(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0078444
(43) 공개일자 2018년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0183094
(22) 출원일자 2016년12월29일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호
백승필
대전광역시 유성구 노은로426번길 15 602동 1604호 (하기동,송림마을아파트)
박수현
경기도 군포시 산본천로 12 624동 1101호 (산본동,을지아파트)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 16 항

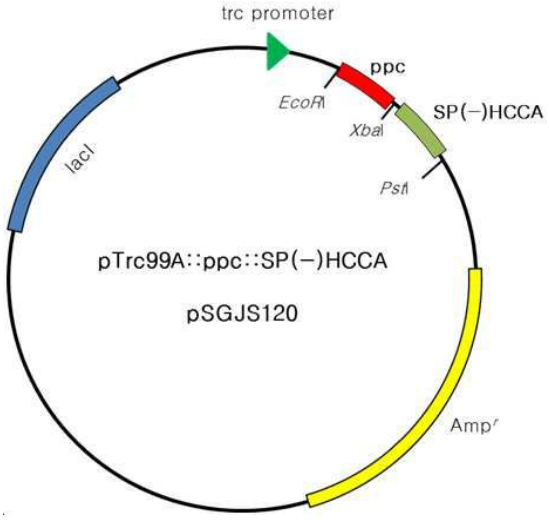
(54) 발명의 명칭 **CA 및 ppc 유전자가 과발현되고 pykF, pykA 및 ptsG 유전자가 불활성화된 숙신산 생산량이 증대된 재조합 대장균 균주 및 그의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 숙신산 생산량이 증대된 재조합 대장균 균주 및 그의 제조 방법에 관한 것으로서, 탄산 무수화효소를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하고, 피루브산 인산화효소 F 유전자, 피루브산 인산화효소 A 유전자 및 포도당 인산전이효소 유전자가 불활성화된 재조합 대장균 균주를 포함한다.

상기와 같은 본 발명에 따르면, 기존 균주 대비 이산화탄소를 이용한 숙신산 생산량이 크게 증가하므로 이를 효과적으로 이산화탄소로부터의 숙신산 생산에 이용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 9/1205 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12P 7/46 (2013.01)
C12Y 204/0104 (2013.01)
C12Y 207/01 (2013.01)
C12Y 401/01031 (2013.01)
C12Y 402/01001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201632003
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 (재)한국연구재단
연구사업명 C1가스리파이너리
연구과제명 C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율 1/1
주관기관 서강대학교
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

탄산 무수화효소(carbonic anhydrase, CA)를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase, ppc)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하고, 피루브산 인산화효소 F(pyruvate kinase F, pykF) 유전자, 피루브산 인산화효소 A(pyruvate kinase A, pykA) 유전자 및 포도당 인산전이효소(glucose phosphotransferase, ptsG) 유전자가 불활성화된 재조합 대장균 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 탄산 무수화효소를 코딩하는 핵산 서열은 Hahella chejuensis KCTC 2396 유래의 탄산 무수화효소인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 탄산 무수화효소는 시그널 펩타이드가 제거되고 코돈 최적화된 서열목록 제 2 서열로 나타낸 핵산서열을 포함하는 개질 탄산 무수화효소인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 핵산서열은 동종의 대장균으로부터 유래된 것인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 피루브산 인산화효소 F 유전자는 서열목록 제 8 서열로 나타낸 핵산서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 피루브산 인산화효소 A 유전자는 서열목록 제 9 서열로 나타낸 핵산서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 포도당 인산전이효소 유전자는 서열목록 제 14 서열로 나타낸 핵산서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 불활성화는 피루브산 인산화효소 F 유전자, 피루브산 인산화효소 A 유전자 및 포도당 인산전이효소 유전자의 결손에 의한 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 피루브산 인산화효소 F 유전자의 결손은 서열목록 제 10 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 정방향 프라이머 및 서열목록 제 11 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 역방향 프라이머에 의한 결손인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 피루브산 인산화효소 A 유전자의 결손은 서열목록 제 12 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 정방향 프라이머 및 서열목록 제 13 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 역방향 프라이머에 의한 결손인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 포도당 인산전이효소 유전자의 결손은 서열목록 제 15 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 정방향 프라이머 및 서열목록 제 16 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 역방향 프라이머에 의한 결손인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 상기 두 유전자의 업스트림 위치에 작동적으로 결합된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 탄산 무수화효소를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 핵산 서열은 하나의 프로모터(promoter)에 의해 동시 발현되는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 프로모터는 대장균 유래의 프로모터인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 프로모터는 trc 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터, lac 프로모터 및 trp 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 균주.

청구항 16

다음 단계를 포함하는 숙신산(succinate) 생산량이 증대된 재조합 대장균 (Escherichia coli) 균주의 제조방법:

(a) 탄산 무수화효소(carbonic anhydrase, CA)를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase, ppc)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 도입하여 대장균 균주를 형질전환하는 단계; 및

(b) 대장균 균주의 피루브산 인산화효소 F(pyruvate kinase F, pykF) 유전자, 피루브산 인산화효소 A(pyruvate

kinase A, pykA) 유전자 및 포도당 인산전이효소(glucose phosphotransferase, ptsG) 유전자를 불활성화시키는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 숙신산 생산량이 증대된 재조합 대장균 균주 및 그의 제조 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 탄산 무수화효소 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 강화하고, 피루브산 인산화효소 F, 피루브산 인산화효소 A 및 포도당 인산전이효소를 결손시킨 대장균 균주 및 이를 이용하여 숙신산의 생산량을 증대시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화석연료의 사용이 증가함에 따라 지속적으로 온실가스양이 증가하고 있으며, 지구온난화와 같은 이상기후현상 발생원인이 온실가스로 알려져 있다. 특히 이산화탄소가 온실가스의 약 84% 정도를 차지하는 주된 온실가스로 알려져 있으므로, 이산화탄소를 이용한 고부가가치 화합물을 합성하는 기술을 개발한다면, 이산화탄소 저감과 동시에 산업적으로 유용한 기술이 될 것이다.

[0003] 기존 이산화탄소를 활용한 기술들은 대부분 단백질 분리정제를 이용한 방법으로서, 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, CA) 단백질을 대장균에서 발현 및 분리 정제 후, 탄산칼슘을 생산하는 연구를 진행해왔다. 그러나 대장균 자체를 생 촉매로 이용하여 이산화탄소를 이용 및 전환하고, 최종적으로 고부가가치 화합물인 숙신산의 생산이 가능함을 증명한 연구는 거의 진행되지 않았다.

[0004] 특히 대장균이 이산화탄소를 이용한다는 것을 직접적으로 증명하기보다는, 간접적으로 $NaHCO_3$ 또는 $MgCO_3$)의 탄산염(carbonate)을 배지에 첨가함으로써 이미 이산화탄소가 수화(hydration)되어 생산된 HCO_3^-(bicarbionate ion) 공급하여 이를 설명하였기 때문에, 이를 근거로 대장균이 직접적으로 이산화탄소를 이용했다고 증명하기엔 부족하다. 따라서 본 발명에서는 대장균이 이산화탄소를 이용하는 것을 증명하기 위해 동위원소 ^{13}C으로 치환된 $^{13}CO_2$를 기질로 공급하였으며, 생산물 분석은 LC-MS를 통해 진행해 생산된 숙신산이 이산화탄소를 이용해 생산되었음을 정성적 및 정량적으로 증명하였다. 또한 유전자 재조합 기술을 사용하여 강화된 이산화탄소 활용능력을 가진 대장균을 개발하여 이산화탄소를 이용한 숙신산 생산량을 크게 증대 시켰다. 이 결과에 따라 본 기술을 통해 제작된 재조합 대장균이 이산화탄소를 이용하여 숙신산 생산을 할 수 있으며, 생산량 증가를 통해 우수한 균주임을 증명할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0656590호 (2006.12.05)

