



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0108367

(43) 공개일자 2015년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/81 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/81 (2013.01)

C12N 9/0008 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7019594

(22) 출원일자(국제) 2014년01월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년07월20일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2014/050998

(87) 국제공개번호 WO 2014/112627

국제공개일자 2014년07월24일

(30) 우선권주장

JP-P-2013-008810 2013년01월21일 일본(JP)

(71) 출원인

세키스이가가쿠 교교가부시킴이샤

일본 오사카후 오사카시 기타구 니시템마 2조메 4-4

(72) 발명자

후루마니, 마사히로

일본 300-4292 이바라키켄 츠클바시 와다이 32 세키스이가가쿠 교교가부시킴이샤 내

우에니시, 아끼히로

일본 300-4292 이바라키켄 츠클바시 와다이 32 세키스이가가쿠 교교가부시킴이샤 내

이와사, 고이찌로

일본 105-8450 도쿄도 미나토쿠 도라노몬 2-3-17 세키스이가가쿠 교교가부시킴이샤 내

(74) 대리인

장수길, 박보현

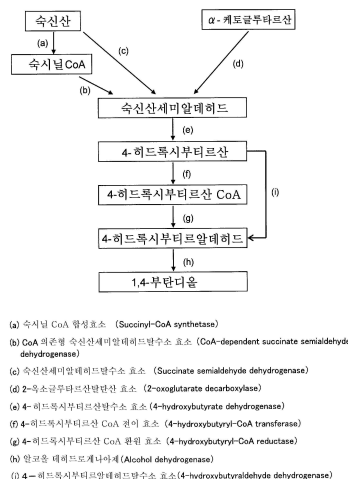
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 세포, 및 1,4-부탄디올의 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 메탄올 등으로부터 1,4-부탄디올을 생산하기 위한 일련의 기술을 제공하는 것을 과제로 한다. 메틸로트로프인 숙주 세포에, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/10 (2013.01)

C12N 9/93 (2013.01)

C12P 7/18 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

메틸로트로프(Methylotroph)인 숙주 세포에, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,

당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,

메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

청구항 2

메틸로트로프인 숙주 세포에, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,

당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,

메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 포름알데히드의 고정화 경로로서, 세린 경로, 리블로스모노인산 경로 및 크실룰로스모노인산 경로로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 탄소 동화 경로를 갖는 재조합 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 3-핵술로스6인산 합성 효소를 코딩하는 유전자와, 6-포스포-3-핵술로이소머라아제를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현되는 재조합 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 메탄올 자화성 효모이며, 메탄올을 탈수소 반응에 의해 포름알데히드로 변환하는 효소를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현되는 재조합 세포.

청구항 6

숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자와, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,

당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,

메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

청구항 7

숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자와, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,

메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자는, 3-핵술로스6인산 합성 효소를 코딩하는 유전자 및 6-포스포-3-핵술로이소머라아제를 코딩하는 유전자인 재조합 세포.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 포름알데히드의 고정화 경로로서, 세린 경로, 리블로스모노인산 경로 및 크실로스모노인산 경로로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 탄소 동화 경로를 갖는 재조합 세포.

청구항 10

리블로스모노인산 경로를 갖는 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,

당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,

메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

청구항 11

리블로스모노인산 경로를 갖는 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,

당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,

메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

청구항 12

제6항, 제7항, 제9항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 3-핵술로스6인산 합성 효소를 코딩하는 유전자와, 6-포스포-3-핵술로이소머라아제를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현되는 재조합 세포.

청구항 13

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 메탄올을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자는 메탄올 데히드로게나아제 또는 알코올 옥시다아제를 코딩하는 유전자이고, 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자는 포름알데히드 데히드로게나아제를 코딩하는 유전자인 재조합 세포.

청구항 14

제6항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 메탄올 메탄올로 변환하는 기능을 부여하는 유전자가 더 도입되어,

당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현되는 재조합 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, 메탄을 메탄올로 변환하는 기능을 부여하는 유전자는 메탄 모노옥시게나아제를 코딩하는 유전자인 재조합 세포.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 도입된 유전자가 숙주 세포의 게놈에 편입되어 있는 재조합 세포.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 도입된 유전자가 플라스미드에 편입되어 있는 재조합 세포.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 400mM의 1,4-부탄디올에 대한 내성을 갖는 재조합 세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2%(v/v)의 메탄올에 대한 내성을 갖는 재조합 세포.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 기재된 재조합 세포를, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 탄소원으로서 사용하여 배양하고, 당해 재조합 세포에 1,4-부탄디올을 생산시키는 1,4-부탄디올의 생산 방법.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 기재된 재조합 세포에, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 접촉시켜, 당해 재조합 세포에 상기 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산시키는 1,4-부탄디올의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄올 등으로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포, 및 당해 재조합 세포를 사용하는 1,4-부탄디올의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1,4-부탄디올(1,4-Butanediol)은 합성 고무의 단량체로서 중요한 부타디엔의 원료가 될 수 있는 유기 화합물이며, 특히 타이어 업계에 있어서 중요한 소재이다. 최근들어 석유에 의존한 기간 화학품의 생산 프로세스로부터, 식물 자원 등의 재생 가능 자원으로부터의 생산 프로세스로의 전환 기술의 개발과 실용화가 착실하게 진행되고 있다. 1,4-부탄디올에 관해서도, 예를 들어 당을 원료로 한 재조합 대장균에 의한 생산 기술이 알려져 있다(특허문헌 1).

[0003] 1,4-부탄디올의 생합성 경로의 예를 도 1에 도시한다. 즉 1,4-부탄디올은, 예를 들어 숙신산(Succinate) 또는 α-케토글루타르산(α-Ketoglutarate)을 출발 물질로서 생합성 가능하다.

[0004] 숙신산을 출발 물질로 하는 경로에서는, 숙신산이 숙시닐 CoA(Succinyl CoA), 숙신산세미알데히드(Succinyl semialdehyde), 4-히드록시부티르산(4-Hydroxybutyrate), 4-히드록시부티르산 CoA(4-Hydroxybutyryl CoA) 및 4-히드록시부티르알데히드(4-Hydroxybutyraldehyde)를 거쳐, 1,4-부탄디올로 변환된다. 각 반응을 촉매하는 효소는 각각 (a) 숙시닐 CoA 합성 효소(Succinyl-CoA synthetase), (b) CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소(CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase), (c) 4-히드록시부티르산 탈수소 효소(4-hydroxybutyrate dehydrogenase), (d) 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소(4-hydroxybutyryl-CoA transferase), (e) 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소(4-hydroxybutyryl-CoA reductase) 및 (f) 알코올 탈수소 효소(알코올 탈수소 효소)를 포함한다.

(Alcohol dehydrogenase)이다(도 1). 또한, (a) 숙시닐 CoA 합성 효소는 모든 생물이 갖고 있다.

[0005] 또한, 숙신산을 숙신산세미알데히드로 직접 변환하는 경로도 있다. 그 경우는, 숙신산이 숙신산세미알데히드, 4-히드록시부티르산, 4-히드록시부티르산 CoA 및 4-히드록시부티르알데히드를 거쳐, 1,4-부탄디올로 변환된다. 숙신산을 숙신산세미알데히드로 변환하는 반응을 촉매하는 효소는, (c) 숙신산세미알데히드 탈수소 효소(Succinate semialdehyde dehydrogenase)이다(도 1).

[0006] 한편, α -케토글루타르산을 출발 물질로 하는 경로에서는, α -케토글루타르산이, 숙신산세미알데히드, 4-히드록시부티르산, 4-히드록시부티르산 CoA 및 4-히드록시부티르알데히드를 거쳐, 1,4-부탄디올로 변환된다. α -케토글루타르산을 숙신산세미알데히드로 변환하는 반응을 촉매하는 효소는 (d) 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소(2-oxoglutarate decarboxylase)이다(도 1).

[0007] 또한, (i) 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소(4-hydroxybutyraldehyde dehydrogenase)에 의해, 4-히드록시부티르산으로부터 직접 4-히드록시부티르알데히드를 생성시키는 경로도 있다(도 1).

[0008] 그런데, C1 화합물 중에서도 메탄올은 천연 가스, 및 바이오매스나 도시 쓰레기 등의 폐기물을 소각함으로써 얻어지는 일산화탄소, 이산화탄소 및 수소의 혼합 가스인 합성 가스 등으로부터 저렴하게 제조된다. 천연 가스는 화석 자원 중에서도 다량으로 존재하고, 또한 CO₂의 발생량이 비교적 적은 점에서 차세대 에너지원으로서 주목받아, 종래의 석유로부터 천연 가스로의 이행이 진행되고 있다. 메탄올은, 물에 가용인 것 등, 취급이나 저장이 용이한 데다가, 미생물 배양의 탄소원으로서도 적합하다.

[0009] 메틸로트로프(Methyloph)란, 분자 내에 C-C 결합을 갖지 않는 탄소 화합물, 예를 들어 메탄, 메탄올, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민 등을 유일한 탄소원, 에너지원으로서 이용하는 C1 화합물 자화성 미생물의 총칭명이다. 메타노트로프(Methanotroph), 메탄 산화 세균, 메탄올 자화성 세균, 메탄올 자화성 효모, 메탄올 자화성 미생물 등이라고 불리는 미생물은, 모두 메틸로트로프에 속하는 것이다. 세균인 메틸로트로프에는 메탄올 자화할 수 있는 것도 많아, 이들은 다양한 메타노트로프(Methanotroph)라고도 불린다.

[0010] 메틸로트로프는, 메탄올을 포름알데히드로 변환 후, 포름알데히드를 C-C 결합을 갖는 유기물로 변환하는 반응을 중심 대사로 한다. 도 2에 도시된 바와 같이, 포름알데히드를 통한 탄소 동화 대사 경로로서, 세린 경로, 리볼로스모노인산 경로(RuMP 경로) 및 크실롤로스모노인산 경로(XuMP 경로)가 알려져 있다. 세균으로 분류되는 메틸로트로프(메틸로트로프 세균)는, 세린 회로 또는 RuMP 경로를 보유하고 있다. 한편, 효모로 분류되는 메틸로트로프(메틸로트로프 효모)는 XuMP 경로를 보유하고 있다.

[0011] 또한, 메틸로트로프 세균은, 메탄올 요구성의 차이로부터, 편성 메틸로트로프(obligate methyloph)와, 다른 탄소 화합물도 이용할 수 있는 통성 메틸로트로프(facultative methyloph)로 분류된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2010/141920호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 재생 가능 자원으로부터의 생산 프로세스에 대해, 그 종래 기술의 대부분은, 상기 1,4-부탄디올 생산 기술을 포함하여, 유기물, 특히 당, 글리세롤 또는 오일 성분 등에 의존한, 미생물에 의한 생산법이다. 그러나, 석유에서 유래하는 수많은 기간 화학품의 세계적인 생산량을 조달하기 위해서는, 식물 자원 등에서 유래하는 현재 사용 가능한 당질, 글리세린이나 오일 성분의 양으로는, 미생물의 탄소원으로서 부족한 것은 필수이다. 즉, 당질이나 오일 성분에 의존하는 미생물에 의한 기간 화학품의 생산량은 장애에 걸처서도 한정적이다. 또한, 이러한 프로세스는, 식(食)과의 경합도 염려된다.

[0014] 상기 현 상황을 감안하여, 본 발명은 메탄올 등으로부터 1,4-부탄디올을 생산하기 위한 일련의 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기한 과제를 해결하기 위한 본 발명의 하나의 양상은, 메틸로트로프인 숙주 세포에, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포이다.
- [0016] 도 1에 도시한 바와 같이, 1,4-부탄디올은 숙신산으로부터 생합성 가능하다. 그리고 본 발명의 재조합 세포는, 숙신산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군, 즉 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가, 메틸로트로프인 숙주 세포에 도입된 것이며, 숙주 세포 내에서 당해 유전자가 발현된다. 그리고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능하다.
- [0017] 본 발명의 재조합 세포에 의하면, 메틸로트로프가 본래적으로 갖는 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」과 「포름알데히드 고정화능」을 기초로 하고, 숙신산을 경유하여, 상기한 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.
- [0018] 마찬가지로 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 양상은, 메틸로트로프인 숙주 세포에, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포이다.
- [0019] 도 1에 도시한 바와 같이, 1,4-부탄디올은 α -케토글루타르산으로부터도 생합성 가능하다. 그리고 본 발명의 재조합 세포는, α -케토글루타르산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군, 즉 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가, 메틸로트로프인 숙주 세포에 도입된 것이며, 숙주 세포 내에서 당해 유전자가 발현된다. 그리고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능하다.
- [0020] 본 발명의 재조합 세포에 의하면, 메틸로트로프가 본래적으로 갖는 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」과 「포름알데히드 고정화능」을 기초로 하고, α -케토글루타르산을 경유하여, 상기한 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.
- [0021] 바람직하게는, 포름알데히드의 고정화 경로로서, 세린 경로, 리블로스모노인산 경로 및 크실로스모노인산 경로로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 탄소 동화 경로를 갖는다.
- [0022] 바람직하게는, 3-핵술로스6인산 합성 효소를 코딩하는 유전자와, 6-포스포-3-핵술로이소머라아제를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현된다.
- [0023] 이러한 구성에 의해, 리블로스모노인산 경로에 의한 포름알데히드 고정화능이 부여 또는 증강된다.
- [0024] 바람직하게는, 숙주 세포가 메탄올 자화성 효모이며, 메탄올을 탈수소 반응에 의해 포름알데히드로 변환하는 효소를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현된다.
- [0025] 일반적으로, 효모는 알코올에 대한 내성이 높다. 따라서 본 양상에서는 숙주로서 메탄올 자화성 효모를 채용하여, 재조합 세포의 1,4-부탄디올에 대한 내성을 높이고 있다. 또한, 효모에서는 일반적으로, 메탄올로부터 포름알데히드로의 변환 반응을 알코올 옥시다아제가 담당하고 있다. 그로 인해, 당해 변환 반응에는 산소가 필요하며, 구체적으로는 배양 시에 격렬하게 통기할 필요가 있다. 따라서 본 양상에서는 「메탄올을 탈수소 반응에

의해 포름알데히드로 변환하는 효소」를 코딩하는 유전자를 도입하여, 산소에 의존하지 않고 메탄올로부터 포름알데히드로의 변환 반응이 행하여지도록 하고 있다.

[0026]

마찬가지의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 양상은, 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자와, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포이다.

[0027]

본 발명의 재조합 세포는, 숙주 세포에 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자」와 「포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자」가 도입되고, 또한 숙신산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군, 즉 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있다. 그리고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능하다.

[0028]

즉 본 발명의 재조합 세포는, 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자」와 「포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자」가 도입되어 있으므로, 메틸로트로프와 마찬가지로 특성을 갖고 있다. 그리고, 이들 외래 유전자에 의해 부여된 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」과 「포름알데히드 고정화능」을 기초로 하고, 숙신산을 경유하여, 상기한 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

[0029]

마찬가지의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 양상은, 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자와, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포이다.

[0030]

본 발명의 재조합 세포는, 숙주 세포에 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자」와 「포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자」가 도입되고, 또한 α -케토글루타르산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군, 즉 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있다. 그리고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능하다.

[0031]

즉 본 발명의 재조합 세포는, 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자」와 「포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자」가 도입되어 있으므로, 메틸로트로프와 마찬가지로 특성을 갖고 있다. 그리고, 이들 외래 유전자에 의해 부여된 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」과 「포름알데히드 고정화능」을 기초로 하고, α -케토글루타르산을 경유하여, 상기한 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

[0032]

바람직하게는, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자는, 3-핵술로스6인산 합성 효소를 코딩하는 유전자 및 6-포스포-3-핵술로이소머라아제를 코딩하는 유전자이다.

[0033]

이러한 구성에 의해, 리불로스모노인산 경로에 의한 포름알데히드 고정화능이 부여된다.

[0034]

바람직하게는, 포름알데히드의 고정화 경로로서, 세린 경로, 리불로스모노인산 경로 및 크실로스모노인산 경로로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 탄소 동화 경로를 갖는다.

- [0035] 마찬가지로 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 양상은, 리볼로스모노인산 경로를 갖는 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포이다.
- [0036] 마찬가지로 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 양상은, 리볼로스모노인산 경로를 갖는 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고, 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포이다.
- [0037] 이들 양상은, 예를 들어 리볼로스모노인산 경로를 갖는 비메틸로트로프가 숙주 세포인 형태에 상당하는 것이다.
- [0038] 바람직하게는, 3-핵술로스6인산 합성 효소를 코딩하는 유전자와, 6-포스포-3-핵술로이소머라아제를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현된다.
- [0039] 바람직하게는, 메탄올을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자는 메탄올 데히드로게나아제 또는 알코올 옥시다아제를 코딩하는 유전자이며, 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자는 포름알데히드 데히드로게나아제를 코딩하는 유전자이다.
- [0040] 메탄올 데히드로게나아제(Methanol dehydrogenase)와 알코올 데히드로게나아제(Alcohol dehydrogenase)는, 모두 메탄올을 포름알데히드로 변환하는 작용을 갖는다. 또한, 포름알데히드 데히드로게나아제(Formaldehyde dehydrogenase)는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 작용을 갖는다. 이들 효소는, 모두 세균에 속하는 메틸로트로프에 있어서의 메탄 대사 효소 중 하나이다. 한편, 효모에 속하는 메틸로트로프는 메탄 산화 활성을 갖지 않고, 알코올 옥시다아제(Alcohol oxidase)의 작용에 의해 메탄올을 포름알데히드로 변환하는 작용을 갖는다. 효모도 포름산을 포름알데히드로 변환하는 효소 활성을 갖는다.
- [0041] 바람직하게는, 메탄을 메탄올로 변환하는 기능을 부여하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현된다.
- [0042] 바람직하게는, 메탄을 메탄올로 변환하는 기능을 부여하는 유전자는, 메탄 모노옥시게나아제를 코딩하는 유전자이다.
- [0043] 메탄 모노옥시게나아제(Methane monooxygenase)는 메탄을 메탄올로 변환하는 작용을 갖는다. 메탄 모노옥시게나아제도, 메틸로트로프에 있어서의 메탄 대사 효소 중 하나이다.
- [0044] 바람직하게는, 도입된 유전자가 숙주 세포의 게놈에 편입되어 있다.
- [0045] 이러한 구성에 의해, 도입된 유전자가 보다 안정적으로 재조합 세포 내에서 유지된다.
- [0046] 바람직하게는, 도입된 유전자가 플라스미드에 편입되어 있다.
- [0047] 바람직하게는, 적어도 400mM의 1,4-부탄디올에 대한 내성을 갖는다.
- [0048] 이러한 구성에 의해, 1,4-부탄디올을 보다 대량으로 생산할 수 있다.
- [0049] 바람직하게는, 적어도 2%(v/v)의 메탄올에 대한 내성을 갖는다.
- [0050] 이러한 구성에 의해, 1,4-부탄디올을 보다 대량으로 생산할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 양상은, 상기한 재조합 세포를, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 탄소원으로서 사용하여 배양하고, 당해 재조합 세포에 1,4-부탄디올을 생산시키는 1,4-부탄디올의 생산 방법이다.

[0052] 본 발명은 1,4-부탄디올의 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는, 상기한 재조합 세포를 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 탄소 원으로서 배양함으로써, 당해 재조합 세포에 1,4-부탄디올을 생산시킨다. 본 발명에 따르면, 메탄올 등으로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

[0053] 본 발명의 다른 양상은, 상기한 재조합 세포에, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 접촉시켜, 당해 재조합 세포에 상기 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산시키는 1,4-부탄디올의 생산 방법이다.

