



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 15/81 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년01월18일 10-0671593 2007년01월12일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-1999-0014369 1999년04월22일 2004년04월22일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-1999-0083401 1999년11월25일
----------------------------------	---	------------------------	--------------------------------

(30) 우선권주장 98107380.2 1998년04월23일 유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자 디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.
네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1

(72) 발명자 바브야크리우보브야
우크라이나290056르비브브리자나스트르6

바허아델베르트
독일데-85748가르칭괴니히스베르거스트라세74

보레츠키유리알
우크라이나290035르비브플랫29리포바알레야스트르5에이

템킨신바실브이
우크라이나290040르비브플랫24파토나스트르23

에베르하르트자비네
독일데-85737이스마닝폴루르스트라세2

페도로비치다리아
우크라이나290000르비브플랫11말란유카스큐8

뤼트겐홀거
독일데-85748가르칭쉴라이스하이머스트라세13

리히터게랄트
독일데-85080가이머샤임암켈러부크5아

반룬아돌푸스
스위스체하-4310라인펠덴발트슈터스트라세17

(74) 대리인 김창세

심사관 : 신원혜

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 효모에서의 리보플라빈의 대량 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 재조합 DNA 기술을 사용하여 인간을 비롯한 동물에게 필수 영양소인 리보플라빈을 대량 생산하는 재조합 균주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 재조합 DNA 서열에 의해서 형질전환된 효모 균주를 제공하는 것으로, 적합한 숙주 세포에서 발현될 때 리보플라빈 생합성 활성을 갖는 1종 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 효모, 바람직하게는 철분 결핍 조건하에 리보플라빈을 대량 생산하는 플라빈 생산성 효모, 더 바람직하게는 캔디다(*Candida*)(예를 들어, 캔디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*) 또는 캔디다 파마타(*Candida famata*))로부터 유래하는 효모 균주를 제공하는 것이다. 또한 본 발명은 전술한 효모 균주를 적합한 배양 조건하에 배양하고, 생산된 리보플라빈을 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법으로 배지나 효모 균주로부터 분리하는 것을 특징으로 하는 리보플라빈의 생산 방법, 및 이렇게 수득된 리보플라빈을 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법으로 1종 이상의 식품 성분이나 사료 성분과 혼합하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물 또는 사료 조성물의 생산 방법을 제공한다.

대표도

도 6

특허청구의 범위

청구항 1.

GTP 사이클로하이드롤레이스 II 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는, 서열번호: 3으로 표시되는 DNA 서열 및 서열번호: 3에서 핵산 잔기 557번 내지 1552번의 DNA 서열로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 형질전환된 효모 균주로서, 상기 DNA 서열이 효모 균주에서 작용성인 프로모터에 전사적으로 연결되고, 상기 형질전환된 효모 균주가 야생형 캔디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*) L2 균주(ATCC 9058)보다 1.2배 이상 증가된 리보플라빈을 생산하는, 형질전환된 효모 균주.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

슈와니오마이세스(*Schwanniomyces*), 토룰롭시스(*Torulopsis*) 및 캔디다(*Candida*)로 구성된 군으로부터 선택되는 형질전환된 효모 균주.

청구항 4.

제 3 항에 있어서,

캔디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*) 또는 캔디다 파마타(*Candida famata*)인 형질전환된 효모 균주.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

제 1 항에 있어서,

프로모터가 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 해독 신장 인자(TEF) 프로모터인, 형질전환된 효모 균주.

청구항 8.

제 1 항, 제 3 항, 제 4 항 및 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 형질전환된 효모 균주를 적합한 배양 조건하에서 배양하고, 생산된 리보플라빈을 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법으로 배지 또는 효모 균주로부터 단리함을 특징으로 하는 리보플라빈의 생산 방법.

청구항 9.

제 1 항, 제 3 항, 제 4 항 및 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 형질전환된 효모 균주를 적합한 배양 조건하에서 배양하고, 생산된 리보플라빈을 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법으로 배지 또는 효모 균주로부터 단리하고, 단리된 리보플라빈을 1종 이상의 적합한 식품 성분 또는 사료 성분과 혼합함을 특징으로 하는 식품 조성물 또는 사료 조성물의 생산 방법.

청구항 10.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

리보플라빈의 유도체(플라보코호소인 FMN 및 FAD)는 보편적으로 모든 유기 세포체의 산화-환원 반응에 필요하다. 모든 식물 및 다수의 미생물이 리보플라빈(비타민 B₂)을 합성한다(데마인(Demain A. L.)의 문헌["Riboflavin oversynthesis", *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 369, 1972] 참조). 척추동물은 이 리보플라빈을 합성하지 못한다. 따라서 리보플라빈은 인간을 비롯한 동물에게 필수 영양소이다.

리보플라빈은 화학적 합성법 및 다양한 발효법으로 제조할 수 있는데, 발효법에는 바실러스(*Bacillus*) 균주(예를 들어, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 자낭균에 속하는 애쉬비아 고시피(*Ashbya gossypii*) 및 에레모테슘 애쉬비(*Eremothecium ashbyi*)(데마인의 문헌["Riboflavin oversynthesis", *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 369, 1972] 및 미쓰다(Mitsuda H.)와 나카지마(Nakajima K.)의 문헌["Effects of 8-azaguanine on riboflavin production and on the nucleotide pools in non-growing cells of *Eremothecium ashbyii*", *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*(Tokyo), **19**(3), 215-227, 1973] 참조), 다양한 효모 균주(예를 들어, 캔디다 구일리에르몽디와 캔디다 파마타(*Candida famata*))(탄너(Tanner, F. W.), 보이노비치(Vojnovich, Jr. C.) 및 반 라넨(Van Lanen, J. M.)의 문헌["Riboflavin production by *Candida* species", *Nature*, **101**(2616), 180-181, 1945] 참조)와 관련 균주, 및 그밖의 미생물이 사용된다.

효모의 리보플라빈 생합성 경로를 도 1에 도시하였다. 리보플라빈을 생합성하는데 사용되는 전구체는 구아노신 트리포스페이트(GTP) 및 리블로스 5-포스페이트이다. 1몰의 리보플라빈을 생합성하여 생산하는데는 1몰의 GTP와 2몰의 리블로스 5-포스페이트가 필요하다.

효모인 사카로마이세스 세레비지에에서, 리보플라빈을 생합성하기 위해서는 6종 이상의 유전자, 구체적으로 *RIB1* 유전자, *RIB2* 유전자, *RIB3* 유전자, *RIB4* 유전자, *RIB5* 유전자 및 *RIB7* 유전자가 필요하다(올트만스(Oltmanns O.), 바허(Bacher A.), 린젠스(Lingens F.) 및 짐머만(Zimmermann F. K.)의 문헌["Biochemical and genetic classification of riboflavin deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol. Gen. Genet.*, **105**, 306, 1969] 참조). 또한 캔디다 구일리에르몽디에서, 리보플라빈을 생합성할 때도 6종 이상의 유전자 산물, 구체적으로 *RIB1* 유전자, *RIB2* 유전자, *RIB3* 유전자, *RIB4* 유전자, *RIB5* 유전자 및 *RIB6* 유전자의 산물이 필요하다고 공지되어 있다(하기 참고 문헌의 2번 참조). 캔디다 구일리에르몽디의 이들 유전자에 의해서 생성된 효소 및 리보플라빈 생합성 경로에서 이들 효소의 작용을 도 1에 요약하였다. 리보플라빈 생합성 유전자는 바실러스 서브틸리스에서와는 달리, 사카로마이세스 세레비지에 및 캔디다 구일리에르몽디와 같은 진핵세포에서는 클러스터(cluster)를 형성하지 않는다.

생합성 경로에서 개시 단계는 GTP 사이클로하이드롤레이스(cyclohydrolase) II 효소에 의해 촉매되어 GTP의 이미다졸 환이 개환되는 것이다. 이 효소에 의한 생성물은 2,5-디아미노-6-리보실아미노-4(3H)-피리미딘은 5'-포스페이트로 보고되어 있다. 이 중간체는 촉매 환원, 환 탈아민화 및 탈인산화의 일련의 반응을 거쳐 5-아미노-6-리비틸아미노-2,4(1H,3H)-피리미딘디온으로 전환된다. 5-아미노-6-리비틸아미노 5'-포스페이트의 탈인산화에 관련된 가설상의 효소는 아직 알려져 있지 않다. 리블로스 5-포스페이트로부터 3,4-디하이드록시-2-부타논-4-포스페이트 합성효소의 촉매 작용에 의해 수득되는 3,4-디하이드록시-2-부타논 4-포스페이트를 제 2 기질로 하여, 5-아미노-6-리비틸아미노-2,4(1H,3H)-피리미딘디온은 6,7-디메틸-8-리비틸루마진 합성효소에 의해 6,7-디메틸-8-리비틸루마진으로 전환된다. 최종적으로, 6,7-디메틸-8-리비틸루마진은 리보플라빈 합성효소가 촉진하는 디스뮤티이션(dismutation) 반응에 의해 리보플라빈으로 전환된다. 리보플라빈 생합성 경로의 개시 효소인 GTP 사이클로하이드롤레이스 II의 합성을 담당하는 *RIB1* 유전자의 서열이 효모인 캔디다 구일리에르몽디에서 밝혀져 있다(하기 참고 문헌의 4번 참조).

재조합 바실러스 서브틸리스 균주에서 발효법으로 리보플라빈을 생산하는 방법이, 예를 들어 유럽 특허 제 405 370 호에 기술되어 있다. 이 균주는 강력한 프로모터의 조절하에 리보플라빈 생산과 관련된 동족 효소를 대량으로 생산하는 리보플라빈 오페론을 가지고 있다. 강력한 프로모터의 조절하에 리보플라빈 오페론의 유전자 구조물은 하나 또는 몇 군데의 상이한 위치에서 바실러스 서브틸리스의 염색체 상에 존재할 수 있다. 또한 리보플라빈 생합성 경로에 포함되는 추가 유전자를 강력한 프로모터의 조절하에 바실러스 서브틸리스의 염색체 상의 분리된 좌위에 삽입시켜 발효에 의해 수득되는 리보플라빈의 수율을 증가시키는 내용이 유럽 특허 제 821 063 호에 기술되어 있다.

