



등록특허 10-2070990



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월29일
(11) 등록번호 10-2070990
(24) 등록일자 2020년01월21일

- | | | | |
|-----------------------|-------------------|------------|-----------|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.) | | | |
| C12N 9/04 | (2006.01) | C12N 15/53 | (2006.01) |
| C12Q 1/26 | (2006.01) | | |
| (21) 출원번호 | 10-2013-7005355 | | |
| (22) 출원일자(국제) | 2011년08월04일 | | |
| 심사청구일자 | 2016년07월08일 | | |
| (85) 번역문제출일자 | 2013년02월28일 | | |
| (65) 공개번호 | 10-2013-0105614 | | |
| (43) 공개일자 | 2013년09월25일 | | |
| (86) 국제출원번호 | PCT/JP2011/067898 | | |
| (87) 국제공개번호 | WO 2012/018094 | | |
| 국제공개일자 | 2012년02월09일 | | |
| (30) 우선권주장 | | | |
| JP-P-2010-176967 | 2010년08월06일 | 일본(JP) | |
| JP-P-2010-213070 | 2010년09월24일 | 일본(JP) | |

(56) 서해기술조사문항

JP2010148358 A
Protein Engineering Design & Selection, Vol.
81, No. 4, pp. 823-830 (2009.01.31.)

Journal of Diabetes Science and Technology, Vol. 3, 595-598 (2009-05-.)

PRBC Vol. 211 104-111 (2002)

*는 실사파에 의하여 이용된 문현

(73) 특허권자
기꼬만 가부시키가이샤
일본국 지바켄 노다시 노다 250반지

(72) 발명자
이치야나기 아츠시
2788601 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬
만 가부시키가이샤 내

히로카와 코조
2788601 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬
만 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이의현

(74) 대리의

이월희

전체 천구학 숙 : 총 10 학

신사과 · 노은주

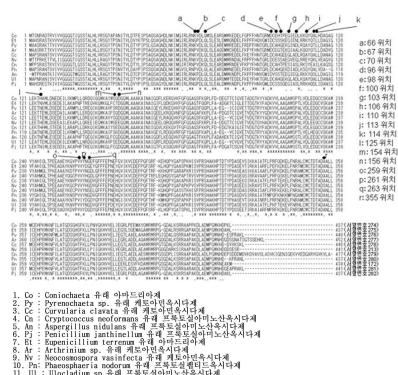
(54) 밤면의 면치 기질 특이성이 개별화 아파드리아제

(57) g 약

본 발명은 프룩토실 바릴-히스티딘(fructosyl valyl-histidine)에 대한 기질 특이성이 높은 아마드리아제(amadoriase)의 제공을 목적으로 한다. 본 발명은 코니오카에타(*Coniochaeta*) 속 유래의 아마드리아제의 98 위치 259 위치 154 위치 125 위치 261 위치 263 위치 106 위치 103 위치 355 위치 96 위치 66 위치 67

(뒷면에 계속)

대 표 도 = 도 1



위치, 70 위치, 100 위치, 110 위치, 113 위치, 114 위치, 및 156 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산에 대응하는 위치에서 1개 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 치환을 가지는 아마드리아제이며, 본 발명에 의해서, ϵ -프룩토실 라이신(ϵ -fructosyl lysine)의 존재하에서도, 당화 헤모글로빈(glycosylated hemoglobin)의 β -사슬 아미노 말단에 유래하는 α -프룩토실 바닐-히스티딘(α -fructosyl valyl-histidine)을 정확하게 측정할 수 있다.

(72) 발명자

타나베 야스코

2788601 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬
만 가부시키가이샤 내

마사카리 요스케

2788601 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬
만 가부시키가이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

아마드리아제 변이체로서,

상기 아마드리아제 변이체는 서열 번호 1의 아마드리아제와 적어도 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖고, 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 아미노산의 하기 (t) ~ (aj)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 또는 그 이상의 아미노산에 대응하는 위치의 아미노산이, 하기 (t) ~ (aj)의 각각에 기재되는 치환 후의 아미노산 잔기로 치환되고 있고, 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환후의 상기 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 바닐 히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는지, 및/또는 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환후의 상기 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제 변이체 :

- (t) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 프롤린 이외의 아미노산, 즉, 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 글리신, 알라닌, 발린, 이소루신, 루신, 메티오닌, 시스테인, 세린, 스레오닌, 아스파라긴, 아스파라긴산, 페닐 알라닌, 타이로신, 또는 트립토판으로 치환;
- (u) 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 알라닌, 시스테인, 또는 세린으로 치환;
- (v) 서열 번호 1의 154 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 글리신, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파라긴산, 글루타민산, 히스티딘, 또는 시스테인으로 치환;
- (w) 서열 번호 1의 125 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 알라닌, 루신, 페닐 알라닌, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 글루타민산, 라이신, 또는 아르기닌으로 치환;
- (x) 서열 번호 1의 263 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 또는 글루타민산으로 치환;
- (y) 서열 번호 1의 355 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 또는 글루타민산으로 치환;
- (z) 서열 번호 1의 103 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 라이신, 아르기닌, 또는 히스티딘으로 치환;
- (aa) 서열 번호 1의 261 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 알라닌, 루신, 페닐 알라닌, 트립토판, 또는 라이신으로 치환;
- (ab) 서열 번호 1의 106 위치에 대응하는 위치의 아미노산이, 아스파라긴산보다도 분자량이 작은 아미노산, 즉, 글리신, 알라닌, 세린, 발린, 스레오닌, 시스테인, 루신, 이소루신, 또는 아스파라긴으로 치환;
- (ac) 서열 번호 1의 96 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 알라닌, 아스파라긴, 히스티딘, 또는 세린으로 치환;
- (ad) 서열 번호 1의 66 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 글리신 또는/및 서열 번호 1의 67 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 프롤린으로 치환;
- (ae) 서열 번호 1의 70 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 프롤린으로 치환;
- (af) 서열 번호 1의 100 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌으로 치환;
- (ag) 서열 번호 1의 110 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 알라닌, 루신, 메티오닌, 페닐 알라닌, 트립토판, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 또는 아르기닌으로 치환;
- (ah) 서열 번호 1의 113 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 글루타민산, 또는 라이신으로 치환;
- (ai) 서열 번호 1의 114 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 라이신, 또는 아르기닌으로 치환;

(aj) 서열 번호 1의 156 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환.

청구항 2

이하의 (ba) ~ (be)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기의 치환을 가지는, 제1항 기재의 아마드리아제 변이체 :

(ba) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환, 서열 번호 1의 154 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;

(bb) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 서열 번호 1의 154 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환;

(bc) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 글루타민으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환;

(bd) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;

(be) 서열 번호 1의 110 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환, 서열 번호 1의 154 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환.

청구항 3

서열 번호 272로 기재된 아미노산 서열을 갖는 아마드리아제에 대하여, 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환, 서열 번호 1의 154 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환을 가지고, 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환 후의 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 바릴 히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있고, 또한, 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환 후의 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제 변이체.

청구항 4

서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열을 갖는 아마드리아제에 대해서 하기의 (ca) ~ (cc)로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산잔기의 치환을 가지고, 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환 후의 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 바릴 히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소 있고, 한편 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서, 치환 후의 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제 변이체 :

(ca) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환, 서열 번호 1의 110 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;

(cb) 서열 번호 1의 98 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;

(cc) 서열 번호 1의 110 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 서열 번호 1의 259 위치에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환.

청구항 5

서열 번호 172로 기재된 아미노산 서열을 갖는 아마드리아제의 변이체로서, 상기 변이체는 서열 번호 172의 153 위치의 시스테인아스파라긴산으로 치환 ;
 서열 번호 172의 259 위치의 발린이 알라닌, 또는 시스테인으로 치환 ; 혹은
 서열 번호 172의 263 위치의 글리신이 라이신, 또는 아르기닌으로 치환을 갖고,
 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환후의 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 바릴 히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는지, 또는
 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 치환후의 상기 아마드리아제 변이체의 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제 변이체 .

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 아마드리아제 유전자.

청구항 7

제6항에 기재된 아마드리아제 유전자를 포함한 재조합 벡터.

청구항 8

제7항에 기재된 재조합 벡터를 포함한 숙주 세포.

청구항 9

하기의 단계를 포함하는 아마드리아제를 제조하는 방법 :

- (ak) 제8항에 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계 ;
- (al) 숙주 세포에 포함되는 아마드리아제 유전자를 발현시키는 단계 ; 및
- (am) 배양물로부터 아마드리아제를 단리하는 단계 .

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 하나에 기재된 아마드리아제 변이체를 포함하는 당화 혜모글로빈의 측정에 이용하기 위한 키트.

청구항 11

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 기질 특이성이 개변된 아마드리아제, 그 유전자 및 재조합 DNA 및 기질 특이성이 개변된 아마드리아

제의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

당화 단백질은 글루코스(glucose) 등의 알도스(aldose)(알데하이드(aldehyde))기를 잠재적으로 가지는 단당 및 그 유도체)의 알데하이드기와 단백질의 아미노기가 비효소적으로 공유결합을 형성하여 아마드리(amadori) 전이 하는 것으로 생성하는 것이다. 상기 단백질의 아미노기는 아미노 말단의 α 아미노기, 단백질중의 라이신 잔기 측쇄의 ϵ 아미노기를 들 수 있다. 생체 내에서 생기는 당화 단백질로서는 혈액중의 혜모글로빈이 당화된 당화 혜모글로빈, 일부민이 당화된 당화 일부민 등이 알려져 있다. 이들 생체 내에서 생기는 당화 단백질 중에서도, 당뇨병의 임상 진단 분야에 있고, 당뇨병 환자의 진단이나 증상 관리를 위해 중요한 혈당 조절 마커로서 당화 혜모글로빈(HbA1c)이 주목받고 있다. 혈액중의 HbA1c 농도는 과거의 일정기간의 평균 혈당치를 반영하고 있어서 그 측정치는 당뇨병의 증상의 진단이나 관리에 있어 중요한 지표가 되고 있다. 상기 HbA1c를 신속하고 간편하게 측정하는 방법으로서 아마드리아제(amadoriase)를 이용하는 효소적 방법, 즉, HbA1c를 프로테아제(protease)등으로 분해하여, β -사슬 아미노 말단에서 유리시킨 α -프룩토실 바릴-히스티딘(α -fructosyl valyl-histidine)(이하, α FVH로 나타낸다), 또는 α -프룩토실 발린(α -fructosyl valine)(이하, α FV로 나타낸다)을 정량하는 방법이 제안되고 있다(예를 들면, 특허 문헌 1 내지 특허문헌 6 참조.). 실제로는, HbA1c로부터 α FV를 잘라내는 방법은 협잡물 등에 의한 영향이 크다고 생각되어 특히 현재는 α FVH를 측정하는 방법이 주류를 이루고 있다.

[0003]

아마드리아제는 산소의 존재하에서 이미노 2 초산(iminodiacetic acid) 또는 그 유도체(아마드리(amadori) 화합물이라고도 한다)를 산화하고, 글리옥실산(glyoxylic acid) 또는 α -케토 알데하이드(α -keto aldehyde), 아미노산 또는 펩티드 및 과산화 수소를 생성하는 반응을 촉매 한다. 상기 아마드리아제는 세균, 효모, 진균류로부터 검출되고 있지만, 특히 HbA1c의 측정에 유용하다. α FVH 및/또는 α FV에 대한 효소 활성을 가지는 아마드리아제는, 예를 들면, 코니오카에타(Coniochaeta) 속, 유페니실리움(Eupenicillium) 속, 아르트리니움(Arthrinium) 속, 커블라리아(Curularia) 속, 렘토스페리아(Leptosphaeria) 속, 네오코스모스포라(Neocosmospora) 속, 오피오볼루스(Ophiobolus) 속, 플레오스포라(Pleospora) 속, 피레노케타(Pyrenopochaeta) 속, 클립토코카스(Cryptococcus) 속, 페오스페리아(Phaeosphaeria) 속, 아스페르길루스(Aspergillus) 속, 울로크라디움(Ulocladium) 속 및 페니실리움(Penicillium) 속 유래의 아마드리아제가 보고되고 있다(예를 들면, 특히 문헌 1, 7 내지 11, 비특허 문헌 1 내지 4 참조.). 또한, 상기 보고된 예시들에서 상기 아마드리아제는, 선행 문헌에 따라서 케토아민 옥시다제(ketoamine oxidase)나 프룩토실 아미노산 옥시다제(fructosyl amino acid oxidase), 프룩토실 펩티드 옥시다제(fructosyl peptide oxidase), 프룩토실 아민 옥시다제(fructosyl amine oxidase) 등의 표현으로 기재되어 있는 경우도 있다. 효소적 방법에 따르는 HbA1c의 측정에 대해서는 아마드리아제의 성질로서 엄밀한 기질 특이성이 요구된다. 예를 들면, 앞서 서술한 바와 같이, 유리된 α FVH를 정량함으로써 HbA1c의 측정을 실시하는 경우에는, 검사대상 물체 중에 유리 상태로 존재하는 및/또는 프로테아제등을 이용한 HbA1c의 처리 공정에 있어 유리된 α FVH 이외의 당화 아미노산이나 당화 펩티드에는 작용하기 어려운 아마드리아제를 이용하는 것이 바람직하다. 특히, 혜모글로빈 분자중에 포함되는 라이신(lysine) 잔기 측쇄의 ϵ 위치의 아미노기는 당화를 받는 것이 알려져 있고, 상기 당화를 받은 라이신 잔기(lysine residue)로 유래하는 ϵ 위치의 아미노기가 당화된 ϵ -프룩토실 라이신(ϵ -fructosyl lysine)(이하, ϵ FK와 나타낸다)이 프로테아제 처리등에 의해서 유리되는 것을 시사하고 있다(예를 들면, 비특허 문헌 5 참조.). 그 때문에, 측정 오차의 원인 물질이 될 수 있는 ϵ FK에 대해 작용하기 어려운 기질 특이성의 높은 아마드리아제가 매우 바람직하다. 한편, 종래 공지된 아마드리아제 대부분은 ϵ FK로의 반응성이 충분히 낮은 것이라고는 할 수 없다.

[0004]

일반적인 기술로서 효소의 기질 특이성을 개변하기 위해서 효소를 코딩하는 DNA에 변이를 가하여 효소의 아미노산에 치환을 도입하고, 얻고자 하는 기질 특이성을 갖춘 효소를 선발하는 방법이 알려져 있다. 또한, 상동성이 높은 효소에 대하여 아미노산 치환에 의해서 기질 특이성을 높였다고 하는 예가 이미 공지된 경우에는, 그 정보를 기초로 기질 특이성의 향상을 예상하는 것이 가능하다. 실제로, 커블라리아 클라바타(Curvularia clavata) YH923 유래의 케토아민 옥시다제 및 네오코스모스포라 바신펙타(Neocosmospora vasinfecta) 474 유래의 케토아민 옥시다제에 대해서 몇 개의 아미노산을 치환하는 것에 의한, α FVH에 대한 기질 특이성이 향상한 개변형 케토아민 옥시다제를 나타내고 있다(특허 문헌 1 참조.). 예를 들면, 커블라리아 클라바타 YH923 유래의 케토아민 옥시다제에 대해서는, 58 위치의 이소루신(isoleucine)을 발린(valine)으로, 62 위치의 아르기닌(arginine)을 히스티딘(histidine)으로, 330 위치의 페닐 알라닌(phenylalanine)을 루신(leucine)으로 치환하는

것으로, ϵ -프룩토실(fructosyl)-(α-벤질옥시카보닐라이신)(benzyloxycarbonyl lysine)(이하, ϵ FZK로 나타낸다)에 대한 효소 활성을 αFVH에 대한 효소 활성으로 나누어 도출한 활성비 ϵ FZK/αFVH가 0.95에서 0.025로 감소하는 것이 나타나고 있다.

[0005]

그러나, 상기 문헌에서 개변형 케토아민 옥시다제의 기질 특이성의 평가에 이용되고 있는 ϵ FZK는, 당화 헤모글로빈을 프로테아제로 처리하는 공정에 대해 실제로 생기는 ϵ FK란, 분자량이나 구조의 부분에서도 상당히 다른 화합물이다. 때문에, ϵ FZK에 대한 반응성이 감소하고 있는 것으로, 실제 측정 오차의 원인 물질이 될 수 있는 ϵ FK에 대한 반응성이 감소했다고는 하기 어렵다. 또한, 상기 문헌 중의 개변형 케토아민 옥시다제를 이용하여 ϵ FK에 대한 반응성의 감소함을 확인하고 있는 취지의 기재도 없다. 그 외에도, 아스페르길루스 니드랑스 (*Aspergillus nidulans*) A89 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제(fructosyl amino acid oxidase)에 아미노산 치환을 도입하여 기질 특이성을 개변하는 것으로써, αFVH에 대한 반응성을 새롭게 부여한 개변형 프룩토실 아미노산 옥시다제가 보고되고 있다(예를 들면, 특허 문헌 10 참조.). 예를 들면, 아스페르길루스 니드랑스 A89 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제의, 59 위치의 세린(serine)을 글리신(glycine)으로, 또한, 65 위치의 라이신(lysine)을 글리신으로, 또는 109 위치의 라이신을 글루타민(glutamine)에 치환하는 것으로써, 새로운 αFVH에 대한 효소 활성이 부여되는 것을 나타내고 있다. 그렇지만, 해당 아미노산 치환이 ϵ FK에 대한 반응성의 감소에 기여한다라는 기재는 없다. 나아가, 그 밖에도, 아스페르길루스 니드랑스 A89 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에 아미노산 치환을 도입하여 기질 특이성을 개변하는 것으로, ϵ FK에 대한 효소 활성을 αFV에 대한 효소 활성으로 나누어 도출한 활성비 ϵ FK/αFV를 감소시킨 개변형 프룩토실 아미노산 옥시다제가 보고되고 있다(예를 들면, 특허 문헌 12 참조.). 그렇지만, 이 개변 효소의 αFVH에 대한 효소 활성에 대해서는 아무런 언급되어 있지 않다. 즉, 천연형 혹은 변이형 아마드리아제를 포함하여 ϵ FK에 대한 효소 활성을 αFVH에 대한 효소 활성으로 나누어 도출한 활성비 ϵ FK/αFVH가 낮은, 및/또는 ϵ FK/αFV가 낮은 아마드리아제의 예는, 지금까지 극히 소수가 보고되고 있는 것에 지나지 않아, 정밀도가 높은 HbA1c의 측정을 실현할 수 있는 ϵ FK에 대한 반응성이 충분히 낮은 아마드리아제가 여전히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006]

- (특허문헌 0001) [특허 문헌 1] 국제 공개 제 2004/104203호.
- (특허문헌 0002) [특허 문헌 2] 국제 공개 제 2005/49857호.
- (특허문헌 0003) [특허 문헌 3] 특개 2001-95598호 공보.
- (특허문헌 0004) [특허 문헌 4] 특공평 05-33997호 공보.
- (특허문헌 0005) [특허 문헌 5] 특개평 11-127895호 공보.
- (특허문헌 0006) [특허 문헌 6] 국제 공개 제 97/13872호.
- (특허문헌 0007) [특허 문헌 7] 특개 2003-235585호 공보.
- (특허문헌 0008) [특허 문헌 8] 특개 2004-275013호 공보.
- (특허문헌 0009) [특허 문헌 9] 특개 2004-275063호 공보.
- (특허문헌 0010) [특허 문헌 10] 특개 2010-35469호 공보.
- (특허문헌 0011) [특허 문헌 11] 특개 2010-57474호 공보.
- (특허문헌 0012) [특허 문헌 12] 특개 2010-104278호 공보.

비특허문헌

[0007]

- (비)특허문헌 0001) [비특허 문헌 1] Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 104-11, 2003
- (비)특허문헌 0002) [비특허 문헌 2] Biotechnol. Bioeng. 106, 358-66, 2010

- (비)특허문현 0003) [비특허 문현 3] J. Biosci. Bioeng. 102, 241-3, 2006
 (비)특허문현 0004) [비특허 문현 4] Eur. J. Biochem. 242, 499-505, 1996
 (비)특허문현 0005) [비특허 문현 5] J. Biol. Chem. 279, 27613-20, 2004

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하려고 하는 과제는 ε FK에 대한 반응성, 구체적으로는, ε FK/ α FVH가 낮은, 및/또는 ε FK/ α FV가 낮은 아마드리아제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 상기 과제 해결을 위해서 열심히 연구를 거듭한 결과, 코니오카에타(*Coniochaeta*) 속 유래의 아마드리아제(*amadoriase*)에 있어서 특정의 아미노산 잔기를 특정의 아미노산 잔기로 치환하는 것으로 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성했다.

[0010] 따라서, 본 발명은 이하와 같다.

[0011] (1) 하기의 (a) 및/또는 (b)의 성질을 가지는 아마드리아제(*amadoriase*):

[0012] (a) 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열에 하나 또는 몇 개의 아미노산의 결실, 삽입, 부가, 및/또는 치환이 이루어진 아미노산 서열을 가지고, 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 아마드리아제와 비교해서 α -프룩토실 바릴-히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ε -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있다.

[0013] (b) 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열에 하나 또는 몇 개의 아미노산의 결실, 삽입, 부가, 및/또는 치환이 이루어진 아미노산 서열을 가지고, 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 아마드리아제와 비교하여 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ε -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있다.

[0014] (2) 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열의 하기 (c)로부터 (s)로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산에 대응하는 위치에서 1개 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 치환을 가지며, 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 α -프룩토실 바릴-히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ε -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는지 및/또는 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ε -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제.

[0015] (c) 98 위치의 글루타민산.

[0016] (d) 259 위치의 발린.

[0017] (e) 154 위치의 세린.

[0018] (f) 125 위치의 히스티딘.

[0019] (g) 261 위치의 타이로신.

[0020] (h) 263 위치의 글리신.

[0021] (i) 106 위치의 아스파라긴산.

[0022] (j) 103 위치의 글리신.

[0023] (k) 355 위치의 알라닌.

- [0024] (1) 96 위치의 아스파라진산.
- [0025] (s) 66 위치의 라이신 또는/및 67 위치의 발린.
- [0026] (m) 70 위치의 글루타민.
- [0027] (o) 100 위치의 스레오닌.
- [0028] (p) 110 위치의 글루타민.
- [0029] (q) 113 위치의 알라닌.
- [0030] (r) 114 위치의 루신.
- [0031] (s) 156 위치의 아스파라진산.
- [0032] (3) 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열의 아미노산 하기 (t)로부터 (aj)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 또는 그 이상의 아미노산에 대응하는 위치의 아미노산이, 하기 (t)로부터 (aj)의 각각에 기재되는 치환 후의 아미노산 잔기로 치환되고 있어 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 α -프룩토실 바릴-히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ε -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는지, 및/또는 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교하여, α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ε -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제:
- [0033] (t) 98 위치의 글루타민산이 프롤린 이외의 아미노산, 즉 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 글리신, 알라닌, 발린, 이소루신, 루신, 메티오닌, 시스테인, 세린, 스레오닌, 아스파라긴, 아스파라진산, 페닐 알라닌, 타이로신, 트립토판으로 치환;
- [0034] (u) 259 위치의 발린이 알라닌, 시스테인, 세린으로 치환;
- [0035] (v) 154 위치의 세린이 글리신, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파라진산, 글루타민산, 히스티딘, 시스테인으로 치환;
- [0036] (w) 125 위치의 히스티딘이 알라닌, 루신, 페닐 알라닌, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 글루타민산, 라이신, 아르기닌으로 치환;
- [0037] (x) 261 위치의 타이로신이 알라닌, 로이신, 페닐 알라닌, 트립토판, 라이신으로 치환;
- [0038] (y) 263 위치의 글리신이 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라진산, 글루타민산으로 치환;
- [0039] (z) 106 위치의 아스파라진산이, 아스파라진산보다 분자량이 작은 아미노산, 즉 글리신, 알라닌, 세린, 발린, 스레오닌, 시스테인, 루신, 이소루신, 아스파라긴으로 치환;
- [0040] (aa) 103 위치의 글리신이 라이신, 아르기닌, 히스티딘으로 치환;
- [0041] (ab) 355 위치의 알라닌이 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라진산, 글루타민산으로 치환;
- [0042] (ac) 96 위치의 아스파라진산이 알라닌, 아스파라긴, 히스티딘, 세린으로 치환;
- [0043] (ad) 66 위치의 라이신이 글리신 또는/및 67 위치의 발린이 프롤린으로 치환;
- [0044] (ae) 70 위치의 글루타민이 프롤린으로 치환;
- [0045] (af) 100 위치의 스레오닌이 아르기닌으로 치환;
- [0046] (ag) 110 위치의 글루타민이 알라닌, 루신, 메티오닌, 페닐 알라닌, 트립토판, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 아르기닌으로 치환;
- [0047] (ah) 113 위치의 알라닌이 글루타민산, 라이신으로 치환;
- [0048] (ai) 114 위치의 루신이 라이신, 아르기닌으로 치환;
- [0049] (aj) 156 위치의 아스파라진산이 아스파라긴으로 치환.

- [0050] (4) 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열에 대하여, 하기의 (ba)로부터 (be)로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기의 치환을 가지는 상기(3)에 기재한 아마드리아제:
- [0051] (ba) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로 치환, 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;
- [0052] (bb) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환;
- [0053] (bc) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 글루타민으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환;
- [0054] (bd) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;
- [0055] (be) 110 위치의 글루타민에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환, 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환.
- [0056] (5) 서열 번호 272로 기재되는 아미노산 서열에 대하여 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환, 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환을 가지고, 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서, α -프룩토실 바릴-히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있고, 또한 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교하여 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제.
- [0057] (6) 서열 번호 241로 기재되는 아미노산 서열에 대하여 하기의 (ca)로부터 (cc)로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기의 치환을 가지고 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교하여 α -프룩토실 바릴-히스티딘에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있어, 또한 상기 치환을 실시하기 전의 아마드리아제와 비교해서 α -프룩토실 발린에 대한 반응성에 대하여 ϵ -프룩토실 라이신에 대한 반응성의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 하는 아마드리아제:
- [0058] (ca) 98 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환, 110 위치의 라이신에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;
- [0059] (cb) 98 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환;
- [0060] (cc) 110 위치의 라이신에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환.
- [0061] (7) 상기 (1) 내지 (6)의 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 코드하는 아마드리아제 유전자.
- [0062] (8) 상기 (7)에 기재된 아마드리아제 유전자를 포함한 재조합 벡터.
- [0063] (9) 상기 (8)에 기재된 재조합 벡터를 포함한 숙주 세포(host cell).
- [0064] (10) 아마드리아제를 제조하는 방법이며, 하기의 단계를 포함한 방법:
- [0065] (ak) 상기 (6) 기재의 숙주 세포를 배양하는 단계;
- [0066] (al) 숙주 세포에 포함되는 아마드리아제 유전자를 발현시키는 단계; 및

[0067] (am) 배양물로부터 아마드리아제를 단리하는 단계.

[0068] (11) 상기 (1) 내지 (6)의 어느 하나에 기재된 아마드리아제를 포함하는 당화 혈모글로빈의 측정에 이용하기 위한 키트.

[0069] 본 명세서는 본 출원의 우선권의 기초인 일본 특허 출원 제 2010-176967호 및 제 2010-213070호의 명세서 및/또는 도면에 기재되는 내용을 포함한다.

발명의 효과

[0070] 본 발명에 의하면, 당뇨병의 진단용 효소로서 또는 당뇨병 마커의 측정 키트에 유용하게 이용될 수 있는 기질 특이성이 뛰어난 아마드리아제, 구체적으로는, ϵ FK/ α FVH가 낮은, 및/또는 ϵ FK/ α FV가 낮은 아마드리아제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 각종 공지의 아마드리아제의 아미노산 서열에서의 상동성을 예시하는 도이다.

