

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0128775 2012년11월28일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12N 15/54</i> (2006.01) <i>C12N 15/31</i> (2006.01) <i>C12P 7/64</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0046620 (22) 출원일자 2011년05월18일 심사청구일자 2011년05월18일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 이진원 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수 기 자촌아파트 201-1601호 (방이동) 원종인 경기도 고양시 일산동구 강송로 156, 강촌한신 APT 214동 1201호 (마두동) 박서영 서울특별시 서대문구 신촌로 121, 아남인베스텔 1507호 (창천동) (74) 대리인 양부현		

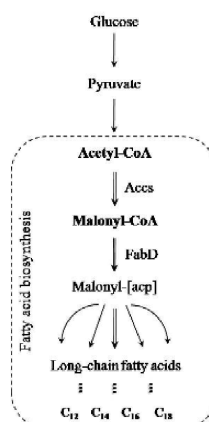
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 지방산 생합성 경로에서의 핵심 중간 대사산물 말로닐-코엔자임 A 과발현 재조합 대장균의 개발

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 다음의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동형질전환된 (cotransformed) 말로닐-CoA 과발현용 대장균을 제공한다: (a) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (b) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질(biotin carboxyl carrier protein)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (c) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛(biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 (d) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제(acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)를 코딩하는 뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종 이상의 뉴클레오타이드 서열. 본 발명은 재조합 이중 대장균에 의하여 지방산 생합성 경로의 초입단계 물질인 말로닐산을 세포내외의 생산을 증진할 수 있을 뿐만 아니라 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있는 효과를 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201042005

부처명 지식경제부

연구사업명 신재생에너지기술개발사업

연구과제명 당화 바이오매스를 이용한 탄화수소계 바이오에너지 생산 균주 및 공정 최적

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.08.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동형질전환된(cotransformed) 말로닐-CoA 과 발현용 대장균: (a) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (b) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질(biotin carboxyl carrier protein)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (c) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛(biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (d) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제(acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)를 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종 이상의 뉴클레오티드 서열.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 서열목록 제 5 서열의 pET22b 벡터이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pET22b 의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 말로닐-CoA 과발현용 대장균.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 (a) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (b) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질(biotin carboxyl carrier protein)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (c) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛(biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (d) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제(acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 *바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)* 168로부터 유래한 것을 특징으로 하는 말로닐-CoA 과발현용 대장균.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛은 서열목록 제 3 서열의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제는 서열목록 제 4 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 말로닐-CoA 과발현용 대장균.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 6 서열로 표시되고, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 7 서열로 표시되며, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 8 서열로 표시되며, 상기 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 9 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 말로닐-CoA 과발현용 대장균.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 말로닐-CoA 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) (i) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iv) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제를 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종 이상의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 형질전환은 CaCl_2 방법에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 말로닐-CoA 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법.

(a) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 지방산을 생합성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 지방산을 수득하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 지방산 생합성 경로의 말로닐-CoA 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 형질전환 대장균에 관한 것이다.

배경기술

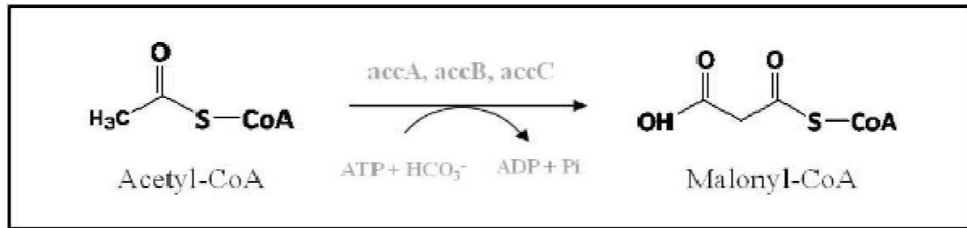
[0002] 국제 유가 강세는 세계적 경제 성장에 따른 에너지 수요의 지속적인 증대에도 불구하고 에너지 공급은 제한적인 상황이며 이로 인해 전 세계적으로 석유 재고량이 감소하였기 때문이다. 또한 세계 각국의 이산화탄소 배출규제와 같은 환경규제도 점점 강화되고 있다. 이로 인해 화석연료 자원의 한정성과 기존의 화석연료를 대체할 수 있는 에너지에 대한 각국의 관심은 높아지고 있다. 특히 에탄올, 부탄올, 바이오디젤과 같은 바이오에너지에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 박테리아와 같은 비식용 바이오매스를 이용한 기술개발이 이루어질 경우 식량공급과 토지 면적의 문제를 피하면서도 신재생에너지 비중을 늘릴 수 있을 것으로 기대된다. 이에 따라 긴 사슬 지방산(long chain fatty acid)을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] 본 발명은 단독 미생물 내에서 발효 가능한 탄소 공급원으로부터 탄화수소($\text{C}_8\sim\text{C}_{16}$)를 생물학적으로 효과적인 생산을 위한 개선된 방법을 제공하기 위한 선행연구로서 유전자 조작(gene manipulation)을 통해 지방산 생합성 경로(fatty acid biosynthesis(FAS) pathway)의 대사 흐름을 향상시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 측면에서, 글루코스(glucose)를 탄화수소($\text{C}_8\sim\text{C}_{16}$)으로 전환시키기 위한 대사 메커니즘의 흐름을 조절할 초기단계는 지방산 생산의 핵심물질인 말로닐-CoA(malonyl-CoA)를 과 발현과 동시에 이를 분해(degradation)시킴으로써 FAS(fatty acid biosynthesis)로의 흐름이 활발하도록 돕는 것이다. 이를 실현하기 위해 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환하는 효소(acetyl-CoA carboxylase (Accs))를 암호화하는 세 가지 유전자 accA, accB, 그리고 accC를 대장균(Escherichia coli)으로 도입 및 형질전환(transformation) 시킨 후, 이 재조합 균주를 사용하여 목적을 달성할 수 있다. 본 형질전환 대장균을 통해 야생종의 대장균이 생산하는 아세트산(acetic acid)과 말론산(malonic acid)의 생산량과의 차이를 규명하였다. 또한 Accs(acetyl-CoA carboxylase)를 과 발현함으로써 생산된 말론산이 아세트산으로 전환되는 정도를 규명하였다.

[0004] 유전공학적인 기술을 이용하여 재조합 대장균이 세균 내의 물질 대사 과정을 거쳐서 중간대사산물인 말로닐-CoA

를 과 생산시켜 지방산을 효과적으로 합성할 수 있도록 설계하였다. 이렇게 형질이 전환된 대장균을 이용하여 최종 대사산물로써 바이오디젤로 대체가 가능한 지방산을 생산할 수 있는 효율적인 균주를 개발하였다. 이 지방산(fatty acids)은 물과 섞이지 않기 때문에 세포 밖으로 방출될 때 배지 위에 지방산끼리 뭉쳐있게 되어서 정제가 용이하므로 경제적인 효과도 기대된다.

- [0005] 말로닐-CoA가 생성됨으로써 지방산 합성의 단위체인 아세트산염이 활성화된다. 말로닐-CoA의 합성을 위한 아세틸-CoA의 카르복실화 반응은 본질적으로 비가역적이며 지방산 합성의 주 조절단계(committed step)이며, 지방산 합성을 위한 중간대사산물 말로닐-CoA 합성 반응 모식도는 하기와 같다.



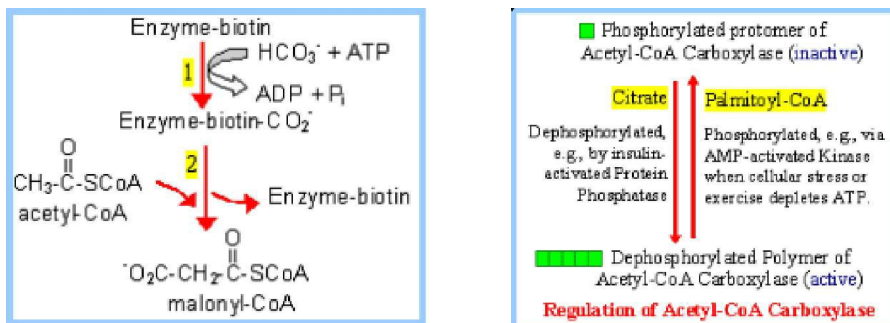
[0006]

- [0007] 지방산 생합성이 일어나려면 충분한 양의 아세틸-CoA, 말로닐-CoA, 그리고 NADPH가 세포질 내에서 생성되어야 하며, 기질인 아세틸-CoA와 환원력인 NADPH가 필요하다.

- [0008] 본 발명의 지방산 생합성의 첫 단계는 아세틸-CoA(지방산 합성에 필수적인 전구체)를 세포질로 운반하는 것이다. 아세틸-CoA는 미토콘드리아 막을 통과할 수 없다. 대신 아세틸-CoA는 옥살로아세테이트(oxaloacetate)와 반응하여 시트레이트(citrate)를 형성한 후 세포질로 운반된다. 시트레이트는 다시 세포질에서 ATP-시트레이트 리아제(lyase)의 작용으로 아세틸-CoA로 전환된 후 사용된다.