캔디다 구일리에르몽디와 같은 효모 균주로부터 리보플라빈을 생산하는 것은 보고되어 있지만, 재조합 DNA 기술을 사용하여 캔디다 구일리에르몽디 또는 관련된 플라빈 생산성 효모에서 리보플라빈 생합성 유전자를 대량 발현시키는 경우는 지금까지 보고된 바 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 리보플라빈을 대량 생산하는 효모 균주를 제조할 수 있게 하는 재조합 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

보다 구체적으로, 본 발명의 목적은 재조합 DNA 서열에 의해서 형질전환된 효모 균주를 제공하는 것으로, 이 재조합 DNA 서열은 적합한 숙주 세포에서 발현될 때 리보플라빈 생합성 활성을 갖는 1종 이상의 폴리펩타이드를 암호화하고, 효모 균주, 더 구체적으로는 다음과 같은 균에서 선택되는 효모 균주와 같이 철분 결핍 조건하에 리보플라빈을 대량 생산하는 플라빈 생산성 효모 균에 속하는 효모 균주에서 작용성인 프로모터에 전사적으로 연결되는 DNA 서열을 포함한다: 슈와니오마이세스(*Schwanniomyces*), 바람직하게는 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 드바리오마이세스(*Debaryomyces*), 바람직하게는 드바리오마이세스 클로에케리(*Debaryomyces kloeckeri*); 토룰롭시스(*Torulopsis*), 바람직하게는 토룰롭시스 캔디다(*Torulopsis candida*); 또는 특히 캔디다, 바람직하게는 캔디다 구일리에르몽디 또는 캔디다 파마타(로그비넨코(Logvinenko E. M.) 등의 문헌[*Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, **61**(1), 28-32, 1989], 로그비넨코 등의 문헌[*Mikrobiologiya*, **57**(2), 181-186, 1988] 및 나카세(Nakase)와 스즈키(Suzuki)의 문

현[*Journal of General and Appl. Mikrobiologie*, **31**(1), 49-70, 1985] 참조). 추가로, 본 발명의 목적은 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 효모, 바람직하게는 철분 결핍 조건하에 리보플라빈을 대량 생산하는 플라빈 생산성 효모, 더 바람직하게는 캔디다(예를 들어, 캔디다 구일리에르몽디 또는 캔디다 파마타)로부터 유래하는 효모 균주를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 GTP 사이클로화이드를 레이스 II 활성을 갖는 단백질을 암호화하고, 하기 (a) 내지 (c)의 DNA 서열로부터 선택되는 효모 균주를 제공하는 것이다:

- (a) 도 4에 도시된 바와 같은 DNA 서열 또는 그의 상보적 스트랜드(strand);
- (b) 표준 조건하에서 (a)에 정의된 DNA 서열의 단백질 암호화 영역에 혼성화되는 DNA 서열 또는 그의 단편; 및
- (c) 유전자 암호의 변성이 없는, (a) 및 (b)에 정의된 DNA 서열에 혼성화되는 DNA 서열.

추가로, 본 발명의 목적은 프로모터가 TEF 사카로마이세스 세레비지에 프로모터인 상기와 같은 효모 균주를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 전술한 바와 같은 효모 균주를 적합한 배양 조건하에서 배양하고, 생산된 리보플라빈을 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법으로 배지나 효모 균주로부터 분리하는 것을 특징으로 하는 리보플라빈의 생산 방법, 및 이와 같은 방법으로 수득된 리보플라빈을 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법으로 1종 이상의 적합한 식품 성분이나 사료 성분과 혼합하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물 또는 사료 조성물의 생산 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 실시예에 사용된 모든 캔디다 구일리에르몽디 균주는 수탁 번호 ATCC 9058로서 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, ATCC)으로부터 입수된 캔디다 구일리에르몽디의 유도체이다(하기 참고 문헌의 1번 참조). 캔디다 구일리에르몽디(ATCC 9058)는 1998년 4월 1일자로 부다페스트 조약에 의거하여 재기탁되어, 수탁 번호 ATCC 74437을 부여받았다. 캔디다 구일리에르몽디는 철분 결핍 조건하에 리보플라빈(비타민 B₂)을 대량 생산하는 대표적인 효모 종이다. 철분 결핍 조건하에 리보플라빈을 대량 생산하는 효모 균은 또한 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(또는 드바리오마이세스 옥시덴탈리스로도 지칭됨), 드바리오마이세스 클로에케리, 토룰롭시스 캔디다 및 캔디다 파마타를 포함한다. 캔디다 파마타는 리보플라빈의 산업적 생산에 사용되는 종이다. 효모 종의 분류학상 위치에 대해, 당해 분야의 숙련가라면 이들 분류학상 위치가 상이한 저자들에 따라 다양하게 부여됨을 인식할 것이다. 예를 들면, 캔디다 파마타, 드바리오마이세스 한세니(*Debaryomyces hansenii*) 및 토룰라스포라 한세니(*Torulasporea hansenii*)가 동의어로 사용되고, 캔디다 구일리에르몽디, 피키아 구일리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) 및 야마다제마 구일리에르몽디(*Yamadazyma guilliermondii*)가 동의어로 사용된다. 당해 분야의 숙련가는 본 발명의 실시예에서 숙주 세포로 DNA 서열 분리를 위한 균주원으로 사용될 수 있는 미생물이 ATCC, 센트라알뷰로 부르 쉬멜컬처스(Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS) 또는 도이체 랍퐁 뤼어 미크로오르가니즘 언트 쉐콜투렌 게엠베하(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSM)와 같은 기탁 기관이나 문헌[*Industrial Property*, **1**, 29-40, 1991]에 기재된 바와 같은 임의의 기타 기탁 기관으로부터 입수할 수 있음을 인식할 것이다.

본 발명의 실시예에 유용하고, 리보플라빈 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해서 또는 잘 알려진 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술을 사용하여 리보플라빈을 생산하는 것으로 알려진 임의의 미생물(상기 참조)로부터 게놈 DNA 서열이나 c-DNA 서열과 같은 형태로 수득될 수 있다. PCR 방법의 원리는 화이트(White) 등의 문헌[*Trends in Genetics*, **5**, 185-189, 1989] 등에 개략적으로 설명되어 있지만, 더 개선된 방법이 인니스(Innis) 등의 문헌[PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., 1990] 등에 기술되어 있다.

PCR-프라이머(primer)를 설계하는데 필요한 서열 정보는 임의의 서열 데이터베이스, 예를 들어 진뱅크(Genbank)(미국 캘리포니아주 소재의 인텔리제네틱스(Intelligenetics)), 유러피언 바이오인포매틱스 인스티튜트(European Bioinformatics Institute)(영국 캠브리지 소재의 힌스턴 홀(Hinston Hall)), 엔비알에프(NBRF)(미국 워싱턴 DC 소재의 조지타운 유니버시티내 메디칼 센터(Georgetown University, Medical Centre)) 및 베베이스(Vecbase)(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 유니버시티 오브 위스콘신내 바이오테크놀로지 센터(University of Wisconsin, Biotechnology Centre))로부터 입수할 수 있다.

이러한 DNA 서열이 입수되면, 이 서열을 임의의 바람직한 숙주에서 발현시킬 수 있고, 암호화된 폴리펩타이드의 리보플라빈 생합성 활성을 당해 분야의 숙련가에게 공지된 분석법, 예를 들어 바허, 리히터(Richter, G.), 리츠(Ritz, H.), 에베르

하르트(Eberhardt, S.), 피셔(Fisher, M.) 및 크리거(Krieger, C.)의 문헌["Biosynthesis of riboflavin: GTP cyclohydrolase II, deaminase, and reductase", *Methods in enzymology*, **280**, 382-389, 1997], 키스(Kis, K.), 볼크(Volk, R.) 및 바허의 문헌["Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase", *Biochemistry*, **34**, 2883-2892, 1995], 로그비넨코, 샤블로브스키(Shavlovsky G. M.), 자칼스키(Zakalsky A. E.) 및 콘토로브스카야 니우(Kontorovskaia Niu)의 문헌["Properties of 2,5-diamino-4-oxy-6-ribosylaminopyrimidine-5'-phosphate reductase, a enzyme of the second stage of flavinogenesis in *Pichia guilliermondii* yeast", *Ukr. Biokhim. Zh.*, **61**(4), 47-54, 1989년 7월], 리히터, 피셔, 크리거, 에베르하르트, 뤼트겐(Luttgen, H.), 게르스텐쉴레거(Gerstenschlager, I.) 및 바허의 문헌["Biosynthesis of riboflavin. Characterization of the bifunctional deaminase/reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol.*, **179**, 2022-2028, 1997] 및 리체르트(Ritsert, K.), 터크(Turk, D.), 후버(Huber, R.), 라덴스타인(Ladenstein, R.), 슈미트-베제(Schmidt-Base) 및 바허의 문헌["Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of reconstituted icosahedral β subunit capsied at 2.4 Å resolution", *J. Mol. Biol.*, **253**, 151-167, 1995]에 기술된 임의의 분석법에 의해 측정할 수 있다.

본 발명의 실시예에 사용된 DNA 서열은 리보플라빈 생합성 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 DNA 서열을 포함한다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는 또한 이러한 DNA 서열이 리보플라빈 생합성 경로중의 하나 이상의 효소, 예를 들어 모든 효소를 암호화할 수 있고, 다른 중 기원의 DNA 서열이 하나 이상의 상기 효소를 암호화할 수 있거나, 또는 이들 효소가 하나 이상의 바람직한 리보플라빈 생합성 활성을 나타낸다면 효소의 일부 또는 전체가 합성 기원일 수 있음을 이해할 것이다. 전술한 DNA 서열의 한 예로서 GTP 사이클로하이드롤레이스 II를 암호화하는 DNA 서열을 도 4에 도시하였다. 그러나, 표준 조건 하에서 이 DNA 서열에 혼성화하고 전술한 GTP 하이드롤레이스를 암호화하는 DNA 서열도 또한 본 발명의 실시예에 유용하다.

이와 관련하여 혼성화의 "표준 조건"이란 일반적으로 특정 혼성화 신호를 검출하기 위해 당해 분야의 숙련가가 사용하는 조건(예를 들어, 샘브루크(Sambrook) 등의 문헌[Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989]에 기술된 조건)이거나, 또는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 바람직하게는 소위 엄격한 혼성화와 엄격하지 않은 세척 조건 또는 더 바람직하게는 소위 엄격한 혼성화와 엄격한 세척 조건(예를 들어, 샘브루크 등의 상기 문헌에 기술됨)이다. 이와 관련하여 "DNA 서열 단편"이란 구체적으로 전술한 바와 같은 효소 활성을 여전히 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 단편을 의미한다.

