



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0055078

(43) 공개일자 2007년05월30일

(21) 출원번호 10-2005-0113378

(22) 출원일자 2005년11월25일

심사청구일자 2005년11월25일

(71) 출원인 부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자 김영태
부산 해운대구 좌동 1448번지 경남선경아파트 107동 1002호
이재형
부산 남구 대연3동 삼성아파트 103동 505호

(74) 대리인 최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 카로티노이드 생합성 유전자를 이용한 대장균으로부터아스타잔틴의 생산

(57) 요약

본 발명은 대장균으로부터 아스타잔틴을 생산할 수 있는 카로티노이드 생합성에 관여 하는 유전자와 그 유전자를 함유하는 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 베타카로틴을 기질로 하여 아스타잔틴을 생산하는 유전자를 제조하고 이를 함유하는 재조합 벡터를 이용하여 아스타잔틴을 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의해 아스타잔틴을 합성하지 않는 미생물로부터 고농도의 천연 아스타잔틴을 생산할 수 있다.

대표도

도 3

특허청구의 범위

청구항 1.

아스타잔틴을 생합성하는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaensis*)(기탁번호:KCCM-10460)에서 분리된 유전자로부터 대장균에서 베타카로틴을 기질로 하여 아스타잔틴을 생산 하는 재조합 유전자(crtWZ).

청구항 2.

제 1항의 재조합 유전자(서열번호2 및 서열번호4)를 포함하는 카로티노이드를 생합성하지 않는 미생물로부터 베타카로틴을 기질로 하여 다량의 아스타잔틴을 생합성하는 재조합 벡터(pCR-XL-crtWZ).

청구항 3.

제 1항의 재조합 유전자(서열번호2 및 서열번호4)를 포함하는 카로티노이드를 생합성하지 않는 미생물로부터 베타카로틴을 기질로 하여 다량의 아스타잔틴을 생합성하는 재조합 벡터(pET-crtWZ).

청구항 4.

제 2항 또는 3항의 재조합 벡터를 포함하는 형질전환된 미생물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 원핵생물인 대장균에서 아스타잔틴을 생산할 수 있는 카로티노이드 생합성에 관여 하는 유전자와 그 유전자를 함유하는 벡터에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 아스타잔틴의 전구물질인 베타카로틴을 기질로 하여 아스타잔틴을 생산하는 유전자를 제조하고 이를 함유하는 재조합 벡터를 이용하여 천연 아스타잔틴을 생산하는 방법에 관한 것이다. 또한 상기 재조합 벡터를 대장균등의 숙주세포에 형질전환시킨 미생물에 관한 것이다.

카로티노이드(carotenoids)는 항산화 활성을 가지고 있는 C₄₀ 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로서 자연계에 널리 분포되어 있는 한 군의 색소를 총칭하며, 현재까지 알려진 카로티노이드는 6백여 종에 이른다. 이들은 각각 다른 형태로 존재하며 분자 구조에 따라서도 노란색, 적색, 주홍색, 주황색 등 여러 색으로 존재한다. 그 예로 β-카로틴(β-carotene; 당근의 주황색 색소; 도 1), 라이코펜(licopen; 토마토의 적색 색소), 푸코잔틴(fucoxanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소) 등이 있다. 카로티노이드는 인체 내에서 비타민 A의 전구체로서의 역할을 하며, 산화 방지 효과와 유해산소 소거작용, 암세포 증식 억제작용 및 발암 억제작용이 강하여 순환기 질환, 암 및 성인병 등을 예방하는 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 최근에는 카로티노이드가 직접적인 자외선에 의한 신체의 면역기능을 향상시켜 자외선 노출로부터 피부의 손상을 줄여주거나 멜라닌 생성을 억제함이 밝혀지면서 유럽이나 미국에서 미용 소재로 각광을 받기 시작했다. 현재 카로티노이드는 건강식품 소재(영양 보충제), 인간을 대상으로 한 약학적 제제와 식품 착색제 또는 동물용 사료의 색소 등으로 사용되고 있다.