- [0009] 지방산 합성에 필요한 NADPH는 PPP 경로(pentose phosphate pathway; 오탄당인산회로)나 말산 효소에 의해 생성될 수 있다. 해당과정에서 유래한 NADH는 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)와 말릭 엔자임(malic enzyme)의 작용으로 NADPH로 전환된다. 세포질로 들어간 시트레이트는 아세틸-CoA와 옥살로아세테이트로 전환되고, 옥살로아세테이트는 말레이트 디하이드로게나제에 의해 말레이트로, 이것은 다시 말릭 엔자임에 의해 피루베이트로 탈카르복실화 된다. 따라서 아세틸-CoA 한 분자가 전달될 때 마다 1개의 NADPH가 생성되는 셈이다.

- [0010] 말로닐-CoA의 합성 전체 과정은 말로닐-CoA 합성과 연장 사이클(elongation cycle)로 이루어진다. 하기 그림과 같이, 지방산 합성의 개입단계에서 아세틸-CoA는 카르복실화 반응에 의해 말로닐-CoA로 전환되어야 하는데 이 비가역적 반응은 아세틸-CoA 카르복실라제(Accs) 복합체에 의해 촉매 된다. 이 복합체는 세 개의 효소(바이오틴 카르복실라아제, 바이오틴 운반 단백질, 그리고 카르복실기 전달효소)로 구성되어 있고, 이 효소는 보결원자단으로 바이오틴을 함유하고 있다.

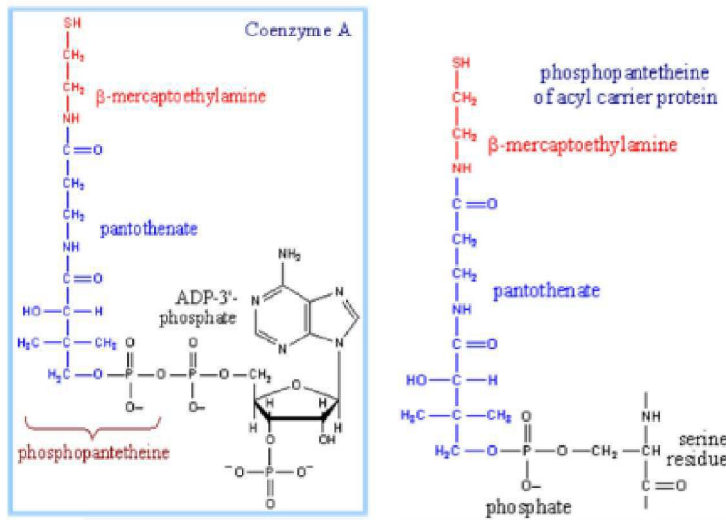


[0011]

- [0012] 중탄산염 형태의 이산화탄소는 ATP의 인산기에 대한 공격으로 활성화된 CO₂ 인 카르보닐 포스페이트(carbonyl phosphate)를 형성하고, 이것은 바이오틴이 결합하여 N-카르복시바이오틴(N-carboxybiot in)을 형성한 후 아세틸-CoA에 전달되어 말로닐-CoA를 생성한다.

- [0013] 지방산 생합성의 최종산물인 팔미토닐-CoA(palmitoyl-CoA)는 다량체를 비활성의 기본단위체로 전환시키고, 시트레이트는 그 반대로 작용한다. 시트레이트와 팔미토닐-CoA의 작용은 Accs(acetyl-CoA carboxylase)의 인산화를 통해 이루어진다. 소단위체의 여러 곳에 인산화가 이루어지며, 인산화되지 않는 Accs는 높은 친화력으로 시트레이트와 결합하여 시트레이트의 농도가 매우 낮을 때에도 활성을 지닌다. 반면 인산화되면 시트레이트에

대한 친화력이 낮아져 활성화되기 위해서는 고농도의 시트레이트를 필요로 한다. 지방 아실-CoA(Fatty acyl-CoA)는 반대의 작용을 한다. 저농도로도 인산화된 Accs를 억제하지만 탈인산화된 Accs는 높은 농도에 의해서만 억제된다(그러나 대장균의 경우는 fatty acid가 에너지 저장 역할이 아닌 인지질의 주전구체이므로 시트레이트에 의해 조절되지 않는다.).



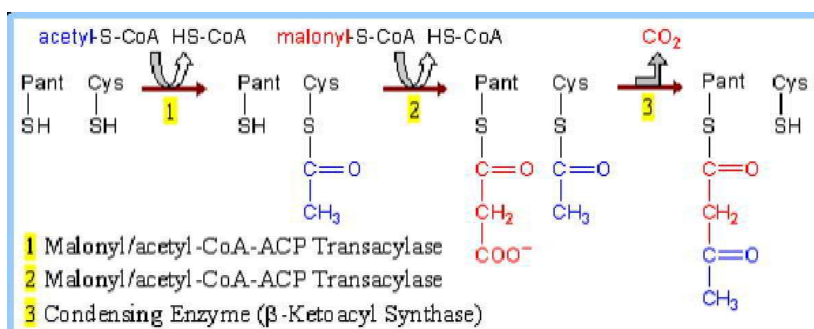
[0014]

아세틸-CoA, 말로닐-CoA는 ACP(acyl carrier protein)으로 전달된다. ACP는 지방산 생합성에 특별히 사용되는 특별한 형태의 CoA(coenzyme A)에 해당된다. ACP는 77 개의 아미노산으로 구성된 단백질로서 포스포판테테인(phosphopantetheine)기가 붙어 있다. 이 과정을 촉매 하는 효소들은 생물체마다 차이가 있으나 각 생합성 단계는 유사하다. 전체과정은 크게 두 개로 구분될 수 있다. 우선 첫 3 단계는 아세틸-CoA를 첨가하는 반응이다. 아세틸 트랜스아실라제 : 아세틸-ACP를 합성, 아세틸 이외의 다른 아실기들도 전달, 말로닐 트랜스아실라제 : 말로닐-ACP를 합성, 매우 특이성이 높다.

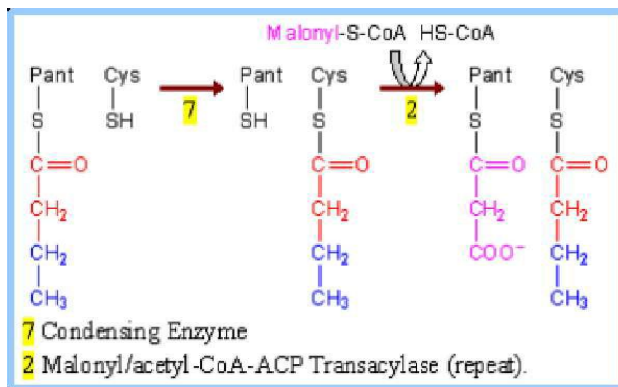
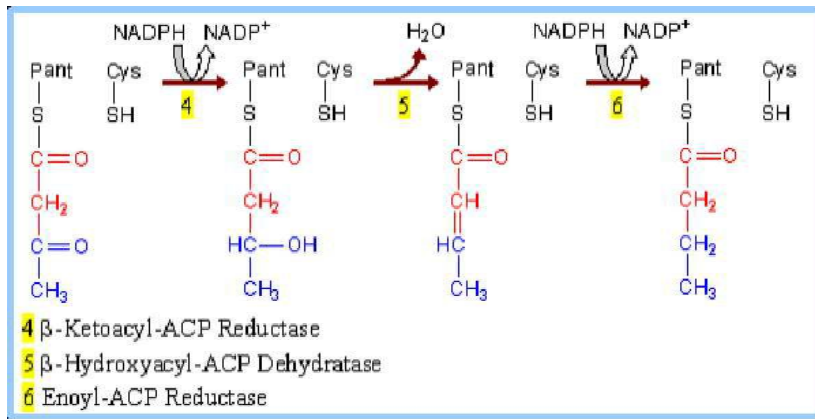
아실-말로닐-ACP 콘덴싱 엔자임(β -ketoacyl-ACP synthase): 아세틸-ACP와 말로닐-ACP가 축합되어 아세토아세틸-ACP가 생성된다. 결과적으로 말로닐-CoA에 첨가된 CO_2 는 이 과정에서 제거된다. 이 반응은 열역학적으로 불리한 반응을 가능케 하는 탈카르복실화 반응에 해당된다.