도 2는 본 발명의 아마드리아제에 의한 α FVH의 정량성을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

(아마드리아제)

[0074] 아마드리아제(amadoriase)는 케토아민 옥시다제(ketoamine oxidase), 프룩토실 아미노산 옥시다제(fructosyl amino acid oxidase), 프룩토실 펩티드 옥시다제(fructosyl peptide oxidase), 프룩토실 아민 옥시다제(fructosyl amine oxidase)라고도 하며 산소의 존재하에서, 아미노 2 초산(iminodiacetic acid) 또는 그 유도체(아마드리(amadori) 화합물)를 산화하고, 글리옥실산(glyoxylic acid) 또는 α -케토 알데하이드(α -keto aldehyde), 아미노산 또는 펩티드 및 과산화 수소를 생성하는 반응을 촉매하는 효소를 말한다. 아마드리아제는 자연계에 넓게 분포하고 있어, 미생물이나, 동물 또는 식물 기원의 효소를 탐색하는 것으로 얻을 수 있다. 미생물에 있어서, 예를 들면, 사상균, 효모, 또는 세균등으로부터 얻을 수 있다.

[0075] 본 발명의 아마드리아제는 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 코니오카에타(*Coniochaeta*) 속 유래의 아마드리아제에 근거하여 제작된 기질 특이성이 개변된 아마드리아제의 개변체이다. 이러한 변이체의 예로는, 서열 번호 1로 높은 서열 동일성(예를 들면, 75% 이상, 바람직하게는, 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 한층 더 바람직하게는 95% 이상, 한층 더 바람직하게는 97% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상)을 가지는 아미노산 서열을 가지는 아마드리아제 및 서열 번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1개에서 몇 개의 아미노산이 개변 또는 변이, 또는, 결실, 치환, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열을 가지는 아마드리아제를 들 수 있다. 또한, 청구의 범위에 기재된 기질 특이성 및/또는 아미노산 서열에 관한 조건을 만족하는한, 예를 들면, 유포니실리움(*Eupenicillium*) 속, 아르트리니움(*Arthrinium*) 속, 커블라리아(*Curularia*) 속, 레프트스페리아(*Leptosphaeria*) 속, 네오코스모스포라(*Neocosmospora*) 속, 오피오볼루스(*Ophiobolus*) 속, 플레오스포라(*Pleospora*) 속, 피레노케타(*Pyrenophaeta*) 속, 아스페르길루스(*Aspergillus*) 속, 클립토코카스(*Cryptococcus*) 속, 페오스페리아(*Phaeosphaeria*) 속, 울로크라디움(*Ulocladium*) 속 또는 페니실리움(*Penicillium*) 속과 같은 다른 생물종에 유래하는 아마드리아제에 근거하여 제작된 것이라도 좋다.

[0076] 기질 특이성이 개변된 아마드리아제의 개변체는 아마드리아제의 아미노산 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산 잔기를 치환하는 것에 의해서 얻을 수 있다. 기질 특이성의 개변을 가져오는 아미노산의 치환으로서 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열에서의 하기의 위치의 아미노산에 대응하는 위치의 아미노산의 치환을 들 수 있다.

- [0077] (1) 98 위치의 글루타민산의 치환, 예를 들면, 프롤린 이외의 아미노산, 즉 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 글리신, 알라닌, 발린, 이소루신, 루신, 메티오닌, 시스테인, 세린, 스레오닌, 아스파라긴, 아스파라진산, 페닐 알라닌, 타이로신, 트립토판으로의 치환.
- [0078] (2) 259 위치의 발린의 치환, 예를 들면, 알라닌, 시스테인, 세린으로의 치환.
- [0079] (3) 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, 글리신, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파라진산, 글루타민산, 히스티딘, 시스테인으로의 치환.
- [0080] (4) 125 위치의 히스티딘의 치환, 예를 들면, 알라닌, 루신, 페닐 알라닌, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 글루타민산, 라이신, 아르기닌으로의 치환.
- [0081] (5) 261 위치의 타이로신의 치환, 예를 들면, 알라닌, 루신, 페닐 알라닌, 트립토판, 라이신으로의 치환.
- [0082] (6) 263 위치의 글리신의 치환, 예를 들면, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라진산, 글루타민산으로의 치환.
- [0083] (7) 106 위치의 아스파라진산의 치환, 예를 들면, 아스파라진산보다 분자량이 작은 아미노산, 즉 글리신, 알라닌, 세린, 발린, 스레오닌, 시스테인, 루신, 이소루신, 아스파라긴으로의 치환.
- [0084] (8) 103 위치의 글리신의 치환, 예를 들면, 라이신, 아르기닌, 히스티딘으로의 치환.
- [0085] (9) 355 위치의 알라닌의 치환, 예를 들면 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라진산, 글루타민산으로의 치환.
- [0086] (10) 96 위치의 아스파라진산으로의 치환, 예를 들면, 알라닌, 아스파라긴, 히스티딘, 세린으로의 치환.
- [0087] (11) 66 위치의 라이신의 치환, 예를 들면, 글리신으로의 치환.
- [0088] (12) 67 위치의 발린의 치환, 예를 들면, 프롤린으로의 치환.
- [0089] (13) 70 위치의 글루타민의 치환, 예를 들면, 프롤린으로의 치환.
- [0090] (14) 100 위치의 스레오닌의 치환, 예를 들면, 아르기닌으로의 치환.
- [0091] (15) 110 위치의 글루타민의 치환, 예를 들면, 알라닌, 루신, 메티오닌, 페닐 알라닌, 트립토판, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 아르기닌으로의 치환.
- [0092] (16) 113 위치의 알라닌의 치환, 예를 들면, 글루타민산, 라이신으로의 치환.
- [0093] (17) 114 위치의 루신의 치환, 예를 들면, 라이신, 아르기닌으로의 치환.
- [0094] (18) 156 위치의 아스파라진산의 치환, 예를 들면, 아스파라긴으로의 치환.
- [0095] 기질 특이성이 개변한 아마드리아제의 변이체는 상기 아미노산 치환을 적어도 1개를 가지고 있으면 좋고, 복수의 아미노산 치환을 가지고 있어도 좋다. 예를 들면, 상기 아미노산 치환의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18을 가지고 있다. 그 중에서도, 하기의 아미노산의 위치에 대응하는 아미노산의 치환을 가지고 있는 변이체가 바람직하다. 본 발명에 있어서, 예를 들면, 제 110 위치의 글루타민(Q)이 아르기닌(R)으로 치환된 변이를 Q110R로 나타낸다.
- [0096] 66 위치의 라이신 및 67 위치의 발린의 치환, 예를 들면, K66G 및 V67P를 가지는 변이체.
- [0097] 66 위치의 라이신, 67 위치의 발린 및 98 위치의 글루타민산의 치환, 예를 들면, K66G, V67P 및 E98A을 가지는 변이체.
- [0098] 66 위치의 라이신, 67 위치의 발린 및 110 위치의 글루타민의 치환, 예를 들면, K66G, V67P 및 Q110R를 가지는 변이체.
- [0099] 98 위치의 글루타민산 및 110 위치의 글루타민의 치환, 예를 들면, E98A 및 Q110R을 가지는 변이체.
- [0100] 110 위치의 글루타민 및 125 위치의 히스티딘의 치환, 예를 들면, Q110R 및 H125Q를 가지는 변이체.
- [0101] 110 위치의 글루타민 및 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, Q110R 및 S154G 또는 S154N을 가지는 변이체.

- [0102] 110 위치의 글루타민 및 355 위치의 알라닌의 치환, 예를 들면, Q110R 및 A355K를 가지는 변이체.
- [0103] 98 위치의 글루타민산 및 103 위치의 글리신의 치환, 예를 들면, E98A 및 G103R을 가지는 변이체.
- [0104] 98 위치의 글루타민산 및 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, E98A 또는 E98R 및 S154N을 가지는 변이체.
- [0105] 110 위치의 글루타민 및 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, Q110R 및 S154C를 가지는 변이체.
- [0106] 98 위치의 글루타민산, 106 위치의 아스파라긴산 및 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, E98A, D106S 및 S154N을 가지는 변이체.
- [0107] 98 위치의 글루타민산, 110 위치의 글루타민 및 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, E98A, Q110R 및 S154N을 가지는 변이체.
- [0108] 110 위치의 글루타민, 125 위치의 히스티딘 및 154 위치의 세린의 치환, 예를 들면, Q110R, H125Q 및 S154N을 가지는 변이체.
- [0109] 98 위치의 글루타민산 및 259 위치의 발린의 치환, 예를 들면, E98Q 및 V259A, E98Q 및 V259C, E98H 및 V259A, E98H 및 V259C, E98R 및 V259C, E98A 및 V259C를 가지는 변이체.
- [0110] 98 위치의 글루타민산 및 263 위치의 글리신의 치환, 예를 들면, E98A 및 G263R을 가지는 변이체.
- [0111] 110 위치의 글루타민 및 259 위치의 발린의 치환, 예를 들면, Q110R 및 V259A를 가지는 변이체.
- [0112] 154 위치의 세린 및 259 위치의 발린의 치환, 예를 들면, S154D 및 V259A를 가지는 변이체.
- [0113] 98 위치의 글루타민산, 154 위치의 세린 및 259 위치의 발린의 치환, 예를 들면, E98A, S154N 및 V259C를 가지는 변이체.
- [0114] 110 위치의 글루타민, 154 위치의 세린 및 259 위치의 발린의 치환, 예를 들면, Q110R, S154N 및 V259A를 가지는 변이체.
- [0115] 이러한 아미노산 치환의 조합 중에서도 하기의 (ba) ~ (be)의 몇 개의 조합이 바람직하다.
- [0116] (ba) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환, 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환.
- [0117] (bb) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환.
- [0118] (bc) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 글루타민으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환.
- [0119] (bd) 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 시스테인으로의 치환.
- [0120] (be) 110 위치의 글루타민에 대응하는 위치의 아미노산의 아르기닌으로의 치환, 154 위치의 세린에 대응하는 위치의 아미노산의 아스파라긴으로의 치환 및 259 위치의 발린에 대응하는 위치의 아미노산의 알라닌으로의 치환.
- [0121] 본 발명의 기질 특이성이 개변된 아마드리아제 변이체는 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열에 대하여 상기의 기질 특이성의 개변을 가져오는 아미노산의 치환을 가지고, 그러한 치환 아미노산 이외의 위치에서 한층 더 1개 또는 몇 개(예를 들면 1~10개, 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개, 특히 바람직하게는 1개)의 아미노산이 결실, 삽입, 부가 및/또는 치환된 아미노산 서열로부터 구성되어, 아마드리아제 활성을 가지는 기질 특이성이 개변된 아마드리아제 변이체를 포함한다. 게다가 상기의 기질 특이성의 개변을 가져오는 아미노산의 치환 변이, 내열성을 향상시키는 아미노산의 치환 변이를 가지고, 서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 치환한 아미노산 이외의 아미노산을 제외한 부분의 아미노산 서열에 대하여, 90% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 한층 더 바람직하게는 97% 이상, 특히 바람직하게는 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열로 구성되어, 아마드리아제 활성을 가지고 기질 특이성이 개변된 아마드리아제 변이체를 포함한다.
- [0122] 상기 아미노산 치환에 대하여 아미노산의 위치는 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열에서의 위치를 나타내고 있지만, 다른 생물종 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열에 대하여

서열 번호 1로 기재되는 아미노산 서열에서의 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 치환되고 있다. 대응하는 위치의 의미에 대해서는 나중에 설명한다.

[0123] (아마드리아제를 코드(code)하는 유전자의 취득)

이러한 아마드리아제를 코드하는 본 발명의 유전자(이하, 간단히 아마드리아제 유전자라고 한다)를 얻으려면, 통상 일반적으로 이용되고 있는 유전자의 클로닝 방법이 이용된다. 예를 들면, 아마드리아제 생산능을 가지는 미생물 균체나 여러 가지의 세포로부터 상법(常法), 예를 들면, Current Protocols in Molecular Biology(WILEY Interscience, 1989)에 기재된 방법에 의하여 염색체 DNA 또는 mRNA를 추출할 수 있다. 나약 mRNA를 주형으로서 cDNA를 합성할 수 있다. 이와 같이 수득한 염색체 DNA 또는 cDNA를 이용하여 염색체 DNA 또는 cDNA의 라이브러리를 제작할 수 있다.

[0125] 그 다음에, 상기 아마드리아제의 아미노산 서열에 근거하여 적당한 프로브(probe) DNA를 합성하고, 이것을 이용하여 염색체 DNA 또는 cDNA의 라이브러리로부터 아마드리아제 유전자를 선발하는 방법, 또는, 상기 아미노산 서열에 근거하여 적당한 프라이머 DNA를 제작하고, 5' RACE(rapid amplification of cDNA ends)법이나 3' RACE법 등의 적당한 폴리머라제 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR법)에 의하여 아마드리아제를 코드하는 목적의 유전자 단편을 포함한 DNA를 증폭시켜, 상기 증폭된 DNA 단편을 연결시키고 목적 아마드리아제 유전자의 전체 길이를 포함한 DNA를 얻을 수 있다.

[0126] 이와 같이 수득된 아마드리아제를 코드하는 유전자가 바람직한 일례로서 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제 유전자(특히 문헌 7)를 들 수 있다.

[0127] 이러한 아마드리아제 유전자는 상기 방법대로 각종 벡터에 연결되고 있는 것이, 취급상 바람직하다. 예를 들면, *Coniochaeta sp. NISL 9330* 균주 유래의 아마드리아제 유전자를 코드하는 DNA를 포함한 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP(특히 문헌 7)로부터, QIAGEN(퀴아젠 사제)를 이용하는 것으로, 아마드리아제 유전자를 코드하는 DNA를 추출, 정제하여 얻을 수 있다.

[0128] (벡터)

[0129] 본 발명에 있어서 이용할 수 있는 벡터로서는 상기 플라스미드(plasmid)로 한정되지 않고, 그 이외의, 예를 들면, 박테리오파지(bacteriophage), 코스미드(cosmid) 등의 당업자에게 공지의 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면, pBluescript IISK(스트라타젠 사제) 등이 바람직하다.

[0130] (아마드리아제 유전자의 변이 처리)

[0131] 아마드리아제 유전자의 변이 처리는 계획하는 변이 형태에 맞춘 공지의 임의의 방법으로 실시할 수 있다. 즉, 아마드리아제 유전자 또는 해당 유전자가 편입된 재조합 DNA와 변이원이 되는 약제를 접촉 및 작용시키는 방법; 자외선 조사법, 유전자 공학적 방법 또는 단백질 공학적 방법을 구사하는 방법 등을 넓게 이용할 수 있다.

[0132] 상기 변이 처리에 이용되는 변이원이 되는 약제로는, 예를 들면, 히드록실 아민, N-메틸-N'-나트로-N-나트로소구아니딘(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), 아초산(nitrous acid), 아황산(sulfurous acid), 하이드라진(hydrazine), 포름산(formic acid), 또는 5-브로모우라실(bromouracil) 등을 들 수 있다.

[0133] 이러한 접촉 및 작용의 제조건은 이용하는 약제의 종류 등에 따른 조건을 뽑는 것이 가능하고, 현실로 원하는 변이를 아마드리아제 유전자에 대해 야기할 수 있는 한 특히 한정되지 않는다. 통상, 바람직하게는 0.5~12 M의 상기 약제 농도에 대하여 20~80°C의 반응 온도하에서 10분간 이상, 바람직하게는 10~180분간 접촉 및 작용시키는 것으로, 원하는 변이를 야기할 수 있다. 자외선 조사를 실시하는 경우에 있어서도 상기와 같이 상법(常法)에 따라 실시할 수 있다(현대 화학, 024~30, 1989년 6월호).

[0134] 단백질 공학적 방법을 구사하는 방법으로는, 일반적으로, 부위-특이적 돌연변이(Site-Specific Mutagenesis)로 알려진 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, Kramer법(Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984) Methods Enzymol., 154, 350 (1987) Gene, 37, 73 (1985)), Eckstein법(Nucleic Acids Res., 13, 8749 (1985) Nucleic Acids Res., 13, 8765 (1985) Nucleic Acids Res., 14, 9679 (1986)), Kunke1법(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,

82, 488 (1985) Methods Enzymol., 154, 367 (1987)) 등을 들 수 있다.

[0135] 또한, 일반적인 PCR법으로서 알려진 방법을 이용할 수도 있다(Technique, 1, 11 (1989) 참조). 나아가 상기 유전자 개변법 외에, 유기 합성법 또는 효소 합성법으로 직접 원하는 개변 아마드리아제 유전자를 합성할 수도 있다.

[0136] 상기 방법에 의해 얻을 수 있는 아마드리아제 유전자의 DNA 염기 서열의 결정 또는 확인을 실시하는 경우, 예를 들면, 멀티-케필러리(Multi-Capillary) DNA 분석 시스템 CEQ2000(beckman coulter 사제) 등을 이용하는 것으로 실시할 수 있다.

[0137] (형질 전환 · 형질 도입)

[0138] 상기에서 설명한 바와 같이 수득한 아마드리아제 유전자를 상기 방법에 의해서 박테리오파지, 코스미드, 또는 원핵세포 또는 진핵세포의 형질 전환에 이용되는 플라스미드(plasmid)등의 벡터에 편입하여, 각각의 벡터에 대응하는 숙주를 상법(常法)에 의해서 형질 전환 또는 형질 도입할 수 있다. 예를 들면, 숙주로서 에스cherichia (Escherichia) 속에 속하는 미생물, 예를 들면 수득한 재조합 DNA를 이용하여 예를 들면, 대장균 K-12 균주, 바람직하게는 대장균 JM109 균주, 대장균 DH5 α 균주(모두 다카라 바이오 사제) 등을 형질 전환 또는 그것들에 형질 도입해 각각의 균주를 얻는다.

[0139] (아미노산 서열의 상동성)

[0140] 아미노산 서열의 상동성을, GENETYX-Mac(Software Development 사제)의 맥시멈 매칭(Maximum matching)이나 서치호모로지(search homology) 등의 프로그램, 또는 DNASIS Pro(히타치 소프트 사)의 맥시멈 매칭이나 멀티플 얼라이먼트(multiful alignment) 등의 프로그램에 의해 계산할 수 있다.

[0141] (아미노산에 대응하는 위치의 특징)

[0142] 아미노산에 대응하는 위치란, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열의 특정의 위치의 아미노산에 대응하는 다른 생물종 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열에 있어서의 위치를 말한다.

[0143] 아미노산에 대응하는 위치를 특정하는 방법으로서, 예를 들면 리프만-퍼슨법등의 공지의 알고리즘을 이용해 아미노산 서열을 비교하여 각 아마드리아제의 아미노산 서열 중에 존재하는 보존된 아미노산 잔기에 최대의 상동성을 부여하는 것에 의해 실시할 수 있다. 아마드리아제의 아미노산 서열을 이러한 방법으로 정렬시키는 것으로써, 아미노산 서열 중에 어떤한 삽입, 결실과 관계없이, 상동 아미노산 잔기의 각 아마드리아제 서열에서의 서열 중의 위치를 결정하는 것이 가능하다. 상동 위치는 삼차원 구조 중에서 같은 위치에 존재한다고 생각할 수 있어 대상이 되는 아마드리아제의 특이적 기능에 관해서 유사한 효과를 가지는 것을 추정할 수 있다. 도 1에 여러 가지의 생물종 유래의 아마드리아제 서열의 정렬(alignment)을 나타낸다. 도 1에서 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열의 특정의 위치의 아미노산에 대응하는 다른 생물종 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열에서의 위치를 알 수 있다. 도 1에는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제, 유페니실리움 테레눔(Eupenicillium terrenum) 유래의 아마드리아제, 피레노카에타 서브틸러스(Pyrenophaeta sp.) 유래의 케토아민 옥시다제, 아르시니움 서브틸러스(Arthrinium sp.) 유래의 케토아민 옥시다제, 커블라리아 클라바타(Curvularia clavata) 유래의 케토아민 옥시다제, 네오코스모포라 바신펙타(Neocosmospora vasinfecta) 유래의 케토아민 옥시다제, 크립토코쿠스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans) 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제, 패오스페리아 노도룸(Phaeosphaeria nodorum) 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제, 아스페길러스 니둘란스(Aspergillus nidulans) 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제, 울로크라디움 서브틸러스(Ulocladium sp.) 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제 및 페니실리움 잔티넬룸(Penicillium janthinellum) 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제의 아미노산 서열이 기재되어 있다.

[0144] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 66 위치의 라이신에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 66 위치의 라이신에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다.

이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0145] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 66 위치의 글리신, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 66 위치의 라이신, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 66 위치의 프롤린, *Curvularia clavata* 유래의 케트아민 옥시다제에서는 66 위치의 라이신, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 66 위치의 라이신, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 66 위치의 프롤린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 66 위치의 프롤린, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 65 위치의 라이신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 66 위치의 라이신, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 66 위치의 글리신이다.

[0146] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 67 위치의 발린에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 67 위치의 발린에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0147] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 67 위치의 프롤린, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 66 위치의 프롤린, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 67 위치의 발린, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 67 위치의 프롤린이다.

[0148] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 70 위치의 글루타민에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 70 위치의 글루타민에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0149] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 70 위치의 글루타민, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 69 위치의 글루타민, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 70 위치의 글루타민이다.

[0150] 또한, 본 발명에 있어서 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 96 위치의 아스파라긴산에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 96 위치의 아스파라긴산에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0151] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 95 위치의 아스파라긴산, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 96 위치의 아스파라긴산이다.

- [0152] 또한, 본 발명에 있어서 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산에 대응하는 위치란, 정확한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 98 위치의 글루타민산에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.
- [0153] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 98 위치의 세린, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 98 위치의 알라닌, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 98 위치의 글루타민산, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 98 위치의 알라닌, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 98 위치의 글루타민산, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 98 위치의 알라닌, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 펩티드 옥시다제에서는 98 위치의 알라닌, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 97 위치의 세린, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 98 위치의 알라닌, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 98 위치의 세린이다.
- [0154] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 100 위치의 스레오닌에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 100 위치의 스레오닌에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.
- [0155] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 100 위치의 세린, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 100 위치의 글리신, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 100 위치의 스레오닌, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 100 위치의 글리신, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 100 위치의 세린, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 100 위치의 스레오닌, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 펩티드 옥시다제에서는 100 위치의 글리신, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 99 위치의 스레오닌, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 100 위치의 글리신, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 100 위치의 세린이다.
- [0156] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 103 위치의 글리신에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.
- [0157] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 103 위치의 글리신, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 103 위치의 글리신, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 103 위치의 글리신, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 103 위치의 글리신, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 103 위치의 세린, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 103 위치의 세린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 펩티드 옥시다제에서는 103 위치의 아스파라긴산, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 102 위치의 글리신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 103 위치의 글리신, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 103 위치의 글리신이다.
- [0158] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 106 위치의 아스파라긴산에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 106 위치의 아스파라긴산에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.
- [0159] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 106 위치의 아스파라긴, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 106 위치의 아스파라긴산, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 106 위치의 알라닌, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 106 위치의 아스파라긴산, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 106 위치의 글리신, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아

미노산 옥시다제에서는 106 위치의 세린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 106 위치의 아스파라긴산, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 105 위치의 글리신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 106 위치의 아스파라긴산, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 106 위치의 세린이다.

[0160] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 110 위치의 글루타민에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0161] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 110 위치의 라이신, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 110 위치의 알라닌, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 110 위치의 글루타민, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 110 위치의 알라닌, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 110 위치의 글루타민산, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 110 위치의 세린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 110 위치의 글리신, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 109 위치의 라이신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 110 위치의 알라닌, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 110 위치의 라이신이다.

[0162] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 113 위치의 알라닌에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 113 위치의 알라닌에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0163] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 113 위치의 스레오닌, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 113 위치의 스레오닌, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 113 위치의 스레오닌, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 113 위치의 알라닌, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 113 위치의 라이신, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 113 위치의 알라닌, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 113 위치의 알라닌, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 112 위치의 세린, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 113 위치의 알라닌, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 113 위치의 아스파라긴산이다.

[0164] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 114 위치의 루신에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0165] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 114 위치의 루신, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 114 위치의 루신, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 114 위치의 루신, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 114 위치의 루신, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 114 위치의 루신, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 114 위치의 이소루신, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 114 위치의 루신, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 113 위치의 루신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 114 위치의 루신, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 114 위치의 루신이다.

[0166] 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것도 상기의 방법으로 아미노산 서열을 정렬시키는 것으로써 특정할 수 있다.

- [0167] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 125 위치의 아스파라긴, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 125 위치의 아스파라긴, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 125 위치의 스레오닌, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 125 위치의 스레오닌, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 125 위치의 히스티딘, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 125 위치의 히스티딘, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 123 위치의 아스파라긴, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 124 위치의 아스파라긴, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 125 위치의 스레오닌, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 125 위치의 아스파라긴이다.
- [0168] 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 154 위치의 세린에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것도 상기의 방법으로 아미노산 서열을 정렬시키는 것으로써 특정할 수 있다.
- [0169] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 154 위치의 시스테인, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 154 위치의 세린, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 154 위치의 세린, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 154 위치의 세린, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 154 위치의 세린, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 154 위치의 세린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 152 위치의 세린, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 153 위치의 시스테인, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 154 위치의 세린, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 154 위치의 시스테인이다.
- [0170] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 156 위치의 아스파라긴산에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 156 위치의 아스파라긴산에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것에 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.
- [0171] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 156 위치의 아스파라긴산, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 156 위치의 아스파라긴산, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 156 위치의 아스파라긴산, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 156 위치의 아스파라긴산, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 156 위치의 글루타민산, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 156 위치의 아스파라긴산, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 154 위치의 아스파라긴산, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 155 위치의 아스파라긴산, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 156 위치의 아스파라긴산, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 156 위치의 아스파라긴산이다.
- [0172] 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 259 위치의 발린에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것도 상기의 방법으로 아미노산 서열을 정렬시키는 것으로써 특정할 수 있다.
- [0173] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 259 위치의 발린, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 257 위치의 발린, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 259 위치의 발린, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 257 위치의 발린, *Neocosmospora vasinfecta* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 259 위치의 발린, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 259 위치의 발린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 255 위치의 발린, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 259 위치의 발린, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 257 위치의 발린, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 259 위치의 발린이다.
- [0174] 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 261 위치의 타이로신에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것도 상기

의 방법으로 아미노산 서열을 정렬시키는 것으로 특정할 수 있다.

[0175] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 261 위치의 타이로신, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 259 위치의 타이로신, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 261 위치의 타이로신, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 259 위치의 타이로신, *Neocosmospora vasinfector* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 261 위치의 타이로신, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 261 위치의 타이로신, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 257 위치의 타이로신, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 261 위치의 타이로신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 259 위치의 타이로신, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 261 위치의 타이로신이다.

[0176] 또한, 본 발명에 있어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 263 위치의 글리신에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것이 의하여 상기의 대응하는 위치의 아미노산을 특정하는 방법으로 아미노산 서열을 정렬시켜 특정할 수 있다.

[0177] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 263 위치의 글리신, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 261 위치의 글리신, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 263 위치의 글리신, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 261 위치의 글리신, *Neocosmospora vasinfector* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 263 위치의 글리신, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 263 위치의 세린, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 259 위치의 글리신, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 263 위치의 글리신, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 261 위치의 글리신, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 263 위치의 글리신이다.

[0178] 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 355 위치의 알라닌에 대응하는 위치란, 확정한 아마드리아제의 아미노산 서열을, 서열 번호 1로 기재되는 코니오카에타 속 유래의 아마드리아제의 아미노산 서열과 비교했을 경우, 서열 번호 1의 아마드리아제의 355 위치의 알라닌에 대응하는 아미노산을 의미하는 것이다. 이것도 상기의 방법으로 아미노산 서열을 정렬시키는 것으로 특정할 수 있다.