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1618852호 (2016.04.29)

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) "Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in Escherichia coli", Enzyme and Microbial Technology, Vol 45, December 2009, p491-497

(비특허문헌 0002) C.S. MILLARD et al., "Enhanced Production of Succinic Acid by Overexpression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Escherichia coli", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol 62, No 5, May 1996, p. 1808-1810

(비특허문헌 0003) P.P. Cherepanovet al., Gene disruption in Escherichia coli: Tc R and Km R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, Gene 158(1) (1995) 9-14

(비특허문헌 0004) MR ki et al., "Expression, reconstruction and characterization of codon-optimized carbonic anhydrase from Hahella chejuensis for CO2 sequestration application", 2013, bioprocess and biosystems engineering, 36(3) 375-381

(비특허문헌 0005) KH Min et al., "High expression and biosilica encapsulation of alkaline-active carbonic anhydrase for CO2 sequestration system development", 2016, chemosphere, 143, 128-134

(비특허문헌 0006) SH park et al., "Increased incorporation of gaseous CO2 into succinate by Escherichia coli overexpressing carbonic anhydrase and phosphoenolpyruvate carboxylase genes", 2017 Journal of biotechnology, 241, 101-107

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 숙신산의 생산량이 증대된 재조합 대장균 균주를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 탄산 무수화효소 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 과발현시키고, 피루브산 인산화효소 F, 피루브산 인산화효소 A 및 포도당 인산전이효소를 결손시키면 숙신산의 생산량이 증가함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, 숙신산의 생산량이 증대된 재조합 대장균 균주 및 그 제조 방법을 제공함에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 균주가 숙신산을 생산함에 있어 탄소원으로 이산화탄소를 사용하므로, 이를 이용하여 이산화탄소의 고정 기술로 활용함으로써 온실 가스 저감 방법으로 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 탄산 무수화효소(carbonic anhydrase, CA)를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase, ppc)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하고, 피루브산 인산화효소 F(pyruvate kinase F, pykF) 유전자, 피루브산 인산화효소 A(pyruvate kinase A, pykA) 유전자 및 포도당 인산전이효소(glucose phosphotransferase, ptsG) 유전자가 불활성화된 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 숙신산의 생산량이 증대된 재조합 대장균 균주를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 탄산 무수화효소 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 과발현시키고, 피루브산 인산화효소 F, 피루브산 인산화효소 A 및 포도당 인산전이효소 유전자를 결손시키면 숙신산의 생산량이 증가함을 규명하였다.

[0012] 대장균은 일반적으로 글루코스(glucose)를 탄소원으로 이용하여 숙신산을 생산하는 대사경로를 가지고 있다(도 1). 글루코스가 대사경로를 통해 탄소 3개로 이루어진 포스포에놀피루브산(phosphoenolpyruvate, PEP)으로 전환되면 이를 탄소 4개로 이루어진 옥살산(oxaloacetate, OAA)로 전환하기 위해 탄소 1개가 추가적으로 필요한데, 이 때 이산화탄소가 수화(hydration)되는 반응 중에 생성되는 HCO_3^-(bicarbonate)를 이용하게 된다.

[0013] OAA는 숙신산 생산을 위해 꼭 증가시켜야 되는 물질로 알려져 있지만, 대장균 내에서는 도 1에 기재된 탄산 무수화효소(carbonic anhydrase, CA)가 존재하지 않고, CO_2 수화 반응 중 H_2CO_3 탄산생산반응이 느리기 때문에 HCO_3^-의 공급이 원활하지 않다(도 2).

[0014] 따라서 본 발명에서는, HCO_3^-의 공급을 증가시키기 위해 탄산 무수화효소 유전자를 발현 벡터를 이용한 재조합을 통해 과발현시켰고, 이렇게 생산된 HCO_3^-를 더 효과적으로 이용하기 위해 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase, ppc) 유전자도 동시에 과발현하는 재조합 벡터를 제작하였다. 또한 OAA의 생산을 증가시키기 위해, 기질로 사용되는 PEP를 소모하는 대사경로 해당 효소 피루브산 인산화효소(pyruvate kinase) 유전자인 pykF, pykA 및 포도당 인산전이효소 유전자인 ptsG를 결손시켰으며, 이를 통해 궁극적으로 이산화탄소 활용이 강화된 숙신산 생산 유전자 재조합 대장균 균주를 완성하였다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 탄산 무수화효소를 코딩하는 핵산 서열은 Hahella chejuensis KCTC 2396 유래의 탄산 무수화효소이다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 탄산 무수화효소는 시그널 펩타이드가 제거되거나 코돈 최적화된 서열목록 제 2 서열로 나타낸 핵산서열을 포함하는 개질 탄산 무수화효소이다.

[0017] 상기 탄산 무수화효소는 대장균 이외의 종에서 유래한 유전자일 수 있으며, 이러한 경우 대장균에서 발현 시 불용성(insoluble), 즉 불활성화된 단백질 형태로 발현될 수 있기 때문에 리폴딩(refolding) 과정을 추가적으로 거쳐서 가용성(soluble) 있는 형태로 변환하여 사용해야 한다는 단점이 있다(MR ki et al., 2013, bioprocess and biosystems engineering, 36(3) 375-381). 이를 보완하기 위해 시그널 펩타이드를 제거하는 방법을 이용할 수 있다.

[0018] 시그널 펩타이드는 세포 내에서 해당 유전자의 발현으로 인해 생성된 단백질이 이동하는 경로에 관련한 정보를 가지고 있는 단백질 서열이다. 그러므로 해당 유전자의 시그널 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 제거할 경우, 이종 유전자를 대장균에서 발현하였을 때 가용성 있는 형태로 발현되며, 불필요한 리폴딩 과정이 필요없음이 확인된 바 있다(KH Min et al., 2016, chemosphere, 143, 128-134).

[0019] 본 발명의 개질 탄산 무수화효소를 설명하기 위해 사용된 용어 "코돈 최적화"는 이종에서 유래한 유전자를 대장균에서 발현시킬 때 가용성있는 형태로 얻기 위해 진행하는 방법 중 하나이다. 원하는 단백질을 코딩하는 이종 유전자를 적용할 때, 대장균에서 잘 발현될 수 있도록 대장균에서 작동 가능한 코돈으로 바꾸는 작업을 의미하며, 코돈 최적화 과정을 거치면 염기서열만 바뀔 뿐, 해당 단백질의 아미노산 서열은 바뀌지 않으므로 본래의 유전자와 같은 기능을 수행하게 된다.

[0020] 본 발명의 명세서상의 용어"개질 탄산 무수화 효소"는, 재조합에 따른 효과적인 적용을 위하여 대장균 균주에 삽입하기 전 적절한 방법으로 개질한 서열로부터 발현되는 탄산 무수화 효소를 의미한다. 상기 개질된 탄산 무수화 효소는, 본 발명의 실시예에서 "SP(-)HCCA"라고 명명되어 사용되었다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 핵산서열은 동종의 대장균으로부터 유래된 것이다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 피루브산 인산화효소 F 유전자는 서열목록 제 8 서열로 나타낸 핵산서열을 포함한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 피루브산 인산화효소 A 유전자는 서열목록 제 9 서열로 나타낸 핵산서열을 포함한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 포도당 인산전이효소 유전자는 서열목록 제 14 서열로 나타낸 핵산서열을 포함한다.

