



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0042387
(43) 공개일자 2008년05월15일

(51) Int. Cl.

C12P 23/00 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0110732

(22) 출원일자 2006년11월09일

심사청구일자 2006년11월09일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김영태

부산 해운대구 좌동 1448번지 경남선경아파트 10
7동 1002호

이재형

부산 남구 대연3동 삼성아파트 103동 505호

(74) 대리인

최규환

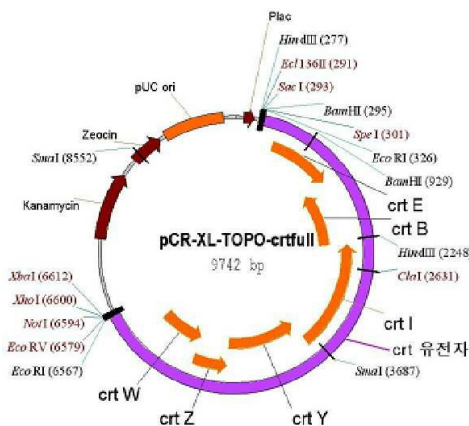
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 이소프레노이드와 카로티노이드 생합성 유전자로 형질전환된 대장균 및 이를 이용한 아스타잔틴의 대량 생산방법

(57) 요약

본 발명은 이소프레노이드와 카로티노이드 생합성 유전자로 형질 전환된 대장균 및 이를 이용한 아스타잔틴의 대량 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 파라코커스 해운대시스로부터 분리한 카로티노이드 생합성에 관여하는 *crt* 유전자를 이용한 카로티노이드를 생산하지 않는 미생물에서 카로티노이드 최종 생성물인 아스타잔틴을 생산할 수 있도록 하기 위해 재조합된 pCR-XL-TOPO-*crt*ful 벡터 및 아스타잔틴의 최대 생성을 유도하기 위한 이소프레노이드 합성에 관여하는 유전자인 *idi* 유전자가 재조합된 pACYC 184-T7promoter-*idi* 벡터를 동시형질전환시킨 대장균 균주와 상기 대장균 균주로부터 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 pACYC 184-T7promoter-idi 벡터를 동시형질전환하여 아스타잔틴을 생산하지 않는 대장균에서 아스타잔틴을 대량생산하는 것을 특징으로 하는 아스타잔틴 대량 생산 방법.

청구항 2

재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 pACYC 184-T7promoter-idi 벡터를 동시형질전환하여 아스타잔틴을 대량생산하는 대장균 균주.

청구항 3

이소프레노이드 공급에 중요한 전구물질 변환 효소의 유전자인 *idi* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pACYC 184-T7promoter-idi.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <8> 본 발명은 이소프레노이드와 카로티노이드 생합성 유전자로 형질 전환된 대장균 및 이를 이용한 아스타잔틴의 대량 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 파라코커스 해운대시스로부터 분리한 카로티노이드 생합성에 관여하는 *crt* 유전자를 이용한 카로티노이드를 생산하지 않는 대장균에서 카로티노이드 최종 생성물인 아스타잔틴을 생산할 수 있도록 하기 위해 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 아스타잔틴의 최대 생성을 유도하기 위한 이소프레노이드 합성에 관여하는 유전자인 *idi* 유전자가 재조합된 pACYC 184-T7promoter-idi 벡터를 동시형질전환시킨 대장균 균주와 상기 대장균 균주으로부터 아스타잔틴을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.
- <9> 카로티노이드(carotenoids)는 항산화 활성을 가지고 있는 C₄₀ 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로서, 그 예로는 아스타잔틴(astaxanthin; 연어 및 바다가재에 존재; 도 1), 라이코펜(licopen; 토마토의 적색 색소), 푸코잔틴(fucoaxanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소) 등이 있다. 특히, 아스타잔틴의 항산화력은 다른 카로티노이드의 10배 이상이고, α-토코페롤(tocopherol)의 100배 이상인 것으로 알려져 있다. 또한, 현재까지 아스타잔틴의 독성(toxicity)에 대해서는 보고된 바 없다. 따라서, 아스타잔틴은 신경질환(neurodegenerative diseases), 암(cancer), 면역질환(immune disorders), 심장혈관질환(cardiovascular diseases) 등을 포함하는 다양한 질환의 치료 및 예방에 이용되고 있다. 이러한 이유로 아스타잔틴의 수요는 매년 15% 이상의 소비성장을 보이고 있으며, 이에 따라 아스타잔틴의 중요성이 대두되고 있다.
- <10> 최근에 스위스의 호프만-라로체(F. Hoffman-LaRoche)사에서 아스타잔틴의 화학 합성법을 개발하였으나, 화학합성으로 제조된 아스타잔틴은 천연 아스타잔틴에 비해 낮은 생체 흡수율을 보이고, 식품 첨가제로서의 안전성에 문제가 되고 있어 유럽의 일부 국가에서만 사용이 허가된 상태이다. 따라서, 천연 아스타잔틴의 합성법에 관심이 집중되고 있으며, 아스타잔틴을 생산하는 미생물을 이용한 아스타잔틴의 제조에 상업적 관심이 일고 있다. 현재 아스타잔틴을 생산하는 것으로 알려진 미생물로는 효모인 파피아 로도지마(*Phaffia rhodozyma*; Miller *et al.*, 1976, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 529-536), 녹색조류인 해마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*; Bubrick, 1991, *Bioresour Technol.*, 38: 237-239), 그람-양성균 브레비박테리움 103(*Brevibacterium* 103; Lizuka & Nishimura, 1969, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15: 127-134), 그람-음성균 아그로박테리움 아우란티아컴(*Agrobacterium aurantiacum*; Yokoyama *et al.*, 1994, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1842-1844), 파라코커스 마르쿠시아이(*Paracoccus marcusii*; Harker *et al.*, 1998, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 543-548) 및 파라코커스 카로티니파시엔스(*Paracoccus carotinifaciens*; Tsubokura *et al.*, 1999, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 277-282) 등과 최근에 본 발명자들에 의해 동정된 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaesis*; Lee *et al.*, 2004, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 54: 1699-1702)등이 알려져 있다.