[0179] 즉, *Eupenicillium terrenum* 유래의 아마드리아제에서는 355 위치의 알라닌, *Pyrenochaeta* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 353 위치의 알라닌, *Arthrinium* sp. 유래의 케토아민 옥시다제에서는 356 위치의 알라닌, *Curvularia clavata* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 353 위치의 알라닌, *Neocosmospora vasinfector* 유래의 케토아민 옥시다제에서는 355 위치의 세린, *Cryptococcus neoformans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 355 위치의 알라닌, *Phaeosphaeria nodorum* 유래의 프룩토실 웨티드 옥시다제에서는 351 위치의 알라닌, *Aspergillus nidulans* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 355 위치의 알라닌, *Ulocladium* sp. 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 353 위치의 알라닌, *Penicillium janthinellum* 유래의 프룩토실 아미노산 옥시다제에서는 355 위치의 알라닌이다.

(본 발명의 아마드리아제의 생산)

[0181] 상기와 같이 얻을 수 있는 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 생산능을 가지는 균주를 이용하여 해당 아마드리아제를 생산하는데, 상기 균주를 통상의 고체 배양법으로 배양해도 되지만, 가능한 액체 배양법을 사용하여 배양하는 것이 바람직하다.

[0182] 또한, 상기 균주를 배양하는 배양 배지로는 예를 들면, 흐모 엑기스, 트립톤(triptone), 웨튼(peptone), 고기 엑기스(beef extract), 콘 스텁 리커(Corn Steep Liquor) 또는 대두 또는 밀겨의 침출액 등의 1종 이상의 질소원에, 염화 나트륨, 인산 2 수소 칼륨, 인산수소 2 칼륨, 황산마그네슘, 염화 마그네슘, 염화 제 2철, 황산 제 2철 또는 황산 망간등의 무기 염류의 1종 이상을 첨가하고 추가로 필요에 따라 당질 원료, 비타민등을 적절히 첨가한 것을 이용한다. 또한, 배지의 초발 pH는 pH7~9로 조정하는 것이 적당하다.

[0183] 상기 배양은 20~42°C의 배양 온도, 바람직하게는 37°C 전후의 배양 온도로 4~24시간, 더 바람직하게는 37°C 전후의 배양 온도로 4~8시간, 환기 교반 심부배양, 진탕배양, 정치배양 등으로 실시하는 것이 바람직하다.

[0184]

상기 배양 종료후, 상기 배양물로 아마드리아제를 채취하는데, 통상의 효소 채취 수단을 이용해 얻을 수 있다. 예를 들면, 상법(常法)에 의한 균체를 초음파 파괴 처리, 마쇄 처리 등을 하거나, 또는 리소자임(lysozyme) 등의 용균효소를 이용하여 본 효소를 추출하거나 또는 톨루엔(toluen) 등의 존재하에서 전탕 또는 방치하고 용균을 실시하여 본 효소를 균체 외로 배출시킬 수 있다. 그리고, 상기 용액을 여과, 원심분리 등을 실시하여 고형부분을 제거하고, 필요에 따라 스트렙토마이신 황산염(streptomycin sulfate), 프로타민 황산염(protamine sulfate), 또는 황산 망간(manganese(II) sulfate)등에 의해 혼란을 제거한 후, 이것에 황안(硫安), 알코올, 아세톤등을 첨가하여 분획하고 첨전물을 채취하여 아마드리아제의 조효소(crude enzyme)를 얻는다.

[0185]

상기 아마드리아제의 조효소(crude enzyme) 보다 더 아마드리아제 정제 효소표본을 얻으려면, 예를 들면, 세파덱스(sephadex), 슈퍼덱스(superdex) 또는 울트로겔(ultragel)등을 이용하는 겔 여과법이온 교환체를 이용하는 흡착용출법; 폴리-아크릴아미드 겔(poly-acrylamide gel) 등을 이용하는 전기 영동법; 하이드록실아파타이트(hydroxylapatite)를 이용하는 흡착용출법; 자당 밀도 구배 원심법 등의 침강법; 어피니티 크로마토그래피(affinity chromatography)법; 분자 체의 막 (molecular sieve membrane) 또는 중공사막 등을 이용하는 분획법 등을 적절히 선택하거나 또는 이것들을 조합하여 실시함으로써, 정제된 아마드리아제 효소표본을 얻을 수 있다. 상기와 같이 하여, 얻고자 하는 기질 특이성이 개선된 아마드리아제를 얻을 수 있다.

[0186]

(본 발명의 아마드리아제에서의 ε FK에 대한 반응성의 저하)

[0187]

상기와 같은 수단으로 얻을 수 있는 본 발명의 아마드리아제는 유전자 개변 등에 의해서 그 아미노산 서열에 변이를 일으킨 결과, 개변 전의 것과 비교해 기질 특이성이 향상된 것을 특징으로 한다. 구체적으로는, 개변 전의 것과 비교해서 「 α FVH에 대한 반응성」에 대한 「 ε FK에 대한 반응성」의 비율, 또는 「 α FV에 대한 반응성」에 대한 「 ε FK에 대한 반응성」의 비율이 감소하고 있는 것을 특징으로 한다. 또는, 개변 전의 것과 비교해서 「 α FVH에 대한 반응성」에 대한 「 ε FK에 대한 반응성」의 비율, 및 「 α FV에 대한 반응성」에 대한 「 ε FK에 대한 반응성」의 비율이 모두 감소하고 있는 것을 특징으로 한다.

[0188]

당화 혜모글로빈의 측정에 있어서, ε FK에 대해 반응성이 높은 것은 측정 오차의 원인이 될 수 있기 때문에 ε FK에 대한 반응성의 비율은 낮으면 낮을수록 바람직하다. 구체적으로는, 본 발명의 아마드리아제에 있어서, α FVH에 대한 반응성에 대해서 ε FK에 대한 반응성의 비율을 나타내는 ε FK/ α FVH는, 개변전에 비해서 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 더 바람직하게는 40% 이상 감소하고 있는 것이 바람직하다.

[0189]

또한, 본 발명의 아마드리아제에 있어서, α FV에 대해 반응성에 대한 ε FK에 대한 반응성의 비율을 나타내는 ε FK/ α FV는, 개변 전에 비해서 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 더 바람직하게는 40% 이하 감소하고 있는 것이 바람직하다.

[0190]

α FVH에 대한 반응성에 대해 ε FK에 대한 반응성의 비율, 또는 α FV에 대한 반응성에 대해 ε FK에 대한 반응성의 비율은 공자의 아마드리아제의 측정법을 이용하고, 임의의 조건하에서 측정하여 개변 전의 것과 비교할 수 있다. 예를 들면, pH7.0으로서, 5 mM의 ε FK를 첨가하여 측정한 활성을, 5 mM의 α FVH를 첨가하여 측정한 활성으로 나눈 비율을 구하여, α FVH에 대한 반응성에 대해 ε FK에 대한 반응성의 비율을 산출하여 이것을 개변 전의 것과 개변 후의 것으로 비교할 수 있다. 또한, 예를 들면, pH7.0으로, 5 mM의 ε FK를 첨가해 측정한 활성을 5 mM의 α FV를 첨가해 측정한 활성으로 나눈 비율을 구하여, α FV에 대한 반응성에 대해 ε FK에 대한 반응성의 비율을 산출하여 이것을 개변 전의 것과 개변 후의 것으로 비교할 수 있다.

[0191]

개변 전의 것과 비교하여 기질 특이성이 향상되고 있는 본 발명의 아마드리아제의 하나의 예로서, 예를 들면, 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-Y261W) 균주에 의해 생산되는 아마드리아제를 들 수 있다. 이러한 기질 특이성이 개선된 아마드리아제는 ε FK를 노이즈로서 측정하는 정도가 양호하게 감소되어 HbA1c의 β -사슬 아미노 말단 유래의 당화 아미노산인 α FVH, 또는 HbA1c의 β -사슬 아미노 말단 유래의 당화 아미노산인 α FV만을 측정하는 것이 가능해지기 때문에 정밀도가 높은 측정을 실시할 수 있고 산업 이용상 매우 유리하다.

[0192]

(아마드리아제 활성의 측정 방법)

[0193]

아마드리아제의 활성의 측정 방법으로는, 여러 가지의 방법을 이용할 수 있지만, 하나의 예로서 하기에 본 발명에서 이용하는 아마드리아제 활성의 측정 방법에 대해 설명한다.

- [0194] 본 발명에서의 아마드리아제의 효소 활성의 측정 방법으로는 효소의 반응에 의해 생성되는 과산화 수소량을 측정하는 방법이나 효소 반응에 의해 소비되는 산소량을 측정하는 방법 등이 주된 측정 방법으로 들 수 있다. 하기에, 하나의 예로서 과산화 수소량을 측정하는 방법에 대해 나타낸다.
- [0195] 본 발명에 있어서의 아마드리아제의 활성 측정에는 한정하지 않는 한, α FVH, 또는 ε FK, 또는 α FV를 기질로서 이용한다. 또한, 효소 역가는 α FVH 또는 ε FK, 또는 α FV를 기질로서 측정했을 때, 1분 동안에 1 μmol 의 과산화 수소를 생성하는 효소량을 1 U라고 정의한다.
- [0196] ε FK 등의 당화 아미노산 및 α FVH 등의 당화 펩티드는 예를 들면, 사카가미 등의 방법에 근거해 합성, 정제한 것을 이용할 수 있다(특개 2001-95598호 공보 참조).

A. 시약의 제조

- [0198] (1) 시약 1 : 퍼옥시다제(peroxidase), 4-아미노안티피린(aminoantipyrine) 용액

[0199] 5.0 kU의 퍼옥시다제(키코만 사제), 100 mg의 4-아미노안티피린(도쿄 카세이 사제)을 0.1 M의 인산칼륨 완충액(pH7.0 또는 pH7.5 또는 pH8.0)에 용해하여 1000 mL로 정용한다.

- [0200] (2) 시약 2 : TOOS(N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-Tolidine) 용액

[0201] 500 mg의 TOOS(도진 화학 연구소 사제)를 이온 교환수에 용해하여 100 mL로 정용한다.

- [0202] (3) 시약 3 : 기질 용액(150 mM; 최종농도 5 mM)

[0203] α FVH 625 mg, 또는 ε FK 462 mg 또는 α FV 419 mg를 이온 교환수에 용해하여 10 mL로 정용한다.

B. 활성 측정법

[0205] 2.7 mL의 시약 1, 100 μl 의 시약 2, 및 100 μl 의 효소액을 혼합하여 37°C로 5분간 예비 가온한다. 그 후, 시약 3을 100 μl 더해 잘 혼합한 후, 분광 광도계(U-3010 A, 히타치 하이테크놀로지 사제)로 555 nm에 있어서의 흡광도를 측정한다. 측정치는 555 nm에서의 1 분 후에서 2 분 후의 1분당 흡광도 변화이다. 또한, 대조액은 100 μl 의 시약 3 대신에 100 μl 의 이온 교환수를 추가하는 것이외에는 상기와 동일하게 한 것이다. 상기 용액을 미리 제작해 둔 과산화 수소의 표준 용액을 시약 3 대신에, 또한, 효소액 대신에 이온 교환수를 이용하여 그 생성 색소량과의 관계를 조사한 그래프를 준비한다. 이 그래프를 이용하여 37°C, 1분 당 생성되는 과산화 수소의 마이크로 몰수를 계산하여 이 수치를 효소액중의 활성 단위로 한다.

[0206] 이하, 실시예에 의해서 본 발명을 한층 더 구체적으로 설명한다. 다만, 본 발명의 기술적 범위는 하기의 예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

- [0208] (1) 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA의 제조

[0209] 코니오카에타(Coniochaeta) 속 유래 아마드리아제 유전자(서열 번호 2)의 재조합 플라스미드(plasmid)를 가지는 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7) 균주(국제 공개 제 2007/125779호 참조)을, 3 mL의 LB-amp 배지 1%(w/v) 박토 트립톤(bacto tryptone), 0.5%(w/v) 펩톤(peptone), 0.5%(w/v) NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 암피실린(ampicillin)에 접종하고, 37°C으로 16시간 진탕배양하여 배양물을 얻었다. 이 배양물을 10,000 $\times g$ 로, 1분간 원심분리하는 것으로써 짐균하여 균체를 얻었다. 이 균체로부터 전일루트 플라스미드 미니 프램 키트(GenElute Plasmid Mini-Prep Kit)(시그마 알드리치 사제)를 이용해 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7를 추출하여 정제하고, 2.5 μg 의 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 얻었다.

- [0210] (2) 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA의 부위 특이적 개변 조작

[0211] 상기 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로서 서열 번호 3, 4의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용하여 하기의 조건으로 PCR 반응을 실시했다.

- [0212] 즉, $10\times$ KOD-Plus-완충액을 $5\ \mu\text{l}$, dNTP가 각 $2\ \text{mM}$ 가 되도록 제조된 dNTPs 혼합 용액을 $5\ \mu\text{l}$, $25\ \text{mM}$ 의 MgSO_4 용액을 $2\ \mu\text{l}$, 주형이 되는 pKK223-3-CFP-T7DNA를 $50\ \text{ng}$, 상기 합성 올리고 뉴클레오티드를 각각 $15\ \text{pmol}$, KOD-Plus-를 1 Unit 더하고, 멸균수로 전량을 $50\ \mu\text{l}$ 하여 제조한 반응액을 서열 사이클러(thermal cycler)(에펜도프 사제)를 이용하고, 94°C 로 2분간 인큐베이트 하고, 계속해서, 「 $94^\circ\text{C}, 15초$ 」 - 「 $50^\circ\text{C}, 30초$ 」 - 「 $68^\circ\text{C}, 6분$ 」의 사이클을 30회 반복했다.
- [0213] 반응액의 일부를 $1.0\ %$ 아가로스겔로 전기영동 하고, 약 $6,000\ \text{bp}$ 의 DNA가 특이적으로 증폭되고 있는 것을 확인했다. 이렇게 수득한 DNA를 제한 효소 DpnI(NewEngland Biolabs 사제)로 처리하여, 잔존하고 있는 주형 DNA를 절단 한 후, 대장균 JM109를 형질 전환하여 LB-amp 배지에 도말했다. 생육한 콜로니를 LB-amp 배지에 접종해서 진탕 배양하여, 상기(1)와 같은 방법으로 플라스미드(plasmid) DNA를 단리했다. 플라스미드(plasmid)중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열을, 멀티-케필러리 DNA 해석 시스템 CEQ2000(베크만콜터 사제)를 이용해서 결정하여, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 66 위치의 라이신이 글리신으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-K66G)를 얻었다.
- [0214] 계속해서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 67 위치의 발린을 프롤린으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 5, 6의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 67 위치의 발린이 프롤린으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-V67P)를 얻었다.
- [0215] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 66 위치의 라이신을 글리신으로, 또한, 67 위치의 발린을 프롤린으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 7, 8의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 66 위치의 라이신이 글리신으로, 또한, 67 위치의 발린이 프롤린으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-K66GV67P)를 얻었다.
- [0216] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 70 위치의 글루타민을 프롤린으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 9, 10의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 70 위치의 글루타민이 프롤린으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-Q70P)를 얻었다.
- [0217] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 96 위치의 아스파라긴산을 알라닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 11, 12의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 96 위치의 아스파라긴산이 알라닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-D96A)를 얻었다.
- [0218] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 글루타민으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 13, 14의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산이 글루타민으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-E98Q)를 얻었다.
- [0219] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 100 위치의 스레오닌을 아르기닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 15, 16의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그

결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 100 위치의 스태오닌이 아르기닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-T100R)를 얻었다.

[0220] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신을 아르기닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 17, 18의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신이 아르기닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-G103R)를 얻었다.

[0221] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 106 위치의 아스파라긴산을 알라닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 19, 20의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 106 위치의 아스파라긴산이 알라닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-D106A)를 얻었다.

[0222] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민을 알라닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 21, 22의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민이 알라닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-Q110A)를 얻었다.

[0223] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 113 위치의 알라닌을 글루타민산으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 23, 24의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 113 위치의 알라닌이 글루타민산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-A113E)를 얻었다.

[0224] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신을 라이신으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 25, 26의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신이 라이신으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-L114K)를 얻었다.

[0225] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘을 글루타민산으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 27, 28의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘이 글루타민산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-H125E)를 얻었다.

[0226] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린을 글루타민산으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 29, 30의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린이 글루타민산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-S154E)를 얻었다.

[0227] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 156 위치의 아스파라긴산을 아스파라긴으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 31, 32의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육

콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 156 위치의 아스파라긴산이 아스파라긴으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-D156N)를 얻었다.

[0228] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린을 알라닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 33, 34의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린이 알라닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFPT7-V259A)를 얻었다.

[0229] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신을 알라닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 35, 36의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신이 알라닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-Y261A)를 얻었다.

[0230] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신을 아르기닌으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 37, 38의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신이 아르기닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-G263R)를 얻었다.

[0231] 이어서, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 355 위치의 알라닌을 라이신으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 서열 번호 39, 40의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 355 위치의 알라닌이 라이신으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T7-A355K)를 얻었다.

[0232] (3) 각종 개변형 아마드리아제의 생산

[0233] 상기의 순서로 수득한 상기 재조합 플라스미드(plasmid)를 유지하는 각각의 대장균 JM109 균주를 0.1 mM의 IPTG를 첨가한 LB-amp 배지 3 mL에, 30°C으로 16시간 배양했다. 수득한 각 배양균체를 20 mM의 HEPES-NaOH 완충액(pH7.0)으로 세정한 후, 상기 완충액에 혼탁하여 초음파 파쇄처리를 실시하여, 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여, 기질 특이성 확인을 위한 효소액 0.6 mL를 제조했다.

[0234] (4) ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV의 측정

[0235] 상기 설명의 효소액을 이용하여, 상기의 B:활성 측정법으로 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정했다. 또한, 비교를 위해서, 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7) 균주로부터 생산한 개변 전의 아마드리아제에 대해서도 같은 측정을 실시했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다.

[0236] 그 결과, 상기 설명의 효소 활성 측정의 결과로부터 수득한 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7) 균주에 의해서 생산되는 개변 전 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 0.316이며, ε FK/ α FV는 0.093이었다.

[0237] 이것에 대하여 부위 특이적 변이 도입에 의해 제작한 개변 후의 각종의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV, 및 개변 전 아마드리아제의 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV의 값을 100%로 했을 때의 개변 후 아마드리아제의 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV의 비율은, [표 1]로 나타냈다.

표 1

플라스미드	아미노산 변이	사용된 리고고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-K66G	K66G	3, 4	0.255	81	0.080	86
pKK223-3-CFP-T7-V67P	V67P	5, 6	0.239	76	0.072	77
pKK223-3-CFP-T7-K66GV67P	K66G, V67P	7, 8	0.185	59	0.071	76
pKK223-3-CFP-T7-Q70P	Q70P	9, 10	0.147	47	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7-D96A	D96A	11, 12	0.078	25	0.018	19
pKK223-3-CFP-T7-E98Q	E98Q	13, 14	0.087	28	0.037	40
pKK223-3-CFP-T7-T100R	T100R	15, 16	0.175	55	0.069	74
pKK223-3-CFP-T7-G103R	G103R	17, 18	0.110	35	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7-D106A	D106A	19, 20	0.164	52	0.066	71
pKK223-3-CFP-T7-Q110A	Q110A	21, 22	0.248	78	0.081	87
pKK223-3-CFP-T7-A113E	A113E	23, 24	0.279	88	측정 않음	
pKK223-3-CFP-T7-L114K	L114K	25, 26	0.095	30	0.036	39
pKK223-3-CFP-T7-H125E	H125E	27, 28	0.216	68	측정 않음	
pKK223-3-CFP-T7-S154E	S154E	29, 30	0.162	51	0.047	51
pKK223-3-CFP-T7-D156N	D156N	31, 32	0.171	54	0.074	80
pKK223-3-CFP-T7-V259A	V259A	33, 34	0.080	25	0.029	31
pKK223-3-CFP-T7-Y261A	Y261A	35, 36	0.145	46	측정 않음	
pKK223-3-CFP-T7-G263R	G263R	37, 38	0.123	39	0.055	59
pKK223-3-CFP-T7-A355K	A355K	39, 40	0.177	56	0.048	52

[0238]

[0239] 즉, [표 1]에 기재된 바와 같이, 이들 모든 개변형 아마드리아제에 대해서, 기질 특이성이 개선되고 있는 것을 알 수 있었다.

[0240]

<실시예 2>

[0241]

(96 위치의 아스파라긴산의 점변이 시험)

[0242]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 96 위치의 아스파라긴산을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드 (plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 표 2에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 41~46),

KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 96 위치의 아스파라긴산이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0243] 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0244] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 2]에 나타냈다.

표 2

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오티드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-D96A	D96A	11, 12	0.078	25	0.018	19
pKK223-3-CFP-T7-D96S	D96S	41, 42	0.100	32	0.021	23
pKK223-3-CFP-T7-D96N	D96N	43, 44	0.221	70	0.025	27
pKK223-3-CFP-T7-D96H	D96H	45, 46	0.095	30	0.023	25

[0245]

[표 2]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 96 위치의 아스파라긴산을 알라닌, 세린, 아스파라긴, 히스티딘으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0247] <실시예 3>

[0248] (98 위치의 글루타민산의 점변이 시험)

[0249] 기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 3]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 47~82), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0250] 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0251] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 3]에 나타냈다.

표 3

플라스미드	아미노산 변이	사용된 리고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-E98Q	E98Q	13, 14	0.087	28	0.037	40
pKK223-3-CFP-T7-E98H	E98H	47, 48	0.107	34	0.041	44
pKK223-3-CFP-T7-E98K	E98K	49, 50	0.051	16	0.021	23
pKK223-3-CFP-T7-E98R	E98R	51, 52	0.039	12	0.015	16
pKK223-3-CFP-T7-E98G	E98G	53, 54	0.120	38	0.044	47
pKK223-3-CFP-T7-E98A	E98A	55, 56	0.122	39	0.048	52
pKK223-3-CFP-T7-E98V	E98V	57, 58	0.113	36	0.046	49
pKK223-3-CFP-T7-E98I	E98I	59, 60	0.121	38	0.042	45
pKK223-3-CFP-T7-E98L	E98L	61, 62	0.064	20	0.023	25
pKK223-3-CFP-T7-E98M	E98M	63, 64	0.083	26	0.034	37
pKK223-3-CFP-T7-E98C	E98C	65, 66	0.111	35	0.043	46
pKK223-3-CFP-T7-E98S	E98S	67, 68	0.122	39	0.046	49
pKK223-3-CFP-T7-E98T	E98T	69, 70	0.118	37	0.047	51
pKK223-3-CFP-T7-E98N	E98N	71, 72	0.105	33	0.039	42
pKK223-3-CFP-T7-E98D	E98D	73, 74	0.207	66	0.077	83
pKK223-3-CFP-T7-E98F	E98F	75, 76	0.080	25	0.039	42
pKK223-3-CFP-T7-E98Y	E98Y	77, 78	0.104	33	0.045	48
pKK223-3-CFP-T7-E98W	E98W	79, 80	0.082	26	0.035	38
pKK223-3-CFP-T7-E98P	E98P	81, 82	측정 불가		측정 불가	

[0252]

[0253]

[표 3]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 프롤린 이외의 다른 아미노산, 즉 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 글리신, 알라닌, 발린, 이소루신, 루신, 메티오닌, 시스테인, 세린, 스레오닌, 아스파라긴, 아스파라긴산, 페닐 알라닌, 타이로신, 트립토판으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다. 또한, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 프롤린으로 치환했을 경우, 효소의 발현이 보이지 않게 되었다.

<실시예 4>

(103 위치의 글리신의 점변이 시험)

[0254] 기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 4]에 나타낸 합성 올리고뉴클레오티드(서열 번호 83, 84, 255, 256), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0255] 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0256] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ϵ FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 4]에 나타낸다.

표 4

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오- 타이드 서열번호	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 비율 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- G103R	G103R	17, 18	0.110	35	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7- G103K	G103K	83, 84	0.134	42	0.055	59
pKK223-3-CFP-T7- G103H	G103H	255, 256	0.181	57	0.070	75

[0257]

[표 4]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신을 아르기닌, 라이신, 히스티딘으로 치환한 개변형의 아마드리아제의, ϵ FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ϵ FK/ α FV는 모두, 개변전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

<실시예 5>

(106 위치의 아스파라긴산의 점변이 시험)

[0258] 기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 106 위치의 아스파라긴산을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 5]에 나타낸 합성 올리고뉴클레오티드(서열 번호 85~100), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 106 위치의 아스파라긴산이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0259] 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0265] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시시다제, 4-아미노안티파린 용액을 이용했다. 결과를 [표 5]에 나타낸다.

표 5

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오티드 서열번호	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)	
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-D106A	D106A	19, 20	0.164	52	0.066	71
pKK223-3-CFP-T7-D106G	D106G	85, 86	0.163	52	0.065	70
pKK223-3-CFP-T7-D106S	D106S	87, 88	0.173	55	0.071	76
pKK223-3-CFP-T7-D106T	D106T	89, 90	0.171	54	0.073	78
pKK223-3-CFP-T7-D106N	D106N	91, 92	0.152	48	0.068	73
pKK223-3-CFP-T7-D106C	D106C	93, 94	0.180	57	0.070	75
pKK223-3-CFP-T7-D106V	D106V	95, 96	0.182	58	0.079	85
pKK223-3-CFP-T7-D106L	D106L	97, 98	0.158	50	0.074	80
pKK223-3-CFP-T7-D106I	D106I	99, 100	0.163	52	0.072	77

[0266]

[표 5]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 106 위치의 아스파라긴산을 아스파라긴산보다 분자량이 작은 아미노산, 즉 글리신, 알라닌, 세린, 발린, 스레오닌, 시스테인, 루신, 이소루신, 아스파라긴으로 치환한 개변형의 아마드리아제의, ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0268]

<실시예 6>

[0269]

(110 위치의 글루타민의 점변이 시험)

[0270]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 6]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 101~118), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0271]

상기와 같이 해 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0272] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시시다제, 4-아미노안티파린 용액을 이용했다. 결과를 [표 6]에 나타낸다.

표 6

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-Q110A	Q110A	21, 22	0.248	78	0.081	87
pKK223-3-CFP-T7-Q110L	Q110L	101, 102	0.255	81	0.104	112
pKK223-3-CFP-T7-Q110M	Q110M	103, 104	0.247	78	0.101	109
pKK223-3-CFP-T7-Q110F	Q110F	105, 106	0.187	59	0.086	92
pKK223-3-CFP-T7-Q110W	Q110W	107, 108	0.251	79	0.075	81
pKK223-3-CFP-T7-Q110N	Q110N	109, 110	0.235	74	0.085	91
pKK223-3-CFP-T7-Q110H	Q110H	111, 112	0.199	63	0.069	74
pKK223-3-CFP-T7-Q110K	Q110K	113, 114	0.142	45	0.064	69
pKK223-3-CFP-T7-Q110R	Q110R	115, 116	0.105	33	0.048	52
pKK223-3-CFP-T7-Q110E	Q110E	117, 118	0.595	188	0.193	208

[0273]

[0274] [표 6]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민을 알라닌, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 아르기닌으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, 110 위치의 글루타민을 알라닌, 페닐알라닌, 트립토판, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 아르기닌으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환인 것을 알 수 있었다. 한편, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민을 글루타민산으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.316, 0.093보다 높아졌다.

[0275]

<실시예 7>

[0276]

(113 위치의 알라닌의 점변이 시험)

[0277]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 113 위치의 알라닌을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid)

pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 7]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 119, 120), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 113 위치의 알라닌이 라이신으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0278] 이렇게 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양해 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0279] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 7]에 나타낸다.

표 7

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오티드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100
pKK223-3-CFP-T7-A113E	A113E	23, 24	0.279	88
pKK223-3-CFP-T7-A113K	A113K	119, 120	0.279	88

[0280]

[0281] [표 7]에 나타냈듯이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 113 위치의 알라닌을 글루타민산, 라이신으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮고, 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0282]

<실시예 8>

[0283]

(114 위치의 루신의 점변이 시험)

[0284]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 8]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 121~124), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0285]

이렇게 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양해 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0286]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 8]에 나타낸다.