[0025] 본 발명의 핵산 서열은 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 98%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 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 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, 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.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 불활성화는 피루브산 인산화효소 F 유전자, 피루브산 인산화효소 A 유전자 및 포도당 인산전이효소 유전자의 결손에 의한 것이다. 본 발명에 있어서, "유전자의 결손"은 본 발명의 피루브산 인산화효소 F 유전자, 피루브산 인산화효소 A 유전자 또는 포도당 인산전이효소 유전자로부터 각각 피루브산

인산화효소 F, 피루브산 인산화효소 A 또는 포도당 인산전이효소의 발현을 애초에 차단하거나 발현된 변이 단백질이 정상적인 활성이 나타나지 않게 하는 유전자 변이의 종류를 모두 포함하는 의미이며, 바람직하게는 피루브산 인산화효소 F 유전자, 피루브산 인산화효소 A 유전자 및 포도당 인산전이효소 유전자의 파쇄(disruption)를 의미한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 피루브산 인산화효소 F 유전자의 결손은 서열목록 제 10 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 정방향 프라이머 및 서열목록 제 11 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 역방향 프라이머에 의한 결손이다. 본 발명에 있어서의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머에 의한 결손은 종래 공지된 방법에 따라 제한없이 실시 가능하다(sh park et al. 2017 Journal of biotechnology, 241, 101-107).

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 피루브산 인산화효소 A 유전자의 결손은 서열목록 제 12 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 정방향 프라이머 및 서열목록 제 13 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 역방향 프라이머에 의한 결손이다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 포도당 인산전이효소 유전자의 결손은 서열목록 제 15 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 정방향 프라이머 및 서열목록 제 16 서열로 나타낸 핵산서열로 구성된 역방향 프라이머에 의한 결손이다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 발현 벡터는 상기 두 유전자의 업스트림 위치에 작동적으로 결합된 것이다.

[0031] 본 발명의 명세서상의 용어 "두 유전자의 업스트림 위치에 작동적으로 결합된"은 상기 프로모터가 두 유전자 중 선행하는 유전자의 업스트림에 위치하는 것을 의미한다. 즉, 두 유전자 모두의 발현을 조절할 수 있는 위치에 프로모터가 결합된다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 탄산 무수화효소를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소를 코딩하는 핵산 서열은 하나의 프로모터(promoter)에 의해 동시 발현된다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 프로모터는 대장균 유래의 프로모터이다. 상기 프로모터는 trc 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터, lac 프로모터 및 trp 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0034] 본 발명은 재조합 대장균 균주에 관한 것이므로, 본 발명의 발현 벡터는 원핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 따라서, 본 발명의 프로모터는 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lac*UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ}프로모터, p_R^{λ}프로모터, *rac*5 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로머터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 본 발명에서 숙주 세포로서 대장균이 이용되므로, 대장균 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (p_L^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0035] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19 및 pET 등), 파지(예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 숙신산(succinate) 생산량이 증대된 재조합 대장균(Escherichia coli) 균주의 제조 방법을 제공한다: (a) 탄산 무수화효소(carbonic anhydrase, CA)를 코딩하는 핵산 서열 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소(phosphoenolpyruvate carboxylase, ppc)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 도입하여 대장균 균주를 형질전환하는 단계; 및 (b) 대장균 균주의 피루브산 인산화효소 F(pyruvate kinase F, pykF) 유전자, 피루브산 인산화효소 A(pyruvate kinase A, pykA) 유전자 및 포도당 인산전이효소(glucose phosphotransferase, ptsG) 유전자를 불활성화시키는 단계.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0038] 본 발명은 탄산 무수화효소 및 포스포에놀피루브산 카르복실화효소가 강화되고, 피루브산 인산화효소 pykF, pykA 및 포도당 인산전이효소 ptsG가 결손된 재조합 대장균 균주를 제공한다.

[0039] 본 발명의 재조합 대장균 균주를 이용하면 기존 균주 대비 이산화탄소를 이용한 숙신산 생산량이 크게 증가하므로 이를 효과적으로 이산화탄소로부터의 숙신산 생산에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1 은 이산화탄소를 이용한 재조합 대장균 W3110 내 숙신산 생산 경로를 나타내는 모식도이다.

도 2는 CO_2가 수화(hydration)되어 HCO_3^-가 생산되는 반응을 나타내는 모식도이다.

도 3은 pSGJS120 재조합 벡터를 나타내는 모식도이다.

도 4는 LC-MS 분석을 위한 피크를 나타낸다.

도 5는 숙신산의 생산량을 분석한 LC-MS 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0042] **실시예 1: CA 및 ppc 유전자의 과발현을 위한 재조합 벡터의 제조**

[0043] 기존 E. coli W3110의 이산화탄소 활용능력을 증가시키기 위해 W3110이 가지고 있지 않는 SP(-)HCCA 유전자와, OAA 생산능력을 증가시키기 위해 W3110이 가지고 있는 ppc 유전자를 발현 벡터인 pTrc99A를 이용해 삽입하여 재조합 벡터 pSGJS120를 제작하였다(도 3).

[0044] 기존 Hahella chejuensis KCTC 2396의 CA 유전자 염기서열은 서열목록 제1 서열로 표시하였다. CA 유전자의 시그널 펩타이드 서열(signal peptide sequence)을 제거하고, 코돈-최적화(codon-optimization)를 통해 합성된 유전자(서열목록 제2 서열)를 SP(-)HCCA(672bp)라고 명명한 뒤, 본 발명에서 활용하였다. 제한효소 부위는 XbaI-PstI이다.

[0045] 발현 벡터에 삽입된 ppc유전자(2652bp)는 기존 유전자와 동일한 염기서열(서열목록 제3 서열)을 나타내며, 아래 언급한 프라이머(primer)를 사용해 E. coli W3110 균주로부터 직접 확보하여 사용하였다. 제한효소 부위는 EcoRI-XbaI이다.

[0046] 두 유전자를 벡터 pTrc99A에 넣기 위하여 사용된 프라이머 정보는 표 1과 같다. SP(-)HCCA 및 ppc 유전자를 도입한 pTrc99A 벡터는 도 3에 나타내었고, 재조합 벡터 pSGJS120으로 명명하였다. 이를 이용하여 대장균 W3110을 형질전환하였고, CA 및 ppc 유전자를 과발현하도록 형질전환된 균주는 SGJS120으로 명명하였다.

표 1

[0047]

SP(-)HCCA	정방향	5'-TCTAGAATGAGCGGCGAA AGCCATT-3'	제4 서열
	역방향	5'-CTGCAGTTAATGCAGAATAATGCGCG-3'	제5 서열
ppc	정방향	5'-GAATTCATGAACGAACAATATTCCGCA-3'	제6 서열
	역방향	5'-TCTAGATTAGCCGGTATTACGCATACCT-3'	제7 서열

[0048] **실시예 2: CA 및 ppc 유전자가 과발현되고 pykF 및 pykA 유전자가 결손된 재조합 균주의 제조**

[0049] OAA 생산능력을 더욱 증가시켜 궁극적으로 숙신산 생산량을 증가시키기 위해, SGJS120 균주에서 PEP를 피루브산으로 전환하는 pykF(1413bp), pykA(1443bp) 유전자 두개를 추가적으로 결손시켜 최종적으로 SGJS132 균주를 제작하였다. 두 유전자의 결손을 위하여 사용된 프라이머 정보는 표 2와 같다.