나머지 3 단계 환원과정으로 지방산 분해의 역반응과 매우 유사한 반응에 해당된다. β -케토아실-ACP 리덕타제: 아세토아실-ACP는 환원되어 D- β -하이드록시부티릴-ACP를 만든다. NADPH를 환원보조효소로 사용한다는 것과 L-형이 아닌 D-형이라는 것이 산화과정과 다르다. 3-하이드록시아실-ACP 디하이드레이타제 : 탈수반응이 일어나 크로토닐-ACP(crotonyl-ACP)가 합성된다. 에노닐-ACP 리덕타제(Enoyl-ACP reductase) : NADPH를 환원제로 사용하여 부티릴-ACP를 합성한다.

합성된 부티릴-ACP는 앞으로 돌아가 β -케토아실-ACP 신타제와 결합하여 말로닐-ACP와 합쳐지는 반응이 계속된다. 이러한 순환반응은 탄소사슬 16 개가 될 때까지 계속된다. β -케토아실-ACP 신타제는 이보다 큰 기질은 받아들일 수 없기 때문에 반응은 팔미토닐-ACP로 끝나게 된다. 팔미토닐-ACP는 가수분해되어 팔미테이트(palmitate)와 ACP로 전환된다. 결과적으로 7 분자의 말로닐--CoA와 1분자의 아세틸-CoA가 1 분자의 팔미테이트를 합성하는데 이용된다. 말로닐--CoA의 합성에 1 분자의 ATP가 필요하고, 각 회로당 2 분자의 NADPH가 사용되므로, 모두 7 분자의 ATP와 14분자의 NADPH가 필요하게 된다.



[0019]



지방산 합성의 요약(H^+ 및 H_2O 무시) : 아세틸-CoA + 7말로닐-CoA + $14NADPH \rightarrow$ 팔미테이트 + $7CO_2$ + $14NADP^+$ + $8CoA$

미생물을 사용하여 FAS 경로의 활발한 대사흐름을 꾀한 말로닐-CoA의 과 발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환하는데 관여하는 효소 아세틸-CoA 카복실라제는 3개의 소단위체(biotin carboxyl carrier protein, biotin carboxylase, transcarboxylase)로 구성되어 있다. 그러나 기본 단위체는 활성이 없으며, 활성을 가지는 다합체로의 전환이 일어난다는 정확한 연구가 부족한 상태이다. 반면 이들 효소에 관여하는 3개의 소단위체를 추출한 바실러스균과 호스트로의 대장균은 효소 생산 시스템으로 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 특히 대장균은 지방산을 합성하는 자연적 능력과 바이오 연료 연구 분야에서 이상적인 목표를 수행하기 위한 유전자 조작(genetic manipulation)에 예외적인 적응성을 나타내는 잘 규명된 미생물이다.

대장균의 지방산 생합성을 위한 도입단계의 대사 작용에 아세틸-CoA와 말로닐 Co-A가 중요한 역할을한다는 것에 대해 문헌 Ethan S. James and John E. Cronan. Expression of Two Escherichia coli Acetyl-CoA Carboxylase Subunits Is Autoregulated, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 279(4), 25202527, 2004.에 언급되어있다. 또한 ACP 트랜스아실라제에 의해 말로닐-Co가 말로닐-ACP로 전환되어 지방산 합성을 위한 대사 네트워크가 진행됨이 참고 문헌에 나타났다. Satyanrayana subrahmanyam and John E. Cronan, JR., Overproduction of a Functional Fatty Acid Biosynthetic Enzyme Blocks Fatty Acid Synthesis in Escherichia coli, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 180(17), 4596-4602, 1998.

하지만 대부분의 연구는 지방산 생합성 경로의 내부 사이클, 즉 말로닐-ACP 이후의 대사 경로를 중심으로 이루어졌으며, fab 계열의 유전자의 기작에 의해 지방산의 생산과 저해에 대해 논하고 있다. 그로인해 지방산 생합성을 위한 탄소원부터 지방산 합성경로 도입부까지의 연구가 부족했다.

따라서 본 발명에서는 지방산 생합성 대사 경로(fatty acid biosynthesis pathway)의 상위 주 조절단계 물질들의 세포내 생산 증대를 위해 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 미생물의 게놈 정보와 대사 네트워크를 이해함과 동시에 야생형 대장균에 적용하여, 표적 유전자의 삽입을 통한 재조합 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.

[0027] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0028] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *바실러스 서브틸리스*의 *accA* 유전자, *accB* 유전자, *accC* 유전자 및 *fabD* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 대장균을 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0029] 따라서, 본 발명은 지방산 생합성 대사산물을 안정적으로 발현하는 대장균을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 대장균의 제조방법을 제공한다.

[0031] 마지막으로, 본 발명은 상기 대장균을 이용하여 지방산을 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0032] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *바실러스 서브틸리스*의 *accA* 유전자, *accB* 유전자, *accC* 유전자 및 *fabD* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 대장균을 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0033] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동형질전환된(cotransformed) 말로닐-CoA 과발현용 대장균을 제공한다: (a) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (b) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질(biotin carboxyl carrier protein)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (c) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛(biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 (d) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제(acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)를 코딩하는 뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종 이상의 뉴클레오타이드 서열.

[0034] 본 명세서에서 용어 ‘아세틸-CoA 카르복실라제’는 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, 두 개의 알파 서브유닛과 두 개의 베타 서브유닛으로 구성된 테트라머이다.

[0035] 본 발명의 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 상기 서브유닛 중 하나이며, *accA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0036] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*) 168으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제 1 서열로 표시되는 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제 6 서열로 표시될 수 있다.

[0037] 본 발명의 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질(biotin carboxyl carrier protein)은 상기 서브유닛 중 하나이며, *accB* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0038] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질은 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*) 168으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제 2 서열로 표시되는 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질을 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제 7 서열로 표시될 수 있다.

- [0039] 본 발명의 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛(biotin carboxylase subunit)은 상기 서브유닛 중 하나이며, *accC* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0040] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛은 *바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)* 168으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제 3 서열로 표시되는 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛을 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제 8 서열로 표시될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서의 용어 ‘아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제(acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)’는 말로닐-CoA를 말로닐-ACP로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, *fabD* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0042] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제는 *바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)* 168으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제 4 서열로 표시되는 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제 9 서열로 표시될 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0044] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 대장균에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0045] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0046] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0047] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, pL^{λ} 프로모터, pR^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-

1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

- [0048] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ gt4? λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 지방산 생합성에 이용될 박테리아인 대장균을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 pET22b를 사용한다.
- [0049] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0050] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *accA*, *accB*, *accC* 및 *fabD*로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.
- [0051] 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.
- [0052] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 $CaCl_2$ 방법에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0053] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 말로닐-CoA 과발현용 형질전환 대장균의 제조 방법을 제공한다: (a) (i) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iv) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제를 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종 이상의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.
- [0054] 본 발명의 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법은 상술한 형질전환 대장균을 생산하는 방법에 관한 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기에서 상술한 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 배양은 당업계에 공지된 통상의 대장균 배양 방법에 의해 배양될 수 있다.
- [0057] 바람직하게는, 단계 (a)는 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시된다.
- [0058] 상기 형질전환 대장균 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

- [0059] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0060] (a) 본 발명은 본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 공동형질전환된 (cotransformed) 말로닐-CoA 과발현용 대장균을 제공한다: (i) 아세틸-CoA 카르복실라제 카르복실 트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase subunit alpha)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실 운반 단백질(biotin carboxyl carrier protein)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (iii) 아세틸-CoA 카르복실라제 바이오틴 카르복실라제 서브유닛(biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iv) 아실-운반-단백질 S-말로닐트랜스퍼라제(acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)를 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종 이상의 뉴클레오티드 서열.
- [0061] (b) 본 발명은 재조합 이중 대장균에 의하여 지방산 생합성 경로의 초입단계 물질인 말로닐산을 세포내외의 생산을 증진할 수 있을 뿐만 아니라 지방산 자체의 함량을 증진할 수 있는 효과를 제공한다.
- [0062] (c) 본 발명은 당으로부터 지방산 생합성 경로에의 과발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 지방산 생합성을 대량 생산 해 내는 효과를 제공한다.
- [0063] (d) 본 발명은 바이오에너지 생산의 기초가 될 지방산 생산을 대량 생산하고 친환경적임을 물론이고 경제적으로도 큰 경제력을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0064] 도 1은 *에스케리치아 콜라이*(*Escherichia coli*) 생체 내에서 글루코스에서부터 지방산 생합성(FAS) 까지의 경로를 보여주는 도식이다.
- 도 2는 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)의 genomic DNA에서부터 관심 유전자들을 *에스케리치아 콜라이*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pET22b에 도입하여 호스트 BL21에 삽입하는 방법을 보여주는 도식화이다.
- 도 3은 *에스케리치아 콜라이*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pET22b 에 관심 유전자들이 삽입되어있는 구조의 도식화이다. (a) accA 유전자가 삽입 (b) accB, 그리고 accC 유전자가 삽입 (c) fabD 유전자 삽입 (d) accA, accB, 그리고 accC 유전자가 삽입되어있는 재조합벡터 구조의 도식화이다.
- 도 4는 재조합 *에스케리치아 콜라이*의 생장곡선을 야생종 *에스케리치아 콜라이*와 비교한 결과를 그린 그래프이다.
- 도 5는 재조합 *에스케리치아 콜라이*를 배양한 후 분석된 말론산의 생산량을 야생종 *에스케리치아 콜라이*의 실험 결과와 비교한 데이터이다.
- 도 6은 재조합 *에스케리치아 콜라이*의 아세트산과 말론산의 생산량을 측정하고 아세트산이 말론산으로의 전환되는 비율을 야생종 *에스케리치아 콜라이*의 실험 결과와 비교한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0065] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0066] 실시예

- [0067] 실시예 1: accA, accB, accC 그리고 fabD 유전자를 발현하는 플라스미드 pSY01_accA, pSY02_accBC, pSY03_accABC 및 pSY04_fabD의 제조

- [0068] *바실러스 서브틸리스* 168의 염색체를 주형으로 하여 말로닐-CoA의 생산을 위한 세 가지 효소와 말로닐-ACP로 전환을 accA, accB, accC 그리고 fabD의 유전자서열(genebank, NCBI)을 중합효소연쇄반응(PCR, Biorad) 방법을 통해 클로닝 하였다 (표 1, 2 및 도 2).

