

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0128885 (43) 공개일자 2013년11월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/88 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) C12N 1/13 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	(72) 발명자 백승필 대전광역시 유성구 하기동 송림마을아파트 602-1604
(21) 출원번호 10-2012-0053028 (22) 출원일자 2012년05월18일 심사청구일자 2012년05월18일	(74) 대리인 특허법인다나	

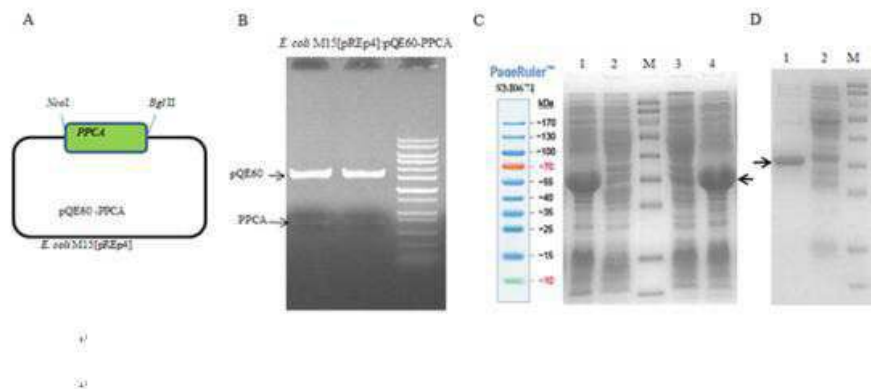
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 신규 탄산탈수효소 및 이를 이용한 이산화탄소의 전환 또는 고정화 방법

(57) 요약

해양 규조류인 탈라시오시라 웨이스플로기(*Thalassiosira weissflogii*) 유래의 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 3BOH를 기준으로 유전자 데이터베이스로부터 탄산탈수효(carbonic anhydrase) 단백질을 탐색한 결과, 플레시오시스티스 파시피카(*Plesiocystis pacifica*) SIR-1에서 기능이 알려져 있지 않았지만 제타 타입 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)와 구조적으로 유사한 단백질 후보 서열을 확보하였다. 이의 유전자서열을 대장균에서 최적 발현될 수 있도록 유전자를 최적화한 후 대장균에서 발현시킨 결과 높은 발현율을 보였으며, 제타 타입 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)기능이 있는 것으로 확인되었다. 또한 80℃-100℃ 정도의 고온에서도 활성을 나타내는 것으로 보아 열 안정성이 있다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명은 알파-탄산탈수효소(carbonic anhydrase)에서 보이는 가수분해 활성 및 열 안정성을 나타내는 제타 타입 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 생산과 활용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110018567

부처명 한국연구재단

연구사업명 해양바이오기초원천기술개발사업

연구과제명 [2차년도] 해양 유래 CA와 PEPCase의 대량생산 및 기능 개량 원천 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.23 ~ 2012.06.22

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탄산탈수효소는 플레시오시스티스 파시피카(Plesiocystis pacifica)유래인 탄산탈수효소.

청구항 3

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 합성용 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 형질전환체는 미세조류인 형질전환체.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 형질전환체는 미생물인 형질전환체.

청구항 7

제4항의 형질전환체를 배양하고,

배양물 또는 형질전환체로부터 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 수득하는 것을 포함하는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 생산방법.

청구항 8

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정용 조성물.

청구항 9

제4항의 형질전환체를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정용 조성물.

청구항 10

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 이산화탄소 포화 용액과 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정 방법.

청구항 11

제4항의 형질전환체를 이산화탄소의 존재 하에서 배양하는 것을 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정방법.

청구항 12

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정장치.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 탄산탈수효소는 지지체에 고정되어있는 것인 이산화탄소의 전환 또는 고정장치.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 이산화탄소는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환되는 것인 이산화탄소의 전환 또는 고정장치.

청구항 15

제14항에 있어서,

바이카보네이트 화합물은 소듐 바이카보네이트(Na_2HCO_3), 포타슘 바이카보네이트(KHCO_3), 마그네슘 바이카보네이트($\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$), 칼슘 바이카보네이트($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) 또는 암모늄 바이카보네이트($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$)인 이산화탄소의 전환 또는 고정장치.

청구항 16

제14항에 있어서,

카보네이트 화합물은 카본산(H_2CO_3), 리튬 카보네이트(Li_2CO_3), 소듐 카보네이트(Na_2CO_3), 포타슘 카보네이트(K_2CO_3), 루비듐 카보네이트(Rb_2CO_3), 세슘 카보네이트(Cs_2CO_3), 베릴륨 카보네이트(BeCO_3), 마그네슘 카보네이트(MgCO_3), 칼슘 카보네이트(CaCO_3), 스트론튬 카보네이트(SrCO_3), 바륨 카보네이트(BaCO_3), 망간 카보네이트(MnCO_3), 철 카보네이트(FeCO_3), 코발트 카보네이트(CoCO_3), 니켈 카보네이트(NiCO_3), 구리 카보네이트(CuCO_3), 실버 카보네이트(Ag_2CO_3), 징크 카보네이트(ZnCO_3), 카드뮴 카보네이트(CdCO_3), 알루미늄 카보네이트($\text{Al}_2(\text{CO}_3)_3$), 탈륨 카보네이트(Tl_2CO_3), 리드 카보네이트(PbCO_3) 또는 란타넘 카보네이트($\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$)인 이산화탄소의 전환 또는 고정장치.

청구항 17

이산화탄소 포화 용액과 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소를 반응시키는 단계; 및
상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법.

청구항 18

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 사용하여 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물을 생산하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

대사 산물은 C4 대사 또는 지질 대사 산물인 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물을 생산하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 C4 대사는 포스포에놀 피루베이트(phosphoenol pyruvate)를 옥살로아세테이트(oxaloacetate)로 전환하는 것인 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물을 생산하는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 지질 대사는 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환하는 것인 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물을 생산하는 방법.