표 2

[0050]

pykF	정방향	5'-AAGCAAGTTTCTCCCATCCTTCTCAACTTAAAGACTAAGACTGTCATGAAAATTAA CCCTCACTAAAGGGCG-3'	제10 서열
	역방향	5'-GGGCGCTTCGATATACAAATTAATTCACAAAAGCAATATTACAGGACGTGTAATAC GACTCACTATAGGGCTCGA-3'	제11 서열

pykA	정방향	5'-CTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAGTCTTATGAAACTCGCCGTTTATAGCACAAAATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'	제12 서열
	역방향	5'-GATTATCTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGATTAAACCAGTTCGTTCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGA-3'	제13 서열

[0051] 본 발명에서 E. coli의 유전자 결손 구축을 위해 결손 키트(Quick & Easy E. coli deletion kit, Gene Bridges, Germany)를 이용하였으며, 제조사의 지침에 따라 타겟 유전자의 결손을 수행하였다. 첫째로, Gene Pulse Xcell(Bio-Rad, USA)를 이용하여 pRedET를 야생형 W3110 균주에 도입하여 형질전환하였다. pykF 및 pykA의 결손을 위하여 50 내지 60 염기쌍의 상동 서열을 포함하는 프라이머를 설계하였다. 프라이머의 상동 서열은 W3110에 존재하는 각 타겟 유전자의 핵산 서열 양 끝에 부합되었다.

[0052] 서열들을 포함하는 카세트는 FRT-PGK-gb2-neo-FRT 주형 DNA(Gene Bridge, Germany)로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 구축하였다(PCR 조건: one cycle of pre-denaturation at 94℃ for 5 min, 25 cycles of denaturation at 94℃ for 30 s, annealing at 59℃ for 30 s, and elongation at 72℃ for 90 s, and one cycle of post-elongation at 72℃ for 7 min).

[0053] 구축된 카세트는 상동 재조합, 항생제 저항성 및 상동 서열분석을 위하여 타겟 유전자의 FRT 부위를 포함하였다. 구축된 카세트는 야생형 W3110에 전기천공법(electroporation)을 이용하여 도입시켰다(전기천공법 조건: voltage 2500V, capacitance 25 μF, Resistance 200 Ω, Cuvette 2 mm).

[0054] 타겟 유전자가 상기 카세트로 교체된 결과물 콜로니만이 카나마이신(kanamycin) 15 μg/ml을 포함하는 LB(Luria broth) 플레이트에서 생존하였다. 추가적으로, 선택 마커를 제거하기 위하여 pCP20을 이용하였다(P.P. Cherepanov, W. Wackernagel, Gene disruption in Escherichia coli: Tc R and Km R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, Gene 158(1) (1995) 9-14).

[0055] 상기 플라스미드는 30℃에서 복제하고 43℃에서는 분리되었다. 그러므로, 먼저 30℃에서 앰피실린(ampicillin, 50 μg/ml)을 포함하는 LB 플레이트에서 플라스미드로 콜로니를 선택하고, 상기 콜로니를 43℃에서 오버나잇 조건으로 배양하였다. 최종적으로 LB 플레이트 내의 항생제를 포함하지 않고 타겟 유전자가 결실된 균주에서 선택 마커가 제거되었음을 입증하였다. SGJS132는 pSGJS120를 포함하는 균주에서 pykF 및 pykA 유전자가 결손되는 형질변환을 통해 수득하였다.

[0056] **실시예 3: pykF, pykA 및 ptsG 유전자가 결손된 재조합 균주의 제조**

[0057] 상기 실시예 2에서 수행한 것과 동일한 방법으로 SGJS132 균주에서 ptsG(서열목록 제14 서열, 1434bp) 유전자를 추가적으로 결손시켜 CA 및 ppc 유전자가 과발현되고 pykF, pykA 및 ptsG 유전자가 결손된 SGJS134 균주를 제조하였다. ptsG 유전자의 결손을 위하여 사용된 프라이머 정보는 표 3과 같다.

표 3

[0058]

ptsG	정방향	5'-AGAACGTAAAAAAAGCACCCATACTCAGGAGCACTCTCAATTATGTTTAAAATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'	제15 서열
	역방향	5'-CCATCTGGCTGCCTTAGTCTCCCCAACGTCTTACGGATTAGTGGTTACGGTAATACGACTCACTATAGGGCTCGA-3'	제16 서열

[0059] 또한, W3110 균주에서 실시예 2에 기재된 유전자 결손 방법을 이용하여 pykF, pykA 및 ptsG 유전자만 결손된 SGJS133 균주를 제조하였다.

[0060] **실시예 4: 배양조건 및 배지조건**

[0061] 이산화탄소를 이용해 생산된 숙신산을 정량적으로 분석하기 위해, 가스발효를 진행하였으며 대조군으로는 기존 야생종 E. coli W3110에 pTrc99A 벡터만 넣은 SGJS110 균주와 pSGJS120벡터를 형질전환한 SGJS120 균주를 사용하였다. 기질로서는 $^{13}CO_2$를 공급하였다. 배지 조성은 표 4와 같다. 7 ml 유리 바이알(glass vial)에 배지를 2 ml 넣고 IPTG 0.1 mM과 SP(-)HCCA 활성 증가를 위한 $ZNSO_4$를 0.1 mM 추가하였다. 전날 3 ml 오버나잇(overnight) 배양을 통해 충분히 성장한 대장균을 한번 더 50 ml LB amp+(50 μg/ml)배지에 OD 1.0까지 키운 뒤 유리 바이알에 든 배지에 1% 접종하였다. 그리고 고무 격막(rubber septum)으로 공기 변화가 일어나지 않게

유리 바이알을 막고, 가스 투입용 주사기(gas tight syringe)로 바이알 안 공기를 제거한 뒤 2 ml 의 $^{13}CO_2$를 각 바이알마다 주입해주었다. 그리고 37℃에서 200 rpm조건으로 24시간 동안 배양하였다.

표 4

[0062]

LB	tryptone 10 g/L
	sodium chloride 10 g/L
	yeast extract 5 g/L
Glucose	10 g/L
$ZnSO_4$	0.1 mM
IPTG	0.1 mM
ampicillin	50 μg/ml

[0063] **실시예 5: $^{13}CO_2$ 활용을 통한 숙신산 생산 분석**

[0064] $^{13}CO_2$를 넣어 배양할 경우 생산되는 숙신산은 몰질량 118 g/mol과 119 g/mol 두가지가 생성된다. 도 1의 대사 경로에 따라 $^{13}CO_2$로부터의 ^{13}C 하나가 OAA 생산시 사용되기 때문에, 제작한 재조합 대장균이 $^{13}CO_2$를 이용할 경우, 기존 숙신산 118 g/mol에 분자량 1이 더해져 119 g/mol의 숙신산이 생성된다. 따라서 숙신산의 몰질량을 LC-MS를 통해 분석하면 이산화탄소를 활용하여 숙신산을 활용하는 지와 정량적 분석이 가능하다(도 4). 본 연구에서 확인하고자 하는 피크는 도 4에 나타난 바와 같이 파란색에 해당되며, $^{13}C_2$-succinic acid를 내부 표준(internal standard, IS)으로 이용해 몰질량 118, 119의 숙신산 모두를 정량적으로 분석하는 방법을 사용하였다.

[0065] **시험예 1: LC-MS분석법**

[0066] 시료는 세포를 배양한 배지를 12,470 × g에서 10분 동안 원심분리하여 수득하였다. 상층액을 수집하고 0.2-μm 여과 필터(Woongi, Seoul, Korea)로 여과하였다. 여과된 시료는 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry)를 이용하여 분석하였다. ^{13}C로 표지된 숙신산을 정량하기 위하여, 내부 표준으로 두 개의 ^{13}C을 내재하는 숙신산-1,4-$^{13}C_2$(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)를 LC-MS 분석을 위한 시료에 첨가하였다.

[0067] LC-MS 분석은 UHPLC(Dionex Ultimate 3000, Thermo scientific, Germering, Germany)와 결부된 선형의 이온 트랩 질량 분석기(ion-trap mass spectrometer, LTQ XL, Thermo Scientific, San Jose, CA, U.S.A.)에서 수행하였다. 시료는 보호컬럼(VanGuard Pre-column, 2.1x100 mm, 100Å, Waters, Milford, MA, U.S.A.)과 함께 컬럼(Acquity UPLC HSS T3 1.8 μm column, 2.1x100 mm, 100Å, Waters, Milford, MA, U.S.A.)을 이용하여 분리하였다. 0.3 ml/min 속도의 반전-위상(reversed-phase) 흐름에 있어서, 용액 A(H_2O, 0.1% formic acid) 및 B(acetonitrile, 0.1% formic acid)를 이동상(mobile phases)으로 이용하였다.