[0054] 본 발명에서는, 상기한 재조합 세포에, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 접촉시켜, 당해 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산시킨다. 본 발명에 의해서도, 메탄올 등으로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 재조합 세포에 의하면, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 또는 포름아미드로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

[0056] 본 발명의 1,4-부탄디올의 생산 방법에 대해서도 마찬가지로, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 또는 포름아미드로부터 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 숙신산 또는 α -케토글루타르산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 대사 경로를 나타내는 설명도이다.

도 2는 포름알데히드를 통한 탄소 동화 대사 경로를 나타내는 설명도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 본 발명의 실시 형태에 대하여 설명한다. 또한, 본 발명에 있어서 「유전자」라는 용어는, 모두 「핵산」 또는 「DNA」라는 용어로 치환할 수 있다.

[0059] 본 발명의 재조합 세포는, 기본적으로 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」과 「포름알데히드 고정화능」을 갖는 숙주 세포에, 숙신산 또는 α -케토글루타르산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군을 코딩하는 유전자가 도입된 것이다.

[0060] 본 발명에서 채용되는 숙주 세포로서는, 메틸로트로프인 숙주 세포와, 비메틸로트로프를 포함한 광범위한 숙주 세포의 양쪽이 있다.

[0061] 상술한 바와 같이, 메틸로트로프란, 분자 내에 C-C 결합을 갖지 않는 탄소 화합물, 예를 들어 메탄, 메탄올, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민 등을 유일한 탄소원, 에너지원으로서 이용하는 C1 화합물 자화성 미생물을 가리킨다. 일반적으로 메틸로트로프는, 포름알데히드를 통한 탄소 동화 대사 경로, 구체적으로는 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능(경로)과 포름알데히드 고정화능(포름알데히드의 고정화 경로)을 본래적으로 보유하고 있다.

[0062] 포름알데히드의 고정화 경로로서는, 도 2에 도시하는 세린 경로, 리블로스모노인산 경로(RuMP 경로), 크실룰로스모노인산 경로(XuMP 경로)를 들 수 있다. 일반적으로, 메틸로트로프는, 포름알데히드를 통한 탄소 동화 대사 경로로서, 세린 경로, RuMP 경로 또는 XuMP 경로를 보유하고 있다.

[0063] 여기서, 각각의 포름알데히드 고정화 경로(도 2)에 대하여 설명한다.

[0064] 세린 경로에 의한 포름알데히드 고정에 중요한 반응은, 세린 히드록시메틸트랜스페라아제(serine hydroxymethyltransferase)에 의한, 글리신과 5,10-메틸렌-테트라히드로엽산으로부터의 세린 생성 반응이다. 5,10-메틸렌-테트라히드로엽산은, 포름알데히드와 테트라히드로엽산의 결합에 의해 발생한다. 세린 경로에서는, 1분자의 포름알데히드로부터 1분자의 아세틸 CoA가 직접 생성된다.

[0065] RuMP 경로에 의한 포름알데히드 고정에 중요한 반응은, 3-헥실로스6인산 합성 효소(3-hexulose-6-phosphate synthase, 이하 「HPS」라고 약기하는 경우가 있음)에 의한 리블로스5인산(Ru5P)과 포름알데히드로부터의 D-아라비노3헥실로스6인산의 생성 반응, 및 6-포스포-3-헥실로이소머라아제(6-phosphate-3-hexuloisomerase, 이하

「PHI」라고 약기하는 경우가 있음)에 의한, D-아라비노3헥슬로스6인산으로부터의 프룩토스6인산(F6P)의 생성 반응이다.

[0066] 본 경로에서 생성되는 F6P 등은 해당계로도 제공되고, 그 후 아세틸 CoA나, 글리세르알데히드3인산(G3P) 및 피루브산을 생성한다. F6P의 경우, 1분자당 2분자의 G3P로 변환되고, 계속하여 2분자의 피루브산을 거쳐 2분자의 아세틸 CoA가 생성된다.

[0067] XuMP 경로에 의한 포름알데히드 고정에 중요한 반응은, 디히드록시아세톤 신타아제(dihydroxyacetone synthase)에 의한 크실룰로스5인산(Xu5P)과 포름알데히드로부터의 디히드록시아세톤(DHA) 및 글리세르알데히드3인산(G3P)의 생성 반응이다. 본 경로에서 생성된 G3P는 해당계로도 제공되어, 피루브산과 아세틸 CoA로 변환된다. 디히드록시아세톤도 인산화에 의해 해당계로 제공되어, G3P, 피루브산 및 아세틸 CoA로 변환될 수 있다.

[0068] 본 발명의 제조합 세포는, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 것이다. 예를 들어, 메탄올 데히드로게나아제나 알코올 옥시다아제를 갖는 제조합 세포의 경우에는, 메탄올을 포름알데히드로 변환할 수 있다.

[0069] 또한, 메탄올 데히드로게나아제나 알코올 옥시다아제 외에 메탄 모노옥시게나아제를 갖는 제조합 세포의 경우에는 메탄올 메탄올로 변환하고, 계속하여 메탄올을 포름알데히드로 변환할 수 있다.

[0070] 또한, 포름알데히드 데히드로게나아제를 갖는 제조합 세포의 경우에는 포름산을 포름알데히드로 변환할 수 있다.

[0071] 일반적으로, 세균으로 분류되는 메틸로트로프(메틸로트로프 세균)는, 메탄 모노옥시게나아제와 메탄올 데히드로게나아제를 갖고 있으므로, 메탄 또는 메탄올로부터 포름알데히드를 합성할 수 있다. 또한, 효모로 분류되는 메틸로트로프(메틸로트로프 효모)는, 알코올 옥시다아제를 갖고 있으므로, 메탄올로부터 포름알데히드를 합성할 수 있다. 또한, 메틸로트로프는 포름알데히드 데히드로게나아제를 갖고 있으며, 포름산을 포름알데히드로 변환할 수 있다.

[0072] 상기 메탄올 데히드로게나아제에는, 그람 음성 세균의 메틸로트로프에서 발견되는 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ: pyrroloquinoline quinone) 의존형 메탄올 데히드로게나아제, 그람 양성 세균의 메틸로트로프에서 발견되는 NAD(P) 의존형 메탄올 데히드로게나아제 및 알코올 데히드로게나아제, 그람 양성 세균의 메틸로트로프에서 발견되는 DMNA(N,N'-디메틸-4-니트로소아닐린) 의존형 메탄올옥시드리덕타아제(Park H. et al., Microbiology 2010, 156, 463-471)가 포함된다. 효모에서의 메탄올로부터 포름알데히드로의 변환은, 통상 산소 의존형인 알코올 옥시다아제에 의해 촉매된다.

[0073] 또한, 아민 옥시다아제(amine oxidase)나 메틸아민 데히드로게나아제(methylamine dehydrogenase)를 갖는 제조합 세포의 경우에는 메틸아민을 포름알데히드로 변환할 수 있다. 이들 효소에 대해서는, 일부의 메틸로트로프나 아르트로박터(*Arthrobacter*)속 세균이 갖고 있는 것이 알려져 있다(Anthony C., The Biochemistry of Methylotroph, 1982, Academic Press Inc).

[0074] 또한 포름아미드를 포름알데히드로 변환하는 효소가, 일부의 미생물에서 발견되고 있다(Anthony C., The Biochemistry of Methylotroph, 1982, Academic Press Inc).

[0075] 그리고, 포름알데히드를 경유하여 1,4-부탄디올을 생산할 수 있다.

[0076] 숙주 세포로서 사용되는 메틸로트로프의 종류로서는, 특별히 한정은 없지만, 예를 들어 세균이나 효모로 분류되는 것을 채용할 수 있다.

[0077] 메틸로트로프 세균으로서, 예를 들어 메틸락시드필룸(*Methylacidiphilum*)속, 메틸로시누스(*Methylosinus*)속, 메틸로시스티스(*Methylocystis*)속, 메틸로박테리움(*Methylobacterium*)속, 메틸로셀라(*Methylocella*)속, 메틸로코쿠스(*Methylococcus*)속, 메틸로모나스(*Methylomonas*)속, 메틸로박터(*Methylobacter*)속, 메틸로바실루스(*Methylobacillus*)속, 메틸로필루스(*Methylophilus*)속, 메틸로테네라(*Methylotenera*)속, 메틸로보루스(*Methylovorus*)속, 메틸로미크로븀(*Methylomicrobium*)속, 메틸로파가(*Methylophaga*)속, 메틸로필라세아에(*Methylophilaceae*)속, 메틸로베르사틸리스(*Methyloversatilis*)속, 미코박테리움(*Mycobacterium*)속, 아르트로박터속, 바실루스(*Bacillus*)속, 베기아토아(*Beggiatoa*)속, 부르크홀데리아(*Burkholderia*)속, 그라눌리박터(*Granulibacter*)속, 히포미크로븀(*Hyphomicrobium*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 아크로모박터(*Achromobacter*)속, 파라코쿠스(*Paracoccus*)속, 크레노트릭스(*Crenothrix*)속, 클로노트릭스(*Clonothrix*)속, 로도박터(*Rhodobacter*)속, 로도시클라세아에(*Rhodocyclaceae*)속, 실리시박터(*Silicibacter*)속, 티오미크로스피라

(*Thiomicrospira*)속, 베르루코미크로비아(*Verrucomicrobia*)속 등에 속하는 세균을 들 수 있다.

- [0078] 메틸로트로프 효모로서는, 예를 들어 피키아(*Pichia*)속, 칸디다(*Candida*)속, 사카로미세스(*Saccharomyces*)속, 한센울라(*Hansenula*)속, 토룰롭시스(*Torulopsis*)속, 클로에케라(*Kloeckera*)속 등에 속하는 효모를 들 수 있다. 피키아속 효모의 예로서는, 피. 하플로필라(*P. haplophila*), 피. 파스토리스(*P. pastoris*), 피. 트레할로필라(*P. trehalophila*), 피. 린드네리이(*P. lindnerii*) 등을 들 수 있다. 칸디다속 효모의 예로서는, 씨. 파라프실로시스(*C. parapsilosis*), 씨. 메타놀리카(*C. methanolica*), 씨. 보이디니이(*C. boidinii*), 씨. 알코미가스(*C. alcomigas*) 등을 들 수 있다. 사카로미세스속 효모의 예로서는, 사카로미세스 메타-논포암스(*Saccharomyces metha-nonfoams*) 등을 들 수 있다. 한센울라속 효모의 예로서는, 에이치. 위커하미이(*H. wickerhamii*), 에이치. 캡슐라타(*H. capsulata*), 에이치. 글루코지마(*H. glucozyma*), 에이치. 헨리씨이(*H. henricii*), 에이치. 미누타(*H. minuta*), 에이치. 논페르멘탄스(*H. nonfermentans*), 에이치. 필로덴드라(*H. philodendra*), 에이치. 폴리모르파(*H. polymorpha*) 등을 들 수 있다. 토룰롭시스속 효모의 예로서는, 티. 메타놀로베센스(*T. methanolovesens*), 티. 글라브라타(*T. glabrata*), 티. 네모덴드라(*T. nemodendra*), 티. 피누스(*T. pinus*), 티. 메타노플로트(*T. methanofloat*), 티. 에노키이(*T. enokii*), 티. 멘타노필레스(*T. menthanophiles*), 티. 메타노소르보사(*T. methanosorbosa*), 티. 메타노도메르퀴이(*T. methanodomecqi*) 등을 들 수 있다.
- [0079] 숙주 세포가 비메틸로트로프인 경우에는, 메탄올 등을 포름알데히드로 변환하는 경로를 갖고 있다고만은 할 수 없으므로, 적어도 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」을 부여할 필요가 있다. 또한, 「메탄올 메탄올로 변환하는 기능」을 부여하는 것이 바람직하다. 이들 기능 부여는, 상기한 효소를 코딩하는 유전자를 숙주 세포에 도입함으로써 실현할 수 있다.
- [0080] 예를 들어, 메탄올을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자로서, 메탄올 데히드로게나아제(예를 들어, EC 1.1.1.244, EC 1.1.2.7)를 코딩하는 유전자나 알코올 옥시다아제(예를 들어 EC 1.13.13)를 코딩하는 유전자를 사용할 수 있다. 또한, 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자로서, 포름알데히드 데히드로게나아제(예를 들어 EC 1.2.1.46)를 코딩하는 유전자를 사용할 수 있다. 또한, 메탄올 메탄올로 변환하는 기능을 부여하는 유전자로서, 메탄 모노옥시게나아제를 코딩하는 유전자를 사용할 수 있다.
- [0081] 또한, 메탄올 자화성을 부여하는 플라스미드가 알려져 있다. 예를 들어, 바실루스 메타놀리쿠스(*Bacillus methanolicus*)의 메탄올 자화성은, 메탄올 대사에 관한 효소군을 코딩하는 플라스미드에 의존하고 있다(Brautaset T. et al., J. Bacteriology 2004, 186(5), 1229-1238). 이러한 플라스미드를 근연의 비메틸로트로프에 도입함으로써, 메탄올 자화능을 부여하는 것이 가능하다. 나아가, 이러한 플라스미드를 개변함으로써, 다양한 비메틸로트로프에 메탄올 자화성을 부여하는 것도 가능하다.
- [0082] 상기한 바와 같이 하여 비메틸로트로프에 대하여 「메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능」을 부여하고, 추가로 「포름알데히드의 고정화능」을 부여함으로써, 비메틸로트로프를 메틸로트로프와 마찬가지로 취급하는 것이 가능해진다. 포름알데히드 고정화능의 부여는, 예를 들어 상기한 세린 경로, RuMP 경로 또는 XuMP 경로에서 작용하는 효소를 코딩하는 유전자를 비메틸로트로프에 도입함으로써, 실현할 수 있다.
- [0083] 하나의 바람직한 실시 형태에서는, 숙주 세포가 메탄올 자화성 효모이며, 메탄올을 탈수소 반응에 의해 포름알데히드로 변환하는 효소를 코딩하는 유전자가 더 도입되어, 당해 유전자가 숙주 세포 내에서 발현된다. 예를 들어, 메탄올 자화성을 구비한 피키아속 효모를 숙주 세포로서 사용하고, 또한 메탄올 데히드로게나아제 유전자를 도입함으로써, 원하는 재조합 세포를 취득할 수 있다. 본 실시 형태에 따르면, 고알코올 내성이고, 또한 산소에 의존하지 않고 메탄올을 포름알데히드로 변환할 수 있는, 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포를 얻을 수 있다.
- [0084] RuMP 경로를 부여하는 경우를 예로 하여 재차 설명한다. RuMP 경로의 부여는, 예를 들어 상기한 3-핵술로스6인산 합성 효소(HPS; 예를 들어 EC 4.1.2.43) 유전자와, 6-포스포-3-핵술로이소머라아제(PHI; 예를 들어 EC 5.3.1.27) 유전자를 도입함으로써 실현할 수 있다. 즉, HPS/PHI에 의한 포름알데히드 고정화 반응의 기질 또는 생성물인, 리불로스5인산(Ru5P)과 프룩토스6인산(F6P)은, 펜토스인산 경로 및 캘빈 회로의 대사 중간체로서 모든 생물에 보편적으로 존재한다. 따라서, HPS/PHI의 도입에 의해, 대장균(*Escherichia coli*), 고초균(바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)) 및 효모 등을 비롯한 모든 생물에 포름알데히드 고정화능을 부여하는 것이 가능하다.
- [0085] 원래 RuMP 경로를 갖고 있는 숙주 세포에, HPS 유전자와 PHI 유전자를 도입할 수도 있다. 이에 의해, RuMP 경

로에 의한 포름알데히드 고정화능을 증강시킬 수 있다. 예를 들어, 고초균과 같이, 원래 RuMP 경로 또는 이것과 동질의 경로를 갖는 미생물에, 예를 들어 메탄올 데히드로게나아제(예를 들어, EC 1.1.1.244, EC 1.1.2.7) 등의 알코올 탈수소 효소, 3-핵술로스6인산 합성 효소(HPS; 예를 들어 EC 4.1.2.43), 6-포스포-3-핵술로이소머라아제(PHI; 예를 들어 EC 5.3.1.27) 등의 효소를 코딩하는 유전자를 도입함으로써, 메탄올을 포름알데히드로 변환하는 기능(즉 메탄올 자화성)을 부여함과 함께, 포름알데히드 고정화능을 증강시킬 수 있다.

[0086] 또한, 메틸로트로프인 숙주 세포에, HPS 유전자와 PHI 유전자를 도입할 수도 있다. 즉, 세린 경로, RuMP 경로 또는 XuMP 경로를 갖는 메틸로트로프에 HPS/PHI를 도입함으로써, RuMP 경로에 의한 포름알데히드 고정화능을 증강시킬 수 있다. 그 결과, 재조합 세포의 포름알데히드 내성을 높일 수 있어, 결과적으로 메탄올이나 포름산에 대한 내성 및 자화능을 높이는 것이 가능해진다. 이에 의해, 재조합 세포의 배양 효율이나 1,4-부탄디올의 생산 효율을 향상시키는 것이 가능해진다.

[0087] 한편, 세린 경로에 의한 포름알데히드 고정화능을 부여하는 경우에는, 상기한 세린 히드록시메틸트랜스페라아제(예를 들어 EC 2.1.2.1) 유전자를 사용할 수 있다. 예를 들어, 비메틸로트로프에, 메탄올 데히드로게나아제 등의 알코올 탈수소 효소 유전자, 5,10-메틸렌테트라히드로엽산(5,10-methylenetetrahydrofolate)(CH₂=H₄F) 합성 효소 유전자 및 세린 히드록시메틸트랜스페라아제(예를 들어 EC 2.1.2.1) 유전자 등을 도입함으로써, 메탄올 자화성과, 세린 경로에 의한 포름알데히드 고정화능을 부여하는 것이 가능해진다.

[0088] 본 발명의 재조합 세포에서는, 숙신산 또는 α-케토글루타르산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군(이하, 통합하여 「1,4-부탄디올 생합성 관련 효소(군)」이라고 칭하는 경우가 있음)을 코딩하는 유전자가 도입되어 있다. 도 1의 (a) 내지 (i)로 표시되는 효소가 1,4-부탄디올 생합성 관련 효소에 상당한다.

[0089] 하나의 양상에서는, 숙신산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군으로서, (c) 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, (a) 숙시닐 CoA 합성 효소, (b) CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, (e) 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, (f) 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, (g) 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, (i) 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 (h) 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가, 숙주 세포에 도입되어 있다. 예를 들어, 이들 효소군으로부터 1 또는 2 이상의 효소를 선택하여, 당해 효소를 코딩하는 유전자를 숙주 세포에 도입하면 된다.

[0090] 또한, 다른 양상에서는, α-케토글루타르산으로부터 1,4-부탄디올에 이르는 생합성 경로에서 작용하는 효소군으로서, (d) 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, (e) 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, (f) 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, (g) 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, (i) 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 (h) 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가, 숙주 세포에 도입되어 있다. 예를 들어, 이들 효소군으로부터 1 또는 2 이상의 효소를 선택하여, 당해 효소를 코딩하는 유전자를 숙주 세포에 도입하면 된다.