청구항 22

제4항의 형질전환체를 이산화탄소의 존재 하에서 배양하는 것을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소의 대사 산물로의 전환 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

대사 산물은 C4 대사 또는 지질 대사 산물인 바이카보네이트 또는 이산화탄소의 대사 산물로의 전환 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 C4 대사는 포스포에놀 피루베이트(phosphoenol pyruvate)를 옥살로아세테이트(oxaloacetate)로 전환하는 것인 바이카보네이트 또는 이산화탄소의 대사 산물로의 전환 방법.

청구항 25

제23항에 있어서,

상기 지질 대사는 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환하는 것인 바이카보네이트 또는 이산화탄소의 대사 산물로의 전환 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 및 이를 이용한 이산화탄소의 전환 또는 고정화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 오늘날 전 지구적인 환경문제로 대두되고 있는 지구온난화는 인구증가와 더불어 지난 100여 년간 사용해 온 화석연료의 연소과정에서 생기는 이산화탄소와 각종 온실가스가 주원인인 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 대기 중에 이산화탄소와 각종 온실가스의 축적으로 지구에서 방출되는 적외선을 흡수하여 지구의 기온이 상승하고, 이로 인해 극지방의 빙하가 녹아 해수면이 상승하는 등의 많은 환경문제가 야기되는 것으로 보고되고 있다. 현재까지 개발된 이산화탄소를 처리하기 위한 기술은 주로 흡착법이나 막 분리법 같은 물리적 방법과 이산화탄소를 화학적 수단 또는 생물학적 수단을 이용하여 유용물질로 전환하는 고정화 기술 등이 있다. 특히, 상기 기술 중에서 생물학적 수단을 이용한 이산화탄소의 고정화 기술은 자연계의 탄소순환 메커니즘을 이용하는 것으로 가장 환경친화적인 방법으로 평가되고 있다. 상기 생물학적 방법 중 최근 미세조류를 이용한 방법 즉, 미세조류 및 광합성 미생물을 배양함으로써 직접적으로 발전소, 제철소 등의 배기가스를 정화하는 방법에 대한 관심이 증대되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0003] (비특허문헌 0001) P. J. McGinn, F. M. M. Morel Physiologia Plantarum 133 (2008) 78.
- (비특허문헌 0002) G. Puxty, R. Rowland, A. Allport, Q. Yang, M. Bown, R. Burns, M. Maeder, M. Attalla, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 6427.
- (비특허문헌 0003) B. Dawson, M. Spannagle, The Complete Guide to Climate Change, 1st ed., NewYork, Routledge, 2009.
- (비특허문헌 0004) S.W. Lee, S.B. Park, S.K. Jeong, K.S. Lim, S.H. Lee, M.C. Trachtenberg, Micron 41(2010) 273.
- (비특허문헌 0005) W.B. Frommer, Science 327 (2010) 275.
- (비특허문헌 0006) J.D. Figueroa, T. Fout, S. Plasynski, H. McIlvried, R.D. Srivastava, Int. J. Green-house Gas Control 2 (2008) 9.
- (비특허문헌 0007) J.A. Verpoorte, S. Mehta, J.T. Edsall. J. Biol. Chem. 242 (1967) 4221.
- (비특허문헌 0008) P. Mirjafari, K. Asghari, N. Mahinpey. Ind. Eng. Chem. Res. 46 (2007) 921.
- (비특허문헌 0009) N.H. De Leeuw, S.C. Parker. J. Phys. Chem. B. 102 (1998) 2914.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 따라서 본 발명의 주된 목적은 고기능성의 신규 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 제공하는 것이다.
- [0005] 본 발명의 다른 목적은 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 유전자를 함유하는 벡터를 이용하여 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 이산화탄소를 전환(conversion) 또는 고정(fixation)하는 용도 및 이산화탄소의 전환 또는 고정 기술을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 매개로 한 탄소광화를 통한 바이카보네이트 화합물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 촉매로 사용하여 유용 대사 산물을 제조하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 높은 열 안정성을 가지는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase), 이를 고효율로 발현할 수 있는 재조합 벡터 및 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 이용하여 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0011] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 제공한다.
- [0012] 한 구체예에서, 상기 탄산탈수효소는 플레시오시스티스 파시피카(Plesiocystis pacifica) 유래의 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 합성용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하고, 배양물 또는 형질전환체로부터 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 수득하는 것을 포함하는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 생산방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 생산방법에 의해 생산된 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 또는 형질전환체를 이용하여 이산화탄소를 전환 또는 고정하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한 상기 생산방법에 의해 생산된 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 상기 탄산탈수효소가 지지체에 고정되어 있는 것인 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치를 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 상기 이산화탄소가 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환되는 것인 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한 이산화탄소 포화 용액과 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소를 반응시키는 단계; 및
- [0022] 상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 C4 대사 또는 지질 대사에서 촉매로 서열번호 1의 아

미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소를 사용하여 대사 산물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 이산화탄소의 존재 하에서 배양하는 것을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소의 C4 대사 또는 지질 대사 산물로의 전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)는 종래의 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)에 비하여 높은 열 안정성을 가져 보다 효율적이고 안정적인 이산화탄소의 전환 또는 고정 시스템 운영을 위해 사용될 수 있다.

[0026] 또한 이산화탄소에서 전환된 바이카보네이트는 알칼리 양이온 처리로 바이카보네이트 화합물로 회수되어 건자재 또는 제지용 재료 등 다양한 산업용 원료로 활용하거나 미생물 내 C4 대사 또는 지질 대사의 시작 물질로서 유용 대사산물을 생산하기 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 PPCA(Plesiocystis pacifica 유래 carbonic anhydrase) 단백질의 E.coli에서의 최적 발현을 위해 구성한 유전자 벡터 (도 1A), 벡터에 유전자 존재를 확인한 결과 (도 1B), PPCA 단백질의 과발현 확인 (도 1C) 및 정제 결과 (도 1D)이다.