[0068] 시료는 자동 샘플러(auto sampler)를 이용하여 주입하였고, LC 용리(elution) 구배(gradient)는 다음과 같다. 먼저, 용액 A는 3분 동안 5%로 구배하였고, 이후 1분 동안 45%까지 연속적으로 증가하였으며, 0.1분 동안 45%에서 정체되었고, 3.9분 동안 5%까지 연속적으로 감소하였으며, 2분 동안 5%에서 정체되었다. 컬럼 오븐의 온도는 40℃, 자동 샘플러의 온도는 4℃로 설정하였다.

[0069] UHPLC 컬럼을 통해 분리된 시료는 전기분사(electro-sprayed)되어 질량 분석기로 주입되었다. 질량 분석기의 파라미터는 다음과 같다: 극성, 음성; ESI 전압, -5.00 kV; 캐피러리(capillary) 온도, 300℃; 차단 가스 유속(sheath gas flow rate), 20.00 arb; 최대 주입 시간, 150 ms.

[0070] 24시간 동안 $^{13}CO_2$를 넣고 배양한 결과, 대조군 SGJS110에 pSGJS120 벡터를 투포해 제작된 SGJS120 균주에서는 그 양이 0.9 mM로 나타났다. pykF, pykA 유전자의 결손을 추가적으로 진행한 후, pSGJS120 벡터를 도입하여 제작된 SGJS132 균주의 경우 succinic acid^{119} 양이 5.52 mM로 SGJS120 대비 약 6.1배 증가하였고, SGJS120 균주에서 pykF, pykA 및 ptsG 유전자의 결손만을 진행한 SGJS133 균주는 succinic acid^{119} 양이 6.17 mM로 SGJS120

균주 대비 약 6.86 배 증가하였다. SGJS132 균주에서 ptsG 유전자의 결손을 추가적으로 진행한 SGJS134 균주는 succinic acid[119] 양이 6.50 mM로 SGJS120 균주 대비 약 7.2배 증가하였고, SGJS132 균주에 대비하여서는 succinic acid[119] 양이 약 18% 증가하였다.

[0071] 특히 SGJS134 균주의 경우 생산되는 숙신산 중 68.7%가 이산화탄소 고정으로부터 생산되며, SGJS132균주 대비 1.5% 증가한 수치임을 확인하였다(표 5 및 도 5 참조). 표 5는 재조합 대장균의 succinic acid[119] 생산량 및 전체 생산된 숙신산대비 이산화탄소 고정 succinic acid[119] 생산비율(모든 데이터 값은 동일 실험을 3번이상 실험한 결과의 평균 데이터 값)을 나타낸다.

표 5

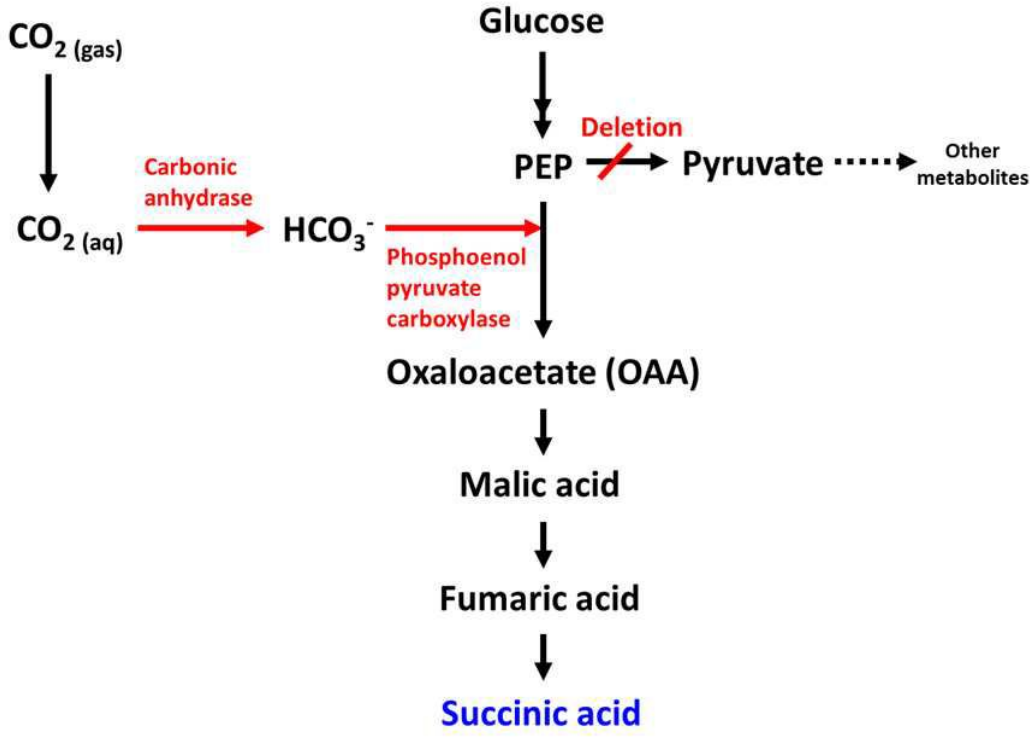
[0072]

균주	재조합 균주의 구축 방법	Succinic acid[119]의 농도 (mM)	전체 숙신산 대비 succinic acid[119] 양의 비율(%)
SGJS120	CA 및 PEPC 유전자의 과발현	0.90	29.3
SGJS132	pykF 및 pykA 유전자의결손, CA 및 PEPC 유전자의 과발현	5.52	67.2
SGJS133	pykF, pykA 및 ptsG 유전자의결손	6.17	64.7
SGJS134	pykF, pykA 및 ptsG 유전자의결손, CA 및 PEPC 유전자의 과발현	6.50	68.7

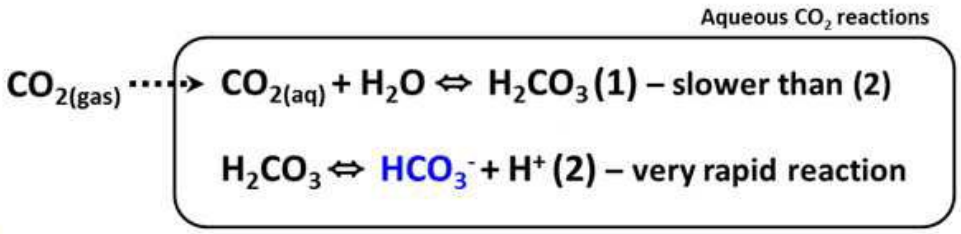
[0073] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

