(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0063907
(43) 공개일자 2012년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0125082
(22) 출원일자 2010년12월08일
심사청구일자 2010년12월08일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
정광환
경기도 성남시 분당구 양현로 192, 삼성아파트 1025동 503호 (이매동)
김유선
경기도 안양시 동안구 귀인로 210, 현대홈타운 204동 1405호 (평촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 12 항

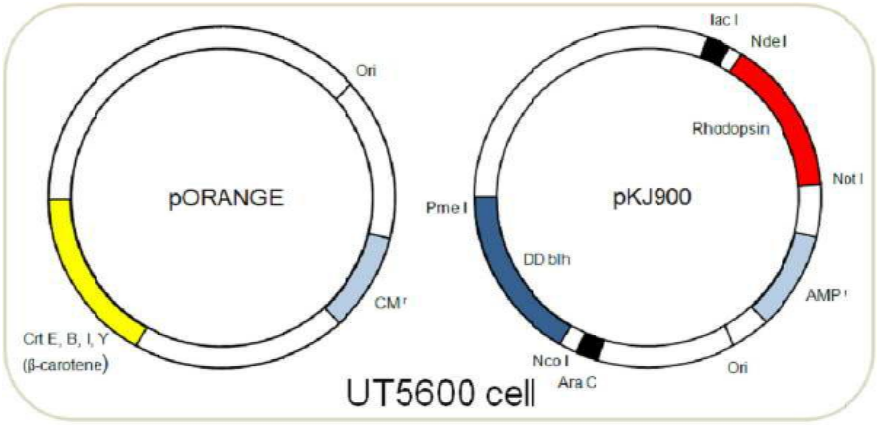
(54) 발명의 명칭 **비타민 A의 합성 활성이 증가된 동해아나 독도넨시스 B l h**

(57) 요 약

본 발명은 비타민 A 합성 효소에 관한 것으로, 구체적으로 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*)로 부터 획득한 서열목록 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 베타-카로틴 디옥시게나제 상동 단백질인 Blh(bacteriorhodopsin-related protein like homolog protein: 이하, DD Blh)를 암호화하는 핵산 서열 및 그의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 단백질은 비타민 A 혹은 올-트랜스(all-trans) 레티날의 합성에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최아름

울산광역시 동구 문재5길 32-4, 402호 (방어동, 크리스탈빌)

한송이

서울특별시 용산구 서빙고로 67, 102동 207호 (용산동5가, 파크타워)

권순경

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동, 한국생명공학연구원)

김지현

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동, 한국생명공학연구원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	201033035
부처명	교육과학기술부
연구사업명	21세기프론티어연구개발사업
연구과제명	녹색광 수용체를 이용한 광에너지 전환 연구
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 Blh는 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 Blh.

청구항 3

상기 제 1 항의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열목록 제 2 서열인 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 5

(a) β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh을 인코딩하는 상기 제 3 항의 핵산 분자; 및

(b) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 벡터.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 벡터는 (i) 서열 목록 제 14 서열의 프로테오로돕신(proteorhodopsin)을 인코딩하는 핵산 분자; 및 (ii) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 추가적으로 포함하는 벡터.

청구항 7

상기 제 5 항 또는 제 6 항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 8

하기 단계를 포함하는 재조합 Blh 제조방법:

(a) 상기 제 1 항의 Blh 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)의 형질전환체를 배양하는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 숙주세포는 *E.coli*인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

하기 단계를 포함하는 프로테오로돕신 제조방법:

(a) 상기 제 1 항의 Blh 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 및 상기 제 6 항의 프로테오로돕신을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)의 형질전환체를 배양하는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 숙주세포는 *E.coli*인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 *E.coli*는 β-카로틴 합성 효소 발현 유전자(서열목록 제6서열, 제8서열, 제10서열, 제12서열)를 포함하는 플라스미드로 형질전환된 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비타민 A를 합성할 수 있는 효소에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로테오로돕신(proteorhodopsin, PR)은 해양성 감마-프로테오박테리아(γ-proteobacteria)의 메타지놈분석(metagenomic analysis)에 의해 확인된(Beja et al., 2000; Beja et al., 2001), 광활성의 타입 I 레티날 결합 단백질이다(Spudich et al., 2000; Spudich and Jung, 2005). γ-프로테오박테리아의 SAR86 그룹에서 PR이 최초로 확인(Beja et al., 2000)된 후, 다수의 프로테오로돕신 변이체들이 Monterey Bay, Hawaii Ocean Time(HOT), Palmer station(Antarctica)(Beja et al., 2001), Mediterranean Sea, Red Sea(Sabehi et al., 2003), and Sargasso Sea(Venter et al., 2004)에서의 감마-프로테오박테리아 및 알파-프로테오박테리아에서 발견되었다. PR은 최대 흡수 파장(absorption maxima)에 기초하여 블루(490nm)에서 그린(525nm) 까지에 걸치는 스펙트럼 범위를 갖는 몇 개의 하위 패밀리로 분류될 수 있다(Man et al., 2003). 이러한 분포는 깊이에 따라 층상으로 형성되는 것을 보이는 데, 그린광 흡수 색소는 표면에 블루광 흡수 색소는 더 깊은 곳에 위치한다(Beja et al., 2001). 두 개의 PR 하위 패밀리, 즉 GPR(Green proteorhodopsin) 및 BPR(Blue proteorhodopsin)은 78 % 아미노산 서열 상동성을 나타낸다. PR은 all-*trans* 레티날을 발색단(chromophore)으로 사용한다. 광센서 수용체에서 사용되는 발색단중에서 레티날의 가장 주목할만한 상이한 특성은 아포단백질(apoprotein)과의 상호작용에 따라 이의 흡수 스펙트럼에서의 변이가 크다는 것이다(Birge, 1990; Ottolenghi and Sheves, 1989). 레티날의 시프 염기(Schiff base)는 메탄올에서 440 nm의 최대 흡수 파장을 나타내지만, 마이크로 환경의 단백질에서는 더욱 긴 파장으로 이동된다(Yan et al., 1995).

[0003] all-*trans* 레티날은 β-카로틴의 15,15' C=C 결합의 중앙 절단에 의해 생성되어(Spudich et al., 2000), β-카로틴은 2 분자의 레티날을 생성한다. 이러한 효소적 절단(cleavage)은 분자 산소에 의존하며, 보조인자

(cofactor)가 요구되지 않기 때문에, 이 효소는 15, 15'-β-카로틴-디옥시게나아제라고 명명되었다(Lintig and Vogt, 2004). 몇몇 프로테아박테리아(proteobacteria)는 β-카로틴을 합성하고 이를 레티날로 전환하여 기능적 활성인 PR을 생성할 수 있는 것으로 추정된다(Lintig and Vogt, 2000; Sabehi et al, 2005).