[0091] 이들 효소(1,4-부탄디올 생합성 관련 효소)로서는, 재조합 세포 내에서 그 효소 활성을 발휘할 수 있는 것이면 특별히 한정은 없다. 이들 효소를 코딩하는 유전자에 대해서도 마찬가지이며, 재조합 세포 내에서 정상적으로 전사·번역되는 것이면 특별히 한정은 없다. 숙주 세포 유래의 것일 수도 있고, 다른 유래의 것일 수도 있다.

[0092] 1,4-부탄디올 생합성 관련 효소 및 그의 유전자의 구체예로서는, 상기 특허문헌 1에 개시된 것을 들 수 있다. 예를 들어, 이하의 효소를 들 수 있다. 또한, 숙주 세포가 이하에 나타내는 효소를 원래 갖는 경우, 보다 기질 특이성, 분자 활성 및 안정성이 우수한, 즉 Kcat/Km값 등이 보다 높은 효소 유전자를 도입하면 된다. 이 경우, 상기 효소 유전자에는, 숙주 세포가 원래 보유하는 효소의 개변체를 코딩하는 유전자도 포함된다. 도입 유전자의 코돈(codon)의 최적화나 저빈도의 회피는, 「코돈 사용 데이터베이스(Codon Usage Database)」(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)을 참조하여, 각 숙주 미생물에 있어서 행할 수 있다.

[0093] (c) 숙신산 세미알데히드 탈수소 효소(Succinate semialdehyde dehydrogenase: 예를 들어, EC 1.2.1.16, EC 1.2.1.24)

[0094] 유전자의 예(모두 UniProtKB No.로 표시): P76149(이. 콜리(*E. coli*)); P25526(이. 콜리); P94428(바실루스 서브틸리스); Q55585(시네키스티스속(*Synechocystis* sp.)); P 38067(사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)) 등

[0095] (a) 숙시닐 CoA 합성 효소(Succinyl CoA synthetase, Succinyl CoA ligase: 예를 들어, EC 6.2.1.4, EC

6.2.1.5 등)

- [0096] 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): POAGE9(이. 콜리); POA836(이. 콜리); P53598(사카로미세스 세레비시아에); P53312(사카로미세스 세레비시아에); P09143(터무스 테모필루스(*Thermus thermophilus*)); 082662(아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)) 등. 본 효소 활성은, 모든 생물이 보유하지만, 필요에 따라 외래 유전자로서 도입하는 것도 유효하다.
- [0097] (b) CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소(CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase: 예를 들어, EC 1.2.1.79)
- [0098] 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): P38947(클로스트리듐 클루이베리(*Clostridium kluyveri*)); A4YGN0(메탈로스파에라 세둘라(*Metallosphaera sedula*)) 등.
- [0099] (e) 4-히드록시부티르산 탈수소 효소(4-hydroxybutyrate dehydrogenase: 예를 들어 EC 1.1.1.61)
- [0100] 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): D8GUP1(클로스트리듐 룡달리이(*Clostridium ljungdahlii*)); C9YNR6(클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*)); Q97IR6(클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)); Q8XYI7(랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)); Q7MWD4(포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)) 등.
- [0101] (f) 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소(4-hydroxybutyryl-CoA transferase: 예를 들어 EC 2.8.3.a)
- [0102] 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): Q9RM86(클로스트리듐 아미노부틸리쿰(*Clostridium aminobutyricum*)); P38942(클로스트리듐 클루이베리); Q185L2(클로스트리듐 디피실레); Q3ACH6(카르복시도테르무스 히드로게노포르마스(*Carboxydotherrmus hydrogenoformas*)); C4Z8H6(에우박테리움 렉탈레(*Eubacterium rectale*)); I8UF15(포르피로모나스 진지발리스) 등.
- [0103] (g) 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소(4-hydroxybutyryl-CoA reductase: 예를 들어 EC 1.2.1.10 등, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소 활성은, CoA-아실화 알데히드 환원 효소(CoA-acylating aldehyde dehydrogenase)의 역반응의 촉매 활성을 나타냄)
- [0104] 유전자의 예: Q716S8(클로스트리듐 베이저링키이(*Clostridium beijerinckii*)); Q7X4B7(클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)); A5HYN9(클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)); POA9Q7(이. 콜리)(이상, UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시); 젠뱅크 CAQ57983(클로스트리듐 사카로부틸리쿰(*Clostridium saccharobutylicum*)); NCBI ZP_03705305(클로스트리듐 메틸펜토숨(*Clostridium methylpentosum*)); NCBI ZP_08533507(칼달칼리바실루스 터마룸(*Caldalkalibacillus thermarum*)) 등.
- [0105] (h) 알코올 데히드로게나아제(Alcohol dehydrogenase: 예를 들어 EC 1.1.1.1, EC 1.1.1.2 등)
- [0106] 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): POA4X1(미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*)); P00331(사카로미세스 세레비시아에); P00330(사카로미세스 세레비시아에); Q9HIM3(터모플라즈마 애시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*)); B9WPR7(아트로박터속); P00334(드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)) 등.
- [0107] 또한, 상기 (g) 및 (h)의 2단계의 효소 반응 스텝은, 알데히드/알코올 데히드로게나아제(aldehyde/alcohol dehydrogenase)(adhE: EC 1.1.1.1, 1.1.1.10 등)의 작용에 의해서도 촉매될 수 있다. 즉 adhE는, 상기 (g)와 (h)의 양쪽에 해당한다. adhE의 예로서는, D8GU53(클로스트리듐 룡달리이), D8GU52(클로스트리듐 룡달리이), Q9ANR5(클로스트리듐 아세토부틸리쿰), POA9Q7(이. 콜리), F7TVB7(브레비바실루스 라테로스포루스(*Brevibacillus laterosporus*)) 등이 있다(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시).
- [0108] (i) 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소(4-hydroxybutyraldehyde dehydrogenase)
- [0109] 본 효소는 4-히드록시부티르산으로부터 4-히드록시부티르알데히드로의 변환을 가역적으로 촉매할 수 있는 효소이며, 효소 분류상, 알데히드데히드로게나아제(예를 들어 EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4, EC 1.2.1.5 등)에 속한다.
- [0110] 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 활성을 나타내는 알데히드 데히드로게나아제 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): E4R8S4(슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)); P23883(이. 콜리); P12693(슈도모나스 푸티다); P40047(사카로미세스 세레비시아에); P25553(이. 콜리); POC6D7(비브리오속(*Vibrio sp.*)); P47771(사카로미세스 세레비시아에); G3XYI2(아스페길루스 니거(*Aspergillus niger*)) 등.

- [0111] (d) 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소(2-oxoglutarate decarboxylase: 예를 들어 EC 4.1.1.71)
- [0112] 유전자의 예(모두 UniProtKB/Swiss-Prot No.로 표시): AOR2B1(미코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*)); IOWZ48(로도코쿠스 임테켄시스(*Rhodococcus imtechensis*)); G2EJR8(코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)); J1S9U2(스트렙토미세스 아우라투스(*Streptomyces auratus*)); J7LQH4(아트로박터속) 등.
- [0113] 또한, 도입되는 「1,4-부탄디올 생합성 관련 효소」의 유전자의 종류(수)는, 재조합 세포가 「메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능」한 한, 적어도 하나이면 된다. 단, 2종 이상의 유전자를 도입함으로써 각 효소의 활성이 증가되는 경우에는 1,4-부탄디올의 생산성이 높아지는 것이 기대된다. 기본적으로, 숙주 세포가 보유하고 있지 않은 1,4-부탄디올 생합성 관련 효소에 대해서는, 당해 효소를 코딩하는 유전자를 외부로부터 도입한다. 또한, 숙주 세포가 보유하고 있지만 분자 활성이 낮은 경우에는, 보다 분자 활성 등의 높은 효소를 코딩하는 유전자를 도입하는 것이 바람직하다.
- [0114] 1,4-부탄디올 생합성 관련 효소에 대해서는, 천연에 존재하는 것 외에, 각 효소의 개변체일 수도 있다. 예를 들어, 각 효소의 아미노산 치환 변이체나, 각 효소의 부분 단편이며 마찬가지로의 효소 활성을 갖는 폴리펩티드일 수도 있다.
- [0115] 본 발명의 재조합 세포에 있어서는, 1,4-부탄디올 생합성 관련 효소를 코딩하는 유전자 등 외에, 다른 유전자가 더 도입되어 있을 수도 있다. 도입하는 유전자로서는, 예를 들어 상기한 메탄올 데히드로게나아제 유전자, 알코올 데히드로게나아제 유전자, 메탄모노옥시다아제 유전자, HPS/PHI 유전자, 세린 히드록시메틸트랜스페라아제 유전자, 5,10-메틸렌테트라하이드로엽산 합성 효소 유전자 및 세린 히드록시메틸트랜스페라아제 유전자 등을 들 수 있다.
- [0116] 숙주 세포에 유전자를 도입하는 방법으로서 특별히 한정은 없고, 숙주 세포의 종류 등에 의해 적절히 선택하면 된다. 예를 들어, 숙주 세포에 도입 가능하고 또한 편입된 유전자를 발현 가능한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0117] 예를 들어, 숙주 세포가 세균 등의 원핵 생물인 경우에는, 당해 벡터로서, 숙주 세포에 있어서 자립 복제 가능 내지는 염색체 중으로의 편입이 가능하며, 삽입된 상기 유전자를 전사할 수 있는 위치에 프로모터를 함유하고 있는 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 당해 벡터를 사용하여, 프로모터, 리보솜 결합 서열, 상기 유전자 및 전사 종결 서열을 포함하는 일련의 구성을 숙주 세포 내에서 구축하는 것이 바람직하다.
- [0118] 예를 들어, 메틸로트로프 세균의 염색체로의 편입 방법으로서, 리볼로스모노인산 경로를 갖는 메틸로바실루스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)나, 세린 경로를 갖는 메틸로박테리움 엑스토르퀼스(*Methylobacterium extorquens*)로, 목적 유전자의 파괴 조작에 의해 예가 기재되어 있다(Chistoserdova L. et al., Microbiology 2000, 146, 233-238; Chistoserdov AY., et al., J. Bacteriol 1994, 176, 4052-4065). 이들은 환상 DNA를 사용한 계놈으로의 유전자 도입법이지만, 메틸로필루스(*Methylophilus*)속 세균 등에서는, 직쇄상 DNA를 사용한 계놈으로의 유전자 도입법도 개발되고 있다(일본 특허 공개 제2004-229662호 공보). 일반적으로, 숙주 세포에 의한 분해를 받기 어려운 경우에는, 직쇄상 DNA에 의한 계놈 재조합이 환상 DNA에 의한 것보다도 더 효율적이다. 또한 통상 상동 재조합법은, 역반복 서열(inverted-repeat sequence) 등과 같이, 계놈 위에 멀티카피 존재하는 유전자를 표적하는 것이 바람직하다. 또한, 계놈에 멀티카피 도입하는 방법으로서, 상동 재조합 이외에, 트랜스포존에 탑재하는 방법도 있다. 메틸로트로프 세균으로의 플라스미드에 의한 유전자 도입법으로서, 예를 들어 광숙주역 벡터인 pAYC32(Chistoserdov AY., et al., Plasmid 1986, 16, 161-167), pRP301(Lane M., et al., Arch. Microbiol. 1986, 144(1), 29-34), pBBR1, pBHR1(Antoine R. et al., Molecular Microbiology 1992, 6, 1785-1799), pCM80(Marx CJ. et al., Microbiology 2001, 147, 2065-2075) 등이 있다.
- [0119] 메틸로트로프 효모에 있어서의 유전자 도입 방법으로서, 주로 피키아 파스토리스(*Pachia pastoris*)로 확립되어 있고, pPIC3.5K, pPIC6, pGAPZ, pFLD(인비트로젠사) 등의 벡터가 시판되고 있다.
- [0120] 바실루스속 세균으로의 유전자 도입에 생기는 사용 플라스미드로서는, 바실루스 서브틸리스에는, pMTLBS72(Nguyen HD. Et al., Plasmid 2005, 54(3), 241-248), pHT01(후나코시사), pHT43(후나코시사) 등이, 바실루스 메가테륨(*Bacillus megaterium*)에는, p3STOP1623hp(후나코시사), pSP_{Yoch}hp(후나코시사) 등이, 바실루스 브레비스(*Bacillus brevis*)에는 pNI DNA(다카라 바이오사) 등이 있다.

- [0121] 또한 벡터를 사용하여 복수종의 유전자를 숙주 세포에 도입하는 경우, 각 유전자를 1개의 벡터에 편입할 수도 있고, 별도의 벡터에 편입할 수도 있다. 또한 1개의 벡터에 복수의 유전자를 조합하는 경우에는, 각 유전자를 공통된 프로모터 하에서 발현시킬 수도 있고, 별도의 프로모터 하에서 발현시킬 수도 있다. 복수종의 유전자를 도입하는 예로서는, 숙주 세포가 메틸로트로프인 경우에 「1,4-부탄디올 생합성 관련 효소를 코딩하는 유전자」 외에, HPS/PHI 유전자를 도입하는 형태를 들 수 있다.
- [0122] 이상과 같이 메틸로트로프 등에서 사용할 수 있는 기지의 벡터를 나타냈지만, 프로모터, 터미네이터 등의 전사 제어, 복제 영역 등에 관한 영역을 목적에 따라 개변할 수 있다. 개변 방법으로서의 각 숙주 세포, 또는 그의 근연종에 있어서의 천연의 다른 유전자 서열로 변경할 수도 있고, 또한 인공의 유전자 서열로 변경할 수도 있다.
- [0123] 또한, 이상의 유전자 도입에 의한 개변 외에, 돌연변이, 게놈 셔플링 등의 변이 방법도 조합함으로써, 숙주 세포에서의 도입 유전자의 발현량, 숙주 세포의 1,4-부탄디올 배출 기능, 1,4-부탄디올 내성 등을 향상시킴으로써, 1,4-부탄디올의 생산성을 더욱 향상시키는 것이 가능해진다.
- [0124] 즉, 본 발명에 있어서는, 외래 유전자를 숙주 세포의 게놈에 편입할 수도 있고, 플라스미드에 편입할 수도 있다.
- [0125] 하나의 바람직한 실시 형태에서는, 재조합 세포가 적어도 400mM의 1,4-부탄디올에 대한 내성을 갖는다. 다른 바람직한 실시 형태에서는, 재조합 세포가 적어도 2%(v/v)의 메탄올에 대한 내성을 갖는다. 이러한 구성에 의해, 1,4-부탄디올의 고생산이 가능해진다. 이러한 특성을 갖는 재조합 세포는, 예를 들어 적절한 변이 처리를 숙주 세포에 실시하여 원하는 특성을 갖는 숙주 세포를 선발하여, 그 숙주 세포를 사용함으로써 얻을 수 있다.
- [0126] 본 발명은, 하기 (i) 내지 (iv)를 포함한다.
- [0127] (i) 메틸로트로프인 숙주 세포, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자가 도입된 숙주 세포, 또는 리블로스모노인산 경로를 갖고 또한 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자가 도입된 숙주 세포에, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,
- [0128] 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,
- [0129] 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.
- [0130] (ii) 메틸로트로프인 숙주 세포에, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,
- [0131] 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,
- [0132] 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.
- [0133] (iii) 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 포름알데히드 고정화능을 부여하는 유전자와, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,
- [0134] 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,
- [0135] 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.

- [0136] (iv) 리볼로스모노인산 경로를 갖는 숙주 세포에, 메탄올 및/또는 포름산을 포름알데히드로 변환하는 기능을 부여하는 유전자와, 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 숙시닐 CoA 합성 효소, CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소, 2-옥소글루타르산 탈탄산 효소, 4-히드록시부티르산 탈수소 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소, 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소, 4-히드록시부티르알데히드 탈수소 효소 및 알코올 데히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 이루어지고,
- [0137] 당해 유전자가 상기 숙주 세포 내에서 발현되고,
- [0138] 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산 가능한 재조합 세포.
- [0139] 본 발명의 1,4-부탄디올의 생산 방법의 하나의 양상에서는, 상기한 재조합 세포를, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 탄소원으로서 사용하여 배양하고, 당해 재조합 세포에 1,4-부탄디올을 생산시킨다. 탄소원으로서 사용하는 이들 C1 화합물에 대해서는, 하나만을 사용할 수도 있고, 2개 이상을 조합하여 사용할 수도 있다. 또한, 이들의 C1 화합물은, 주된 탄소원으로서 사용하는 것이 바람직하고, 유일한 탄소원인 것이 보다 바람직하다.
- [0140] 또한, 편성 메틸로트로프의 경우에는, C1 화합물을 유일한 탄소원으로 하는 합성 배양지를 사용하는 것이 기본이지만, 이것에 효모 엑기스, 옥수수 침지액, 옥엑기스 등의 천연 배지나 비타민류를 소량 첨가함으로써도 균의 증식은 촉진된다. 통성 메틸로트로프인 경우에는, 균체 증식 스테이지에서는 당질, 지질 등의 C1 화합물 이외의 물질을 탄소원으로 할 수도 있고, 1,4-부탄디올 생산 스테이지에서 탄소원을 상기 C1 화합물로 변경하면 된다. 미생물의 배양법으로서는, 목적에 따라 호기, 미호기, 또는 혐기 조건에서 배양 가능하다. 또한 배치 배양, 유가 배양, 연속 배양의 어느 한 방법일 수도 있다.
- [0141] 탄소원으로서 예를 들어 메탄올을 사용하는 경우는, 통상 세균의 경우에는 1.0%(v/v) 농도, 효모의 경우에는 3.0%(v/v) 농도 이하에서 사용하지만, 인위적으로 이들에 대한 내성을 개량한 경우에는, 그 이상의 농도에서도 배양 가능하다.
- [0142] 본 발명의 1,4-부탄디올의 생산 방법의 다른 양상에서는, 상기한 재조합 세포에, 메탄, 메탄올, 메틸아민, 포름산, 포름알데히드 및 포름아미드로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 C1 화합물을 접촉시켜, 당해 재조합 세포에 상기 C1 화합물로부터 1,4-부탄디올을 생산시킨다. 즉, 세포 분열(세포 증식)을 수반하는지의 여부와 관계없이 재조합 세포에 상기한 C1 화합물을 접촉시켜, 1,4-부탄디올을 생산시킬 수 있다. 예를 들어, 고정화된 재조합 세포에 상기한 C1 화합물을 연속적으로 공급하여, 1,4-부탄디올을 연속적으로 생산시킬 수 있다.
- [0143] 본 양상에 있어서도, 이들 C1 화합물에 대해서는, 하나만을 사용할 수도 있고, 2개 이상을 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0144] 생산된 1,4-부탄디올은 세포 내에 축적되거나 세포 밖으로 방출된다. 예를 들어, 세포 밖으로 방출된 1,4-부탄디올을 회수하여, 증류 등에 의해 단리 정제함으로써, 순화된 1,4-부탄디올을 취득할 수 있다.
- [0145] 이하, 실시예를 갖고 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0146] 실시예 1
- [0147] XuMP 경로를 갖는 메틸로트로프로의 1,4-부탄디올(1,4-BDO) 합성 효소 유전자의 도입과, 재조합체를 사용한 메탄올로부터의 1,4-BDO의 생산
- [0148] 본 실시예에서는, XuMP 경로를 갖는 메틸로트로프로서, 메탄올 자화성 효모피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115주(인비트로젠사)를 사용하였다.
- [0149] 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터인 서열 번호 1의 인공 합성 유전자(7773 bp)를 구축하였다. 해당 유전자 클러스터는, sucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 포함한다.
- [0150] 서열 번호 1의 인공 합성 유전자를, pT7 blue-2 벡터(노바젠(Novagen)사)의 SmaI/NotI 절단 부위에 클로닝하였다. 해당 플라스미드를 대량 제조한 후, SmaI 및 NotI로 절단하여, 삽입 유전자를 회수하였다. 회수된 유전자 단편을 pPIC 3.5K(인비트로젠사)의 SnaBI/NotI 절단 부위에 도입하여, 1,4-BDO 합성 유전자가 도입된 벡터

pPBD0를 구축하였다. 본 벡터는, 알코올 옥시다아제 I(AOXI) 프로모터 및 AOXI 터미네이터의 컨트롤 하에서, sucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 발현시킨다. 본 벡터의 도입에 의해, 효모에 있어서 숙시닐 CoA로부터 1,4-BDO의 합성이 가능해진다.

