

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁸*C12N 9/04* (2006.01)*C12N 15/53* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0015439

(43) 공개일자 2006년02월17일

(21) 출원번호 10-2005-7000470

(22) 출원일자 2005년01월10일

번역문 제출일자 2005년01월10일

(86) 국제출원번호 PCT/DE2003/002290

국제출원일자 2003년07월08일

(87) 국제공개번호 WO 2004/007705

국제공개일자 2004년01월22일

(30) 우선권주장 10231297.4 2002년07월10일 독일(DE)

(71) 출원인 포르슘스젠트룸 올리히 게엠베하
독일 테-52425 올리히 빌헬름-요오넨-슈트라쎈
아미노 게엠베하
독일 38373 프렐슈테트 안 더 주커-라피네리 10

(72) 발명자 에겔링로타르
독일 52428 올리히 엘센캄프 6
페터스-웬터슈페트라
독일 52428 올리히 마르티누스 스트리트 2아
네체르로만
독일 52428 올리히 아돌프-피셔-스트리트 47
삼헤르만
독일 52428 올리히 웬데리누스 스트리트 71
파울리로버트
독일 38154 퀴니히슬루터, 브라운슈바이거 스트리트 3베
클라센비르지트
독일 38108 브라운슈바이흐 노이마르크 스트리트 3

(74) 대리인 정진상
박종혁

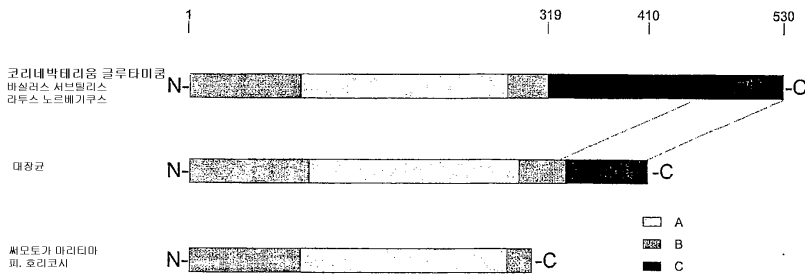
심사청구 : 없음

(54) 코리네형 박테리아의 탈조절 포스포글리세레이트디히드로게나제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 L-세린의 제조 방법

요약

본 발명은 L-세린의 생합성에 관여하는 단백질을 암호화하는 코리네형 박테리아의 뉴클레오티드 서열 및 L-세린의 제조 방법에 관한 것이다. 야생형 *serA* 서열의 C-말단에서 79 이상의 아미노산을 결실시킴으로써, 야생형에 비해 L-세린에 의한 되먹임 억제가 감소되는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 얻을 수 있었다

대표도



색인어

코리네형 박테리아, 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제, L-세린, 뉴클레오티드 serA

명세서

기술분야

본 발명은 L-세린(L-serine)의 생합성에 관여하는 단백질을 암호화하는 코리네형 박테리아(coryneform bacteria)의 뉴클레오티드 서열 및 L-세린의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

아미노산 L-세린은 식품 산업, 사료 산업, 제약 산업, 및 인의학(human medicine)에 사용되고 있다. 또한, 그것은 산업적으로 사용될 수 있는 또 다른 제품, 예컨대 인돌(indole)과 L-세린으로 이뤄진 L-트립토판(L-tryptophan)의 성분으로서 사용된다.

코리네형 박테리아의 균주에 의한 발효를 통해 L-세린을 제조할 수 있는 것이 공지되어 있다. 즉, 예컨대 코리네박테리움 글리시노필룸(*Corynebacterium glycinophilum*)은 글리신(glycine)과 탄수화물로 L-세린을 생성할 수 있다(Kubota K, Kageyama K, Shiro T and Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K, Kageyama K, Maeyashiki I, Yamada K and Okumura S (1972) Journal of General Applications in Microbiology 18: 365). 그 경우, L-세린-히드록시메틸-트랜스퍼라제(L-serine-hydroxymethyl-transferase)라는 효소가 글리신을 L-세린으로 변환시키는데 관여한다(Kubota K and Yokozeki K (1989) Journal of Fermentation and Bioengineering, 67(6): 387-390). 또한, 사용되는 균주는 감소된 L-세린 분해를 나타내는데, 그것은 L-세린 디히드라타제(dehydratase)라는 효소의 활성이 감소되는 것에 기인한다(Kubota K, Kageyama K, Shiro T and Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K (1985) Agricultural Biological Chemistry, 49: 7-12). 또한, 예컨대 히포마이크로븀(*Hypomicrobium*) 균주와 같은 메틸로트로프(methylotroph) 박테리아의 도움 하에 메탄올과 글리신으로 발효에 의해 L-세린을 제조한다(Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Oshiro T, Shiamo M, Miyata A and Tanabe T (1993) Applied Microbiology and Biotechnology, 39: 427-432). 양자의 경우, 전 단계 물질로서의 아미노산 글리신을 사용하여 아미노산 L-세린을 생성해야 한다. 아울러, 또 다른 전 단계 물질을 첨가함이 없이 탄수화물로 직접 L-세린을 제조할 수 있는 코리네형 박테리아가 공지되어 있다. 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 속에 속하는 그러한 균주는 그것이 L-세린-아날로가 세린-히드록사메이트(L-serine-analoga serine-hydroxamate) 및 β -클로로알라닌(chloroalanine)에 대해 내성을 보이고, 불특정 부위 돌연변이(undirected mutagenesis)에 의해 얻어진다는 것에 의해 식별된다(Yoshida H and Nakayama K (1974) Nihon-Nogei-Kagakukaishi 48: 201-208).

뿐만 아니라, 불특정 부위 돌연변이로 인해 L-세린 분해에 있어 결핍을 나타내고, serA에 의해 암호화되는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 높은 활성을 가지며, 대장균(*Escherichia coli*; *E. coli*) 유래의 유전자 serB 및 serC를 과발현시키는 브레비박테리움 플라븀(*Brevibacterium flavum*) 균주도 공지되어 있다(EP0931833A2). 여기서 사용되는 탈조절

serA 유전자는 불특정 부위 돌연변이에 의해 얻어지고, 단지 단일의 염기가 교환되었다는 점에서만 야생형 유전자(wild type gene)와 구별된다. 그러한 유전자를 발현시킨다는 것은 그것이 쉽게 복귀되어 조절 상태로 되돌아 갈 수 있다는 단점을 내포하고 있다.

지금까지 공지된 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 단점은 L-세린에 의해 그것의 되먹임(feedback)이 억제되고, 그로 인해 예컨대 미생물에 의한 L-세린 제조의 생산성이 저하된다는 데 있다. L-세린에 의한 그러한 조절의 원인을 초래하는 것은 단백질의 C-말단(terminus)이다. WO 93/12235로부터, 그 C-말단이 25 % 변형되거나 그 C-말단이 완전히 결실되거나 일정한 범위에서 그에 삽입이 이뤄진 대장균으로부터 유래된 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 암호화하는 DNA가 공지되어 있다. 그러나, 그러한 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제는 고작해야 낮은 활성만을 나타낼 뿐이다. 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제에 의해 L-세린 제조가 개선된다는 것은 입증된 바가 없다.

야생형 *serA* 서열은 일반적으로 공지되어 있고, 당업자에게 공지된 데이터뱅크 또는 첨부된 SEQ ID No: 6에 따른 서열 프로토콜로부터 인용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명의 목적은 전술된 단점을 제거할 수 있고, L-세린 또는 그로부터 유래될 수 있는 예컨대 트립토판과 같은 대사 산물의 개선된 제조를 가져오는 조치를 제공하는 것이다. 즉, 본 발명의 목적은 천연적으로 존재하는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제에 비해 L-세린에 의한 되먹임 억제가 감소되면서도 활성을 그대로 유지하는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 암호화하는 핵산을 제공하는 것이다. 그와 관련하여, 천연적으로 존재하는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 또는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 갖는 미생물에 비해 L-세린에 의한 되먹임 억제가 감소되면서도 활성을 그대로 유지하는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 또는 미생물을 제공하는 것도 또한 본 발명의 목적이다. 아울러, 본 발명의 다른 목적은 미생물에 의해 L-세린을 제조하는 개선된 방법을 제공하는 것이다.

그러한 목적은 청구항 1, 청구항 2, 청구항 3, 청구항 4, 또는 청구항 5의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 1, 청구항 2, 청구항 3, 청구항 4, 또는 청구항 5의 특징부에 기재된 특징들에 의해 달성되게 된다. 또한, 본 발명의 목적은 청구항 9의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 9의 특징부에 기재된 특징들에 의해 달성되게 된다. 아울러, 본 발명의 목적은 청구항 10의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 10의 특징부에 기재된 특징들에 의해 달성되게 된다. 또한, 본 발명의 목적은 청구항 11의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 11의 특징부에 기재된 특징들에 의해서도 달성되게 된다. 역시, 본 발명의 목적은 청구항 20의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 20의 특징부에 기재된 특징들에 의해서도 달성되게 된다. 아울러, 본 발명의 목적은 청구항 26의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 26의 특징부에 기재된 특징들에 의해서도 달성되게 된다. 뿐만 아니라, 본 발명의 목적은 청구항 27의 전제부로부터 출발하여 본 발명에 따라 청구항 27의 특징부에 기재된 특징들에 의해서도 달성되게 된다.

이제, 본 발명에 따른 핵산 및 폴리펩티드에 의해, 천연적으로 존재하거나 유전자 조작에 의해 변형되지 않은 핵산 또는 효소에 비해 L-세린에 의한 되먹임 억제가 감소되거나 아예 없으면서도 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 활성을 그대로 유지하는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 제공하는 것이 가능하게 된다. 이후로, 그러한 특성을 "탈조절"이란 개념으로 총괄하기로 한다. 또한, 지금까지 공지된 미생물에 의한 방법에 비해 더 높은 수율을 가능하게 하는 미생물 및 방법도 제공할 수 있게 된다.

바람직한 부가의 구성은 종속 청구항들에 기재되어 있다.