[0004] 박테리오로돕신(bacteriorhodopsin, BR)과 같이, PR은 광-유도 프로톤 펌프이다(Beja et al., 2000; Friedrich et al., 2002; Dioumaev et al., 2003). 이러한 기능에 있어서 중요한 두 개의 잔기는 프로톤 수용자로 작용하는 Asp-97과 시프 염기에 프로톤 공여자로 작용하는 Glu-108이다. 이들 잔기는 BR에서 Asp-85 및 Asp-96에 대응한다(Dioumaev et al., 2003; Dioumaev et al., 2002). 모든 타입 I 로돕신에서, 레티날 발색단의 기능적 광이성화(photoisomerization)는 all-*trans* 로부터 13-cis 로의 변환에 의해 발생된다(Spudich et al., 2000). PR의 광사이클의 중간체는 BR의 것과 유사하고 이의 프로톤 전달 기능과도 일치한다(Dioumaev et al., 2002). PR의 광사이클은 K, M1, M2, N, 및 PR'(O)라는 적어도 5개의 중간체를 포함한다(Varo et al., 2003; Friedrich et al., 2002). 재조합 DNA 및 인 비트로 생화학적 분석에 기초한 연구에 의해 PR이 빠른 광사이클 및 프로톤 펌핑 활성을 갖는다는 것을 알게 되었다.

[0005] 인간을 포함한 진핵생물은 β-카로틴을 자체적으로 생성할 수 없어서 물질 섭취를 통해 β-카로틴을 체내에 공급하지만, 원핵생물은 그와 다르게 β-카로틴을 자체적으로 생성할 수 있는 일련의 유전자들이 있기 때문에 대부분의 유기체에서 형성된다. 예를 들어 박테리오로돕신(bacteriorhodopsin: 이하, BR) 또는 프로티오로돕신(proteorhodopsin: 이하, PR)을 가지고 있는, 해양에 서식하는 미생물들은 1분자의 β-카로틴을 잘라 2분자의 all-trans 레티날을 생성하는 *blh* 유전자 이외에도 β-카로틴을 생성하는 4개의 *crt* 유전자들, 즉 *crtE*, *crtI*, *crtB*와 *crtY* 유전자군을 가지고 있다(Armstrong et al. Annu. Rev. microbiol, 51:629-59, 1997).

[0006] 본 발명자들은 최근에 신규 발굴한 유전자의 기능을 규명하여 효과가 우수한 것을 증명함으로써 비타민 A 합성을 대량 생산을 가능하게 하는 본 발명을 완성하였다. 동해아나 독도넨시스에서 분리한 *blh*를 베타-카로틴을 안정적으로 발현하는 *E. coli*(UT5600) 세포에서 발현시켜서, DD Blh 효소 활성으로 인해 생성된 올-트랜스 레티날(all-trans retinal)을 발색단으로 하는 PR의 생성을 구축함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 비타민 A 합성 효소에 관한 것으로, 구체적으로 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*)로 부터 획득한 베타-카로틴 디옥시게나제 상동 단백질인 Blh을 찾고자 예의 연구 노력한 결과, 서열목록 제 1 서열로 표현되는 DD Blh 단백질을 분리하고, 또한 이렇게 분리된 DD Blh 단백질이 1 분자의 β-카로틴을 잘라 2 분자의 all-trans 레티날을 생성하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 Blh 단백질을 제공하는 것에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 Blh 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것에 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 Blh 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공하는 것에 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것에 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 Blh 단백질 제조방법을 제공하는 것에 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 Blh 단백질을 이용하여 프로테오로돕신을 제조하는 방법을 제공하는 것에 있다.

[0015] 본 발명의 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 DD Blh 단백질을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 비타민 A 합성 효소에 관한 것으로, 구체적으로 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*)로 부터 베타-카로틴 디옥시게나제 상동 단백질인 Blh을 찾고자 예의 연구 노력한 결과, 서열목록 제 1 서열로 표현되는 DD Blh 단백질을 분리하고, 또한 이렇게 분리된 DD Blh 단백질이 1 분자의 β-카로틴을 잘라 2 분자의 all-trans 레티날을 생성하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh를 제공한다.

[0019] 본 명세서에서 "β, β-카로틴 15, 15'-디옥시게나제"란 1 분자의 β-카로틴의 15, 15' C=C 이중결합의 중앙 부분을 절단하여 2 분자의 레티날을 형성하는 반응을 촉매하는 효소를 의미한다(도 1 참조). 이러한 효소적 절단은 산소분자에 의존하며, 보조인자를 필요로 하지 않는다.

[0020] 본 발명의 바람직한 양태에 따르면, 본 발명의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh는 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*) 유래한다.

[0021] 본 발명인 Blh 아미노산 서열은 바람직하게는 a) 서열목록 1로 기재되는 아미노산 서열; b) 서열목록 1로 기재되는 아미노산 서열과 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열; c) 서열목록 2에 기재된 염기 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; d) 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 구성되며, 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질의 아미노산 서열; 및 e) 서열목록 2에 기재된 염기서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화 되는 DNA에 의해 코딩되는 아미노산 서열이며, 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질의 아미노산 서열 중 하나를 포함하나, 가장 바람직하게는 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh을 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[0024] 본 발명의 바람직한 양태에 의하면, 본 발명의 Blh를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 보다 바람직하게는, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0025] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교

방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 (a) β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh을 인코딩하는 상기 제 3 항의 핵산 분자; 및 (b) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0027] 본 발명의 바람직한 양태에 의하면, 본 발명의 상기 벡터는 (ⅰ) 서열 목록 제 5 서열의 프로테오로돕신(proteorhodopsin)을 인코딩하는 핵산 분자; 및 (ii) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 추가적으로 포함하는 벡터를 제공한다.

[0028] 본 명세서에서 용어 "프로테오로돕신"은 해양성 γ-프로테오박테리아에서 분리된 타입 I의 레티날(retinal) 결합 단백질을 의미한다. 상기 프로테오로돕신은 다른 박테리아에서 발견되는 박테리오로돕신(bacteriorhodopsin)과 마찬가지로 막단백질로서 막통과 도메인(transmembrane domain)을 갖고 있으며, 발색단(chromophore)으로 작용하는 레티날과 결합하면 광-유도(light-driven) 프로톤 펌핑(proton pumping) 기능을 갖게 되고, 세포가 색깔을 띄게 된다.

[0029] 바람직하게는, 본 발명의 프로테오로돕신 단백질은 서열목록 제 13 서열의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 프로테오로돕신을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 서열목록 제 14 서열의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 더욱 바람직하게는 서열목록 제 14 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0030] 본 발명에서 상기 프로테오로돕신을 인코딩하는 핵산 분자 등을 추가적으로 포함하는 이유는 동해아나 독도넨시스로부터 유래한 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh에 의해 1 분자의 β-카로틴이 2 분자의 all-trans 레티날이 되어 후술할 프로테오로돕신을 합성할 수 있기 때문이다.

[0031] 본 발명에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0032] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0033] 본 발명의 DD Blh를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포 또는 진핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0034] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자가 원핵 세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵 세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다.