도 2는 PPCA 단백질의 온도에 따른 활성 변화 결과 (도 2A) 및 DSC 결과를 통한 온도에 따른 단백질 구조 변화 결과 (도 2B)이다.

도 3은 PPCA 단백질을 활용하여 이산화탄소를 바이카보네이트로 전환한 후 칼슘이온 존재 하에서 탄산칼슘(CaCO_3) 화합물로 생성시킨 결과, PPCA를 사용하여 얻어낸 탄산칼슘(CaCO_3)의 구조 (도 3A) 그리고 얻어낸 탄산칼슘의 XRD 분석 결과로 칼사이트(Calcite) 형태임을 확인(도 3B)한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0029] 본 발명은 신규 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 및 이를 이용한 이산화탄소의 전환 또는 고정화 방법에 관한 것이다.

[0030] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 신규 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 제공한다.

[0031] 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)는 다음의 반응을 촉매 하는 효소로서 척추동물의 적혈구를 비롯하여 많은 동물의 여러 조직, 식물의 잎 등에서 관찰되고 식물에서는 광합성에 관계한다고 알려져 있다. 현재 알려져 있는 효소 가운데 분자 활성이 가장 커서 효소 1분자는 1분당 3.6×10^7 개의 기질을 변화시킬 수 있는 능력을 가지고 있다.

[0032] [반응식] $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

[0033] 본 발명자들은 구조가 알려진 해양 규조류인 탈라시오시라 웨이스플로기(Thalassiosira weissflogii) 유래의 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)(3BOH)를 기준으로 단백질 데이터베이스로부터 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 기능을 보유한 후보 단백질을 탐색하였다. 탐색 결과 기능이 알려져 있지는 않지만 제타 타입(zeta type) 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)와 구조적으로 유사한 플레시오시스티스 파시피카(Plesiocystis pacifica) SIR-1 유래의 유전자를 확보하였다.

[0034] 이 유전자 서열은 제타 타입 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 특성을 보이지만 활성 측면에서 알파-탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 기질로 알려진 파라-니트로 페닐 아세테이트에 대해서도 활성을 나타내었다. 이는 알파-탄산탈수효소(carbonic anhydrase)에서 보이는 가수분해 활성을 나타내는 제타-타입 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)이다.

[0035] 본 발명에 따른 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소뿐만 아

니라 이들의 변이체, 또는 이들과 상동인 것을 포함한다.

- [0036] 본 발명의 탄산탈수효소는 서열번호 2의 핵산 서열, 또는 이를 숙주에 따라 최적화된 서열(예컨대 서열번호 3의 핵산 서열)로 코딩될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소는 플레시오시스티스 파시피카 유래일 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 합성용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0039] 본 발명에 있어 벡터(vector)는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에서는 재조합 벡터의 제작을 위해 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터, pGEM-T Easy vector에 서열번호 2의 아미노산 서열을 증폭시킨 PCR 단편을 서브클로닝한 후 pQE60 벡터에 삽입함으로써 제조하였다. 대장균 발현용 벡터로 pGEM-T Easy vector, pQE60 벡터를 사용하였지만 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 일반적으로 사용할 수 있는 모든 발현 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0042] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0043] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [0044] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다. 또한 미세조류로서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 클라미도모나스 레인 하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 스피루리나 파시피카(*Spirulina pacifica*), 크립테코드눔 코니(*Cryptocodinium cohnii*), 클로렐라 속(*Chlorella sp.*), 두날리엘라 속(*Dunaliella sp.*), 두날리엘라 바다윌(*Dunaliella bardawil*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다.
- [0045] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하고, 배양물 또는 형질전환체로부터 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 수득하는 것을 포함하는 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)의 생산방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명은 또한 상기 생산방법에 의해 생산된 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 또는 상기 형질전환체를 포함하는 이산화탄소 전환 또는 고정용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명은 또한 상기 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 또는 형질전환체를 이용하여 이산화탄소를 전환 또는 고정하는 방법을 제공한다.
- [0048] 일 예로, 상기 탄산탈수효소를 이산화탄소 포화 용액과 반응시키는 단계를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정 방법일 수 있다.