표 8

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- L114K	L114K	25, 26	0.095	30	0.036	39
pKK223-3-CFP-T7- L114R	L114R	121, 122	0.132	42	0.049	53
pKK223-3-CFP-T7- L114E	L114E	123, 124	0.332	105	측정 않음	

[0287]

[표 8]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신을 라이신, 아르기닌으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다. 한편, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 114 위치의 루신을 글루타민산으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는, 개변 전의 값인 0.316보다 높아졌다.

[0289]

<실시예 9>

[0290] (125 위치의 히스티딘의 점변이 시험)

[0291]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 9]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 125~134, 257~260), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0292]

이렇게 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양해 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0293]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티페린 용액을 이용했다. 결과를 [표 9]에 나타낸다.

표 9

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- H125E	H125E	27, 28	0.216	68	측정 않음	
pKK223-3-CFP-T7- H125N	H125N	125, 126	0.240	76	0.081	87
pKK223-3-CFP-T7- H125K	H125K	127, 128	0.090	28	0.033	35
pKK223-3-CFP-T7- H125A	H125A	129, 130	0.199	63	0.102	110
pKK223-3-CFP-T7- H125Q	H125Q	131, 132	0.169	53	0.044	47
pKK223-3-CFP-T7- H125R	H125R	133, 134	0.088	28	0.025	27
pKK223-3-CFP-T7- H125L	H125L	257, 260	0.121	38	0.038	41
pKK223-3-CFP-T7- H125F	H125F	258, 260	0.186	59	0.077	83
pKK223-3-CFP-T7- H125Y	H125Y	259, 260	0.177	56	0.088	95

[0294]

[표 9]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 125 위치의 히스티딘을 글루타민산, 아스파라긴, 라이신, 알라닌, 글루타민, 아르기닌, 루신, 페닐 알라닌, 타이로신으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, 125 위치의 히스티딘을 아스파라긴, 라이신, 글루타민, 아르기닌, 루신, 페닐 알라닌, 타이로신으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0296]

<실시예 10>

[0297]

(154 위치의 세린의 점변이 시험)

[0298]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 10]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 135~150), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0299]

이렇게 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양해 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0300]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 10]에 나타낸다.

표 10

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오티드 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-S154E	S154E	29, 30	0.162	51	0.047	51
pKK223-3-CFP-T7-S154G	S154G	135, 136	0.186	59	0.054	58
pKK223-3-CFP-T7-S154Y	S154Y	137, 138	0.188	59	0.058	62
pKK223-3-CFP-T7-S154N	S154N	139, 140	0.146	46	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7-S154Q	S154Q	141, 142	0.150	47	0.049	53
pKK223-3-CFP-T7-S154D	S154D	143, 144	0.212	67	0.066	71
pKK223-3-CFP-T7-S154H	S154H	145, 146	0.127	40	0.040	43
pKK223-3-CFP-T7-S154A	S154A	147, 148	0.318	101	0.098	105
pKK223-3-CFP-T7-S154C	S154C	149, 150	0.151	48	0.059	63

[0301]

[표 10]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린을 글루타민산, 글리신, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파라긴산, 히스티딘, 시스테인으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ε FK/ α FV는 모두 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다. 한편, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린을 알라닌으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 개변 전의 값인 0.316과 거의 같아, 저하가 보이지 않았다.

[0303]

<실시예 11>

[0304]

(259 위치의 발린의 점변이 시험)

[0305]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 11]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 151~154), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0306]

상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조 효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0307]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제,

4-아미노안티페린 용액을 이용했다. 결과를 [표 11]에 나타낸다.

표 11

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- V259A	V259A	33, 34	0.080	25	0.029	31
pKK223-3-CFP-T7- V259C	V259C	151, 152	0.099	31	0.037	40
pKK223-3-CFP-T7- V259S	V259S	153, 154	0.094	30	0.033	35

[0308]

[0309] [표 11]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린을 알라닌, 시스테인, 세린으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, ε FK/ α FV는 모두 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0310]

<실시예 12>

[0311]

(261 위치의 타이로신의 점변이 시험)

[0312]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 12]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 155~162), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0313]

이렇게 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양해 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 μ l를 제조했다.

[0314]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티페린 용액을 이용했다. 결과를 [표 12]에 나타낸다.

표 12

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- Y261A	Y261A	35, 36	0.145	46	측정 않음	
pKK223-3-CFP-T7- Y261L	Y261L	155, 156	0.087	28	측정 않음	
pKK223-3-CFP-T7- Y261F	Y261F	157, 158	0.039	12	0.032	34
pKK223-3-CFP-T7- Y261W	Y261W	159, 160	0.018	6	0.015	16
pKK223-3-CFP-T7- Y261K	Y261K	161, 162	0.020	6	측정 않음	

[0315]

[0316]

[표 12]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신을 알라닌, 루신, 페닐 알라닌, 트립토판, 라이신으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는, 모두 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, 261 위치의 타이로신을 페닐 알라닌, 트립토판으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FV는, 모두 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0317]

<실시예 13>

[0318]

(263 위치의 글리신의 점변이 시험)

[0319]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로 하여 [표 13]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 163, 164, 261~266), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0320]

상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0321]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B활성 측정법으로 나타낸 방법에 의하여 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 13]에 나타낸다.

표 13

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)	
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093
pKK223-3-CFP-T7- G263R	G263R	37, 38	0.123	39	0.055
pKK223-3-CFP-T7- G263K	G263K	163, 164	0.107	34	0.046
pKK223-3-CFP-T7- G263H	G263H	261, 262	0.121	38	0.056
pKK223-3-CFP-T7- G263D	G263D	263, 264	0.195	62	0.080
pKK223-3-CFP-T7- G263E	G263E	265, 266	0.211	67	0.074

[0322]

[0323]

[표 13]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신을 아르기닌, 라이신, 히스티딘, 아스파라긴산, 글루타민산으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는 모두, 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되어, 또한, ε FK/ α FV는 모두, 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0324]

<실시예 14>

[0325]

(355 위치의 알라닌의 점변이 시험)

[0326]

기질 특이성의 향상에 효과가 높은 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 355 위치의 알라닌을 다른 아미노산으로 치환하여 기질 특이성이 뛰어난 개변형 아마드리아제의 탐색을 시도했다. 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T7DNA를 주형으로서 [표 14]에 나타낸 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 165~168, 267~270), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 355 위치의 알라닌이 각종 아미노산으로 치환된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0327]

이렇게 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양해 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0328]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티페린 용액을 이용했다. 결과를 [표 14]에 나타냈다.

표 14

플라스미드	아미노산을 리고뉴클레오 타이드 서열번호	사용된 아미노산 변이	ϵ FK/ α FVH 비율 (%)	ϵ FK/ α FV 비율 (%)	ϵ FK/ α FVH 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	0.316	100	0.093
pKK223-3-CFP-T7-A355K	A355K	39, 40	0.177	56	0.048
pKK223-3-CFP-T7-A355R	A355R	165, 166	0.121	38	0.062
pKK223-3-CFP-T7-A355H	A355H	167, 168	0.190	60	0.115
pKK223-3-CFP-T7-A355D	A355D	267, 268	0.201	64	0.122
pKK223-3-CFP-T7-A355E	A355E	269, 270	0.218	69	0.068

[0329]

[표 14]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 355 위치의 알라닌을 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 글루타민산으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ϵ FK/ α FVH는, 모두 개변 전의 값인 0.316보다 낮은 값이 되었고, 또한, 355 위치의 알라닌을 라이신, 아르기닌, 글루타민산으로 치환한 개변형의 아마드리아제의, ϵ FK/ α FV는, 모두 개변 전의 값인 0.093보다 낮은 값이 되었다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0331]

<실시예 15>

[0332]

(기질 특이성 개선에 유효한 변이의 축적)

[0333]

[표 15]에 나타낸 각종 재조합 플라스미드(plasmid) DNA를 주형으로 하여 합성 올리고 뉴클레오티드(서열 번호 7, 8, 17, 18, 39, 40, 51, 52, 55, 56, 87, 88, 115, 116, 131, 132, 135, 136, 139, 140), KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기 (2)와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109 균주의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열에 표 15중의 아미노산 변이의 란에 기재한 복수의 아미노산 치환이 도입된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0334]

상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0335]

이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ϵ FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 15]에 나타낸다.

표 15

플라스미드	아미노산 변이	주형으로 한울리고뉴클레오 플라스미드	사용된 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-K66G V67P/E98A	K66G, V67P, E98A	pKK223-3-CFP-T7-K66GV67P	55,56	0.069	22	0.027	29
pKK223-3-CFP-T7-K66G V67P/Q110R	K66G, V67P, Q110R		7,8	0.085	27	0.034	37
pKK223-3-CFP-T7-E98A/Q110R	E98A, Q110R		55,56	0.072	23	0.032	34
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/H125Q	Q110R, H125Q	pKK223-3-CFP-T7-Q110R	131,132	0.073	23	0.027	29
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154G	Q110R, S154G		135,136	0.090	28	0.029	31
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154N	Q110R, S154N		139,140	0.064	20	0.022	24
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/A355K	Q110R, A355K		39,40	0.094	30	0.042	45
pKK223-3-CFP-T7-E98A/G103R	E98A, G103R	pKK223-3-CFP-T7-E98A	17,18	0.062	20	0.029	31
pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N	E98A, S154N	pKK223-3-CFP-T7-S154N	55,56	0.062	20	0.023	25
pKK223-3-CFP-T7-E98R/S154N	E98R, S154N	pKK223-3-CFP-T7-S154N	51,52	0.030	9	0.011	12
pKK223-3-CFP-T7-Q110RS154C	Q110R, S154C	pKK223-3-CFP-T7-S154C	115,116	0.083	26	0.032	34
pKK223-3-CFP-T7-E98A/D106S/S154N	E98A, D106S, S154N	pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N	87,88	0.045	14	0.019	20
pKK223-3-CFP-T7-E98A/Q110R/S154N	E98A, Q110R, S154N	pKK223-3-CFP-T7-S154N	55,56	0.063	20	0.021	23
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/H125Q/S154N	Q110R, H125Q, S154N	pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154N	131,132	0.044	14	0.019	20

[0336]

[표 15]에 나타낸 다중 아미노산 치환의 도입된 개변형 아마드리아제에서는 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV는 모두 각 아미노산 치환을 단독으로 도입했을 경우와 비교해 낮은 값이 되었다. 그러므로, 서열 번호 1에 나타낸 아마드리아제의 기질 특이성 개선에 효과적인 단일 변이를 조합하는 것으로, 한층 더 기질 특이성의 개선을 기대할 수 있는 것이 분명해졌다.

[0338]

<실시예 16>

[0339]

(기질 특이성 개선에 유효한 변이의 축적)

[0340]

[표 16]에 나타낸 사용 플라스미드(plasmid) L 및 S를 제한 효소 KpnI 및 HindIII로 이중 소화하여 사용 플라스미드(plasmid) L로부터 약 5.3 kbp의 DNA 단편을, 사용 플라스미드(plasmid) S로부터 약 0.8 kbp의 DNA 단편을

각각 아가로스 겔 전기 영동에 의해 분리한 후, Nucleo Spin Extract II(Macherey-Nagel 사wp)로 겔에서 각 DNA 단편을 추출, 정제했다. 이어서, 양DNA 단편을 Ligation high Ver.2(토요 방적 사제)를 이용해 연결하여 연결한 플라스미드(plasmid) DNA를 이용해 대장균 JM109 균주를 형질 전환하고 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열에 [표 16] 안의 아미노산 변이 란에 기재한 복수의 아미노산 치환이 도입된 개변형 아마드리아제를 생산하는 대장균 JM109 균주를 얻었다.

[0341] 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0342] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법에 나타낸 방법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 16]에 나타낸다.

표 16

플라스미드	아미노산 변이	사용된 플라스미드 L	사용된 플라스미드 S	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T7	없음	없음	없음	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-E98Q/V259A	E98Q, V259A	pKK223-3-CFP-T7-E98Q	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.020	6	0.009	10
pKK223-3-CFP-T7-E98Q/V259C	E98Q, V259C		pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.034	11	0.014	15
pKK223-3-CFP-T7-E98H/V259A	E98H, V259A	pKK223-3-CFP-T7-E98H	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.037	12	0.015	16
pKK223-3-CFP-T7-E98H/V259C	E98H, V259C		pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.036	11	0.014	15
pKK223-3-CFP-T7-E98R/V259C	E98R, V259C	pKK223-3-CFP-T7-E98R	pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.022	7	0.008	9
pKK223-3-CFP-T7-E98A/V259C	E98A, V259C	pKK223-3-CFP-T7-E98A	pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.044	14	0.018	19
pKK223-3-CFP-T7-E98A/G263R	E98A, G263R		pKK223-3-CFP-T7-G263R	0.064	20	0.030	32
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/V259A	Q110R, V259A	pKK223-3-CFP-T7-Q110R	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.035	11	0.014	15
pKK223-3-CFP-T7-S154D/V259A	S154D, V259A	pKK223-3-CFP-T7-S154D	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.054	17	0.023	25
pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N/V259C	E98A, S154N, V259C	pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N	pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.016	5	0.006	6
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154N/V259A	Q110R, S154N, V259A	pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154N	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.017	5	0.007	8

[0343]

[표 16]중의 다중 아미노산 치환이 도입된 개변형 아마드리아제에서는 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV는 모두 각 아미노산 치환을 단독으로 도입했을 경우와 비교해 낮은 값이 되었다. 고로, 서열 번호 1에 나타낸 아마드리아제의

기질 특이성 개선에 효과적인 단일 변이를 조합하는 것으로, 한층 더 기질 특이성의 개선을 기대할 수 있는 것이 분명해졌다.

[0345] <실시예 17>

[0346] (개변형 아마드리아제의 생산 및 정제)

야생형 아마드리아제 및 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제를 생산하는 형질 전환체, 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-Q110R), 및 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-Q110K), 및 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-Y261F), 및 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-Y261W), 및 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-E98A/V259C), 및 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N/V259C)를, 0.1 mM의 IPTG를 첨가한 LB-amp 배지 40 mL에 식균 하여 30°C로 16시간 배양했다. 수득한 각 배양균체를 20 mM의 HEPES-NaOH 완충액(pH7.0)으로 세정한 후, 상기 완충액에 균체를 혼탁하여 초음파 파쇄처리를 실시하고 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액 8 mL를 제조했다.

[0348] 제조한 조효소액을 20 mM HEPES-NaOH 완충액(pH7.0)으로 평형화한 4 mL의 Q-Sepharose Fast Flow 수지(GE 헬스케어 사제)에 흡착시켜, 다음에 80 mL의 상기 완충액으로 수지를 세정하여, 이어서, 100 mM NaCl를 포함한 20 mM HEPES-NaOH 완충액(pH7.0)으로 수지에 흡착된 단백질을 용출하여 아마드리아제 활성을 나타내는 분획을 회수했다.

[0349] 수득한 아마드리아제 활성을 나타내는 분획을, Amicon Ultra-15,30KNMWL(밀리포어 사제)로 농축했다. 그 후, 150 mM NaCl을 포함한 20 mM HEPES-NaOH 완충(pH7.0)으로 평형화한 HiLoad 26/60 Superdex 200 pg(GE 헬스케어 사제)에 어플라이 하여 상기 완충액으로 용출하고, 아마드리아제 활성을 나타내는 분획을 회수하여 야생형 및 개변형 아마드리아제의 정제표본을 얻었다. 수득한 정제표본은 SDS-PAGE에 의한 분석에 의하여 단일 밴드수준 까지 정제 되어 있는 것을 확인했다.

[0350] 수득한 야생형 및 개변형 아마드리아제의 정제표본을 이용하여 α FVH, ε FK, α FV를 기질로 했을 때의 효소 활성을 측정했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티페린 용액을 이용했다. 결과를 [표 17], [표 18]에 나타낸다. 나아가, 비활성의 산출에 이용한 단백질 농도는 Bradford법에 근거하는 비색 정량법, 또는 280 nm에서의 흡광도를 이용한 자외 흡수법으로 측정했다. 각 정량법에 의해 측정한 단백질 농도로부터 산출한 비활성은 각각 U/mg, U/A₂₈₀ 으로 나타냈다.

표 17

아미노산 변이	비활성 (α FVH) (U/mg)	비활성 (ε FK) (U/mg)	비활성 (α FV) (U/mg)	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율 (%)
없음	22.6	7.0	76.2	0.310	100	0.092	100
Q110R	20.3	2.7	48.1	0.133	43	0.056	61
Q110K	21.2	3.4	37.0	0.160	52	0.092	100

[0351]

표 18

아미노산 변이	비활성 (α FVH) (U/A ₂₈₀)	비활성 (ε FK) (U/A ₂₈₀)	비활성 (α FV) (U/A ₂₈₀)	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
없음	12.6	3.90	42.5	0.310	100	0.092	100
Y261F	5.80	0.305	7.08	0.053	17	0.043	47
Y261W	2.85	0.0599	3.22	0.021	7	0.019	21
E98A, V259C	12.7	0.585	31.3	0.046	15	0.019	21
E98A, S154N, V259C	11.4	0.197	26.4	0.017	5	0.007	8

[0352]

[표 17]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민을 아르기닌, 라이신으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는, 모두 개변 전의 값인 0.310보다 낮은 값을 나타냈고, 또한, 110 위치의 글루타민을 아르기닌으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FV는 개변 전의 값인 0.092보다 낮은 값을 나타냈다. 또한, [표 18]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 261 위치의 타이로신을 페닐 알라닌, 또는 트립토판으로 치환한 개변형의 아마드리아제, 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 알라닌으로, 한편 259 위치의 발린을 시스테인으로 치환한 개변형의 아마드리아제, 및 서열 번호 1로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 알라닌으로, 또한, 154 위치의 세린을 아스파라긴으로, 또한, 259 위치의 발린을 시스테인으로 치환한 개변형의 아마드리아제의 ε FK/ α FVH는, 모두 개변 전의 값인 0.310보다 낮은 값을 나타냈고, 또한, ε FK/ α FV는 개변 전의 값인 0.092보다 낮은 값을 나타냈다. 상기 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환이었다.

[0354]

또한, 야생형 및 각 개변형 아마드리아제의 정제표품을 이용해 효소 활성을 측정하여 산출한 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV의 값은, 야생형 및 각 개변형 아마드리아제의 조효소액을 이용해 효소 활성을 측정해 산출한 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV의 값과 큰 차이는 보이지 않았다. 따라서, 개변형 아마드리아제의 조효소액을 이용해 효소 활성 측정에 대해 기질 특이성의 개선이 인정되면, 개변형 아마드리아제의 정제 효소표본을 이용한 효소 활성의 측정에 대해서도 기질 특이성의 개선이 인정된다고 보는 것이 가능하다.

[0355]

<실시예 18>

[0356]

(개변형 아마드리아제에 의한 α FVH의 정량)

[0357]

다음으로, 개변형 아마드리아제를 이용해 HbA1c의 β -사슬 아미노 말단에서(보다) 프로테아제등에 의해 유리되는 α FVH를 정량할 때에, 공존하는 ε FK가 측정값에 주는 영향에 대해 평가했다.

[0358]

C. 시약의 제조

[0359]

(4) 시약 4: 페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액

[0360]

7.5 kU의 페옥시다제(키코만 사제), 150 mg의 4-아미노안티피린(도쿄 카세이 사제)을 0.15 M의 인산칼륨 완충액(pH6.5)에 용해하여 1000 ml로 정용한다.

[0361]

(5) 시약 5: TOOS 용액

[0362]

500 mg의 TOOS(도진 화학 연구소제)를 이온 교환수에 용해하여 100 ml로 정용한다.

[0363]

(6) 시약 6: 아마드리아제 용액

[0364]

정제한 서열 번호 1로 기재된 아마드리아제 및 서열 번호 1로 기재된 아마드리아제의 98 위치의 글루타민산을 알라닌으로, 또한, 154 위치의 세린을 아스파라긴으로, 한편 259 위치의 발린을 시스테인으로 치환한 개변형의 아마드리아제(서열 번호 271)를 0.01 M의 인산칼륨 완충액(pH6.5)로 희석하여 각각 1.0 U/ml, 2.3 U/ml가 되도록

록 제조했다.

[0365] (7) 시약 7: α FVH 용액

[0366] α FVH 625 mg를 이온 교환수에 용해하여 10 mL로 정용하여, 150 mM의 α FVH 용액을 제조했다. 이어서, 150 mM의 α FVH 용액을 이온 교환수로 정용하는 것으로, 90 M, 180 M, 270 M, 360 M, 450 M의 α FVH 용액을 제조했다.

[0367] (8) 시약 8: 혈액 모델 시료

[0368] ε FK462 mg를 이온 교환수에 용해하여 10 mL에 희석하는 것으로 제조한 150 mM의 ε FK 용액과 상기 (7)로 제조한 150 mM의 α FVH 용액을 이온 교환수로 희석하여 이하의 4 종류의 혈액 모델 용액을 제조했다.

[0369] 8-1. 215 μ M α FVH

[0370] 8-2. 215 μ M α FVH, 215 μ M ε FK

[0371] 8-3. 215 μ M α FVH, 1075 μ M ε FK

[0372] 8-4. 215 μ M α FVH, 2150 μ M ε FK

[0373] 또한, 헤모글로빈 농도 15 g/dL, HbA1c 6.1%(JDS치, NGSP치 6.5%상당, IFCC치 46.5 mmol/mol 상당)의 혈액에서 는, 헤모글로빈의 분자량을 65 kDa로 하면, HbA1c의 β -사슬 아미노 말단으로부터 유리되는 α FVH의 농도는 215 μ M가 된다.

[0374]

[0375] (개변형 아마드리아제에 의한 α FVH의 정량성의 확인)

[0376] 1.8 mL의 시약 4, 100 μ L의 시약 5 및 100 μ L의 시약 6을 혼합하여 37°C로 5분간 예비 가온한다. 그 후, 37°C로 5분간 예비 가온해 둔 시약 7을 1000 μ L 더해 잘 혼합한 후, 분광 광도계(U-3010 A, 히타치 하이테크놀로지 사제)로 555 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 1분간 당의 흡광도 변화량(ΔA_{555})을 산출했다. 또한, 대조액은, 1000 μ L의 시약 7 대신에 1000 μ L의 이온 교환수를 추가하는 이외는 상기와 같게 한 것이다. 결과를 [도 2]에 나타냈다. [도 2]에 분명하게 나타낸 바와 같이, α FVH 농도와 흡광도 변화량(ΔA_{555})에는 상관관계가 성립했다. 따라서, 서열 번호 1로 기재된 아마드리아제 및 서열 번호 271로 기재된 개변형 아마드리아제는 모두, 90 μ M에서 450 μ M의 범위에서 α FVH의 정량에 이용할 수 있는 것을 확인했다.

[0377] (개변형 아마드리아제에 의한 혈액 모델 시료의 정량)

[0378] 1.8 mL의 시약 4, 100 μ L의 시약 5 및 100 μ L의 시약 6을 혼합하여 37°C로 5분간 예비 가온한다. 그 후, 37°C로 5분간 예비 가온해 둔 시약 8-1에서 8-4의 어느 하나를 1000 μ L를 더해 잘 혼합한 후, 분광 광도계(U-3010 A, 히타치 하이테크놀로지 사제)로 555 nm에서의 흡광도를 측정하여 1분 당의 흡광도 변화량(ΔA_{555})을 산출했다. 또한, 대조액은, 1000 μ L의 시약 8-1 ~ 8-4 대신에 1000 μ L의 이온 교환수를 추가하는 이외는 상기와 같게 한 것이다. 결과를 [표 19]에 나타냈다. [표 19]에 분명하게 나타낸 바와 같이, 서열 번호 1로 기재된 아마드리아제를 이용했을 경우, α FVH와 같은 농도의 ε FK가 공존하면, 그 측정치는 본래의 측정치와 비교해 3% 미만의 차이를 보였고, α FVH의 5배, 10배 농도의 ε FK가 공존하면, 그 측정치는 본래의 측정치와 비교하여 8%, 17%의 차이를 보였다. 그에 대하여 서열 번호 271로 기재된 개변형 아마드리아제를 이용했을 경우에는 α FVH의 같은 농도, 5배 농도의 ε FK가 공존해도, 본래의 측정치와의 차이는 1% 미만이며, 또한, α FVH의 10배 농도의 ε FK가 공존해도, 본래의 측정치와의 차이는 2% 미만이다. 따라서, 서열 번호 271로 기재된 개변형 아마드리아제를 이용하면, ε FK가 공존하고 있는 시료에서도 정확하게 α FVH만을 정량하는 것이 가능하다.

표 19

혈액 모델 시료	서열번호 1 아마드리아제			서열번호 271 아마드리아제			$\Delta A555$ 비율 (%)	
	$\Delta A555$			$\Delta A555$ 비율 (%)	$\Delta A555$			
	1회차 측정치	2회차 측정치	평균치		1회차 측정치	2회차 측정치	평균치	
8-1	0.111	0.111	0.111	100.0	0.124	0.124	0.124	100.0
8-2	0.115	0.113	0.114	102.7	0.123	0.122	0.123	99.2
8-3	0.120	0.120	0.120	108.1	0.125	0.125	0.125	100.8
8-4	0.129	0.131	0.130	117.1	0.127	0.125	0.126	101.6

[0379]

<실시예 19>

(아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자의 클로닝 및 대장균으로의 발현)

(a) 아스페르길루스 니드랑스 FGSC A26 균주로부터의 전체 RNA의 추출

아스페르길루스 니드랑스 FGSC A26 균주를, 액체 배지(0.4% 이스트 익스트랙트(yeast extract), 1.0% 맬트 익스트랙트(malt extract), 0.1% 트립톤, 0.1% 인산 2 수소 1 칼륨, 0.05% 황산마그네슘, 2.0% 글루코오스, pH6.5)에서, 30°C로 24시간 배양했다. 배양 후, 회수한 균체를 액체 질소로 분쇄하여 ISOGEN(니쁜 진 사베)를 이용해 부속의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 제조했다. 또한, 제조한 전체 RNA를 DNaseI(인비트로젠 사제)로 처리함으로써, DNA의 혼입을 막았다.

(b) 아스페르길루스니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 cDNA의 클로닝

수득한 전체 RNA 1 μ g를 이용하여, Prime Script RT-PCR Kit(다카라 바이오 사제)로 부속의 프로토콜에 따라서 RT-PCR를 실시했다. 이 때, 역전사 반응에서는 Kit 부속의 Oligo dT Primer를 이용하고 그 후의 PCR 반응에서는 서열 번호 169, 170로 기재된 합성 올리고 뉴클레오티드를 이용했다. 그 결과, 약 1,300 bp의 cDNA 단편이 특이적으로 증폭했다. 다음으로, 상기 증폭한 cDNA 단편에 대해 서열 해석을 실시한 결과, 서열 번호 171로 기재된 1,317 bp로 구성되는 염기 서열인 것을 알 수 있었다. 또한, 서열 번호 171에서 예상되는 아미노산 서열(서열 번호 172)은 도 1의 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 서열과 일치했다.

(c) 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 대장균에서의 발현

이어서, 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제를 대장균으로 발현시키기 위해서, 이하의 순서를 실시했다. 우선, 상기 클로닝 한 cDNA 단편은 서열 번호 169, 170으로 기재된 합성 뉴클레오티드 유래의 NdeI 사이트와 BamHI 사이트를 각각 5' 말단과 3' 말단에 가지고 있기 때문에, 클로닝 한 cDNA 단편을 NdeI와 BamHI(다카라 바이오 사제)의 2 종류의 제한 효소로 처리하여 pET-22 b(+) Vector(노바젠 사제)의 NdeI-BamHI 사이트에 삽입하는 것으로, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX를 취득했다.

다음으로, 아스페르길루스니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제에 프룩토실 펩티드 옥시다제 활성을 부여하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX를 주형으로 하고, 서열 번호 173, 174의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 172로 기재된 아미노산 서열의 59 위치의 세린이 글리신으로 치환된 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-AnFX)를 취득했다. 그리고, 상기 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX를 대장균 BL21(DE3) 균주(니쁜 진 사제)로 형질 전환하여, 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제를 생산하는 대장균을 취득했다.