<11> 한편, 카로티노이드 생합성 경로는 일반적인 이소프레노이드(isoprenoid) 경로 (도 2)의 중요한 중간 생성물인 FPP(farnesyl pyrophosphate)로부터 파생한다. 도 3을 참조하면, FPP와 IPP(isopentenyl pyrophosphate)는 *crtE*에 의해 암호화되는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신테아제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase)에 의해 GGPP(geranylgeranyl pyrophosphate)로 된다. 이후, GGPP는 *crtB*에 의해 암호화되는 피토엔 신테아제(phytoene synthase), *crtI*에 의해 암호화되는 피토엔 디세투레이즈(phytoene desaturase), 그리고 *crtJ*에 의해 암호화되는 리코펜 싸이클레이즈(lycopene cyclase)에 의해 일련의 반응을 거쳐 β-카로텐으로 전환된다. 따라서 카로티노이드 최종 생성물인 아스타잔틴의 최대 생성을 유도하기 위해서는 전구물질을 다량으로 공급하는 것이 중요하며, 이를 위해 이소프레노이드 공급에 중요한 전구물질 변환 효소(isopentenyl diphosphate isomerase)가 필요하며 이들의 대량 발현이 요구된다.

<12> 이에, 본 발명자들은 본 발명자들의 앞선 연구에 의해 보고되어진 파라코커스 해운대시스로부터 분리한 카로티노이드 생합성에 관여하는 *crt* 유전자(대한민국 공개특허 제 10-0085369호)를 이용한 카로티노이드를 생산하지 않는 미생물에서 카로티노이드 최종 생성물인 아스타잔틴을 생산할 수 있도록 하기 위해 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull DNA와 아스타잔틴의 최대 생성을 유도하기 위한 이소프레노이드 합성에 관여하는 유전자인 *idi*(isopentenyl diphosphate isomerase, genebank accession No. AF119715) 유전자를 이용하여 아스타잔틴의 생합성을 효율적으로 향상시켜 대량생산하는 방법을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 본 발명의 목적은 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 pACYC 184-T7promoter-*idi* 벡터를 동시형질전환하여 아스타잔틴을 생산하지 않는 대장균에서 아스타잔틴을 대량생산하는 방법을 제공하는 것이다.

<14> 본 발명의 다른 목적은 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 pACYC 184-T7promoter-*idi* 벡터를 동시형질전환하여 아스타잔틴을 대량생산하는 대장균 균주를 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은 이소프레노이드 공급에 중요한 전구물질 변환 효소의 유전자인 *idi* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pACYC 184-T7promoter-*idi*를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<16> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 pACYC 184-T7promoter-*idi* 벡터를 동시형질전환하여 아스타잔틴을 생산하지 않는 대장균에서 아스타잔틴을 대량생산하는 방법을 제공한다.

<17> 또한 본 발명은 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터 및 pACYC 184-T7promoter-*idi* 벡터를 동시형질전환하여 아스타잔틴을 대량생산하는 대장균 균주를 제공한다.

<18> 또한 본 발명은 이소프레노이드 공급에 중요한 전구물질 변환 효소의 유전자인 *idi* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pACYC 184-T7promoter-*idi*를 제공한다.

<19> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<20> 본 발명의 카로티노이드 생합성 유전자인 전체 *crt* 유전자는 6,223 bp의 크기이며, 그 내부에는 5'→3' 방향으로 *crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI*, *crtB* 및 *crtE* 유전자가 순서대로 위치하고 있다(도 4, 서열번호 1).

<21> 본 발명에서는 pCR-XL-TOPO 벡터와 pACYC 184를 사용하여 *crt* 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 이소프레노이드 전환효소를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 'pCR-XL-TOPO-crtfull'와 'pACYC 184-T7promoter-*idi*'이라 명명하였다. 본 발명에서 사용될 수 있는 기본 벡터는 유전자의 클로닝 또는 발현에 일반적으로 사용되는 벡터라면 제한없이 사용될 수 있다.