[0035] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^{λ}프로모터, pR^{λ}프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로머터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 츄린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터(Appl. Environ. Microbiol. 64:3932-3938(1998); Mol. Gen. Genet. 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.

[0036] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열)을 일반적으로 갖는다.

[0038] 본 발명에 이용될 수 있는 진핵 세포용 발현 벡터는 당업계에 공지된 다양한 벡터로부터 선택할 수 있다. 예를 들어, SV40 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, YIp5, YCp19, 엡스테인-바 바이러스 벡터, pMSG, pAV009/A^+, pMAMneo-5, 배큘로바이러스 pDSVE, pSecTag2B 또는 yT&A 벡터의 구조를 기본적인 백본으로 가질 수 있다.

[0039] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 히스톤 탈아세틸화 효소의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.

[0040] 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 소망하는 히스톤 탈아세틸화 효소를 신속하고 용이하게 얻을 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 DD Blh는 C-말단에 6개의 히스티딘(His) 잔기가 융합(His-태그(tagged))되어 있다. 이러한 본 발명의 His-태그된 로돕신 단백질은 Ni^{2+}-NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 정제한다.

[0041] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0042] 본 발명의 다른 양태에 의하면 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[0043] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포 및 사람 세포(예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 등이 이용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

[0046] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 DD Blh를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 lac 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을

유도할 수 있다.

[0047] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 재조합 Blh 단백질 제조방법을 제공한다:

[0048] (a) 상기 제 1 항의 Blh 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0049] (b) 상기 단계 (a)의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계; 및

[0050] (c) 상기 단계 (b)의 형질전환체를 배양하는 단계.

[0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 단계 (b)의 숙주세포는 바람직하게는 *E.coli*를 사용한다. 상기 제조방법과 관련하여 보다 구체적인 사항은 하기 실시예에서 설명하도록 한다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 프로테오로돕신 제조방법을 제공한다:

[0053] (a) 상기 제 1 항의 Blh 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 및 상기 제 5 항의 프로테오로돕신을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0054] (b) 상기 단계 (a)의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계; 및

[0055] (c) 상기 단계 (b)의 형질전환체를 배양하는 단계.

[0056] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 단계 (b)의 숙주세포는 바람직하게는 *E.coli*이며, 가장 바람직하게는 β-카로틴 합성 효소 발현 유전자(서열목록 제6서열, 제8서열, 제10서열, 제12서열)를 포함하는 플라스미드로 형질전환된 것이다.

[0057] 상기 프로테오로돕신의 제조방법에서 β-카로틴 합성 효소 발현 유전자(서열목록 제6서열, 제8서열, 제10서열, 제12서열)를 포함하는 플라스미드로 형질전환된 것이 가장 바람직한 이유는 발현된 β-카로틴 합성 효소에 의해 합성된 β-카로틴이 DD Blh에 의해 all-trans 레티날을 생성하여, 프로테오로돕신의 합성에 이용되기 때문이다.

[0058] 본 명세서에서 용어 "β-카로틴 합성 효소"는 β-카로틴을 합성하는데 필요한 효소를 의미하고, 바람직하게는 *crtE, crtB, crtI, crtY* 유전자를 포함한다.

[0059] *crtE* 유전자는 제라닐제라닐 파이로포스페이트(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 신테아제(synthase)를 코딩하는 유전자이다. GGPP 신테아제는 파네실 파이로포스페이트(farnesyl pyrophosphate)와 이소펜틸 파이로포스페이트(isopentyl pyrophosphate)를 축합반응(condensation)시켜 제라닐제라닐 파이로포스페이트를 생성하는 반응을 촉매한다. 본 발명에 사용되는 crtE 유전자는 GGPP 신테아제 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자이면 어떠한 기원(origin)에서 유래한 것이든 사용 가능하다.

[0060] 바람직하게는 상기 GGPP 신테아제는 서열목록 제5서열의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 GGPP 신테아제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 서열목록 제 5 서열의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 더욱 바람직하게는 서열목록 제 6 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0061] *crtB* 유전자는 프리파이토엔(prephytoene) 신테아제를 코딩하는 유전자이다. 프리파이토엔 신테아제는 2 분자의 제라닐제라닐 파이로포스페이트를 축합반응시켜 카로테노이드인 프리파이토엔을 형성하는 반응을 촉매하고, 이어서 프리파이토엔의 사이클로프로필환(cyclopropyl ring)을 재배치하여 파이토엔(phytoene)을 형성하는 반응을 촉매한다. 본 발명에 사용되는 *crtB* 유전자는 프리파이토엔 신테아제 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자이면 어떠한 기원에서 유래한 것이든 사용 가능하다.

[0062] 바람직하게는, 상기 프리파이토엔 신테아제는 서열목록 제 7 서열의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 프리파이토엔 신테아제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 서열목록 제 7 서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하고, 더욱 바람직하게는 서열목록 제 8 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0063] *crtI* 유전자는 파이토엔 디세튜라제(phytoene desaturase)를 코딩하는 유전자이다. 상기 파이토엔 디세튜라제

는 4 단계에 걸쳐 파이토엔을 디세튜레이션(desaturation) 시켜 라이코펜(lycopene)을 형성하는 반응을 촉매한다. 본 발명에 사용되는 *crtI* 유전자는 파이토엔 디세튜라제 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자이면 어떠한 기원에서 유래한 것이든 사용 가능하다.

[0064] 바람직하게는 상기 파이토엔 디세튜라제는 서열목록 제 9 서열의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 파이토엔 디세튜라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 서열목록 제 9 서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하며, 더욱 바람직하게는 서열목록 제 10 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0065] *crtY* 유전자는 라이코펜 사이클라제(lycopene cyclase)를 코딩하는 유전자이다. 상기 라이코펜 사이클라제는 라이코펜의 양쪽 말단에서 환(ring)을 폐쇄시켜 β-카로틴을 형성하는 반응을 촉매한다. 본 발명에 사용되는 *crtY* 유전자는 라이코펜 사이클라제 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자이면 어떠한 기원에서 유래한 것이든 사용 가능하다.

[0066] 바람직하게는, 상기 라이코`펜 사이클라제는 서열목록 제 11 서열의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 라이코펜 사이클라제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 서열목록 제 11 서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함하고, 더욱 바람직하게는 서열목록 제 12 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

발명의 효과

[0067] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0068] (a) 본 발명은 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*)로부터 유래한 서열목록 제 1 서열의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제(β,β-carotene 15,15'-dioxygenase) 활성을 갖는 Blh를 제공한다.

[0069] (b) 본 발명은 원핵세포에서 발견된 Blh 중 진핵세포인 마우스 디옥시게나제와 동등한 활성을 나타내는 최초의 Blh 단백질이다.

[0070] (c) 본 발명의 단백질은 비타민 A 혹은 올-트랜스(all-trans) 레티날의 합성에 유용하게 사용될 수 있다.