- [0049] 일 예로, 상기 형질전환체를 이산화탄소의 존재 하에서 배양하는 것을 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정 방법일 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 상기 생산방법에 의해 생산된 탄산탈수효소(carbonic anhydrase)를 포함하는 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치를 제공한다.
- [0051] 본 발명의 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치는 공기로부터 이산화탄소를 추출하여 바이카보네이트로 전환시켜 고정하는 통상의 장치일 수 있다.
- [0052] 예컨대, 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치는 업라이트 타워(upright towers), 챔버(chamber), 및 물 공급부(source of water)를 포함하고, 상기 업라이트 타워는 하부에 적어도 하나의 공기 투입부(air inlet)를 포함하고 타워의 상부에 적어도 하나의 공기 배출부(air outlet)를 포함하고, 상기 챔버는 적어도 하나의 공기 투입구(air inlet)와 적어도 하나의 공기 배출구(air outlet) 사이에 위치하고 이산화탄소를 포집하기 위한 수집기를 포함하며, 상기 물 공급부에서 수지를 흡수하여 이산화탄소를 방출시키는 구조를 가질 수 있고, 상기 이산화탄소를 포집하기 위한 수집기에 본 발명의 재조합 탄산탈수효소를 포함할 수 있다.
- [0053] 다른 구체예에서, 본 발명의 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치는 실내 공기정화 장치일 수 있다. 상기 실내 공기정화 장치는 기존 분수장치 내에 효소가 포함된 담체를 고정한 것으로, 이산화탄소 저감기능 및 가습기능을 겸비하고, 효소가 지속적으로 그 기능을 할 수 있도록 수용액 저장소의 수용액에 잠기도록 구성할 수 있다. 따라서, 상기 효소가 포함된 담체에 포함된 효소는 용해된 이산화탄소를 바이카보네이트로 빠르게 전환하도록 하는 촉매기능을 가져 지속적으로 공기 중 이산화탄소를 저감할 수 있다. 상기 효소로 본 발명의 재조합 탄산탈수효소를 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 이산화탄소 전환 또는 고정 장치에 있어서 탄산탈수효소는 지지체에 고정되어 있을 수 있다.
- [0055] 본 발명의 이산화탄소의 전환 또는 고정용 장치는 본 발명의 재조합 탄산탈수효소를 고정화(immobilization)한 장치일 수 있으며, 효소 고정 방법은 흡착법, 이온결합법, 가교법, 포획법 또는 공유결합법으로 고정할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명은 또한 상기 이산화탄소가 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환되는 것이 이산화탄소의 전환 또는 고정 장치를 제공한다.
- [0057] 본 발명은 또한 이산화탄소 포화 용액과 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소를 반응시키는 단계; 및
- [0058] 상기에서 얻은 반응물과 알칼리 양이온염을 반응시켜 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0059] 탄산탈수효소는 가역반응성이 있어 기질로 이산화탄소뿐만 아니라 바이카보네이트를 사용할 수 있다. 따라서, 이산화탄소 고정 과정에서 이산화탄소에서 전환된 바이카보네이트는 알칼리 양이온의 처리 시 비정질의 바이카보네이트 또는 카보네이트 화합물로 전환될 수 있다.
- [0060] 상기 바이카보네이트 화합물은 소듐 바이카보네이트(Na_2HCO_3), 포타슘 바이카보네이트(KHCO_3), 마그네슘 바이카보네이트($\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$), 칼슘 바이카보네이트($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) 또는 암모늄 바이카보네이트($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$) 등일 수 있다.
- [0061] 상기 카보네이트 화합물은 카본산(H_2CO_3), 리튬 카보네이트(Li_2CO_3), 소듐 카보네이트(Na_2CO_3), 포타슘 카보네이트(K_2CO_3), 루비듐 카보네이트(Rb_2CO_3), 세슘 카보네이트(Cs_2CO_3), 베릴륨 카보네이트(BeCO_3), 마그네슘 카보네이트(MgCO_3), 칼슘 카보네이트(CaCO_3), 스트론튬 카보네이트(SrCO_3), 바륨 카보네이트(BaCO_3), 망간 카보네이트(MnCO_3), 철 카보네이트(FeCO_3), 코발트 카보네이트(CoCO_3), 니켈 카보네이트(NiCO_3), 구리 카보네이트(CuCO_3), 실버 카보네이트(Ag_2CO_3), 징크 카보네이트(ZnCO_3), 카드뮴 카보네이트(CdCO_3), 알루미늄 카보네이트($\text{Al}_2(\text{CO}_3)_3$), 탈륨 카보네이트(Tl_2CO_3), 리드 카보네이트(PbCO_3) 또는 란타넘 카보네이트($\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$) 등일 수 있다.
- [0062] 본 발명은 또한 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄산탈수효소를 사용하여 바이카보네이트 또는 이산화탄소를 이용한 대사 산물을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0063] 본 발명은 또한 상기 탄산탈수효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 탄산탈수효소 합성용 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 이산화탄소의 존재 하에서 배양하는 것을 포함하는 바이카보네이트 또는 이산화탄소의 대사 산

물로의 전환 방법을 제공한다.