상기로 수득한 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제를 생산하는 대장균 BL21(DE3)를, Over night Express Autoinduction System 1(노바젠 사제)의 시약을 더한 LB-amp 배지에서 30°C로 18시간 진탕 배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파 파쇄처리를 실시하고

20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법에 의하여 α FV에 대한 효소 활성을 측정했는데, 2.2 U/ml였다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다.

[0390] <실시예 20>

(아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자으의 점변이 도입)

기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX를 주형으로 하고, 서열 번호 175, 176의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 172로 기재된 아미노산 서열의 153 위치의 시스테인이 아스파라긴산으로 치환된 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-AnFX-C153D)를 얻었다.

이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX를 주형으로 하고, 서열 번호 177, 178 및 179, 180의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 172로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린이 각각 알라닌, 시스테인으로 치환된 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-AnFX-V259A, pET22b-AnFX-V259C)를 얻었다.

이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX를 주형으로 하고, 서열 번호 181, 182 및 183, 184의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 172로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신이 각각 라이신, 아르기닌으로 치환된 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-AnFX-G263K, pET22b-AnFX-G263R)를 얻었다.

[0395] <실시예 21>

(점변이를 도입한 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 기질 특이성 개선 효과의 평가)

상기로 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-AnFX, pET22b-AnFX-C153D, pET22b-AnFX-V259A, pET22b-AnFX-V259C, pET22b-AnFX-G263K, pET22b-AnFX-G263R를 각각 유지하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Auto induction System 1(노바젠 사제)의 시약을 추가한 LB-amp 배지에 있어 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파 파쇄처리를 실시하고 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하여, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV, α FVH 및 ϵ FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV를 산출했다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다. 결과를 [표 20]에 나타낸다.

표 20

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오티드 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε F K/ α F VH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pET22b-AnFX	없음	없음	0.124	100	0.0255	100
pET22b-AnFX-C153D	C153D	175, 176	0.0882	71	0.0142	56
pET22b-AnFX-V259A	V259A	177, 178	0.0208	17	0.0051	20
pET22b-AnFX-V259C	V259C	179, 180	0.0444	36	0.0092	36
pET22b-AnFX-G263K	G263K	181, 182	0.0714	57	0.0175	69
pET22b-AnFX-G263R	G263R	183, 184	0.0684	55	0.0153	60

[0398]

[표 20]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 172로 기재된 아미노산 서열의 153 위치의 시스테인을 아스파라긴산으로, 259 위치의 발린을 알라닌 또는 시스테인으로, 263 위치의 글리신을 라이신 또는 아르기닌으로 치환하는 것으로써, 아스페르길루스 니드랑스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV는 모두 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 따라서, 이것들 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환인 것을 알 수 있었다.

[0400]

<실시예 22>

[0401]

(페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자의 클로닝 및 대장균으로의 발현)

[0402]

(a) 페니실리움 크리소게니움 NBRC9251 균주로부터의 전체 RNA의 추출

[0403]

페니실리움 크리소게니움 NBRC9251 균주를, 액체 배지(0.4% 이스트 익스트랙트, 1.0% 맬트 익스트랙트, 0.1% 트립톤, 0.1% 인산 2 수소 1 칼륨, 0.05% 황산마그네슘, 2.0% 글루코오스, pH6.5)에서, 30°C으로 24시간 배양하여 상기와 동일한 순서로 전체 RNA를 제조했다.

[0404]

(b) 페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 cDNA의 클로닝

[0405]

수득한 전체 RNA 1 μ g를 이용하여, 상기와 같은 해 RT-PCR를 실시했다. 이 때, 역전사 반응에서는 Kit 부속의 Oligo dT Primer를 이용하고 그 후의 PCR 반응에서는 서열 번호 185, 186로 기재된 합성 올리고 뉴클레오티드를 이용했다. 그 결과, 약 1,300 bp의 cDNA 단편이 특이적으로 증폭했다. 다음으로, 상기 증폭한 cDNA 단편에 대해 서열 해석을 실시한 결과, 서열 번호 187로 기재된 1,317 bp로 구성되는 염기 서열인 것을 알 수 있었다. 또한, 서열 번호 187로 예상되는 아미노산 서열(서열 번호 188)은, 도 1로 기재된 페닐시리움 얀시넬리움의 서열의 69번째의 루신이 트립토판으로, 142번째의 스레오닌이 알라닌으로 치환된 것과 일치하고 있었다.

[0406]

(c) 페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 대장균으로의 발현

[0407]

이어서, 페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제를 대장균으로 발현시키기 위해서, 이하의 순서를 실시했다. 우선, 상기로 클로닝 해온 cDNA 단편은 서열 번호 185, 186로 기재된 합성 뉴클레오티드 유래의 NdeI 사이트와 BamHI 사이트를 각각 5' 말단과 3' 말단에 가지고 있기 때문에, 클로닝 한 cDNA 단편을 NdeI 와 BamHI(다카라 바이오 사제)의 2 종류의 제한 효소로 처리하여 pET-22 b(+) Vector(노바젠 사제)의 NdeI-BamHI 사이트에 삽입하는 것으로, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX'를 취득했다.

[0408]

다음에, 페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제에 프룩토실 웨티드 옥시다제 활성을 부여하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX를 주형으로 하여, 서열 번호 189, 190의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정

을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 188로 기재된 아미노산 서열의 60 위치의 세린이 글리신으로 치환된 페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-PcFX)를 취득했다. 그리고, 이 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX를 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환하는 것으로, 페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제를 생산하는 대장균을 취득했다.

[0409] 상기로 수득한 페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제를 생산하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Auto induction System 1(노바젠 사)의 시약을 더한 LB-amp 배지에 있어 30°C으로 18시간 진탕 배양했다. 수득한 각 배양균체를 베그 부스터 단백질 추출 반응물(Bug Buster Protein Extraction Reagent)(노바젠 사)를 이용해 용균 한 후, 20,000 ×g로 10분간 원심분리하는 것으로 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 αFV에 대한 효소 활성을 측정했는데, 0.090 U/ml였다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다.

<실시예 23>

(페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자으로의 점변이 도입)

[0412] 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX를 주형으로 하고, 서열 번호 191, 192의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 188로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 라이신이 아르기닌으로 치환된 페니시리움크리소케님 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-PcFX-K110R)를 얻었다.

[0413] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX를 주형으로 하고, 서열 번호 193, 194의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 188로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 시스테인이 아스파라긴산으로 치환된 페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-PcFX-C154D)를 얻었다.

[0414] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX를 주형으로 하여, 서열 번호 195, 196의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 188로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신이 라이신으로 치환된 페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-PcFX-G263K)를 얻었다.

<실시예 24>

(점변이를 도입한 페니실리움 크리소케니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 특성 평가)

[0417] 상기로 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-PcFX, pET22b-PcFX-K110R, pET22b-PcFX-C154D, pET22b-PcFX-G263K를 각각 유지하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Autoinduction System 1(노바젠 사제)의 시약을 추가한 LB-amp 배지에 있어 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 Bug Buster Protein Extraction Reagent(노바젠 사)를 이용해 용균 한 후, 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 αFV, αFVH 및 εFK에 대한 효소 활성을 측정하여 εFK/αFVH 및 εFK/αFV를 산출했다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다. 결과를 [표 21]에 나타냈다.

표 21

플라스미드	아미노산 변이	사용된 울리고뉴클레오타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pET22b-PcFX	없음	없음	0.0833	100	0.0085	100
pET22b-PcFX-K110R	K110R	191, 192	0.0353	42	0.0051	59
pET22b-PcFX-C154D	C154D	193, 194	0.0645	77	0.0079	93
pET22b-PcFX-G263K	G263K	195, 196	0.0711	85	—	—

[0418]

[0419] [표 21]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 188로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 라이신을 아르기닌으로, 154 위치의 시스테인을 아스파라긴산으로 치환하는 것으로써, 페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV는 모두 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 또한, 서열 번호 188로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신을 라이신으로 치환하는 것으로써, 페니실리움 크리소게니움 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 ε FK/ α FVH는 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 따라서, 이를 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환인 것을 알 수 있었다.

[0420]

<실시예 25>

[0421]

(크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 대장균으로의 발현)

[0422]

기존의 프룩토실 아미노산 옥시다제의 아미노산 서열을 기초로, 계놈 데이터베이스 (<http://www.genome.jp/tools/blast/>)에서 검색한 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 (Cryptococcus neoformans B-3501A: GENE ID: 4934641 CNBB5450 hypothetical protein)에 대해서, C말단으로부터 34 아미노산을 제외한, 서열 번호 197으로 기재된 443 아미노산을 대장균으로 발현시키는 것을 시도했다. 거기서, 서열 번호 197의 아미노산 서열을 코드하고 또한, 대장균 발현용으로 코돈을 최적화한, 서열 번호 198으로 기재된 1,332 bp의 유전자(종지 코돈 TGA를 포함한다)를, 정법인 유전자 단편의 PCR에 의한 전(全)합성으로 cDNA를 전합성하여 취득했다. 이 때, 서열 번호 1의 5'말단, 3'말단에는 각각 NdeI 사이트와 BamHI 사이트를 부가했다. 또한, 클로닝 한 유전자 서열로부터 예상되는 아미노산 서열은 도 1의 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 C말단으로부터 34 아미노산을 제외한 서열과 일치하고 있는 것을 확인했다.

[0423]

이어서, 취득한 서열 번호 198의 유전자를 대장균으로 발현시키기 위해서, 이하의 순서를 실시했다. 우선, 상기로 전합성한 유전자를 NdeI와 BamHI(다카라 바이오 사제)의 2 종류의 제한 효소로 처리하고 pET-22 b(+) Vector(노바젠 사제)의 NdeI-BamHI 사이트에 삽입하는 것으로, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 취득하고 대장균 BL21(DE3)로 형질전환했다. 다음으로, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 유지하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Autoinduction System 1(노바젠 사제)의 시약을 추가한 LB-amp 배지서 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파 파쇄 처리를 실시하고 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV에 대한 효소 활성을 측정했는데, 각각 2.2 U/ml였다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다.

[0424]

<실시예 26>

[0425]

(크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자의 점변이 도입)

[0426]

기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 주형으로 하여, 서열 번호 199, 200의 합성 울리고 뉴클레오타이드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드 (plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열

번호 197로 기재된 아미노산 서열의 100 위치의 스레오닌이 아르기닌으로 치환된 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-CnFX-T100R)를 얻었다.

[0427] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 주형으로 하여, 서열 번호 201, 202의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제))를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 197로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 세린이 아르기닌으로 치환된 클립트 코카스네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-CnFX-S110R)를 얻었다.

[0428] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 주형으로 하여, 서열 번호 203, 204의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 197로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린이 아스파라긴으로 치환된 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-CnFX-S154N)를 얻었다.

[0429] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 주형으로 하여, 서열 번호 205, 206및 207, 208의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 197로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린이 각각 알라닌, 시스테인으로 치환된 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-CnFX-V259A, pET22b-CnFX-V259C)를 얻었다.

[0430] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX를 주형으로 하고, 서열 번호 209, 210및 211, 212의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 197로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 세린이 각각 라이신, 아르기닌으로 치환된 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-CnFX-S263K, pET22b-CnFX-S263R)를 얻었다.

<실시예 27>

(점변이를 도입한 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 특성 평가)

[0433] 상기로 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-CnFX-T100R, pET22b-CnFX-S110R, pET22b-CnFX-S154N, pET22b-CnFX-V259A, pET22b-CnFX-V259C, pET22b-CnFX-S263K, pET22b-CnFX-S263R를 각각 유지하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Autoinduction System 1(노바젠 사제)의 시약을 추가한 LB-amp 배지서 30℃로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파파쇄처리를 실시하고 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV, α FVH 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다. 결과를 [표 22]에 나타낸다.

표 22

플라스미드	아미노산 변이	사용된 리고뉴클레오 타이드 서열번호	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FV 비율 (%)	ϵ FK/ α FV 비율	ϵ FK/ α FV 비율 (%)
pET22b-CnFX	없음	없음	0. 0647	100	0. 0197	100
pET22b-CnFX-T100R	T100R	199, 200	0. 0584	90	0. 0168	85
pET22b-CnFX-S110R	S110R	201, 202	0. 0468	72	0. 0136	69
pET22b-CnFX-S154N	S154N	203, 204	0. 0552	85	0. 0180	91
pET22b-CnFX-V259A	V259A	205, 206	0. 0353	55	0. 0116	59
pET22b-CnFX-V259C	V259C	207, 208	0. 0284	44	0. 0085	43
pET22b-CnFX-S263K	S263K	209, 210	0. 0583	90	0. 0171	87
pET22b-CnFX-S263R	S263R	211, 212	0. 0543	84	0. 0156	79

[0434]

[0435] [표 22]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 197로 기재된 아미노산 서열의 100 위치의 스크레이프를 아르기닌으로, 110 위치의 세린을 아르기닌으로, 154 위치의 세린을 아스파라긴으로, 259 위치의 발린을 알라닌 또는 시스테인으로, 263 위치의 세린을 라이신 또는 아르기닌으로 치환하는 것으로써, 크립토코쿠스 네오포르만스 유래 프룩토실 아미노산 옥시다제의 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV는 모두 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 따라서, 이를 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환인 것을 알 수 있었다.

[0436]

<실시예 28>

[0437]

(네오페스모스포라 바신페타 유래 케토아민 옥시다제의 대장균에서의 발현)

[0438]

네오페스모스포라 바신페타 유래 케토아민 옥시다제를 대장균으로 발현시키는 것을 시도했다. 벌써 밝혀지고 있는 네오페스모스포라 바신페타 유래 케토아민 옥시다제의 아미노산 서열을 서열 번호 213으로 나타냈다(특허 문헌 1 참조). 이 서열 번호 213으로 기재된 441 아미노산을 코드하고, 또한, 대장균 발현용으로 코돈을 최적화한, 서열 번호 214로 기재된 1,326 bp의 유전자(종지 코돈 TGA를 포함한다)를 정법인 유전자 단편의 PCR에 의한 전합성에 의해 cDNA를 전합성하여 취득했다. 이 때, 서열 번호 1의 5' 말단, 3' 말단에는 각각 NdeI 사이트와 BamHI 사이트를 부가했다. 또한, 클로닝 한 유전자 서열로부터 예상되는 아미노산 서열 전체 길이는 도 1의 네오페스모스포라 바신페타 유래 케토아민 옥시다제의 서열과 일치하고 있는 것을 확인했다.

[0439]

이어서, 취득한 서열 번호 214의 유전자를 대장균으로 발현시키기 위해서, 이하의 순서를 실시했다. 우선, 상기로 전합성한 유전자를 NdeI와 BamHI(다카라 바이오 사)의 2 종류의 제한 효소로 처리하여 pET-22b(+) Vector (노바젠 사)의 NdeI-BamHI 사이트에 삽입하는 것으로, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NvFX를 취득하여 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환했다. 다음에, 이 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NvFX를 유지하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Autoinduction System 1(노바젠 사제)의 시약을 추가한 LB-amp 배지에서 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파파쇄처리를 실시하고 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV에 대한 효소 활성을 측정했는데, 19.3 U/ml였다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다.

[0440]

<실시예 29>

[0441]

(네오페스모스포라 바신페타 유래 케토아민 옥시다제 유전자으로의 점변이 도입)

[0442]

이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NFX를 주형으로 하여, 서열 번호 215, 216 및 217, 218 및 219, 220 및 221, 222의 합성 올리고 뉴클레

오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 프룩토실 아미노산 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산이 각각 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-E98Q, pET22b-NvFX-E98H, pET22b-NvFX-E98K, pET22b-NvFX-E98R)를 얻었다.

[0443] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NFX를 주형으로 하고, 서열 번호 223, 224의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 케토아민 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 103 위치의 글리신이 아르기닌으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-G103R)를 얻었다.

[0444] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NFvX를 주형으로 하고, 서열 번호 225, 226의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 케토아민 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 글루타민산이 아르기닌으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-E110R)를 얻었다.

[0445] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NvFX를 주형으로 하여, 서열 번호 227, 228 및 229, 230의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 케토아민 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 154 위치의 세린이 각각 아스파라긴, 아스파라긴산으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-S154N, pET22b-NvFX-S154D)를 얻었다.

[0446] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NvFX를 주형으로 하여, 서열 번호 231, 232 및 233, 234의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 케토아민 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 발린이 각각 알라닌, 시스테인으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-V259A, pET22b-NvFX-V259C)를 얻었다.

[0447] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NvFX를 주형으로 하여, 서열 번호 235, 236 및 237, 238의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 케토아민 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신이 각각 라이신, 아르기닌으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-G263K, pET22b-NvFX-G263R)를 얻었다.

[0448] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NvFX를 주형으로 하여, 서열 번호 239, 240의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 BL21(DE3)의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 케토아민 옥시다제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 66 위치의 라이신이 글리신에, 67 위치의 발린이 프롤린으로 치환된 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pET22b-NvFX-K66GV67P)를 얻었다.

[0449]

<실시예 30>

[0450]

(점변이를 도입한 네오코스모스포라 바신펩타 유래 케토아민 옥시다제의 특성 평가)

[0451]

상기로 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pET22b-NFX-E98Q, pET22b-NFX-E98H, pET22b-NFX-E98K, pET22b-NFX-E98R, pET22b-NFX-E110R, pET22b-NFX-S154N, pET22b-NFX-S154D, pET22b-NFX-V259A, pET22b-NFX-V259C, pET22b-NFX-G263K, pET22b-NFX-G263R, pET22b-NFX-K66GV67P를 각각 유지하는 대장균 BL21(DE3)를, Overnight Express Autoinduction System 1(노바젠 사제)의 시약을 추가한 LB-amp 배지에서 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)에 희석하여 초음파 파쇄처리를 실시하고 20,000 ×g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV, α FVH 및 ϵ FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV를 산출했다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH7.5로 조정한 것을 사용했다. 결과를 [표 23]에 나타냈다.

표 23

플라스미드	아미노산 변이	사용된 올리고뉴클레오퍼 타이드 서열번호	ϵ FK/ α FV H 비율 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 비율 (%)
pET22b-NvFX	없음	없음	2.32	100	0.707	100
pET22b-NvFX-E98Q	E98Q	215, 216	1.45	63	0.585	83
pET22b-NvFX-E98H	E98H	217, 218	1.41	61	0.601	85
pET22b-NvFX-E98K	E98K	219, 220	0.691	30	0.239	34
pET22b-NvFX-E98R	E98R	221, 222	0.840	36	0.237	33
pET22b-NvFX-G103R	G103R	223, 224	1.65	71	0.579	82
pET22b-NvFX-E110R	E110R	225, 226	0.474	20	0.178	25
pET22b-NvFX-S154N	S154N	227, 228	1.32	57	0.359	51
pET22b-NvFX-S154D	S154D	229, 230	1.67	72	0.494	70
pET22b-NvFX-V259A	V259A	231, 232	1.33	57	0.431	61
pET22b-NvFX-V259C	V259C	233, 234	1.27	55	0.474	67
pET22b-NvFX-G263K	G263K	235, 236	0.974	42	0.324	46
pET22b-NvFX-G263R	G263R	237, 238	0.972	42	0.315	45
pET22b-NvFX-K66GV67P	K66G, V67P	239, 240	2.10	90	—	—

[0452]

[표 23]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 213으로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 글루타민 또는 히스티딘 또는 라이신 또는 아르기닌으로, 103 위치의 글리신을 아르기닌으로, 110 위치의 글루타민산을 아르기닌으로, 154 위치의 세린을 아스파라긴 또는 아스파라긴산으로, 259 위치의 발린을 알라닌 또는 시스테인으로, 263 위치의 글리신을 라이신 또는 아르기닌으로 치환하는 것으로써, 네오코스모스포라 바신펩타 유래 프록토실 아미노산 옥시다제의 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV는 모두 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 또한, 66 위치의 라이신을 글리신으로, 또한, 67 위치의 발린을 프롤린으로 치환하는 것으로써, 네오코스모스포라바신펩타 유래 케토아민 옥시다제의 ϵ FK/ α FV는 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 따라서, 이들 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환인 것을 알 수 있었다.

[0454]

<실시예 31>

[0455]

(유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자으로의 점변이 도입)

- [0456] 서열 번호 241은 열안정성 향상형 변이(G184D, N272D, H388Y)를 도입한 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제의 아미노산 서열이며, 서열 번호 241의 아미노산 서열을 코드하는 유전자(서열 번호 242)를 삽입한 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5를 대장균으로 발현시키는 것으로써, 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제의 활성이 확인되고 있다(국제 공개 제 2007/125779호 참조).
- [0457] 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제에 기질 특이성 향상형 변이를 도입하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5를 주형으로 하여, 서열 번호 243, 244의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 세린이 알라닌으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-S98A)를 얻었다.
- [0458] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5를 주형으로 하여, 서열 번호 245, 246의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 라이신이 아르기닌으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-K110R)를 얻었다.
- [0459] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5를 주형으로 하고, 서열 번호 249, 250 및 251, 252의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 259 위치의 밸린이 각각 알라닌, 시스테인으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-V259A, pUTE100K'-EFP-T5-V259C)를 얻었다.
- [0460] 이어서, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5를 주형으로 하여, 서열 번호 253, 254의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 263 위치의 글리신이 라이신으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-G263K)를 얻었다.
- [0461] <실시예 32>
- [0462] (점변이를 도입한 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제의 기질 특이성 개선 효과의 평가)
- [0463] 상기로 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5-S98A, pUTE100K'-EFP-T5-K110R, pUTE100K'-EFP-T5-V259A, pUTE100K'-EFP-T5-V259C, pUTE100K'-EFP-T5-G263K를 각각 유지하는 대장균 DH5 α 균주를, 0.1 M의 IPTG를 첨가한 LB-amp 배지에서 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 린 산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파파쇄처리를 실시하고 20,000 \times g로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV, α FVH 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH8.0으로 조정한 것을 사용했다. 활성 측정 결과를 [표 24]에 나타낸다.

丑 24

플라스미드	아미노산 변이	사용된 리고뉴클레 오타이드 서열번호	ε FK/ α FVH	ε F K/ α F VH	ε FK/ α FV	ε FK / α FV 비율 (%)
pUTE100K' -EFP-T5	없음	없음	0.107	100	0.0206	100
pUTE100K' -EFP-T5-S98A	S98A	243, 244	0.0825	77	0.0151	73
pUTE100K' -EFP-T5-K110R	K110R	245, 246	0.0893	83	0.0204	99
pUTE100K' -EFP-T5-V259A	V259A	249, 250	0.0769	72	0.0172	84
pUTE100K' -EFP-T5-V259C	V259C	251, 252	0.0333	31	0.0068	33
pUTE100K' -EFP-T5-G263K	G263K	253, 254	0.0909	85	0.0139	68

[0464]

[0465] [표 24]에 나타낸 바와 같이, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 세린을 알라닌으로, 110 위치의 라이신을 아르기닌으로, 259 위치의 발린을 알라닌 또는 시스테인으로, 263 위치의 글리신을 라이신으로 치환하는 것으로써, 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제의 ϵ FK/ α FVH 및 ϵ FK/ α FV는 모두 치환 전보다 낮은 값이 되었다. 따라서, 이들 아미노산 치환은 기질 특이성이 개선된 아마드리아제의 제작에 유효한 치환인 것을 알 수 있었다.

[0466]

<실시예 33>

[0467]

(유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자의 기질 특성 향상형 다중 변이체의 제작)

[0468]

유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자의 기질 특이성 항상형 다중 변이체를 제작하는 것으로, ε FKR로의 반응성을 협조하게 저하시킨 아마드리아제의 개발을 시도했다.

[0469]

재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5-V259C를 주형으로 하고, 서열 번호 243, 244의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 세린이 알라닌으로, 259 위치의 발린이 시스테인으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드 (plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-S98A/V259C)를 얻었다.

[0470]

이와 같이 하여, 기질 특이성을 향상시키기 위한 점변이를 도입하는 것을 목적으로 하고, 재조합 플라스미드 (plasmid) pUTE100K'-EFP-T5-K110R를 주형으로 하고, 서열 번호 247, 248의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 라이신이 아르기닌으로, 154 위치의 시스테인이 아스파라긴으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드 (plasmid) (pUTE100K'-EFP-T5-K110R/C154N)를 얻었다.

[0471]

이와 같이 하여, 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5-V259C를 주형으로 하고, 서열 번호 245, 246의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 110 위치의 라이신이 아르기닌으로, 259 위치의 발린이 시스테인으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-K110R/V259C)를 얻었다.

[0472]

이와 같이 하여, 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5-S98A-V259C를 주형으로 하고, 서열 번호 245, 246의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용해 상기와 같은 조건으로 PCR 반응, 대장균 DH5 α 의 혼질 전화 및 셋팅 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염

기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 서열 번호 241로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 세린이 알라닌으로, 110 위치의 라이신이 아르기닌으로, 259 위치의 발린이 시스테인으로 치환된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pUTE100K'-EFP-T5-S98A/K110R/V259C)를 얻었다.

[0473] <실시예 34>

[0474] (유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제 유전자으로의 기질 특성 향상형 다중 변이의 도입에 의한 기질 특이성 개선 효과의 평가)

[0475] 상기로 수득한 재조합 플라스미드(plasmid) pUTE100K'-EFP-T5-S98A/V259C, pUTE100K'-EFP-T5-K110R/C154N, pUTE100K'-EFP-T5-K110R/V259C, pUTE100K'-EFP-T5-S98A/K110R/V259C를 각각 유지하는 대장균 DH5 α 균주를, 0.1 M의 IPTG를 첨가한 LB-amp 배지에서 30°C로 18시간 진탕배양했다. 수득한 각 배양균체를 10 mM의 인산칼륨 완충액(pH7.5)로 혼탁하여 초음파파쇄처리를 실시하고 20,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다. 이 조효소액을 이용하고, 상기의 B:활성 측정법으로 α FV, α FVH 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 다만, 이 때의 활성 측정의 시약 1은 pH8.0으로에 조정한 것을 사용했다. 활성 측정 결과를 [표 25]에 나타낸다.

표 25

플라스미드	아미노산 변이	주형으로 한 플라스미드	사용된 리고뉴클레 타이드 서열번호	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV 비율	ε FK/ α FV 비율 (%)	
pUTE100K' - EFP-T5	없음	없음	없음	0.107	100	0.0206	100
pUTE100K' - EFP-T5-S98A	S98A	pUTE100K' - EFP-T5	243, 244	0.0825	77	0.0151	73
pUTE100K' - EFP-T5-K110R	K110R	pUTE100K' - EFP-T5	245, 246	0.0893	83	0.0204	99
pUTE100K' - EFP-T5-V259C	V259C	pUTE100K' - EFP-T5	251, 252	0.0333	31	0.0068	33
pUTE100K' - EFP-T5-S98A/V259C	S98A, V259C	pUTE100K' - EFP-T5-V259C	243, 244	0.0248	23	0.0058	28
pUTE100K' - EFP-T5-K110R/C154N	K110R, C154N	pUTE100K' - EFP-T5-K110R	247, 248	0.0779	73	0.0115	56
pUTE100K' - EFP-T5-K110R/V259C	K110R, V259C	pUTE100K' - EFP-T5-V259C	245, 246	0.0267	25	0.0060	29
pUTE100K' - EFP-T5-S98A/K110R/V259C	S98A, K110R, V259C	pUTE100K' - EFP-T5-S98A/V259C	245, 246	0.0178	17	0.0047	23

[0476]

[0477] [표 25]에 나타낸 바와 같이, 다중 아미노산 치환이 도입된 유페니실리움 테레니움 유래 아마드리아제에서는, ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV는 모두 각 아미노산 치환을 단독으로 도입했을 경우와 비교해 더 낮은 값이 되었고, ε FK으로의 반응성이 현저하게 저하하는 것이 분명해졌다.

[0478] <실시예 35>

[0479] (재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T9 DNA의 제조)

[0480] 서열 번호 272는 열안정성 향상형 변이(G184D, F265L, N272D, H302R, H388Y)를 도입한 코니오카에타 속 유래 아마드리아제의 아미노산 서열이며, 서열 번호 273의 유전자에 코드되고 있다.