[0071] (d) 본 발명은 진핵생물에서는 베타 카로틴을 절단하여 2분자의 올 트랜스 레티날을 만드는 효소를 가지고 있지만 원핵생물은 자체적으로 만들 수 없다. 예전에 마우스 등의 포유류가 아닌 미생물에서 발견한 박테리아 효소인 Blh protein 이다. 이 신규 유전자는 비타민A 합성을 대량생산을 가능하게 하는 장점이 있다.

[0072] (c) 본 발명의 핵산 서열을 이용하여 로돕신을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 Blh 활성을 갖도록 형질도입된 형질전환체를 선별하기 위해 사용된 재조합 발현 시스템의 개요도이다.

도 2는 본 발명의 DD Blh에 의해서 베타-카로틴이 all-trans로 잘려서 프로테오옵신 전구체와 결합한 것을 확인한 사진이다: 1 내지 3 모두 로돕신은 프로테오로돕신을 사용하였고, 디옥시게나제의 경우 반시계 방향으로 1번은 마우스 디옥시게나제(핑크색), 2번은 비배양된 해양 박테리움 66A03 유래의 디옥시게나제이고(노란색), 3번은 본 발명의 동해아나 독도넨시스 유래의 Blh이다(오렌지색).

도 3은 본 발명인 DD-Blh의 아미노산 서열과 공지의 PR-Blh의 아미노산 서열의 비교를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0075] **실시예**

[0076] **실험방법**

[0077] **동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*)로부터 신규 DD Blh의 획득**

[0078] 동해아나 독도센시스 Blh 단백질(*Donghaeana dokdonensis* bacteriorhodopsin-related like protein homolog protein)(서열목록 1)을 과발현하기 위한, Blh를 암호화하는 서열목록 2로 기재되는 핵산을 포함하는 벡터의 제조과정은 다음과 같다. blh를 동해아나 독도넨시스(J.H.Yoon et al., Donghaeana dokdonensis gen. nov., sp. nov., isolated from sea water, *Int J Syst Evol Microbiol*, 56:187-191(2006))의 게놈 DNA에서 PCR로 증폭하였으며 이때 사용된 축퇴성(degenerate) 프라이머쌍은 다음과 같다: 서열목록 3으로 기재되는 정방향 프라이머 5'-ATGTCTAGGAAATTTCAG-3' 및 서열목록 4로 기재되는 역방향 프라이머 5'-CTACTTGCTATTTAATTG-3'으로 구성된 프라이머쌍. 유전자 증폭을 위한 PCR은 *Pfu* 중합효소(Koschem, Korea)를 이용하여 95℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 2분 30초로 하여 35 싸이클을 반응시켰다. PCR로 증폭된 유전자산물(서열목록 2)은 *Xho* I, *Nco* I 제한효소 및 라이게이즈(New English Lab, USA)를 이용하여 pKJ900(Kim et al., Screening and characterization of proteorhodopsin color-tuning mutations in Escherichia coli with endogenous retinal synthesis, *Biochim biophysica Acta*, 1777(6):504-513(2008)) 벡터의 *AraC* 프로모터 하위에 삽입되었다(도 1). 상기 벡터는 앰피실린 내성 유전자를 가지고 있으므로, *E. coli* 중의 하나인 *DH5α*(UT5600, New England Biolabs, USA)에 도입된 후 50 μM의 앰피실린(USB Corp, USA)이 함유되어 있는 LB Agar 배지에서 선택되었다.

[0079] **박테리아 균주 및 플라스미드**

[0080] 대장균(*Escherichia coli*) *DH5α*를 DD Blh 유전자를 클로닝하는데 사용하였다. 형질전환체(transformant)들은 35℃의 온도에서 50 ㎍/㎖ 농도의 앰피실린(ampicillin, USB Corp.)이 존재하는 LB(Luria-Bertani)배지에서 배양하였다. 형질전환체(transformant)들을 *E. coli* β/UT(Kim et al., Screening and characterization of proteorhodopsin color-tuning mutations in Escherichia coli with endogenous retinal synthesis, *Biochim biophysica Acta*, 1777(6):504-513(2008))균주에서 발현시켰다. *E. coli* β/UT는 β-카로틴 합성 효소 발현 유전자(서열목록 제6서열, 제8서열, 제10서열, 제12서열)를 포함하는 플라스미드 pORANGE(Lintig and Vogt, MOLECULAR IDENTIFICATION OF AN ENZYME CLEAVING β-CAROTENE TO RETINAL, *The Journal of Biological Chemistry*, 275:11915-11920(2000))으로 UT5600을 형질전환시켜 제조하였다. 플라스미드 pKJ900은 프로테오로돕신(PR, Monterey Bay proteorhodopsin, MBP) 유전자(서열목록 제13서열)을 *Nde* I 및 *Not* I 제한효소 자리에 삽입하고, DD *Blh* 유전자(서열목록 제2서열)을 *Nco* I 및 *Pme* I 제한효소 자리에 삽입하여 제조하였다(도 1 참조). *E. coli* β/UT 균주내에서 프로테오로돕신은 lac UV5 프로모터하에서 발현시켰고, DD *Blh* 유전자는 *Ara C* 프로모터하에서 발현시켰다(도 1 참조).

[0081] **DD Blh 유전자의 발현 및 정제**

[0082] DD Blh 유전자로 형질전환된 *E. coli* β/UT균주를 밤샘 배양하고 이를 1:100으로 희석하고 600 nm에서 0.4 OD의 흡광도를 생성할 때까지 30 ℃에서 배양하였다. β/UT 세포들을 1 mM IPTG 및 0.2% (+)-L-아라비노오스(Sigma)로 30 ℃에서 24 시간 동안 유도하였다. 유도된 세포들은 회수하여 50 mM Tris(pH 7.0) 및 150 mM NaCl 내에서 희석시켰다. 유도된 세포들을 4 ℃에서 소니케이션(Branson sonifier 250)에 의해 파쇄시키고 저속(3,220ㅅ g/20 분) 원심분리기(Eppendorf centrifuge 5810R)에 의해 세포 부스러기를 제거하였다. 상등액을 Ni^{2+}-NTA 아가로오스(Quiagen)과 혼합한 후 저속 진탕기(shaker)로 4℃에서 밤샘 혼합시켰다. 혼합물을 25 mM 이미다졸(Sigma)의 20 배 부피로 세정하고 0.02% DM을 포함하는 동일한 버퍼내의 250 mM 이미다졸로 용출시켰다. DD Blh를 포함하는 분획(fraction)을 회수하고 이미다졸을 제거하고 정제된 DD Blh 단백질을 농축하기 위해서 Amicon Ultra-4 10,000 MWCO 원심분리 필터(Millipore)로 농축시켰다.