표 1

[0069]

유전자서열 (genebank 허가번호)	유전자	생산 효소
서열번호 1 (GeneID: 936367)	<i>accA</i>	아세틸-CoA 카르복실라제 카르복시 트랜스퍼라제 서브유닛 알파 (carboxy transferase subunit alpha)
서열번호 2 (GeneID: 938587)	<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase 바이오틴 카르복실 운반 단백질 (biotin carboxyl carrier protein)
서열번호 3 (GeneID: 938588)	<i>accC</i>	acetyl-CoA carboxylase 바이오틴 카르복실라제 서브유닛 (biotin carboxylase subunit)
서열번호 4 (GeneID: 938488)	<i>fabD</i>	아실-운반- 단백질 S-말로닐트랜스퍼라제 (acyl-carrier-protein S-malonyltransferase)

표 2

[0070]

표 1의 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 및 제한효소

유전자	프라이머 서열	제한 효소
<i>accA</i>	F 5'-TTTCCATGGAACAGGAGGTGACATTGAGTGGCTCCAAGATTA-3'	NcoI
	R 5'-TTTGGATCCTATTAGTTTACCCCGATATATTG-3'	BamHI
<i>accBC</i>	F 5'-TTTGGATCCTAGGAGTGCGATTGAATGTTAAATATCAAA-3'	BamHI
	R 5'-TTTGAATCTTATGAGCCATTACATCATATGTTTC-3'	EcoRI
<i>fabD</i>	F 5'-TTTGAATTCGGAGGTTTACATCATGAGTAAG-3'	EcoRI
	R 5'-TTTAAGCTTTAAGCATTATCATTCTCCTCTT-3'	HindIII

[0071]

표 1의 유전자들은 표 2에 열거된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한 효소를 이용하여 pET22b 벡터(서열목록 제 5 서열, Novagen)에 도입하여 pSY01_accA, pSY02_accBC, pSY03_accABC 및 pSY04_fabD 를 제조하였다. 도 2은 상기 pSY01_accA (accA 유전자 포함), pSY02_accBC (accB와 accC 유전자 포함), pSY03_accABC (accA, accB 그리고 accC 유전자 포함) 및 pSY04_fabD (fabD 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도를 나타내는 도면이다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(dNTP mixture(takara), Thermopol buffer(10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl, pH8.3, BioLabs), Taq DNA 중합효소(BioLabs)) 아래에서 95℃/3분(denaturation) 1회 수행한 후, 95℃/1분(denaturation), 55℃/1분(annealing), 72℃/3분(extension)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 72℃/10분 반응시켰다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.7% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 제한효소반응에 이용하였다. 제한효소 처리된 각각의 DNA 조각들을 pET22b 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 2에 개시된 것과 같이 삽입하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 형질 전환된 대장균(E. coli DH5α competentcell, Novagen)에서 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 1% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

[0072]

실시예 2: 대장균 형질전환체(transformant)의 제조

[0073]

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣는 형질전환방법을 사용하였다. 상기 열충격에 의한 형질전환방법을 위해 DH5α 세포를 LB 아가 플레이트에 스트리킹하여 37℃에서 16시간동안 배양한다. 그 다음 플레이트에 형성된 콜로니들 중 하나를 취하여 3 mL LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract) 배지가 담긴 테스트 튜브에 넣고 37℃, 210 rpm 웨이커에서 다시 14시간동안 배양하였다. 500 mL 삼각 플라스크에 100 mL LB 배지를 넣고 멸균시킨 다음, 여기에 테스트 튜브에 넣고 배양시킨 세포를 첨가하여 37℃, 210 rpm 웨이커에서 2-3시간 배양하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 0.4-0.5에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 ml의 배양액을 나눠 담고, 20분 동안 얼음에 막아두었다. 그 후 배양액은 4℃에서 5분

동안 6280 rpm으로 원심 분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 얼음물 속에서 상등액이 제거된 세포를 재현탁 이후, 여기에 10 mL CaCl₂을 넣고 계속 돌려가며 세포를 풀어주었다. 세포가 다 풀어지면 2 mL CaCl₂과 20% 글리세롤 1 mL씩 넣고 섞은 이후 200 µl씩 분주하여 -80℃에 보관하였다. -80℃에 보관해둔 DH5 α 컴피턴트 세포를 꺼내어 얼음에 10분 동안 방치하였다. 100 µl DH5 α 컴피턴트 세포에 2-5µl의 플라스미드를 넣고 잘 섞어 얼음에 5-10분 동안 방치하였다. 항온조 42℃에서 1분30초 동안 반응시킨 뒤 얼음에 다시 10분 동안 방치하였다. 미리준비해둔 900 µl LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)를 첨가한 뒤 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양된 형질 전환체는 1분의 원심 분리하여 상등액 800 µl 제거한 후 나머지 200 µl와 세포를 재현탁하여 선택배지(50 µg/ml 엠펜실린(50 µg/ml)이 첨가된 LB 고체배지)에서 단일균체가 생성될 때까지 37℃에서 배양하였다. 상기와 같은 방법에 의해 도 2에서 나타내어진 구성의 발현백터가 삽입된 재조합 대장균(형질전환체)이 완성되었다.

[0074] 실시예 3: 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산

[0075] 형질전환의 정확성이 확인된 각각의 균들을 LB 배지에 14 시간정도 배양시키고 500 µl 50% 글리세롤과 500 µl 배양액을 섞어 총 1 mL 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다. 배양은 10 mL 바텀 튜브에 4 mL의 LB와 전기 보관용 균액 1 mL 중 40 µl 그리고 4 µl 엠펜실린(50 µg/ml)을 첨가하여 24 시간 동안 배양한 후, 이를 다시 500 mL 플라스크에 들어있는 엠펜실린(50 µg/ml)이 첨가된 200 mL의 LB 배지(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)에 1/200의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 200 rpm шей커에서 27 시간동안 배양하였다(도 3 참조). 단백질 발현을 위한 유도 물질인 IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside, sigma, USA)를 투여하기 위해 배양액의 흡광도(absorbance)를 측정하였다. 흡광도는 600 nm 파장에서 0.4에 이르렀을 때 IPTG를 첨가(1 mM)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 예를 따라 배양된 재조합 대장균 4종과 야생종의 성장곡선은 도 3에서 보여주고 있다.

[0076] 실시예 4: 재조합 대장균 세포내외로부터의 아세트산 및 말론산의 측정

[0077] 배양액 내의 아세트산과 말론산의 농도는 배양 중 특정시간마다(초기 배양 시간으로부터 3-4 시간 간격) 채취한 시료를 4℃에서 원심분리(10분, 4500 rpm) 후 상등액과 세포를 분리하여 -80℃에서 보관하고, 이 중 세포는 인트라셀룰라(intracellular) 물질의 추출을 위해서 다음과 같은 과정을 거쳤다: 상등액과 분리된 세포는 영하 -80℃에 넣어둔 메탄올 250 µl로 세포를 희석한 후, -80℃에 넣어두고 5~10분 뒤 확인하면 유동성 있는 액체로 변화되었다. 이 과정을 3번 반복하여 -9℃에서 원심분리 후 상등액은 보관 (-80℃)하였다. 남은 셀을 가지고 다시 위와 같은 과정을 반복하여 얻어진 용액을 합치면, 총 500 µl의 샘플을 획득하게 되었다. 이것이 인트라셀룰라 물질로서 세포내의 메타볼라이트(metabolites)를 추출한 것이었다. 상기 배양액 50 mL로부터 분리된 상등액과 세포에서 추출된 인트라셀룰라 물질은 각각 500 µl씩을 0.2 µm 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 HPLC(high performance liquid chromatography) 정량 분석을 실시하였다(도 4 및 도 5 참조).