[0481] 코니오카에타 속 유래 아마드리아제 유전자(서열 번호 273)의 재조합 플라스미드(plasmid)를 가지는 대장균 JM109(pKK223-3-CFP-T9) 균주(국제 공개 제 2007/125779호 참조)를 <실시예 1>에 기재된 방법과 동일하게 배양하여, 배양물을 10,000 ×g로, 1분간 원심분리하여 집균하고 균체를 얻었다. 상기 균체로부터, Gen Elute Plasmid Mini-Prep Kit(시그마 알드리치 사제)를 이용해 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T9를 추출해 정제하여 2.5 µg의 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T9 DNA를 얻었다.

[0482] (재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T9 DNA의 부위 특이적 개변 조작)

[0483] 서열 번호 272로 기재된 아미노산 서열의 98 위치의 글루타민산을 알라닌으로, 154 위치의 세린을 아스파라긴으로, 259 위치의 발린을 시스테인으로 치환하기 위해서, 재조합 플라스미드(plasmid) pKK223-3-CFP-T9 DNA를 주형으로하여 서열 번호 55, 56의 합성 올리고 뉴클레오티드, KOD-Plus-(토요 방적 사제)를 이용하여 <실시예 1>에 기재된 동일한 조건으로 PCR 반응, 대장균 JM109의 형질 전환 및 생육 콜로니가 유지하는 플라스미드(plasmid) DNA중의 아마드리아제를 코드하는 DNA의 염기 서열 결정을 실시했다. 그 결과, 98 위치의 글루타민산이 알라닌으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T9-E98A)를 얻었다.

[0484] 상기와 동일하게 하여, pKK223-3-CFP-T9-E98A DNA를 주형으로 하여 서열 번호 139, 140의 합성 올리고 뉴클레오티드를 사용하고, 98 위치의 글루타민산이 알라닌으로, 154 위치의 세린이 아스파라긴으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T9-E98A/S154N)를 얻었다.

[0485] 상기와 동일하게 하여, pKK223-3-CFP-T9-E98A/S154N DNA를 주형으로 하여 서열 번호 151, 152의 합성 올리고 뉴클레오티드를 사용하여, 98 위치의 글루타민산이 알라닌으로, 154 위치의 세린이 아스파라긴으로, 259 위치의 발린이 시스테인으로 치환된 개변형 아마드리아제를 코드하는 재조합 플라스미드(plasmid)(pKK223-3-CFP-T9-E98A/S154N/V259C)를 얻었다.

[0486] 상기와 같이 수득한 개변형 아마드리아제 생산능을 가지는 대장균 JM109 균주를, 상기 <실시예 1>의 (3)에 기재된 방법으로 배양하고, 각종 개변형 아마드리아제의 조효소액 0.6 ml를 제조했다.

[0487] 이와 같이 제조한 효소액에 대해 상기 B:활성 측정법으로 α FVH, α FV 및 ε FK에 대한 효소 활성을 측정하여 ε FK/ α FVH 및 ε FK/ α FV를 산출했다. 또한, 활성 측정에는 pH7.0으로 조정한 시약 1:페옥시다제, 4-아미노안티피린 용액을 이용했다. 결과를 [표 26]에 나타낸다.

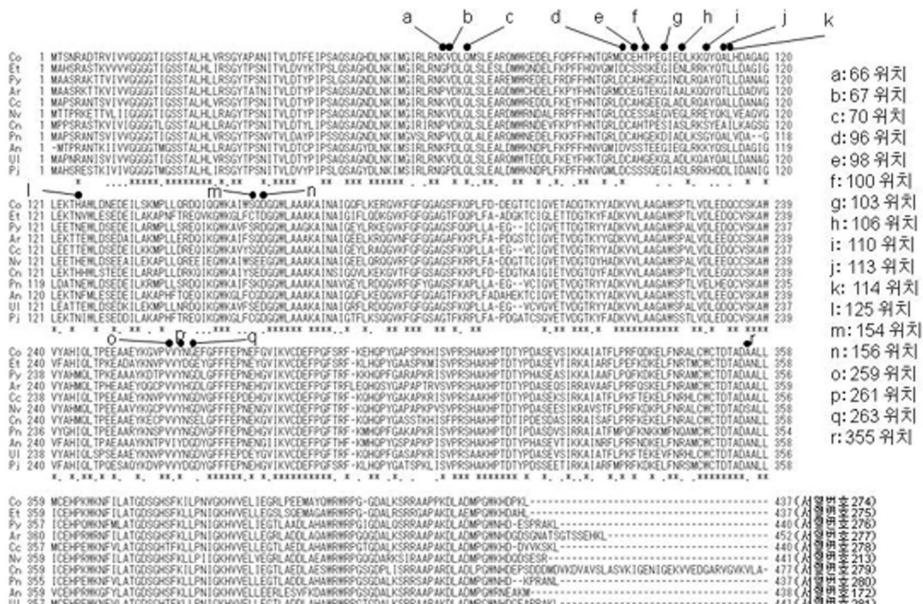
표 26

플라스미드	아미노산 변이	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 비율 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 비율 (%)
pKK223-3-CFP-T9	없음	0.0271	100	0.081	100
pKK223-3-CFP-T9- E98A, S154N, V259C	E98A, S154N, V259C	0.017	6	0.007	8

[0489] [표 26] 중의 다중 아미노산 치환이 도입된 개변형 아마드리아제에서는 ε FK/ α FVH, ε FK/ α FV는 모두 변이 도입 이전과 비교해 매우 낮은 값이 되었다. 따라서, 서열 번호 1로 기재된 아마드리아제의 기질 특이성 개선에 효과적인 단일 변이를 서열 번호 272로 기재된 아마드리아제에 축적시키는 것에 의해서도 매우 큰 기질 특이성의 개선을 기대할 수 있는 것이 분명해졌다.

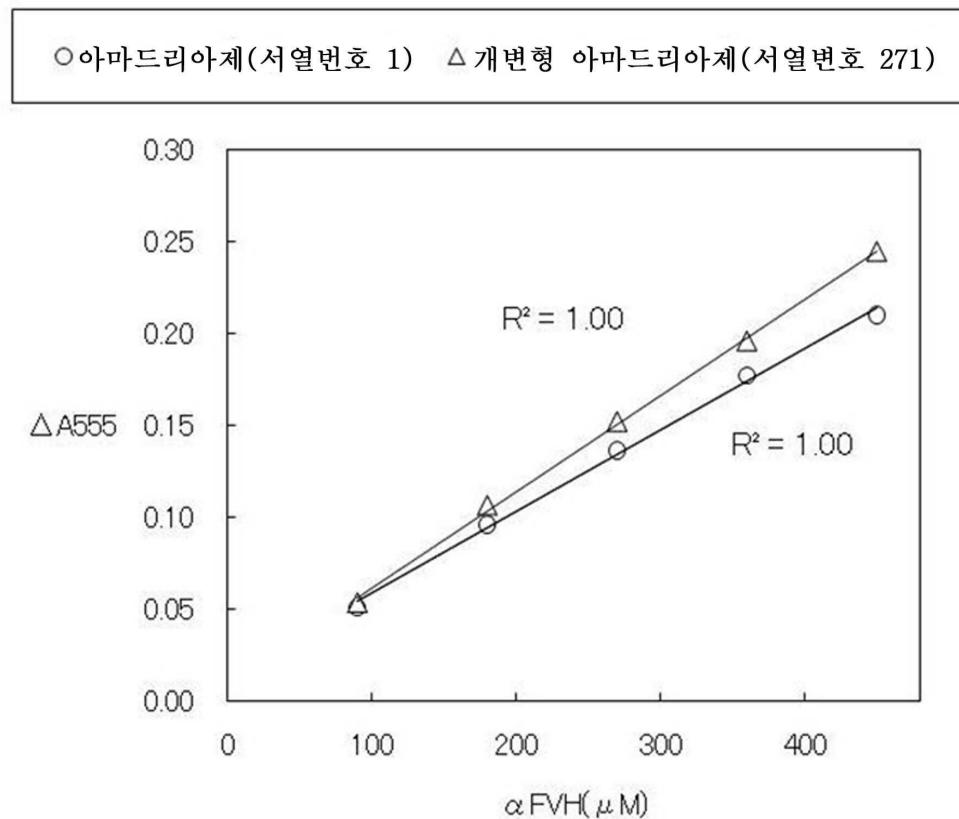
도면

도면1



- Co : Coniochaeta 유래 아마드리아제
 - Py : Pyrenophaeta sp. 유래 케토아민옥시다제
 - Cc : Curvularia clavata 유래 케토아민옥시다제
 - Cn : Cryptococcus neoformans 유래 프룩토실아미노산옥시다제
 - An : Aspergillus nidulans 유래 프룩토실아미노산옥시다제
 - Pj : Penicillium janthinellum 유래 프룩토실아미노산옥시다제
 - Et : Eupenicillium terrenum 유래 아마드리아제
 - Ar : Arthrinium sp. 유래 케토아민옥시다제
 - Nv : Neocosmospora vasinfecta 유래 케토아민옥시다제
 - Pn : Phaeosphaeria nodorum 유래 프룩토실펩티드옥시다제
 - Hl : Hloeocladium sp. 유래 프룩토실아미노산옥시다제

도면2



서 열 목 록

- <110> KIKKOMAN CORPORATION
- <120> Amadoriase with altered substrate specificity
- <130> 12fpi-12-08
- <150> JP 2010-176967
- <151> 2010-08-06
- <150> JP 2010-213070
- <151> 2010-09-24
- <160> 282
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 437
- <212> PRT
- <213> Coniochaeta sp.
- <400> 1

Met Thr Ser Asn Arg Ala Asp Thr Arg Val Ile Val Val Gly Gly Gly

1

5

10

15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr

20	25	30
Ala Pro Ala Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Phe Glu Ile Pro Ser Ala		
35	40	45
Gln Ser Ala Gly His Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg		
50	55	60
Asn Lys Val Asp Leu Gln Met Ser Leu Glu Ala Arg Gln Met Trp Lys		
65	70	75
Glu Asp Glu Leu Phe Gln Pro Phe His Asn Thr Gly Arg Met Asp		
85	90	95

Cys Glu His Thr Pro Glu Gly Ile Glu Asp Leu Lys Lys Gln Tyr Gln		
100	105	110
Ala Leu His Asp Ala Gly Ala Gly Leu Glu Lys Thr His Ala Trp Leu		
115	120	125
Asp Asn Glu Asp Glu Ile Leu Ser Lys Met Pro Leu Leu Gln Arg Asp		
130	135	140
Gln Ile Gln Gly Trp Lys Ala Ile Trp Ser Gln Asp Gly Gly Trp Leu		
145	150	155
Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ala Ile Gly Gln Phe Leu Lys Glu Arg		

165	170	175
Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Ala Gly Ser Phe Lys Gln Pro Leu		
180	185	190
Phe Asp Asp Glu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Val Glu Thr Ala Asp Gly		
195	200	205
Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser		
210	215	220
Pro Thr Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val		
225	230	235
Tyr Ala His Ile Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Lys Gly		
245	250	255

Val Pro Val Val Tyr Asn Gly Glu Phe Gly Phe Phe Glu Pro Asp

260	265	270
Glu Phe Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Ser Arg		
275	280	285
Phe Lys Glu His Gln Pro Tyr Gly Ala Pro Ser Pro Lys Arg Ile Ser		
290	295	300
Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala		
305	310	315
Ser Glu Val Ser Ile Lys Lys Ala Ile Ala Thr Phe Leu Pro Arg Phe		
325	330	335
Gln Asp Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr		
340	345	350
Ala Asp Ala Ala Leu Leu Met Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe		
355	360	365
Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Ile Leu Pro Asn		
370	375	380
Val Gly Lys Tyr Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Arg Leu Pro Glu Glu		
385	390	395
Met Ala Tyr Gln Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Lys Ser		
405	410	415
Arg Arg Ala Ala Pro Pro Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Lys		
420	425	430
His Asp Pro Lys Leu		
435		
<210>	2	
<211>	1314	
<212>	DNA	
<213>	Coniochaeta sp.	
<400>	2	
atgacgtcga atcgtgcaga tacaagggtg attgtcgctg gtggcggagg aacgatttgt		60
tcctcgacag cgctgcatact tgtgaggagt ggttatgctc ccgcaaatat cacggcttt		120
gacacattt agattccatc ggctcaatca gccggccatg atctcaacaa gatcatggga		180
atacactgc gcaacaaggt ggacctgcaa atgagtctag aggctagaca gatgtggaag		240

gaggatgagt tattccagcc cttcttcac aataccggca gaatggactg cgaacacacg 300
cctgagggtta tcgaggacct gaaaaagcag taccaggcac tgcacgatgc cggtgcgggt 360
ctggagaaga ctcatgcctg gttggacaac gaggtgaga tcttatccaa gatgccgtg 420
cttcaacgtg accaaataca aggatggaaa gcaatatgga gtcaagatgg cggctggta 480

gctgcggcaa aggccatcaa tgcgatcgga cagttcttga aagaacgtgg tgtaaagttc 540
ggattcggcg gcgctggatc cttaagcaa cccctttcg acgatgaagg cacaacttgc 600
attggcgttg agacggcaga tggtaccaaa tattacgctg acaagggttgt cttagcagct 660
ggcgcatgga gcccaaccct ggtggacctg gaagatcaat gttgctgaa ggcttgggtg 720
tatgctcata ttcatgttgc gcctgaagag gccgctgagt ataagggtgt cccagtttg 780
tataatggcg aatttggctt cttcttttag cctgatgagt ttgggtaat aaaggtgtgc 840
gacgagttcc caggatttc gcgttcaag gaacatcaac cctatggcgc cccatctccg 900

aaacggatat cagtaccacg atcgacgccc aagcatcccc cagacactta tccagacgca	960
tccgaagtca gcataaaaaa agcaatcgcg acgtttctcc ctgcattca ggacaaggag	1020
ctcttcaatc gcgccttgtc ctggtgtaca gacactgcgg acgctgctct cttgtatgtt	1080
gaacacccca aatggaagaa ttccattcta gcgaccggcg acagcggaca ctcatcaaa	1140
atcttgccta acgtcgaaa atacgtatgc gagtttatag agggccgcct gccggaggaa	1200
atggcttatac aatggaggtg gcggccagga ggcgatgcac tcaagtctag acgtgcggca	1260
ccggccaaaag atcttgacatgcggatggaaacatgtatccggaaattgtaa	1314

<210> 3

<Z12> DNT

210. Anterior Sequence

Anti-HIV-1 Primers

8 8 8 88 8 88 8 8 8

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 5
tgcgcaaca gccggacctg caaatgag 28

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 6
tttcaggc cggcttgtg cgcatcg 28

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gactgcgcaa cggccggac ctgcaaatg 29

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tttcaggc cggccgttg cgcatcg 28

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 9

aaggtaggacc tgccaatgag tctagag

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 10

tctagactca ttggcaggc caccttg

27

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 11

ggcagaatgg cctgcgaaca cac

23

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 12

gtgttcgcag gccattctgc cg

22

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 13

agaatggact gccaacacac gcctgag

27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 14

tcaggcgtgt gttggcagtc cattctg 27

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 15

actgcgaaca ccgtcctgag ggtatc 26

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 16

ataccctcag gacggtgttc gcagtc 26

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 17

acacgcctga gcgtatcgag gacctg 26

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 18

aggccctcga tacgctcagg cgtgtg 26

<210> 19

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 19

agggtatcga ggcctgaaa aagcag 26

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 20

tgcttttca gggcctcgat accctc 26

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 21

acctaaaaaa ggccgtaccag gcactgcac 29

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 22

agtgccttgtt acgcctttt caggtcctc 29

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 23

aaaaaggagt accaggaact gcacgatgcc g	31
<210> 24	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 24	
ggcatcggtgc agttcctggc actgctttt c	31
<210> 25	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 25	
agtaccaggc aaaggcacat gccgggtgcg	29
<210> 26	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 26	
gcaccggcat cgtgtttgc ctggtaactg	29
<210> 27	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 27	
tggagaagac tgaaggctgg ttggac	26
<210> 28	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 28

tccaaaccagg cttcagtctt ctccag 26

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 29

aaagcaatat gggacaaga tggcg 27

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 30

ccgccccat tt gttcccatat tgctttc 27

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 31

aatatggagt caaaatggcg gctggtag 29

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 32

taaccagccg ccatttgac tccatattg 29

<210> 33

<211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 33

agggtgtccc agctgtgtat aatggcg

27

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 34

ccattataca cagctggac acccttatac

30

<210> 35

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 35

tgtcccaagt tggctaatg gcgaatttg

29

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 36

aaattcgcca ttagccacaa ctgggacac

29

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 37

tttgtataa tcgcgaattt ggcttc

26

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 38

aagccaaatt cgcgattata cacaac

26

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 39

agacactgct gacaaagctc tcttgatgtg

30

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 40

acatcaagag agtttgcc gcagtgtctg

30

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 41

ggcagaatga gctgcgaaca cac

23

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 42

gtgttcgcag ctcattctgc cg 22

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 43

ggcagaatga actgcgaaca cac 23

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 44

gtgttcgcag ttcattctgc cg 22

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 45

ggcagaatgc actgcgaaca cac 23

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 46

gtgttcgcag tgcattctgc cg 22

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 47

agaatggact gccatcacac gcctgag

27

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 48

tcaggcgtgt gatggcagtc cattctg

27

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 49

agaatggact gcaaacacac gcctgag

27

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 50

tcaggcgtgt gttgcagtc cattctg

27

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 51

agaatggact gccgccacac gcctgag

27

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 52

tcagcggtgt ggcggcagtc cattctg

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 53

agaatggact gcccacacac gcctgag

27

<210> 54

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 54

tcagcggtgt gtccgcagtc cattctg

27

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 55

agaatggact gcccacacac gcctgag

27

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 56

tcaggcgtgt gtgcgcagtc cattctg 27

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 57

agaatggact gcgtacacac gccttag 27

<210> 58

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 58

tcaggcgtgt gtacgcagtc cattctg 27

<210> 59

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 59

agaatggact gcattcacac gccttag 27

<210> 60

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 60

tcaggcgtgt gaatgcagtc cattctg 27

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 61

agaatggact gcttacacac gcctgag

27

<210> 62

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 62

tcaggcgtgt gtaaggagtc cattctg

27

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 63

agaatggact gcatgcacac gcctgag

27

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 64

tcaggcgtgt gcatgcagtc cattctg

27

<210> 65

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 65

agaatggact gctgccacac gcctgag

27

<210> 66

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 66

tcagcggtgt ggcaggcgtc cattctg

27

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 67

agaatggact gtcacacac gcctgag

27

<210> 68

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 68

tcagcggtgt gtgaggcgtc cattctg

27

<210> 69

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 69

agaatggact gcacacacac gcctgag

27

<210> 70

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 70

tcaggcgtgt gtgtcagtc cattctg 27

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 71

agaatggact gcaaccacac gccttag 27

<210> 72

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 72

tcaggcgtgt ggttcagtc cattctg 27

<210> 73

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 73

agaatggact gcgatcacac gccttag 27

<210> 74

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 74

tcaggcgtgt gatcgagtc cattctg 27

<210> 75

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 75

agaatggact gcttcacac gcctgag

27

<210> 76

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 76

tcaggcgtgt gaaaggagtc cattctg

27

<210> 77

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 77

agaatggact gctatcacac gcctgag

27

<210> 78

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 78

tcaggcgtgt gataggagtc cattctg

27

<210> 79

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 79

agaatggact gctggcacac gcctgag

27

<210> 80

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 80

tcagcggtgt gccaggcgtc cattctg

27

<210> 81

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 81

agaatggact gcccacacac gcctgag

27

<210> 82

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 82

tcagcggtgt gtgggcgtc cattctg

27

<210> 83

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 83

acacgcctga gaaaatcgag gacctg

26

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 84

aggccctcga tttctcagg cgtgtg 26

<210> 85

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 85

agggtatcga gggcctgaaa aagcag 26

<210> 86

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 86

tgctttca gccctcgat accctc 26

<210> 87

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 87

agggtatcga gagcctgaaa aagcag 26

<210> 88

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 88

tgctttca ggctctcgat accctc 26

<210> 89

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 89

agggtatcga gaccctgaaa aagcag

26

<210> 90

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 90

tgcttttca gggtctcgat accctc

26

<210> 91

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 91

agggtatcga gaacctgaaa aagcag

26

<210> 92

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 92

tgcttttca gtttctcgat accctc

26

<210> 93

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 93

agggtatcga gtgcctgaaa aagcag

26

<210> 94

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 94

tgcttttca ggcactcgat accctc

26

<210> 95

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 95

agggtatcga ggtcctgaaa aagcag

26

<210> 96

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 96

tgcttttca ggacctcgat accctc

26

<210> 97

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 97

agggtatcga gctgctgaaa aagcag

26

<210> 98

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 98

tgctttca gcagctcgat accctc 26

<210> 99

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 99

agggtatcga gatcctgaaa aagcag 26

<210> 100

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 100

tgctttca ggatctcgat accctc 26

<210> 101

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 101

acctaaaaaa gctgtaccag gcactgcac 29

<210> 102

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 102

agtgcctggta cagctttt caggccctc 29

<210> 103

<211> 29

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 103
acctaaaaaa gatgtaccag gcactgcac 29

<210> 104
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 104
agtgcctggc acatctttt caggccctc 29

<210> 105
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400>
> 105
acctaaaaaa gttctaccag gcactgcac 29

<210> 106
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 106
agtgcctggc agaactttt caggccctc 29

<210> 107
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 107

acctgaaaaa gtggtaccag gcactgcac	29
<210> 108	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 108	
agtgcctggt accactttt caggtcctc	29
<210> 109	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 109	
acctgaaaaa gaactaccag gcactgcac	29
<210> 110	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 110	
agtgcctggt agttttttt caggtcctc	29
<210> 111	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 111	
acctgaaaaa gcactaccag gcactgcac	29
<210> 112	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 112

agtgcctggt agtgctttt caggtcctc 29

<210> 113

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 113

acctgaaaaa gaagtaccag gcactgcac 29

<210> 114

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 114

agtgcctggt acttctttt caggtcctc 29

<210> 115

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 115

acctgaaaaa gcgcgtaccag gcactgcac 29

<210> 116

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 116

agtgcctggt agcgctttt caggtcctc 29

<210> 117

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 117

acctgaaaaa ggagtaccag gcactgcac 29

<210> 118

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 118

agtgcctggc actcctttt caggccctc 29

<210> 119

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 119

aaaaagcagt accagaaact gcacgatgcc g 31

<210> 120

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 120

ggcatcggtc agtttctggc actgctttt c 31

<210> 121

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 121

agtaccaggc acgtcacgat gccggtgcg

29

<210> 122

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 122

gcaccggcat cgtgacgtgc ctggtaactg

29

<210> 123

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 123

agtaccaggc agagcacgat gccggtgcg

29

<210> 124

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 124

gcaccggcat cgtgctctgc ctggtaactg

29

<210> 125

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 125

tggagaagac taatgcctgg ttggac

26

<210> 126

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 126

> 126
tccaaaccagg cattagtctt ctccag 26

<210> 127

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 127

tggagaagac taaaagcctgg ttggac 26

<210> 128

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 128

tccaaaccagg cttagtctt ctccag 26

<210> 129

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 129

tggagaagac tgctgcctgg ttggac 26

<210> 130

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 130

tccaaaccagg cagcagtctt ctccag 26

<210> 131

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 131

tggagaagac tcaaggctgg ttggac

26

<210> 132

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 132

tccaaccagg cttagtctt ctccag

26

<210> 133

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 133

tggagaagac tcgtgcctgg ttggac

26

<210> 134

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 134

tccaaccagg cacgagtctt ctccag

26

<210> 135

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 135

aaagcaatat ggggtcaaga tggcggc

27

<210> 136

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 136

ccgccccatctt gaccccatat tgctttc

27

<210> 137

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 137

aaagcaatat ggttatcaaga tggcggc

27

<210> 138

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 138

ccgccccatctt gatacccatat tgctttc

27

<210> 139

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 139

aaagcaatat ggaatcaaga tggcggc

27

<210> 140

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 140

ccgccccatctt gattccatat tgctttc

27

<210> 141

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 141

aaagcaatat ggcagcaaga tggcgcc

27

<210> 142

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 142

ccgccccatctt gctgccatat tgctttc

27

<210> 143

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 143

aaagcaatat gggatcaaga tggcgcc

27

<210> 144

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 144

ccgccccatctt gatccatat tgctttc

27

<210> 145

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 145

aaagcaatat ggcataaga tggcgac

27

<210> 146

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 146

ccgccccatttt gatgccatata tgctttc

27

<210> 147

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 147

aaagcaatat gggctcaaga tggcgac

27

<210> 148

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 148

ccgccccatttt gagcccatata tgctttc

27

<210> 149

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 149

aaagcaatat ggtgtcaaga tggcggc

27

<210>	150	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	150	
ccgccccatctt gacaccatata tgctttc		
		27
<210>	151	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	151	
agggtgtccc atgtgttat aatggcg		
		27
<210>	152	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	152	
ccattataaca cacatgggac acccttatac		
		30
<210>	153	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	153	
agggtgtccc aagtgttat aatggcg		
		27
<210>	154	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 154

> 154

ccattataca cacttggac acccttatac 30

<210> 155

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 155

tgtcccagtt gtgttaatg gcgaatttg 29

<210> 156

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 156

aaattcgcca ttaaacacaa ctggacac 29

<210> 157

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 157

tgtcccagtt gtgttaatg gcgaatttg 29

<210> 158

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 158

aaattcgcca ttaaacacaa ctggacac 29

<210> 159

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 159

tgtcccagtt gtgtggaatg gcgaatttg 29

<210> 160

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 160

aaattcgcca ttccacacaa ctgggacac 29

<210> 161

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 161

tgtcccagtt gtaaaaatg gcgaatttg 29

<210> 162

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 162

aaattcgcca ttttcacaa ctgggacac 29

<210> 163

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 163

tttgtataa taaaatggcttc

26

<210> 164

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 164

aagccaaatt ctttattata cacaac

26

<210> 165

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 165

agacactgcg gaccgtgctc tcttgatgtg

30

<210> 166

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 166

acatcaagag agcacgggcc gcagtgtctg

30

<210> 167

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 167

agacactgcg gaccatgctc tcttgatgtg

30

<210> 168

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 168

acatcaagag agcatgggcc gcagtgtctg 30

<210> 169

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 169

cgccatatga cgcggcggc caacacccaa 30

<210> 170

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 170

cgcgatccc tacattttg cctcatcctt cca 33

<210> 171

<211> 1317

<212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

<400> 171

atgacgcccc gagccaacac caaaatcattt gtcgtcgccg gggcgccac aatgggctcg 60

tcgacagcccc tacacccctt ggcggccggc tacacccgtt ccaacattttt aatgtgtcgac 120

acgtgccta tccctccgc acagtcttca ggctacgacc tgaacaaaat catgagcatc 180

aggctgcgcaca acaaggcttca ttacagcttcc tcttttgggg cgctggacat gtggaaaaat 240

gatcctcttca tcaaggccgtt ttccacaat gttggatgtt tcgacgttcc ttcaacagag 300

gaaggcatcg agggttttgc gaagaaatac cagtttttcc tcgacgcagg cattgggttc 360

gagaagacga atttcatgtt ggaaagtgtt gacgagatcc tggctaaagc gccgcatttc 420

acgcaggaggc agattaaagg ctggaaaggc ctgttctgtt ggcggccgg ctggctcgct 480

gcagccaaag ccatcaatgc cattggccat ttcctcaagg aacaggccgtt caagtttgg 540

ttcggccggc ccggcacgtt caaaaagcca ctcttcggccat atgcccacgtt gaagacgttc 600

atcggcgtcg agactgtaga cggcacaaag tactacgccg acaaggctgt tctagcagct 660
 ggtgcctgga gttcgacgtt ggtcgatctg gaggagcagt gcgtttcaaa ggcctggtc 720
 tttccccaca tccaaactgac gcccgtgaa gcagccgcgt ataagaacac tcctgttata 780

tacgacggtg actatgggtt tttctttagg ccgaatgaaa acggcatcat aaaagtctgt 840
 gacgaattcc ctggcttcac gcatttcaaa atgcaccagc cgtacggctc gccggcgc 900
 aaaccatct ctgtgcctcg ttccatgca aagcaccca cagatacata cccgcacgcg 960
 tcggaggta cgataaaaaa ggcttatcaac cggttctgc cgaggttcaa tgacaaggaa 1020
 ctgttaaca gggccatgtg ctggtgcacc gataccgcgg atgcaaatct gcttgttgt 1080
 gagcatccac gcitgaaagg gtttatctt gcaacagggg acagtggca ttcgttcaag 1140
 ttgctgccga atattggaaa gcatgttgca gagttattgg aggagaggct ggaaagtgtg 1200

tttaaggatg ctggaggtg gaggcctggc agtggggatg cattaaaag tagacggct 1260
 ggcctgcga aggacctggc ggatatgccg gggtgagga atgaggcaaa gatgtag 1317