[0083] **실험결과**

[0084] **DD Blh의 발현 및 활성 테스트**

[0085] 동해아나 독도넨시스(*Donghaeana dokdonensis*), 마우스(mouse) 및 비배양된 해양 박테리움 66A03과 같은 다양한 기원의 β, β-카로틴 15, 15'-디옥시게나제를 발현시켜, 이의 효소적 활성을 레티날(retinal)의 생성량과 프로테오로돕신(proteorhodopsin)에 의한 색깔 분석을 이용하여 확인하였다. β-카로틴 합성 효소 유전자를

갖는 플라스미드 pORANGE를 포함하는 *E. coli* β/UT 균주(Lintig and Vogt, 2000)에, 프로테오로돕신 유전자와, 동해아나 독도넨시스, 마우스 및 비배양된 해양 박테리움 66A03의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제 유전자를 갖는 플라스미드 pKJ900을 각각 형질전환시켰다. 형질전환 숙주 세포 내부에서, β-카로틴은 β-카로틴 합성 효소로부터 합성되고, 플라스미드 pKJ900 으로부터 발현되는 동해아나 독도넨시스, 마우스 및 비배양된 해양 박테리움 66A03 각각의 β,β-카로틴 15,15'-디옥시게나제에 의해 β-카로틴으로부터 all-trans 레티날이 생성되며, all-trans 레티날은 플라스미드 pKJ900으로부터 발현되는 막단백질 프로테오로돕신과 결합하여 발색단으로 작용한다. 이때 숙주 세포가 프로테오로돕신을 발현할 경우 색깔을 띄게 된다.

[0086] 상기 선택된 형질전환체를 50 ㎍/㎖ 앰피실린(USB Corp, USA), 0.34 ㎍/㎖ 클로람페니콜(Sigma, USA), 1 mM IPTG(Fermentas, USA) 그리고 0.2% 아라비노즈(Aldrich, USA)가 첨가된 LB-agar 플레이트에 도말(streaking)해서 16시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다(37℃). 로돕신이 발현된 분홍색을 띄는 *E. coli*를 얻었다.

[0087] 그 결과 도 2에서 나타난 바와 같이 본 발명의 Blh는 이제까지 밝혀진 디옥시게나아제 중 가장 활성이 높은 것으로 알려진 마우스 디옥시게나아제(mouse dioxgenase)와 동등한 활성을 나타냈고, 기존의 Blh를 갖는 것으로 알려진 비배양된 해양 박테리움 66A03 미생물에서는 검출되지 않은 Blh 활성이 검출됨으로써, 예전에 마우스 등의 포유류가 아닌 미생물에서는 검출된 바 없는 Blh을 새로 확인하였다.

표 1

[0088]

번 호	1	2	3
로돕신(Rhodopsin)	PR	PR	PR
디옥시게나제 호모로그 (Dioxygenase homolog)	마우스 디옥시게나제	PR Blh	DD Blh
활성도(Activity)	+++	ND	+++

[0089] PR - 프로테오로돕신(proteorhodopsin)

[0090] PR Blh - 비배양된 해양 박테리움 66A03 Blh(uncultured marine bacterium Blh)

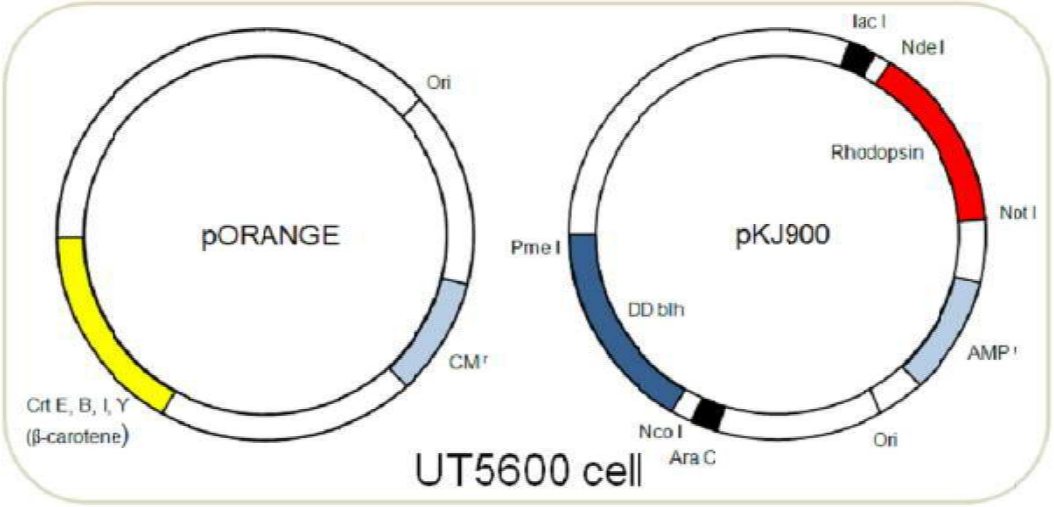
[0091] DD Blh - 동해아나 독도넨시스 Blh(Donghaeana dokdonensis Blh)

[0092] +가 많으면 활성이 좋은 것을 의미한다.

[0093] ND - 검출되지 않았음(Non Detected)

도면

도면1



도면2



도면3

predictet Brp-like protein Blh [uncultured marine bacterium 66A03]-PR blh
possible transmembrane protein [Dokdonia donghaensis MED134]- DD blh

```
DD_blh          MSRKFQLYNLIMVLSFFFLWISFQIPEAMEFALGYFLILTIGVGHGANDLKIYFNARKLN
PR_blh          ----------------------MGLMLIDVCALALVVFIGLPHGALDAAISFSMISSA
                                       :   :    ,  *:: **: *** +  + *,  ,

DD_blh          --LKKTLLFLGLYSLIVLAGTGLPFIVPEFILTLFIVISGYHFGQEHFEKVEIKTTWYYN
PR_blh          KRIARLAGILLIYLLLATAFFLIWYQLPAFSLLIFLLISIIHFGMADFNASPSKLKWPH-
                  : :   :* :+ *:, *   ::: :* + * :+::**  *** ,+:    * ,+ :

DD_blh          LFVSAYGLMIILTLLYIHAQESLLIINDLLGSNLEVEVLLYPLIASVVVLLDFLKFRQQ
PR_blh          --IIAHGGVVTVWLPLIQKNEVTKLFSILTNGPTPILWDILLIFFLDWSIGVDLHTY-ET
                  : *:* :: : *  *: :*   ::, * ,,   :   :  ::     : :*: ,: :

DD_blh          FQLKEVLKELFYLLLIFTVFSTSNLIWGFAIYFILWHS-VPSIYNQICYLEGTVNSNTIK
PR_blh          LRSKHYNIAFELIGLIFLAWYAPPLVT-FATYFCFIHSRRHFSFVVKQLQHMSSKKMMIG
                :: *,    :  : *** ,: :, *:  ** ** : **     :       , : :,  *

DD_blh          TYIKDSLLYWIAALFFLGVLYYFLSDYTSLFLSIIIAFLGGITFPHVVVMHQLNSK----
PR_blh          SAIILSCTSWLIGGGIYFFLNSKMIASEAALQTVFIG-LAALTVPHMILIDFIFRPHSSR
                : *  *   *: ,  :  ,*   :    : : :::*, *,,:*,**::::, :

DD_blh          -----
PR_blh          IKIKN
```