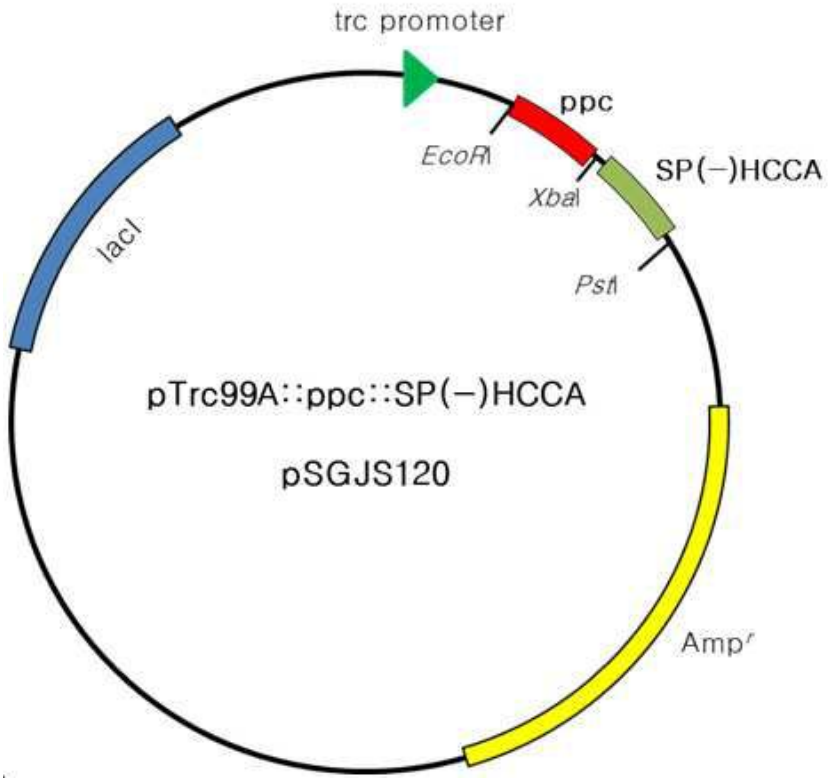
도면1



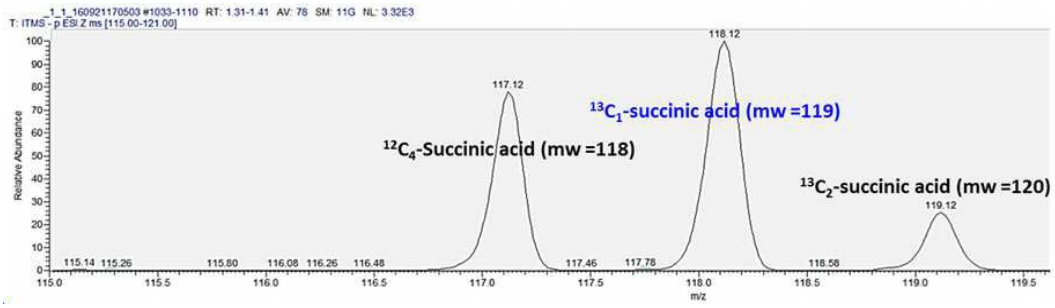
도면2


Aqueous CO_2 reactions
$CO_{2(gas)}$ → $CO_{2(aq)} + H_2O \Leftrightarrow H_2CO_3$ (1) – slower than (2)
$H_2CO_3 \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ (2) – very rapid reaction

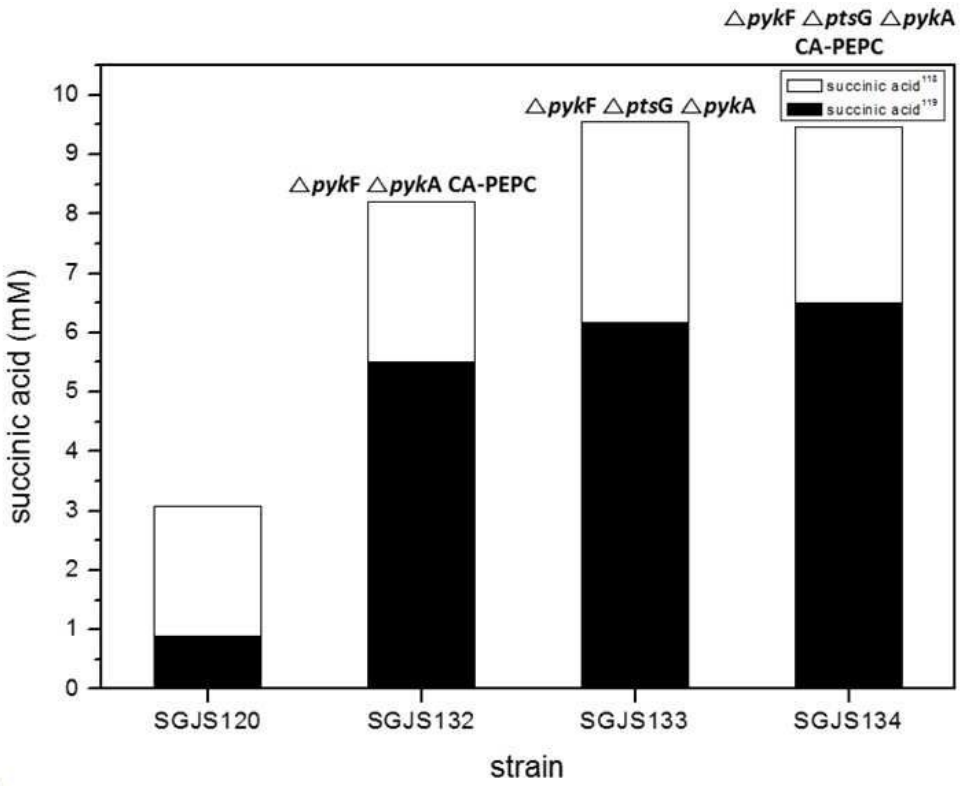
도면3


trc promoter
ppc
EcoRI
XbaI
SP(−)HCCA
lacI
PstI
pTrc99A::ppc::SP(−)HCCA
pSGJS120
Amp^r

도면4


$^{12}C_4$-Succinic acid (mw =118)
$^{13}C_1$-succinic acid (mw =119)
$^{13}C_2$-succinic acid (mw =120)
117.12
118.12
119.12
Relative Abundance
m/z

도면5



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Recombinated Escherichia coli with enhanced succinate producity comprising overexpressed CA and ppc and inactivated pykF, pykA and ptsG and method for manufacturing thereof

<130> PN160470

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 729

<212> DNA

<213> Hahella chejuensis KCTC 2396

<400> 1

atgatcagac gtctgatatg ggtattggct ggagtgaccg catgcgggca ggcattggcc 60

agtggtgagt cgcattgggg atatgatgaa cccgaacgct ggggggaact gaagccggaa 120

tatacgatgt gctccgccgg gaaaaatcag tcgccggtgg atatcagcgg cctcatcaaa 180

ggcgagttgc cagcggtggg catgaactat agcagcggcg gccatgaagt catcaataac 240

ggccatacca ttcaggtgaa ctacaagccg ggcagtaagg ccagtgtgga tggacgggag 300

tttgaactca agcagtttca cttccatgct cccagtgaga ataccgtaga cggcaagagt 360

ttccccttgg aagcgcattt cgtacacgcc aatgaaaatg gcgaactggc ggtgctgtcc 420

gtgctgtatg aagagggaga acacaacgaa caactggcga aagtctggga gcatatgccg 480

gcagaggcgg gtgggtccaa agtcttgccg acggcagttc acgctggcga catggtgtca 540

gcgagcgcag gctactaccg ctttaacggt tcgctgacca caccgccctg ctccgaaggc 600

gtgcgctggc tggtgatgaa ggattaccgc acggcgtcta aagagcagat caaccagttt 660

atggaaacca tgggcggccc taccaatcgt cccgtgcaag gcgtgaacgc gcgcattatt 720

ctgcattaa 729

<210> 2

<211> 672

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 2

atgagcggcg aaagccattg gggctatgat gaaccggaac gctggggcga actgaaaccg 60

gaatatacca tgtgcagcgc gggcaaaaac cagagcccgg tggatattag cggcctgatt 120

aaaggcgaac tgccggcggt gggcatgaac tatagcagcg gcggccatga agtgattaac 180

aacggccata ccattcaggt gaactataaa ccgggcagca aagcgagcgt ggatggccgc 240

gaatttgaac tgaaacagtt tcattttcat gcgccgagcg aaaacaccgt ggatggcaaa 300

agctttccgc tggaagcgca ttttgtgcat gcgaacgaaa acggcgaact ggcggtgctg 360

agcgtgctgt atgaagaagg cgaacataac gaacagctgg cgaaagtgtg ggaacatatg 420

ccggcggaag cgggcggcag caaagtgctg ccgaccgcgg tgcatgcggg cgatatggtg 480

agcgcgagcg cgggctatta tcgctttaac ggcagcctga ccaccccgcc gtgcagcgaa 540

ggcgtgcgct ggctggtgat gaaagattat cgcaccgcga gcaaagaaca gattaaccag 600

tttatggaaa ccatgggcgg cccgaccaac cgcccggtgc agggcgtgaa cgcgcgcatt 660

attctgcatt aa 672

<210> 3

<211> 2652

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atgaacgaac aatattccgc attgcgtagt aatgtcagta tgctcggcaa agtgctggga 60