본 발명의 DNA 서열이 암호화하는 단백질을 대량 생산하기 위해, 이들 서열을 바람직한 효모에서 작용하는 프로모터, 예를 들면 사카로마이세스 세레비지에 TEF-프로모터(실시예 2 참조), pho5-프로모터(보겔(Vogel) 등의 문헌[Mol. Cell. Biol., 2050-2057, 1989] 및 루돌프(Rudolf)와 힌넨(Hinnen)의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci., **84**, 1340-1344, 1987] 참조), 갭(gap)-프로모터, aox1-프로모터(쿠츠(Koutz) 등의 문헌[Yeast, **5**, 167-177, 1989] 및 스킨크리쉬나(Sreekrishna) 등의 문헌[J. Basic. Microbiol., **28**, 265-278, 1988] 참조), FMD-프로모터(홀렌베르크(Hollenberg) 등에게 허여된 유럽 특허 제 299 108 호 참조), 또는 MOS-프로모터(레데보어(Ledeboer) 등의 문헌[Nucleic Acid Res., **13**, 3063-3082, 1985] 참조)에 연결시킬 수 있다.

본 발명의 실시예에 유용한 DNA 서열은 또한, 예를 들어 실시예 1에 기술된 바와 같은 소위 "ARS" 요소(자가 복제 서열)를 포함할 수도 있다.

실시예

하기 참고 문헌에 의해 구체적으로 지시되거나 지칭되지 않는 한, 예를 들어 샘브루크 등의 문헌[Molecular Cloning, 상기 와 동일] 및 크레그(Cregg, J. M.), 바리너(Barriner, K. J.), 헤슬러(Hessler, A. Y.) 및 마덴(Madden, K. R.)의 문헌["*Pichia pastoris* as a host system for transformations", *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3376-3385, 1985]에 기술된 바와 같은 표준 절차를 사용하였다.

실시예 1

캔디다 구일리에르몽디에서 플라스미드 p19R1의 자가 복제

캔디다 구일리에르몽디의 *RIB1* 유전자를 포함하는 플라스미드 pFR1이 문헌에 기술되어 있다(하기 참고 문헌의 3번 참조). *RIB1* 유전자를 서브클로닝(subcloning)하기 위해, 플라스미드 pFR1을 제한 뉴클레아이스 *SaI*로 분해하였다. 생성

된 단편을 pUC19 벡터의 *SaI* 부위에 클로닝시켰다. 연결시킨 혼합물로 리보플라빈 요구성을 나타내는 돌연변이된 *ribA* 유전자를 포함한 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*, 이후 이 콜라이) 변이주 BSV 821을 형질전환시켰다. 리보플라빈의 부재하에 생육하는 콜로니(colony)를 단리하여 플라스미드 p19R1을 포함하는 것을 확인하였다.

플라스미드 p19R1의 서열을 분석하여 pUC19 벡터의 *SaI* 부위에서 캔디다 구일리에르몽디 DNA의 2.18kb 단편을 포함하는 것을 확인하였다. 이 삽입 유전자의 서열을 도 2에 도시하였다.

도 2에 도시된 DNA 서열은 캔디다 구일리에르몽디의 *RIB1* 유전자를 포함한다. 플라스미드 p19R1은 *RIB1* 유전자가 결손된 캔디다 구일리에르몽디 변이주를 리보플라빈 원영양주로 형질전환시키고, 이 효모 중 내에서 자가 복제할 수 있다. 자가 복제는 도 2에서 약 1450 내지 1659의 염기쌍으로 구성되고 구조 유전자 *RIB1*까지 연장된 자가 복제 서열(ARS)이 존재하기 때문에 일어나는 것으로 밝혀졌다.

실시예 2

캔디다 구일리에르몽디의 *RIB1* 유전자를 대량 발현시키기 위한 플라스미드의 구성

사카로마이세스 세레비지에 효모의 *TEF* 유전자는 해독 신장 인자 1- α 를 나타낸다. 이 유전자는 사카로마이세스 세레비지에서 고효율로 전사되는 것으로 알려져 있다.

사카로마이세스 세레비지에 *TEF* 프로모터 및 캔디다 구일리에르몽디 *RIB1* 유전자의 5' 부분을 포함하는 DNA 단편을 PCR 증폭에 의해 획득하였다. 우선, 사카로마이세스 세레비지에 *TEF* 유전자의 5' 말단으로부터 업스트림(upstream)에 위치한 DNA 서열을 사카로마이세스 세레비지에의 염색체 DNA를 주형으로 사용하여 프라이머 ShBle_V 및 프라이머 TEF1_H와 함께 PCR 증폭시켰다. 증폭된 DNA 단편(이후, *TEF* 프로모터로 표기함)은 EMBL 수탁 번호 gb/U51033/YSCP9513으로 개시된 서열의 15984 내지 16344 bp를 포함한다.

이와는 별도로, 캔디다 구일리에르몽디 GTP 사이클로하이드롤레이스 II 구조 유전자의 5'-말단 부분을 포함하는 DNA 단편을 p19R1 플라스미드를 주형으로 사용하고 프라이머 PGgtpCY_V 및 프라이머 PGgtpCY_nco와 함께 PCR을 행하여 획득하였다. 증폭된 DNA 단편(이후, 5'GTPcII로 표기함)은 도 2에 도시된 서열의 460 내지 1145 bp를 포함한다.

전술한 2가지 PCR 반응에서 획득된, 사카로마이세스 세레비지에의 *TEF* 유전자 부분을 포함하는 DNA 증폭물과 5'GTPcII 부분을 포함하는 DNA 증폭물을 혼합하고, 프라이머 ShBle_V 및 프라이머 PGgtpCY_nco를 사용하여 3 번째 PCR 증폭을 수행하였다. 이 반응에서 완전한 *TEF* 프로모터와 캔디다 구일리에르몽디 *RIB1* 유전자의 5' 부분을 포함하는 DNA 단편을 획득하였다.

이들 PCR에 사용된 모든 프라이머를 하기 표 2에 도시하였다. 최종 증폭물의 서열을 도 3에 도시하였다.

이 증폭물은 프라이머 ShBle_V를 통해 도입된 제한 뉴클레아이스 *SphI*의 분해 부위를 포함한다. 또한 증폭물은 *RIB1* 유전자의 특징인 *MscI* 부위를 포함한다. 증폭물을 *SphI* 및 *MscI*로 분해하였다.

플라스미드 p19R1(구조는 전술한 바와 같다)을 또한 동일한 효소로 분해하고, 전술한 PCR 증폭물을 분해된 플라스미드에 연결시켰다.

GTP 사이클로하이드롤레이스 II를 나타내는 *ribA* 유전자가 돌연변이된 이 콜라이 변이주, Rib7을 연결 혼합체로 형질전환시켰다. 형질전환은 인비트로진(InvitroGene)의 프로토콜(protocol)을 따라 일렉트로포레이션 (electroporation)에 의해 수행하였다(하기 참고 문헌의 5번 참조).

이 콜라이 세포를 리보플라빈을 함유하지 않은, 암피실린(100mg/ml)이 보충된 루리아-브로쓰(Luria-Broth) 평판 배지에서 평판 배양하였다. 이 배지에서 생육하는 콜로니를 분리하여, pTC2로 표기되는 플라스미드를 포함함을 확인하였다.

플라스미드 pTC2에서의 삽입 유전자의 서열을 도 3에 도시하였다.

플라스미드 pTC2를 *XhoI* 및 *SaI* 제한 엔도뉴클레아이스로 분해하여 4.4kb와 0.5kb의 단편을 획득하였다. 4.4kb 단편을 T4 DNA 연결 효소로 환상화하였다. 연결 혼합체로 RibA 돌연변이를 포함하는 이 콜라이의 Rib7 변이주를 형질전환시켰다. 형질전환은 일렉트로포레이션에 의해 행하였다. 형질전환된 세포를 암피실린을 함유하고 리보플라빈은 함유하지 않는

루리아-브로쓰 평판 배지에서 평판 배양하였다(상기 참조). 이들 평판 배지에서 생육하는 콜로니를 분리하여, 플라스미드 pTCdXS2를 포함함을 확인하였다. 이러한 절차에 의해 플라스미드 pTC2로부터 0.5kb 염기쌍이 제거되는 결과를 얻었다.

플라스미드 pTCdXS2에서의 삽입 유전자의 서열을 도 4에 도시하였다. 캔디다 구일리에르몬디의 *RIB1* 유전자의 개방 판독틀이 지시되어 있다. 사카로마이세스 세레비지에 *TEF* 프로모터 유전자를 나타내는 DNA 서열도 또한 도시되어 있다.

실시예 3

제조함 캔디다 구일리에르몬디 균주의 제조

ATCC 9058 캔디다 구일리에르몬디 균주로부터 미리 수득한 L2 균주(하기 참고 문헌의 2번 참조)를 화학적으로 돌연변이시켜 GTP 사이클로하이드롤레이스 II를 나타내는 *RIB1* 유전자가 현저하게 결손된 리보플라빈 결핍 변이주 rh-21(하기 참고 문헌의 2번 참조)을 수득하였다.

플라스미드 pTCdXS2로 캔디다 구일리에르몬디 *RIB1* 변이주 rh-21을 LiCl 방법에 따라 형질전환시켰다(하기 참고 문헌의 6번 참조). 세포를 리보플라빈을 첨가하지 않은 YPD 배지에서 평판 배양하였다. 리보플라빈의 부재하에 생육하는 콜로니를 분리하였다. 후술한 바와 같이 이들의 GTP 사이클로하이드롤레이스 II 활성과 리보플라빈 생산을 관찰하였다.

원영양주에 플라스미드로 도입된 DNA 서열이 존재하는지를 PCR 분석에 의해 관측하였다. 프라이머 ShBle_V 및 프라이머 PGgtpCY_nco를 사용하고 주형으로서는 가열한 제조함 캔디다 구일리에르몬디 균주 세포를 사용하여 PCR을 행하였다. 프라이머 ShBle_V는 *TEF* 프로모터와 상보적이고, 프라이머 PGgtpCY_nco는 *RIB1* 구조 유전자와 상보적이다. 단리된 모든 형질전환체에서 예상한 길이(1175 염기쌍)의 증폭물이 수득되었다. XS-3 균주에서 수득한 증폭물을 단리하고 형광 디데옥시 종결법(fluorescent dideoxy terminator method)으로 서열을 분석하였다. 분석한 서열을 도 5에 도시하였다. 이 서열은 플라스미드 pTCdXS2의 삽입 유전자의 1 내지 1168 염기쌍과 일치하였다.

제조함 형질전환체는 유전적으로 안정하였다. 구체적으로, 이 형질전환체는 리보플라빈 결핍 서브클론을 분리하지 않았다.

실시예 4

제조함 캔디다 구일리에르몬디 균주의 GTP 사이클로하이드롤레이스 활성 측정

전술한 제조함 균주의 GTP 사이클로하이드롤레이스 II 활성 수준을 다음과 같이 측정하였다.