- [0064] 상기 대사 산물은 C4 대사 또는 지질 대사 산물로서, C4 대사에서, PEP(phosphoenol pyruvate)에 CO₂를 붙여서 옥살로아세테이트(Oxaloacetate)로 진행되는 PEP carboxylase 반응에서 탄산탈수효소가 촉매(또는 보조 효소)로 연동하여 C4 화합물을 효과적으로 합성할 수 있는 특징이 있다.
- [0065] 또한, 지질 대사에서, 아세틸(Acetyl) CoA에서 바이카보네이트(HCO³⁻)를 붙여서 말로닐(Malonyl) CoA로 진행되는 아세틸(Acetyl) CoA 카르복실라아제(carboxylase) 반응에서 탄산탈수효소가 촉매(또는 보조 효소)로 연동하여 말로닐 CoA를 효과적으로 합성할 수 있는 특징이 있다.
- [0066] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] <실시예 1> PPCA 유전자 서열의 발굴 및 코돈의 최적화
- [0068] 탈라씨오시라 웨이스플로기(*Thalassiosira weissflogii*) 유래의 카드뮴에 특이적인 탄산탈수효소(cadmium-specific carbonic anhydrase(CDCA))의 아미노산서열 (PDB ID: 3BOH) 과 탈라씨오시라 슈도나나(*Thalassiosira pseudonana*) 유래의 CDCA유사 구조 단백질 서열 (Genbank ID: XP_002295227)을 기준으로 젠뱅크 데이터베이스 (Genbank database)를 검색한 결과 플레시오시스티스 파시피카(*Plesiocystis pacifica*) SIR-1 유래의 아직 특성이 부여되지 않은 CDCA 유사 단백질을 찾고 이름을 PPCA로 명명하였다 (Genbank ID: ZP_01905628). 플레시오시스티스 파시피카(*Plesiocystis pacifica*)SIR-1는 그람 음성균이며, 호기성과 간상(Rod-shaped)인 성질이 있다. PPCA는 CDAC1-R2과 41% 유사성을 나타내었다. 유전자 서열은 플레시오시스티스 파시피카(*Plesiocystis pacifica*) SIR-1 전체 유전자 서열 (Genbank ID: NZ_ABCS01000003)중 103755번부터 104435번까지 해당하며 서열정보는 서열번호 2에 나타내었다.
- [0069] 플레시오시스티스 파시피카(*Plesiocystis pacifica*) SIR-1 의 PPCA 유전자 서열 정보를 대장균에서 발현이 용이하도록 코돈 최적화 툴(<http://www.encorbio.com/protocols/Codon.htm>)을 이용하여 코돈 최적화를 실시한 후 바이오닉스 (Bionics Co., Seoul, Korea)를 통해 최적화된 PPCA 유전자를 합성을 통해 확보하였다(서열번호 3). PPCA 단백질은 총 226개의 아미노산으로 이루어져 있다(서열번호 1).
- [0070] <실시예 2> PPCA의 클로닝 및 발현
- [0071] PPCA의 대장균 발현을 위해 최적화된 유전자 서열 (서열번호 3)을 *Nco*I 제한 효소 자리가 5 ‘ 말단에 첨가된 포워드 프라이머(forward primer, 5’ - ACCATGGGAACCCCGCAGGATATTAAGCGGCGCTG-3’) 와 5’ 말단에 *Bgl*III 제한 효소 자리가 첨가된 리버스 프라이머(reverse primer, 5’ - AGATCTGTTCACAATAATGCGCGCTTTGCGCACATC-3’)를 이용하여 증폭시킨 후 (PCR 조건; 94 ° C for 7min, ×1; 94 ° C for 1min, 45 ° C for 1min, 72 ° C for 1min, ×30; 74 ° C for 10min, ×1), pGEM-T Easy vector (Promega co., Madison, WI)에 PCR 단편을 서브클로닝한 후 상기 각 제한 효소를 처리하여 잘린 PCR 단편을 같은 제한 효소로 처리된 pQE60벡터에 라이게이션(ligation)시켜 *E.coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 PPCA 생산 유전자가 클로닝된 벡터인 pQE60-PPCA를 제조하였다 (도 1A, B). 구축한 발현 벡터를 *E.coli* M15 (pRep4)에 형질전환시켜 PPCA 단백질을 생산할 수 있는 균주를 확보하였다. 단백질 생산 균주를 100 μg/ml 농도의 암피실린이 첨가된 LB (luria broth; 1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 배지에 접종하여 37℃에서 배양액의 흡광도가 600 nm에서 0.4~0.6에 이를 때까지 키운 후 최종 농도가 1 mM 농도가 되도록 IPTG를 첨가 후 20℃에서 20~24시간 키워 재조합 단백질 발현을 유도하였다. 원심분리를 통해 회수된 균체를 50 mM 트리스-염산(Tris-HCl) 완충용액(pH 7.6)으로 부유시킨 후 소니케이터(sonicator, Branson Ultrasonic Co., Mexico)를 이용하여 초음파 처리로 균체를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 12,000 rpm에서 30분간 원심분리여 상청액과 침전물로 나누어 각 부분의 단백질을 SDS-PAGE 전기 영동을 실시하여 발현 단백질의 위치와 크기를 확인하였다 (도 1C).
- [0072] <실시예 3> 발현 단백질의 정제
- [0073] IPTG 로 단백질 발현을 유도한 후 20℃에서 20~24시간 배양 한 배양균체 약 10g 당 40 ml의 라이시스 버퍼

(lysis buffer; 25 mM Tris-SO₄, 0.1% Triton X-100, 및 1 ml of EDTA-free protease cocktail)에 부유시킨 후 초음파 처리 (Branson Digital Sonifer-250; Danbury, CT, USA) 로 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액에 20 µg/ml DNase I, 15 mM MgSO₄, 0.5 mM ZnSO₄을 첨가한 후 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 불용성 물질을 제거하고 가용성 분획만을 회수하여 평형화 완충액 (50 mM NaH₂PO₄-NaOH, 0.3 M NaCl, pH 7.6)으로 미리 평형화시켜 놓은 HisPurTM Cobalt resin (Thermo Fisher Scientific Inc.)과 섞어 1시간 동안 얼음(ice)에서 20~30 rpm으로 흔들어 주며 반응시켰다. 세포가 용액과 수지(resin)혼합액을 크로마토그래프 컬럼(chromatograph column)에 채우고 자연낙하로 수지(resin)가 충전되게 한 후 수지(resin)에 붙지 않는 단백질들은 컬럼의 10배 부피의 세척용 완충액(washing buffer; 50 mM NaH₂PO₄-NaOH, 0.3 M NaCl, 10 mM 이미다졸, pH7.6)을 통해 제거하고 수지(resin)에 결합된 His-tag을 갖는 재조합 단백질은 용출 완충액(50 mM NaH₂PO₄-NaOH, 0.3 M NaCl, 150 mM 이미다졸, pH7.6)로 용출시켰다. 용출 분획은 12 % SDS-PAGE를 실시하여 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue R-250; Bio-Rad)로 염색 후 25 kDa의 밴드(band)만을 나타내는 용출된 분획을 모아서 아미콘 울트라-0.5 디바이스(Amicon Ultra-0.5 device; Millipore Co., Billerica, MA, USA)를 이용하여 최종 10 µM ZnSO₄ 가 포함된 25 mM Tris-SO₄ 완충액으로 교환하면서 단백질을 농축시켰다. 단백질 정제 전 과정은 4° C에서 진행 되었다. 단백질 농도는 BSA를 표준 단백질로 하여 브래드포드(Bradford)법을 이용하여 측정하였다. 정제된 단백질은 도 1D에 나타내었다.