- [0151] 피키아 파스토리스 GS115주로의 pPBD0에 의한 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 발현 유닛의 도입은, 인비트로젠사 매뉴얼 「Version D 032002/25-0156」에 따라 행하였다. 멀티 카피의 유전자 도입체를 얻기 위하여, 1.5 mg/mL 농도의 제네티신(Geneticin)(인비트로젠사) 내성주를 취득하였다. 이에 의해, 외래의 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자를 복수 카피 유지하는 메탄올 자화성 효모 GS115BDO주를 구축하였다. 또한 컨트롤주로서 1.5mg/mL 농도의 제네티신에 내성이 있는, pPIC3.5K만이 도입된 GS11535K 주도 얻었다.
- [0152] GS115BDO주 및 GS11535K 주를 각각 메탄올을 유일한 탄소원으로 하는 20mL의 합성 A 배지(1L당 H_3PO_4 18g, K_2SO_4 14.28g, KOH 3.9g, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.9g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 11.7g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 8.4mg, KI 1.1mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 4.2mg, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.3mg, H_3BO_3 0.03mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.7mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 28mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 91mg, 비오틴 0.28mg, 메탄올 20mL을 포함함)에서 호기적으로 30℃로 64시간 배양하였다. 균체를 회수한 후, 회수 균체를 45mL의 합성 A 배지에서 재차 30℃로 16시간 진탕 배양하였다. 배양 종료 후, 배양으로부터 원심 분리에 의해 배양 상청을 얻었다. 배양 상청을 LC/MS에 의해 분석하였다.
- [0153] 그 결과, GS11535K 주에서는 1,4-BDO는 검출되지 않았지만, GS115BDO 주에서는 1,4-BDO가 유의하게 검출되었다. 이 때의 1,4-BDO의 생성 농도는 13mM이었다.
- [0154] 이상으로부터, 본 실시예에 의해, 메탄올 자화 경로의 일종인 XuMP 경로를 통한, 진행 미생물(효모)에 의한 1,4-BDO 생산이 가능한 것을 알 수 있다.
- [0155] 실시예 2
- [0156] 비메틸로트로프로의 메탄올 데히드로게나아제, HPS 유전자, PSI 유전자 및 이소프렌 합성 효소 유전자의 도입과, 재조합체에 의한 메탄올로부터의 1,4-BDO 생산
- [0157] 본 실시예에서는, 비메틸로트로프로서 바실루스 서브틸리스를 사용하였다.
- [0158] 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터인 서열 번호 6의 인공 합성 유전자(10600 bp)를 구축하였다. 해당 유전자 클러스터는, mdh(서열 번호 7: 메탄올 탈수소 효소), HPS(서열 번호 8: 3-헥실로스-6인산 합성 효소), PHI(서열 번호 9: 3-헥실로스-6-인산 이성화 효소), SucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 포함한다.
- [0159] 서열 번호 6의 인공 합성 유전자를, pUC119의 SmaI/XbaI 절단 부위에 클로닝하였다. 해당 플라스미드를 대량 제조한 후, SmaI 및 XbaI로 절단하여, 삽입 유전자를 회수하였다. 회수한 유전자를 바실루스 서브틸리스용 발현 벡터 pHT01(MoBiTec사)의 XbaI/SmaI 절단 부위에 도입하여, pHTBDO를 제작하였다. pHTBDO는, mdh(서열 번호 7: 메탄올 탈수소 효소), HPS(서열 번호 8: 3-헥실로스-6인산 합성 효소), PHI(서열 번호 9: 3-헥실로스-6-인산 이성화 효소), SucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 발현시킨다.
- [0160] 컨트롤 벡터로서, pHTBDO가 코딩하는 상기 7개의 효소군으로부터 MDH를 제외한 발현 벡터 pHTMDH(-)를 구축하였다. 또한, pHTBDO가 코딩하는 상기 7개의 효소군으로부터 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자인 SucD, 4HBd, abfT 및 adhE2를 제외한 발현 벡터 pHTBDO(-)를 제작하였다.
- [0161] MoBiTec사 매뉴얼 「바실루스 서브틸리스 발현 벡터(Bacillus subtilis Expression Vectors)」에 따라, 각 발현 벡터를 바실루스 서브틸리스에 도입하여, 재조합체(재조합 세포)를 제작하였다. 이에 의해, 발현 벡터 pHTBDO를 유지하는 BSBDO주, 발현 벡터 pHTMDH(-)를 유지하는 BSMDH(-)주 및 발현 벡터 pHTBDO(-)를 유지하는 BSBDO(-)주를, 각각 제작하였다.
- [0162] 각 재조합체를, 100mL의 메탄올 자화 유도 배지(메탄올 10mL, 인산암모늄 3g, 염화칼륨 1g, 황산마그네슘 $\cdot$ 7수화물 0.1g, 효모 엑기스 0.5g, 0.01mM IPTG 및 클로람페니콜 5mg을, 1L의 수돗물 중에 포함함)에서, 호기적으로

37℃로 배양액의 OD600이 1.5로 될 때까지 배양하였다. 배양 종료 후, 배양 상청을 원심 분리에 의해 얻고, LC/MS에 의해 분석하였다.

[0163] 그 결과, BSBDO주에서는, 1,4-BDO가 유의하게 검출되고, 그 농도는 9mM(10D600당 6mM)이었다. 한편, BSBDO(-)주에서는 1,4-BDO는 검출되지 않았다. 또한, MDH를 갖지 않는 BSMDH(-)주는 거의 생육되지 않았다.

[0164] 이상으로부터, 비메틸로트로프인 바실루스 서브틸리스에 MDH 유전자, HPS 유전자 및 PHI 유전자를 도입함으로써, 메탄올을 주요 탄소원하는 배지에서 효율적으로 생육시키는 것이 가능하고, 또한 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터(서열 번호 6)를 도입함으로써, 효율적으로 1,4-BDO가 생성되는 것을 알 수 있다.

[0165] 실시예 3

[0166] 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자가 도입된, 세린 경로를 갖는 메틸로트로프의 제작과, 재조합체에 의한 메탄올로부터의 1,4-BDO의 생산

[0167] 본 실시예에서는, 세린 경로를 갖는 메틸로트로프로서, 메틸로박테리움 엑스토르킨스(ATCC 55366)를 사용하였다.

[0168] 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터인 서열 번호 10의 인공 합성 유전자(6922 bp)를 구축하였다. 해당 유전자 클러스터는, SucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 포함한다.

[0169] 서열 번호 10의 인공 합성 유전자를 pUC119의 HindIII/XbaI 절단 부위에 클로닝하였다. 해당 플라스미드를 대량 제조한 후, HindIII 및 XbaI로 절단하고, 삽입 유전자를 회수하였다. 회수한 본 유전자를 광역 벡터 pCM80(Marx CJ. et al., Microbiology 2001, 147, 2065-2075)의 HindIII/XbaI 사이트에 도입하여, pC80BDO를 제작하였다. 본 벡터는, SucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 발현시킨다. 또한, 각 효소 유전자의 코돈 개변으로서, UUA(Leu)는 UUG(Leu)로, AUA(Ile)는 AUC(Ile)로 변환되었다. 발현 벡터 pC80BDO를 일렉트로포레이션에 의해 엠. 엑스토르킨스(*M. extorquens*)에 도입하여, ME-BDO주를 얻었다. 컨트롤로서, 발현 벡터 pCM80을 일렉트로포레이션에 의해 엠. 엑스토르킨스에 도입하여, ME-CM80주를 얻었다.

[0170] ME-BDO주 또는 ME-CM80주를, 메탄올을 유일한 탄소원으로 하는 합성 B 배지(1L당 H₃PO₄ 18g, K₂SO₄ 14.28g, KOH 3.9g, CaSO₄·2H₂O 0.9g, MgSO₄·7H₂O 11.7g, CuSO₄·5H₂O 8.4mg, KI 1.1mg, MnSO₄·H₂O 4.2mg, NaMoO₄·2H₂O 0.3mg, H₃BO₃ 0.03mg, CoCl₂·6H₂O 0.7mg, ZnSO₄·7H₂O 28mg, FeSO₄·7H₂O 91mg, 비오틴 0.28mg, 메탄올 5mL 및 테트라사이클린 10mg을 포함함) 100mL에서, 호기적으로 30℃로 배양하였다. 배양액의 OD600이 1.8로 될 때까지 배양하고, 원심 분리에 의해 배양 상청을 회수하였다. 회수한 배양 상청을 LC/MS에 의해 분석하였다.

[0171] 그 결과, ME-BDO주에서 1,4-BDO가 검출되고, 그 농도는 11mM(10D600당 6.2mM)이었다. 한편, ME-CM80주에서는 1,4-BDO는 검출되지 않았다.

[0172] 이상으로부터, 세린 경로를 갖는 메틸로트로프에, 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터(서열 번호 10)를 도입함으로써, 메탄올로부터의 효율적인 1,4-BDO의 생산이 가능한 것이 나타났다.

[0173] 실시예 4

[0174] RuMP 경로를 갖는 메틸로트로프로의 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자의 도입과, 재조합체를 사용하는 메탄올로부터의 1,4-BDO의 생산

[0175] 본 실시예에서는, RuMP 경로를 갖는 메틸로트로프로서, 메틸로필루스 메틸로트로푸스(*Methylophilus methylotrophus*)(ATCC 53528)를 사용하였다.

[0176] 실시예 3에서 제작한 pC80BDO를 일렉트로포레이션에 의해 엠.메틸로트로푸스(*M. methylotrophus*)에 도입하여, MM-BDO주를 얻었다. 컨트롤로서, pCM80을 일렉트로포레이션에 의해 엠.메틸로트로푸스에 도입하여, MM-CM80주를 얻었다.

[0177] MM-BDO주 또는 MM-CM80주를, 실시예 3에서 사용한 메탄올을 유일한 탄소원으로 하는 합성 B 배지(단, 메탄올 농도는 1%(v/v)로 함) 100mL에서, 호기적으로 37℃로 배양하였다. 배양액의 OD600이 1.8-2.0인 시점에서, 원심

분리에 의해 배양 상청을 회수하였다. 배양 상청을 LC/MS에 의해 분석하였다. 그 결과, MM-BDO주에서는, 1,4-BDO가 검출되었지만, MM-80주에서는 검출되지 않았다. MM-BDO주에 의해 생성된 1,4-BDO의 축적 농도는 15mM(10D600당 8.3mM)이었다.

[0178] 이상으로부터, RuMP 경로를 갖는 메틸로트로프에, 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터(서열 번호 10)를 도입함으로써, 메탄올로부터의 효율적인 1,4-BDO의 생산이 가능한 것이 나타났다.

[0179] 실시예 5

[0180] 대장균으로의 메탄올 데히드로게나아제(MDH) 유전자, HPS 유전자, PHI 유전자 및 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자의 도입과, 재조합체에 의한 메탄올로부터 1,4-BDO의 생산

[0181] 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터인 서열 번호 11의 인공 합성 유전자(9123 bp)를 구축하였다. 해당 유전자 클러스터는, mdh(서열 번호 7: 메탄올 탈수소 효소), HPS(서열 번호 8: 3-핵술로스-6인산 합성 효소), PHI(서열 번호 9: 3-핵술로스-6-인산 이성화 효소), SucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 포함한다.

[0182] 서열 번호 11의 인공 합성 유전자를, pTrc99A 벡터의 NcoI/HindIII 절단 부위에 클로닝하여, pTrcMeBDO를 제작하였다. pTrcMeBDO는, mdh(서열 번호 7: 메탄올 탈수소 효소), HPS(서열 번호 8: 3-핵술로스-6인산 합성 효소), PHI(서열 번호 9: 3-핵술로스-6-인산 이성화 효소), SucD(서열 번호 2: CoA 의존형 숙신산세미알데히드 탈수소 효소), 4HBd(서열 번호 3: 4-히드록시부티르산 탈수소 효소), abfT(서열 번호 4: 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소) 및 adhE2(서열 번호 5: 알데히드/알코올 탈수소 효소 2)의 각 유전자를 발현시킨다.

[0183] 컨트롤 벡터로서, pTrcMeBDO가 코딩하는 상기 7개의 효소군으로부터 MDH를 제외한 발현 벡터 pTrcMDH(-)를 구축하였다. 또한, pTrcMeBDO가 코딩하는 상기 7개의 효소군으로부터 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자인 SucD, 4HBd, abfT 및 adhE2를 제외한 발현 벡터 pTrcBDO(-)를 제작하였다.

[0184] 발현 벡터 pTrcMeBDO, pTrcMDH(-) 또는 pTrcBDO(-)를 대장균 K12주에 도입하여, 각각 EKMeBDO주, EKMDH(-)주 및 EKBDO(-)주를 얻었다.

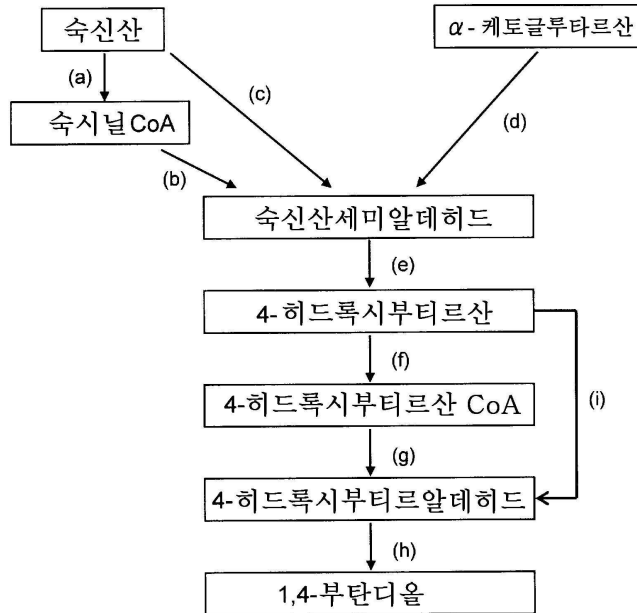
[0185] 각각의 재조합 대장균을, 0.05mM 농도의 IPTG를 함유하는 메탄올 자화 합성 C 배지(1L당 H_3PO_4 18g, K_2SO_4 14.28g, KOH 3.9g, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.9g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 11.7g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 8.4mg, KI 1.1mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 4.2mg, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.3mg, H_3BO_3 0.03mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.7mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 28mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 91mg, 비오틴 0.28mg, 메탄올 5mL, 클로람페니콜 34mg 및 암피실린 100mg을 포함함) 100mL에서, 호기적으로 37°C로 배양하였다. 배양액의 OD600이 1.0-1.6인 시점에서, 원심부 분리에 의해 배양 상청을 회수하였다.

[0186] 회수된 배양 상청을 LC/MS에 의해 분석한 바, EKMeBDO주에서는 1,4-BDO가 11mM(10D600당 6.9mM) 생성하고 있었지만, EKBDO(-)주에서는 거의 검출되지 않았다. 또한, EKMDH(-)주는 전혀 생육되지 않았다.

[0187] 이상으로부터, 비메틸로트로프인 대장균에 MDH 유전자, HPS 유전자 및 PHI 유전자를 도입함으로써, 메탄올을 주요 탄소원하는 배지에서 효율적으로 생육시키는 것이 가능하고, 또한 1,4-BDO 생합성 관련 효소 유전자 클러스터(서열 번호 11)를 도입함으로써, 효율적으로 1,4-BDO가 생성되는 것을 알 수 있었다.

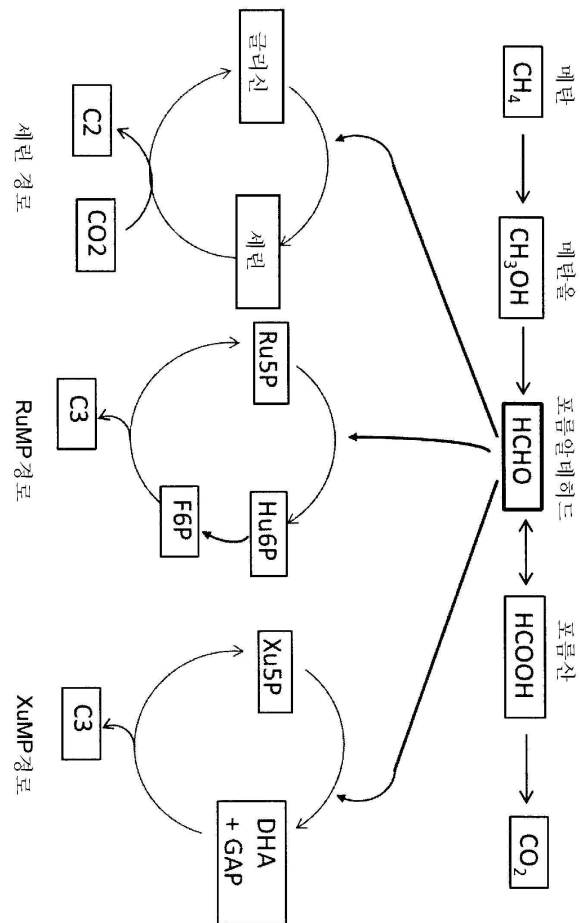
도면

도면1



- (a) 숙시닐 CoA 합성효소 (Succinyl-CoA synthetase)
 (b) CoA 의존형 숙신산세미알데히드탈수소 효소 (CoA-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase)
 (c) 숙신산세미알데히드탈수소 효소 (Succinate semialdehyde dehydrogenase)
 (d) 2-옥소글루타르산탈탄산 효소 (2-oxoglutarate decarboxylase)
 (e) 4-히드록시부티르산탈수소 효소 (4-hydroxybutyrate dehydrogenase)
 (f) 4-히드록시부티르산 CoA 전이 효소 (4-hydroxybutyryl-CoA transferase)
 (g) 4-히드록시부티르산 CoA 환원 효소 (4-hydroxybutyryl-CoA reductase)
 (h) 알코올 탈수소효소 (Alcohol dehydrogenase)
 (i) 4-히드록시부티르알데히드탈수소 효소 (4-hydroxybutyraldehyde dehydrogenase)

도면2



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Sekisui Chemical Co., Ltd.