본 발명의 주제는 SEQ ID No: 1, 2, 3, 4, 또는 5에 따른 유전자 서열 *serA* 또는 그 뉴클레오티드 서열의 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체 혹은 그와 이중 교배된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 (이후로 PGD라 지칭하기로 함)를 암호화하는 핵산을 제공하는 것이다. C-말단에서 197 아미노산이 결실된 PGD를 암호화하는 SEQ ID No 1에 따른 핵산이 매우 바람직한 것으로 판명되었다.

본 발명에 따른 핵산은 코리네형 박테리아, 바람직하게는 코리네박테리아 또는 브레비박테리아 속의 코리네형 박테리아, 매우 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 분리되는 것을 그 특징으로 한다. 미생물 균주로 기탁된 야생형의 코리네형 박테리아의 예는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 및 코리네박테리움 아세토글루타미쿰 (*Corynebacterium acetoglutamicum*) ATCC 15806 또는 브레비박테리움 플라툼 ATCC 14067이다. L-세린의 제조에 적합한 돌연변이주 또는 제조 균주의 예는 아트로박터(*Arthrobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 노카르디아

(Nocardia), 메틸로박테리움(Methylobacterium), 히포마이크로븀(Hyphomicrobium), 알칼리게네스(Alcaligenes), 및 클렙시엘라(Klebsiella)로 이뤄진 그룹 유래의 유기체이다. 본 발명은 전술된 박테리아 균주의 기재에 의해 보다 더 구체적으로 특징지어지는데, 다만 그러한 박테리아 균주는 한정적으로 작용하는 것은 아니다.

본 발명에 따르면, 핵산 또는 핵산 단편이란 한 가닥이거나 두 가닥일 수 있고, 임의의 천연 뉴클레오티드, 임의의 화학적으로 합성되거나 변형된 뉴클레오티드, 또는 임의의 인공 뉴클레오티드를 포함할 수 있는 RNA 또는 DNA로 이뤄진 중합체를 의미한다. 여기서, DNA 중합체란 개념은 게놈 DNA, cDNA, 또는 그 혼합체를 포괄한다.

본 발명에 따르면, 대립 유전자란 기능적 등가물, 즉 거의 동일하게 작용하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 기능적 등가 서열이란 예컨대 유전 암호의 변질에 기인하여 뉴클레오티드 서열이 다름에도 불구하고 여전히 원하는 기능을 갖는 그러한 서열이다. 즉, 기능적 등가물은 여기서 설명되는 서열의 천연적으로 존재하는 변형체 및 예컨대 화학적 합성에 의해 얻어지고 경우에 따라서는 숙주 유기체의 코돈 사용에 맞춰지는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

특히, 기능적 등가물이란 여전히 원하는 기능을 나타내는, 처음에 분리된 서열의 천연 또는 인공 돌연변이를 의미하기도 한다. 돌연변이는 하나 이상의 뉴클레오티드 꼬리의 치환체, 부가체, 결실체, 교환체, 또는 삽입체를 포함한다. 단백질 평면 상에서 예컨대 보존 아미노산(conserved amino acid)의 교환을 일으킬 수 있지만, 단백질의 활성을 근본적으로 변화시키지 않음으로써 기능 중립성을 갖는 소위 센스 돌연변이(sense mutation)도 역시 그러한 돌연변이에 들어간다. 그것은 단백질 평면 상에서 단백질의 기능을 크게 저하시킴이 없이 단백질의 N-말단에 해당하는 뉴클레오티드 서열을 변형하는 것을 포함한다.

본 발명은 뉴클레오티드 서열의 변형에 의해 얻어져 결과적으로 그에 상응하는 유도체를 생성하는 그러한 뉴클레오티드 서열도 포함한다. 그러한 변형의 목적은 예컨대 그에 포함되어 있는 암호화된 서열을 추가로 한정하기 위한 것이거나 예컨대 추가의 제한 효소 절단 부위를 삽입하는 것일 수 있다.

또한, 인공 DNA 서열도 그것이 전술된 바와 같이 원하는 특성을 매개하는 한에는 본 발명의 주제가 된다. 그러한 인공 DNA 서열은 예컨대 컴퓨터 지원 프로그램(분자 모델링)에 의해 제조된 단백질을 역번역함으로써 또는 시험관 내 선별(*in-vitro* selection)에 의해 탐지될 수 있다. 숙주 유기체에 대해 특이적인 코돈 사용에 따른 폴리펩티드 서열을 역번역함으로써 얻어지는 암호화된 DNA 서열이 특히 적합하다. 분자 유전학적 방법에 숙련된 당업자라면 전문가라면 형질 전환하려는 유기체의 이미 공지된 다른 유전자를 컴퓨터로 평가함으로써 특이적 코돈 사용을 용이하게 탐지할 수 있을 것이다.

본 발명에 따르면, 상동 서열이란 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열과 상보적이고/상보적이거나 그와 이종 교배된 서열을 의미한다. 본 발명에 따르면, 이종 교배된 서열이란 개념은 공지의 엄격한 조건 하에서 전술된 뉴클레오티드 서열과의 특이적 대사 작용(결합)을 수용하는 DNA 또는 RNA의 그룹으로부터 유래된 거의 유사한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예컨대, 10 내지 30 뉴클레오티드, 바람직하게는 12 내지 15 뉴클레오티드의 길이를 갖는 짧은 뉴클레오티드 서열도 역시 그러한 서열에 속한다. 본 발명에 따르면, 그것은 특히 소위 프라이머(primer)와 프로브(probe)를 포함한다.

본 발명에 따르면, 암호화된 영역에 선행하는 서열 영역(5'- 또는 그 상류) 및/또는 그 영역에 후속하는 서열 영역(3'- 또는 그 하류)도 포함된다. 특히, 거기에는 조절 기능을 갖는 서열 영역이 포함된다. 그러한 서열 영역은 전사, RNA 안정성 또는 RNA 처리, 및 번역에 영향을 미칠 수 있다. 조절 서열의 예는 특히 프로모터(promotor), 인핸서(enhancer), 오퍼레이터(operator), 터미네이터(terminator), 또는 번역 앰플리파이어(translation amplifier)이다.

또한, 탈조절 PGD를 암호화하는 전술된 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 및 작용에 있어 그와 연계되어 숙주 세포에서의 암호화된 서열의 발현을 제어하는 조절 서열을 포함하는 유전자 구조도 본 발명의 주제이다.

또한, 본 발명은 탈조절 PDG를 암호화하는 전술된 유형의 뉴클레오티드 서열, 작용에 있어 그와 연계된 조절 뉴클레오티드 서열, 및 숙주 세포 내에서의 복제를 위해 변형된 숙주 세포를 선별하거나 적절한 숙주 세포 게놈으로 융합하는 부가의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 벡터는 전술된 유형의 유전자 구조를 포함한다. 벡터로서는 예컨대 pZ1(Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688), pEKEx2(Eikmanns 등, *Gene* 102: 93-98 (1991)), pVWEx, 또는 pXMJ19와 같은 벡터가 적합하다. 다른 플라스미드 벡터(plasmid vector)도 마찬가지로 사용될 수 있다. 그러나, 그러한 열거는 본 발명에 있어 한정적인 것은 아니다.

본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열의 사용 하에 적절한 프로브 또는 프라이머도 합성되어 예컨대 PCR 기술에 의해 다른 미생물, 바람직하게는 코리네형 박테리아 유래의 상동 유전자를 증폭시키거나 분리하는데 사용될 수 있다.

즉, L-세린의 생합성에 관여하는 단백질을 암호화하는 유전자의 식별 및/또는 분리를 위한 프로브도 역시 본 발명의 주제로서, 그러한 프로브는 본 발명에 따른 전술된 유형의 뉴클레오티드 서열로부터 출발하여 제조되고, 검출에 적합한 표지를 포함한다. 그러한 프로브는 예컨대 보존 영역으로부터 유래된 본 발명에 따른 서열의 부분 섹터일 수 있는데, 그 부분 섹터는 예컨대 10 내지 30 뉴클레오티드, 바람직하게는 12 내지 15 뉴클레오티드의 길이를 갖고, 엄격한 조건 하에서 상동 뉴클레오티드 서열과 특이적으로 이중 교배될 수 있다. 적절한 표지는 문헌들로부터 널리 공지되어 있다. 당업자라면 특히 예컨대 Gait의 핸드북: Oligonucleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) 및 Newton과 Graham의 저서: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994)에서 또는 예컨대 Roche Diagnostics사(Mannheim, Deutschland)의 핸드북 "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" 및 Liebl 등의 저서(International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260)에서 그에 관한 지침을 찾아볼 수 있을 것이다.

또한, SEQ ID No: 1, 2, 3, 4, 또는 5에 따른 전술된 유형의 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열 및 그 변형체에 의해 암호화된 탈조절 PGD 또는 그 일부도 본 발명의 주제이다. 아울러, 본 발명은 SEQ ID No: 7, 8, 9, 10, 또는 11에 따른 아미노산 서열 또는 그 폴리펩티드 서열의 변형체 또는 그 이형체 또는 그 혼합체를 갖는 탈조절 PGD에 관한 것이기도 하다. SEQ ID No: 7에 따른 아미노산 서열을 갖는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제가 특히 바람직한 것으로 판명되었다.

이형체란 동일하거나 필적할만한 기질 특이성 및 작용 특이성을 갖지만 상이한 1차 구조를 나타내는 효소를 의미한다.

본 발명에 따르면, 변형체란 서열에서, 예컨대 폴리펩티드의 N-말단이나 보존 아미노산 영역에서 변형이 존재하지만 그 기능이 저하됨이 없는 효소를 의미한다. 그러한 변형은 공지의 방법에 따른 아미노산 교환의 형태로 행해질 수 있다.

그 아미노산 서열이 조절 작용 화합물, 예컨대 아미노산의 활성을 조절하는 최종 대사 산물(L-세린)에 대해 민감하지 않게 되도록(되먹임에 대해 민감하지 않도록) 변형된 탈조절 PGD도 본 발명의 주제이다.