[0074] <실시예 4> 발현 단백질의 이산화탄소 수화(hydration) 활성 측정 및 에스테라제(esterase) 활성 측정

[0075] 베로날 완충액(Veronal buffer) 2 ml(pH 8.2), 0.004% 브로메티몰 블루(bromethymol blue) 0.2 ml, PPCA 희석액 0.8 ml, 그리고 여기에 얼음 상태에서 탈이온 3차 증류수에 1시간 동안 이산화탄소 가스를 녹여 이산화탄소로 포화된 탄산수 2 ml를 섞은 후 지시약의 색이 푸른색에서 연두색(yellow-green)으로 바뀌는 데 필요한 시간을 계산하였다(t). PPCA에 의한 촉매반응 없이 자연적으로 지시약의 색이 푸른색에서 연두색(yellow-green)으로 바뀌는 데 필요한 시간을 t₀으로 계산하여 활성은 윌버-앤더슨 유니트(WAU, Wilbur-Anderson unit)로 표현하고 다음의 공식에 따라 구하였다.

[0076]
$$WAU = (t_0 - t) / t$$

[0077] PPCA는 서열은 제타 타입(zeta-type) 탄산탈수효소 특성을 보이지만 활성측면에서 알파 타입 탄산탈수효소의 기질로 알려진 파라-니트로 페닐 아세테이트(p-nitro phenyl acetate)에 대해서도 활성을 나타내었다. PPCA의 에스테라제(esterase) 활성은 파라-니트로 페닐 아세테이트(p-NPA)를 기질로 가수분해되어 생성되는 파라-니트로 페놀(p-nitro phenol, p-NP)의 양을 분광광도계를 이용하여 348nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다 (p-NP, Δε = 5000 m⁻¹ cm⁻¹). 반응 조건은 25° C, 반응 완충액은 50 mM Tris-SO₄ buffer (pH7.6) 1.4 ml, 3 mM p-NPA 1 ml, 0.5 ml 3차 증류수에 0.1 ml의 PPCA 용액을 넣어 최종 3 ml 부피로 맞추었다. 자연적으로 가수분해되는 p-NP 양을 효소가 없는 같은 반응 조건에서 시행하여 측정 후 효소 반응값에서 제한 후 최종 효소 활성을 계산하였다. 효소 활성 1 유니트(U)는 분당 1nmoles의 p-NP를 생산하는 필요한 효소 양으로 정의하였다. 정제된 PPCA의 활성도는 1874.254 unit/mg이다.

[0078] <실시예 5> PPCA의 열 안정성 및 시차주사열량분석

[0079] 정제된 단백질을 50 µl씩 1.5 ml의 에펜도르프 튜브(ependorf tube)에 담아 파라필름(parafilm)으로 봉한 후 10, 20, 40, 50, 60, 70 그리고 80° C까지 각각 온도를 맞춘 수조에서 정제 샘플을 각 온도당 3개씩 1시간 동안 정치시킨 후 얼음(ice)으로 옮겨 식힌 후 3 mM p-NPA 300 µl를 넣고 Tris-SO₄ 완충용액을 넣어 최종 부피를 900 µl로 맞춘 후 시간에 따른 p-NPA 가수 분해 활성을 측정하였다. 4°C에서 보관한 PPCA의 활성을 100%로 환산하여 각 온도에서의 상대 활성을 계산하였다. 열 안정성을 조사한 결과 80°C에서 오히려 활성이 증가하는 것을 확인하였다(도 2A). 이에 PPCA는 고온에서도 활성을 나타내며 열 안정성이 높은 탄산탈수효소임을 확인하였다. 통상적인 탄산탈수효소가 60°C에서 반 이상의 활성을 잃어버리는 것을 고려할 때 고안정성의 탄산탈수효소임을 확인하였다.

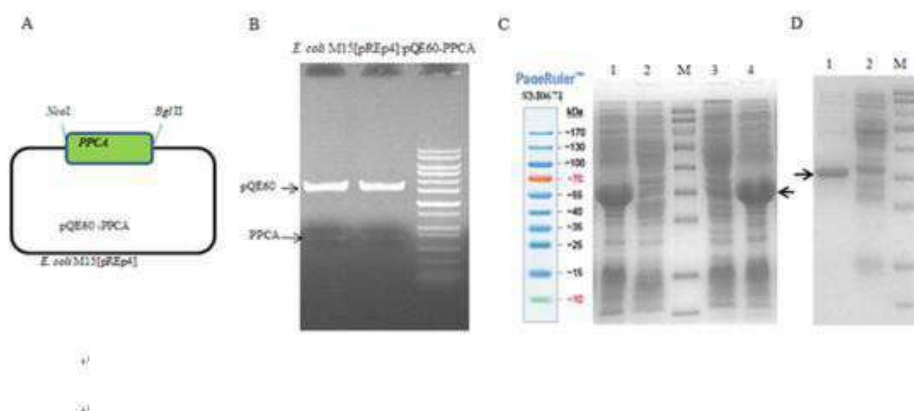
[0080] 또한 시차주사열량분석기 (DSC: Differential Scanning Calorimeter)를 이용하여 PPCA의 열 안정성을 분석하였다. 브이피 캐필러리 시차주사열량분석기(VP-capillary DSC; MicroCal, Northampton, MA, USA)를 이용하여 PPCA의 전이온도 (T_m) 측정하였다. 정제 단백질내에 함유된 이미다졸 농도를 제거하기 위해 아미콘 울트라-0.5 디바이스(Amicon Ultra-0.5 device; Millipore Co., Billerica, MA, USA)를 이용하여 100 mM 인산 나트륨 완충액(sodium phosphate buffer; pH 7.0)로 교환 후 40℃에서 100℃까지 분당 1℃씩 온도를 올려가며 각 온도에서의 변화를 측정하였다. 측정 결과 두 가지 온도에서 구조 변화가 일어나는 것을 확인하였다 (도 2B). 이는 첫 번째, 85℃에서 멀티머(multimer)가 단위체(monomer)로 전환하는 변화와 97℃에서 단위체(monomer)인 PPCA 자체의 구조가 변성되는 결과로서 각각의 온도가 85℃, 97℃의 높은 온도에서 관측되는 것으로 보아 PPCA는 높은 열 안정성을 가진 것으로 확인되었다.