gaaaccatca aggatgcgtt gggagaacac attcttgaac gcgtagaaac tatccgtaag 120
ttgtcgaaat cttcacgcgc tggcaatgat gctaaccgcc aggagttgct caccacctta 180
caaaatttgt cgaacgacga gctgctgccc gttgcgcgtg cgtttagtca gttcctgaac 240
ctggccaaca ccgccgagca ataccacagc atttcgccga aaggcgaagc tgccagcaac 300
ccggaagtga tcgcccgcac cctgcgtaaa ctgaaaaacc agccggaact gagcgaagac 360
accatcaaaa aagcagtgga atcgctgtcg ctggaactgg tcctcacggc tcacccaacc 420
gaaattaccc gtcgtacact gatccacaaa atggtggaag tgaacgcctg tttaaaacag 480

ctcgataaca aagatatcgc tgactacgaa cacaaccagc tgatgcgtcg cctgcgccag 540
ttgatcgccc agtcatggca taccgatgaa atccgtaagc tgcgtccaag cccggtagat 600
gaagccaaat ggggctttgc cgtagtggaa aacagcctgt ggcaaggcgt accaaattac 660
ctgcgcgaac tgaacgaaca actggaagag aacctcggct acaaactgcc cgtcgaattt 720
gttccggtcc gttttacttc gtggatgggc ggcgaccgcg acggcaaccc gaacgtcact 780
gccgatatca cccgccacgt cctgctactc agccgctgga aagccaccga tttgttcctg 840
aaagatattc aggtgctggt ttctgaactg tcgatggttg aagcgacccc tgaactgctg 900

gcgctggttg gcgaagaagg tgccgcagaa ccgtatcgct atctgatgaa aaacctgcgt 960
tctcgcctga tggcgacaca ggcatggctg gaagcgcgcc tgaaaggcga agaactgcca 1020
aaaccagaag gcctgctgac acaaaacgaa gaactgtggg aaccgctcta cgcttgctac 1080
cagtcacttc aggcgtgtgg catgggtatt atcgccaacg gcgatctgct cgacaccctg 1140
cgccgcgtga aatgtttcgg cgtaccgctg gtccgtattg atatccgtca ggagagcacg 1200
cgtcataccg aagcgctggg cgagctgacc cgctacctcg gtatcggcga ctacgaaagc 1260
tggtcagagg ccgacaaaca ggcgttcctg atccgcgaac tgaactccaa acgtccgctt 1320

ctgccgcgca actggcaacc aagcgccgaa acgcgcgaag tgctcgatac ctgccaggtg 1380
attgccgaag caccgcaagg ctccattgcc gcctacgtga tctcgatggc gaaaacgccg 1440
tccgacgtac tggctgtcca cctgctgctg aaagaagcgg gtatcgggtt tgcgatgccg 1500
gttgctccgc tgtttgaaac cctcgatgat ctgaacaacg ccaacgatgt catgacccag 1560
ctgctcaata ttgactggta tcgtggcctg attcagggca aacagatggt gatgattggc 1620
tattccgact cagcaaaaga tgcgggagtg atggcagctt cctgggcgca atatcaggca 1680
caggatgcat taatcaaaac ctgcgaaaaa gcgggtattg agctgacgtt gttccacggt 1740