<22> 본 발명에서의 숙주세포는 대장균을 사용할 수 있으며, 대장균은 BL21(DE3) 균주로 선택되는 것이 바람직하나 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

<23> 본 발명의 실시예에서는 *crt* 유전자와 *idi* 유전자를 포함하는 각각의 재조합 벡터를 제작하고, 상기 재조합 벡터들을 아스타잔틴을 생산하지 않는 대장균 균주에 동시형질전환하여 상기 대장균 균주로부터 생산된 아스타잔틴의 양을 측정한 결과, 아스타잔틴 생산균주인 파라코커스 해운대시스에서 25 μg/g(dry weight), pCR-XL-TOPO-crtfull로만 형질전환된 대장균 균주에서 50 μg/g(dry weight), pCR-XL-TOPO-crtfull 및 pACYC 184-T7promoter-*idi*로 동시형질전환된 대장균 균주에서는 80 μg/g(dry weight)을 생산함을 확인하였다.

- <24> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다.
- <25> 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <26> 실시예 1. *crt* 유전자 클로닝 및 재조합백터의 제작
- <27> 해운대 연안의 부영양화 되어진 환경에서 니스킨(Niskin) 개량형 채수기인 MB 채수기를 이용하여 해수를 채취하고, 상기의 해수를 해수배지인 PPES-II (Taga, 1968)에 접종하여 25℃에서 48시간 배양시킨 후, 색을 띄는 균을 분리함으로써 분리 동정된 파라코커스 해운대시스(대한민국 등록특허 제10-0511770호)에서 게놈 DNA(Genomic DNA)를 추출하여 슈퍼코스 1 코스미드 벡터 키트(SuperCos 1 Cosmid Vector Kit, stratagene사)를 이용하여 코스미드 게놈 라이브러리(Cosmid genomic library)를 제작하였다. 제작된 코스미드 게놈 라이브러리를 암피실린(ampicillin)이 첨가된 LB 배지에 카로티노이드 계통의 공통된 기질 중의 하나인 FPP를 1%가 되도록 첨가한 후, 플레이트(plate)에 도말해 37℃에서 배양하여 그 중에서 오렌지색이나 빨간색을 띄는 콜로니를 선별한 후, 상기 콜로니로부터 코스미드 벡터를 분리하였다. 염기서열 분석은 클론된 DNA를 추출한 다음, DNA 염기서열 자동분석기를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 카로티노이드 생합성에 관련된 모든 염기 서열을 분석한 후, 각 제한 효소 부위를 확인하고, pACYC 184 벡터에 클로닝하여 long PCR를 수행하여 하나의 벡터로 재조합시켰다. 이를 위해서 HLpremix(Bioneer), LA Taq (Takara)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 하고, 3 kb에서 10 kb까지 T-벡터 라이게이션(ligation)이 가능한 pCR-XL-Topo 벡터(인비트로젠사)에 라이게이션시켜 pCR-XL-TOPO-crtfull(도 5) 재조합백터를 완성하였다.
- <28> 실시예 2. *idi* 유전자 클로닝 및 재조합백터의 제작
- <29> 이소프레노이드 합성 유전자인 *idi*(서열번호 2)를 대장균인 *E. coli*(*Escherichia coli*)의 게놈 DNA에서 PCR을 통하여 클로닝하고, 이들 서열을 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 존재하는 DNA 염기서열 데이터베이스를 이용하여 기존에 밝혀진 대장균 *idi* 유전자들과 비교 분석을 실시하여 유전자를 검증하였다. 검증되어진 클론을 pET 벡터 또는 pT7 벡터로 재조합하여 발현을 유도하였으며, 발현이 확인되어진 pET-*idi* 또는 pT7-*idi*를 이용하여 T7 프로모터(T7 promoter)를 포함하는 *idi*를 PCR을 통하여 증폭시킨 후 T-벡터에 클로닝하였다. 그 후 제한효소 *Nco*I과 *Eco*RI를 이용하여 pACYC184 벡터로 재조합시켜 pACYC 184-T7promoter-*idi*(도 6) 재조합백터를 완성하였다.
- <30> 실시예 3. 두 재조합백터의 동시형질전환
- <31> 상기 실시예 1과 2에서 완성시킨 *crt* 유전자와 이소프레노이드 합성 유전자를 포함하는 두 재조합 벡터인 pCR-XL-TOPO-crtfull 및 pACYC 184-T7promoter-*idi*를 대장균 균주 중 하나인 BL21(DE3)에 형질 전환하였다. 대장균의 동시형질전환체에서 두 재조합 백터의 확인과 발현을 위해서는 복제 기점(origin)이 다른 벡터와 항생제 선별 마커(marker)가 다른 벡터를 사용하여 동시형질전환을 시켜야한다. 상기의 방법으로 실시예 1에서 완성시킨 pCR-XL-TOPO-crtfull을 먼저 대장균 BL21(DE3)에 형질전환한 후, 상기 형질전환체에 다시 이소프레노이드를 생합성하는 pACYC 184-T7promoter-*idi*를 동시형질전환시켜 형질전환체를 완성하였다.
- <32> 실시예 4. 아스타잔틴 생산 분석
- <33> 재조합 벡터 pCR-XL-TOPO-crtfull, pACYC 184-T7promoter-*idi*를 BL21(DE3)에 동시형질전환(co-transformation)시키고, 상기의 형질전환체를 카나마이신(kanamycin)과 테트라사이클린(tetracycline)으로 선별한 후, 선별된 균주를 50 ml LB 배지에서 37℃, 6시간 동안 배양하였다(OD₆₀₀=0.5). 상기 배양 균주(동시형질전환체)와 대조구로 pCR-XL-TOPO crtfull로만 형질전환된 전환체를 LB 배양액 외에 어떠한 첨가된 기질 없이 10 시간 동안 각각 배양하였다. 배양이 끝난 균주를 13,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 버리고, 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 메탄올 20 ml를 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하여 4℃에서 하룻밤동안 배양하고, 13,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 수득하였다. 아스타잔틴의 생성 유무를 확인하기 위하여, 상기 상등액 1 ml를 취하여 직경 0.45 μm의 필터로 여과한 후, HPLC 분석(column: 4.6× 250mm, uBondapak C18, Waters, Milford, MA; mobile phase: acetonitrile-methanol-water(49:44:7 v/v), Flow: 10ml/min, Detector: 470nm)을 수행하였다. 이 때 표준물질로는 시그마(Sigma)사에서 구입한 아스타잔틴을 사용하였다.
- <34> 그 결과, 본 발명의 균주로부터 생산된 물질이 아스타잔틴임을 확인하였으며, 본 발명의 균주로부터 생산된 아스타잔틴의 양을 측정한 결과, pCR-XL-TOPO-crtfull로만 형질전환시킨 형질전환체에서는 50 μg/g(dry weight)을, pCR-XL-TOPO-crtfull과 pACYC184-T7promoter-*idi*로 동시형질전환시킨 형질전환체에서는 80 μg/g(dry