아스타잔틴(astaxanthin; 도 2)은 주로 새우, 붉은 도미류(red seabream), 연어(salmon) 및 바다가재(lobsters) 등과 같은 해양 동물 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다(참조: Fujita et al., Nippon Suisan Gakkaishi., 49:1855-1869, 1983; Johnson, E. A., Crit. Rev. Biotechnol., 11:297-326, 1991; Nelis et al., J. Appl. Bacteriol., 70:181-191, 1991). 아스타잔틴은 정상적인 호기적 대사과정 중 활성산소가 세포 내 DNA, 단백질, 지질 등을 손상시키는 것과 더불어 세포와 조직의 노화 및 발암을 유발하는 반응을 억제할 뿐만 아니라, 유리 라디칼(hydroxy or peroxy radicals)의 생성을 억제하는 작용을 한다(참조: Palozza et al., Arch. Biochem. Biophys., 297:291-295, 1992; Shimidzu et al., Fish Sci., 62:134-137, 1996). 또한 면역 조절 활성(immune modulatory activity) 및 심장 조절 효과(cardioprotective effect)를 갖는 것으로 알려졌다(참조: Jyonuchi et al., Nutr. Cancer, 19:269-280, 1993). 특히, 아스타잔틴의 항산화력은 다른 카로티노이드의 10배 이상이고, α-토코페롤(tocopherol)의 100배 이상인 것으로 알려져 있으며, 현재까지 아스타잔틴의 독성(toxicity)에 대해서는 보고된 바 없다. 따라서, 아스타잔틴은 신경질환(neurodegenerative diseases), 암(cancer), 면역 질환(immune disorders), 심장혈관질환(cardiovascular diseases) 등을 포함하는 다양한 질환의 치료 및 예방에 이용되고 있고, 이에 대한 연구가 계속 되고 있다(참조: Beal, H. F., The Neuroscientist, 3:21-27, 1991; Chew et al., Anticancer Res., 19:1849-1853, 1999; Murillo E., Arch. Latinoam. Nutr., 42:409-413, 1992). 또한, 아스타잔틴은

산업적으로 색소증진 물질로 이용되고 있으며, 우리나라에서는 '파피아 색소'라는 명칭으로 식품첨가물로 등록되어 있다. 이러한 이유로 아스타잔틴의 수요는 매년 15% 이상의 소비성장을 보이고 있으며, 이에 따라 아스타잔틴의 중요성이 대두되고 있다.

최근에 스위스의 호프만-라로체(F. Hoffman-LaRoche)사에서 아스타잔틴의 화학 합성법을 개발하였으나, 화학합성으로 제조된 아스타잔틴은 천연 아스타잔틴에 비해 낮은 생체 흡수율을 보이고, 식품 첨가제로서의 안전성에 문제가 되고 있어 유럽의 일부 국가에서만 사용이 허가된 상태이다.

따라서, 천연 아스타잔틴의 합성법에 관심이 집중되고 있으며, 아스타잔틴을 생산하는 미생물을 이용한 아스타잔틴의 제조에 상업적 관심이 일고 있다.

현재 아스타잔틴을 생산하는 것으로 알려진 미생물로는 효모인 파피아 로도지마(*Phaffia rhodozyma*), 녹색조류인 해마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 그람-양성균 브레비박테리움 103(*Brevibacterium* 103), 그람-음성균 아그로박테리움 아우란티아쿰(*Agrobacterium aurantiacum*), 파라코커스 마르쿠시아이(*Paracoccus marcusii*) 및 파라코커스 카로티니파시엔스(*Paracoccus carotinifaciens*) 등과 최근에 본 발명자들에 의해 동정된 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaensis*)(참조: Lee et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 54:1699-1702; 2004)등이 알려져 있다.

최근 6년 동안, 많은 카로티노이드 생합성 유전자들이 다양한 미생물로부터 클로닝 되었으며, 이들의 기능이 규명되었다(참조: Armstrong, G. A., J. Bacteriol., 176:4795-4802, 1994; Sandmann, G., Eur. J. Biochem., 223:7-24, 1994; Wieland, B., J. Bacteriol., 176:7719-7726, 1994). 카로티노이드 생합성 경로는 일반적인 이소프레노이드(isoprenoid) 경로의 중요한 중간 생성물인 FPP(farnesyl pyrophosphate)로부터 파생한다. 도 3을 참조하면, FPP와 IPP(isopentenyl pyrophosphate)는 *crtE*에 의해 암호화되는 제라닐제라닐 피로포스페이트 신테아제(geranylgeranyl pyrophosphate synthase)에 의해 GGPP(geranylgeranyl pyrophosphate)로 되며, 이는 *crtB*에 의해 암호화되는 피토엔 신테아제(phytoene synthase), *crtI*에 의해 암호화되는 피토엔 디세투레이즈(phytoene desaturase), 그리고 *crtY*에 의해 암호화되는 리코펜 사이클레이즈(lycopene cyclase)에 의해 일련의 반응을 거쳐 β -카로텐로 전환된다. β -카로텐은 *crtW*에 의해 암호화되는 β -카로텐 케토레이즈(β -carotene ketolase)와 *crtZ*에 의해 암호화되는 β -카로텐 하이드록실레이즈(β -carotene hydroxylase)에 의해 일련의 반응을 거쳐 아스타잔틴으로 전환된다.