서 열 목 록

<110> Sogang University

<120> Donghaeana dokdonensis blh having enhanced in enzyme activity for the production of vitamin A

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 294

<212> PRT

<213> Donghaeana dokdonensis

<400> 1

Met Ser Arg Lys Phe Gln Leu Tyr Asn Leu Ile Met Val Leu Ser Phe
1 5 10 15

Phe Phe Leu Trp Ile Ser Phe Gln Ile Pro Glu Ala Met Glu Phe Ala
20 25 30

Leu Gly Tyr Phe Leu Ile Leu Thr Ile Gly Val Gly His Gly Ala Asn
35 40 45

Asp Leu Lys Ile Tyr Phe Asn Ala Arg Lys Leu Asn Leu Lys Lys Thr
50 55 60

Leu Leu Phe Leu Gly Leu Tyr Ser Leu Ile Val Leu Ala Gly Thr Gly
65 70 75 80

Leu Phe Phe Ile Val Pro Glu Phe Ile Leu Thr Leu Phe Ile Val Ile
85 90 95

Ser Gly Tyr His Phe Gly Gln Glu His Phe Glu Lys Tyr Glu Ile Lys

100 105 110

Thr Thr Trp Tyr Tyr Asn Leu Phe Val Ser Ala Tyr Gly Leu Met Ile
115 120 125

Ile Leu Thr Leu Leu Tyr Ile His Ala Gln Glu Ser Leu Leu Ile Ile
130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Ser Asn Leu Glu Val Glu Val Leu Leu Tyr Pro
145 150 155 160

Leu Ile Ala Ser Val Val Val Leu Leu Leu Cys Phe Leu Lys Phe Arg
165 170 175

Gln Gln Phe Gln Leu Lys Glu Val Leu Lys Glu Leu Phe Tyr Leu Leu

180 185 190

Leu Ile Phe Thr Val Phe Ser Thr Ser Asn Leu Ile Trp Gly Phe Ala
195 200 205

Ile Tyr Phe Ile Leu Trp His Ser Val Pro Ser Ile Tyr Asn Gln Ile
210 215 220

Cys Tyr Leu Glu Gly Thr Val Asn Ser Asn Thr Ile Lys Thr Tyr Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Tyr Tyr Phe Leu Ser Asp Tyr Thr Ser Leu Phe Leu Ser Ile Ile

260 265 270

Ile Ala Phe Leu Gly Gly Ile Thr Phe Pro His Val Val Val Met His

275 280 285

Gln Leu Asn Ser Lys ***

290

<210> 2

<211> 882

<212> DNA

<213> Donghaeana dokdonensis

<400> 2

atgtctagga aatttcagtt atataacctt attatggtac tgagtttttt ctttttatgg 60

atatcctttc aaatacctga agcaatggag tttgcattag gctatttttt aattcttacg 120

ataggtgtag gacatggcgc aaacgattta aagatttatt tcaatgctag aaaattaaac 180

ttaaagaaga ctttattatt tctagggctt tattctttaa tagttcttgc aggtactggt 240

ttatttttta tcgtcccaga atttatttta acgctgttta tagtgatcag tggttaccat 300

tttggacaag agcactttga aaaatatgaa attaaaacca cctggtatta caacttattt 360

gtaagtgctt acggcttaat gattatactt accttattat acattcatgc tcaagaaagt 420

ctacttatca taaatgatct actaggtagc aatctagaag tagaagtatt gctctatcca 480

ttgatagctt cggtggtggt attattgctg tgtttcttaa aattcaggca gcagtttcag 540

ttaaaagagg tgctgaaaga actgttttac ctactcctaa tatttacggt tttctcaacc 600

tcaaacctta tttggggttt tgctatatat tttattttat ggcacagtgt accttccatc 660

tacaatcaaa tttgctatct ggaaggaaca gtaaattcaa ataccataaa gacctatatt 720

aaggactcgc tactttattg gatagctgcc ctttttttc taggtgtgtt atactatttc 780

cttagcgact ataccagtct attcctcagt atcatcatcg ctttttagg cggtattact 840

tttcctcacg tagtagttat gcatcaatta aatagcaagt ag 882

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> foward primer

<400> 3

atgtctagga aatttcag 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

ctacttgcta tttaattg 18

<210> 5

<211> 302

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Thr Val Cys Ala Lys Lys His Val His Pro Thr Arg Ser Ala Ala

1 5 10 15

Glu Gln Leu Leu Ala Asp Ile Asp Arg Arg Leu Glu Gln Leu Leu Pro

20 25 30

Val Glu Gly Glu Arg Asp Phe Val Gly Ala Ala Met Arg Glu Gly Ala

35 40 45

Leu Ala Pro Gly Lys Arg Ile Arg Pro Met Leu Leu Leu Leu Thr Ala

50 55 60

Arg Asp Leu Gly Cys Ala Val Ser His Glu Gly Leu Leu Asp Ile Ala

65 70 75 80

Cys Ala Val Glu Met Val His Ala Ala Ser Leu Ile Leu Asp Asp Met

85 90 95

Pro Cys Met Asp Asp Ala Gln Ile Val Gly Gly Arg Pro Thr Val His

100 105 110

Cys Gln Tyr Gly Glu His Val Ala Ile Leu Ala Ala Val Ala Leu Leu

115 120 125

Ser Lys Ala Phe Gly Val Ile Ala Asp Ala Asp Gly Leu Thr Ala Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Leu Val Gln Gly Gln Phe Lys Asp Leu Ser Glu Gly Asp Lys Arg

165 170 175

Arg Ser Ala Glu Ala Ile Leu Met Thr Asn His Phe Lys Thr Ser Thr

180 185 190

Leu Phe Cys Ala Ser Met Gln Met Ala Ser Ile Val Ala Asn Ala Ser

195 200 205

Ser Glu Arg Arg Asp Tyr Leu His Arg Phe Ser Leu Asp Leu Gly Gln

210 215 220

Ala Phe Gln Leu Leu Asp Asp Leu Thr Asp Gly Met Ala Asp Thr Gly

225 230 235 240

Lys Asp Ile Asn Gln Asp Glu Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Leu Leu