[0081] <실시예 6> 칼사이트(calcite) 형성 반응

[0082] 이산화탄소에서 전환된 바이카보네이트(bicarbonate)는 칼슘이온 처리로 탄산칼슘으로 전환되어 칼사이트, 아라고나이트, 베타라이트의 세 가지 결정 구조로 결정화 될 수 있다. 탄산탈수효소 매개의 탄소 광화를 통한 탄소 고정법은 탄산탈수효소에 의한 이산화탄소의 바이카보네이트(bicarbonate)로의 빠른 전환속도를 이용하여 칼슘 이온의 존재 하에서 신속하게 이산화탄소를 제거하면서 동시에 유용한 탄산염 무기성 원료를 생산하는 기술이다. 본 발명에 의해 생산된 PPCA의해 칼사이트(calcite)형성 반응은 먼저 1 M Tris-SO4 (pH8.5) 완충용액 1 ml에 100 μ g PPCA를 넣은 후 얼음(ice) 상태에서 탈이온 3차 증류수에 1시간 동안 이산화탄소 가스를 녹여 이산화탄소로 포화된 탄산수 10 ml를 섞어 15 분간 이산화탄소를 바이카보네이트(bicarbonate)로 전환시킨 후 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 용액 10 ml와 서서히 반응 시킨 후 곧 바로 1 M 트리스 완충액(Tris-buffer; pH 9.5, 2 ml)를 첨가하여 탄산칼슘(CaCO_3) 침전 반응을 유도한 후 35℃ 와 45℃에서 각각 5분씩 반응 후 결정체를 60℃에서 말린 후 주사 전자 현미경을 통해 결정 모양을 (도 3A), 다목적 X-선 회절분석기 (XRD)를 이용하여 탄산칼슘의 결정 분포 변화를 확인하였다 (도 3B).

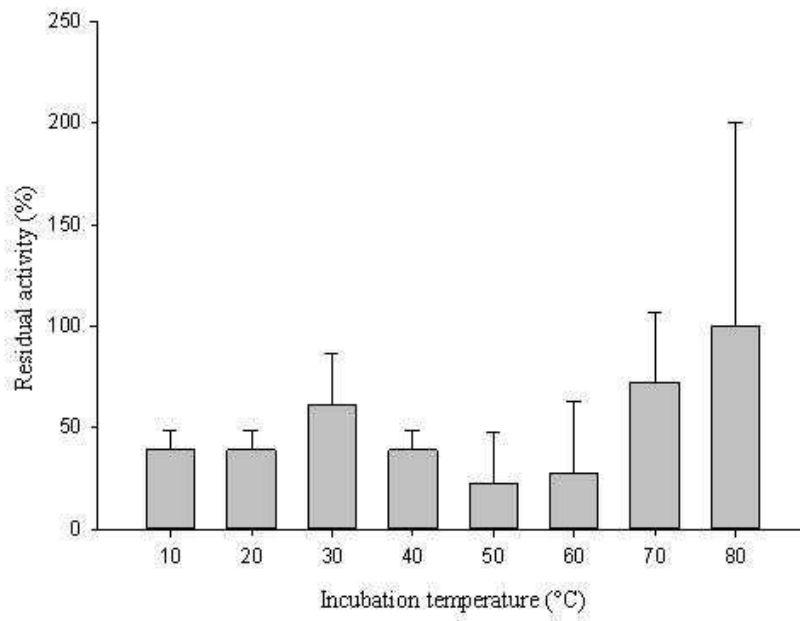
도면

도면1

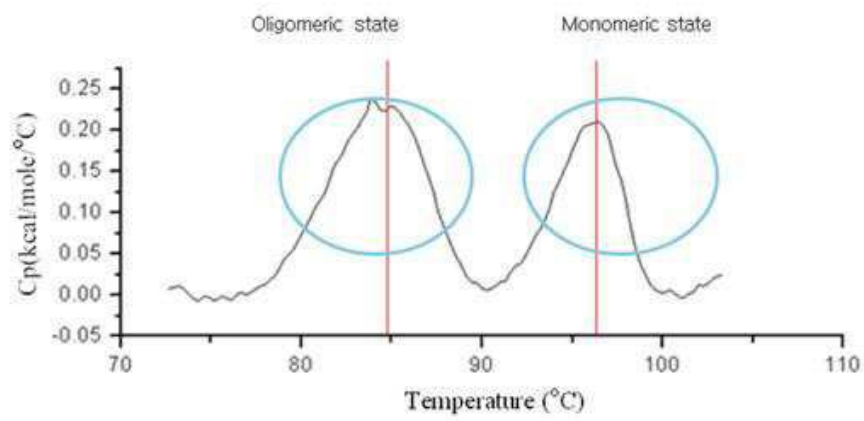


도면2

A.

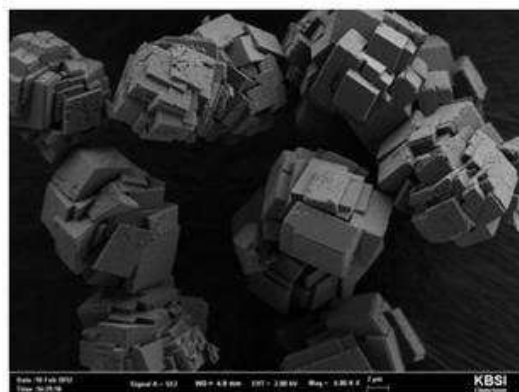


B.