표 3

[0078] 아세트산과 말론산 분석을 위한 HPLC 조건

품 목	조 건
HPLC 모델	(영원기기, Korea), UV730D (영원기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H (Biorad, USA)
유속	0.6 ml/min
주입부피	30 µl
이동상	0.005 N 황산
오븐 온도	50 °C
작동 시간	30 분
UV 검출파장	210 nm

[0079] 상기 실시예를 통해 도 4 및 도 5 는 배양 초반, 중반 그리고 후반인 3, 12, 24 시간을 대표적으로 나타내었다. 재조합 대장균은 야생종 대장균의 분석되어지는 말론산의 생산량과 분비 경향에 큰 차이를 보였다. 그리고 도 5에서는 분리되어진 아세트산과 말론산을 각각 나타내어 아세트산이 말론산으로 얼마만큼 전환

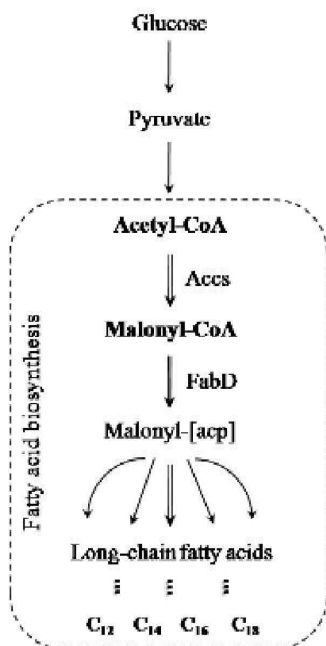
되어져 생산되는지 나타내었다. 배양이 시작된 후 12 시간이 지난 이후부터 아세트산과 말론산의 생산이 야생 종에서는 확인되지 않지만, pSY01_accA, pSY02_accBC, pSY03_accABC 및 pSY04_fabD 플라스미드가 내재된 재조합 대장균에서는 IPTG 에 의한 발현유도로 아세트산과 말론산의 세포 내 생산이 유지됨을 도면 5에서 보였다.

[0080] **재조합 균주의 효과**

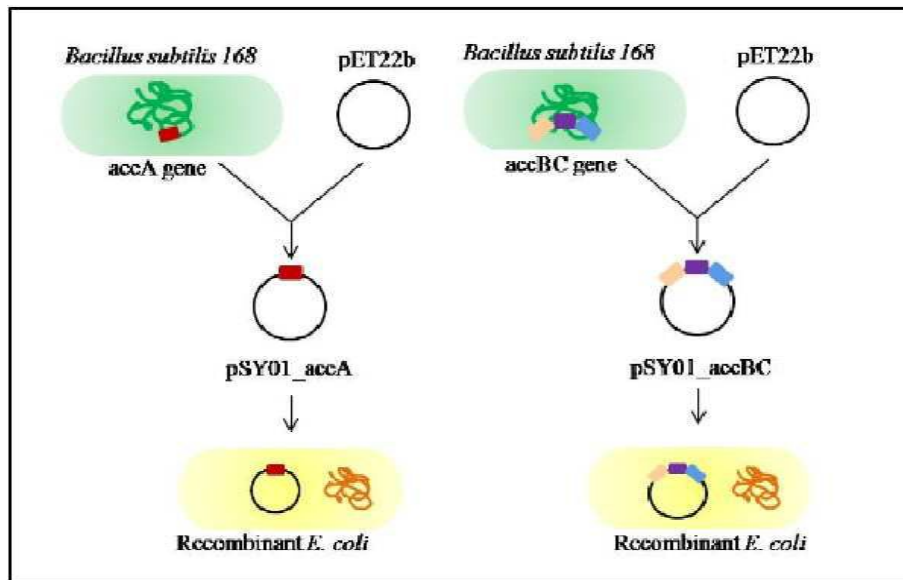
[0081] 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 재조합 대장균에 의하여 지방산 생합성 경로의 핵심 단계에 관여하는 중간대사산물인 말로닐-CoA의 세포내외의 생산을 증대할 수 있으며 지방산 합성 경로로 진입을 확장시킬 수 있었다. 또한 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환시키는데 관여하는 효소의 유전자 accA, accB, accC의 상관관계에 대한 영향을 연구함으로써 이들의 역할을 확인할 수 있었다. 따라서 글루코스로부터 지방산 생합성 경로에의 대사 흐름 변경을 통해 지방산 생합성 경로의 활성을 높였다.