weight)인 것을 확인하였다(도 7). 이는 pCR-XL-TOPO-crtfull로만 형질전환된 대장균에서 어떠한 기질 첨가 없이 아스타잔틴을 생산할 수 있음을 알 수 있으며, pCR-XL-TOPO-crtfull과 pACYC184-T7promoter-idi로 동시형질 전환시킨 대장균에서 더 높은 아스타잔틴 생산량을 보임으로써 더욱 효율적으로 아스타잔틴을 생산함을 알 수 있었다.

발명의 효과

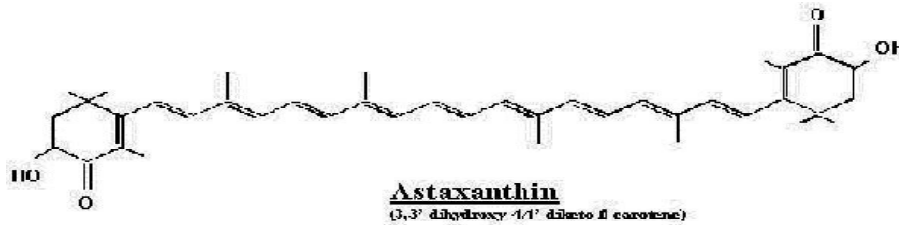
<35> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 카로티노이드 생합성 유전자와 이소프레노이드 전환효소 생합성 유전자를 이용하여 재조합된 벡터들을 동시형질전환시켜 아스타잔틴을 생산하지 않는 미생물에서 고부가의 아스타잔틴의 생산을 효율적으로 향상시켰으며, 본 발명의 대량생산방법은 식품학적, 약학적 및 미용학적 용도로 사용되는 카로티노이드의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

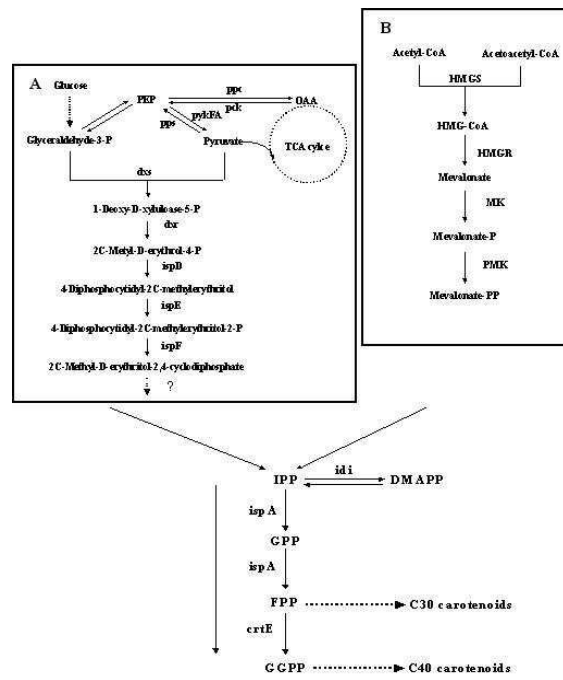
- <1> 도 1은 아스타잔틴의 구조도이다.
- <2> 도 2는 비-메발론산과 메발론산에 의해 이소프레노이드의 생합성 경로를 나타내는 모식도이다.
- <3> 도 3은 이소프레노이드로부터 카로티노이드의 생합성 경로를 나타내는 모식도이다.
- <4> 도 4는 파라코커스 해운대시스로부터 분리된 *crt* 유전자의 구성(organization)을 나타내는 모식도이다.
- <5> 도 5는 *crt* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pCR-XL-TOPO-crtfull를 나타내는 유전자 지도이다.
- <6> 도 6은 *idi* 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pACYC184-T7promoter-idi를 나타내는 유전자 지도이다.
- <7> 도 7은 아스타잔틴의 생산량을 비교하여 나타내는 사진이다(A는 파라코커스 해운대시스, B는 pCR-XL-TOPO-crtfull로만 형질전환시킨 대장균, C는 pCR-XL-TOPO-crtfull와 pACYC184-T7promoter-idi로 동시형질전환시킨 대장균).