제조함 캔디다 구일리에르몬디 세포를 아스파라긴을 제외한 미량 원소가 보충된 부르크홀더(Burkholder) 합성 배지(문헌 [Science, 101, 180, 1945] 참조)에서 30°C에서 2 내지 3일간 호기 배양하였다. 이 실험에서 캔디다 구일리에르몬디 L2 균주(야생형)를 대조군으로 사용하였다.

대수기의 세포를 원심분리(5000g, 15분)하여 회수하고, 1mM DTT와 1mM MgCl₂가 함유된 20mM Tris HCl 완충액(pH 8.2)으로 2회 세척하였다. 그다음 세포를 -20°C에 저장하였다. 냉동된 세포괴(1 내지 3g)를 3 내지 9ml의 세척용 완충액에서 해동시켰다. 세포를 유리 비드(bead)(직경 0.8mm)와 함께 교반하여 파괴시켰다. 원심분리 후에, 세포 추출물을 100 용적의 세척용 완충액 내에서 하룻밤 동안 투석시켰다. 단백질 농도를 로우리(Lowry) 방법으로 측정하였다.

GTP 사이클로하이드롤레이스 분석용 반응 혼합물은 20mM Tris HCl 완충액(pH 8.2), 3mM DTT, 2mM MgCl₂, 1mM GTP 및 단백질(총 용적 4ml내 단백질 농도 1 내지 3mg/ml)을 포함하였다. 이 혼합물을 암실에서 20분간 37°C에서 항온반응시켰다.

항온반응 후에, 2ml의 분취물을 취하여 2,3-부탄디올을 0.5mg/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 혼합물을 95°C에서 30분간 항온반응시켰다. 블랭크(blank) 값은 디아세틸을 첨가하는 것을 제외하고는 동일한 방식으로 행하여 수득하였다.

이들 2가지 분취물의 비형광성(specific fluorescence) 차이를 측정하여 6,7-디메틸프테리딘의 농도와 GTP 사이클로하이드롤레이스 II의 활성을 계산하는데 사용하였다. 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

rh-21 변이주가 유도된 L2 균주를 대조군으로 사용하였다. L2 균주의 효소 활성은 $2.9\text{nmolmg}^{-1}\text{h}^{-1}$ 이었다. 돌연변이된 *RIB1* 유전자를 포함한 리보플라빈 결핍 수용체 균주 rh-21에서는 효소 활성이 관측되지 않았다. 플라스미드 pTCdXS로 형질전환되어 수득된 재조합 균주는 6.5 내지 $13.4\text{nmolmg}^{-1}\text{h}^{-1}$ 의 효소 활성을 나타내었다. 따라서, 재조합 균주는 캔디다 구일리에르몽디 L2 균주에 비해 2.3배 내지 4.6배의 더 높은 효소 수준을 나타내었다.

또한 재조합 균주의 리보플라빈 합성효소의 활성을 측정하였다. 플라스미드 p19RI, pTC2 또는 pTCdXS2로 형질전환시킨 경우, 리보플라빈 합성효소의 활성에 영향을 미치지 않았다. 분석한 모든 균주는 $20\text{nmolmg}^{-1}\text{h}^{-1}$ 정도의 리보플라빈 합성효소 활성을 가졌다(표 3).

실시예 5

재조합 캔디다 구일리에르몽디 균주에 의한 리보플라빈 생산

캔디다 구일리에르몽디 균주(야생형 균주 및 재조합 균주)를 아스파라긴을 제외한 미량원소가 보충된 부르크홀더 합성 배지(문헌[*Science*, **101**, 180, 1945] 참조)에서 30°C 에서 4일간 호기 배양하였다(탄너, 보이노비치, 반 라넨의 문헌["Riboflavin production by *Candida* species", *Nature*, **101**(2616), 180-181, 1945] 참조). 세포 현탁액을 원심분리하였다. 상청액내 리보플라빈의 농도를 형광분석계로 측정하였다. 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

야생 균주 L2는 기술된 조건하에 1ℓ당 1.2mg의 리보플라빈을 생산하였다. 재조합 균주 XS-3은 3배 증가된 리보플라빈 ($3.6\text{mg}/\ell$)을 생산하였다.

실시예 6

리보플라빈의 단리

아스파라긴을 제외한 미량 원소를 함유한 부르크홀더 합성 배지가 각각 0.5ℓ씩 함유된 2개의 엘렌메이어(Erlenmeyer) 플라스크(2.5ℓ)에 재조합 캔디다 구일리에르몽디 균주 XS-3을 접종하였다. 접종액을 30°C 에서 5시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리하였다. 상청액을 $500\text{ml}/\text{h}$ 의 속도로 플로리실(Florisil) 칼럼(4ml의 충전부피)을 통과시켰다. 칼럼을 증류수(7ml)로 세척하였다. 아세톤/1M 수성 NH_4OH 의 혼합물로 리보플라빈을 용출시켰다. 용출액을 건조 상태로 될 때까지 증발시켰다. 리보플라빈의 수득량을 광도계로 측정하였다.

[표 1]

리보플라빈 생합성 경로의 효소 및 유전자

효소		유전자		
		사카로마이세스 세레비지애	캔디다 구일리에르몽디	이 콜라이
A	GTP 사이클로하이드롤레이스	<i>RIB1</i>	<i>RIB1</i>	<i>ribA</i>
B	세균 탈아민효소			<i>ribD</i>
C	효모 환원효소	<i>RIB7</i>	<i>RIB2</i>	
D	효모 탈아민효소	<i>RIB2</i>	<i>RIB3</i>	
E	세균 환원효소			<i>ribD</i>
F	미지의 포스파테이스(phosphatase)			
G	루마진 합성효소	<i>RIB4</i>	<i>RIB5</i>	<i>ribE</i>
H	리보플라빈 합성효소	<i>RIB5</i>	<i>RIB7</i>	<i>ribC</i>
I	3,4-디하이드록시-2-부타논 4-포스페이트 합성효소	<i>RIB3</i>	<i>RIB6</i>	<i>ribB</i>

[표 2]

사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열

번호	프라이머	서열 (5' - 3')
1	ShBle_V	GGGCATGCAATTCGAGCTCGGTACCCG
2	TEF1_H	CGACTCACTATAGGAGGAAGCTTGGCGC
3	PGgtpCY_V	AGGAGGAAGCTTGGCGCTATGGCATCGAAGG
4	PGgtpCY_nco	GCTGGTCGGTTAATGGGTGAAGCTGGG

[표 3]

재조합 캔디다 구일리에르몽디 균주의 GTP 사이클로하이드롤레이스 II 활성 및 리보플라빈 합성효소의 활성(생육 시간: 40 내지 48시간)

번호	균주	리보플라빈 합성효소 활성 (nmolmg ⁻¹ h ⁻¹)	GTP 사이클로하이드롤레이스 II 활성 (nmolmg ⁻¹ h ⁻¹)	비율*
1	L2(야생형)	21.6	2.88	1.00
2	R1-1	측정되지 않음	10.08	3.50
3	R1-2	측정되지 않음	4.20	1.46
4	R1-3	20.4	8.76	3.04
5	R1-4	19.8	7.80	2.70
6	R1-5	21.6	7.80	2.70
7	TC-1	20.4	9.60	3.33
8	TC-2	측정되지 않음	8.40	2.92
9	TC-3	측정되지 않음	7.56	2.63
10	XS-1	22.8	13.38	4.60
11	XS-2	측정되지 않음	12.60	4.37
12	XS-3	측정되지 않음	6.60	2.29

* 재조합 균주의 GTP 사이클로하이드롤레이스 활성을 L2 균주의 GTP 사이클로하이드롤레이스 활성으로 나눈 값.

[표 4]

재조합 캔디다 구일리에르몽디 균주에 의한 리보플라빈 생산(생육 시간: 110시간,
배양 온도: 30℃)

번호	균주	리보플라빈 생산량 (mg/l)	리보플라빈 생산량의 상대적인 비교
1	L2(야생형)	1.2	1.0
4	R1-3	1.4	1.2
5	R1-4	3.6	3.0
6	R1-5	3.0	2.5
7	TC-1	1.4	1.2
9	TC-3	1.3	1.0
12	XS-3	3.6	3.0
13	XS-4	2.0	1.7
14	XS-5	2.3	1.9

<참고 문헌>

1. 시비르니(Sibirny, A. A.), 자로바(Zharova, V. P.), 크샤노브스카야(Kshanovskaya, B. V.) 및 샤블로브스키의 문헌 ["Selection of a genetic line of yeast *Pichia guilliermondii* capable to formation of significant amount of spores", *Tsytolgia i genetika*, **11**, 330-333, 1977(러시아어)].
2. 샤블로브스키, 시비르니 및 크샤노브스카의 문헌["Genetical classification of *C. guilliermondii* riboflavin auxotroph mutants", *Genetika*, **15**, 1561-1568, 1979(러시아어)].
3. 자칼스키, 즐로체브스키(Zlochevsky, M. L.), 스타시브(Stasiv, Y. Z.), 로그비넨코, 베부로브(Beburov, M. Y.) 및 샤블로브스키의 문헌["Cloning of the *Pichia guilliermondii* *RIB1* gene coding for GTP cyclohydrolase II-first enzyme of flavinogenesis-in *E. coli* cells", *Genetika*, **26**, 614-620, 1990(러시아어)].
4. 리아우타-테글리벳츠(Liauta-Teglivets, O.), 하슬라체(Hasslacher, M.), 보레츠키(Boretskyy, Y.), 코홀웨인(Kohlwein, S. D.) 및 샤블로브스키의 문헌["Molecular cloning of the GTP cyclohydrolase. Structural gene *RIB1* of *Pichia guilliermondii* involved in riboflavin biosynthesis", *Yeast*, **11**, 945-952, 1995].
5. 인비트로진사의 제로 백그라운드/칸 클로닝 키트((Zero Background/Kan Cloning kit), 버전(version) A. 151204의 사용 설명서.
6. 로그비넨코, 스타시브, 즐로체브스키, 보로노브스키(Boronovsky, A. Ya.), 베부로브 및 샤블로브스키의 문헌["Cloning of the *RIB7* gene encoding the riboflavin synthase of the yeast *Pichia guilliermondii*", *Genetika*, **29**, 922-927, 1993(러시아어)].

발명의 효과

본 발명에 의해, 재조합 DNA 기술을 사용하여 인간을 비롯한 동물에게 필수 영양소인 리보플라빈을 대량 생산하는 재조합 효모 균주를 제조할 수 있고, 이 효모 균주를 사용하여 리보플라빈을 대량 생산할 수 있으며, 이렇게 수득된 리보플라빈을 1종 이상의 적합한 식품 성분이나 사료 성분과 혼합하여 식품 조성물 또는 사료 조성물을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 효모의 리보플라빈 생합성 경로를 도시한 것이다.