본 발명에 따른 폴리펩티드는 그것이 코리네형 박테리아, 바람직하게는 코리네박테리아 또는 브레비박테리아 속의 코리네형 박테리아, 더욱 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰 또는 브레비박테리움 종의 코리네형 박테리아, 매우 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰으로부터 유래되는 것을 그 특징으로 한다. 미생물 균주로 기탁된 야생형의 코리네형 박테리아의 예는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 및 코리네박테리움 아세토글루타미쿰 ATCC 15806 또는 브레비박테리움 플라툼 ATCC 14067이다. L-세린의 제조에 적합한 돌연변이주 또는 제조 균주의 예는 아르트로박터(Arthrobacter), 슈도모나스(Pseudomonas), 노카르디아(Nocardia), 메틸로박테리움(Methylobacterium), 히포마이크로븀(Hyphomicrobium), 알칼리게네스(Alcaligenes), 및 클렙시엘라(Klebsiella)로 이뤄진 그룹 유래의 유기체이다. 본 발명은 전술된 박테리아 균주의 기재에 의해 보다 더 구체적으로 특징지어지는데, 다만 그러한 박테리아 균주는 한정적으로 작용하는 것은 아니다.

또한, 탈조절 PGD, 그 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체를 암호화하는 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열 또는 그 일부를 숙주 시스템에 전달하는 것을 포함한다. 그것은 본 발명에 따른 유전자 구조 또는 벡터를 숙주 시스템에 전달하는 것을 포함한다. 숙주 세포에 DNA를 전달하는 것은 유전학적 방법에 따라 이뤄진다. 여기서, 바람직한 방법으로는 형질 전환, 매우 바람직하게는 전기 천공(electroporation)에 의한 전달을 들 수 있다.

상동 숙주 시스템이 특히 적합한 것으로 판명되었다. 상동 숙주 시스템이란 같은 과에 속하는 모든 미생물을 의미한다. 본 발명에 따르면, 그것은 본 발명에 따라 코리네형 박테리아로부터 분리되는 핵산이 도입된 코리네형 박테리아를 의미한다. 즉, 성공적으로 이뤄진 핵산 전이의 결과로 형질 전환된 미생물은 그것이 본 발명에 따른 유형의 추가의 핵산을 포함하고, 적절하게 각인될 수 있다는 점에서 각인되지 않은 해당 유전자와 구별된다. 적합한 상동 숙주 시스템의 대표자로서는 코리네박테리움 글루타미쿰 박테리아, 바람직하게는 균주 ATCC 13032를 들 수 있다. 배양 배지로서는 그 요건에 따라 예컨대 LB 배지(T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989)와 같은 착염 배지 또는 예컨대 CGXII 배지(Keilhauer, C. et al 1993, J. Bacteriol., 175: 5593-5603)와 같은 광물염 배지가 적합하다. 적절한 배양 후에 박테리아 현탁액을 수득할 수 있고, 그러한 박테리아 현탁액은 일반적으로 행해지는 방법에 따라 후속 시험, 예컨대 핵산의 형질 전환 또는 분리에 사용될 수 있다. 그 경우, 숙주 시스템으로서 코리네박테리아 또는 브레비박테리아 속의 박테리아가 바람직하다. 코리네박테리아 속 중에서는 코리네박테리움 글루타미쿰 종이 특히 바람직하고, 브레비박테리아 속 중에서는 브레비박테리움 플라툼 종이 특히 바람직하다. 그러한 속의 대표자에는 그 특성에 있어 야생형으로 특징지어지는 균주가 속한다. 여기서 들 수 있는 것은 예컨대 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 14752, 코리네박테리움 아세토글루타미쿰 ATCC 15806, 코리네박테리움 멜라스세콜라(*Corynebacterium melassecola*) ATCC 17965, 코리네박테리움 썬모

아미노게네스(*Corynebacterium thermoaminogenes*) FERM BP-1539, 브레비박테리움 플라툼 ATCC 14067, 브레비박테리움 락토퍼멘툼(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869, 및 브레비박테리움 디바리카툼(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020이다. 또한, 본 발명은 L-세린을 제조하는 돌연변이주 또는 아미노산 제조 균주로서 특출한 숙주 시스템으로서의 박테리아 균주를 포함한다. 그러한 박테리아 균주는 예컨대 야생형 균주로부터 출발하여 전형적인(화학적인 또는 물리적인) 방법이나 유전학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 적합한 균주의 예는 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 21586, 코리네박테리움 글루타미쿰 KY 10150, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032ΔpanBC, 및 브레비박테리움 케토글루타미쿰(*Brevibacterium ketoglutamicum*) ATCC 21222이다. 또한, 본 발명에 따르면, 미생물에 의한 제조 방법으로부터 당업자에 공지된 제조 균주, 예컨대 엔테로박테리아(Enterobacteria), 바실라신(Bacillaceen), 또는 효모 종도 적합하다. 본 발명은 선택된 예의 미생물에 의해 더욱 구체적으로 특징지어지지만, 그에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 전술된 유형의 본 발명에 따른 핵산을 복제될 수 있는 형태로 포함하는 유전학적으로 변형된 미생물을 포함하는데, 그러한 미생물에서는 유전학적으로 변형되지 않은 해당 미생물에 비해 핵산이 증폭되어 발현되고/발현되거나 그 복제 수가 증가된다.

또한, 본 발명은 전술된 유형의 유전자 구조 또는 벡터를 복제될 수 있는 형태로 포함하는 유전학적으로 변형된 미생물도 포함한다.

아울러, 전술된 유형의 탈조절 PGD의 기능을 갖는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하는 유전학적으로 변형된 미생물도 역시 본 발명의 주제인데, 그러한 미생물에서는 유전학적으로 변형되지 않은 해당 미생물에 비해 폴리펩티드가 L-세린에 의한 되먹임 억제를 덜 나타내거나 나타내지 않으면서도 PGD 활성을 그대로 유지한다. 또한, 유전학적으로 변형된 본 발명에 따른 미생물은 그것이 코리네형 박테리아, 바람직하게는 코리네박테리아 또는 브레비박테리아 속의 코리네형 박테리아, 매우 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰 또는 브레비박테리움 플라툼 종인 것을 그 특징으로 한다.

원칙적으로, 유전자는 예컨대 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction)(PCR)과 같은 공지의 방법에 의해 짧은 합성 뉴클레오티드 서열(프라이머)을 사용하여 증폭되고 난 후에 분리될 수 있다. 사용되는 유전자 서열의 제조는 일반적으로 유전자의 보존 영역에 있는 상동체를 기반으로 하여 공지된 유전자 서열에 의해 및/또는 시험 대상 미생물의 DNA의 GC 함량을 고려하여 이뤄진다.

암호화된 뉴클레오티드 서열을 분리하는 또 다른 조치는 시험 대상 유전자 또는 해당 단백질의 활성화에 있어 하나 이상의 표현형 기능 상실을 나타내는 시험 대상 미생물의 소위 결실 돌연변이주(defect mutant)를 보충하는 것이다. 보충이란 돌연변이주의 유전자 결실을 제거하여 돌연변이 이전의 원래의 모습을 거의 회복시키는 것을 의미하는데, 그것은 시험 대상 미생물 유래의 기능 유전자 또는 유전자 단편을 도입함으로써 구현된다.

결실 돌연변이주를 제조하기 위한 전형적인 돌연변이 방법은 예컨대 박테리아 세포를 예컨대 N-메틸-N-니트로-N-니트로조구아니딘(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)과 같은 화학 약품으로 처리하거나 박테리아 세포에 자외선(UV)을 조사하는 것이다. 그러한 형식의 방법은 돌연변이 유발 방법은 일반적으로 공지되어 있고, 특히 Miller의 저서(A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) 또는 미국 박테리아학회(Washington D.C., USA, 1981)의 핸드북 "Manual of Methods for General Bacteriology"에서 그러한 방법을 읽을 수 있다.

또한, 본 발명은 코리네형 박테리아로부터 분리된 본 발명에 따른 하나 이상의 핵산을 숙주 유기체에 전달하여 거기서 발현시키되, 암호화된 해당 폴리펩티드의 유전자 발현 및/또는 활성이 유전학적으로 변형되지 않은 해당 미생물에 비해 증대되고, 그와 같이 유전학적으로 변형된 미생물을 미생물에 의해 L-세린을 제조하는데 사용하며, 그에 상응하게 생성된 L-세린을 배양 배지로부터 분리하는 미생물에 의한 L-세린의 제조 방법에 관한 것이다. 증대된 유전자 발현(과발현)을 구현하기 위해, 해당 유전자의 복제 수를 늘릴 수 있다. 또한, 구조 유전자의 상류 측에 위치된 프로모터 영역 및/또는 조절 영역 및/또는 리보솜 결합 부위를 높은 발현율로 발현이 이뤄지도록 적절히 변형할 수 있다. 구조 유전자의 상류 측에 부착된 발현 카세트도 동일한 작용을 한다. 유도될 수 있는 프로모터에 의해, L-세린을 발효시켜 제조하는 과정 중에 발현을 증대시키는 것이 추가로 가능하게 된다. mRNA의 수명을 연장시키므로써도 역시 발현이 개선된다. 유전자 또는 유전자 구조는 상이한 복제 수로 플라스미드에 존재하거나 염색체에 융합되어 증폭될 수 있다. 또한, 효소의 활성 그 자체를 높이거나 효소 단백질의 분해를 저지함으로써 증강시킬 수도 있다. 대안적으로, 배지 조성을 변경함으로써 해당 유전자의 과발현을 또한 구현할 수 있다. 당업자라면 특히 Martin 등의 저서(Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), Guerrero 등의 저서(Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya 및 Morinaga의 저서(BioRechnology 6, 428-430 (1988)), Eikmanns 등의 저서(Gene 102, 93-98 (1991)), 유럽 특허 EPS 0 472 869, 미국 특허 제4,601,893호, Schwarzer 및 Puhler 등의 저서(Bio/

Technology 9, 84-87 (1991)), Reinscheid 등의 저서(Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), LaBarre 등의 저서(Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), 국제 특허 출원 WO 96/15246, Malumbres 등의 저서(Gene 134, 15-24 (1993)), 일본 공개 공보 JP-A-10-229891, Jesen 및 Hammer의 저서(Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), Makride의 저서(Microbiological Reviews 60: 512-538 (1996)), 및 유전학과 분자 생물학의 주지의 교본에서 그에 관한 지침을 찾아볼 수 있을 것이다.