도면

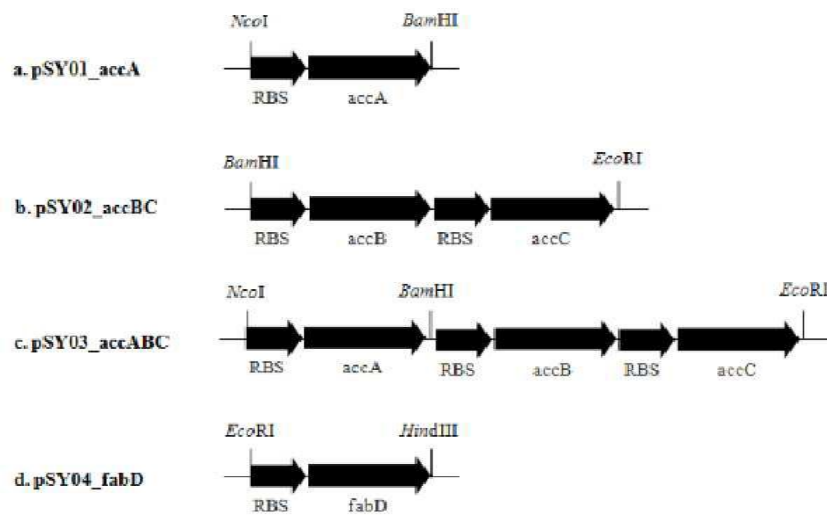
도면1



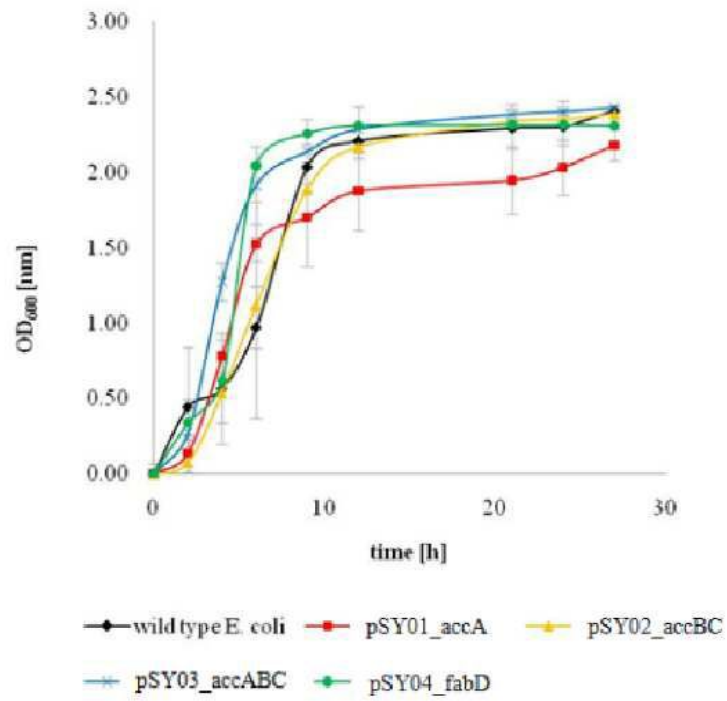
도면2



도면3

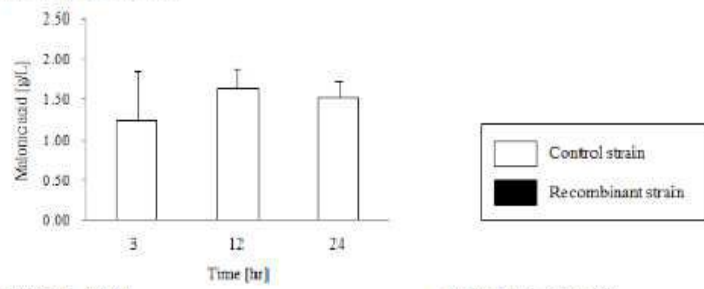


도면4

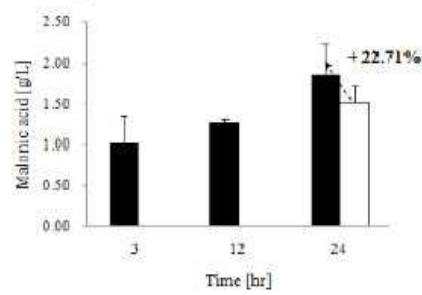


도면5

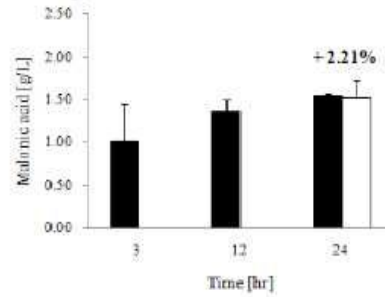
a. Wild type *E. coli*



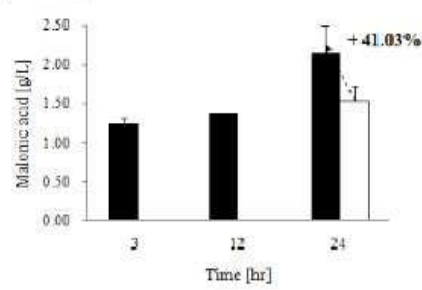
b. pSY01_accA



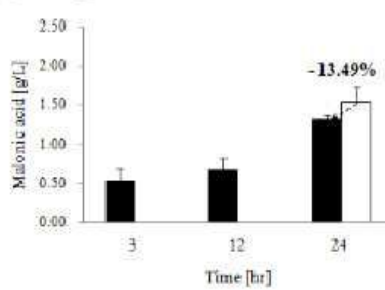
c. pSY02_accBC



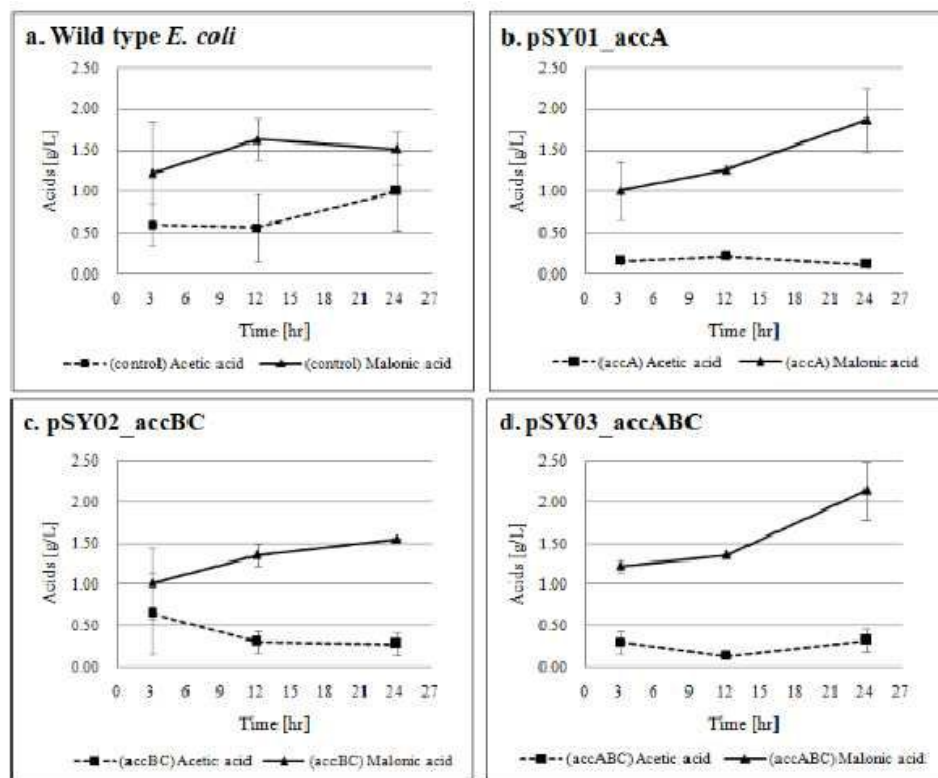
d. pSY03_accABC



e. pSY04_fabD



도면6



* Standard amount : Measurement time 24 hr.

Name	a. Control strain	b. pSY01_accA	c. pSY02_accBC	d. pSY03_accABC
Ratio (= M.A. / A.A.)	1.52	16.07	5.53	6.52
Increase rate	-	10.57	3.64	4.29

서열 목록

<110> Sogang university

<120> Development of recombinant Escherichia coli which can overflow
fatty acid biosynthesis pathway by overproducing malonyl-CoA

<160> 9

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 325

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Ala Pro Arg Leu Glu Phe Glu Lys Pro Val Ile Glu Leu Gln Thr

1 5 10 15

Lys Ile Ala Glu Leu Lys Lys Phe Thr Gln Asp Ser Asp Met Asp Leu

				20				25				30			
Ser	Ala	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Glu	Asp	Arg	Leu	Ala	Lys	Leu	Gln	Asp
35				40				45							
Asp	Ile	Tyr	Lys	Asn	Leu	Lys	Pro	Trp	Asp	Arg	Val	Gln	Ile	Ala	Arg
50				55				60							
Leu	Ala	Asp	Arg	Pro	Thr	Thr	Leu	Asp	Tyr	Ile	Glu	His	Leu	Phe	Thr
65				70				75				80			
Asp	Phe	Phe	Glu	Cys	His	Gly	Asp	Arg	Ala	Tyr	Gly	Asp	Asp	Glu	Ala
85				90				95							
Ile	Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Phe	His	Gly	Leu	Pro	Val	Thr	Val	Ile
100				105				110							
Gly	His	Gln	Arg	Gly	Lys	Asp	Thr	Lys	Glu	Asn	Leu	Val	Arg	Asn	Phe
115				120				125							
Gly	Met	Pro	His	Pro	Glu	Gly	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	Arg	Leu	Met	Lys
130				135				140							
Gln	Ala	Asp	Lys	Phe	Asn	Arg	Pro	Ile	Ile	Cys	Phe	Ile	Asp	Thr	Lys
145				150				155				160			
Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Arg	Ala	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Gln	Ser	Glu	Ala
165				170				175							
Ile	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe	Glu	Met	Ala	Gly	Leu	Arg	Val	Pro	Val	Ile
180				185				190							
Cys	Ile	Val	Ile	Gly	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly
195				200				205							
Val	Gly	Asn	His	Leu	His	Met	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr	Tyr	Ser	Val	Ile
210				215				220							
Ser	Pro	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Trp	Lys	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala
225				230				235				240			
Lys	Lys	Ala	Ala	Glu	Thr	Met	Lys	Ile	Thr	Ala	Pro	Asp	Leu	Lys	Glu
245				250				255							
Leu	Gly	Ile	Ile	Asp	His	Met	Ile	Lys	Glu	Val	Lys	Gly	Gly	Ala	His
260				265				270							

His Asp Val Lys Leu Gln Ala Ser Tyr Met Asp Glu Thr Leu Lys Gln
 275 280 285
 Ser Leu Lys Thr Leu Leu Lys Leu Ser Glu Glu Glu Leu Val Gln Gln
 290 295 300
 Arg Tyr Glu Lys Tyr Lys Ala Ile Gly Lys Val Ser Val Glu Asp Gln
 305 310 315 320

Tyr Ile Gly Val Asn
 325

<210> 2
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 2

Met Leu Asn Ile Lys Glu Ile His Glu Leu Ile Lys Ala Ile Asp Glu
 1 5 10 15
 Ser Thr Ile Asp Glu Phe Val Tyr Glu Asn Glu Gly Val Ser Leu Lys
 20 25 30
 Leu Lys Lys His Glu Ala Gly Thr Val Gln Val Met Gln Gln Ala Pro
 35 40 45
 Ala Ala Pro Val Gln Ala Gln Ala Pro Gln Ala Val Gln Pro Gln Ala

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

Glu Ala Glu Val Lys Gly Glu Ile Val Glu Val Leu Val Glu Asn Gly
 130 135 140
 Gln Leu Val Glu Tyr Gly Gln Pro Leu Phe Leu Val Lys Ala Glu

145 150 155

<210> 3

<211> 450

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Glu Ala Asp Lys Asp Ala Leu His Val Gln Met Ala Asp Glu Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Tyr Gly Phe Leu Ala Glu Asn Ala Asp Phe Ala Glu Leu Cys Glu

85 90 95

Glu Val Asn Val Thr Phe Val Gly Pro Ser Ala Asp Ala Ile Ser Lys

100 105 110

Met Gly Thr Lys Asp Val Ala Arg Glu Thr Met Lys Gln Ala Gly Val

115 120 125

Pro Ile Val Pro Gly Ser Gln Gly Ile Ile Glu Asn Val Glu Glu Ala

130 135 140

Val Ser Leu Ala Asn Glu Ile Gly Tyr Pro Val Ile Ile Lys Ala Thr

145 150 155 160

Ala Gly Gly Gly Gly Lys Gly Ile Arg Val Ala Arg Thr Glu Glu Glu

165 170 175

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

180 185 190

Gly Asn Pro Gly Val Tyr Ile Glu Lys Tyr Ile Glu Asp Phe Arg His

195 200 205

Val Glu Ile Gln Val Leu Ala Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Ile His Leu
210 215 220