도 2는 플라스미드 p19R1에 삽입된, 캔디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*) *RIB1* 유전자를 포함하는 2.18kb DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다.

도 3은 플라스미드 pTC2에 삽입된, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) TEF 프로모터 및 캔디다 구일리에르몽디 *RIB1* 유전자의 5' 부분을 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다.

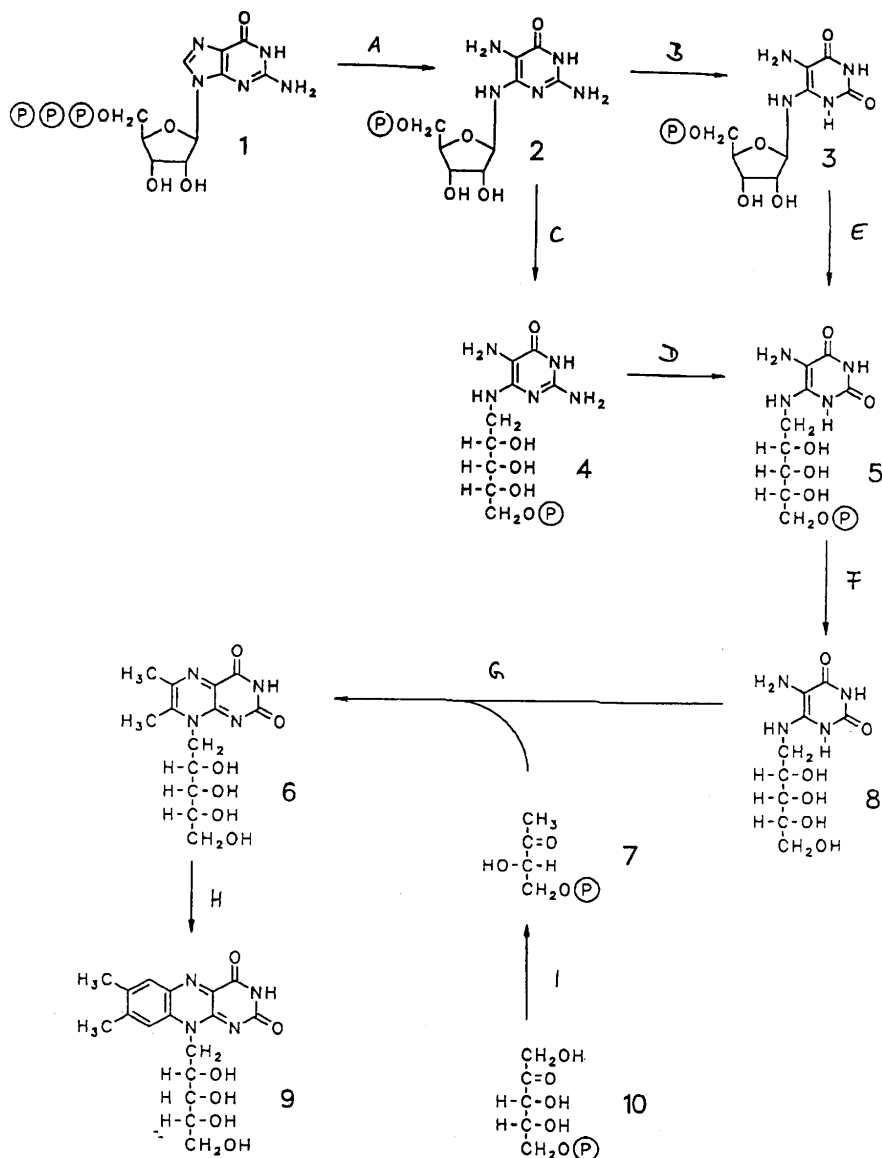
도 4는 플라스미드 pTC2로부터 *XhoI* 및 *SaI* 제한 엔도뉴클리에이스의 분해에 의해 취득된 4.4kb의 플라스미드 pTCdXS2에서 전술한 도 3의 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다.

도 5는 프라이머 ShBle_V 및 프라이머 PGgtpCY_nco를 사용하고 주형으로서 가열한 재조합 캔디다 구일리에르몽디 XS-3 균주를 사용하여 취득된 PCR 생성물의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다.

도 6은 사카로마이세스 세레비지에 TEF 프로모터 및 캔디다 구일리에르몽디 *RIB1* 유전자의 5' 부분을 포함하는 DNA 단편을 제조하는 2단계 PCR 증폭 반응식을 도식적으로 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2a

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
GTCGACTTTCACTCCGAAGGTAGGTGCGGCTGGAAGACGTCGTCCCAAGTCGTATGCGTT

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
AGCTGAGAGCGACGGAAACGAAAGTGATGAAGATTACATGCTGGAATAATCCATAGCTAG

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
TGTACTIONGCTAATAACAACCGGTAAGCTAGCCAATTGCAGCGTTATTACACCACCGCCGTG

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
GATCGGGTTAGTCACGTGAACTGGCCGTGGGTCTGCACGTCGCTTCATTATTCATATA

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
TTAGTGAGAGTCTTCCCTATATCAGTCAGCAGACGTATCGGTTGATTTTCAGGTCAAAAAGA

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
GAAAAGGTGGTCTTACAAAAGCGAAATAGCTGATACATTTTTACTCACAGCAGCATCATA

      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
TTTGTGGAACCTTTAAACTTGACTTTTCATTTCAAGCAAGTTATTTTAAAATTCAAATCA

      430     440     450     460     470     480
      |      |      |      |      |      |
TTTGAAAATCAAAAAGAACATCTAAGTTCTGAAAAATTGTACGAACAACGCTATGGCAT

                                                                 MetAlaSer

      490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |
CGAAGGACATAGTACATCCGCAACCAGAGCGCCGGCACGGTTCGGAAACTCACGAATTTA

      LysAspIleValHisProGlnProGluArgArgHisGlySerGluThrHisGluPheThr

      550     560     570     580     590     600
      |      |      |      |      |      |
CCATGCCTCTCTTATCTCCTACATTGACACCATCCCATATTCATCGCAAACGCCTCAA

      METProLeuLeuSerProThrLeuThrProSerHisIleProSerGlnThrProGlnIle
    
```

도면2b

```

        610      620      630      640      650      660
    TTCCTCCGGAAGTGCCAGCAGAAGTCAGGGATCGCTTGCCCTTCTCTGAAACGTTGCCTG
    ProProGluValProAlaGluValArgAspArgLeuProLeuProGluThrLeuProVal

        670      680      690      700      710      720
    TGGTGAAATGCATGGCGAGAGCTCGTATACCGACCACTCAGGGGCCGGAGATATTTCTCC
    ValLysCysMETAlaArgAlaArgIleProThrThrGlnGlyProGluIlePheLeuHis

        730      740      750      760      770      780
    ATTTGTACGAGAATAACGTTGACAATAAAGAGCATTGGCTATTGTTTTTGGGGAAGATG
    LeuTyrGluAsnAsnValAspAsnLysGluHisLeuAlaIleValPheGlyGluAspVal

        790      800      810      820      830      840
    TGCGGTGAAAACGCTCTATCAGAAACGTCCCAATGAGACCCAGCAAGATAGAATGACTC
    ArgSerLysThrLeuTyrGlnLysArgProAsnGluThrGlnGlnAspArgMETThrArg

        850      860      870      880      890      900
    GTGGTGCTTATGTGGGCAGATTGTTTCCTGGAAGAACCGAGGCAGACTATGACAGTGAGT
    GlyAlaTyrValGlyArgLeuPheProGlyArgThrGluAlaAspTyrAspSerGluSer

        910      920      930      940      950      960
    CTAATTTGAGATTGAATTTTCGATGAAAATGGCCAACTTATCAGAGATCCGAGTACCACCT
    AsnLeuArgLeuAsnPheAspGluAsnGlyGlnLeuIleArgAspProSerThrThrCys

        970      980      990      1000      1010      1020
    GTAGTGGTGAGCCCATTTTGGCCCGTATTCATTCGGAATGTTATACGGGGGAAACCGCAT
    SerGlyGluProIleLeuAlaArgIleHisSerGluCysTyrThrGlyGluThrAlaTrp

        1030      1040      1050      1060      1070      1080
    GGAGTGCTCGTTGCGATTGTGGAGAACAATTCGATGAAGCTGGTCGGTTAATGGGTGAAG
    SerAlaArgCysAspCysGlyGluGlnPheAspGluAlaGlyArgLeuMETGlyGluAla
    
```

도면2c

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
      |        |        |        |        |        |
CTGGGCACGGGTGTATCGTGTACCTTCGTCAGGAAGGTCGTGGAATTGGACTTGGGGAAA
      |        |        |        |        |        |
      GlyHisGlyCysIleValTyrLeuArgGlnGluGlyArgGlyIleGlyLeuGlyGluLys

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      |        |        |        |        |        |
AGTTGAAGGCTTATAATTTGCAAGACTTGGGAGCGGATACCGTCCAGGCCAATTTGATGT
      |        |        |        |        |        |
      LeuLysAlaTyrAsnLeuGlnAspLeuGlyAlaAspThrValGlnAlaAsnLeuMETLeu

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      |        |        |        |        |        |
TACGACATCCTGCTGATGCGAGATCTTTTCGCTCGCTACAGCCATACTCTGGACTTGG
      |        |        |        |        |        |
      ArgHisProAlaAspAlaArgSerPheSerLeuAlaThrAlaIleLeuLeuAspLeuGly

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
      |        |        |        |        |        |
GGCTCAACGAGATCAAGTTGTTGACCAACAATCCCGATAAAATTGCTGCAGTTGAGGGAA
      |        |        |        |        |        |
      LeuAsnGluIleLysLeuLeuThrAsnAsnProAspLysIleAlaAlaValGluGlyArg

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
      |        |        |        |        |        |
GAAACAGAGAGGTCAAGGTAGTGAACGGGTCCCTATGGTGCCGTGGCATGGAGAAGTG
      |        |        |        |        |        |
      AsnArgGluValLysValValGluArgValProMETValProLeuAlaTrpArgSerGlu

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
      |        |        |        |        |        |
AGAATGGAATCAAGTCAAAAGAGATAGAGGGCTACTTGAGTGCTAAGATTGAAAGGATGG
      |        |        |        |        |        |
      AsnGlyIleLysSerLysGluIleGluGlyTyrLeuSerAlaLysIleGluArgMETGly

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
      |        |        |        |        |        |
GGCACTTGCTTGAAAAGCCACTCAAGATATGATAGAAGAGATGAAGTTAAGGACTTAAGA
      |        |        |        |        |        |
      HisLeuLeuGluLysProLeuLysIle-----

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
      |        |        |        |        |        |
AATAAATGATGAATTAATGACGCAAATGTCACTACTCGATTAGAGAAATAGCTATAATG

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
      |        |        |        |        |        |
AAGAATTTTGCATTTTCGCAAAATTTAAGATAAATGCAAAAATTGCAAATTACGAAATATG