본 발명에 따라 제조되는 유전학적으로 변형된 미생물은 L-세린을 제조하기 위한 목적으로 회분 배양법(batch culture) 또는 유가 배양법(fed-feed culture) 또는 반복 유가 배양법(repetitive fed-batch culture)으로 배양될 수 있다. 그러한 공지의 배양법에 관한 총설은 Chmiel의 교본(Bio-process Technique 1. Introduction in the Bio-method Technique (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) 또는 Storhas의 교본(Bio-reactors and peripheral devices (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994))에 개시되어 있다.

사용하려는 배양 배지는 각각의 균주의 요구를 적절하게 충족시켜야 한다. 각종의 미생물의 배양 배지에 관한 설명은 미국 박테리아학회(Washington D.C., USA, 1981)의 핸드북 "Manual of Methods for General Bacteriology"에 수록되어 있다. 탄소 공급원으로는 예컨대 글루코오스(glucose), 사카로스(saccharose), 락토오스(Lactose), 프럭토오스(fructose), 말토오스(maltose), 멜라췌(melasse), 전분, 및 셀룰로오스(cellulose)와 같은 당류와 탄수화물, 예컨대 콩기름, 해바라기기름, 땅콩기름, 및 야자기름과 같은 기름과 지방, 예컨대 팔미틴산(palmitic acid), 스테아린산(stearic acid), 및 리놀산(linoleic acid)과 같은 지방산, 예컨대 글리세린 및 에탄올과 같은 알코올, 그리고 예컨대 초산과 같은 유기산을 사용할 수 있다. 그러한 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 질소 공급원으로는 펩톤(peptone), 효모 추출물, 과육 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 원천수, 콩가루, 및 요소와 같은 유기 질소 함유 화합물 또는 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기 화합물을 사용할 수 있다. 그러한 질소 공급원은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 인 공급원으로는 인산, 수소인산칼륨, 또는 수소인산이칼륨이나 적절한 나트륨 함유 염을 사용할 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 예컨대 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속의 염을 함유해야 한다. 끝으로, 전술된 물질에 추가하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장소를 사용할 수 있다. 그 밖에도, 적절한 전단계 물질을 배양 배지에 첨가할 수 있다. 열거된 사용 물질은 단 한번만 배양에 부가되는 형태로 배양에 제공되거나 배양 동안 적절하게 공급될 수 있다. 배양의 pH 조절을 위해, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아 또는 암모니아수와 같은 염기성 화합물이나 인산 또는 황산과 같은 산성 화합물을 적절하게 사용한다. 거품 발생을 규제하기 위해, 예컨대 지방산 폴리글리콜에스테르와 같은 거품 방지제를 사용할 수 있다. 플라즈미드의 안정성을 유지시키기 위해, 예컨대 항생 물질과 같은 선택적으로 작용하는 적절한 물질을 배지에 첨가할 수 있다. 호기성 조건을 유지시키기 위해, 배양 중에 산소 또는 공기와 같은 산소 함유 기체 혼합물을 도입한다. 배양의 온도는 통상적으로 20 °C 내지 45 °C이고, 바람직하게는 25 °C 내지 40 °C이다. 최대의 L-세린이 생성될 때까지의 시간 동안 배양을 계속한다. 그러한 목표점은 통상적으로 10 시간 내지 160 시간 내에 도달된다. L-세린 생성의 분석은 Spackman 등의 저서(Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190)에 개시된 바와 같이 닐히드린 유도 반응(ninhydrin derivation)이 연이어지는 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 행하거나 Lindroth 등의 저서(Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174)에 개시된 바와 같이 역상 HPLC(reversed phase HPLC)에 의해 행할 수 있다.

본 발명이 주제인 미생물은 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 만노오스(mannose), 플럭토오스, 말토오스, 멜라췌, 전분, 셀룰로오스로 또는 글리세린과 에탄올로 L-세린을 제조할 수 있다. 이미 전술된 바 있는 코리네형 박테리아의 대표자가 바로 그러한 미생물이다. 발효 결과의 선택이 표 6에 표시되어 있다. 여기서, 본 발명에 따라 유전학적으로 변형된 미생물은 변형되지 않은 해당 미생물(야생형) 또는 유전자 삽입이 없는 벡터만을 함유하는 미생물에 비해 L-세린의 제조를 현저히 개선시킨다는 것을 그 특징으로 한다. 본 발명의 특징의 실시 양태에서는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032DpanBCpZ1serA4197에서 C-말단 단축 상동 serA 유전자의 과발현이 배지에서의 L-세린 축적을 대조 표본 균주에 비해 40 % 이상 증대시키는 결과를 가져오는 것으로 나타났다(표 6을 참조). L-세린의 생합성에 유리하게 작용하는 추가의 유전자를 함께 과발현시킴으로써, L-세린의 제조가 한층 더 증대될 것으로 예상된다.

본 발명의 의미에서의 아미노산 제조 균주란 그 대사 플럭스가 아미노산 또는 그 유도체를 생합성하는 쪽으로 증대되어 경과되도록 전형적인 방법 및/또는 분자 유전학적 방법에 의해 변형된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 또는 상동 미생물을 의미한다. 예컨대, 그러한 아미노산 제조 균주에서는 결정적인, 그에 따라 복잡하게 조절되는 대사 경로의 키 위치(병목 위치)에 있는 하나 이상의 유전자 및/또는 그에 대응하는 효소가 그 조절에 있어 변형되거나 탈조절된다. 그와 관련하여, 본 발명은 이미 공지된 아미노산 제조 균주, 바람직하게는 코리네박테리아 속 또는 상동 유기체를 모두 포함한다. 또한, 본 발명에 따르면, 당업자가 다른 미생물, 예컨대 엔테로박테리아, 바실라신, 또는 효모 중으로부터 그러한 인식과 유사하게 통용적인 방법에 따라 제조할 수 있는 제조 균주도 포함된다.

도면의 간단한 설명

첨부 도면은 사용되는 플라스미드와 더불어 PGD의 1차 구조의 비교 및 PCR에 의해 구축된 *serA*의 대립 유전자를 예시적으로 도시하고 있다. 그러한 첨부 도면 중에서,

도 1은 각종의 유기체 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제(PGD)의 1차 구조를 비교한 도면으로서, 여기서 수치 등급은 코리네형 박테리아 유래의 PGD의 아미노산 수에 해당하고; N = 아미노 말단이며; C = 카복시 말단이고; 밝은 회색 면으로 표시된 영역 A는 뉴클레오타이드 결합 부위를 나타내며; 어두운 회색으로 표시된 영역 B는 기질 결합 부위를 나타내고; 검정색으로 표시된 영역 C는 억제자(inhibitor) 결합 부위를 나타내며; 아울러 전형적으로 대장균(*Tobey K.L. and Grant G.A., 1986, J. Biol. Chem., 261: 12179-12183*) 또는 썬모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)(유전자뱅크 가입 번호 AE000512)로 대표된 2개의 추가의 균의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제가 주어져 있는 바, 그 경우 초고온성 박테리아인 썬모토가 마리티마의 단백질은 가장 짧게 327 아미노산의 길이를 갖는데 반해, 410 아미노산을 갖는 대장균 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제는 중간 길이를 갖는 것을 나타내고 있는 도면이고,

도 2는 C-말단 단축 PGD를 암호화하는, PCR에 의해 구축된 *serA*의 대립 유전자에 대한 개관을 나타낸 도면으로서, 야생형의 *serA* 유전자 영역(위쪽)과 본 발명에 따른 결실 구조가 도시되어 있고, 밝은 회색, 어두운 회색, 및 검정색으로 표시된 영역은 도 1에서와 같이 정의되어 있는 도면이며,

도 3은 pZ1*serA* 플라스미드 벡터를 나타낸 도면이고;

도 4는 pZ1*serA*Δ79 플라스미드 벡터를 나타낸 도면이며;

도 5는 pZ1*serA*Δ188 플라스미드 벡터를 나타낸 도면이고;

도 6은 pZ1*serA*Δ197 플라스미드 벡터를 나타낸 도면이며;

도 7은 pZ1*serA*Δ205 플라스미드 벡터를 나타낸 도면이고;

도 8은 pZ1*serA*Δ211 플라스미드 벡터를 나타낸 도면이다.