<210> 172

<211> 438

<212> PRT

<213> Aspergillus nidulans

<400> 172

Met Thr Pro Arg Ala Asn Thr Lys Ile Ile Val Val Gly Gly Gly

1 5 10 15

Thr Met Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Thr

20 25 30

Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Cys Pro Ile Pro Ser Ala Gln

35 40 45

Ser Ala Gly Tyr Asp Leu Asn Lys Ile Met Ser Ile Arg Leu Arg Asn

50 55 60

Lys Pro Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ala Leu Asp Met Trp Lys Asn

65 70 75 80

Asp Pro Leu Phe Lys Pro Phe Phe His Asn Val Gly Met Ile Asp Val

85 90 95

Ser Ser Thr Glu Glu Gly Ile Glu Gly Leu Arg Lys Tyr Gln Ser

100 105 110

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

Tyr Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Leu Leu Pro Asn
 370 375 380
 Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Leu Glu Glu Arg Leu Glu Ser Val
 385 390 395 400

Phe Lys Asp Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Ser Gly Asp Ala Leu Lys
 405 410 415
 Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp
 420 425 430
 Arg Asn Glu Ala Lys Met

435

<210> 173

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 173

aacaaaatca tggggatccg tctgcgaac 30

<210> 174

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 174

gttgcgcaga cggatcccc tgattttgtt 30

<210> 175

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 175

aaaggcctgt tcgatggcga cggcggc 27

<210> 176

<211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 176

gccggcgtcg ccatcgaaca ggccttt 27

<210> 177

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 177

aagaacactc ctgctatata cgacggta 31

<210> 178

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 178

gtcacccgtcg tatatacgag gagtgttctt 30

<210> 179

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 179

aagaacactc ctgttatata cgacggtgac 30

<210> 180

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 180

gtcaccgtcg tatatacaag gagtgttctt	30
<210> 181	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 181	
gttatatacg acaaggacta tgggttttc	30
<210> 182	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 182	
gaaaaaccca tagtccttgt cgtatataaac	30
<210> 183	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 183	
gttatatacg accgtgacta tgggttttc	30
<210> 184	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 184	
gaaaaaccca tagtcacggt cgtatataaac	30
<210> 185	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 185

aaaaaacata tggctcatc gcgagaaaagc aca 33

<210> 186

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 186

aaaaaaaggat cctcagagct tcgcacatcg cttcca 36

<210> 187

<211> 1314

<212> DNA

<213> Penicillium chrysogenum

<400> 187

atggctcatt cgcgagaaaag cacaaagatt gtcattgtcg ggggaggtgg cacaatggga 60

tcttcaaccg cgctacacct gatacgctct ggatacaccc cgtcaaacat caccgtcctt 120

gatgtataacc caattccatc cttgcaatcc gcaggatatg atcttaacaa gatcatgagc 180

atccgattac gcaacgggcc tgactggcaa ctttccctgg aggctctcgat tatgtggaaa 240

aacgatccgt tttcaagcc ttctttcac aacgttggca tgctagactg ttcatcgta 300

caagagggtt ttgcaagcct tcgacggaag caccaagacc tcatagacgc gaatatcgga 360

ctagagaaga cgaatatctg gtttagagat gaagatgata ttctggcaaa agccccgcac 420

ttcgcgcggg aacagatcaa ggggtggaa ggcttggtt gcccgcgtgg aggatggctt 480

gctgcagcca agccatcaa tgcgatcgga accttctaa aaagtcaagg cgtcaagttc 540

ggatttgaa gtgccggac tttcaagcga ctttttttgc ctccagatgg ggcgcacatgc 600

agcgggtttg agacagttaga tggaaacaaa tacttcgcgg acaagggttgtt tttggccgt 660

gggtgttgc gttcgacgtt agtagatttggaggaccaat gtgtttcgaa ggcctgggtc 720

ttcgctata tccaaactcac gccccaaagaa tcggcccaagt acaaggacgt gcccgttagta 780

tacgacggtg attatggctt ttcttcgag cccaaacgaa acggagtaat caaagtctgc 840

gatgagttcc ccgggttctc ccgcttcaag ctgcataac cttacggtgc cacctctct 900

aagcttatat ccgttccctcg atcacacgccc aagcatccca ccgataccta cccagattct 960

tctgaagaga ccattcgaaa agcgattgcg aggttatgc cacgcttcaa ggataaggag	1020
cttttaata ggacatgtg ctgggcacc gatactgctg atgccaactt gttgatctgc	1080
gagcacccca agtggaaagaa ctttatcttgc gcacaggag acagcggcca tagttcaag	1140
gtttgccca atataggaaa acatgtcggt gagttgatag aaggacgcct accacaagac	1200
ctggctggtg cgtggagatg gagaccaggg ggagatgccc ttaagtccaa acgcagtgt	1260
ccggcaaaagg accttgctga aatgccgggc tgaaagcatg atgcgaagct ctga	1314
<210> 188	
<211> 437	
<212> PRT	

<213> Penicillium chrysogenum

<400> 188

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Thr Met Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Ile Arg Ser Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Val Tyr Pro Ile Pro Ser Leu

35	40	45
----	----	----

Gln Ser Ala Gly Tyr Asp Leu Asn Lys Ile Met Ser Ile Arg Leu Arg

50	55	60
----	----	----

Asn Gly Pro Asp Trp Gln Leu Ser Leu Glu Ala Leu Asp Met Trp Lys

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Asp Pro Leu Phe Lys Pro Phe Phe His Asn Val Gly Met Leu Asp

85	90	95
----	----	----

Cys Ser Ser Ser Gln Glu Gly Ile Ala Ser Leu Arg Arg Lys His Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Leu Ile Asp Ala Asn Ile Gly Leu Glu Lys Thr Asn Ile Trp Leu

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Gln Ile Lys Gly Trp Lys Gly Leu Phe Cys Gly Asp Gly Gly Trp Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Ser Ala Gly Thr Phe Lys Arg Pro Leu		
180	185	190
Phe Ala Pro Asp Gly Ala Thr Cys Ser Gly Val Glu Thr Val Asp Gly		
195	200	205
Thr Lys Tyr Phe Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser		
210	215	220
Ser Thr Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val		
225	230	235
Phe Ala His Ile Gln Leu Thr Pro Gln Glu Ser Ala Gln Tyr Lys Asp		
245	250	255
Val Pro Val Val Tyr Asp Gly Asp Tyr Gly Phe Phe Glu Pro Asn		
260	265	270
Glu His Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Ser Arg		
275	280	285
Phe Lys Leu His Gln Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Pro Lys Leu Ile Ser		
290	295	300
Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ser		
305	310	315
Ser Glu Glu Thr Ile Arg Lys Ala Ile Ala Arg Phe Met Pro Arg Phe		
325	330	335
Lys Asp Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ser Met Cys Trp Cys Thr Asp Thr		
340	345	350
Ala Asp Ala Asn Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe		
355	360	365
Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Val Leu Pro Asn		
370	375	380
Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Arg Leu Pro Gln Asp		
385	390	395
Leu Ala Gly Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Lys Ser		
405	410	415

Lys Arg Ser Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Glu Met Pro Gly Trp Lys

420 425 430

His Asp Ala Lys Leu

435

<210> 189

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 189

aacaagatca tggggatccg attacgc 27

<210> 190

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 190

gcgtaatcgg atccccatga tcttg 27

<210> 191

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 191

agccttcgac gtcgacacca agacctc 27

<210> 192

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 192

gaggctttgg tgtcgacgtc gaaggct 27

<210> 193

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 193

aaggcgttgt ttgacggcga tggagga 27

<210> 194

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 194

tcctccatcg ccgtcaaaca agccctt 27

<210> 195

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 195

gtagtatacg acaaggattt tggcttttc 30

<210> 196

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 196

aaaaaaagcca taatccttgt cgtataactac 30

<210> 197

<211> 443

<212> PRT

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 197

Met Pro Pro Ser Arg Ala Ser Thr Lys Val Ile Val Ile Gly Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Leu Ile Pro Ser Ala

35	40	45
----	----	----

Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Ile Arg

50	55	60
----	----	----

Asn Pro Val Asp Lys Gln Leu Ser Leu Glu Ala Arg Asp Met Trp Arg

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Asp Glu Val Phe Lys Pro Tyr Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp

85	90	95
----	----	----

Cys Ala His Thr Pro Glu Ser Ile Ala Ser Leu Arg Lys Ser Tyr Glu

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Ile Leu Lys Ala Gly Ser Gly Leu Glu Lys Thr His His Trp Leu

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Thr Glu Asp Glu Ile Leu Ala Arg Ala Pro Leu Leu Asp Arg Lys

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ser Ile Gly Gln Val Leu Lys Glu Lys

165	170	175
-----	-----	-----

Gly Val Thr Phe Gly Phe Gly Ser Ala Gly Ser Phe Lys Lys Pro Leu

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

Thr Gln Tyr Phe Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Thr Leu Val Asp Leu Glu Gly Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Tyr Ala His Met Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Lys Glu

245	250	255
-----	-----	-----

Cys Pro Val Val Tyr Asn Ser Glu Leu Gly Phe Phe Glu Pro Asn
 260 265 270

Glu Lys Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg
 275 280 285

Phe Lys Gln His Gln Pro Tyr Gly Ala Ser Ser Thr Lys His Ile Ser
 290 295 300

Phe Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Ile Pro Asp Glu
 305 310 315 320

Ser Asp Ala Ser Ile Arg Arg Ala Ile Ser Ala Phe Leu Pro Arg Phe
 325 330 335

Lys Glu Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr
 340 345 350

Ala Asp Ala Asn Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe
 355 360 365

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

370 375 380
 Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Thr Leu Ala Glu Asp
 385 390 395 400

Leu Ala Glu Ser Trp Arg Trp Arg Pro Gly Ser Gly Asp Pro Leu Ile
 405 410 415

Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Arg Asp Leu Ala Asp Leu Pro Gly Trp
 420 425 430

Asn His Asp Glu Pro Ser Asp Asp Asp Met Asp

435 440

<210> 198

<211> 1332

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 198

atgccggcgt cccgtgcttc aacgaaagtg attgtcattg gtgggtgtgg tacgctgggc	60
tcctcaaccg ccctgcatact gctgcgcg ggctatacccgagtaacat taccgtgtcg	120
gatacgttacc tgatcccagg tgcccaacttgcaggcaacg acctgaataa aattatgggt	180

atcgatatcc gcaatccgggt ggataaaacaa ctgagcctgg aagcccgta tatgtggcgc	240
aacgacgaag tttcaaacc gtacttccat aacaccggtc gtctggactg cgctcacacg	300
ccggaatcaa ttgcgtcgct gcgtaaaagg tacgaaggcca tcctgaaagc aggctcaggt	360
ctggaaaaaa cccatcaactg gctgtcgacg gaagatgaaa tcctggcacg tgacccgctg	420
ctggaccgta aacagattaa aggttgaaa gcaatctata gtgaagatgg cggttggctg	480
gcggccgcaa aagctattaa ctccatcgcc caagtctga aagaaaaagg tgtgaccc	540
ggctttggta gcgcaggctc tttaaaaaa ccgctgtcg atgaagacgg cacgaaagcc	600
attggtatcg aaaccgttga tggtaacgcag tatttgccg acaaagtgg tctggctca	660
gtgtcatgga gcccgaccct gggtgatctg gaaggccagt gctgttctaa agcttggtc	720
tacgcgcaca tgcactgac gccggaagaa gccgcagaat ataaagaatg cccgtcgtg	780
tacaacagcg aactggcctt ttttttggaa ccgaacgaaa aaggtgtgat caaagttgt	840
gatgaattcc cggcgttac ccgttcaaa cagcatcaac cgtacggtgc tagctctacg	900
aaacacatta gcttcccgcg ctctcatcg aaacacccga ccgatacgtat cccggatgaa	960
agtgacgcct ccattcgtcg cgctatctc gcgttctgc cgcttcaa agaaaaagaa	1020
ctgttaacc gcgcgtgtg ctgggttacc gatacggctg acgcgaacct gctgattgt	1080
gaacacccga aatggaaaaa tttatcctg gccaccggcg attcaggtca ttcgttcaaa	1140
attctgccga atatcgccaa acacgttgcg gaactgattg aaggtaccct ggccgaagat	1200
ctggcagaaa gctggcgttg gcgtccggc agtggtgacc cgctgatctc ccgtcgcgct	1260
gcgcggcgc ggcacctggc ggacctgccc ggctgaaacc acgacgaacc gagcgacgat	1320
gacatggact ga	1332
<210> 199	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 199	
gactgcgcgc accgtccgga atcaatttgcg	30
<210> 200	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 200

cgcaattgat tccggacggt gagcgcagtc 30

<210> 201

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 201

tgcgtgcgta aacgctacga agccatc 27

<210> 202

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 202

gatggctcg tagcgttac gcagcga 27

<210> 203

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 203

gaaaggcaatc tataatgaag atggcggttg 30

<210> 204

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 204

caaccgccat cttcattata gattgcttc 30

<210> 205

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 205

ataaagaatg cccggccgtg tacaacagcg 30

<210> 206

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 206

cgctgttgta cacggccggg cattcttat 30

<210> 207

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 207

ataaagaatg cccgtgcgtg tacaacagcg 30

<210> 208

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 208

cgctgttgta cacgcacggg cattcttat 30

<210> 209

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 209

gtcgtgtaca acaaggaact gggcttttc 30

<210> 210
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 210
gaaaaagccc agttccttgt tgtacacgac 30
<210> 211
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 211
gtcggttaca accgcgaact gggcttttc 30

<210> 212
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 212
gaaaaagccc agttcgccgt tgtacacgac 30
<210> 213
<211> 441
<212> PRT
<213> Neocosmospora vasinfecta
<400> 213
Met Thr Thr Pro Arg Lys Glu Thr Thr Val Leu Ile Ile Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Leu Arg Ala Gly Tyr

20 25 30
Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Pro Ile Pro Ser Ala
35 40 45
Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg

50	55	60
Asn Lys Val Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ala Arg Asp Met Trp Arg		
65	70	75
Asn Asp Ala Leu Phe Arg Pro Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp		
85	90	95
Cys Glu Ser Ser Ala Glu Gly Val Glu Gly Leu Arg Arg Glu Tyr Gln		
100	105	110
Lys Leu Val Glu Ala Gly Val Gly Leu Glu Glu Thr His Glu Trp Leu		
115	120	125
Asp Ser Glu Glu Ala Ile Leu Glu Lys Ala Pro Leu Leu Gln Arg Glu		
130	135	140
Glu Ile Glu Gly Trp Lys Ala Ile Trp Ser Glu Glu Gly Trp Leu		
145	150	155
Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ala Ile Gly Glu Glu Leu Gln Arg Gln		
165	170	175
Gly Val Arg Phe Gly Phe Gly Ala Gly Ser Phe Lys Arg Pro Leu		
180	185	190
Phe Ala Asp Asp Gly Thr Thr Cys Ile Gly Val Glu Thr Val Asp Gly		
195	200	205
Thr Gln Tyr His Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser		
210	215	220
Pro Ala Leu Val Asp Leu Glu Glu Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val		
225	230	235
Tyr Ala His Met Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Val Tyr Lys Gly		
245	250	255
Cys Pro Val Val Tyr His Gly Asp Val Gly Phe Phe Glu Pro Asn		
260	265	270
Glu Asn Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg		
275	280	285
Phe Lys Gln His Gln Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Pro Lys Pro Val Ser		
290	295	300

Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala

305 310 315 320

Ser Glu Glu Ser Ile Lys Arg Ala Val Ser Thr Phe Leu Pro Arg Phe

325 330 335

Lys Asp Lys Pro Leu Phe Asn Arg Ala Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr

340 345 350

Ala Asp Ser Ala Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Arg Trp Lys Asn Phe

355 360 365

Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Leu Leu Pro Ile

370 375 380

Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Val Glu Gly Arg Leu Ala Asp Asp

385 390 395 400

Leu Ala Glu Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gln Gly Asp Ala Arg Lys

405 410 415

Ser Ile Arg Ala Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp

420 425 430

Lys His Asp Gln Asp Ser Glu Ser Arg

435 440

<210> 214

<211> 1326

<212> DNA

<213> Neocosmospora vasinfecta

<400> 214

atgacgaccc cgcgtaaaga aacgacggtc ctgattattg gtgggtgg cacgatttgt 60

agctcgacgg ctctgcatct gctgcgtgcc ggctataccc cgtctaacct taccgtgctg 120

gatacgtacc cgatcccgag tgcccagtcc gcaggcaacg acctgaataa aattatgggt 180

atccgtctgc gcaataaagt tgatctgcaa ctgagcctgg aagccgtga tatgtggcgc 240

aacgacgcac tggcgatcc gttttccat aataccggcc gcctggactg cgaaagctct 300

gctgaaggcg tggaaaggctc gcgtcgcaaa tatcagaaac tggtgaaagc aggcggttgt 360

ctgaaagaaa cgcacgaatg gctggatagc gaagaagcta ttctggaaaa agcggcgctg 420

ctgcaacgtg aagaaattga aggttgaaa gccatctggt ctgaagaagg cggttgctg 480

gcggccgcaa aagctattaa cgcgatcgcc gaagaactgc agcgtcaagg cgttcgttc	540
gttttggcg gtgccgttag tttaaacgc ccgctgtcg cagatgacgg caccacgtgt	600
atcggtgtcg aaaccgtgga tggcacgcag tatcatgcgg acaaagtggt tctggctgca	660
gtgtcttgtt caccggcgct ggtcgatctg gaagaacagt gctgttcgaa agccgtggtg	720
tacgcacaca tgcaactgac cccggaagaa gccgcagtt ataaaggctg cccggtcg	780
taccacggcg atgtcggtt ttttttggaa ccgaacgaaa atggcgttat taaagtctgt	840
gacgaattcc cgggtttac gcgtttcaaa cagcatcaac cgtatggtgc cccggcaccg	900
aaacctgtga gtgtccgcg ctccatgcg aaacacccga ccgatacgtt cccggacgct	960
tcagaagaat cgtcaaaacg tgccgtgagt accttctgc cgcgttcaa agataaaccg	1020
ctgttaacc gtgcactgtg ctgggttacc gatacggccg actccgact gctgattgc	1080
gaacacccgc gctggaaaaa ttttatcctg gcgaccggcg atagcggtca ttcttcaaa	1140
ctgctgccga ttatcggcaa acacgttgcg gaactgggtt aaggctgtt ggcggatgac	1200
ctggctgaag cgtggcggtt gctccgggtt cagggtgatg cacgtaaaag cattcg	1260
gcgcgcggcga aagacctggc ggatatgccc ggctggaaac acgaccaaga ctcggatca	1320
cgctga	1326
<210> 215	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 215	
cgccctggact gccaaagctc tgctgaag	28
<210> 216	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 216	
cttcagcaga gcttggcag tccaggcg	28
<210> 217	
<211> 28	
<212> DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	217	
cgccctggact gccatagctc tgctgaag		28
<210>	218	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	218	
cttcagcaga gctatggcag tccaggcg		28
<210>	219	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	219	
cgccctggact gcaaaagctc tgctgaag		28
<210>	220	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	220	
cttcagcaga gctttgcag tccaggcg		28
<210>	221	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	221	
cgccctggact gccgttagctc tgctgaag		28
<210>	222	

<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	222	
cttacggcata gttttttttt tccaggcg		28
<210>	223	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>		
>	223	
gaaagctctg ctgaacgcgt ggaaggcttg		30
<210>	224	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	224	
cagacccatcc acgcgttcag cagagcttc		30
<210>	225	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	225	
ggctcgatcc gccgttatca gaaactg		27
<210>	226	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	226	

cagttctga taacggcgac gcagacc	27
<210> 227	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 227	
ggaaagccat ctggaatgaa gaaggcggt	29
<210> 228	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 228	
accgccttct tcattccaga tggcttcc	29
<210> 229	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 229	
ggaaagccat ctggatgaa gaaggcggt	29
<210> 230	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	
> 230	
accgccttct tcatccaga tggcttcc	29
<210> 231	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	231	
taaaggctgc ccggccgtgt accacggc		28
<210>	232	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	232	
gccgtggtag acggccggc agcctta		28
<210>	233	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	233	
taaaggctgc ccgtgcgtgt accacggc		28
<210>	234	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	234	
gccgtggtag acgcacggc agcctta		28
<210>	235	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	235	
gtcggttacc acaaggatgt cggcttttc		30
<210>	236	
<211>	30	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 236

gaaaaagccg acatccttgt ggtacacgac 30

<210> 237

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 237

gtcggttacc accgcgttgtt cggcttttc 30

<210> 238

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 238

gaaaaagccg acatcgccgt ggtacacgac 30

<210> 239

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 239

cgtctgcgca atggcctga tctgcaactg 30

<210> 240

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 240

cagtgcaga tcaggaccat tgcgacgacg 30

<210> 241
<211> 437
<212> PRT
<213> Eupenicillium terrenum
<400> 241

Met Ala His Ser Arg Ala Ser Thr Lys Val Val Val Val Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Ile Arg Ser Gly Tyr

20 25 30
Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Val Tyr Lys Thr Pro Ser Leu

35 40 45

Gln Ser Ala Gly His Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg

50 55 60

Asn Gly Pro Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ser Leu Asp Met Trp Gln
65 70 75 80

Asn Asp Glu Leu Phe Lys Pro Phe His Gln Val Gly Met Ile Asp
85 90 95

Cys Ser Ser Ser Lys Glu Gly Ile Glu Asn Leu Arg Arg Lys Tyr Gln
100 105 110

Thr Leu Leu Asp Ala Gly Ile Gly Leu Glu Lys Thr Asn Val Trp Leu
115 120 125

Glu Ser Glu Asp Glu Ile Leu Ala Lys Ala Pro Asn Phe Thr Arg Glu
130 135 140

Gln Val Lys Gly Trp Lys Gly Leu Phe Cys Thr Asp Gly Gly Trp Leu
145 150 155 160

Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ala Ile Gly Ile Phe Leu Gln Asp Lys

165 170 175
Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Asp Ala Gly Thr Phe Gln Gln Pro Leu

180 185 190

Phe Ala Ala Asp Gly Lys Thr Cys Ile Gly Leu Glu Thr Thr Asp Gly
195 200 205

Thr Lys Tyr Phe Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser

210	215	220
Pro Thr Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val		
225	230	235
		240
Phe Ala His Ile Gln Leu Thr Pro Lys Glu Ala Asp Ala Tyr Lys Asn		
245	250	255
Val Pro Val Val Tyr Asp Gly Glu Tyr Gly Phe Phe Glu Pro Asp		
260	265	270
Glu Tyr Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Ser Arg		
275	280	285
Phe Lys Leu His Gln Pro Tyr Gly Ala Ala Ser Pro Lys Met Ile Ser		
290	295	300
Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala		
305	310	315
Ser Glu Val Thr Ile Arg Lys Ala Ile Ala Arg Phe Leu Pro Glu Phe		
325	330	335
Lys Asp Lys Glu Leu Phe Asn Arg Thr Met Cys Trp Cys Thr Asp Thr		
340	345	350
Ala Asp Ala Asn Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe		
355	360	365
Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Leu Leu Pro Asn		
370	375	380
Ile Gly Lys Tyr Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Ser Leu Ser Gln Glu		
385	390	395
Met Ala Gly Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Arg Ser		
405	410	415
Arg Arg Gly Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Glu Met Pro Gly Trp Lys		
420	425	430
His Asp Ala His Leu		
435		
<210>	242	
<211>	1314	
<212>	DNA	

<213> Eupenicillium terrenum

<400>

242			
atggctcatt	cgcgtcaag	caccaaagtgcgtggttggggagggtgg tacgatcggtt	60
tcttcgacgg	ctctgcactt	aatccgctctt ggtataccccc cctcaaatat caccgtgctt	120
gacgtataca	agaccccttc	attgcaatct gcaggacatg atttgaacaa gatcatgggc	180
attcgattgc	gcaacgggcc	tgacttgcag ctttcgctgg aatcactcga catgtggcaa	240
aacgatgagt	tgttcaagcc	attcttcac caagtggca tgattgattt ttcgtcatcc	300
aaagagggtta	ttgaaaatct	tcgacgaaaa taccagaccc tcctcgatgc gggcattggg	360
ctggagaaga	cgaacgttttgcgtggaaatct	gaagatgaga tcctcgccaa agcggcaat	420
ttcacgcgt	aacaagtcaa	gggggtggaaa ggcttatttt gcactgatgg aggctggctt	480
gctgcagcca	aggctatcaa	tgcgatcgga atttcctcc aggacaaagg tgtcaagttt	540
ggctttggag	atgctggaac	atttcagcaa cctctgttcg ccgctgatgg aaaaacttgc	600
atcggacttg	aaactacaga	cggaaccaag tacttgctg acaaggttgtt cttggctgct	660
ggtgcgtgga	gtcccacattt	ggtggatcta gaagatcagt gtgtttcaaa ggcctgggtt	720
ttcgctcata	ttcaactcac	acccaaagaa gcggacgcgt acaagaatgt gcctgtggtc	780
tatgatggtg	aatatgggtt	cttttttag cccgacgagt atgggtgtat caaagtctgt	840
gacgagttcc	ctggtttctc	tcgcttcaaa ctgcataaac cgtacggggc tgcatctccc	900
aagatgatat	ccgtaccgcg	atcacacgc aagcatccca cagataccta ccctgatgcc	960
tccgaagtca	ccatacgcaa	agcgatcgca aggttctgc cagaatttaa agacaaggag	1020
ctcttcaacc	gtaccatgtt	ctgggttaca gatacgccg atgctaactt attgatttgc	1080
gaacacccga	agtggaaagaa	tttcattctg gccactggag atagcgacaa ttcccttcaag	1140
ctgttgccaa	acatcgggaa	atacgttggtt gagcttttag agggatctct atcgcaggaa	1200
atggctggtg	cctggagatg	gagacccgga ggtgtatgc ttagatctag acgcggtgct	1260
ccggcaaagg	atcttgctga	gatgccggga tggaagcatg atgcacattt gtga	1314
<210>	243		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	243		
catgattgtat	tgtgcgtcat	ccaaagag	28

<210>	244	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	244	
ctctttggat gacgcacaat caatcatg		28
<210>	245	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	245	
ttcgacgtcg ctaccagacc ctcctc		26
<210>	246	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	246	
tctggtagcgt acgtcgaaga ttttc		25
<210>	247	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	247	
tgaaaaaggcc tatttaaacac tgatggagg		29
<210>	248	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		

<400>	248	
ccatcagtgt taaataggcc ttccaccc		29
<210>	249	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>		
>	249	
caagaatgtg cctgcgtct atgatggtg		29
<210>	250	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	250	
caccatcata gaccgcaggc acattcttg		29
<210>	251	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	251	
caagaatgtg cttgcgtct atgatggtg		29
<210>	252	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence		
<400>	252	
caccatcata gacgcaaggc acattcttg		29
<210>	253	
<211>	30	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 253

cctgtggct atgataagga atatgggttc	30
---------------------------------	----

<210> 254

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 254

gaacccatat tccttatcat agaccacagg	30
----------------------------------	----

<210> 255

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 255

acacgcctga gcatatcgag gacctg	26
------------------------------	----

<210> 256

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400>

> 256

aggcctcga tatgctcagg cgtgtg	26
-----------------------------	----

<210> 257

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 257

ggtctggaga agactctggc ctggttggac	30
----------------------------------	----

<210> 258

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 258

ggctggaga agactttgc ctgggtggac 30

<210> 259
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 259

ggctggaga agacttatgc ctgggtggac 30

<210> 260
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 260

agtcttcctcc agaccgcac cggcatc 27

<210> 261
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 261

tttgtataa tcacgaattt ggcttc 26

<210> 262
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence
<400> 262

aagccaaatt cgtgattata cacaac	26
<210> 263	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400>	
> 263	
tttgtataa tgatgaattt ggcttc	26
<210> 264	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 264	
aagccaaatt catcattata cacaac	26
<210> 265	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 265	
tttgtataa tgaagaattt ggcttc	26
<210> 266	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence	
<400> 266	
aagccaaatt ctcatattata cacaac	26
<210> 267	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 267

agacactgcg gacgatgctc tcttgatgtg 30

<210> 268

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 268

acatcaagag agcatcgcc gcagtgtctg 30

<210> 269

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 269

agacactgcg gacgaagctc tcttgatgtg 30

<210> 270

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400

> 270

acatcaagag agttcgcc gcagtgtctg 30

<210> 271

<211> 437

<212> PRT

<213> Coniochaeta sp.