245 250 255

Gly Ser Arg Ala Val Glu Glu Arg Leu Arg His Ser Leu His Leu Ala

260 265 270

Ser Glu His Leu Ser Ala Ala Cys Gln Asn Gly His Ser Thr Gln Gln

275 280 285

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

290 295 300

<210> 6

<211> 909

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgacggtct gcgcaaaaaa acacgttcac cccactcgca gtgctgctga gcaattactg 60

gctgatattg atcggcggct tgagcagtta ttgcctgtcg agggagaacg ggattttgta 120

ggtgccgcga tgcgtgaggg cgcgctggca ccgggtaaac gtattcgccc gatgctgttg 180

ttgctcacag cacgcgatct gggctgcgct gtcagccacg agggattgct ggatatcgcc 240

tgcgccgtgg aaatggtgca cgcggcatcg ttgattcttg atgatatgcc ctgtatggat 300

gatgcgcaga tcgtcggcgg ccgccctacc gttcactgtc agtacggcga gcatgtggca 360

atactggcgg cggtcgcctt actgagcaaa gcctttgggg tcattgctga tgcagatggc 420

ctgaccgcgc tggcaaaaaa ccgcgcagtg tcagaattat caaacgccat tggtatgcaa 480

ggtttggtac agggtcagtt taaggatctg tcagaaggcg ataagcgccg cagcgctgaa 540

gccattttga tgacgaacca ctttaaaacc agcaccctgt tttgcgcgtc tatgcagatg 600

gcctcaattg tggcgaatgc ctccagcgaa cgacgcgatt acctacaccg tttttcgctt 660

gatctcggcc aagcgtttca actgctggac gacttaacgg atggcatggc tgacacgggt 720

aaggacatca atcaggatga aggcaaatcg accctggtca atttattagg ctccagagca 780

gttgaagagc gtctgcggca cagtctgcat ctcgccagtg agcacctctc agccgcgtgt 840

caaaacggtc attctactca acaatttatc caggcctggt ttgacaaaaa actcgctgcc 900

gtcagttaa 909

<210> 7

<211> 296

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Met Ala Val Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp
1 5 10 15

Ala Lys Thr Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ser Trp Cys Arg His
20 25 30

Cys Asp Asp Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Thr Asp Gln
35 40 45

Pro Ser Leu Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys
50 55 60

Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala
65 70 75 80

Ala Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala

85 90 95

Phe Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Glu Tyr
100 105 110

Ile Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val
115 120 125

Val Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr
130 135 140
Leu Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile
145 150 155 160

Ala Arg Asp Ile Val Glu Asp Ala His Val Gly Arg Cys Tyr Leu Pro
165 170 175
Ala Ser Trp Leu Glu Asn Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala
180 185 190
Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln
195 200 205
Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Cys Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu
210 215 220
Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg

225 230 235 240
Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Thr Glu Ala Trp Asp His
245 250 255
Arg Gln Ser Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Ser Leu Leu Leu Met Ala
260 265 270
Ser Gly Gln Ala Ile Thr Ser Arg Met Arg Pro His Pro Pro Arg Pro
275 280 285
Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Ile
290 295

<210> 8

<211> 891
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 8

atggctgttg gctcgaaaag ttttgcgact gcctcaaagt tatttgacgc aaaaacccgg 60
cgcagtgtac ttatgctcta ctcctggtgc cgccattgtg acgacgtgat tgacgatcaa 120
accctgggtt ttcaaaccga tcagccgtca ttacaaacgc ctgagcaacg cctgatgcag 180
ttggagatga aaacgcgcca ggcctatgcc ggatcgcaga tgcacgaacc ggcgtttgct 240
gcgtttcagg aagtggcgat ggcccatgat attgcgcccg cttacgcgtt tgatcatctg 300

gaaggctttg ccatggatgt gcgtgaggcg gagtacattc agttggacga tacattacgg 360

tattgctatc acgttgcagg cgtggtcggc ttgatgatgg cgcagattat gggcgtacgc 420
gataacgcta cactggaccg cgcctgtgac cttgggctgg catttcagtt gaccaacatc 480
gcccgcgata ttgtggaaga tgcgcatgtg ggtcgttgtt atctgccggc gagttggctg 540
gaaaatgaag gactgaataa agaaaattat gcggcaccgg aaaaccgcca ggcgctgagc 600
cgcatcgccc gacgtctggt gcaggaagcc gaaccttact atttgtgcgc tacggcggga 660
ctggccgggc tgcccttgcg ctcagcctgg gccatcgcca cagcgaagca ggtttatcgt 720
aaaattgggg tgaaggttga acaggcagga acagaagcct gggaccatcg gcagtcaacc 780

acgacacccg aaaaattatc gcttctgttg atggcatccg gtcaggccat tacttcccgg 840
atgcggcctc atccgcctcg ccctgcccat ctctggcagc gcccgattta g 891