도면

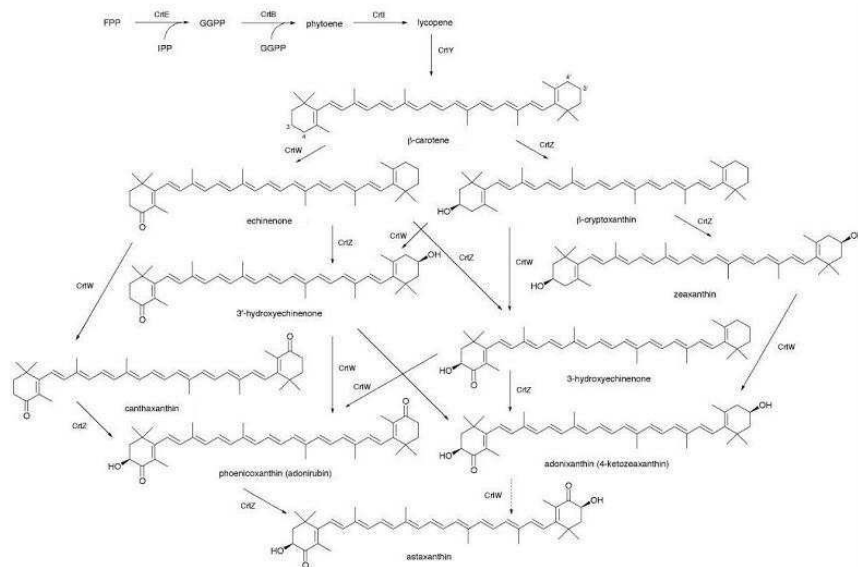
도면1



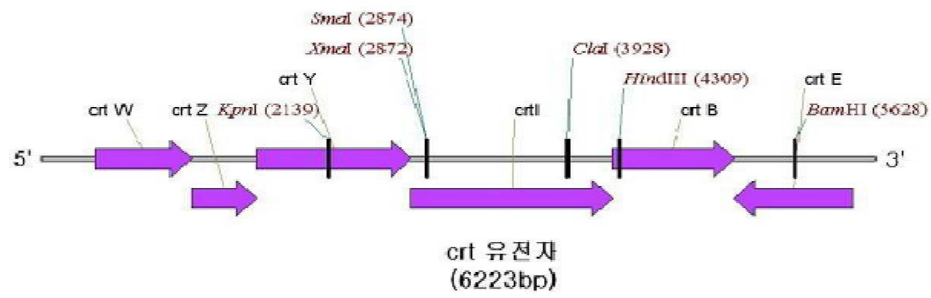
도면2



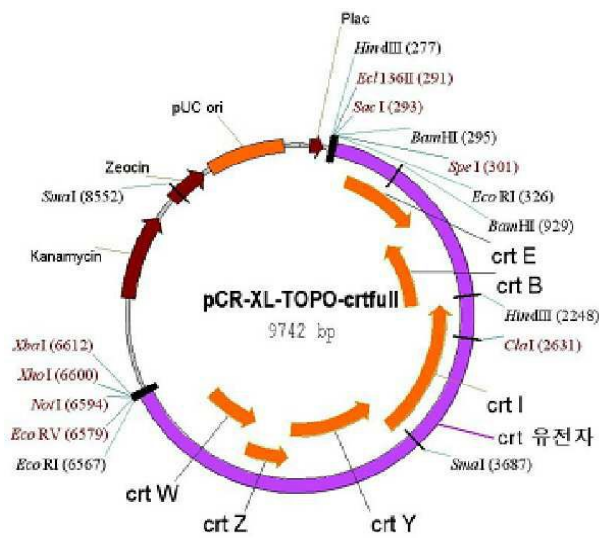
도면3



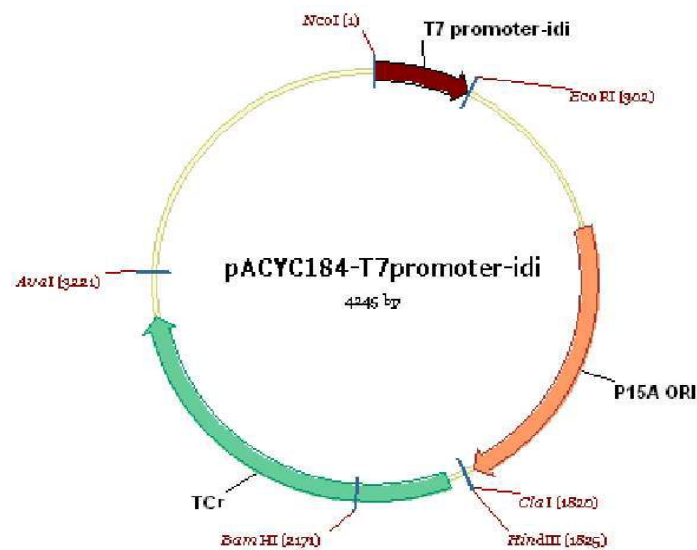
도면4



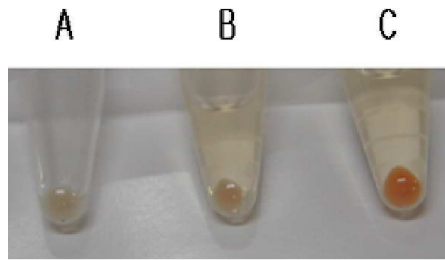
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> Pukyong National University
 <120> The high astaxanthin production of the transformed E. coli strain containing isoprenoid and carotenoid biosynthesis genes

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 6223

<212> DNA

<213> Paracoccus haeundaesis

<400> 1

gttcacgac tggggcatcc ccacaccgc gtcgctgcgc gccatcgcg cgatgatggg 60

gccggaccgg gtcttggtcg ggctgggcgg ggtgcgtcac gggtgggacg ccgcgcgggc 120

catccgctc ggcgcgacc tcgtggggca ggcgggccgc gcgtgcccgc ccgcgcgcca 180

cagcgccgag gccctgtccg atcacctgtc cgacgtcgtg acccagctgc gcatcgcat 240

gttctgcacc ggatcgggcg accttgccgc gctgcgtcgc gcgcctctgc tggtgccggg 300

gccgggtggc caatggtcgc aagcaacggg gatggaaacc ggcatgagg gactgtatgc 360

tgcgcggatc gccggtccgg gggacaagat gagcgacat gccctgccca aggcagatct 420

gaccgccacc agcctgatcg tctcgggcgg catcatcgcc gcgtggctgg ccctgcatgt 480

gcatgcgctg tggtttctgg acgcggcggc gcatcccatc ctggcgatcg cgaatttctt	540
ggggctgacc tggctgtcgg tcggctctgtt cttcatcgcg catgacgcga tgcacgggtc	600