<400> 271

Met Thr Ser Asn Arg Ala Asp Thr Arg Val Ile Val Val Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ser Ala Gly His Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Glu Leu Phe Gln Pro Phe His Asn Thr Gly Arg Met Asp

85 90 95

Cys Ala His Thr Pro Glu Gly Ile Glu Asp Leu Lys Lys Gln Tyr Gln

100 105 110

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

115 120 125

Asp Asn Glu Asp Glu Ile Leu Ser Lys Met Pro Leu Leu Gln Arg Asp

130 135 140

Gln Ile Gln Gly Trp Lys Ala Ile Trp Asn Gln Asp Gly Gly Trp Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Gly Ala Gly Ser Phe Lys Gln Pro Leu

180 185 190

Phe Asp Asp Glu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Val Glu Thr Ala Asp Gly

195 200 205

Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser

210 215 220

Pro Thr Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val

225 230 235 240

Tyr Ala His Ile Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Lys Gly

245 250 255

Val Pro Cys Val Tyr Asn Gly Glu Phe Gly Phe Phe Glu Pro Asp

260 265 270

Glu Phe Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Ser Arg

275	280	285
Phe Lys Glu His Gln Pro Tyr Gly Ala Pro Ser Pro Lys Arg Ile Ser		
290	295	300
Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala		
305	310	315
Ser Glu Val Ser Ile Lys Lys Ala Ile Ala Thr Phe Leu Pro Arg Phe		
325	330	335
Gln Asp Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr		
340	345	350
Ala Asp Ala Ala Leu Leu Met Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe		
355	360	365
Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Ile Leu Pro Asn		
370	375	380
Val Gly Lys Tyr Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Arg Leu Pro Glu Glu		
385	390	395
Met Ala Tyr Gln Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Lys Ser		
405	410	415
Arg Arg Ala Ala Pro Pro Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Lys		
420	425	430
His Asp Pro Lys Leu		
435		
<210>	272	
<211>	437	
<212>	PRT	
<213>	Coniochaeta sp.	
<400>	272	
Met Thr Ser Asn Arg Ala Asp Thr Arg Val Ile Val Val Gly Gly Gly		
1	5	10
Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr		
20	25	30
Ala Pro Ala Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Phe Glu Ile Pro Ser Ala		
35	40	45

Gln Ser Ala Gly His Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg
 50 55 60
 Asn Lys Val Asp Leu Gln Met Ser Leu Glu Ala Arg Gln Met Trp Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Glu Leu Phe Gln Pro Phe Phe His Asn Thr Gly Arg Met Asp
 85 90 95
 Cys Glu His Thr Pro Glu Gly Ile Glu Asp Leu Lys Lys Gln Tyr Gln
 100 105 110
 Ala Leu His Asp Ala Gly Ala Gly Leu Glu Lys Thr His Ala Trp Leu
 115 120 125
 Asp Asn Glu Asp Glu Ile Leu Ser Lys Met Pro Leu Leu Gln Arg Asp
 130 135 140
 Gln Ile Gln Gly Trp Lys Ala Ile Trp Ser Gln Asp Gly Gly Trp Leu
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ala Ile Gly Gln Phe Leu Lys Glu Arg
 165 170 175
 Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Asp Ala Gly Ser Phe Lys Gln Pro Leu
 180 185 190
 Phe Asp Asp Glu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Val Glu Thr Ala Asp Gly
 195 200 205
 Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser
 210 215 220
 Pro Thr Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val
 225 230 235 240
 Tyr Ala His Ile Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Lys Gly
 245 250 255
 Val Pro Val Val Tyr Asn Gly Glu Leu Gly Phe Phe Glu Pro Asp
 260 265 270
 Glu Phe Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Ser Arg
 275 280 285
 Phe Lys Glu His Gln Pro Tyr Gly Ala Pro Ser Pro Lys Arg Ile Ser
 290 295 300

Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala
 305 310 315 320

Ser Glu Val Ser Ile Lys Lys Ala Ile Ala Thr Phe Leu Pro Arg Phe
 325 330 335

Gln Asp Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr
 340 345 350

Ala Asp Ala Ala Leu Leu Met Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe
 355 360 365

Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Ile Leu Pro Asn
 370 375 380

Val Gly Lys Tyr Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Arg Leu Pro Glu Glu

385 390 395 400

Met Ala Tyr Gln Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Lys Ser
 405 410 415

Arg Arg Ala Ala Pro Pro Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Lys

420 425 430

His Asp Pro Lys Leu

435

<210> 273

<211> 1314

<212> DNA

<213> Coniochaeta sp.

<400> 273

atgacgtcga atcgtgcaga tacaagggtg attgtcgctg gtggcggagg aacgatttgt 60

tcctcgacag cgctgcatct tgtgaggagt ggttatgctc ccgcaaataat cacggcttg 120

gacacatttg agattccatc ggctcaatca gccggccatg atctcaacaa gatcatggga 180

atacgaactgc gcaacaaggt ggacctgcaa atgagtctag aggctagaca gatgtggaag 240

gaggatgagt tattccagcc cttcttac aataccggca gaatggactg cgaacacacg 300

cctgagggtta tcgaggacct gaaaaagcag taccaggcac tgcacgatgc cggtgccgggt 360

ctggagaaga ctcatgcctg gttggacaac gaggatgaga tcttatccaa gatgccgttg 420

cttcaacgtg accaaataca aggatggaaa gcaatatgga gtcaagatgg cggctggta 480

gctgcggcaa aggccatcaa tgcgatcgga cagttttga aagaacgtgg tgtaaagttc	540
ggattcggcg acgctggatc ctcaagcaa cccctttcg acgttgagg cacaacttgc	600
attggcgttg agacggcaga tggtagccaa tattacgctg acaaggtggt ctttagcagct	660
ggcgcatttgc gccaaccct ggtggacctg gaagatcaat gtgtcgaa ggcttggtg	720
tatgtctata ttcatgttgc gcctgaagag gccgctgagt ataagggtgt cccagttgtg	780
tataatggcg aacttggctt cttttcgaa cctgtatgtt ttgggtataat aaagggtgtgc	840
gacgagttcc caggattctc gcgttcaag gaacatcaac cctatggcgc cccatctccg	900

aacggatat cagtaccacg atgcacgcc aagcatccca cagacactta tccagacgca	960
tccgaagtca gcatcaaaaa agcaatcgac acgtttctcc ctgcatttca ggacaaggag	1020
ctcttcaatc gcgccttgc ctgggttaca gacactgcgg acgctgtct cttgtatgtt	1080
gaacacccca aatggaaagaa ttttatttta gcgaccggcg acagcggaca ctcattcaaa	1140
atcttgctta acgtcgaaa atacgtatgc gagtttatag agggccgcct gccggaggaa	1200
atggcttatac aatggaggtg gcggccagga ggcgtatgcac tcaagtctag acgtgcggca	1260
ccgcacaaag atcttgaga catgccagga tggaaacatg atccaaattt gtaa	1314

<210> 274

<211> 437

<212> PRT

<213> Coniochaeta sp.

<400> 274

Met Thr Ser Asn Arg Ala Asp Thr Arg Val Ile Val Val Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ser Ala Gly His Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Glu Leu Phe Gln Pro Phe Phe His Asn Thr Gly Arg Met Asp

85 90 95

Cys Glu His Thr Pro Glu Gly Ile Glu Asp Leu Lys Lys Gln Tyr Gln

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

Ala Asp Ala Ala Leu Leu Met Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe

355 360 365

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

370 375 380

Val Gly Lys His Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Arg Leu Pro Glu Glu

385 390 395 400

Met Ala Tyr Gln Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Lys Ser

405 410 415

Arg Arg Ala Ala Pro Pro Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Lys

420 425 430

His Asp Pro Lys Leu

435

<210> 275

<211> 437

<212> PRT

<213> Eupenicillium terrenum

<400> 275

Met Ala His Ser Arg Ala Ser Thr Lys Val Val Val Val Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Ile Arg Ser Gly Tyr

20 25 30

Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Val Tyr Lys Thr Pro Ser Leu

35 40 45

Gln Ser Ala Gly His Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg

50 55 60

Asn Gly Pro Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ser Leu Asp Met Trp Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ser Ser Ser Lys Glu Gly Ile Glu Asn Leu Arg Arg Lys Tyr Gln

100 105 110

Thr Leu Leu Asp Ala Gly Ile Gly Leu Glu Lys Thr Asn Val Trp Leu

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

370	375	380			
Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Ser Leu Ser Gln Glu					
385	390	395			
Met Ala Gly Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gly Asp Ala Leu Arg Ser					
405	410	415			
Arg Arg Gly Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Glu Met Pro Gly Trp Lys					
420	425	430			
His Asp Ala His Leu					
435					
<210>	276				
<211>	440				
<212>	PRT				
<213>	Pyrenochaeta sp.				
<400>	276				
Met Ala Ala Ser Arg Ala Lys Thr Thr Val Ile Val Val Gly Gly Gly					
1	5	10	15		
Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Leu Arg Ser Gly Tyr					
20	25	30			
Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Pro Ile Pro Ser Leu					
35	40	45			
Gly Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg					
50	55	60			
Asn Lys Val Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ala Arg Glu Met Trp Arg					
65	70	75	80		
Glu Asp Glu Leu Phe Arg Asp Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp					
85	90	95			
Cys Ala His Gly Glu Lys Gly Ile Asn Asp Leu Arg Gln Ala Tyr Gln					
100	105	110			
Thr Leu Leu Asp Ala Asn Ala Gly Leu Glu Glu Thr Asn Glu Trp Leu					
115	120	125			
Asp Ser Glu Asp Glu Ile Leu Ala Arg Met Pro Leu Leu Ser Arg Glu					
130	135	140			

Gln Ile Lys Gly Trp Lys Ala Val Phe Ser Arg Asp Gly Gly Trp Leu

145 150 155 160

Ala Ala Gly Lys Ala Ile Asn Ala Ile Gly Glu Tyr Leu Arg Lys Glu

165 170 175

Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Ala Gly Ser Phe Gln Gln Pro Leu

180 185 190

Leu Ala Glu Gly Ile Cys Ile Gly Val Glu Thr Thr Asp Gly Thr Arg

195 200 205

Tyr Tyr Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser Pro Ala

210 215 220

Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val Tyr Ala

225 230 235 240

His Met Gln Leu Thr Pro Lys Glu Ala Ala Ala Tyr Lys Asp Thr Pro

245 250 255

Val Val Tyr Asn Gly Asp Leu Gly Phe Phe Glu Pro Asn Glu His

260 265 270

Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg Phe Lys

275 280 285

Lys His Gln Pro Phe Gly Ala Arg Ala Pro Lys Arg Ile Ser Val Pro

290 295 300

Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro His Ala Ser Glu

305 310 315 320

Ala Ser Ile Lys Lys Ala Ile Ala Ala Phe Leu Pro Gln Phe Lys Asp

325 330 335

Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Met Cys Trp Cys Thr Asp Thr Ala Asp

340 345 350

Ala Ala Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Gln Trp Lys Asn Phe Met Leu

355 360 365

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

370 375 380

Lys His Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Thr Leu Ala Ala Asp Leu Ala

385	390	395	400
His Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Ile Gly Asp Ala Leu Gln Ser Arg			
405	410	415	
Arg Ala Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Asn His			
420	425	430	
Asp Glu Ser Pro Arg Ala Lys Leu			

435	440		
<210>	277		
<211>	452		
<212>	PRT		
<213>	Arthrinium sp.		
<400>	277		
Met Ala Ala Ser Arg Lys Thr Thr Lys Val Ile Val Val Gly Gly Gly			
1	5	10	15
Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Leu Arg Ser Gly Tyr			
20	25	30	
Thr Ala Thr Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Pro Ile Pro Ser Ala			
35	40	45	
Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg			

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

Asp Ser Glu Asp Ala Ile Leu Ala Lys Met Pro Leu Leu Glu Arg Asp			
130	135	140	
Gln Ile Lys Gly Trp Lys Ala Ile Phe Ser Gln Asp Gly Gly Trp Leu			
145	150	155	160

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

165 170 175

Gly Val Asn Phe Gly Phe Gly Ala Gly Ala Phe Lys Lys Pro Leu

180 185 190

Phe Ala Pro Asp Gly Ser Thr Cys Ile Gly Val Glu Thr Val Asp Gly

195 200 205

Thr Lys Tyr Tyr Gly Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser

210 215 220

Pro Ala Leu Val Asp Leu Glu Glu Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val

225 230 235 240

Tyr Ala His Met Gln Leu Thr Pro His Glu Ala Ala Glu Tyr Gln Gly

245 250 255

Cys Pro Val Val Tyr His Gly Asp Leu Gly Phe Phe Glu Pro Asn

260 265 270

Glu His Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg

275 280 285

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

290 295 300

Ser Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp

305 310 315 320

Ala Ser Glu Gln Ser Ile Arg Arg Ala Val Ala Ala Phe Leu Pro Arg

325 330 335

Phe Gln Ser Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Met Cys Trp Cys Thr Asp

340 345 350

Thr Ala Asp Ala Ala Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Arg Trp Arg Asn

355 360 365

Phe Ile Leu Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Leu Leu Pro

370 375 380

Asn Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Arg Leu Ala Asp

385 390 395 400

Asp Leu Ala Gln Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Gln Gly Asp Ala Leu

405 410 415

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

420 425 430

Trp Asn His Asp Gly Asp Ser Gly Asn Ala Thr Ser Gly Thr Ser Ser

435 440 445

Glu His Lys Leu

450

<210> 278

<211> 440

<212> PRT

<213> Curvularia clavata

<400> 278

Met Ala Pro Ser Arg Ala Asn Thr Ser Val Ile Val Val Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr

20 25 30

Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Pro Ile Pro Ser Ala

35 40 45

Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Asp Leu Phe Lys Glu Tyr Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp

85 90 95

Cys Ala His Gly Glu Glu Gly Leu Ala Asp Leu Arg Gln Ala Tyr Gln

100 105 110

Ala Leu Leu Asp Ala Asn Ala Gly Leu Glu Glu Thr Thr Glu Trp Leu

115 120 125

Asp Ser Glu Asp Glu Ile Leu Lys Lys Met Pro Leu Leu Asp Arg Glu

130 135 140

Gln Ile Lys Gly Trp Lys Ala Val Tyr Ser Gln Asp Gly Gly Trp Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Gly Ala Gly Ser Phe Lys Gln Pro Leu

180 185 190

Leu Ala Glu Gly Val Cys Ile Gly Val Glu Thr Val Asp Gly Thr Arg

195 200 205

Tyr Tyr Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser Pro Val

210 215 220

Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val Tyr Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Val Tyr Asn Gly Asp Val Gly Phe Phe Glu Pro Asp Glu His

260 265 270

Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg Phe Lys

275 280 285

Gln His Gln Pro Tyr Gly Ala Lys Ala Pro Lys Arg Ile Ser Val Pro

290 295 300

Arg Ser Ala Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala Ser Glu

305 310 315 320

Lys Ser Ile Arg Lys Ala Ile Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Thr Glu

325 330 335

Lys Glu Leu Phe Asn Arg His Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr Ala Asp

340 345 350

Ala Ala Leu Leu Met Cys Glu His Pro Glu Trp Lys Asn Phe Val Leu

355 360 365

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

370 375 380

Lys His Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Thr Leu Ala Glu Asp Leu Ala

385 390 395 400

His Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Thr Gly Asp Ala Leu Lys Ser Arg

405	410	415
Arg Ala Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Lys His		
420	425	430
Asp Asp Val Val Lys Ser Lys Leu		
435	440	
<210>	279	
<211>	477	
<212>	PRT	
<213>	Cryptococcus neoformans	
<400> 279		
Met Pro Pro Ser Arg Ala Ser Thr Lys Val Ile Val Ile Gly Gly Gly		
1	5	10
Gly Thr Leu Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Leu Arg Ala Gly Tyr		
20	25	30
Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Leu Ile Pro Ser Ala		
35	40	45
Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Ile Arg		
50	55	60
Asn Pro Val Asp Lys Gln Leu Ser Leu Glu Ala Arg Asp Met Trp Arg		
65	70	75
Asn Asp Glu Val Phe Lys Pro Tyr Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp		
85	90	95
Cys Ala His Thr Pro Glu Ser Ile Ala Ser Leu Arg Lys Ser Tyr Glu		
100	105	110
Ala Ile Leu Lys Ala Gly Ser Gly Leu Glu Lys Thr His His Trp Leu		
115	120	125
Ser Thr Glu Asp Glu Ile Leu Ala Arg Ala Pro Leu Leu Asp Arg Lys		
130	135	140
Gln Ile Lys Gly Trp Lys Ala Ile Tyr Ser Glu Asp Gly Gly Trp Leu		
145	150	155
Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ser Ile Gly Gln Val Leu Lys Glu Lys		
165	170	175

Gly Val Thr Phe Gly Phe Gly Ser Ala Gly Ser Phe Lys Lys Pro Leu

180 185 190

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

195 200 205

Thr Gln Tyr Phe Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser

210 215 220

Pro Thr Leu Val Asp Leu Glu Gly Gln Cys Cys Ser Lys Ala Trp Val

225 230 235 240

Tyr Ala His Met Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Lys Glu

245 250 255

Cys Pro Val Val Tyr Asn Ser Glu Leu Gly Phe Phe Glu Pro Asn

260 265 270

Glu Lys Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg

275 280 285

Phe Lys Gln His Gln Pro Tyr Gly Ala Ser Ser Thr Lys His Ile Ser

290 295 300

Phe Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Ile Pro Asp Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Lys Glu Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ala Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr

340 345 350

Ala Asp Ala Asn Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe

355 360 365

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

370 375 380

Ile Gly Lys His Val Val Glu Leu Ile Glu Gly Thr Leu Ala Glu Asp

385 390 395 400

Leu Ala Glu Ser Trp Arg Trp Arg Pro Gly Ser Gly Asp Pro Leu Ile

405 410 415

Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Arg Asp Leu Ala Asp Leu Pro Gly Trp

420 425 430

Asn His Asp Glu Pro Ser Asp Asp Asp Met Asp Val Lys Asp Val Ala

435 440 445

Val Ser Leu Ala Ser Val Lys Ile Gly Glu Asn Ile Gly Glu Lys Val

450 455 460

Val Glu Asp Gly Ala Arg Val Gly Val Lys Val Leu Ala

465 470 475

<210> 280

<211> 437

<212> PRT

<213> Phaeosphaeria nodorum

<400> 280

Met Ala Pro Ser Arg Ala Asn Thr Ser Val Ile Val Val Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr

20 25 30

Thr Pro Ser Asn Val Thr Val Leu Asp Ala Tyr Pro Ile Pro Ser Ser

35 40 45

Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Val Ser Leu Arg

50 55 60

Asn Pro Val Asp Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ala Arg Gln Met Trp Asn

65 70 75 80

Glu Asp Glu Leu Phe Lys Lys Phe Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp

85 90 95

Cys Ala His Gly Glu Lys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Ser Gly Tyr Gln

100 105 110

Ala Leu Val Asp Ala Gly Leu Asp Ala Thr Asn Glu Trp Leu Asp Ser

115 120 125

Glu Asp Glu Ile Leu Lys Arg Met Pro Leu Leu Ser Arg Asp Gln Ile

130 135 140

Lys Gly Trp Lys Ala Ile Phe Ser Lys Asp Gly Gly Trp Leu Ala Ala

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Lys Ala Ile Asn Ala Val Gly Glu Tyr Leu Arg Asp Gln Gly Val

165	170	175
-----	-----	-----

Arg Phe Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Lys Ala Pro Leu Leu Ala

180	185	190
-----	-----	-----

Glu Gly Val Cys Ile Gly Val Glu Thr Val Asp Gly Thr Arg Tyr Tyr

195	200	205
-----	-----	-----

Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser Pro Thr Leu Val

210	215	220
-----	-----	-----

Glu Leu His Glu Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val Tyr Gly His Ile

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Gln Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ala Arg Tyr Lys Asn Ser Pro Val Val

245	250	255
-----	-----	-----

Tyr Asn Gly Asp Val Gly Phe Phe Glu Pro Asn Glu His Gly Val

260	265	270
-----	-----	-----

Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg Phe Lys Met His

275	280	285
-----	-----	-----

Gln Pro Phe Gly Ala Lys Ala Pro Lys Arg Ile Ser Val Pro Arg Ser

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ile Arg Arg Ala Ile Ala Thr Phe Met Pro Gln Phe Lys Asn Lys Lys

325	330	335
-----	-----	-----

Met Phe Asn Gln Ala Met Cys Trp Cys Thr Asp Thr Ala Asp Ala Ala

340	345	350
-----	-----	-----

Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Glu Trp Lys Asn Phe Val Leu Ala Thr

355	360	365
-----	-----	-----

Gly Asp Ser Gly His Ser Phe Lys Leu Leu Pro Asn Ile Gly Lys His

370	375	380
-----	-----	-----

Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Thr Leu Ala Asp Asp Leu Ala His Ala

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Trp Arg Trp Arg Pro Gly Ser Gly Asp Ala Leu Lys Ser Arg Arg Ser
 405 410 415

Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Asn His Asp Lys
 420 425 430

Pro Arg Ala Asn Leu

435

<210> 281

<211> 441

<212>

PRT

<213> Ulocladium sp.

<400> 281

Met Ala Pro Asn Arg Ala Asn Ile Ser Val Ile Val Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Thr Tyr Pro Ile Pro Ser Ala
 35 40 45

Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Ile Arg Leu Arg
 50 55 60

Asn Lys Val Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ala Arg Gln Met Trp Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Asp Leu Phe Lys Glu Tyr Phe His Lys Thr Gly Arg Leu Asp
 85 90 95

Cys Ala His Gly Glu Lys Gly Leu Ala Asp Leu Lys Gln Ala Tyr Gln
 100 105 110

Ala Leu Leu Asp Ala Asn Ala Gly Leu Glu Ala Thr Thr Glu Trp Leu
 115 120 125

Asp Ser Glu Asp Lys Ile Leu Glu Lys Met Pro Leu Leu Asn Arg Asp

130 135 140

Gln Ile Lys Gly Trp Lys Ala Val Phe Ser Glu Asp Gly Gly Trp Leu
 145 150 155 160

Ala Ala Ala Lys Ala Ile Asn Ala Ile Gly Arg Phe Leu Arg Asp Gln

165	170	175
Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Gly Ala Gly Ser Phe Lys Gln Pro Leu		
180	185	190
Leu Ala Glu Gly Val Cys Val Gly Val Glu Thr Val Asp Gly Thr Arg		
195	200	205
Tyr Tyr Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser Pro Ala		
210	215	220
Leu Val Asp Leu Gln Asp Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val Tyr Ala		
225	230	235
His Ile Gln Leu Ser Pro Ser Glu Ala Ala Glu Tyr Lys Asn Val Pro		
245	250	255
Val Val Tyr Asn Gly Asp Val Gly Phe Phe Glu Pro Asp Glu Tyr		
260	265	270
Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Thr Arg Phe Lys		
275	280	285
Gln His Gln Pro Phe Gly Ala Ser Ala Pro Lys Arg Ile Ser Val Pro		
290	295	300
Arg Ser Ala Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ala Ser Glu		
305	310	315
Val Ser Ile Arg Lys Ala Ile Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Thr Glu		
325	330	335
Lys Glu Val Phe Asn Arg His Leu Cys Trp Cys Thr Asp Thr Ala Asp		
340	345	350
Ala Ala Leu Leu Met Cys Glu His Pro Glu Trp Lys Asn Phe Val Leu		
355	360	365
Ala Thr Gly Asp Ser Gly His Thr Phe Lys Leu Leu Pro Asn Ile Gly		
370	375	380
Lys His Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Thr Leu Ala Asp Asp Leu Ala		
385	390	395
His Ala Trp Arg Trp Arg Pro Gly Thr Gly Asp Ala Leu Lys Ser Arg		
405	410	415

Arg Ala Ala Arg Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Asn His

420 425 430

Asp Gly Glu Ala Pro Arg Ala Lys Leu

435 440

<210> 282

<211> 437

<212> PRT

<213> *Penicillium janthinellum*

<400> 282

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

1 5 10 15

Gly Thr Met Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Ile Arg Ser Gly Tyr

20 25 30

Thr Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asp Val Tyr Pro Ile Pro Ser Leu

35 40 45

Gln Ser Ala Gly Tyr Asp Leu Asn Lys Ile Met Ser Ile Arg Leu Arg

50 55 60

Asn Gly Pro Asp Leu Gln Leu Ser Leu Glu Ala Leu Asp Met Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asp Pro Leu Phe Lys Pro Phe His Asn Val Gly Met Leu Asp

85 90 95

Cys Ser Ser Ser Gln Glu Gly Ile Ala Ser Leu Arg Arg Lys His Gln

100 105 110

Asp Leu Ile Asp Ala Asn Ile Gly Leu Glu Lys Thr Asn Ile Trp Leu

115 120 125

Glu Ser Glu Asp Asp Ile Leu Ala Lys Ala Pro His Phe Thr Arg Glu

130 135 140

Gln Ile Lys Gly Trp Lys Gly Leu Phe Cys Gly Asp Gly Gly Trp Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Val Lys Phe Gly Phe Gly Ser Ala Gly Thr Phe Lys Arg Pro Leu

180 185 190

Phe Ala Pro Asp Gly Ala Thr Cys Ser Gly Val Glu Thr Val Asp Gly

195 200 205

Thr Lys Tyr Phe Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser

210 215 220

Ser Thr Leu Val Asp Leu Glu Asp Gln Cys Val Ser Lys Ala Trp Val

225 230 235 240

Phe Ala His Ile Gln Leu Thr Pro Gln Glu Ser Ala Gln Tyr Lys Asp

245 250 255

Val Pro Val Val Tyr Asp Gly Asp Tyr Gly Phe Phe Glu Pro Asn

260 265 270

Glu His Gly Val Ile Lys Val Cys Asp Glu Phe Pro Gly Phe Ser Arg

275 280 285

Phe Lys Leu His Gln Pro Tyr Gly Ala Thr Ser Pro Lys Leu Ile Ser

290 295 300

Val Pro Arg Ser His Ala Lys His Pro Thr Asp Thr Tyr Pro Asp Ser

305 310 315 320

Ser Glu Glu Thr Ile Arg Lys Ala Ile Ala Arg Phe Met Pro Arg Phe

325 330 335

Lys Asp Lys Glu Leu Phe Asn Arg Ser Met Cys Trp Cys Thr Asp Thr

340 345 350

Ala Asp Ala Asn Leu Leu Ile Cys Glu His Pro Lys Trp Lys Asn Phe

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Arg Ser Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Glu Met Pro Gly Trp Lys

420

425

430

His Asp Ala Lys Leu

435