<210> 9
<211> 492
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9

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

Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser
115 120 125

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

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

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

                325                 330                 335
Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Asp Asp Phe Ser Leu Tyr Leu
            340                 345                 350
His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly
        355                 360                 365
Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu
    370                 375                 380
```

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Arg Leu Arg Asp Arg Ile Phe Glu Tyr
385 390 395 400

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Gln
405 410 415
Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr Gln
420 425 430
Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe
435 440 445
Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Asn Asn Leu Tyr Leu Val Gly
450 455 460
Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala

465 470 475 480
Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile
485 490

<210> 10
<211> 1479
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 10
atgaaaccaa ctacggtaat tggtgcaggc tttggtggcc tggcattagc aattcgtctg 60
caggcggcgg ggatccctgt cttactgctt gagcaacgcg acaaacccgg tggccgggct 120
tatgtctatg aagatcaggg attcactttt gatgcagggc ctaccgttat taccgatccc 180
agcgccattg aagaactctt taccctggcg ggaaaacagt taaaagatta cgttgaactg 240

ctgccggttg cgccgtttta tcgcctgtgt tgggagtcag gaaaggtttt caattacgat 300
aacgatcagg cacagcttga ggcgcagatt cagcagttta atccacgcga tgttgaaggc 360
tatcgtcagt ttctggacta ttcacgtgcg gtgtttaaag aaggctatct gaagcttggc 420
accgtgcctt tcttgtcgtt cagggatatg cttcgcgccg cgccccaact ggcgaaactg 480
caggcatggc gaaccgttta cagtaaagtt gccagctaca ttgaggatga acatcttcgt 540
caggcgtttt cttttcactc gctgttagtg ggcggcaatc ccttcgccac ctcctccatt 600
tatacgctaa tacatgcact cgaacgcgaa tggggcgtct ggtttccacg cggtggtacc 660

ggggcattag tgaaagggat gataaagctg tttcaggatc tgggtggcga agtggtactg 720

aatgcgaagg tcagccacat ggaaaccacg ggggatacca ttgaagccgt gcatttagag 780

gacggacgca gattcccgac ccgggctgtc gcttccaatg cggatgtggt tcacacctat 840

cgcgacctgt taagtcagca tcctgccgcc gtgaagcagt cgaaaaaact gcaaactaag 900

cgcatgagca actcattgtt tgttctctat tttggtctga atcaccatca cgatcagctt 960

gcccaccata cggtttgttt cggccctcgc taccgtgagc tgattcatga aattttcaat 1020

catgacggac tcgcagacga tttctcactt tacctgcacg caccttgtgt cacggattcg 1080

tcactggcac cggaaggttg cggcagttac tatgtgttag ctcccgtgcc acatttaggc 1140

acagcgaacc tcgactggac ggttgaaggg ccgcgactgc gcgatcgtat ttttgagtac 1200

cttgagcaac attacatgcc tggcttgcgt agccagttgg ttacgcagcg aatgtttacg 1260

ccgttcgatt ttcgcgacca gctcaatgcc tatcaaggct cagccttttc tgttgagccc 1320

gttctcacac agagcgcctg gttccgaccg cacaaccgcg ataaaaccat caataatctt 1380

tacctggtag gtgcaggcac ccatcccggc gcgggcattc ccggcgtgat cggctcggct 1440

aaggcaactg caggtttaat gctggaggac ctgatttga 1479

<210> 11

<211> 382

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Met Arg Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn
1 5 10 15

Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile
20 25 30

Leu Leu Ile Glu Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser
35 40 45

Phe His Asp Ala Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Val Ala Pro
50 55 60

Leu Val Val Tyr His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg
65 70 75 80

Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Ser Val Thr Ser Gln Arg Phe
85 90 95

Ala Glu Val Leu Gln Gln Lys Phe Gly Gln His Leu Trp Ile Ser Arg
100 105 110

Ala Val Ala Glu Val His Ala Asp Ala Val Arg Leu Asn Asn Gly Gln
115 120 125

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

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

Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu
275 280 285
Asp Val Phe Thr Ser Ser Ser Ile His Gln Ala Ile Thr His Phe Ala
290 295 300
His Glu Arg Trp Gln Gln Gln Arg Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met
305 310 315 320
Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg
325 330 335
Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ser Arg Phe Tyr Ala Gly Lys

340 345 350
Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val

355 360 365

Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr His Arg

370 375 380

<210> 12

<211> 1149

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

atgcgaccgc attatgatct gattttagtg ggcgccgggc tggctaatgg cctcattgcc 60

ctgcgccttc agcagcagca acctgacatg cgtattctgc ttatcgaagc ggcccccccag 120

gcgggcggta atcatacctg gtcctttcac gacgctgatt taaccgagag ccaacatcgc 180

tgggtagcac cgctggtggt atatcactgg cccgactatc aggtccgctt tcccacgcgg 240

cgtcgtaagc tgaacagcgg ctatttttct gtgacttcgc agcgttttgc cgaggtttta 300

caacagaagt ttggtcagca cttatggatt agccgcgcgg tggcagaggt tcacgccgac 360

gctgttcgac tgaataatgg tcaggtcatc agtgccagcg cggtgattga tgggcgaggt 420

tatacgccaa attcagcgct gaacgtggga ttccaggcgt ttatcggaca ggaatggcga 480

ctcagtaaac cgcacggttt atcttcaccc attattatgg atgccacggt cgatcagcaa 540

aatggttatc gctttgttta cagcctgccg ctatctgcga cagaactgtt aatcgaagat 600

acccactata tcgataacgc gacactggaa cctgaacgcg cgcgacaaaa tattcgcgat 660

tatgctgccc agcaggattg gcagcttcag actctgcttc gtgaggaaca gggcgcattg 720

ccaataacct taacgggcga tagcaccgcg ttttggcagc aacagccttt agcctgcagt 780

ggactgcgtg ccggactgtt tcaccccaca accggttatt cactcccct tgcggttgcg 840

ctggccgatc gcctgagtgc gcttgatgtc tttacatcgt cctcaattca tcaggcgatt 900

acccactttg cccacgagcg ctggcagcag caacgctttt tccgcatgtt gaatcgcatg 960

ctgtttttag cgggacccgc cgattcacgc tggcgtgtta tgcagcgctt ctatggttta 1020

cctgaagatt taatctcccg tttttatgcg ggcaaactca cgctgaccga tcggctacgt 1080

attctgagcg gcaagccgcc tgttccggta ttagcggcat tgcaggcaat tatgacgact 1140

catcgttaa 1149

<210> 13

<211> 249

<212> PRT

<213> proteo bacteria

<400> 13

Met Lys Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ser Val Ile Ala Leu Pro Thr Phe
1 5 10 15

Ala Ala Gly Gly Gly Asp Leu Asp Ala Ser Asp Tyr Thr Gly Val Ser
20 25 30

Phe Trp Leu Val Thr Ala Ala Leu Leu Ala Ser Thr Val Phe Phe Phe
35 40 45

Val Glu Arg Asp Arg Val Ser Ala Lys Trp Lys Thr Ser Leu Thr Val
50 55 60

Ser Gly Leu Val Thr Gly Ile Ala Phe Trp His Tyr Met Tyr Met Arg
65 70 75 80

Gly Val Trp Ile Glu Thr Gly Asp Ser Pro Thr Val Phe Arg Tyr Ile

85 90 95

Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu Leu Ile Cys Glu Phe Tyr Leu Ile
100 105 110

Leu Ala Ala Ala Thr Asn Val Ala Gly Ser Leu Phe Lys Lys Leu Leu
115 120 125

Val Gly Ser Leu Val Met Leu Val Phe Gly Tyr Met Gly Glu Ala Gly
130 135 140

Ile Met Ala Ala Trp Pro Ala Phe Ile Ile Gly Cys Leu Ala Trp Val
145 150 155 160

Tyr Met Ile Tyr Glu Leu Trp Ala Gly Glu Gly Lys Ser Ala Cys Asn

165 170 175

Thr Ala Ser Pro Ala Val Gln Ser Ala Tyr Asn Thr Met Met Tyr Ile
180 185 190

Ile Ile Phe Gly Trp Ala Ile Tyr Pro Val Gly Tyr Phe Thr Gly Tyr
195 200 205

Leu Met Gly Asp Gly Gly Ser Ala Leu Asn Leu Asn Leu Ile Tyr Asn
210 215 220

Leu Ala Asp Phe Val Asn Lys Ile Leu Phe Gly Leu Ile Ile Trp Asn

225 230 235 240

Val Ala Val Lys Glu Ser Ser Asn Ala

245

<210> 14

<211> 750

<212> DNA

<213> Proteo bacteria

<400> 14

atgaaattat tactgatatt aggtagtgtt attgcacttc ctacatttgc tgcaggtggt 60

ggtgaccttg atgctagtga ttacactggt gtttcttttt ggttagttac tgctgcttta 120

ttagcatcta ctgtattttt ctttgttgaa agagatagag tttctgcaaa atggaaaaca 180

tcattaactg tatctggtct tgttactggt attgctttct ggcattacat gtacatgaga 240

ggggtatgga ttgaaactgg tgattcgcca actgtattta gatacattga ttggttacta 300

acagttcctc tattaatatg tgaattctac ttaattcttg ctgctgcaac taatgttgct 360

ggatcattat ttaagaaatt actagttggt tctcttgtta tgcttgtgtt tggttacatg 420

ggtgaagcag gaatcatggc tgcatggcct gcattcatta ttgggtgttt agcttgggta 480

tacatgattt atgaattatg ggctggagaa ggaaaatctg catgtaatac tgcaagtcct 540

gctgtgcaat cagcttacaa cacaatgatg tatattatca tctttggttg ggcgatttat 600

cctgtaggtt atttcacagg ttacctgatg ggtgacggtg gatcagctct taacttaaac 660

cttatctata accttgctga ctttgttaac aagattctat ttggtttaat tatatggaat 720

gttgctgtta aagaatcttc taatgcttaa 750