```

도면2d

```

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
      |        |        |        |        |        |
CATATGATACAAGACAAGAAAAGACTACTAAAAGTCTCTCGAGAAGAATACTGGGTAACC

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
      |        |        |        |        |        |
TTCATCTCTTGATTATGCACTGGGGCTATTCATATGCAGATTGCACGCCGAGGTGCAGC

      1750      1760      1770      1780      1790      1800
      |        |        |        |        |        |
GTTTAGCGCGGCTCAACGGAAGCCAACGGCCGCCACAAATTGTCCGGAAAGTCGCCGAA

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
      |        |        |        |        |        |
ACTGATCCACTGGTACCACAGCCCCATAAGAACCCCTTTAATATTAAAAACCGTCTTC

      1870      1880      1890      1900      1910      1920
      |        |        |        |        |        |
AGCCACTTTTGATCACATTGTTTGACGCCGCCCGTTGCTGCCATCCAAAACACCACGCGTC

      1930      1940      1950      1960      1970      1980
      |        |        |        |        |        |
CCCCGCACCTTTTACGGTGCCCACTGCATTGGAATTTGCATAAAACAGCCTCACGAAGTG

      1990      2000      2010      2020      2030      2040
      |        |        |        |        |        |
GATTAATTTTTTAGAGCACTCAAGTCATCATGCTGCAATCTCTGCATCATGAAATGACTCC

      2050      2060      2070      2080      2090      2100
      |        |        |        |        |        |
CGTTGATACAGGGAACTCAGACCGCAAGCGGCGAAGAGTCACAAGAGCGTGTGATGTGTG

      2110      2120      2130      2140      2150      2160
      |        |        |        |        |        |
TCGACTCTAGAGATCCCCGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTACAACGTC

      2170      2180
      |        |
GTGACTGGGAAAACCCTGGCG

```

해독된 부분은 *RIBI* 유전자의 서열이다.

굵은 활자로 타이핑(typing)된 것은 ARS 요소의 서열이다.

도면3a

10 20 30 40 50 60
CAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCCACACCCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTC
 70 80 90 100 110 120
CTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCGTACCACTTCAAACACC
 130 140 150 160 170 180
CAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTTCCTCTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAC
 190 200 210 220 230 240
TAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCCTCGTTTCTTTTCTCGTCGAAAAGGCA
 250 260 270 280 290 300
ATAAAAATTTTTATCAGTTTCTTTTTCTGAAATTTTTTTTTGATTTTTTCTCTTT
 310 320 330 340 350 360
CGATGACCTCCCATGATATTAAGTCAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTT
 370 380 390 400 410 420
TCATTTTTCTTGTCTATTACAACTTTTTTTACTTCTTGCTCATTACAAGAAAGCATAG
 430 440 450 460 470 480
CAATCTAATCTAAGGGCGAGCTCGAATTCGAACTAGTACTGCAGCACGTGACCGGCGCCT
 490 500 510 520 530 540
AGTGTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAAATACGACTCACTATAG
 550 560 570 580 590 600
-GAGGAAGCTTGGCGCTATGGCATCGAAGTACATAGTACATCCGCAACCAGAGCGCCGGCA

METAlaSerLysTyrIleValHisProGlnProGluArgArgHis

도면3b

610 620 630 640 650 660
 CGGGTCGGAAACTCACGAATTTACCATGCCTCTCTTATCTCCTACATTGACACCATCCCA
 GlySerGluThrHisGluPheThrMETProLeuLeuSerProThrLeuThrProSerHis

 670 680 690 700 710 720
 TATTCCATCGCAAACGCCTCAAATTCCTCCCGAAGTCCAGCAGAAGTCAGGGATCGCTT
 IleProSerGlnThrProGlnIleProProGluValProAlaGluValArgAspArgLeu

 730 740 750 760 770 780
 GCCCCTTCCTGAAACGTTCCCTGTGGTGAATGCATGGCGAGCTCGTATACCGACCAC
 ProLeuProGluThrLeuProValValLysCysMETAlaArgAlaArgIleProThrThr

 790 800 810 820 830 840
 TCAGGGGCCGGAGATATTTCTCCATTTGTACGAGAATAACGTTGACAATAAAGACCATTI
 ClnGlyProGluIlePheLeuHisLeuTyrGluAsnAsnValAspAsnLysGluHisLeu

 850 860 870 880 890 900
 GCCTATTGTTTTTGGGAAGATGTGCGGTCGAAAACGCTCTATCAGAAACGTCCTCCCAATGA
 AlaIleValPheGlyGluAspValArgSerLysThrLeuTyrGlnLysArgProAsnGlu

 910 920 930 940 950 960
 GACCCAGCAAGATAGAATGACTCCTGCTTATCTGGGCAGATTGTTTCCTGGAAGAAC
 ThrGlnGlnAspArgMETThrArgGlyAlaTyrValGlyArgLeuPheProGlyArgThr

 970 980 990 1000 1010 1020
 CGAGGCAGACTATGACAGTGAGTCTAATTTGACATTCAATTTTCGATGAAAATGCCCAACT
 GluAlaAspTyrAspSerGluSerAsnLeuArgLeuAsnPheAspGluAsnGlyGlnLeu

 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TATCAGAGATCCGAGTACCACCTGTAGTGGTGAGCCCATTTGGCCCGTATTTCATTCCGA
 IleArgAspProSerThrThrCysSerGlyGluProIleLeuAlaArgIleHisSerGlu

도면4a

10 20 30 40 50 60
CAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCCACACCCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTC
 70 80 90 100 110 120
CTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGGCATCGCCGTACCACTTCAAAACACC
 130 140 150 160 170 180
CAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTTCCTCTAGGGTGTCTTAATTACCCGTAC
 190 200 210 220 230 240
TAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCTCGTTTCTTTTCTTCGTCGAAAAGGCA
 250 260 270 280 290 300
ATAAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTCTTGAATTTTTTTTTTGATTTTTTCTCTTT
 310 320 330 340 350 360
CGATGACCTCCCATTGATATTTAAGTCAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTT
 370 380 390 400 410 420
TCATTTTTCTTGTCTATTACAACTTTTTTTACTTCTTGCTCATTAGAAAGAAAGCATAG
 430 440 450 460 470 480
CAATCTAATCTAAGGGCGAGCTCGAATTCGAACTAGTACTGCAGCACGTGACCGGCGCCT
 490 500 510 520 530 540
AGTGTGACBATTAAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACTCACTATAG
 550 560 570 580 590 600
GAGGAAGCTTGGCGCTATGGCATCGAAGTACATAGTACATCCGCAACCAAGCGCCGGCA

METAlaSerLysTyrIleValHisProGlnProGluArgArgHis

도면4b

```

        610      620      630      640      650      660
CGGGTCGGAAACTCACGAATTACCATGCCTCTCTTATCTCCTACATTGACACCATCCCA
GlySerGluThrHisGluPheThrMETProLeuLeuSerProThrLeuThrProSerHis

        670      680      690      700      710      720
TATTCATCGCAAACGCCTCAAATTCCTCCGGAAGTGCCAGCAGAAGTCAGGGATCGCTT
IleProSerGlnThrProGlnIleProProGluValProAlaGluValArgAspArgLeu

        730      740      750      760      770      780
GCCCCCTCCTGAAACGTTGCCTGTGGTGAAATGCATGGCGAGAGCTCGTATACCGACCAC
ProLeuProGluThrLeuProValValLysCysMETAlaArgAlaArgIleProThrThr

        790      800      810      820      830      840
TCAGGGCCGGAGATATTTCTCCATTGTACGAGAATAACGTTGACAATAAAGAGCATT
GlnGlyProGluIlePheLeuHisLeuTyrGluAsnAsnValAspAsnLysGluHisLeu

        850      860      870      880      890      900
GGCTATTGTTTTGGGAAGATGTGCGGTCGAAAACGCTCTATCAGAAAACGTCCCAATGA
AlaIleValPheGlyGluAspValArgSerLysThrLeuTyrGlnLysArgProAsnGlu

        910      920      930      940      950      960
GACCCAGCAAGATAGAATGACTCGTGGTGCCTTATGTGGCAGATTGTTTCTGGAAGAAC
ThrGlnGlnAspArgMETThrArgGlyAlaTyrValGlyArgLeuPheProGlyArgThr

        970      980      990      1000     1010     1020
CGAGGCAGACTATGACAGTGAGTCTAATTTGAGATTGAATTTTCGATGAAAATGGCCAACT
GluAlaAspTyrAspSerGluSerAsnLeuArgLeuAsnPheAspGluAsnGlyGlnLeu

        1030     1040     1050     1060     1070     1080
TATCAGAGATCCGAGTACCACCTGTAGTGGTGAGCCCATTTGGCCCGTATTCATTCGGA
IleArgAspProSerThrThrCysSerGlyGluProIleLeuAlaArgIleHisSerGlu
    
```

도면4c

```

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
      |         |         |         |         |         |
ATGTTATACGGGGAAACCGCATGGAGTGCCTCGTTGCGATTGTGGAGAACAATTCGATGA
      CysTyrThrGlyGluThrAlaTrpSerAlaArgCysAspCysGlyGluGlnPheAspGlu

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      |         |         |         |         |         |
AGCTGGTCGGTTAATGGGTGAAGCTGGGCACGGGTGTATCGTGTACCTTCGTCAGGAAGG
      AlaGlyArgLeuMETGlyGluAlaGlyHisGlyCysIleValTyrLeuArgGlnGluGly

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      |         |         |         |         |         |
TCGTGGAATTGGACTTGGGGAAAAGTTGAAGGCTTATAATTTGCAAGACTTGGGAGCGGA
      ArgGlyIleGlyLeuGlyGluLysLeuLysAlaTyrAsnLeuGlnAspLeuGlyAlaAsp

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
      |         |         |         |         |         |
TACCGTCCAGGCCAATTTGATGTTACGACATCCTGCTGATGCGAGATCTTTTCGCTCGC
      ThrValGlnAlaAsnLeuMETLeuArgHisProAlaAspAlaArgSerPheSerLeuAla

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
      |         |         |         |         |         |
TACAGCCATACTCTTGACTTGGGGCTCAACGAGATCAAGTTGTTGACCAACAATCCCGA
      ThrAlaIleLeuLeuAspLeuGlyLeuAsnGluIleLysLeuLeuThrAsnAsnProAsp

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
      |         |         |         |         |         |
TAAAATTGCTGCAGTTGAGGGAAGAAACAGAGAGGTCAAGGTAGTGGAAACGGGTGCCTAT
      LysIleAlaAlaValGluGlyArgAsnArgGluValLysValValGluArgValProMET

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
      |         |         |         |         |         |
GGTGCCGTTGGCATGGAGAAGTGAGAATGGAATCAAGTCAAAGAGATAGAGGGCTACTT
      ValProLeuAlaTrpArgSerGluAsnGlyIleLysSerLysGluIleGluGlyTyrLeu

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
      |         |         |         |         |         |
GAGTGCTAAGATTGAAAGGATGGGGCACTTGCTTGAAAAGCCACTCAAGATATGATAGAA
      SerAlaLysIleGluArgMETGlyHisLeuLeuGluLysProLeuLysIle-----
    
```