ggtcgtgccg gggcgtccgc gcggcaatgc ggcgatgggc cagctggtcc tgtggctgta	660
tgccgatttt tcgtggcgca agatgatcgt caagcacatg gcccatcacc gccataccgg	720
aaccgacgac gaccccgatt tcgaccatgg cggcccggtc cgctggtacg cgcgcttcat	780
cggcacctat ttcggctggc gcgaggggct gctgctgcc gtcacgtga cggcttatgc	840
gctgatcctg ggggatcgct ggatgtacgt ggtcttctgg ccgctgccgt cgatcctggc	900
gtcgatccag ctgttcgtgt tcggcacctg gctgccgcac cggcccgcc acgacgcgtt	960
cccggaccgc cataatgcgc ggtcgtcgcg gatcagcgac cccgtgtcgc tgcctgacctg	1020
ctttcacctt ggtggttacc atcacgaaca ccacctgcac ccgacggtgc ctgggtggcg	1080
cctgcccagc acccgaccca agggggacac cgcgatgacca atttctgat cgtcgtcgcc	1140
accgtgctgg tgatggagtt gacggcctat tccgtccacc gttggatcat gcacggcccc	1200
ctgggctggg gctggcaca gtcccaccac gaggaacacg accacgcgt ggaaaagaac	1260
gacctgtacg gcctggcttt tgcggtgatc gccacggtgc tgttcacggt gggctggatc	1320
tgggcgccgg tcctgtggtg gatcgctttg ggcatgaccg tctatgggct gatctatttc	1380
gtcctgcatg acgggctggt tcacagcgc tggccgttcc gctatatccc gcgcaagggc	1440
tatgcccgc gcctgtatca ggcccaccgc ctgcaccacg cggtcgaggg acgcgacat	1500
tgcgtcagct tcggcttcat ctatgcgccg ccggtcgaca agctgaagca ggacctgaag	1560
acgtcgggcg tgcctgggcg cgaggcgcag gagcgacgt gacctatgac gtgctgctgg	1620
cagggcgggg ccttgcgaac gggctgatcg cctggcgct gcgcgcggcg cggcccgaac	1680