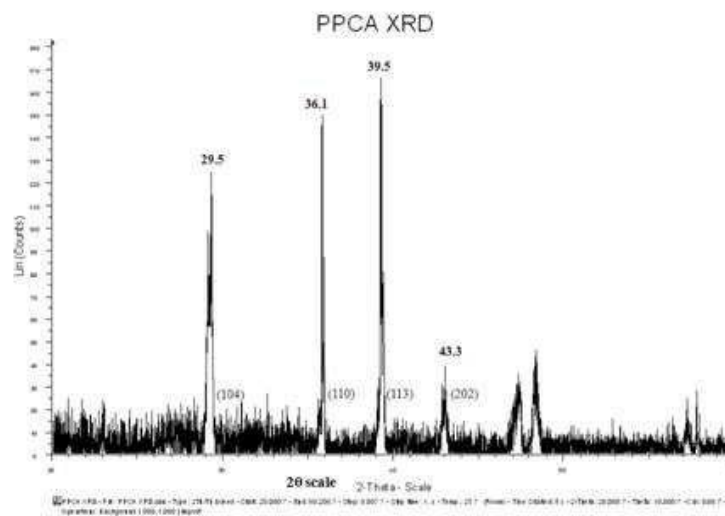
도면3

A



B

B



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY Research and Business Foundation
- <120> Novel carbonic anhydrase and method of CO₂ conversion or fixation using the same
- <130> P-120471
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 226
- <212> PRT
- <213> Plesiosystis pacifica SIR-1
- <400> 1

Met Thr Pro Gln Asp Ile Lys Ala Ala Leu Glu Ala Arg Gly Trp Thr
1 5 10 15
Ala Thr Ile Val Pro Arg Ser Glu Val Ser Asp Ile Val Asp Val Gly
20 25 30
Gly Asp Gly Leu Met Lys Cys Val Asp Gly Arg Pro Ser Phe His Pro
35 40 45
Ala Met Asn Gly Pro Lys Thr Leu Gly Gly Val Tyr Ala Ile Ala Ser
50 55 60
Met Arg Asp Ala Arg Asp Val Ala Gly Leu Val Gln Ala Thr Arg Asp
65 70 75 80
Val Ala Ala Phe Gly His Val Pro Ser Val His Gly Asp Gln His Ala
85 90 95
Glu Pro Pro Pro Met Gly Cys Gly Tyr Phe Lys Leu Trp Lys Thr Gly
100 105 110
Lys Leu Met Asn Leu Ala Pro Glu Gly Lys Glu Asp Glu Phe Lys Ala
115 120 125
Ser Glu Leu Pro Lys Gly Ile Val Pro Pro Asn Tyr Ser Ala Glu Glu
130 135 140
Gly Ser Glu Ile Val Leu Ser Glu Gly Gly Val Tyr Glu Thr Leu Glu
145 150 155 160
Gly Ala His Glu Glu Gln Glu Val Val Ile Asn Leu Val Thr Asp Thr
165 170 175
Thr Phe Glu Pro Ser Arg Glu Ser Gln Arg Phe Val Val Asp Ala Trp
180 185 190
Ile Thr Asp Lys Phe Asn Ile Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala
195 200 205
Ala Lys Thr Val Glu Leu Leu Ser Asp Val Arg Lys Ala Arg Ile Ile
210 215 220
Val Asn
225
<210> 2
<211> 681

<212> DNA

<213> Plesiocystis pacifica SIR-1

<400> 2

atgaccctc aagacatcaa ggcggccctc gaggcgcgcg gctggacggc gacgatcgtg 60

ccccgcagcg aggtcagcga catcgtcgac gtcggcggcg acgggtcat gaagtgcgtc 120

gacgggcggc cctccttcca cccggccatg aacgggccca agaccctcgg tggggtctac 180

gccatcgct cgatgcgcga cgctcgcgac gtcgccgggc tggccaagc gactcgcgac 240

gtcgtcgtcgt tcggccacgt gccctcggtc cacggagacc aacacgtga gcctccgccc 300

atggggtgcg gctacttcaa gctgtggaag acagggaagc tgatgaacct ggctccggag 360

ggtaaggaag acgagttcaa ggccagttag ctgcccaagg gtatcgttcc gccaaactac 420

tcggccgagg agggcagtga aattgtgctg tccgaaggcg gtgtctacga gaccctggag 480

ggggcacatg aagagcaaga ggtggtcatc aacctcgtca cggacacgac cttcgagccc 540

agccgggagt cgcagcgttt cgtggtcgat gcgtggatca ccgacaagtt caacatcgat 600

gcaggtcgct acttgacggt tgcggcgaag accgtcgagc tgctgtccga cgtccgcaag 660

gcgcggatca tcgtcaactg a 681

<210> 3

<211> 681

<212> DNA

<213> Plesiocystis pacifica SIR-1

<400> 3

atgaccccg aggatattaa agcggcgcgtg gaagcgcgcg gctggaccgc gaccattgtg 60

ccgcgcagcg aagttagcga tattgtggat gtggcgggcg atggcctgat gaaatgcgtg 120

gatggccgcc cgagctttca tccggcgatg aacggcccga aaacctggg cggcgtgtat 180

gcgattgcga gcatgcgcga tgcgcgcgat gtggcgggcc tggtcaggc gaccgcgat 240

gtggcggcgt ttggccatgt gccgagcgtg catggcgatc agcatgcgga accgcgccg 300

atgggctgcg gctattttaa actgtgaaa accggcaaac tgatgaacct ggcgccgga 360

ggcaaagaag atgaatttaa agcgagcga ctgccgaag gcattgtgcc gccgaactat 420

agcgcggaag aaggcagcga aattgtgctg agcgaaggcg gcgtgtatga aacctggaa 480

ggcgcgcgat aagaacagga agtggtgatt aacctggtga ccgataccac ctttgaaccg 540

agccgcgaaa gccagcgtt tgtgtggat gcgtggatta ccgataaatt taacattgat 600

gcgggcccgt atctgaccgt ggcgcgaaa accgtggaac tgctgagcga tgtgcgcaa 660

gcgcgcatta ttgtgaacta a

681