도면4d

```

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
      |        |        |        |        |        |
GAGATGAAGTTAAGGACTTAAGAAATAAATGATGAATTAATGACGCAAATGTCACTACT

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
      |        |        |        |        |        |
CGATTAGAGAAATAGCTATAATGAAGAATTTTGCATTTTCGCAAATTTAAGATAAATGCA

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
      |        |        |        |        |        |
AAAATTGCAAATTACGAAATATGCATATGATACAAGACAAGAAAAGACTACTAAAAGTCTCT
    
```

밑줄친 부분은 *TEF* 프로모터의 서열이다.
 해독된 부분은 *RIBI* 유전자의 서열이다.
 굵은 활자로 타이핑된 것은 *ARS* 요소의 서열이다.

도면5a

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
GGGCATGCAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCCCCACACCCATAGCTTCABAAATGTT

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
TCTACTCCCTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGGCATCGCCGTACCACTTCA

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
AAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTCTTCTCCTTAGGGTGTCTTAATTA

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
CCCGTACTAAAGGTTTGGAAGAAAAGAAAAGAGACCGCCTCGTTTCTTTTCTTCGTCGAA

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
AAAGGCAATAAAAATTTTATCACGTTTCTTTTCTTGAAATTTTCTTTTGGATTTTTT

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
TCTCTTTCGATGACCTCCCATGATATTTAAGTCAATAAACGGTCTTCAAATTTCTCAAGT

      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
TTCAAGTTTCATTTTCTTGTCTATTACAACTTTTTTACTTCTTGCTCATTAGAAAGAA

      430     440     450     460     470     480
      |      |      |      |      |      |
AGCATAGCAATCTAATCTAAGGGCGAGCTCGAATTCGAACTAGTACTGCAGCACGTGACC

      490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |
GGCGCCTAGTGTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACTC

      550     560     570     580     590     600
      |      |      |      |      |      |
ACTATAGGAGGAAGCTTGGCGCTATGGCATCGAAGTACATAGTACATCCGCAACCAGAGC
    
```

METAlaSerLysTyrIleValHisProGlnProGluArg

도면5b

```

        610      620      630      640      650      660
GCCGGCACGGGTCGGAAACTCACGAATTACCATGCCTCTCTTATCTCCTACATTGACAC
  ArgHisGlySerGluThrHisGluPheThrMETProLeuLeuSerProThrLeuThrPro

        670      680      690      700      710      720
CATCCCATATTCCATCGCAAACGCCTCAAATTCCTCCGGAAGTGCCAGCAGAAGTCAGGG
  SerHisIleProSerGlnThrProGlnIleProProGluValProAlaGluValArgAsp

        730      740      750      760      770      780
ATCGCTTGCCCTTCTGAAACGTTGCCCTGTGGTGAAATGCATGGCGAGAGCTCGTATAC
  ArgLeuProLeuProGluThrLeuProValValLysCysMETAlaArgAlaArgIlePro

        790      800      810      820      830      840
CGACCACTCAGGGCCGGAGATATTTCTCCATTTGTACGAGAATAACGTTGACAATAAAG
  ThrThrGlnGlyProGluIlePheLeuHisLeuTyrGluAsnAsnValAspAsnLysGlu

        850      860      870      880      890      900
AGCATTGGCTATTGTTTTGGGGAAGATGTGCGGTCGAAAACGCTCTATCAGAAACGTC
  HisLeuAlaIleValPheGlyGluAspValArgSerLysThrLeuTyrGlnLysArgPro

        910      920      930      940      950      960
CCAATGAGACCCAGCAAGATAGAATGACTCGTGGTGCTTATGTGGGCAGATTGTTTCCTG
  AsnGluThrGlnGlnAspArgMETThrArgGlyAlaTyrValGlyArgLeuPheProGly

        970      980      990      1000      1010      1020
GAAGAACCAGGAGACTATGACAGTGAGTCTAATTTGAGATTGAATTTGATGAAAATG
  ArgThrGluAlaAspTyrAspSerGluSerAsnLeuArgLeuAsnPheAspGluAsnGly

        1030      1040      1050      1060      1070      1080
GCCAACTTATCAGAGATCCGAGTACCACCTGTAGTGGTGAGCCCATTTGGCCCGTATTC
  GlnLeuIleArgAspProSerThrThrCysSerGlyGluProIleLeuAlaArgIleHis

        1090      1100      1110      1120      1130      1140
ATTCGGAATGTTATACGGGGAAACCCGATGGAGTGCCTCGTTGCGATTGTGGAGAACAAT
  SerGluCysTyrThrGlyGluThrAlaTrpSerAlaArgCysAspCysGlyGluGlnPhe
  
```

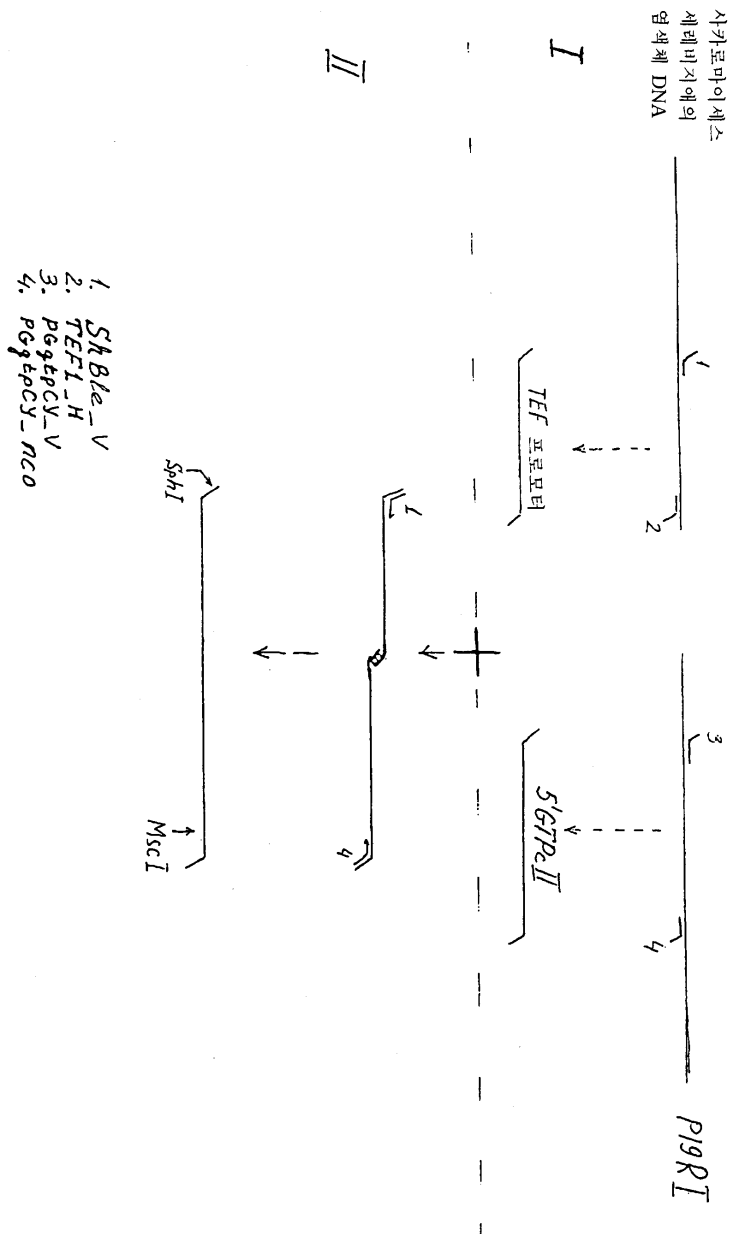
도면5c