tgccgggtgct gctgctggat catgcggcgg gaccgtcaga cgcccatacc tggctctgcc	1740
acgacccccga tctgtcgccg cactggctgg cgcggctgaa gcccttgcgc cgcgccaact	1800
ggcccagacca ggaggtgcgc ttccccgcc atccccggcg gctggccacc ggttacgggt	1860
cgctggacgg ggcggcgctg gcggatgcgg tggcccggtc gggcgccgag atccgctgga	1920
acagcgacat cgccctgctg gatgaacagg gggcgacgct gtcctgcggc acccggatcg	1980
aggcgggcgc ggtcctggac gggcgcggcg cgcagccgtc gcggcatctg accgtgggtt	2040
tccagaaatt cgtgggcgtc gagatcgaga ccgactgccc ccacggcgtg ccccgcccga	2100
tgatcatgga cgcgaccgtc acccagcagg acgggtaccg attcatctat ctgctgcctt	2160
tctctccgac gcgcatcctg atcgaggaca ctgcctattc cgatggcggc aatctggacg	2220
acgacgcgtt ggcggcggcg tcccacgact atcccccca gcagggttg accggggcgc	2280
aggtccggcg cgaacgcggc atcctgccc a ttgcgtggc ccatgacgc gcgggtttct	2340
gggccgatca cgcggagggg cctgttcccg tgggactgcg cgcggggttc ttaccaccgg	2400
tcaccggcta ttgcgtgccc tatgcggcgc aggtggcgga cgtggtggcg ggcctgtccg	2460
ggccgcccgg caccgacgcg ctgcgcggcg ccatccgga ttacgcgatc gaccgggcac	2520
gccgtgaccg ctttctgcgc ctgctgaacc ggatgctgtt ccgcggctgc gcgcccgacc	2580
ggcgctatac cctgctgcag cggttctacc gcatgccgca tggactgac gaacggttct	2640
atgccggccg gctgagcgtg gcggatcagc tgcgcatcgt gaccggcaag cctccattc	2700
cccttggcac ggccatccgc tgctgcccg aacgtccct gctgaaggaa aacgcatgaa	2760
cgccattcg cccgcccga agaccgcat cgtgatcggc gcaggctttg gcgggctggc	2820

cctggccatc cgcttcagtc ccgcgggcat cgcaccacc ctggtcgagg cccgggacaa	2880
gcccggcggg cgccctatg tctggcacga tcagggccat gtcttcgacg cgggcccgc	2940
cgatcatcacc gaccccgatg cgctcaagga gctgtgggcg ctgaccgggc aggacatggc	3000
gcgcgacgtg acgtgatgc cgggtgtgcc ctctatcga ctgatgtggc cgggcgggaa	3060
ggtcttcgat tacgtgaacg aggccgatca gctggagcgc cagatcgccc agttcaacc	3120
ggacgacctg gaaggatacc gccgcttcg tgattacgcg gaggaggtgt atcaggaggg	3180
ctacgtcaag ctgggcaccg tgcccttcct caagctgggc cagatgctca agcccgccg	3240
cgcgctgatg aagctggagg cctataagtc cgtccatgcc aaggtcgga ccttcacaa	3300
ggaccctat ctgcggcagg cgttttcgta tcacacgtg ctggtgggcg ggaatccctt	3360
ctcgaccagc tcgatctatg cgctgatcca cgcgtggag cggcgccgcg gggctctggtt	3420
cgccaagggc ggcaccaacc agctggcgc gggcatggc gcgctgttcg aacggcttgg	3480
cggccagatg atgtgaacg ccaaggtgc ccggtcgag accgaggcg cgcgaccac	3540
gggcgtcacc ctggcggacg ggcgtcttt aaggccgac atggtcgcca gcaacggcga	3600
cgatcatcac aactatcgc acctgctggg ccacacggc cgcgggcaga gccgcgcga	3660
atcgctggac cgcaagcgt ggtccatgtc gttgttcgtg ctgcatttcg gtcgtcgca	3720
ggcgcccaag gacatcggc atcacacat cctgttcggc ccccgctaca gggagctggt	3780
caacgagatc ttcaaggcc cgaagctggc cgaggatttc tcgtgtacc tgcattcgcc	3840
ctgcacgacc gatccggaca tggcgctcc gggcatgtc acgcattacg tgcgtgcccc	3900
cggtccgcat ctgggccgcg ccgagatcga ttgggcggc gaggggccgc gctatgccga	3960
ccgcatcctg gcgtccctgg aggagcggt gatccgaac ctgcgcgcca acctgaccac	4020