[illegible]

<130> 14P00042

<150> JP2013-008810

<151> 2013-01-21

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 7773

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic gene cluster for 1,4-BDO synthesis in *Pichia pastolis*

<400> 1

cccgggacca tgggtaatga agtatctata aaagaattaa ttgaaaaggc aaaggtggca	60
caaaaaaaaaa ttggaagccta tagtcaagaa caagttgatg tactagtaaa agcactagga	120
aaagtgggttt atgataatgc agaaatgttt gcaaaagaag cagttgaaga aacagaaatg	180
ggtgttttatg aagataaagt agctaaatgt catttgaaat caggagctat ttggaatcat	240
ataaaagaca agaaaactgt aggcataata aaagaagaac ctgaaagggc acttgtttat	300
gttgctaagc caaagggagt tgtggcagct actacgccta taactaatcc agtggttaact	360
cctatgtgta atgcaatggc tgctataaag ggcagaaata caataatagt agcaccacat	420
cctaaagcaa agaaagtttc agtcataact gtagaactta tgaatgctga gcttaaaaaa	480
ttgggagcac cagaaaatat catacagata gtagaagcac catcaagaga agctgctaag	540
gaacttatgg aaagtgtga ttagtttatt gctacaggcg gtgctggaag agttaagct	600
gcttactcca gtggaagacc agcttatggc gttggacctg gaaattcaca ggtaaatagt	660
gataagggat acgattataa caaagctgca caggatataa taacaggaag aaaatatgac	720
aatggaatta tatgttcttc agagcaatca gttatagctc ctgctgaaga ttatgataag	780
gtaatagcag cttttgtaga aaatggggca ttctatgtag aagatgagga aacagtagaa	840
aagtttagat caactttatt taaagatgga aaaataaaca gcaagattat aggtaaatcc	900
gtccaaatta ttgcggatct tgcaggagta aaagtaccag aaggtactaa ggttatagta	960
cttaagggtta aaggtgcagg agaaaaagat gtactttgta aagaaaaaat gtgtccagtt	1020
ttagtagcat tgaaatatga tacttttgaa gaagcagttg aaatagctat ggctaattat	1080
atgtatgaag gagctggta tacagcaggc atacattctg acaatgacga gaacataaga	1140
tatgcaggaa ctgtattacc tataagcaga ttagttgtaa atcagcctgc aactactgct	1200
ggaggaagtt tcaataatgg atttaaccct actactacac taggctgcgg atcatggggc	1260
agaaacagta tttcagaaaa tcttacttac gagcatctta taaatgtttc aagaataggg	1320
tatttcaata aagaagcaaa agttcctagc tatgaggaaa tatggggatg atgattctta	1380
aataaacaat acttaaaaca tttgaggagg tcttgtaaac accatggaac ttttcaaact	1440
caagagtgtg acacatcact ttgacacttt tgcagaattt gccaaggaat tctgtcttgg	1500
agaacgcgac ttggtaatta ccaacgagtt catctatgaa ccgtatatga aggcatgcca	1560
gctcccctgc cattttgta tgcaggagaa atatgggcaa ggcgagcctt ctgacgaaat	1620
gatgaataac atcttggcag acatccgtaa tatccagttc gaccgcgtaa tcggtatcgg	1680
aggaggtacg gttattgaca tctctaaact tttcgttctg aaaggattaa atgatgtact	1740

cgatgcattc gaccgcaaaa tacctcttat caaagagaaa gaactgatca ttgtgccac 1800

aacatgcgga acgggtagcg aggtgacgaa catttctatc gcagaaatca aaagccgtca 1860

cacaaaaatg ggattggctg acgatgcat tgttgagac catgcatca tcatacctga 1920

acttctgaag agcttgctt tccacttcta cgcatgcagt gcaatcgatg ctcttatcca 1980

tgccatcgag tcatacgtat ctctaaagc cagtcctat tctcgtctgt tcagtggagc 2040

ggcttgggac attatcctgg aagtattcaa gaaatcgcc gaacacggcc ctgaataccg 2100

cttcgaaaag ctgggagaaa tgatcatggc cagcaactat gccggtatag ccttcggaaa 2160

tgcaggagta ggagccgtcc acgcactatc ctaccgttg ggaggcaact atcacgtgcc 2220

gcattggagaa gcaactatc agttcttcac agaggattc aaagtatacc aaaagaagaa 2280

tcctttcggc tatatagtcg aactcaactg gaagctctcc aagatactga actgccagcc 2340

cgaatacgtat tatccgaagc tggatgaact tctcggatgc ctcttacca agaaaccttt 2400

gcacgaatac ggcatgaagg acgaagaggt aagaggcttt gcggaatcag tgcttaagac 2460

acagcaaaga ttgctcgcca acaactacgt agagcttact gtagatgaga tcgaaggtat 2520

ctacagaaga ctctactgat gaccttagac atgactgttc ctcagttcaa gttgggcact 2580

tacgagaaga ccggtcttgc tagattctaa tcaagaggat gtcagaatgc catttgccctg 2640

agagatgcag gcttcatttt tgatactttt ttatttgtaa cctatatagt ataggatttt 2700

ttttgtcatt ttgtttcttc tcgtacgagc ttgtcctga tcagcctatc tcgcagctga 2760

tgaatatctt gtggtagggg tttgggaaaa tcattcgagt ttgatgtttt tcttgggtatt 2820

tccactcct cttcagagta cagaagatta agtgagaagt tcgtttgtgc aagcttagat 2880

ctaactcca aagacgaaag gttgaatgaa acctttttgc catccgacat ccacaggtcc 2940

attctcacac ataagtcca aacgcaacag gaggggatac actagcagca gaccgttgca 3000

aacgcaggac ctccactcct cttctcctca acacccactt ttgccatcga aaaaccagcc 3060

cagttatttg gcttgatttg agtcgctca ttccaattcc ttctattagg ctactaacac 3120

catgacttta ttagcctgtc tatcctggcc cccctggcga ggttcattgt tgtttatttc 3180

cgaatgcaac aagctccgca ttacaccga acatcactcc agatgagggc tttctgagtg 3240

tggggtcaaa tagtttcatt ttcccaaat ggcccaaac tgacagttta aacgtgtct 3300

tggaaacctaa tatgacaaaa gcgtgatctc atccaagatg aactaagttt ggttcgttga 3360

aatgctaacg gccagtttgt caaaaagaaa ctccaaaag tcgccatacc gtttgtcttg 3420

tttggatttg attgacgaat gctcaaaaat aatctcatta atgcttagcg cagtctctct 3480

atcgcttctg aaccccggtg cacctgtgcc gaaacgcaaa tggggaaaca cccgcttttt 3540
ggatgattat gcattgtctc cacattgtat gcttccaaga ttctggtggg aatactgctg 3600
atagcctaac gttcatgac aaaatttaac tgttctaacc cctacttgac agcaatatat 3660
aaacagaagg aagctgcctt gtcttaaac tttttttta tcatcattat tagcttactt 3720
tcataattgc gactgggtcc aattgacaag cttttgattt taacgacttt taacgacaac 3780
ttgagaagat caaaaaacaa ctaattattc gaaacatgg aagttacaaa tcaaaaagaa 3840
ctaaaacaaa agctaaatga attgagagaa gcgcaaaaga agtttgcaac ctatactcaa 3900

gagcaagttg ataaaatttt taaacaatgt gccatagccg cagctaaaga agaataaac 3960
ttagctaaat tagcagtaga agaaacagga ataggctctg tagaagataa aattataaaa 4020
aatcattttg cagcagaata tatatacaat aaatataaaa atgaaaaaac ttgtggcata 4080
atagaccatg acgattcttt aggcataaca aaggttgctg aaccaattgg aattgttgca 4140
gccatagttc ctactactaa tccaacttcc acagcaattt tcaaatcatt aatttcttta 4200
aaaacaagaa acgcaatatt cttttcacca catccacgtg caaaaaaatc tacaattgct 4260
gcagcaaaat taattttaga tgcagctgtt aaagcaggag cacctaaaaa tataataggc 4320

tggatagatg agccatcaat agaactttct caagatttga tgagtgaagc tgatataata 4380
ttagcaacag gaggtccttc aatggttaaa gcggcctatt catctggaaa acctgcaatt 4440
ggtgttgtag caggaaatc accagcaata atagatgaga gtgcagatat agatatggca 4500
gtaagctcca taattttatc aaagacttat gacaatggag taatatgcgc ttctgaacaa 4560
tcaatattag ttatgaattc aatatacgaa aaagttaaag aggaatttgt aaaacgagga 4620
tcataatatac tcaatcaaaa tgaaatagct aaaataaaag aaactatgtt taaaaatgga 4680
gctattaatg ctgacatagt tggaaaatct gcttataaa ttgctaaaat ggcaggaatt 4740

gaagtctctc aaactacaaa gatacttata ggcgaaagtac aatctgttga aaaaagcgag 4800
ctgttctcac atgaaaaact atcaccagta cttgcaatgt ataaagttaa ggattttgat 4860
gaagctctaa aaaaggcaca aaggctaata gaattaggtg gaagtggaca cacgtcatct 4920
ttatatatag attcacaaaa caataaggat aaagttaaag aatttggatt agcaatgaaa 4980
acttaagga catttattaa catgccttct tcacaggag caagcggaga tttatacaat 5040
tttgcgatag caccatcatt tactcttga tgcggcactt ggggaggaaa ctctgtatcg 5100
caaaatgtag agcctaaaca tttattaaat attaaaagtg ttgctgaaag aagggaaaat 5160

atgcttttgt ttaaagtgcc acaaaaaata tattttaaat atggatgtct tagatttgca 5220
ttaaagaat taaaagatat gaataagaaa agagccttta tagtaacaga taaagatctt 5280
tttaacttg gatattgtta taaaataaca aaggtactag atgagataga tattaatac 5340

agtatattta cagatattaa atctgatcca actattgatt cagtaaaaaa aggtgctaaa 5400
 gaaatgctta actttgaacc tgatactata atctctattg gtggtggatc gccaatggat 5460
 gcagcaaagg ttatgcactt gttatatgaa tatccagaag cagaaattga aaatctagct 5520
 ataaacttta tggatataag aaagagaata tgcaatttcc ctaaattagg taaaaaggcg 5580

 atttcagtag ctattcctac aactgctggg accggttcag aggcaacacc ttttcagtt 5640
 ataactaatg atgaacagg aatgaaatac ctttaactt cttatgaatt gaccccaaac 5700
 atggcaataa tagatactga attaatgtta aatatgccta gaaaattaac agcagcaact 5760
 ggaatagatg cattagtcca tgctatagaa gcatatgttt cggttatggc tacggattat 5820
 actgatgaat tagccttaag agcaataaaa atgatattta aatatttgcc tagagcctat 5880
 aaaaaaggga ctaacgacat tgaagcaaga gaaaaaatgg cacatgcctc taatattgcg 5940
 gggatggcat ttgcaaatgc tttcttaggt gtatgccatt caatggctca taaacttggg 6000

 gcaatgcac acgttcaca tggaattgct tgtgctgtat taatagaaga agttattaaa 6060
 tataacgcta cagactgtcc aacaaagcaa acagcattcc ctcaatataa atctccta 6120
 gctaagagaa aatatgctga aattgcagag tatttgaatt taaagggtac tagcgatacc 6180
 gaaaaggtaa cagccttaat agaagctatt tcaaagttaa agatagattt gagtattcca 6240
 caaaatataa gtgccgtgg aataaataaa aaagattttt ataatacgt agataaaatg 6300
 tcagagcttg cttttgatga ccaatgtaca acagctaata ctaggtatcc acttataagt 6360
 gaacttaagg atatctatat aaaatcattt tgatgattct taaataaaca atacttaaaa 6420

 catttgagga ggtctttaa acaccatgga ttggaagaag atctatgaag acagaacatg 6480
 cactgcagat gaagcagtaa agagcattaa gtcaggtgac agagtgtat ttgcgcactg 6540
 tgttgctgaa ccgccagttc ttgtagaagc aatggttgcg aatgcagctg catacaagaa 6600
 tgtaacgggt tcacacatgg ttacccttgg aaagggtgaa tactcaaaac cagaatataa 6660
 ggaaaacttt acttttgaag gttggtttac aagcccttca acaagaggat ccattgcaga 6720
 aggacacgga cagtttgcc ctgtattctt ccacgaggta ccatctttaa tcagaaaaga 6780
 cattttccat gttgatgtat tcatggtaat ggtatccct ccagatcata acgattctg 6840

 ctgtgtgggt gtatcttctg actatacgt gcaggtatc aaatcagcaa aaattgtact 6900
 tgctgaagta aatgatcagg tactgtagt ttatggagat acatttgttc acgttagtga 6960
 aatcgacaag ttcttagaaa cttcacatcc acttccagaa atcggacttc ctaagatcgg 7020
 tgaagtagaa gctgctattg gtaagcactg cgcttccta atcgaagatg gttccacatt 7080
 acagcttggg atcggagcta ttccggatgc tgtactttca cagcttaagg acaagaaaca 7140
 ccttggtatc cactctgaaa tgatttccga cggtgttgta gatctttacg aagcaggcgt 7200

tatagactgc agccaaaagt ctatcgacaa aggcaaaatg gcaataacat tcttaatggg 7260

aacgaagaga ctttatgatt tcgctgcaaa caatccaaag gttgaattaa agccggttga 7320

ctacataaat catccatctg tagttgcaca gtgctccaaa atggtttgca tcaatgcttg 7380

cttgaagtt gattttatgg gtcagattgt atccgatagt attgggacaa agcagttctc 7440

aggagtaggc ggtcaggttg acttcgtaag aggtgcatcc atgtctattg acggaaaagg 7500

taaagcgatc atcgcgatgc cttccgttgc aaagaagaag gatggaagta tgatttcgaa 7560

gatcgttcca ttcacgatgc acggtgcagc tgtaactaca tccagaaacg atgcggacta 7620

tgctgtaacg gaatatggta ttgctgaaat gaagggttaag tctttacagg acagagcaag 7680

agcgttaatc aatattgcac accctgattt caaagatgaa ttaaaggctg aatttgaaaa 7740

gagattcaac gcggcattct gatgagcggc cgc 7773

<210> 2

<211> 1362

<212> DNA

<213> Clostridium kluyveri

<400> 2

atgagtaatg aagtatctat aaaagaatta attgaaaagg caaaggtggc acaaaaaaaaa 60

ttggaagcct atagtcaaga acaagttgat gtactagtaa aagcactagg aaaagtggtt 120

tatgataatg cagaaatggt tgcaaaagaa gcagttgaag aaacagaaat ggggtgtttat 180

gaagataaag tagctaaatg tcatttgaaa tcaggagcta tttggaatca tataaaagac 240

aagaaaactg taggcataat aaaagaagaa cctgaaaggg cacttgttta tgttgctaag 300

ccaaaggag ttgtggcagc tactacgcct ataactaatc cagtggtaac tcctatgtgt 360

aatgcaatgg ctgctataaa gggcagaaat acaataatag tagcaccaca tcctaaagca 420

aagaaagttt cagctcatc tgtagaactt atgaatgctg agcttaaaaa attgggagca 480

ccagaaaata tcatacagat agtagaagca ccatcaagag aagctgctaa ggaacttatg 540

gaaagtgtcg atgtagttat tgctacaggc ggtgctggaa gagttaaagc tgcttactcc 600

agtggaagac cagcttatgg cgttggacct ggaaattcac aggtaatagt tgataaggga 660

tacgattata acaaagctgc acaggatata ataacaggaa gaaaatatga caatggaatt 720

atatgttctt cagagcaatc agttatagct cctgctgaag attatgataa ggtaaatagca 780

gctttttagt aaaatggggc attctatgta gaagatgagg aaacagtaga aaagtttaga 840

tcaactttat ttaaagatgg aaaaataaac agcaagatta taggtaaatc cgtccaaatt 900

attcggatc ttgcaggagt aaaagtacca gaaggacta aggttatagt acttaagggt 960

aaaggtgcag gagaaaaaga tgtactttgt aaagaaaaaa tgtgtccagt tttagtagca 1020
 ttgaaatatg atacttttga agaagcagtt gaaatagcta tggctaatta tatgtatgaa 1080

ggagctggtc atacagcagg catacattct gacaatgacg agaacataag atatgcagga 1140
 actgtattac ctataagcag attagtgtga aatcagcctg caactactgc tggaggaagt 1200
 ttcaataatg gatttaaccc tactactaca ctaggctgcg gatcatgggg cagaaacagt 1260
 atttcagaaa atcttactta cgagcatctt ataatgttt caagaatagg gtatttcaat 1320
 aaagaagcaa aagttcctag ctatgaggaa atatggggat aa 1362

<210> 3
 <211> 1116
 <212> DNA
 <213> Porphyromonas gingivalis
 <400> 3

atgcaacttt tcaaactcaa gagtgtgaaca catcactttg acacttttgc agaatttgcc 60

aaggaattct gtcttggaga acgcgacttg gtaattacca acgagttcat ctatgaaccg 120
 tatatgaagg catgccagct cccctgccat tttgttatgc aggagaaata tgggcaaggc 180
 gagccttctg acgaaatgat gaataacatc ttggcagaca tccgtaatat ccagttcgac 240
 cgcgtaatcg gtatcggagg aggtacggtt attgacatct ctaaactttt cgttctgaaa 300
 ggattaaatg atgtactcga tgcattcgac cgcaaaatac ctcttatcaa agagaaagaa 360
 ctgatcattg tgcccacaac atgcggaacg ggtagcgagg tgacgaacat ttctatcgca 420
 gaaatcaaaa gccgtcacac caaatggga ttggctgacg atgccattgt tgcagacat 480

gccatcatca tacctgaact tctgaagagc ttgcctttcc acttctacgc atgcagtga 540
 atcgatgctc ttatccatgc catcgagtca tacgtatctc cttaaagccag tccatattct 600
 cgtctgttca gtgaggcggc ttgggacatt atcctggaag tattcaagaa aatcgccgaa 660
 cacggccctg aataccgctt cgaaaagctg ggagaaatga tcatggccag caactatgcc 720
 ggtatagcct tcggaaatgc aggagtagga gccgtccacg cactatccta cccgttggga 780
 ggcaactatc acgtgccgca tggagaagca aactatcagt tcttcacaga ggtattcaaa 840
 gtatacaaaa agaagaatcc tttcggctat atagtcgaac tcaactggaa gctctccaag 900

atactgaact gccagcccga atacgtatat ccgaagctgg atgaacttct cggatgcctt 960
 cttaccaaga aacctttgca cgaatacggc atgaaggacg aagaggtaag aggctttgcg 1020
 gaatcagtgc ttaagacaca gcaaagattg ctcgccaaca actacgtaga gcttactgta 1080
 gatgagatcg aaggtatcta cagaagactc tactaa 1116

<210> 4

<211> 1317

<212> DNA

<213> Clostridium aminobutyricum

<400> 4

atggattgga agaagatcta tgaagacaga acatgcactg cagatgaagc agtaaagagc 60
attaagtcag gtgacagagt gctatttgcg cactgtgttg ctgaaccgcc agttcttgta 120

gaagcaatgg ttgcaatgc agctgcatac aagaatgtaa cggtttcaca catggttacc 180
cttggaaagg gtgaatactc aaaaccagaa tataaggaaa actttacttt tgaaggttgg 240
tttacaagcc cttcaacaag aggatccatt gcagaaggac acggacagtt tgtccctgta 300
ttcttccacg aggtaccatc tttaatcaga aaagacattt tccatgttga tgtattcatg 360
gtaatggtat cccctccaga tcataacgga ttctgctgtg tgggtgtatc ttctgactat 420
acgatgcagg ctatcaaac agcaaaaatt gtacttgctg aagtaaatga tcaggtacct 480
gtagtttatg gagatacatt tgttcacgtt agtgaaatcg acaagttcgt agaaacttca 540

catccacttc cagaaatcgg acttcctaag atcgggtgaag tagaagctgc tattggttaag 600
cactgcgctt ccctaatega agatgggtcc acattacagc ttggtatcgg agctattccg 660
gatgctgtac tttcacagct taaggacaag aaacaccttg gtatccactc tgaaatgatt 720
tccgacggtg ttgtagatct ttacgaagca ggcgttatag actgcagcca aaagtctatc 780
gacaaaggca aaatggcaat aacattctta atgggaacga agagacttta tgatttcgct 840
gcaaaacaac caaaggttga attaaagccg gttgactaca taaatcatcc atctgtagtt 900
gcacagtgct ccaaaatggt ttgcatcaat gcttgcttgc aagttgattt tatgggtcag 960

attgtatccg atagtattgg gacaaagcag ttctcaggag taggcggtca ggttgacttc 1020
gtaagagggtg catcatgtc tattgacgga aaaggtaaag cgatcatcgc gatgccttcc 1080
gttgcaaaga agaaggatgg aagtatgatt tcgaagatcg ttccattcat cgatcacggt 1140
gcagctgtaa ctacatccag aaacgatcgc gactatgtcg taacggaata tggatttgct 1200
gaaatgaagg gtaagtcttt acaggacaga gcaagagcgt taatcaatat tgcacacct 1260
gatttcaaag atgaattaaa ggctgaattt gaaaagagat tcaacgcggc attctaa 1317