```

        1150      1160      1170
TCGATGAAGCTGGTTCGGTTAATGGGTGAAGCTGGG
  AspGluAlaGlyArgLeuMETGlyGluAlaGly
  
```

밑줄친 부분은 *TEF* 프로모터의 서열이다.
 해독된 부분은 *RIBI* 유전자의 일부 서열이다.

도면6



서열목록

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Overproduction of riboflavin in yeast
- <130> 1
- <150> EP 98107380.2
- <151> 1998-04-23
- <160> 4
- <170> KOPATIN 1.0
- <210> 1
- <211> 2181
- <212> DNA
- <213> Candida guilliermondii

<400> 1
gtcgactttc actccgaagg taggtgcggc tggaaagacgt cgtcccaagt cgtatgcggt 60
agctgagagc gacggaaacg aaagtgatga agattacatg ctggaataat ccatagctag 120
tgtacttgct aatacaaccg gtaaagctag ccaattgcag cgttattcac caccgccgtg 180
gatcgggtta gtcacgtgaa ctggccggtg ggtcctgcac gtcgcttcat tattcatata 240
ttagtgagag tcttcctata tcagtcagca gacgtatcgg ttgatttcag gtcaaaaaga 300
gaaaagggtg tcttacaaaa gcgaaatagc tgatacattt ttactcacag cagcatcata 360
tttgtggaac ctttaaactt gacttttcat ttcaagcaag ttattttgaa attcaaatca 420
tttgaaatc aaaaaagaac atctaagttc tgaaaaattg tacgaacaac gctatggcat 480
cgaaggacat agtacatccg caaccagagc gccggcacgg gtcggaaact cacgaattta 540
ccatgcctct cttatctcct acattgacac catccatat tccatcgcaa acgcctcaa 600
ttcctccgga agtgccagca gaagtcaggg atcgttgcc cttcctgaa acgttgctg 660
tggtgaaatg catggcgaga gctcgtatac cgaccactca ggggcccggag atatttctcc 720
atltgtacga gaataacggt gacaataaag agcatttggc tattgttttt ggggaagatg 780
tgcggtcgaa aacgctctat cagaaacgct ccaatgagac ccagcaagat agaatgactc 840
gtggtgctta tgtgggcaga ttgtttcctg gaagaaccga ggcagactat gacagtgagt 900
ctaatttgag attgaatttc gatgaaaatg gccaaacttat cagagatccg agtaccacct 960
gtagtgggta gccattttt gcccgattc attcggaatg ttatacgggg gaaaccgcat 1020
ggagtgctcg ttgcgattgt ggagaacaat tcgatgaagc tggtcgggta atgggtgaag 1080
ctgggcacgg gtgtatcgtg tacctcgtc aggaaggtcg tggaaattgga cttggggaaa 1140
agttgaaggc ttataatttg caagacttgg gagcggatac cgtccaggcc aatttgatgt 1200
tacgacatcc tgctgatgcy agatcttttt cgtcgtctac agccatactc ttggacttgg 1260
ggctcaacga gatcaagttg ttgaccaaca atcccgataa aattgctgca gttgaggaa 1320
gaaacagaga ggtcaaggta gtggaacggg tgcctatggt gccgttggca tggagaagtg 1380
agaatggaat caagtcaaaa gagatagagg gctacttgag tgctaagatt gaaaggatgg 1440
ggcacttgct tgaaaagcca ctcaagatat gatagaagag atgaagttaa ggacttaaga 1500
aataaatgat gaattaaatg acgcaaagt cactactcga ttagagaaat agctataatg 1560
aagaattttg catttcgcaa aatttaagat aaatgcaaaa attgcaaatt acgaaatatg 1620
catatgatac aagacaagaa aagactacta aaagtctctc gagaagaata ctgggtaacc 1680
ttcatctctt gattatgcac tggggctatt catatgcaga ttcgcacgcc gaggtgcagc 1740
gtttaggcgc ggctcaacgg aagccaacgg ccgccacaaa ttgtccggaa agtcgccgaa 1800
actgatccac tgggtaccaca gcccataag aaccccctt aatattaaa accgttcttc 1860
agccactttt gatcacattg tttgcagccg ccggttgctg ccatccaaac accacgcgtc 1920
ccccgcacct tttacggtgc ccaactgcatt ggaatttgca taaaacagcc tcacgaagtg 1980
gtttaatttt tagagcactc aagtcatcat gctgcaatct ctgcatcatg aatgactcc 2040
cgttgataca gggaaactcag accgcaagcg gcgaagagtc acaagagcgt gtgatgtgtg 2100
tcgactctag agatccccgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc 2160
gtgactggga aaaccctggc g 2181

<210> 2

<211> 1080

<212> DNA

<213> *Candida guilliermondii* & *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2
caattcgagc tcggtaccgg gggatcccc acacaccata gttcaaaat gtttctactc 60
cttttttact cttccagatt ttctcggact ccgycatcg ccgtaccact tcaaaacacc 120
caagcacagc atactaaatt tccctctttc ttctctaggg gtgtcgttaa ttaccgctac 180
taaaggtttg gaaaagaaaa aagagaccgc ctcgtttctt tttcttcgtc gaaaaggca 240
ataaaaaatt ttatcacggt tctttttctt gaaatttttt tttttgattt ttttctcttt 300
cgatgacctc ccattgatat ttaagtcaat aaacggtctt caatttctca agtttcagtt 360
tcatttttct tgttctatta caactttttt tacttcttgc tcattagaaa gaaagcatag 420
caatctaadc taagggcgag ctcgaattcg aactagtact gcagcacgtg accggcgcct 480
agtgttgaca attaatcatc ggcatagtat atcggcatag tataatacga ctactatag 540

gaggaagctt ggcgctatgg catcgaagta catagtacat ccgcaaccag agcgccggca 600
 cgggtcggaa actcacgaat ttaccatgcc tctcttatct cctacattga caccatcca 660
 tattccatcg caaacgcctc aaattcctcc ggaagtgcc gagaagtca gggatcgctt 720
 gcccttcct gaaacgttgc ctgtggtgaa atgcatggcg agagctcgta taccgaccac 780
 tcaggggccc gagatatattc tccatttgta cgagaataac gttgacaata aagagcattt 840
 ggctattggt tttggggaag atgtgcggtc gaaaacgctc tatcagaaac gtcccaatga 900
 gaccagcaa gatagaatga ctctggtgct ttatgtgggc agattgtttc ctggaagaac 960
 cgaggcagac tatgacagtg agtctaattt gagattgaat ttcgatgaaa atggccaact 1020
 tatcagagat ccgagtacca cctgtagtgg tgagccatt ttggcccgta ttcattcgga 1080
 1080

<210> 3
 <211> 1742
 <212> DNA
 <213> Candida guilliermondii & Saccharomyces cerevisiae
 <400> 3

caattcgagc tccgtaccgg gggatcccc acacaccata gtttcaaat gtttctactc 60
 ctttttact cttccagatt ttctcggact ccgcgcatcg ccgtaccact tcaaacacc 120
 caagcacagc atactaaatt tccctctttc ttctcttagg gtgtcgtaa ttacccttac 180
 taaaggtttg gaaaagaaa aagagaccgc ctctgttctt tttcttcgctc gaaaaggca 240
 ataaaaattt ttatcacgtt tcttttctt gaaatttttt tttttgattt ttttctcttt 300
 cgatgacctc ccattgatat ttaagtcaat aaacggtctt caatttctca agtttcagtt 360
 tcatttttct tgttctatta caactttttt tacttcttgc tcattagaaa gaaagcatag 420
 caatctaadc taagggcgag ctcgaattcg aactagtact gcagcacgtg accggcgctt 480
 agtggtgaca attaatacctc ggcatagtat atcggcatag tataatacga ctactatag 540
 gaggaagctt ggcgctatgg catcgaagta catagtacat ccgcaaccag agcgccggca 600
 cgggtcggaa actcacgaat ttaccatgcc tctcttatct cctacattga caccatcca 660
 tattccatcg caaacgcctc aaattcctcc ggaagtgcc gagaagtca gggatcgctt 720
 gcccttcct gaaacgttgc ctgtggtgaa atgcatggcg agagctcgta taccgaccac 780
 tcaggggccc gagatatattc tccatttgta cgagaataac gttgacaata aagagcattt 840
 ggctattggt tttggggaag atgtgcggtc gaaaacgctc tatcagaaac gtcccaatga 900
 gaccagcaa gatagaatga ctctggtgct ttatgtgggc agattgtttc ctggaagaac 960
 cgaggcagac tatgacagtg agtctaattt gagattgaat ttcgatgaaa atggccaact 1020
 tatcagagat ccgagtacca cctgtagtgg tgagccatt ttggcccgta ttcattcgga 1080
 atgttatacgg ggggaaaccg catggagtgc tctgttcgat tgtggagaac aattcgatga 1140
 agctggtcgg ttaatgggtg aagctgggca cgggtgtatc gtgtacctc gtcaggaagg 1200
 tctgtggaatt ggacttgggg aaaagttgaa ggcttataat ttgcaagact tgggagcggg 1260
 taccgtccag gccaatgtga tgttacgaca tcctgctgat gcgagatctt tttcgtcgc 1320
 tacagccata ctcttgact tggggctcaa cgagatcaag ttgttgacca acaatcccga 1380
 taaaattgct gcagttgagg gaagaaacag agaggtcaag gtagtggaac ggggtgcctat 1440
 ggtgccgttg gcatggagaa gtgagaatgg aatcaagtca aaagagatag agggctactt 1500
 gagtgctaag attgaaagga tggggcactt gcttgaaaag ccaactcaaga tatgatagaa 1560
 gagatgaagt taaggactta agaaataaat gatgaattaa atgacgcaa tgtcactact 1620
 cgattagaga aatagctata atgaagaatt ttgcatttcg caaaatttaa gataaatgca 1680
 aaaattgcaa attacgaaat atgcatatga tacaagacaa gaaaagacta ctaaaagtct 1740
 ct 1742

<210> 4
 <211> 1175
 <212> DNA
 <213> Candida guilliermondii & Saccharomyces cerevisiae
 <400> 4

gggatgcaa ttcgagctcg gtaccggggg atccccaca caccatagct tcaaatggtt 60
 tctactcctt ttttactcct ccagattttc toggactccg cgcacgccc taccactta 120

aaacacccaa	gcacagcata	ctaaatttcc	ctctttcttc	ctctaggggtg	tcgttaatta	180
cccgtactaa	aggtttggaa	aagaaaaaag	agaccgcctc	gtttcttttt	cttcgtcgaa	240
aaaggcaata	aaaattttta	tcacgtttct	ttttcttgaa	atTTTTTTTT	ttgatttttt	300
tctctttcga	tgacctccca	ttgatattta	agtcaataaa	cggctcttcaa	tttctcaagt	360
ttcagtttca	tttttcttgt	tctattacaa	ctTTTTTTT	ttcttgctca	ttagaaagaa	420
agcatagcaa	tctaatactaa	gggcgagctc	gaattcgaac	tagtactgca	gcacgtgacc	480
ggcgcctagt	gttgacaatt	aatcatcggc	atagtatata	ggcatagtat	aatacgactc	540
actataggag	gaagcttggc	gctatggcat	cgaagtacat	agtacatccg	caaccagagc	600
gccggcacgg	gtcggaaaact	cacgaattta	ccatgcctct	cttatctcct	acattgacac	660
catcccatat	tccatcgcaa	acgcctcaaa	ttcctccgga	agtgccagca	gaagtcaggg	720
atcgcttgcc	ccttctcgaa	acgttgcttg	tggtgaaatg	catggcgaga	gctcgtatac	780
cgaccactca	ggggccggag	atatttctcc	atTTGTACGA	gaataacgtt	gacaataaag	840
agcatttggc	tattgttttt	ggggaagatg	tgcggtcgaa	aacgctctat	cagaaacgtc	900
ccaatgagac	ccagcaagat	agaatgactc	gtggtgctta	tgtgggcaga	ttgtttcctg	960
gaagaaccga	ggcagactat	gacagtgagt	ctaatttgag	attgaatttc	gatgaaaatg	1020
gccaacttat	cagagatccg	agtaccacct	gtagtgggtga	gcccattttg	gcccgtattc	1080
attcggaatg	ttatacgggg	gaaaccgcat	ggagtgctcg	ttgctgattgt	ggagaacaat	1140
tcgatgaagc	tggtcgggta	atgggtgaag	ctggg			1175