gacgcgcatc ttcacgcccc cgcatttcgc cagcgaactg aacgcccac acggcagcgc	4080
cttctcggtc gagccgatcc tgacgcaatc cgcgtggttc cggccgcaca accgcgacaa	4140
gacgatccgc aacttctatc tggtcggcgc gggcacccat ccgggcgcgg gcattccggg	4200
cgctcgtggc tcggccaagg ccacggccca ggtgatgctg tccgacctgg cgggcgcatg	4260
agcgatctgg tctgacctc gaccgaggcg atcacccaag ggtcgcaaag ctttgccacg	4320
gcggccaagc tgatgccgc gggcatccgc gacgacacgg tgatgctcta tgcctggcgc	4380
gccacgcgg atgacgtgat cgacggtcag gccctgggca gccgccccga ggcggtgaac	4440
gaccgcagg cgcggctgga cggcctgcgc gtcgacacgc tggcggccct gcagggcgac	4500
ggtccggtga ccccgccctt tgccgcgtg cgcgcggtgg cgcggcggca tgatttccc	4560
caggcctggc ccatggacct gatcgaaggc ttcgcatgg atgtcgaggc gcgcgactat	4620
cgcacgctgg atgacgtgct ggaatattcc tatcacgtcg caggcatcgt cggcgtgatg	4680
atggcccgcg tgatgggcgt gcgcgacgat cctgtcctgg accgcgcctg cgacctgggg	4740
ctggcgttcc agctgaccaa catcgcgcg cactgatcg acgatgcgc catcgggcgg	4800
tgctatctgc cgggggactg gctggaccag gcgggcgcgc ggatcgacgg gccggtgccg	4860
tcgccggagc tgtacacagt gatcctccgg ctgttgatg aggcggaacc ctattacgcg	4920
tcggcgcggg tgggtctggc ggatctgcca ccgcgtcg cctggtccat cgcgccgcg	4980
ctacggatct atcgcccat cgggtgcgc atccgcaaga gcgggccgca ggcctatgc	5040
cagcgatca gcacgtccaa ggctgccaag atcgccctgc tgggcgtcgg gggctgggat	5100
gtcgcgcat cagcctgcc gggggcgggc gtgtcgcggc agggcctctg gaccggccg	5160

catcacgtct aggcgcgcgc ggcgtagggc agaaccgtt ccagcagggc cgcgatttcc 5220

ggagcctgaa ggcgcttgct gcgcagcatc gcgtccagtt gggcgcggct ggcctcgtaa 5280

tgacgggaca cgttctgcag gtctgacacg gccagaaggc cgcgccgcgg gccgggggcc 5340

gcggcatcgc gaccggtatc cttgccaagc gccgcctggt cgcacacgac gtccagcagg 5400

tcgtcatagg actggaacac gcggcccagc tgacggccaa agtcgatcat ctgggtctgc 5460

tcctcggcgt cgaactcctt gatcacggcc agcatctcca gcccgcgat gaacagcacg 5520

ccggtcttca ggtcctgttc ctgttcgacc cccgcgccgt tcttggccgc gtgcaggctc 5580

aggtcctggc cggcgcacag gccctgcggc cccagggacc gcgacaggat ccgcaccagc 5640

tgccccgca ccgtgccga cgcgccgcgc gcaccggcca gcagggccat tgctcgggtg 5700

atcaggggca tgccgccag cacggcacgg ctttcgcat gccccacatg ggtcgcgggc 5760

cggcccggc gcagccggc atcgtccatg cagggcaggc cgtcgaagat cagcgtgcg 5820

gcatgcacca tctcgaccgc gcaggcggcg tcgacgatc gtgcgagac cccgcccgag 5880

gcctctgccg caagcagcat cagcatgccg cggaaccgcc tgcccgacga cagcgcgcca 5940

tggctcatgg ccgcgccgag cggctgcgac acggcaccga atccctgggc gatctcctca 6000

agtctggtct gcagaagggt ggcgtggatc gggttgacgt ctcgtctcat cagtgccttc 6060

gcgcttgggt tctgacctgg cgggaaggtc aggccggggc ggcaccccg gaccctcat 6120

ccaccgtcaa cagtcccat gttggaacgg ttcacgccc attgcgagcc ttttcgacgg 6180

cgacgcgggg tcgcgcggca atttgtcaa caaggtcagt gga 6223

<210> 2
<211> 549
<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

atgcaaacgg aacacgtcat tttattgaat gcacagggag ttcccacggg tacgctggaa	60
aagtatgccg cacacacggc agacacccgc ttacatctcg cgttctccag ttggctgttt	120
aatgccaaag gacaattatt agttaccgcg cgcgcactga gcaaaaaagc atggcctggc	180
gtgtggacta actcggtttg tgggcacca caactgggag aaagcaacga agacgcagt	240
atccgccgtt gccgttatga gcttggcgtg gaaattacgc ctctgaatc tatctatcct	300
gactttcgct accgcgccac cgatccgagt ggcattgtgg aaaatgaagt gtgtccggt	360
tttgccgcac gcaccactag tgcgttacag atcaatgatg atgaagtgat ggattatcaa	420
tgggtgtgatt tagcagatgt attacacggt attgatgcca cgccgtgggc gttcagtcg	480
tggatggatga tgcaggcgac aaatcgcgaa gccagaaaac gattatctgc atttaccag	540
cttaaataa	549