Gly Glu Arg Asp Cys Ser Ile Gln Arg Arg Leu Gln Lys Leu Leu Glu
225 230 235 240

Glu Ser Pro Ser Pro Ala Leu Asp Ser Glu Ile Arg Glu Gln Met Gly
245 250 255

Asp Ala Ala Val Lys Ala Ala Lys Ala Val Gly Tyr Thr Gly Ala Gly
260 265 270

Thr Val Glu Phe Ile Tyr Asp Tyr Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Phe Met
275 280 285

Glu Met Asn Thr Arg Ile Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Met Val
290 295 300

Thr Gly Thr Asp Leu Ile Lys Glu Gln Ile Lys Val Ala Ser Gly Met
305 310 315 320

Glu Leu Ser Leu Lys Gln Glu Asp Val Glu Phe Glu Gly Trp Ala Ile
325 330 335

Glu Cys Arg Ile Asn Ala Glu Asn Pro Ser Lys Asn Phe Met Pro Ser
340 345 350

Pro Gly Glu Ile Lys Met Tyr Leu Pro Pro Gly Gly Leu Gly Val Arg
355 360 365

Val Asp Ser Ala Ala Tyr Pro Gly Tyr Ser Ile Pro Pro Tyr Tyr Asp
370 375 380

Ser Met Ile Ala Lys Val Ile Thr Tyr Gly Lys Thr Arg Asp Glu Ala
385 390 395 400

Ile Ala Arg Met Lys Arg Ala Leu Ser Glu Phe Val Ile Glu Gly Ile
405 410 415

Glu Thr Thr Ile Pro Phe His Leu Lys Leu Leu Glu His Glu Thr Phe
420 425 430

Val Ser Gly Glu Phe Asn Thr Lys Phe Leu Glu Thr Tyr Asp Val Met
435 440 445

Gly Ser

450

<210> 4

<211> 317

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 4

Met Ser Lys Ile Ala Phe Leu Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Phe Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Lys Glu Leu Tyr Glu Gln Val Pro Ala Ala Lys Arg Leu

20 25 30

Phe Asp Glu Ala Asp Glu Thr Leu Glu Thr Lys Leu Ser Ser Leu Ile

35 40 45

Phe Glu Gly Asp Ala Glu Glu Leu Thr Leu Thr Tyr Asn Ala Gln Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Ile Thr Pro Asp Phe Thr Ala Gly His Ser Leu Gly Glu Tyr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Val Arg Lys Arg Gly Glu Phe Met Asn Glu Ala Val Pro Ala Gly Glu

115 120 125

Gly Ala Met Ala Ala Ile Leu Gly Met Asp Ala Glu Ala Leu Lys Gln

130 135 140

Val Thr Asp Lys Val Thr Glu Glu Gly Asn Leu Val Gln Leu Ala Asn

145 150 155 160

Leu Asn Cys Pro Gly Gln Ile Val Ile Ser Gly Thr Ala Lys Gly Val

165 170 175

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

180 185 190

Pro Leu Glu Val Ser Gly Pro Phe His Ser Glu Leu Met Lys Pro Ala

195 200 205

Ala Glu Lys Leu Lys Glu Val Leu Asp Ala Cys Asp Ile Lys Asp Ala
 210 215 220
 Asp Val Pro Val Ile Ser Asn Val Ser Ala Asp Val Met Thr Glu Lys
 225 230 235 240
 Ala Asp Ile Lys Glu Lys Leu Ile Glu Gln Leu Tyr Ser Pro Val Arg
 245 250 255
 Phe Glu Glu Ser Ile Asn Lys Leu Ile Ala Glu Gly Val Thr Thr Phe
 260 265 270

Ile Glu Ile Gly Pro Gly Lys Val Leu Ser Gly Leu Val Lys Lys Val
 275 280 285
 Asn Arg Arg Leu Lys Thr Ile Ala Val Ser Asp Pro Glu Thr Ile Glu
 290 295 300
 Leu Ala Ile Gln Thr Leu Lys Glu Glu Asn Asp Asn Ala
 305 310 315

<210> 5

<211> 5493

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET22b vector

<400> 5

atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggttta gaggccccaa 60

ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtgg cagcagccaa ctcagcttcc tttcgggctt 120

tgtttagcagc cggatctcag tgggtggtggt ggtggtgctc gattgctggcc gcaagcttgt 180

cgacggagct cgaattcgga tccgaattaa ttccgatatc catggccatc gccggctggg 240

cagcaggag cagcagacca gcagcagcgg tcggcagcag gtatttcata tgtatatctc 300

cttcttaaag ttaaacaaaa ttatttctag aggggaattg ttatccgctc acaattcccc 360

tatagtgagt cgtattaatt tcgcgggacg gagatctcga tcctctacgc cggacgcac 420

gtggccggca tcaccggcgc cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc 480

gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcagtagcg cttgtttcgg cgtgggtatg 540

gtggcaggcc ccgtggccgg gggactgttg ggcgccatct ccttgcacgc accattcctt 600

gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaacctt ctactgggct gcttcctaat gcaggagtcg 660

cataaggag agcgtcgaga tcccggacac catcgaatgg cgcaaacct ttcgcggtat 720

ggcatgatag cgcccgaag agagtcaatt cagggtggtg aatgtgaaac cagtaacgtt	780
atacgatgtc gcagagtatg ccggtgtctc ttatcagacc gtttcccgcg tggngaacca	840
ggccagccac gtttctgcga aaacgcggga aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa	900
ttacattccc aaccgcgtgg cacaacaact ggcgggcaaa cagtcgttgc tgattggcgt	960
tgccacctcc agtctggccc tgcacgcgc gtcgcaaatt gtcggcgca ttaaatctcg	1020
cgccgatcaa ctgggtgcca gcgtggtggt gtcgatggta gaacgaagcg gcgtcgaagc	1080
ctgtaaagcg gcggtgcaca atcttctcgc gcaacgcgtc agtgggctga tcattaacta	1140
tccgtggat gaccaggatg ccattgctgt ggaagctgcc tgcactaatg ttccggcgtt	1200
atttcttgat gtctctgacc agacacccat caacagtatt attttctccc atgaagacgg	1260
tacgcgactg ggctggagc atctggctgc attgggtcac cagcaaatcg cgctgttagc	1320
gggccatta agttctgtct cggcgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac	1380
tcgcaatcaa attcagccga tagcggaacg ggaaggcgac tggagtcca tgtccggttt	1440
tcaacaacc atgcaaatgc tgaatgaggg catcgttccc actgcgatgc tggttgcca	1500
cgatcagatg gcgtgggcg caatgcgcgc cattaccgag tccgggctgc gcgttggtgc	1560
ggatatctcg gtagtgggat acgacgatac cgaagacagc tcatgttata tcccgcgtt	1620
aaccaccatc aaacaggatt ttgcctgct ggggcaaac agcgtggacc gcttctgca	1680
actctctcag ggccaggcgg tgaagggcaa tcagctgttg cccgtctcac tggtgaaaag	1740
aaaaaccacc ctggcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt	1800
aatgcagctg gcacgacagg ttccccgact ggaagcgagg cagtgcgcg aacgcaatta	1860
atgtaagtta gtcactcat taggcaccgg gatctcgacc gatgcccttg agagccttca	1920
accagtcag ctcttccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccga cttatgactg	1980
tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgcggcagc gctctgggtc attttcggcg	2040
aggaccgctt tcgttgagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgcggtt ttcggaatct	2100
tgcacgccct cgtcaagcc ttctgctactg gtcccgccac caaacgttcc ggcgagaagc	2160
aggccattat cgccggcatg gcggcccccac ggtgctgcat gatcgtgtc ctgtcgttga	2220
ggaccggct aggtggcgg ggttgctta ctggttagca gaatgaatca ccgatacgcg	2280
agcgaacgtg aagcgactgc tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca acatgaatgg	2340
tcttcggttt ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgccc tgcaccatta	2400
tgttccggat ctgcatcgca ggatgctgct ggctaccctg tggaacacct acatctgtat	2460
taacgaagcg ctggcattga ccctgagtga ttttctctg gtcgccgcgc atccataccg	2520