cgcggcggtt ccattggtcg cggcggcgca cctgctcatg cggcgctgct gtcacaaccg 1800

ccaggaagcc tgaaaggcgg cctgcgcgta accgaacagg gcgagatgat ccgctttaaa 1860

tatggtctgc cagaaatcac cgtcagcagc ctgtcgcttt ataccggggc gattctggaa 1920

gccaacctgc tgccaccgcc ggagccgaaa gagagctggc gtcgcattat ggatgaactg 1980

tcagtcatct cctgcgatgt ctaccgcggc tacgtacgtg aaaacaaaga ttttgtgcct 2040

tacttccgct ccgctacgcc ggaacaagaa ctgggcaaac tgccgttggg ttcacgtccg 2100

gcgaaacgtc gcccaaccgg cggcgtcgag tcactacgcg ccattccgtg gatcttcgcc 2160

tggacgcaaa accgtctgat gctccccgcc tggctgggtg caggtacggc gctgcaaaaa 2220

gtggtcgaag acggcaaaca gagcgagctg gaggctatgt gccgcgattg gccattcttc 2280

tcgacgcgtc tcggcatgct ggagatggtc ttcgccaaag cagacctgtg gctggcggaa 2340

tactatgacc aacgcctggt agacaaagca ctgtggccgt taggtaaaga gttacgcaac 2400

ctgcaagaag aagacatcaa agtggtgctg gcgattgcca acgattccca tctgatggcc 2460

gatctgccgt ggattgcaga gtctattcag ctacggaata tttacaccga cccgctgaac 2520

gtattgcagg ccgagttgct gcaccgctcc cgccaggcag aaaaagaagg ccaggaaccg 2580

gatcctcgcg tcgaacaagc gttaatggtc actattgccg ggattgcggc aggtatgcgt 2640

aataccggct aa 2652

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 4

tctagaatga gcggcgaaag ccatt 25

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 5

ctgcagttaa tgcagaataa tgcgcg 26

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 6

gaattcatga acgaacaata ttccgca 27

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 7

tctagattag ccggtattac gcatacct 28

<210> 8

<211> 1413

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

atgaaaaaga ccaaaattgt ttgcaccatc ggaccgaaaa ccgaatctga agagatgtta 60

gctaaaatgc tggacgctgg catgaacgtt atgcgtctga acttctctca tggtgactat 120

gcagaacacg gtcagcgcat tcagaatctg cgcaacgtga tgagcaaaac tggtaaaacc 180

gccgctatcc tgcttgatac caaaggtccg gaaatccgca ccatgaaact ggaaggcggt 240

aacgacgttt ctctgaaagc tggtcagacc tttactttca ccactgataa atctgttatc 300

ggcaacagcg aaatggttgc ggtaacgtat gaaggtttca ctactgacct gtctgttggc 360

aacaccgtac tggttgacga tggtctgatc ggtatggaag ttaccgccat tgaaggtaac 420

aaagttatct gtaaagtgct gaacaacggt gacctgggcg aaaacaaagg tgtgaacctg 480

cctggcgttt ccattgctct gccagcactg gctgaaaaag acaaacagga cctgatcttt 540

ggttgcgaac aaggcgtaga ctttgttgct gcttccttta ttcgtaagcg ttctgacgtt 600

atcgaaatcc gtgagcacct gaaagcgcac ggcggcgaaa acatccacat catctccaaa 660

atcgaaaacc aggaaggcct caacaacttc gacgaaatcc tcgaagcctc tgacggcatc 720

atggttgcgc gtggcgacct gggtgtagaa atcccggtag aagaagttat cttcgcccag 780

aagatgatga tcgaaaaatg tatccgtgca cgtaaagtcg ttatcactgc gacccagatg 840

ctggattcca tgatcaaaaa cccacgcccg actcgcgcag aagccggtga cgttgcaaac 900

gccatcctcg acggtactga cgcagtgatg ctgtctggtg aatccgcaaa aggtaaatac 960

ccgctggaag cggtttctat catggcgacc atctgcgaac gtaccgaccg cgtgatgaac 1020

agccgtctcg agttcaacaa tgacaaccgt aaactgcgca ttaccgaagc ggtatgccgt 1080

ggtgccgttg aaactgctga aaaactggat gctccgctga tcgtggttgc tactcagggc 1140

ggtaaatctg ctcgcgcagt acgtaaatac ttcccggatg ccaccatcct ggcactgacc 1200

accaacgaaa aaacggctca tcagttggta ctgagcaaag gcgttgtgcc gcagcttgtt 1260

aaagagatca cttctactga tgatttctac cgtctgggta aagaactggc tctgcagagc 1320

ggtctggcac acaaaggtga cgttgtagtt atggtttctg gtgcactggt accgagcggc 1380

actactaaca ccgcatctgt tcacgtcctg taa 1413

<210> 9

<211> 1443

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 9

atgtccagaa ggcttcgcag aacaaaaatc gttaccacgt taggcccagc aacagatcgc 60

gataataatc ttgaaaaagt tatcgcggcg ggtgccaacg ttgtacgtat gaacttttct 120

cacggctcgc ctgaagatca caaaatgcgc gcggataaag ttcgtgagat tgccgcaaaa 180

ctggggcgtc atgtggctat tctgggtgac ctccaggggc ccaaaatccg tgtatccacc 240

tttaaagaag gcaaagtttt cctcaatatt ggggataaat tcctgctcga cgccaacctg 300

ggtaaaggtg aaggcgacaa agaaaaagtc ggtatcgact acaaaggcct gcctgctgac 360

gtcgtgcctg gtgacatcct gctgctggac gatggtcgcg tccagttaaa agtactggaa 420

gttcagggca tgaaagtgtt caccgaagtc accgtcggtg gtcccctctc caacaataaa 480

ggtatcaaca aacttggcgg cggtttgtcg gctgaagcgc tgaccgaaaa agacaaagca 540

gacattaaga ctgcggcgtt gattggcgta gattacctgg ctgtctcctt cccacgctgt 600

ggcgaagatc tgaactatgc ccgtcgcctg gcacgcgatg caggatgtga tgcgaaaatt 660

gttgccaagg ttgaacgtgc ggaagccgtt tgcagccagg atgcaatgga tgacatcatc 720

ctcgcctctg acgtggtaat ggttgcacgt ggcgacctcg gtgtggaaat tggcgacccg 780

gaactggtcg gcattcagaa agcgttgatc cgtcgtgcgc gtcagctaaa ccgagcggta 840

atcacggcga cccagatgat ggagtcaatg attactaacc cgatgccgac gcgtgcagaa 900

gtcatggacg tagcaaacgc cgttctggat ggtactgacg ctgtgatgct gtctgcagaa 960

actgccgctg ggcagtatcc gtcagaaacc gttgcagcca tggcgcgcgt ttgcctgggt 1020

gcggaaaaaa tcccgagcat caacgtttct aaacaccgtc tggacgttca gttcgacaat 1080

gtggaagaag ctattgccat gtcagcaatg tacgcagcta accacctgaa aggcgttacg 1140

gcgatcatca ccatgaccga atcgggtcgt accgcgctga tgacctcccg tatcagctct 1200

ggtctgccaa ttttcgccat gtcgcgccat gaacgtacgc tgaacctgac tgctctctat 1260

cgtggcgtta cgccggtgca ctttgatagc gctaatgacg gcgtagcagc tgccagcgaa 1320

gcggttaatc tgctgcgcga taaaggttac ttgatgtctg gtgacctggt gattgtcacc 1380

cagggcgacg tgatgagtac cgtgggttct actaatacca cgcgtatttt aacggtagag 1440

taa 1443

<210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 10

aagcaagttt ctcccatcct tctcaactta aagactaaga ctgtcatgaa aattaaccct 60

cactaaaggg cg 72

<210> 11

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 11

gggcgcttcg atatacaaat taattcacaa aagcaatatt acaggacgtg taatacgact 60

cactataggg ctcga 75

<210> 12

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 12

cttaaatgtg attcaacatc actggagaaa gtcttatgaa actcgccgtt tatagcacaa 60

aattaaccct cactaaaggg cg 82

<210> 13

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 13

gattatctga atcagctccc ctggaatgca ggggagcggc aagattaaac cagttcgttc 60

taatacgact cactataggg ctcga 85

<210> 14

<211> 1434

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 14

atgtttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggtcggta aatcgctgat gctgccggta 60

tccgtactgc ctatcgcagg tattctgctg ggcgtcggtt ccgcgaattt cagctggctg 120

cccgccgttg tatcgcatgt tatggcagaa gcaggcggtt ccgtctttgc aaacatgcca 180

ctgatttttg cgatcggtgt cgccctcggc tttaccaata acgatggcgt atccgcgctg 240

gccgcagttg ttgcctatgg catcatggtt aaaaccatgg ccgtggttgc gccactggta 300

ctgcatttac ctgctgaaga aatcgcctct aaacacctgg cggatactgg cgtactcgga 360

gggattatct ccggtgcgat cgcagcgtac atgtttaacc gtttctaccg tattaagctg 420

cctgagtatc ttggcttctt tgccggtaaa cgctttgtgc cgatcatttc tggcctggct 480

gccatcttta ctggcgttgt gctgtccttc atttggccgc cgattggttc tgcaatccag 540

accttctctc agtgggctgc ttaccagaac ccggtagttg cgtttggcat ttacggtttc 600

atcgaacgtt gcctggtacc gtttggtctg caccacatct ggaacgtacc tttccagatg 660

cagattggtg aatacaccaa cgcagcaggt caggttttcc acggcgacat tccgcgttat 720

atggcgggtg acccgactgc gggtaaactg tctggtggct tcctgttcaa aatgtacggt 780

ctgccagctg ccgcaattgc tatctggcac tctgctaaac cagaaaaccg cgcgaaagtg 840

ggcggtatta tgatctccgc ggcgctgacc tcgttcctga ccggtatcac cgagccgatc 900

gagttctcct tcatgttcgt tgcgccgatc ctgtacatca tccacgcgat tctggcaggc 960

ctggcattcc caatctgtat tcttctgggg atgcgtgacg gtacgtcgtt ctcgcacggt 1020

ctgatcgact tcatcgttct gtctggtaac agcagcaaac tgtggctgtt cccgatcgtc 1080

ggtatcggtt atgcgattgt ttactacacc atcttccgcg tgctgattaa agcactggat 1140

ctgaaaacgc cgggtcgtga agacgcgact gaagatgcaa aagcgacagg taccagcgaa 1200

atggcaccgg ctctggttgc tgcatttggt ggtaaagaaa acattactaa cctcgacgca 1260

tgtattaccc gtctgcgcgt cagcgttgct gatgtgtcta aagtggatca ggccggcctg 1320

aagaaactgg gcgcagcggg cgtagtggtt gctggttctg gtgttcaggc gattttcggt 1380

actaaatccg ataacctgaa aaccgagatg gatgagtaca tccgtaacca ctaa 1434

<210> 15

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 15

agaacgtaaa aaaagcaccc atactcagga gcactctcaa ttatgtttaa aattaaccct 60

cactaaaggg cg 72

<210> 16

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 16

ccatctggct gccttagtct ccccaacgtc ttacggatta gtggttacgg taatacgact 60

cactataggg ctcga 75