<210> 5

<211> 2577

<212> DNA

<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 5

atgaaagtta caaatcaaaa agaactaaaa caaaaagctaa atgaattgag agaagcgcaa	60
aagaagtttg caacctatac tcaagagcaa gttgataaaa tttttaaaca atgtgccata	120
gccgcagcta aagaagaat aaacttagct aaattagcag tagaagaaac aggaataggt	180
ctttagaag ataaaattat aaaaaatcat ttgcagcag aatatatata caataaatat	240
aaaaatgaaa aaacttgtgg cataatagac catgacgatt ctttaggcat aacaaagggt	300
gctgaaccaa ttggaattgt tgcagccata gttcctacta ctaatccaac ttccacagca	360
attttcaaat cattaatttc tttaaaaaca agaaacgcaa tattcttttc accacatcca	420
cgtgcaaaaa aatctacaat tgctgcagca aaattaattt tagatgcagc tgttaaagca	480
ggagcaccta aaaatataat aggcctggata gatgagccat caatagaact ttctcaagat	540
ttgatgagtg aagctgatat aatattagca acaggaggctc cttcaatggt taaagcggcc	600
tattcatctg gaaaacctgc aattggtgtt ggagcaggaa atacaccagc aataatagat	660
gagagtgcag atatagatat ggagtaagc tccataattt tatcaaagac ttatgacaat	720
ggagtaatat gcgcttctga acaatcaata ttagttatga attcaatata cgaaaaagtt	780
aaagaggaat ttgtaaaacg aggatcatat atactcaatc aaaatgaaat agctaaaata	840
aaagaaacta tgtttaaaaa tggagctatt aatgctgaca tagttggaaa atctgcttat	900
ataattgcta aaatggcagg aattgaagtt cctcaacta caaagatact tataggcgaa	960
gtacaatctg ttgaaaaaag cgagctgttc tcacatgaaa aactatcacc agtacttgca	1020
atgtataaag ttaaggattt tgatgaagct ctaaaaaagg cacaaaggct aatagaatta	1080
ggtggaagtg gacacacgtc atctttatat atagattcac aaaacaataa ggataaagtt	1140
aaagaatttg gattagcaat gaaaacttca aggacattta ttaacatgcc ttcttcacag	1200
ggagcaagcg gagatttata caattttgcg atagcaccat catttactct tggatgcggc	1260
acttggggag gaaactctgt atcgcaaat gtagagccta aacatttatt aaatattaaa	1320
agtgttgctg aaagaaggga aaatatgctt tggtttaaag tgccacaaaa aatatatttt	1380
aaatatggat gtcttagatt tgcattaaaa gaattaaaag atatgaataa gaaaagagcc	1440
tttatagtaa cagataaaga tctttttaaa cttggatatg ttaataaaat aacaaaggta	1500
ctagatgaga tagatattaa atacagtata ttacagata ttaaatctga tccaactatt	1560
gattcagtaa aaaaagggtc taaagaaatg cttaactttg aacctgatac tataatctct	1620
attggtggtg gatcgccaat ggatgcagca aaggttatgc acttgttata tgaatatcca	1680
gaagcagaaa ttgaaaatct agctataaac ttatggata taagaaagag aatatgcaat	1740
ttccctaaat taggtacaaa ggcgatttca gtagctattc ctacaactgc tggtagcggt	1800

tcagaggcaa caccttttgc agttataact aatgatgaaa caggaatgaa ataccttta 1860
acttcttatg aattgacccc aaacatggca ataatagata ctgaattaat gttaaataatg 1920
cctagaaaaa taacagcagc aactggaata gatgcattag ttcattgctat agaagcatat 1980
gtttcggtta tggtacgga ttatactgat gaattagcct taagagcaat aaaaatgata 2040
tttaaataatt tgcctagagc ctataaaaat gggactaacg acattgaagc aagagaaaaa 2100

atggcacatg cctctaatat tgcggggatg gcatttgcaa atgctttctt aggtgtatgc 2160
cattcaatgg ctcataaact tggggcaatg catcacgttc cacatggaat tgcttgtgct 2220
gtattaatag aagaagttaa taaatataac gctacagact gtccaacaaa gcaaacagca 2280
ttccctcaat ataaatctcc taatgctaag agaaaatag ctgaaattgc agagtatttg 2340
aatttaaagg gtactagcga taccgaaaag gtaacagcct taatagaagc tatttcaaag 2400
ttaagatag atttgagtat tccacaaaat ataagtgccg ctggaataaa taaaaaagat 2460
ttttataata cgctagataa aatgtcagag cttgcttttg atgaccaatg tacaacagct 2520

aatcctaggt atccacttat aagtgaactt aaggatatct atataaaatc attttaa 2577

<210> 6

<211> 10600

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic gene cluster for methanol-utilization and 1,4-BDO synth
esis in *Bacillus subtilis*

<400> 6

tctagaatga caaacttttt cattccacca gccagcgtaa ttggacgagg tgcagtaaag 60
gaagtaggaa caagacttaa gcaaattgga gctaagaaag cgcttatcgt tacagatgca 120
tttcttcata gcacaggttt atctgaagaa gttgctaaaa acattcgtga agctggcctt 180
gatgttgca ttttccaaa agctcaacca gatccagcag atacacaagt tcatgaaggt 240

gtagatgtat tcaaacaaga aaactgtgat gcacttggtt ctatcggtgg aggtagctct 300
cacgatacag ctaaagcaat cggtttagtt gcagcaaacg gcggaagaat caatgactat 360
caaggtgtaa acagtgtaga aaaaccagtc gttccagtag ttgcaatcac tacaacagct 420
ggtactggta gtgaacaac atctcttgca gttattacag actctgcacg taaagtaaaa 480
atgcctgta ttgatgagaa aattactcca actgtagcaa ttgttgaccc agaattaatg 540
gtgaaaaaac cagctggatt aacaatcgca actggtatgg acgcattatc acacgcaatt 600
gaagcatatg ttgcaaaagg tgctacacca gttactgatg catttgcaat tcaagcaatg 660

aaactcatca atgaatactt accaaaagcg gtggcaaacg gagaagacat cgaagcacgt	720
gaagcaatgg cttatgcaca atacatggca ggagtggcat ttaacaacgg tggtttagga	780
ttagtacact ctatttctca ccaagtaggt ggagtttaca aattacaaca cggaatctgt	840
aactcagtta atatgccaca cgtttgcgca ttcaacctaa ttgctaaaac tgagcgcttc	900
gcacacattg ctgagctttt aggcgagaat gtttctggct taagcactgc agcagctgct	960
gagagagcaa ttgtagcgt tgaacgctat acaaaaaact tcggtatccc atctggctat	1020
gcagaaatgg gcgtgaaaga agaggatata gaattattag cgaaaaacgc attcgaagac	1080
gtatgtactc aaagcaaccc acgtgttgct acagttcaag acattgcaca aatcatcaaa	1140
aacgctctgt tgatgattct taaataaaca atacttaaaa catttgagga ggtcttgtaa	1200
acatggcatt gacacaaatg gcattagatt cactggattt cgacgcaact gttgcgctgg	1260
ctgaaaaggt agctccacac gttgacattc ttgaaatcgg tacacatgc atcaagcaca	1320
acggtatcaa gttgctggaa actctgcgcg caaagttccc taacaacaag atcctggttg	1380
acctgaagac tatggatgct ggcttctacg aagctgagcc ttctacaag gctggtgctg	1440
atatcactac cgttctgggc gtagctgata tgggtacaat caaaggcgta atcgacgctg	1500
ctaacaagta cggcaagaag gcacagatcg acctgatcaa tgttggtgat aaggctgctc	1560
gtactaagga agttgctaag ctggcgcgcg acatcattgg cgttcacact ggtctggacc	1620
aacaagctgc tggtaaaact ccttttgctg acctggcaac tgtaactggc ctgaacctgg	1680
gtctggaagt ttccgtagct ggtggtgta agcctgctac tgttgacaa gttaaagacg	1740
ctggtgctac catcatcgtc gctggcgctg ctatctacgg tgctgctgac ccagctgctg	1800
ctgctgctga aatcactggc ctggctaagt gatgattctt aaataaaca tacttaaaac	1860
atttgaggag gtcttgtaaa catgaacaaa tatcaagagc tcgtggtcag caagctgacc	1920
aatgttatca ataacactgc agaaggctat gacgacaaga ttttgagtct agtcgatgca	1980
gccggccgta catttatcgg tggctgctggc cgttccttgc tggtttcccg tttctttgca	2040
atgcgcttgg tgcattgcagg ttaccaagtt agcatggtcg gtgaagttgt tactccaagt	2100
atccaagctg gtgatctttt cattgtgata tctggctctg gcagcacaga aacctgatg	2160
cctttggtta agaaggcaaa gagccaaggt gccaagatta tcgtgatttc catgaaggct	2220
cagtcaccaaa tggtgaatt ggctgatctg gttgtgccag ttggtggcaa cgatgccaat	2280
gcatttgaca agactcatgg tatgcctatg ggtactatct tcgagttgtc caccctgtgg	2340
ttcctcgaag cgactattgc caagctggta gatcaaaaag gtctgacaga agaaggtatg	2400
cgcgcgattc atgctaacct cgagtatga tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg	2460
tcttgagggg ttttttgag ctcaggcctt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc	2520

ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 2580
ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgccagg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc 2640
aacagctgat tgcctttcac cgctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtcacgctg 2700
gtttgcccc gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggtta acggcgggat ataacatgag 2760

ctgtcttcgg tatcgtcgtat tcccactacc gagatatccg caccaacgcg cagcccggac 2820
tcggtaatgg cgcgcattgc gccacgcgc atctgatcgt tggcaaccag catcgagtg 2880
ggaacgatgc cctcattcag catttgcatg gtttgttgaa aaccggacat ggcaactccag 2940
tcgccttccc gttccgctat cggtgaatt tgattgcgag tgagatattt atgccagcca 3000
gccagacgca gacgcgcga gacagaactt aatgggccc ctaacagcgc gatttgctgg 3060
tgacccaatg cgaccagatg ctccacgccc agtcgcgtac cgtcttcatg ggagaaaata 3120
atactgttga tgggtgtctg gtcagagaca tcaagaaata acgccggaac attagtgcag 3180

gcagcttcca cagcaatggc atcctggtca tccagcggat agttaatgat cagcccactg 3240
acgcgttgcg cgagaagatt gtgcaccgcc gttttacagg cttcgacgcc gcttcgttct 3300
accatcgaca ccaccacgt ggcacccagt tgatcggcgc gagatttaat cgcgcgaca 3360
atttgcgacg gcgcgtgcag ggccagactg gaggtggcaa cgccaatcag caacgactgt 3420
ttgcccgcca gttgtgtgc cagcgggtg ggaatgtaat tcagctccgc catcgccgt 3480
tccacttttt cccgcgtttt cgcagaaacg tggctggcct gggtcaccac gcgggaaacg 3540
gtctgataag agacaccggc atactctcgc acatcgtata acgttactgg tttcatcaa 3600

atcgtctccc tccgtttgaa tatttgattg atcgtaacca gatgaagcac tctttccact 3660
atccctacag tgttatggct tgaacaatca cgaaacaata attggtacgt acgatctttc 3720
agccgactca aacatcaaat cttacaaatg tagtctttga aagtattaca tatgtaagat 3780
ttaaattgcaa ccgtttttc ggaaggaaat gatgacctcg tttccaccgg aattagcttg 3840
gtaccagcta ttgtaacata atcggtagcg gggtgaaaa gctaaccgaa aaggagcgg 3900
aaaagaatga tgtaagcgtg aaaaattttt tatcttatca cttgaaattg gaaggagat 3960
tctttattat aagaattgtg gaattgtgag cggataacaa ttcccaatta aaggaggaag 4020

gatccatgag taatgaagta tctataaaag aattaattga aaaggcaaag gtgacacaaa 4080
aaaaattgga agcctatagt caagaacaag ttgatgtact agtaaaagca ctaggaaaag 4140
tggtttatga taatgcagaa atgtttgcaa aagaagcagt tgaagaaaca gaaatgggtg 4200
tttatgaaga taaagtagct aaatgtcatt tgaatcagg agctatttgg aatcatataa 4260
aagacaagaa aactgtaggc ataataaaag aagaacctga aagggcactt gtttatgttg 4320
ctaagccaaa gggagtgtg gcagctacta cgcctataac taatccagt gtaactccta 4380

tgtgtaatgc aatggctgct ataaaggcca gaaatacaat aatagtagca ccacatccta 4440

aagcaaagaa agtttcagct catactgtag aacttatgaa tgctgagctt aaaaaattgg 4500

gagcaccaga aaatatcata cagatagtag aagcaccatc aagagaagct gctaaggaac 4560

ttatggaaag tgctgatgta gttattgcta caggcgggtgc tggaagagtt aaagctgctt 4620

actccagtgg aagaccagct tatggcgttg gacctggaaa ttcacaggta atagttagata 4680

agggatacga ttataacaaa gctgcacagg atataataac aggaagaaaa tatgacaatg 4740

gaattatatg ttcttcagag caatcagtta tagctcctgc tgaagattat gataaggtaa 4800

tagcagcttt ttagaaaaat ggggcattct atgtagaaga tgaggaaaca gtagaaaagt 4860

ttagatcaac tttatttaaa gatggaaaaa taaacagcaa gattataggt aaatccgtcc 4920

aaattattgc ggatcttgca ggagtaaaag taccagaagg tactaagggt atagtactta 4980

agggtaaagg tgcaggagaa aaagatgtac tttgtaaaga aaaaatgtgt ccagtttttag 5040

tagcattgaa atatgatact tttgaagaag cagttgaaat agctatggct aattatatgt 5100

atgaaggagc tggcatatac gcaggcatatc attctgacaa tgacgagaac ataagatatg 5160

caggaaactgt attacctata agcagattag ttgtaaatca gcctgcaact actgctggag 5220

gaagtttcaa taatggattt aacctacta ctacactagg ctgcggatca tggggcagaa 5280

acagtatttc agaaaatctt acttacgagc atcttataaa tgtttcaaga atagggtatt 5340

tcaataaaga agcaaaagt cctagctatg aggaatatg gggatgatga ttcttaaata 5400

aacaatactt aaaacatttg aggaggtctt gtaaacatgc aacttttcaa actcaagagt 5460

gtaacacatc actttgacac ttttgagaa tttgccaagg aattctgtct tggagaacgc 5520

gacttggtaa ttaccaacga gttcatctat gaaccgtata tgaaggcatg ccagctcccc 5580

tgccattttg ttatgcagga gaaatatggg caaggcgagc cttctgacga aatgatgaat 5640

aacatcttgg cagacatccg taatatccag ttcgaccgag taatcggtat cggaggaggt 5700

acggttattg acatctctaa acttttcgtt ctgaaaggat taaatgatgt actcgatgca 5760

ttcgaccgca aaatacctct tatcaaagag aaagaactga tcattgtgcc cacaacatgc 5820

ggaacgggta gcgaggtgac gaacatttct atcgagaaa tcaaaagccg tcacacaaaa 5880

atgggatttg ctgacgatgc cattgttgca gaccatgcca tcatcatacc tgaacttctg 5940

aagagcttgc ctttccactt ctacgcatgc agtgcaatcg atgtctttat ccatgccatc 6000

gagtcatacg tatctcctaa agccagtcca tattctcgtc tgttcagtga ggcggttgg 6060

gacattatcc tggaagtatt caagaaaatc gccgaacacg gccctgaata ccgcttcgaa 6120

aagctgggag aaatgatcat ggccagcaac tatgccggtat tagccttcgg aaatgcagga 6180
 gtaggagccg tccacgcact atcctacccg ttgggaggca actatcacgt gccgcatgga 6240
 gaagcaaaact atcagttctt cacagaggta ttcaaagtat accaaaagaa gaatcctttc 6300
 ggctatatag tcgaactcaa ctggaagctc tccaagatac tgaactgccg gcccgaaatc 6360
 gtatatccga agctggatga acttctcgga tgccttctta ccaagaaacc tttgcacgaa 6420
 tacggcatga aggacgaaga ggtaagaggc tttgcggaat cagtgtttaa gacacagcaa 6480
 agattgctcg ccaacaacta cgtagagctt actgtatag agatcgaagg tatctacaga 6540

 agactctact gatgattctt aaataaaca tactttaaac atttgaggag gtcttgtaaa 6600
 catggattgg aagaagatct atgaagacag aacatgcact gcagatgaag cagtaaagag 6660
 cattaagtca ggtgacagag tgctatttgc gactgtgtt gctgaaccgc cagttcttgt 6720
 agaagcaatg gttcgcaatg cagctgcata caagaatgta acggtttcac acatggttac 6780
 ccttggaaag ggtgaatact caaaaccaga atataaggaa aactttactt ttgaagggtg 6840
 gtttacaagc ctttaacaa gaggatccat tgcagaagga cacggacagt ttgtccctgt 6900
 attcttcac gaggtacat ctttaatcag aaaagacatt tccatgttg atgtattcat 6960

 ggtaatggta tccccccag atcataacgg attctgctgt gtgggtgtat cttctgacta 7020
 tacgatgcag gctatcaaat cagcaaaaat tgtacttgct gaagtaaag atcaggtagc 7080
 tgtagtttat ggagatacat ttgttcacgt tagtgaaatc gacaagtgc tagaaacttc 7140
 acatccactt ccagaaatcg gacttcctaa gatcgggtgaa gtagaagctg ctattggtaa 7200
 gcactgcgt tccctaacg aagatggtc cacattacag cttggtatcg gagctattcc 7260
 ggatgctgta ctttcacagc ttaaggacaa gaaacacctt ggtatccact ctgaaatgat 7320
 ttccgacggt gttgtagatc ttacgaagc aggcgttata gactgcagcc aaaagtctat 7380

 cgacaaaggc aaaatggcaa taacattctt aatgggaacg aagagacttt atgatttcgc 7440
 tgcaacaat ccaaagggtg aattaaagcc ggttgactac ataatcatc catctgtagt 7500
 tgcacagtgc tccaaaatgg ttgcatcaa tgcttgcttg caagttgatt ttatgggtca 7560
 gattgtatcc gatagtattg ggacaaagca gttctcagga taggcggtc aggttgactt 7620
 cgtaagaggt gcatccatgt ctattgacgg aaaaggtaaa gcgatcatcg cgatgccttc 7680
 cgttgcaaag aagaaggatg gaagtatgat ttcaagatc gttccattca tcgatcacgg 7740
 tgcagctgta actacatcca gaaacgatgc ggactatgct gtaacggaat atggtattgc 7800