ccagttgttt accctcaciaa cgttccagta accgggcatg ttcatcatca gtaaccgta	2580
tcgtgagcat cctctctcgt ttcatcggta tcattacccc catgaacaga aatccccctt	2640
acacggaggc atcagtgacc aaacaggaaa aaaccgccct taacatggcc cgctttatca	2700
gaagccagac attaacgctt ctggagaaac tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag	2760
acatctgtga atcgcttcac gaccacgtg atgagcttta ccgcagctgc ctgcgcgctt	2820
tcggtgatga cggtgaaaaa ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct	2880
tgtaaagcga tgccgggagc agacaagccc gtcaggcgcc gtcagcgggt gttggcgggt	2940
gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatacgga agtgtatact ggcttaacta	3000
tgccgcatca gacgagattg tactgagagt gcacatata tgcggtgtga aataccgcac	3060
agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttcgc cttcctcgct cactgactcg	3120
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	3180
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag	3240
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac	3300
gagcatcaca aaaaatcgac ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga	3360
taccaggcgt ttccccctgg aagtcctctc gtgcgctctc ctgttcgac cctgccgctt	3420
accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc	3480
tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct	3540
cccgttcagc ccgaccgtg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta	3600
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcagggtat	3660
gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca	3720
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct	3780
tgatccggca acaaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt	3840
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgt	3900
cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaa aaggatcttc	3960
acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa	4020
acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta	4080
tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtctgtgaga taactacgat acgggagggc	4140
ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat	4200
ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgttcc tgcaacttta	4260

tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt 4320
aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct gcaggcatcg tgggtgcacg ctgctgttt 4380
ggatatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaagge gagttacatg atcccccatg 4440
ttgtgcaaaa aagcggtttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc 4500
gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 4560
gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 4620
cggcgaccga gtigtctttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga 4680

actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 4740
ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct 4800
tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag 4860
ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatctct tctttttca atattattga 4920
agcatttattc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat 4980
aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgaaat tgtaaacgtt 5040
aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gctcattttt taaccaatag 5100

gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt 5160
gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaaggcgca 5220
aaaaccgtct atcagggcgca tggcccacta cgtgaacat caccctaalc aagttttttg 5280
gggtcaggtt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct 5340
tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc 5400
gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt 5460
aatgcgccgc tacagggcgc gtccattcgc cca 5493

<210> 6

<211> 978

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 6

gtggctccaa gattagaatt tgaaaaaccg gtgattgaac tgcaaaccaa aatcgccgaa 60
ctaaaaaat tcaccaaga ttccgatatg gatctaagtg cggaaatcga acggctcgaa 120
gaccgtctcg ctaagcttca ggatgatatt tacaaaaatt tgaagccgtg ggaccgggtt 180
caaatcgcg gtcgtggcga ccgtccgaca actcttgatt atatgaaca cctgtttacc 240
gacttttttg aatgtcacgg agacagagcg tacggggacg atgaagccat tgtcggcggg 300

attgcgaagt tccacggcct ccctgtaacg gtaatcgggc atcagcgagg caaagacacg	360
aaggaaaacc tagtccgcaa ttttgggatg ccgcatccag aaggctacag aaaagcgctt	420
cgtctgatga aacaggetga caaatTTaac agaccaatta tctgttttat tgatacgaag	480
ggggcatacc ctggacgagc agctgaagaa agaggacaaa gtgaagctat tgccaaaaac	540
ctgtttgaga tggccggcct tcgagtgccct gttatctgca tcgtcattgg tgaaggcgga	600
agcggcgagg cccttggctt ggggtgtagc aatcacttgc atatgctgga aaactctact	660
tattctgtta tttctccgga aggtgccgcg gcacttttat ggaaggactc cagtcttgct	720
aaaaaagcag cagaacaat gaaaatcact gcgccggatt taaaagaatt aggtattata	780
gatcatatga ttaaagaagt aaaaggcgga gcgcacatg atgtgaagct gcaggcaagc	840
tatatggacg aaacctttaa acaatcgta aaaactttac tgaagctgag cgaagaagaa	900
ttagttcagc agcgttatga aaaatataaa gcaattggca aagtctcggt tgaagatcaa	960
tatatcgggg taaactaa	978
<210> 7	
<211> 480	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 7	
atgttaaata tcaaagaaat ccacgagctg attaaagcaa ttgacgagtc tacaattgac	60
gaattcgtat atgaaaatga aggtgtatcc ttaaaactga aaaaacacga agcaggcacg	120
gttcaagtca tgcagcaggc accggcagca cctgtacaag cacaggctcc gcaggcagtt	180
cagccgcaag cgcagcaagc agcggcacct gcccaagaag caccaaagca agatgagaat	240
ctgcataaaa tcaattcacc aatggttagga acatTTtatg cttcttcac accggaagct	300
ggcccgatg taacagccgg ttcaaaagta aatgaaaaca cagtgtctg cattgtagaa	360
gcgatgaagc ttttcaacga aatcgaagca gaagtgaag gcgaaatcgt tgaagtatta	420
gtagaaaacg gccagctggt cgaatcagga caacctctat ttcttgtaaa agcggagtaa	480
	480
<210> 8	
<211> 1353	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 8	

atgattaaaa agctattgat cgccaacaga ggagaaattg ctgtcagaat catcagagcc 60
 tgcagagagc tcggaattga gactgtcgct gtttattcag aagctgataa agatgccctt 120
 catgttcaaa tggccgatga agctttttgt atcggaccga aagcatcaaa agacagctat 180
 ttaaacttta caaatattgt gagtgttgca aagctgactg gcacggacgc cattcatccg 240
 ggatacggat ttttagctga aaatgctgat ttcgctgaat tatgtgaaga agtgaatgtc 300
 acgtttgtcg gcccgagcgc tgacgccatt tcaaaaatgg gaacaaaaga cgttgcgcgg 360

gaaacgatga aacaggccgg cgtgccaatc gtaccgggtt cacagggaat tatagaaat 420
 gtggaagaag cgttttcgtg tgctaatgaa attgggtatc ctgtaattat aaaagccacc 480
 gcaggcggag gcggaaaagg aattagggtt gccgcactg aagagggaact gattaatggc 540
 attaagatta cacagcagga agcggcaact gcatttggga atccaggtgt atacatcgaa 600
 aaatacatag aagattttcg ccacgttgag atccaagtgc ttgctgataa ctacggaaat 660
 acgatccatt tgggcgaacg cgactgctcg atccaaagac gcctgcaaaa gcttttggaa 720
 gaatcaccat ctctgccct tgattcagaa atcagggagc aaatgggaga tgcagcggta 780

aaggctgcca aagcggttgg ctatacaggt gctggaacag ttgaatttat ctatgactac 840
 aatgaacagc gctattactt catggaatg aacacgagaa tccaggtgga gcaccagtc 900
 acagaaatgg tgacgggaac tgacctgatc aaggaacaaa tcaaagtggc ttcaggaatg 960
 gaactgagcc tcaagcaaga agatgttgaa tttgaaggct gggccatcga atgccgaatc 1020
 aacgcagaaa acccaagcaa aaatttcatg ccgtcacctg gtgaaattaa aatgtacctg 1080
 cctctggcg gtcttgggtg ccgtgtcgat tcagctgcgt accctggcta ttccatccca 1140
 ccgtactatg acagcatgat tgcaaaggta atcacatacg gaaaaacgag agatgaagcg 1200

attgcccga tgaagcgcgc attgagcgaa ttcgtcatcg aaggcattga gacaacaatc 1260
 cctttccatt taaaactgct tgaacacgaa acatttgtga gcggagagtt taatacgaat 1320
 ttttagaaa catatgatgt aatgggctca taa 1353

<210> 9

<211> 954

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 9

atgagtaaga ttgcattttt attcccgggt cagggatcac aatttatcgg catgggaaaa 60
 gagctttatg agcaggtgcc tgctgcaaag cgtctgtttg atgaagccga tgaacgttg 120
 gaaacaaaac tcagctcgct tatttttgag ggggatgctg aagaattaac acttacatac 180

aatgcgcagc ctgctttgct tacgacaagc atcgctgttc ttgagaaatt taaagaatct	240
ggcattacac ctgatttcac agcaggacac agccttgggtg aatattctgc actggttgcg	300
gctggcgctc tgtctttcaa agatgctgtt tatactgtca gaaagcgcg agagtttatg	360
aatgaagcgg tgccggctgg cgaaggagca atggctgcga ttctcggcat ggatgctgaa	420
gcattaaagc aagtaaccga taaagtcaca gaggaaggca acctgtaca gcttgcaat	480
ctcaactgtc ctggccaaat cgtcatttcc ggaacagcta aaggggttga gcttgcatct	540
gaactggcaa aagagaacgg cgcaaaacgc gcaattccgc ttgaagtaag cggtcggttc	600
cattctgaac tgatgaaacc ggctgctgaa aagctgaaag aggtattgga cgcctgtgac	660
ataaaagacg ctgacgttcc ggtcatctca aatgtttctg ctgacgtgat gactgaaaaa	720
gcagatatca aagaaaaact tattgagcag ctttactctc cggttcgttt tgaggaaagc	780
attaacaagc tgatcgaga ggggtgttacg acttttattg aaatcgggcc cggaaaagtg	840
ctttcaggcc ttgtgaaaaa agtgaataga cggttaaaaa caattgctgt atcagatccg	900
gaaacgatcg agctggcaat tcaaacgctt aaggaggaga atgataatgc ttaa	954