실시예

1. 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 2-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 의도적인 탈조절

a) 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제와 다른 유기체의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 아미노산 서열의 컴퓨터 지원 비교

우선, 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 구축을 위한 전략을 짰다. 특히 데이터뱅크로부터 얻은, 코리네박테리움 글루타미쿰의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 암호화하는 *serA* 유전자의 서열(Nakagawa, 2., Misoguchi, H., Ando, S., Hayashi, M., Ochiai, K., Yokoi, H., Tateishi, N., Senoh, A., Iketa, M. and Ozaki, A. Patent: EP 1108790-A 7064 20-JUN-2001; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (JP); Pompejus, M., Kroeger, B., Schroeder, H., Zelder, O., and Haberhauser, G. Patent: WO 0100843-A 167 04-JAN-2001; BASF AKTIENGESSELLSCHAFT (DE))을 사용하였다. 이어서, 코리네박테리움 글루타미쿰의 *serA* 유전자(SEQ ID No: 12)로부터 유도된 폴리펩티드 사슬을 데이터뱅크로부터 얻은 해당 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제와 비교하였다. 그 결과, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제는 530 아미노산을 갖는 마이코박테리움 투버클로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)(유전자뱅크 가입 번호 AL123456)와 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)(Sorokin, A., Azevedo, V., Zumstein, E., Galleron, N., Ehrlich, S.D. and Serror, P. Microbiology 142 (Pt 8), 2005-2016 (1996)) 및 아퀴팩스 이오리커스(*Aquifex aeolicus*)(유전자뱅크 가입 번호 AE000657)와 같은 몇 가지 다른 박테리아의 그것과 마찬가지로 매우 긴 것으로 나타났다. 그러한 그룹의 효소에는 쥐와 같은 동물 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제(Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftingen E. and Robbi M., 1997, Biochem. J., 323: 365-370), 사람 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제(Cho HM, Jun DY, Bae MA, Ahn JD. Kim YH., 2000, Gene 245(1): 193-201) 및 식물 유래의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제(예컨대, 아라비도시스 살리아나(*Arabidopsis thaliana*); Ho CL, Saito K., 2001, Amino Acids. 20(3): 243-59)도 속한다. 대장균 효소의 X선 구조 분석으로부터, 그것이 3개의 기능 영역, 즉 NAD/H의 결합을 위한 뉴클레오타이드 결합 영역(아미노산 108 내지 294), 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제가 접합되는 양분된 기질 결합 영역(아미노산 7-107 및 295-336), 및 L-세린의 알로스테릭 결합을 책임

지는 C-말단 조절 영역(아미노산 337-440)으로 이뤄지는 것으로 나타났다(Schuller DJ., Grant GA., Banaszak LT., 1995 nature Struct. Biol. Vol 2 1: 69-76). 3가지 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 타입의 아미노산 서열 비교로부터, 그들이 대략 C-말단 조절 영역의 길이에 있어 차이를 보이는 것으로 나타났다(도 1).

완전히 서열화된 계놈으로부터 공지된 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 클러스터 분석으로부터, C-말단에서의 차이에도 불구하고 그러한 3가지 단백질이 모두 정통 유전자 족(orthologous group)에 속하는 것으로 나타났다. 즉, 그 3가지 단백질은 공통의 진화 기원을 갖지만, 상이한 종으로 상이하게 발전되어 온 것이다.

b) PCR에 의해 C-말단 단축 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 단백질을 암호화하는 코리네박테리움 글루타미쿰의 *serA* 유전자의 대립 유전자 구축

C-말단에서 상이한 길이의 결실을 갖는 코리네박테리움 글루타미쿰의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 5가지 상이한 돌연변이주를 생성하였다(도 2). 결실 돌연변이주의 구축은 야생형 *serA* 유전자를 PCR에 의해 분리하는 것과 마찬가지로 행해졌다. 그를 위해, 유전자의 개시 코돈 전방의 240 bp 영역과 상동인 PCR 프라이머(*serA*-f: 5'-TCTAGAGCCGAGACGTGAATAAAAT-3')를 생성하여 전체의 프로모터 영역을 캐치하였다. 그러한 프라이머는 모든 구조에 대해 동일하게 사용되었고, 3'-말단에서 제한 효소 *Xba*I의 절단 부위를 가졌다. 완전한 *serA* 유전자의 증폭을 위해, 정지 코돈 후방의 199 bp에 놓이고 *Bam*HI-제한 효소 절단 부위를 갖는 제2 역상보 프라이머(reverse complementary primer)를 선별하였다. 예상 PCR 생성물의 길이는 2040 bp이다. 결실을 생성하기 위해, 유전자 영역 내에 놓이고 모두 역시 *Bam*HI의 절단 부위를 갖는 역상보 프라이머를 선별하였다. 프라이머 *serA*Δ211-r(5'-GGATCCTTAACCGGAAACGTTTCACAGC3')은 개시 코돈 후방의 956 bp에 놓여져 1196 bp 길이의 PCR 생성물을 생성한다. 그럼으로써, 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 마지막 211 아미노산이 절단된다. 결실은 대략 기질 결합 영역으로부터 조절 영역으로 이행되는 것으로 추정되는 영역에 놓여진다(도 1과 도 2를 비교). 프라이머 *serA*Δ205-r(5'-GGATCCTTACTCTTCGCCCACGCGACC3')은 개시 코돈 후방의 974 bp에 놓여지고, 예상 PCR 생성물의 길이는 1214 bp이다. 그 경우, C-말단 결실은 205 아미노산의 크기이고, 단백질은 325 위치에 있는 아미노산 글루타메이트 후방에서 종료된다. 그러한 아미노산을 불특정 부위에서 라이신으로 교환함으로써, 코리네박테리움 글루타미쿰에서 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제가 생성된다(EP 0 931 833). 2개의 결실은 쥐 유래의 단백질의 결실(Δ209 아미노산)도 이뤄지는 영역에 놓여진다(Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftigen E. and Robbi M., 1997, Biochem J., 323: 365-370). 2개의 프라이머 *serA*Δ197-r(5'-GGATCCTTAAGCCAGATCCATCCACACAG3') 및 *serA*Δ188-r(5'-GGATCCTTACTTGCCAGCAAGACC3')은 ATG 후방의 998 bp 또는 1026 bp에 놓여지고, 대장균에서 기질 결합 영역으로부터 조절 영역으로 이행되는 부위의 상류 측에 위치된다. PCR에 따른 예상 DNA 단편은 완전한 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제보다 197 또는 188 아미노산만큼 더 짧은 폴리펩티드 사슬을 생성한다. 가장 짧은 결실은 프라이머 *serA*Δ79-r(5'-GGATCCTTAATCCAGGCCACGGCCATT3')에 의해 생성되고, 대장균의 조절 영역에 대한 최대의 유사성을 갖는 79 아미노산의 영역을 절단한다(도 2). 추가로, 단축된 단백질을 생성하는 모든 역상보 프라이머에서 절단 부위의 후방에 정지 코돈을 삽입하였다.

PCR 반응은 써모사이클러(thermocycler)(PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) 중에서 200 μM의 디옥시뉴클레오티드 3인산(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 각각 1 μM의 해당 올리고 뉴클레오티드, 100 ng의 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 염색체 DNA, 1/10 체적의 10배 반응 완충액, 및 2.6 단위의 열 안정성 Taq-/Pwo-DNA 폴리머라제 혼합물의 존재(독일 Mannheim에 소재한 Roche사의 Expand High Fidelity PCR System) 및 다음의 조건 하에서 30 사이클로 행해졌다: 94 °C에서 60 초, 50 °C에서 90 초, 및 72 °C에서 2 분.

PCR 반응 후에 얻어진 DNA 단편을 QIAExII 겔 추출 키트(Qiagen)에 의해 제조사의 지시에 따라 0.8 % 아가로스(agarose) 겔로부터 분리하고, Sure Clone-Kits(Amersham Pharmacia Biotech)에 의해 pUC18 벡터의 *Sma*I 절단 부위에 평활 말단(blunt-end)으로 클로닝하였다. 플라스미드는 제한 맵핑(restriction mapping)에 의해 정확성에 대해 점검되었다. 그러한 클로닝은 대장균 균주 DH5amcr(Grant et al., Processings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649)에서 행해졌다.

이어서, *serA* 유전자 및 *serA* 결실 구조를 대장균/코리네박테리움 글루타미쿰 진자 벡터(pendulum vector) pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688)에 클로닝하였다. 그러한 벡터는 카나마이신(kanamycin)에 대한 내성을 매개해준다. 그를 위해, 결실 구조의 삽입체를 각각 *Eco*RI 및 *Bam*HI 제한 효소에 의해 pUC18 벡터로부터 절단하였다. 돌출된 DNA 말단을 클레노우(Klenow) 처리에 의해 채우고, 단편을 *Sca*I에 의해 절단된 벡터 pZ1에 평활 말단으로 결합하였다. 야생형 *serA* 유전자를 *Eco*RI 제한 효소에 의한 제한에 따라

역시 클레노우 처리하여 *ScaI*에 의해 절단된 벡터 pZ1에 평활 말단으로 결찰하였다. 그와 같이 하여 얻어진 구조는 pZ1*serA*(도 3), pZ1*serA*Δ79(도 4), pZ1*serA*Δ188(도 5), pZ1*serA*Δ197(도 6), pZ1*serA*Δ205(도 7), 및 pZ1*serA*Δ211(도 8)이었다.

2. 코리네박테리움 글루타미쿰에서의 야생형 *serA* 유전자 및 단축된 *serA* 대립 유전자의 과발현

pZ1*serA*, pZ1*serA*Δ79, pZ1*serA*Δ188, pZ1*serA*Δ197, pZ1*serA*Δ205, 및 pZ1*serA*Δ211 플라스미드를 전기 천공에 의해 개별적으로 코리네박테리움 글루타미쿰에 도입하였다. 대조 표본으로서 빈 플라스미드 pZ1을 역시 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 전기 천공에 의해 도입하였다. 이어서, 그와 같이 하여 얻어진 균주 13032pZ1, 13032pZ1*serA*, 13032pZ1*serA*Δ79, 13032pZ1*serA*Δ188, 13032pZ1*serA*Δ197, 13032pZ1*serA*Δ205, 및 13032pZ1*serA*Δ211을 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 효소 시험에 의해 과발현에 관해 분석하였다. 그를 위해, 6가지의 균주를 착염 배지(CgIII = 2.5 g의 NaCl, 10 g의 Bacto-peptone, 10 g의 Bacto-yeast 추출물, 2 % 글루코오스에 의한 pH 7.4)에서 배양하였고, 광물 배지 CGXII를 전배양으로부터 분리시켜 각각 접종하였다. 그러한 배지는 Keilhauser 등의 저서에 개시된 배지 CGXII(Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603)과 동일한 것이었지만, 25 µg/mL의 카나마이신을 추가로 함유하였다. Keilhauser 등의 저서에 개시된 배지의 조성은 표 1에 표시되어 있다:

[표 1]
배지 CGXII의 조성

성분	농도
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
요소	5 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.25 g/L
3-술폰산몰폴리노프로판	42 g/L
CaCl ₂	10 mg/L
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ × H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	1 mg/L
CuSO ₄	0.2 mg/L
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0.02 mg/L
비오틴(biotin)	0.2 mg/L
글루코오스	40 g/L
프로토카테추인산	30 10 mg/L

세포를 5 내지 8의 OD₆₀₀에서 지수 함수적 성장 단계로 채취하여 pH 7.5의 100 mM 트리스-HCl 중에서 2번 성장시켰다. 이어서, 세포 펠릿을 -20 °C에서 해리될 때까지 동결하였다. 그런 다음, 동결된 세포 펠릿을 얼음 상에서 해빙하고, pH 7.5/10 % 글리세린의 저온 100 mM 트리스-HCl로 재현탁하여 Brenson 탐상기(sonifier)에서 해리시켰다. 이어서, Sigma-202 MK 원심 분리기에서 13000 rpm 및 4 °C의 원심 분리에 의해 세포 잔해를 분리시켰다. 그와 같이 하여 얻어진 상등액(supernatant)을 원료 추출물로 하여 우선 PD-10 칼럼에 의해 제조자의 지시에 따라 탈염하고, 이어서 바로 효소 측정에 사용하였다. 효소 시험은 3-포스포글리세레이트와 NAD가 포스포히드록시피루베이트(phosphorhydroxypyruvate)와 NADH로 디는 반응 중에 NADH의 생성을 과도 측정에 의해 검증하는 것을 기반으로 하고 있다. 표 2에는 시험 개시물이 표시되어 있다:

[표 2]

3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 활성을 결정하기 위한 시험 개시물의 성분

	균주 용액	최종 농도
트리스-HCl; pH 8.8	500 mM	100 mM
디티오프레이트	100 mM	1 mM
EDTA	500 mM	5 mM
히드라진	250 mM	10 mM
NAD	20 mg/ml	2 mg/ml
RE	약 2 mg/ml	액 200 µg 단백질
3-포스포글리세레이트	150 mM	15 mM

그러한 시험 개시 조건에 따라, 야생형의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제에 대해 약 150 mU/mg 단백질의 특히 활성을 결정할 수 있었다. 완전한 *serA* 유전자의 과발현에 의해 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 활성이 약 16배 증대되는 것으로 나타났다. *serA*Δ197 구조는 야생형 단백질에 비해 10배의 과발현을 가능하게 한다. *serA*Δ188 및 *serA*Δ205 구조는 3 내지 3.4배 더 과발현시킬 수 있었는데 반해, *serA*Δ79 구조에 있어서는 단지 1.2 내지 1.5배의 과발현만이 가능하였다. 그에 따라, 코리네박테리움 글루타미쿰의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 C-말단 197 아미노산의 결실에 의해 생성된 *serA*Δ197 돌연변이주가 기능적이고, 야생형보다 60 % 더 높은 활성을 갖는 것으로 나타나고 있다.

표 3에는 결과가 요약되어 있다:

[표 3]

serA 유전자 및 C-말단 단축 *serA* 대립 유전자의 과발현

균주	PGD-특이 활성 (U/mg 단백질)	과발현 배수
13032pZ1	130	1.0
13032pZ1 <i>serA</i>	2140	16.5
13032pZ1 <i>serA</i> Δ79	190	1.5
13032pZ1 <i>serA</i> Δ188	440	3.4
13032pZ1 <i>serA</i> Δ197	1320	10.0
13032pZ1 <i>serA</i> Δ205	390	3.0
13032pZ1 <i>serA</i> Δ211	150	1.2

* 13032 균주에서의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 활성을 1.0으로 정규화함.

3. L-세린에 의한 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 야생형 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 및 C-말단 단축 *serA*Δ197 돌연변이주의 억제에 대한 검사

이하에서는 C-말단 부근에서 단축된 *serA*Δ197 돌연변이주가 더 이상 L-세린에 의해 억제되지 않을 수 있는지의 여부에 대해 시험하였다. 그를 위해, 우선 코리네박테리움 글루타미쿰의 무세포 추출물 중의 야생형 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제가 L-세린에 의해 억제될 가능성을 진술된 효소 시험에 의거하여 검사하였다. 그 검사를 위해, 1, 5, 및 10 mM L-세린을 시험 개시물에 추가로 첨가하고, 30 °C에서 5분 동안 배양하였다. 이어서, 15 mM 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 첨가함으로써 반응을 개시하였다. 억제를 검증할 수 있기 위해서는 배양이 필요하였다(표 4). 일정 수준의 억제에 도달되기 전에 수 분간의 배양을 필요로 하는 그러한 L-세린 억제의 시간 종속성은 다른 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제, 예컨대 바실러스 서브틸리스의 정제된 효소에 대해서도 이미 개시된 바 있다(Saski R. and Pitzer L., 1975, Eur. J. Biochem., 51: 415-427).

[표 4]

L-세린에 의한 코리네박테리움 글루타미쿰의 야생형 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 억제

L-세린 [mM]	3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 상대 활성 [%]	
	배양 없음	30 °C에서 5분간 배양
0	100*	100*
1	106	96
5	112	82
10	104	56

* L-세린의 첨가가 없는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 활성을 100 %로 둠.

그러한 결과를 바탕으로 하여, 13032pZ1serA 및 13032pZ1serAΔ197 균주에서의 L-세린에 의한 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 억제를 검사하였다. 실제로, C-말단 단축 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 돌연변이주는 더 이상 L-세린에 의해 크게 억제될 수 없는 것으로 나타났다(표 5):

[표 5]

13032pZ1serA 및 13032pZ1serAΔ197 균주에서의 L-세린에 의한 과발현된 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 억제

L-세린 [mM]	3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 상대 활성 [%]	
	13032pZ1serA	13032pZ1serAΔ197
0	100*	100*
10	34	95

* L-세린의 첨가가 없는 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 활성을 100 %로 둠.

** L-세린이 없이 30--에서 5분 동안 배양한 후에 활성을 결정함.

그에 따라, 코리네박테리움 글루타미쿰의 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 C-말단을 의도적으로 결실시킴으로써 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 성공적으로 생성할 수 있게 된다.

4. 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제에 대한 유전자를 과발현함에 의한 L-세린 축적의 증대(serAΔ 197)

탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제에 의한 균주의 L-세린 분리를 분석하기 위해, pZ1, pZ1serA, 및 pZ1serAΔ197 플라스미드를 코리네박테리움 글루타미쿰 13032ΔpanBC 균주로 형질 전환시켰다(E. Radmacher, A. Vaitsikova, U. Burger, K. Krumbach, H. Sahm, L. Eggeling, 2002, Appl. Environ. Microbiol. (Publication in Preparation)). 그러한 균주는 판토텐네이트(pantothenate) 생합성 유전자인 panB 및 panC의 결실로 인해 판토텐네이트 영양 요구체가 되고, 피루베이트의 축적이 증대됨에 의거하여 판토텐네이트 제한 하에 약 50 mM 알라닌과 8 mM 발린을 분리시키는 것을 그 특징으로 한다. 또한, 그러한 균주는 약 100 μM L-세린을 생성하고, 그에 따라 L-세린 생산자의 구축을 위한 출발 균주로서 적합하다. pZ1serA 플라스미드에 의해 형질 전환된 13032 ΔpanBCpZ1serA는 2002년 4월 11일자 부다페스트 조약에 따라 DSM 번호 14922 하에 DSMZ에 기탁되었다.

L-세린 분리를 검사하기 위해, 3가지 균주를 착염 배지(2 % 글루코오스와 50 μg/l 카나마이신을 함유한 CgIII)에서 배양하고, 발효 배지 CGXII(J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603)을 전배양으로부터 분리시켜 각각 접종하였다. 그러한 배지는 50 μg/l 카나마이신과 1 μM 판토텐네이트를 추가로 함유하였다. 2개의 별개의 발효를 행하였다. 20 rpm의 회전 шей커에서 30 °C로 24 또는 35 시간 동안 배양한 후에, 배지 중에 축적된 L-세린 양을 결정하였다. 그 아미노산 농도를 고압 액체

크로마토그래피(J Chromat (1983) 266: 471-482)에 의해 결정하였다. 그 발효의 결과가 표 6에 표시되어 있는 바, 야생형 *serA* 유전자의 과발현에 의해서만도 이미 배지 중에서의 L-세린 축적이 10 % 증대되는 것으로 나타나고 있다. 그 반면에, 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 과발현은 빈 플라스미드만을 담고 있는 대조 표본 균주에 비해 무려 40 %까지의 증대를 구현하고 있다. 즉, L-세린 생합성 효소인 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제에 대해 전술된 바와 같이 구조화된 유전자를 사용하는 것이 곧 L-세린 생성을 결정적으로 개선시키는 방법이 된다.

[표 6]

serA 또는 *serAΔ197* 유전자의 발현 후에 코리네박테리움 글루타미쿰 13032ΔpanBC의 배양 잔해 중에서의 L-세린의 축적

균주	t [h]	TG [mg/ml]	L-세린 [μM]	L-세린/TG [mg/g]
13032DpanBCpZ1	24	18.3	164	0.9
13032DpanBCpZ1 <i>serA</i>	24	14.7	163	1.2
13032DpanBCpZ1 <i>serAΔ197</i>	24	16.5	199	1.3

* TG = 세포 건조 중량

(57) 청구의 범위

청구항 1.

SEQ ID No: 1에 따른 *serA* 유전자 또는 그 뉴클레오티드 서열의 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체나 그와 이중 교배된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 2.

SEQ ID No: 2에 따른 *serA* 유전자 또는 그 뉴클레오티드 서열의 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체나 그와 이중 교배된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 3.

SEQ ID No: 3에 따른 *serA* 유전자 또는 그 뉴클레오티드 서열의 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체나 그와 이중 교배된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 4.