 tgaaatgaag ggtaagtctt tacaggacag agcaagagcg ttaatcaata ttgcacaccc 7860
 tgatttcaaa gatgaattaa aggtgaatt tgaaaagaga ttcaacgcgg cattctgatg 7920
 attcttaaat aaacaatact taaaacattt gaggaggtct tgtaaacatg aaagttacaa 7980

atcaaaaaga actaaaacaa aagctaaatg aattgagaga agcgcaaaag aagtttgcaa	8040
cctatactca agagcaagtt gataaaattt ttaaacaatg tgccatagcc gcagctaaag	8100
aaagaataaa cttagctaaa ttagcagtag aagaacagg aataggtctt gtagaagata	8160
aaattataaa aaatcatttt gcagcagaat atatatacaa taaatataaa aatgaaaaaa	8220
cttgtggcat aatagacat gacgattctt taggcataac aaaggttgct gaaccaattg	8280
gaattgttgc agccatagtt cctactacta atccaacttc cacagcaatt ttcaaatcat	8340
taatttcttt aaaaacaaga aacgcaatat tcttttcacc acatccacgt gcaaaaaaat	8400
ctacaattgc tgcagcaaaa ttaattttag atgcagctgt taaagcagga gcacctaaaa	8460
atataatagg ctggatagat gagccatcaa tagaactttc tcaagatttg atgagtgaag	8520
ctgatataat attagcaaca ggaggtcctt caatggttaa agcggcctat tcatctggaa	8580
aacctgcaat tgggtttgga gcaggaaata caccagcaat aatagatgag agtgcagata	8640
tagatatggc agtaagctcc ataattttat caaagactta tgacaatgga gtaatatgcg	8700
cttctgaaca atcaatatta gttatgaatt caatatacga aaaagttaaa gaggaatttg	8760
taaaacgagg atcatatata ctcaatcaaa atgaaatagc taaaataaaa gaaactatgt	8820
ttaaaaatgg agctattaat gctgacatag ttggaaaatc tgcttatata attgctaaaa	8880
tggcaggaat tgaagttcct caaactacaa agatacttat aggcgaagta caatctgttg	8940
aaaaaagcga gctgtttctc catgaaaaac tatcaccagt acttgcaatg tataaagtta	9000
aggattttga tgaagctcta aaaaaggcac aaaggctaata agaattaggt ggaagtggac	9060
acacgtcatc tttatatata gattcacaaa acaataagga taaagttaaa gaatttggat	9120
tagcaatgaa aacttcaagg acatttatta acatgccttc ttcacaggga gcaagcggag	9180
atttatacaa ttttgcgata gcaccatcat ttactcttgg atgcggcact tggggaggaa	9240
actctgtatc gcaaaatgta gaggctaaac atttattaaa tattaaaagt gttgctgaaa	9300
gaagggaataa tatgctttgg tttaaagtgc cacaaaaaat atattttaaa tatggatgtc	9360
ttagatttgc attaaaagaa ttaaaagata tgaataagaa aagagccttt atagtaacag	9420
ataaagatct ttttaaactt ggatatgtta ataaaataac aaaggtacta gatgagatag	9480
atattaaata cagtatatat acagatatata aatctgatcc aactattgat tcagtaaaaa	9540
aagtgctaa agaaatgctt aactttgaac ctgatactat aatctctatt ggtgggtggat	9600
cgccaatgga tgcagcaaag gttatgcact tgttatatga atatccagaa gcagaaattg	9660
aaaatctagc tataaacttt atggatataa gaaagagaat atgcaatttc cctaaattag	9720
gtacaaaggc gatttcagta gctattccta caactgctgg taccggttca gaggcaacac	9780
cttttgcagt tataactaat gatgaaacag gaatgaaata ccctttaact tcttatgaat	9840

tgaccccaaa catggcaata atagatactg aattaatgtt aaatatgcct agaaaattaa 9900

cagcagcaac tggaatagat gcattagtgc atgctataga agcatatgtt tcggttatgg 9960

ctacggatta tactgatgaa ttagccttaa gagcaataaa aatgatattt aaatatttgc 10020

ctagagccta taaaaatggg actaacgaca ttgaagcaag agaaaaaatg gcacatgcct 10080

ctaattatgc ggggatggca ttgcaaatg ctttcttagg tgtatgcat tcaatggctc 10140

ataaacttgg ggcaatgcat cacgttccac atggaattgc ttgtgctgta ttaatagaag 10200

aagtatttaa atataacgct acagactgtc caacaaagca aacagcattc cctcaatata 10260

aatctcctaa tgctaagaga aaatatgtcg aaattgcaga gtatttgaat ttaaagggtta 10320

ctagcgatgc cgaagaggtta acagccttaa tagaagctat ttcaaagtta aagatagatt 10380

tgagtattcc acaaaatata agtgccgctg gaataataaa aaaagatttt tataatacgc 10440

tagataaaat gtcagagctt gcttttgatg accaatgtac aacagctaata cctagggtatc 10500

cacttataag tgaacttaag gatatttata taaatcatt ttgatgatag cataaccctt 10560

tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt ttgccccggg 10600

<210> 7

<211> 1146

<212> DNA

<213> Bacillus methanolicus

<400> 7

atgacaaaact ttttcattcc accagccagc gtaattggac gaggtgcagt aaaggaagta 60

ggaacaagac ttaagcaaat tggagctaag aaagcgctta tcgttacaga tgcatttctt 120

catagcacag gtttatctga agaagttgct aaaaacattc gtgaagctgg ccttgatgtt 180

gcgattttcc caaaagctca accagatcca gcagatacac aagttcatga aggtgtagat 240

gtattcaaac aagaaaactg tgatgcactt gtttctatcg gtggaggttag ctctcacgat 300

acagctaaag caatcggttt agttgcagca aacggcggaa gaatcaatga ctatcaaggt 360

gtaaacagtg tagaaaaacc agtcgttcca gtagttgcaa tcaactaac agctggtact 420

ggtagtgaaa caacatctct tgcagttatt acagactctg cacgtaaagt aaaaatgcct 480

gttattgatg agaaaattac tccaactgta gcaattgttg acccagaatt aatggtgaaa 540

aaaccagctg gattaacaat cgcaactggt atggacgcat tatcacacgc aattgaagca 600

tatgttgcaa aaggtgctac accagttact gatgcatttg caattcaagc aatgaaactc 660

atcaatgaat acttacaaa agcgggtgca aacggagaag acatcgaagc acgtgaagca 720

atggcttatg cacaatacat ggcaggagtg gcatttaaca acggtgggtt aggattagta 780

cactctatTT ctcaccaagt aggtggagtt tacaattac aacacggaat ctgtaactca 840
 gttaatatgc cacacgtttg cgcattcaac ctaattgcta aaactgagcg cttcgcacac 900

 attgctgagc ttttaggcga gaatgtttct ggcttaagca ctgcagcagc tgctgagaga 960
 gcaattgtag cgcttgaacg ctataacaaa aacttcggta tcccatctgg ctatgcagaa 1020
 atgggcgtga aagaagagga tatcgaatta ttagcgaaaa acgcattcga agacgtatgt 1080
 actcaaagca acccactgtg tgtacagtt caagacattg cacaatcat caaaaacgct 1140
 ctgtaa 1146
 <210> 8
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> *Methylobacterium aminofaciens*
 <400> 8
 atggcattga cacaatggc attagattca ctggatttcg acgcaactgt tgcgctggct 60

 gaaaaggtag ctccacacgt tgacattctt gaaatcggt aacatgcat caagcacaa 120
 ggtatcaagt tgctggaac tctgcgcga aagtcccta acaacaagat cctggttgac 180
 ctgaagacta tggatgctgg cttctacgaa gctgagcctt tctacaaggc tgggtgctgat 240
 atcactaccg tcttgggcgt agctgatctg ggtacaatca aaggcgtaac cgacgctgct 300
 aacaagtacg gcaagaaggc acagatcgac ctgatcaatg ttggtgataa ggctgctcgt 360
 actaaggaag ttgctaagct gggcgcgac atcattggcg ttcacactgg tctggaccaa 420
 caagctgctg gtcaaacctc ttttctgac ctggcaactg taactggcct gaacctgggt 480

 ctggaagttt ccgtagctgg tgggtttaag cctgctactg ttgcacaagt taaagacgct 540
 ggtgctacca tcatcgtcgc tggcgctgct atctacgggt ctgctgaccc agctgctgct 600
 gctgctgaaa tcaactggcct ggctaagtaa 630
 <210> 9
 <211> 546
 <212> DNA
 <213> *Methylobacterium aminofaciens*
 <400> 9
 atgaacaaat atcaagagct cgtggtcagc aagctgacca atgttatcaa taacactgca 60
 gaaggctatg acgacaagat tttgagtcta gtcgatgcag ccggccgtac atttatcggt 120
 ggtgctggcc gttccttctt ggtttcccg ttttttgcaa tgcgcttggg gcatgcaggt 180

taccaagtta gcatggtcgg tgaagttgtt actccaagta tccaagctgg tgatcttttc 240
 atttgtatct ctggctctgg cagcacagaa accctgatgc ctttggttaa gaaggcaaag 300
 agccaaggtg ccaagattat cgtgatttcc atgaaggctc agtccccaat ggctgaattg 360
 gctgatctgg ttgtgccagt tgggtggcaac gatgccaatg catttgacaa gactcatggt 420
 atgcctatgg gtactatttt cgagttgtcc accctgtggt tcctcgaagc gactattgcc 480
 aagctggttag atcaaaaagg tctgacagaa gaaggtagtc gcgcgattca tgctaacctc 540
 gagtaa 546

<210> 10

<211> 6922

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic gene cluster for 1,4-BDO synthesis in *Methylobacterium*
extorquens

<400> 10

aagcttatga gtaatgaagt atctatcaaa gaattgattg aaaaggcaaa ggtggcacia 60
 aaaaaattgg aagcctatag tcaagaacaa gttgatgtac tagtaaaagc actaggaaaa 120
 gtggtttatg ataatgcaga aatgtttgca aaagaagcag ttgaagaaac agaaatgggt 180
 gttttatgaag ataaagtagc taaatgtcat ttgaaatcag gagctatttg gaatcatatc 240
 aaagacaaga aaactgtagg catcatcaaa gaagaacctg aaagggcact tgtttatgtt 300

gctaagccaa agggagtgtt ggcagctact acgcctatca ctaatccagt ggtaactcct 360
 atgtgtaatg caatggctgc tatcaagggc agaaatacaa tcattgtagc accacatcct 420
 aaagcaaaga aagtttcagc tcatactgta gaacttatga atgctgagct taaaaaattg 480
 ggagcaccag aaaatatcat ccagatcgta gaagcaccat caagagaagc tgctaaggaa 540
 cttatggaaa gtgctgatgt agttattgct acaggcgggtg ctggaagagt taaagctgct 600
 tactccagtg gaagaccagc ttatggcgtt ggacctggaa attcacaggt aatcgttgat 660
 aagggatagc attataacaa agctgcacag gatatcatca caggaagaaa atatgacaat 720

ggaattatct gttcttcaga gcaatcagtt atcgctcctg ctgaagatta tgataaggta 780
 atcgagcttt ttgtagaaaa tggggcattc tatgtagaag atgaggaaac agtagaaaag 840
 tttagatcaa ctttgtttta agatggaaaa atcaacagca agattatcgg taaatccgtc 900
 caaattattg cggatcttgc aggagtaaaa gtaccagaag gtactaaggt tatcgtactt 960
 aagggtaaag gtgcaggaga aaaagatgta ctttgtaaag aaaaaatgtg tccagttttg 1020
 gtagcattga aatatgatac ttttgaagaa gcagttgaaa tcgctatggc taattatatg 1080

tatgaaggag ctggtcatac agcaggcatc cattctgaca atgacagaaa catcagatat 1140

gcaggaactg tattacctat cagcagattg gttgtaaatc agcctgcaac tactgctgga 1200

ggaagtttca ataattggatt taaccctact actacactag gctgcggatc atggggcaga 1260

aacagtatit cagaaaaatc tacttacgag catcttatca atgtttcaag aatcgggtat 1320

ttcaataaag aagcaaaaagt tcctagctat gaggaatctt ggggatgatg attcttaaat 1380

aaacaatact taaaacattt gaggaggtct tgtaaacatg caacttttca aactcaagag 1440

tgtaacacat cactttgaca cttttgcaga atttgccaag gaattctgtc ttggagaacg 1500

cgacttggta attaccaacg agttcatcta tgaaccgtat atgaaggcat gccagctccc 1560

ctgccatttt gttatgcagg agaaatatgg gcaaggcgag ccttctgacg aaatgatgaa 1620

taacatcttg gcagacatcc gtaatatcca gttcgaccgc gtaatcggtg tcggaggagg 1680

tacggttatt gacatctcta aacttttctg tctgaaagga ttaaatgatg tactcgatgc 1740

attcgaccgc aaaatccctc ttatcaaaga gaaagaactg atcattgtgc ccacaacatg 1800

cggaaacgggt agcaggttga cgaacatttc tatcgagaa atcaaaagcc gtcacaccaa 1860

aatgggattg gctgacgatg ccattgttgc agaccatgcc atcatcatcc ctgaacttct 1920

gaagagcttg cttttccact tctacgcatg cagtgcatac gatgctctta tccatgccat 1980

cgagtcatac gtatctcta aagccagtcc atattctctg ctgttcagtg aggcggcttg 2040

ggacattatc ctggaagtat tcaagaaaat cgccgaacac ggccctgaat accgcttcga 2100

aaagctggga gaaatgatca tggccagcaa ctatgccggt atgccttctg gaaatgcagg 2160

agtaggagcc gtccacgcac tatctaccc gttgggaggc aactatcacg tgccgcatgg 2220

agaagcaaac tatcagttct tcacagaggt attcaaagta taccaaaaga agaactcttt 2280

cggctatata gtcgaactca actggaagct ctccaagatc ctgaactgcc agcccgaata 2340

cgtatatccg aagctggatg aacttctcgg atgccttctt accaagaaac ctttgcacga 2400

atacggcatg aaggacgaag aggtaaagg ctttgcggaa tcagtgttta agacacagca 2460

aagattgtct gccacaact acgtagagct tactgtatg gagatcgaag gtatctacag 2520

aagactctac tgatgatagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt 2580

ttgcccgtt ggtcgggccc cttcgcgagg gcccgttgac gacaacggtg cgatgggtcc 2640

cggccccggt caagacgatg ccaatacgtt gcgacactac gccttggcac ttttagaatt 2700

gccttatctg cctgataaga aatgtccgac cagctaaaga catcgctcc aatcaaagcc 2760

tagaaaatat aggcgaaggg acgctaataa gtctttcata agaccgca aatctaaaaa 2820

tatccttaga ttcacgatgc ggcaattcgg atgacttcgg agcgagcctg gaacctcaga 2880
 aaaacgtctg agagataccg cggatctcac acaggaaaca gctatgaaag ttacaaatca 2940
 aaaagaacta aaacaaaagc taaatgaatt gagagaagcg caaaagaagt ttgcaaccta 3000
 tactcaagag caagttgata aaatttttaa acaatgtgcc atcgccgag ctaaagaaag 3060
 aatcaacttg gctaaattgg cagtagaaga aacaggaatc ggtctttag aagataaat 3120
 tatcaaaaat cattttgag cagaatatat ctacaataaa tataaaaatg aaaaaacttg 3180
 tggcatcatc gaccatgacg attctttggg catcacaag gttgctgaac caattggaat 3240

tgttgagccc atcgttccta ctactaatcc aacttcaca gcaattttca aatcattgat 3300
 ttctttgaaa acaagaaacg caatcttctt ttcaccacat ccacgtgcaa aaaaatctac 3360
 aattgctgca gcaaaattaa ttttggatgc agctgtttaa gcaggagcac ctaaaaatat 3420
 catcggtcgg atcgatgagc catcaatcga actttctcaa gatttgatga gtgaagctga 3480
 tatcatctta gcaacaggag gtccttcaat ggttaaagcg gcctattcat ctggaaaacc 3540
 tgcaattggt gttggagcag gaaatacacc agcaatcatc gatgagagtg cagatatcga 3600
 tatggcagta agtccatca ttttgtcaaa gacttatgac aatggagtaa tctgcgcttc 3660

tgaacaatca atcttggta tgaattcaat ctacgaaaaa gttaaagagg aatttgtaaa 3720
 acgaggatca tatactctca atcaaatga aatcgctaaa atcaaagaaa ctatgtttaa 3780
 aaatggagct attaattgctg acatcgttgg aaaatctgct tatatcattg ctaaaatggc 3840
 aggaattgaa gttctctaaa ctacaagat ccttatcggc gaagtacaat ctgttgaaaa 3900
 aagcgagctg ttctcacatg aaaaactatc accagtactt gcaatgtata aagttaagga 3960
 ttttgatgaa gctctaaaaa aggcacaaag gctaatacga ttgggtggaa gtggacacac 4020
 gtcatctttg tatatcgatt cacaaaacaa taaggataaa gttaaagaat ttggattggc 4080

aatgaaaact tcaaggacat ttattaacat gccttcttca caggagcaa gcggagattt 4140
 gtacaatttt gcgatcgac catcatttac tcttggatgc ggcaattggg gaggaaactc 4200
 tgtatcgcaa aatgtagagc ctaaacattt gttgaatatt aaaagtgttg ctgaaagaag 4260
 ggaaaatatg ctttggttta aagtccaca aaaaatctat tttaaatatg gatgtcttag 4320
 atttgcattg aaagaattga aagatatgaa taagaaaaga gcctttatcg taacagataa 4380
 agatcttttt aaacttggat atgttaataa aatcacaaag gtactagatg agatcgatat 4440
 taaatacagt atctttacag atattaaatc tgatccaact attgattcag taaaaaagg 4500

tgctaaagaa atgcttaact ttgaacctga tactatcatc tctattggtg gtggatcgcc 4560
 aatggatgca gcaaaggta tgcacttgtt gtatgaatat ccagaagcag aaattgaaaa 4620
 tctagctatc aactttatgg atatcagaaa gagaatctgc aatttccta aattgggtac 4680

aaaggcgatt tcagtagcta ttcctacaac tgctggtacc ggttcagagg caacaccttt	4740
tgcagttatc actaatgatg aaacaggaat gaaataccct ttgacttctt atgaattgac	4800
cccaaacatg gcaatcatcg atactgaatt gatgttgaat atgcctagaa aattgacagc	4860
agcaactgga atcgatgcat tggttcatgc tatcgaagca tatgtttcgg ttatggctac	4920
ggattatact gatgaattgg ccttgagagc aatcaaaatg atctttaaat atttcctag	4980
agcctataaa aatgggacta acgacattga agcaagagaa aaaatggcac atgcctctaa	5040
tattgcgggg atggcatttg caaatgcttt cttgggtgta tgccattcaa tggctcataa	5100
acttggggca atgcatcacg ttccacatgg aattgcttgt gctgtattaa tcgaagaagt	5160
tattaaatat aacgtacag actgtccaac aaagcaaaca gcattccctc aatataaatc	5220
tcctaatact aagagaaaat atgctgaaat tgcagagtat ttgaatttaa agggtagtag	5280
cgataccgaa aaggtaacag ccttgatcga agctatttca aagttgaaga tcgatttgag	5340
tattccacaa aatatcagtg ccgctggaat caataaaaaa gatttttata atacgctaga	5400
taaaaatgca gagcttgctt ttgatgacca atgtacaaca gctaatecta ggtatccact	5460
tatcagtga ctttaaggata tctatatcaa atcattttga tgattcttaa ataacaata	5520
cttaaaacat ttgaggaggt cttgtaaaca tggattgga gaagatctat gaagacagaa	5580
catgcactgc agatgaagca gtaaagagca ttaagtcagg tgacagagtg ctatttgccg	5640
actgtgttgc tgaaccgcca gttctttag aagcaatggt tgcgaatgca gctgcataca	5700
agaatgtaac ggtttcacac atggttaccc ttggaaaggg tgaatactca aaaccagaat	5760
ataaggaaaa ctttactttt gaaggttggt ttacaagccc ttcaacaaga ggatccattg	5820
cagaaggaca cggacagttt gtcctgtat tcttcacga ggtaccatct ttgatcagaa	5880
aagacatttt ccatgttgat gtattcatgg taatggtatc cctccagat cataacggat	5940
tctgctgtgt ggggtgatct tctgactata cgatgcaggc tatcaaatca gcaaaaattg	6000
tacttgctga agtaaatgat caggtagctg tagtttatgg agatacattt gttcacgtta	6060
gtgaaatcga caagttcgta gaaacttcac atccacttcc agaaatcgga cttcctaaga	6120
tcggtgaagt agaagctgct attggttaagc actgcgcttc cctaategaa gatggttcca	6180
cattgcagct tggatcggg gctattccgg atgctgtact ttcacagctt aaggacaaga	6240
aacaccttgg tatccactct gaaatgattt ccgacggtgt tgtagatctt tacgaagcag	6300
gcgttatcga ctgcagccaa aagtcctatc acaaaggcaa aatggcaatc acattcttga	6360
tgggaacgaa gagactttat gatttcgctg caaacaatcc aaaggttgaa ttgaagccgg	6420
ttgactacat caatcatcca tctgtagtgt cacagtgtc caaaatggtt tgcatcaatg	6480
cttgcttgca agttgatttt atgggtcaga ttgtatccga tagtattggg acaaagcagt	6540

tctcaggagt aggcggtcag gttgacttcg taagaggtgc atccatgtct attgacggaa 6600

aaggtaaagc gatcatcgcg atgccttcg ttgcaaagaa gaaggatgga agtatgattt 6660

cgaagatcgt tccattcadc gatcacggtg cagctgtaac tacatccaga aacgatgcgg 6720

actatgtcgt aacggaatat ggtattgctg aaatgaaggg taagtctttg caggacagag 6780

caagagcgtt gatcaatatt gcacaccctg atttcaaaga tgaattgaag gctgaatttg 6840

aaaagagatt caacgcggca ttctgatgat agcataaccc cttggggcct ctaaacgggt 6900

cttgaggggt tttttgtcta ga 6922

<210> 11

<211> 9123

<212> DNA

<213> Artificial

<220

><223> Synthetic gene cluster for 1,4-BDO synthesis in Escherichia coli

<400> 11

ccatggcaaa ctttttcatt ccaccagcca gcgtaattgg acgaggtgca gtaaaggaag 60

taggaacaag acttaagcaa attggagcta agaaagcgct tatcgttaca gatgcatttc 120

ttcatagcac aggtttatct gaagaagtig ctaaaaacat tcgtgaagct ggccttgatg 180

ttgcgatttt cccaaaagct caaccagatc cagcagatag acaagttcat gaagggttag 240

atgtattcaa acaagaaaac tgtgatgcac ttgtttctat cgggtggaggt agctctcacg 300

atacagctaa agcaatcggt ttagttgcag caaacggcgg aagaatcaat gactatcaag 360

gtgtaaacag tgtagaaaaa ccagtcgttc cagtagttgc aatcactaca acagctggta 420

ctggtagtag aacaacatct cttgcagtta ttacagactc tgcacgtaaa gtaaaaatgc 480

ctgttattga tgagaaaaatt actccaactg tagcaattgt tgaccagaa ttaatggtga 540

aaaaaccagc tggattaaca atcgcaactg gtatggacgc attatcacac gcaattgaag 600

catatgttgc aaaaggtgct acaccagtta ctgatgcatt tgcaattcaa gcaatgaac 660

tcataatga atacttacca aaagcgggtg caaacggaga agacatcgaa gcacgtgaag 720

caatggctta tgcacaatac atggcaggag tggcatttaa caacggtggt ttaggattag 780

tacactctat ttctcaccaa gtaggtggag ttacaaaatt acaacacgga atctgtaact 840

cagttaatat gccacacgtt tgcgcattca acctaatgac taaaactgag cgcttcgcac 900

acattgctga gcttttaggc gagaatgttt ctggcttaag cactgcagca gctgctgaga 960

gagcaattgt agcgttgtaa cgctataaca aaaacttcgg tatcccatct ggctatgcag 1020

aaatgggcgt gaaagaagag gatatcgaat tattagcgaa aaacgcattc gaagacgtat 1080

gtactcaaag caaccacgt gttgctacag ttcaagacat tgcacaaatc atcaaaaacg 1140
ctctgtaata attcttaaat aaacaatact taaaacattt gaggaggtct tghtaacatg 1200

gcattgacac aaatggcatt agattcactg gatttcgacg caactgttgc gctggctgaa 1260
aaggtagctc cacacgttga cattcttgaa atcggtacac catgcatcaa gcacaacggt 1320
atcaagttgc tggaaactct gcgcgcaaag ttccctaaca acaagatcct ggttgacctg 1380
aagactatgg atgctggctt ctacgaagct gagcctttct acaaggctgg tghtgatatc 1440
actaccgttc tgggcgtagc tgatctgggt acaatcaaag gcgtaatcga cgctgctaac 1500
aagtacggca agaaggcaca gatcgacctg atcaatgttg gtgataaggc tghtcgtact 1560
aaggaagttg ctaagctggg gcgcacatc attggcgttc acactggtct ggaccaacaa 1620

gctgctggtc aaactccttt tghtgacctg gcaactgtaa ctggcctgaa cctgggtctg 1680
gaagtttccg tagctgggtg tghtaagcct gctactgttg cacaagttaa agacgctggt 1740
gctaccatca tcgtcgttgg cgctgctatc tacggtgctg ctgaccagc tghtgctgct 1800
gctgaaatca ctggcctggc taagtaataa ttcttaataa acaataactt aaaacatttg 1860
aggaggtctt gtaaacatga acaaatatca agagctcgtg gtcagcaagc tgaccaatgt 1920
tatcaataac actgcagaag gctatgacga caagattttg agtctagtgc atgcagccgg 1980
ccgtacattt atcggtgggt ctggccgttc cttgctggtt tcccgtttct ttgcaatgcg 2040

cttgggtgcat gcaggttacc aagttagcat ggtcggtgaa gttgttactc caagtatcca 2100
agctgggtgat cttttcattg tgatctctgg ctctggcagc acagaaaccc tgatgccttt 2160
ggttaagaag gcaaaagacc aaggtgcca gattatcgtg atttccatga aggtcagtc 2220
cccaatggct gaattggctg atctggttgt gccagttggt ggcaacgatg ccaatgcatt 2280
tgacaagact catggtatgc ctatgggtac tattttcgag ttgtccacc tgtggttctt 2340
cgaagcgact attgccaagc tggtagatca aaaaggctcg acagaagaag gtatgcgcgc 2400
gattcatgct aacctcgagt aataatagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg 2460

aggggttttt tgtgttgaca attaatcatc cggtcgtat aatgtgtgga attgtgagcg 2520
gataacaatt tcacacagga aacagacat gagtaatgaa gtatctataa aagaattaat 2580
tgaaaaggca aaggtggcac aaaaaaatt ggaagcctat agtcaagaac aagttgatgt 2640
actagtaaaa gcactaggaa aagtggttta tgataatgca gaaatgtttg caaaagaagc 2700
agttgaagaa acagaaatgg gtgtttatga agataaagta gctaaatgtc atttgaaatc 2760
aggagctatt tggaatcata taaaagacaa gaaaactgta ggcataataa aagaagaacc 2820

tgaaagggca cttgtttatg ttgctaagcc aaaggaggtt gtggcagcta ctacgcctat 2880

aactaatcca gtggtaaactc ctatgtgtaa tgcaatggct gctataaagg gcagaaatac 2940

aataatagta gcaccacatc ctaaagcaaa gaaagtttca gctcactatg tagaacttat 3000

gaatgctgag cttaaaaaat tgggagcacc agaaaatatc atacagatag tagaagcacc 3060

atcaagagaa gctgctaagg aacttatgga aagtgtgat gtagttattg ctacaggcgg 3120

tgttggaaga gttaaagctg cttactccag tggaagacca gcttatggcg ttggacctgg 3180

aaattcacag gtaatagttg ataagggata cgattataac aaagctgcac aggatataat 3240

aacaggaaga aaatatgaca atggaattat atgttcttca gagcaatcag ttatagctcc 3300

tgctgaagat tatgataagg taatagcagc tttttagaaa aatggggcat tctatgtaga 3360

agatgaggaa acagtagaaa agtttagatc aactttattt aaagatggaa aaataaacag 3420

caagattata ggtaaatccg tccaaattat tgcggatctt gcaggagtaa aagtaccaga 3480

aggtaactaag gttatagtac ttaagggtaa aggtgcagga gaaaaagatg tactttgtaa 3540

agaaaaaatg tgtccagttt tagtagcatt gaaatatgat acttttgaag aagcagttga 3600

aatagctatg gctaattata tgtatgaagg agctgggtcat acagcaggca tacattctga 3660

caatgacgag aacataagat atgcaggaac tgtattacct ataagcagat tagttgtaaa 3720

tcagcctgca actactgctg gaggaagttt caataatgga tttaaccta ctactacact 3780

aggctgcgga tcatggggca gaaacagtat ttcagaaaat cttacttacg agcatcttat 3840

aaatgtttca agaataggtt atttcaataa agaagcaaaa gttcctagct atgaggaaat 3900

atggggataa taattcttaa ataaacaata cttaaaacat ttgaggaggt cttgtaaaca 3960

tgcaactttt caaactcaag agtgaacac atcactttga cacttttgca gaatttgcca 4020

aggaattctg tcttgagaaa cgcgacttgg taattaccaa cgagttcatc tatgaaccgt 4080

atatgaaggc atgccagctc ccttgccatt ttgttatgca ggagaaatat gggcaaggcg 4140

agccttctga cgaaatgatg aataacatct tggcagacat ccgtaatatc cagttcgacc 4200

gcgtaatcgg tatcggagga ggtacggtta ttgacatctc taaacttttc gttctgaaag 4260

gattaaatga tgtactcgat gcattcgacc gcaaaatacc tcttatcaaa gagaaagaac 4320

tgatcattgt gccacaaca tgcggaacgg gtagcgaggt gacgaacatt tctatcgag 4380

aatcaaaaag ccgtcacacc aaaatgggat tggtgacga tgccattgtt gcagaccatg 4440

ccatcatcat acctgaactt ctgaagagct tgcctttcca cttctacgca tgcagtgcaa 4500

tcgatgctct tatccatgcc atcgagtcac acgtatctcc taaagccagt ccatattctc 4560

gtctgttcag tgaggcggtc tgggacatta tcctggaagt attcaagaaa atcgccgaac 4620
acggccctga ataccgcttc gaaaagctgg gagaaatgat catggccagc aactatgccg 4680
gtatagcctt cggaatgca ggagtaggag ccgtccacgc actatcctac ccgttgggag 4740
gcaactatca cgtgccgcat ggagaagcaa actatcagtt cttcacagag gtattcaaag 4800
tatacaaaaa gaagaatcct ttcggctata tagtcgaact caactggaag ctctccaaga 4860
tactgaactg ccagcccgaa tacgtatatc cgaagctgga tgaacttctc ggatgccttc 4920
ttaccaagaa acctttgcac gaatacggca tgaaggacga agaggtaaga ggctttgcgg 4980

aatcagtgtc taagacacag caaagattgc tcgccaacaa ctacgtagag cttactgtag 5040
atgagatcga aggtatctac agaagactct actaataatt cttaaataaa caatacttaa 5100
aacatttgag gaggtcttgt aaacatgaaa gttacaaatc aaaaagaact aaaacaaaag 5160
ctaaatgaat tgagagaagc gcaaaagaag tttgcaacct atactcaaga gcaagttgat 5220
aaaattttta aacaatgtgc catagccgca gctaaagaaa gaataaactt agctaaatta 5280
gcagtagaag aaacaggaat aggtcttgta gaagataaaa ttataaaaaa tcattttgca 5340
gcagaatata tatacaataa atataaaaat gaaaaaactt gtggcataat agaccatgac 5400

gattcttttag gcataacaaa ggttgctgaa ccaattggaa ttgttgcagc catagttcct 5460
actactaatc caacttcac agcaattttc aaatcattaa tttctttaaa aacaagaaac 5520
gcaatattct tttaccaca tccacgtgca aaaaaatcta caattgtgc agcaaaatta 5580
attttagatg cagctgttaa agcaggagca cctaaaaata taataggctg gatagatgag 5640
ccatcaatag aactttctca agatttgatg agtgaagctg atataatatt agcaacagga 5700
ggtccttcaa tggttaaagc ggccatttca tctggaaaac ctgcaattgg tgttggagca 5760
ggaaatacac cagcaataat agatgagagt gcagatatag atatggcagt aagctccata 5820

attttatcaa agacttatga caatggagta atatgcgctt ctgaacaatc aatattagtt 5880
atgaattcaa tatacgaaaa agttaaagag gaatttgtaa aacgaggatc atatatactc 5940
aatcaaaatg aaatagctaa aataaaagaa actatgttta aaaatggagc tattaatgct 6000
gacatagtig gaaaaatctc ttatataatt gctaaaatgg caggaattga agttcctcaa 6060
actacaaaga tacttatagg cgaagtacaa tctgttgaaa aaagcgagct gttctcacat 6120
gaaaaactat caccagtact tgcaatgtat aaagttaagg attttgatga agctctaaaa 6180
aaggcacaaa ggctaataga attaggtgga agtggacaca cgtcatcttt atatatagat 6240

tcacaaaaca ataaggataa agttaaagaa tttggattag caatgaaaac ttcaaggaca 6300
tttattaaca tgccttcttc acaggagca agcggagatt tatacaattt tgcgatagca 6360
ccatcattta ctcttgtagt cggcacttgg ggaggaaact ctgtatcgca aaatgtagag 6420

cctaacatt tattaaatat taaaagtgtt gctgaaagaa gggaaaatat gctttggttt 6480
 aaagtgccac aaaaaatata ttttaatat ggatgtctta gatttgcatt aaaagaatta 6540
 aaagatatga ataagaaaag agcctttata gtaacagata aagatctttt taaacttgga 6600
 tatgttaata aaataacaaa ggtactagat gagatagata ttaaatacag tataattaca 6660

 gatattaaat ctgatccaac tattgattca gtaaaaaaag gtgctaaaga aatgcttaac 6720
 tttgaacctg atactataat ctctattggt ggtggatcgc caatggatgc agcaaagggt 6780
 atgcatttgt tatatgaata tccagaagca gaaattgaaa atctagctat aaactttatg 6840
 gatataagaa agagaatatg caatttcctt aaattagta caaaggcgtt ttcagtagct 6900
 attcctacaa ctgctggtag cggttcagag gcaacacctt ttgcagtat aactaatgat 6960
 gaaacaggaa tgaaataccc ttttaacttct tatgaattga ccccaaacad ggcaataata 7020
 gatactgaat taatgttaaa tatgcctaga aaattaacag cagcaactgg aatagatgca 7080

 ttagttcatg ctatagaagc atatgtttcg gttatggcta cggattatac tgatgaatta 7140
 gccttaagag caataaaaat gatattttaa tatttgcta gagcctataa aaatgggact 7200
 aacgacattg aagcaagaga aaaaatggca catgcctcta atattgcggg gatggcattt 7260
 gcaaatgctt tcttagtgt atgccattca atggctcata aacttggggc aatgcatcac 7320
 gtccacatg gaattgcttg tgctgtatta atagaagaag ttattaaata taacgctaca 7380
 gactgtccaa caaagcaaac agcatttcct caatataaat ctctaatgc taagagaaaa 7440
 tatgctgaaa ttgcagagta tttgaattta aagggtacta gcgataccga aaaggtaaca 7500

 gccttaatag aagctatttc aaagttaaag atagatttga gtattccaca aaatataagt 7560
 gccgtggaa taaataaaaa agatttttat aatacctag ataaaatgc agagcttgct 7620
 tttgatgacc aatgtacaac agctaactct aggtatccac ttataagtga acttaaggat 7680
 atctatataa aatcatttta ataattctta aataaacaat acttaaaaca tttgaggagg 7740
 tcttgtaaac atggattgga agaagatcta tgaagacaga acatgcactg cagatgaagc 7800
 agtaaagagc attaatgtag gtgacagagt gctatttgcg cactgtgttg ctgaaccgcc 7860
 agttcttgta gaagcaatgg ttgcgaatgc agctgcatac aagaatgtaa cggtttcaca 7920

 catggttacc cttggaaagg gtgaatactc aaaaccagaa tataaggaaa actttacttt 7980
 tgaaggttgg tttaacagcc cttcaacaag aggatccatt gcagaaggac acggacagtt 8040
 tgtccctgta ttcttccag aggtaccatc tttaatcaga aaagacattt tccatgttga 8100
 tgtattcatg gtaatgggat cccctccaga tcataacgga ttctgctgtg tgggtgtatc 8160
 ttctgactat acgatgcagg ctatcaaac agcaaaaatt gtacttgctg aagtaaatga 8220
 tcaggtaacct gtagtttatg gagatacatt tgttcacgtt agtgaaatcg acaagttcgt 8280

agaaacttca catccacttc cagaaatcgg acttcctaag atcgggtgaag tagaagctgc 8340

 tattggttaag cactgcgctt ccctaatacga agatgggttcc acattacagc ttggtatcgg 8400
 agctattccg gatgctgtac ttccacagct taaggacaag aaacaccttg gtatccactc 8460
 tgaaatgatt tccgacggtg ttgtagatct ttacgaagca ggcgttatag actgcagcca 8520
 aaagtctatc gacaaaggca aaatggcaat aacattctta atgggaacga agagacttta 8580
 tgatttcgct gcaacaatc caaagggtga attaaagccg gttgactaca taaatcatcc 8640
 atctgtagtt gcacagtgtc ccaaaatggt ttgcatcaat gcttgcttgc aagttgattt 8700
 tatgggtcag attgtatccg atagtattgg gacaaagcag ttctcaggag taggcggtca 8760

 ggttgacttc gtaagagtg catccatgtc tattgacgga aaaggtaaag cgatcatcgc 8820
 gatgccttcc gttgcaaaga agaaggatgg aagtatgatt tcgaagatcg ttccattcat 8880
 cgatcacggt gcagctgtaa ctacatccag aaacgatcgc gactatgtcg taacggaata 8940
 tggatttgct gaaatgaagg gtaagtcttt acaggacaga gcaagagcgt taatcaatat 9000
 tgcacaccct gatttcaaag atgaattaaa ggctgaattt gaaaagagat tcaacgcggc 9060
 attctaataa tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttgaag 9120
 ctt 9123