SEQ ID No: 4에 따른 *serA* 유전자 또는 그 뉴클레오티드 서열의 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체나 그와 이중 교배된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 5.

SEQ ID No: 5에 따른 *serA* 유전자 또는 그 뉴클레오티드 서열의 대립 유전자, 상동체, 또는 유도체나 그와 이중 교배된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네형 박테리아로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 7.

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리아 또는 브레비박테리아로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 8.

제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰 또는 브레비박테리움 플라툼으로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제의 핵산.

청구항 9.

제1항 내지 제8항에 따른 뉴클레오티드 서열 중의 하나 이상 또는 작용에 있어 그와 연계된 조절 서열을 포함하는 유전자 구조.

청구항 10.

제1항 내지 제8항에 따른 뉴클레오티드 서열 중의 하나 이상 또는 제9항에 따른 유전자 구조 및 선별, 숙주 세포에의 복제, 또는 숙주 세포 계놈에의 융합을 위한 추가의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 11.

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 따른 핵산 서열에 의해 암호화된 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제 또는 그 일부.

청구항 12.

제11항에 있어서, SEQ ID No: 7에 따른 아미노산 서열 또는 그 폴리펩티드 서열의 변형체 또는 그 이형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 13.

제11항에 있어서, SEQ ID No: 8에 따른 아미노산 서열 또는 그 폴리펩티드 서열의 변형체 또는 그 이형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 14.

제11항에 있어서, SEQ ID No: 9에 따른 아미노산 서열 또는 그 폴리펩티드 서열의 변형체 또는 그 이형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 15.

제11항에 있어서, SEQ ID No: 10에 따른 아미노산 서열 또는 그 폴리펩티드 서열의 변형체 또는 그 이형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 16.

제11항에 있어서, SEQ ID No: 11에 따른 아미노산 서열 또는 그 폴리펩티드 서열의 변형체 또는 그 이형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 17.

제11항 내지 제16항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네형 박테리아로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 18.

제11항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리아 또는 브레비박테리아로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 19.

제11항 내지 제18항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰 또는 브레비박테리움 플라봄으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제.

청구항 20.

제1항 내지 제8항에 따른 핵산 중의 하나 이상을 야생형 미생물에 비해 증폭되어 발현되고/발현되거나 그 복제 수가 증가되는 복제 가능한 형태로 포함하는 미생물.

청구항 21.

제20항에 있어서, 제9항에 따른 유전자 구조 또는 제10항에 따른 벡터를 복제 가능한 형태로 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 22.

제20항 또는 제21항에 있어서, 해당 야생형 균주에 비해 활성화된 탈조절 3-포스포글리세레이트 디히드로게나제를 갖는 제11항 내지 제19항에 따른 폴리펩티드 중의 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 23.

제20항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네형 박테리아인 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 24.

제20항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리아 또는 브레비박테리아 속에 속하는 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 25.

제20항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 코리네박테리움 글루타미쿰 또는 브레비박테리움 플라봄에 속하는 것을 특징으로 하는 미생물.

청구항 26.

L-세린의 생합성에 관여하는 단백질을 암호화하는 유전자를 식별 및/또는 분리하기 위한 프로브에 있어서,

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 따른 핵산으로부터 추출하여 제조되고, 검출에 적합한 표지를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로브.

청구항 27.

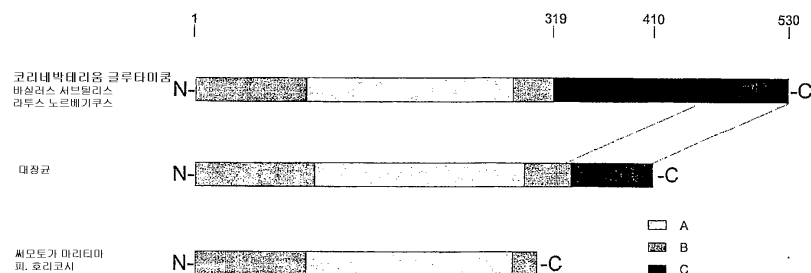
a) 제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 따른 핵산 중의 하나 이상을 코리네형 박테리아로부터 분리하고, 암호화된 해당 폴리펩티드의 유전자 발현 및/또는 활성이 유전학적으로 변형되지 않은 해당 미생물에서보다 더 증대되는 미생물에 전달하여 거기서 발현시키는 단계,

b) 그와 같이 유전학적으로 변형된 단계 a)로부터의 미생물을 미생물에 의한 L-세린의 제조에 투입하는 단계, 및

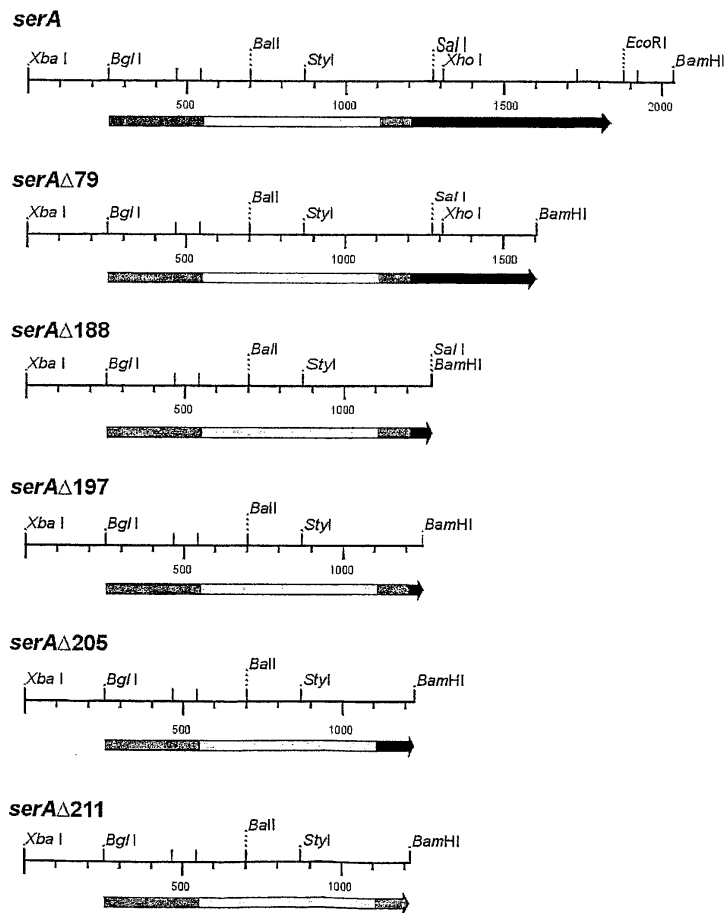
c) 생성된 해당 L-세린을 배양 배지로부터 분리시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 L-세린의 제조 방법.

도면

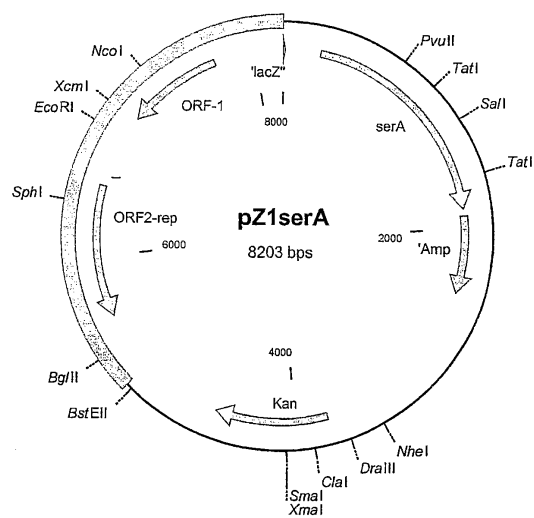
도면1



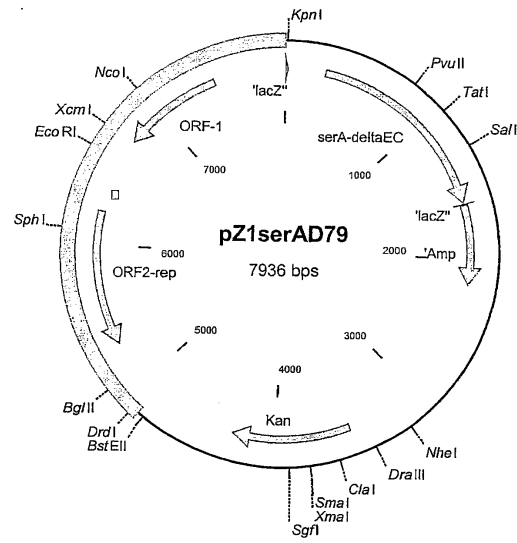
도면2



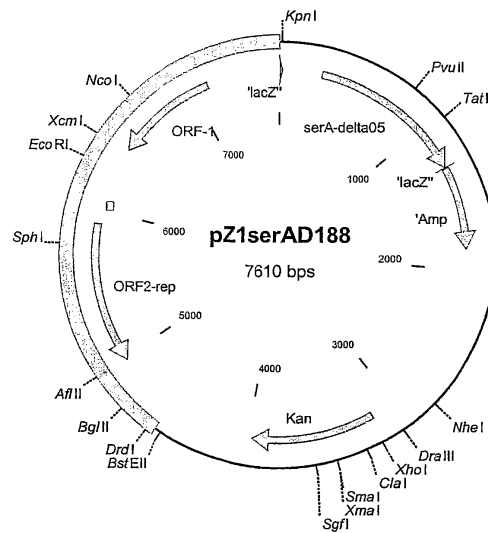
도면3



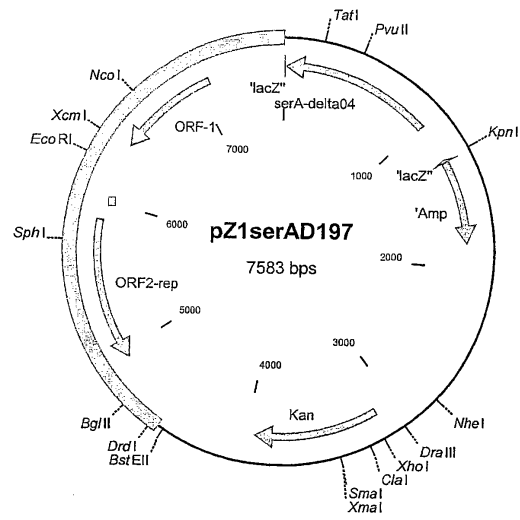
도면4



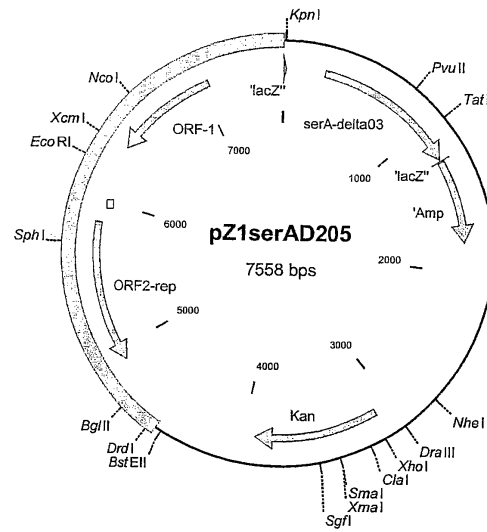
도면5



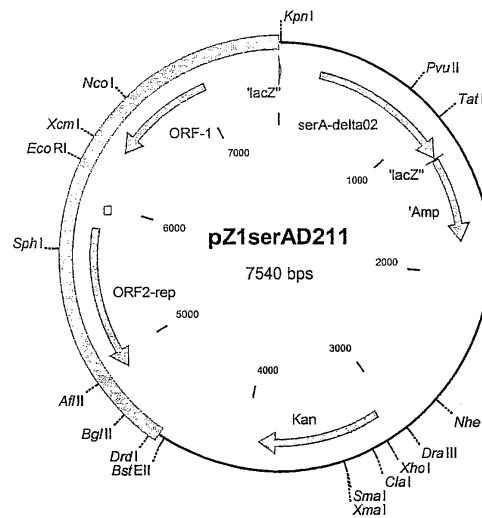
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110>	Forschungszentrum Julich GmbH	
<120>	NUCLEOTIDE SEQUENCES THAT ENCODE DEREGULATED PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASES OF CORYNEFORM BACTERIA AND METHOD FOR PRODUCING L-SERINE	
<130>	1.2002	
<140>	102 31 297.4	
<141>	2002-07-10	
<160>	12	
<170>	PatentIn Ver. 2.1	
<210>	1	
<211>	1253	
<212>	DNA	
<213>	Corynebacterium glutamicum	
<400>	1	
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt		60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaa atctcacagcat gaatctctgg gttagatgac		120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca		180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt		240
aacttgtag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca		300

ctgttgacgc gcttggagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggctggggt 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcggaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccgggtc cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcctttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggtcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggcttaagga tcc 1253

<210> 2
<211> 1607
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatggtg agacaccttt gggggtaaata ctacacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggctgggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttctagttt ttccaggagt 240
aacttgtagc ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctgttgacgc gcttggagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420

atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480

tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540

cctctaatat tcaactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600

agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660

gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720

ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780

ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840

ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcmc 900

agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960

ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccgggtca cattcgtggc gctggtttcg 1020

atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttgttg 1080

tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140

ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200

gtggtcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc 1260

ttgctggcaa gcttgctgac gccgccccag tctccattga ggttgaggct cgaggcgagc 1320

tttcttccga gcaggctgat gcacttggtt tgtccgctgt tcgtggtttg ttctccgaa 1380

ttatcgaaga gtccgttact ttogtcaacg ctccctcgcat tgctgaagag cgtggcctgg 1440

acatctccgt gaagaccaac tctgagtctg ttactcaccg ttccgtcctg caggtaagg 1500

tcattactgg cagcggcgcg agcgcaactg ttgttggtgc cctgactggt cttgagcgcg 1560

ttgagaagat caccgcgcat aatggccgtg gcttgatta aggatcc 1607

<210> 3

<211> 1280

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60

ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctacagcat gaatctctgg gttagatgac 120

tttctgggtg ggggaggggt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaacc ggcgtggaca 180

cgctctgcagc cgacgcgggc gtgcctggtg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt	240
aacttgtagag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca	300
ctgttgacgc gcttgagagat gcagtagaag tccgttggtg tgacggacct aaccgcccag	360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg	420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggctggtggt	480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga	540
cctctaatat tcaactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc	600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg	660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt	720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc	780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tgggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt	840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc	900
agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg	960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttcg	1020
atgtgtactc caccgagcct tgcaactgatt ctcctttggt caagttgcct caggttgttg	1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg	1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg	1200
gtggtcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc	1260
ttgctggcaa gtaaggatcc	1280

<210> 4
 <211> 1229
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4	
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt	60
ttgcatggtg agacaccttt gggggtaaata ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac	120
tttctgggtg ggggaggggt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggctgggaca	180
cgctctgcagc cgacgcgggc gtgcctggtg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt	240

aacttgtag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca	300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag	360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg	420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct	480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga	540
cctctaatat tctactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc	600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg	660
gtgtggaaat tttcggaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt	720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc	780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt	840
ctgactttgt caccattcac ctccctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc	900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg	960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttcg	1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttggtg	1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg	1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg	1200
gtggtcgcgt gggcgaagag taaggatcc	1229

<210> 5
 <211> 1211
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5	
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt	60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaata ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac	120
tttctgggtg ggggaggggt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca	180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt	240
aacttgtag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca	300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag	360

aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg	420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct	480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga	540
cctctaatat tcaactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc	600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg	660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt	720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc	780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt	840
ctgactttgt caccattcac ctccctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc	900
agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg	960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggta cattcgtggc gctggtttcg	1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttggtg	1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg	1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg	1200
gttaaggatc c	1211

<210> 6
 <211> 2043
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6	
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt	60
ttgcatggtg agacaccttt gggggtaaata ctcacagcat gaatctcttg gttagatgac	120
tttctgggtg ggggaggggt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca	180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttccctagttt ttccaggagt	240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag toctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca	300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag	360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg	420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct	480

tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga	540
cctctaatat tactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc	600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg	660
gtgtggaaat tttcggaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt	720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc	780
ctgctcgctg ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt	840
ctgactttgt caccattcac ctccctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcg	900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg	960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttcg	1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttggtg	1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg	1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg	1200
gtggtcgctg gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggctctc	1260
ttgctggcaa gcttgctgac gccgccccag tctccattga ggttgaggct cgaggcgagc	1320
tttcttccga gcaggctgat gcaacttggt tgtccgctgt tcgtggtttg ttctccggaa	1380
ttatcgaaga gtccgttact ttcgtaacg ctccctcgcat tgctgaagag cgtggcctgg	1440
acatctccgt gaagaccaac tctgagtctg ttactcacg ttccgtcctg caggtcaagg	1500
tcattactgg cagcggcgcg agcgcaactg ttgttggtgc cctgactggt cttgagcgcg	1560
ttgagaagat caccgcgcat aatggccgtg gcctggatct gcgcgcagag ggtctgaacc	1620
tcttctgca gtacactgac gctcctggtg cactgggtac cgttggtacc aagctgggtg	1680
ctgctggcat caacatcgag gctgctgcgt tgactcaggc tgagaagggt gacggcgctg	1740
tcctgatcct gcgtgttgag tccgctgtct ctgaagagct ggaagctgaa atcaacgctg	1800
agttgggtgc tacttccttc caggttgatc ttgactaatt agagatccat ttgcttgaac	1860
cgccttcca tctttgaatt cattcaaggt ggtaaggcgg ttttcgctct tttatacag	1920
ttttaaaggt agatttgga gagaagattt cccttaagaa aggttcttaa caaccatgcc	1980
gcctgcgacg ctgttcaatg ttttgacttc agctggactt gaccctcacc agtctaagga	2040
tcc	2043

<210> 7
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

 <400> 7
 Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30
 Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45
 Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60
 Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80
 Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95
 Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110
 Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125
 Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140
 Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175
 Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190
 Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205
 Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220
 Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240

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

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala
325 330

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175
 Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190
 Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205
 Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220
 Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240
 Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255
 Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
 260 265 270
 Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
 275 280 285
 Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
 290 295 300
 Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
 305 310 315 320
 Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
 325 330 335
 Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
 340 345 350
 Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
 355 360 365
 Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
 370 375 380
 Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
 385 390 395 400
 Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
 405 410 415
 Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala

420 425 430
 Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
 435 440 445

 Gly Leu Asp
 450

 <210> 9
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

 <400> 9
 Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

 Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

 Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

 Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

 Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

 Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

 Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

 Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

 Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

 Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160

 Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175

 Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190

 Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys

195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

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

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys
340

<210> 10
<211> 325
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10
Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn

85	90	95
Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu		
100	105	110
Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg		
115	120	125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly		
130	135	140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala		
145	150	155
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr		
165	170	175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu		
180	185	190
Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys		
195	200	205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser		
210	215	220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp		
225	230	235
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala		
245	250	255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe		
260	265	270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu		
275	280	285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys		
290	295	300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly		
305	310	315
Arg Val Gly Glu Glu		
325		

<210> 11
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 11
Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15
Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30
Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45
Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60
Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80
Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95
Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110
Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190
Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly
305 310 315

<210> 12

<211> 530

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205
 Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220
 Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240
 Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255
 Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
 260 265 270
 Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
 275 280 285
 Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
 290 295 300
 Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
 305 310 315 320
 Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
 325 330 335
 Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
 340 345 350
 Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
 355 360 365
 Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
 370 375 380
 Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
 385 390 395 400
 Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
 405 410 415
 Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala
 420 425 430
 Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
 435 440 445
 Gly Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr
 450 455 460
 Asp Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala

465	470	475	480
Gly Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp			
485	490	495	
Gly Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu			
500	505	510	
Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp			
515	520	525	
Leu Asp			
530			