카로티노이드 생합성에 관여하는 *crt* 유전자(carotenogenic gene)의 염기서열, 이의 구성(organization) 및 단백질의 특성이 로도박터 캡슐라터스(*Rhodobacter capsulatus*)(참조: Armstrong et al., Mol. Gen. Genet., 216:254-268, 1989)와 에르위니아 헤르비콜라(*Erwinia herbicola*)(참조: Sandimann et al., FEMS Microbiol. Lett., 71:77-82, 1990; Hundle et al., Photochem. Photobiol., 54:89-93, 1991) 및 에르위니아 우레도보라(*Erwinia uredovora*)(참조: Misawa et al., J. Bacteriol., 172: 6704-6712, 1990)에서 규명된 바 있다. 또한, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtW* 및 *crtZ*로 이루어진 카로티노이드 생합성 *crt* 유전자가 해양미생물인 아그로박테리움 아우란티아쿰으로부터 분리된 바 있으며(참조: Norihiko et al., J. Bacteriol., 177(22):6575-6584, 1995), GGPP로부터 β -카로틴까지의 반응을 촉매하는 효소들을 코딩하는 3개의 유전자들(*crtB*, *crtI* 및 *crtY*)과 이들이 도입된 파피아 로도지마에 대해 보고된 바 있다(WO 97/23633).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스로부터 카로티노이드 생합성에 관여하는 유전자들을 분리하기 위해 연구를 거듭하던 중, *crt* 유전자를 클로닝하여 그의 염기서열을 규명하였고, 상기 *crt* 유전자를 이용하여 대장균에서 카로티노이드를 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 카로티노이드를 합성하는 제조합 벡터 및 이를 함유하는 형질 전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 카로티노이드를 합성하지 않는 미생물에서 천연 아스타잔틴을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명자들은 아스타잔틴을 생합성할 수 있는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaensis*)(기탁번호:KCCM-10460, 참조: 대한민국 등록 특허공보 제 511770호)로부터 분리된 유전자를 이용하여 아스타잔틴 생합성에 필요한 단백

질을 코딩하는 유전자 *crtW*(서열번호 1) 및 *crtZ*(서열번호 3)로 구성된 염기서열을 갖는 재조합 유전자를 제조하고, 상기 유전자를 함유하는 재조합 벡터를 제조하여 미생물에 형질전환시켜 아스타잔틴을 생산한다. 유전자 *crtW*와 *crtZ*로부터 코딩되는 단백질은 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

유전자	유전자명	단백질	단백질의 아미노산 서열
서열번호 1	<i>crtW</i>	베타카로틴 케토레이즈 (β -carotene ketolase)	서열번호 2
서열번호 3	<i>crtZ</i>	베타카로틴 하이드록실레이즈 (β -carotene hydroxylase)	서열번호 4

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

본 발명의 카로티노이드 생합성 유전자의 전체 *crt* 유전자는 6,223 bp의 크기이며, 그 내부에는 5'→3' 방향으로 *crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI*, *crtB* 및 *crtE* 유전자가 순서대로 위치하고 있다. 또한, 그 내부에는 *Kpn*I, *Sma*I, *Xma*I, *Cla*I, *Hind*III 및 *Bam*HI의 인식서열이 하나씩 존재한다(참조: 도3). 이 중 *crtW*와 *crtZ*만을 선택적으로 가지는 재조합 유전자를 제조하여 pCR-XL-TOPO 벡터를 사용하여 재조합벡터를 제조하고 이들 pCR-XL-TOPO-*crtWZ*(참조: 도5)와 pET-*crtWZ*(참조: 도6)을 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환시키고, 이 형질전환체로부터 베타카로틴을 기질로 첨가하여 배양하였다. 아스타잔틴을 생산하는지 확인하기 위하여, 상기 배양액에서 균체를 회수한 후, 메탄올을 첨가하여 배양하고 이 배양액의 상등액의 일부를 위하여 HPLC 분석을 수행하였다. 시그마(Sigma)에서 구입한 β -카로틴과 아스타잔틴을 표준물질로 사용하여 분석한 결과 본 발명의 균주로부터 생산된 물질이 아스타잔틴임을 확인하였다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이들 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 국한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야 및 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예1: 카로티노이드 생합성 유전자의 재조합에 의한 베타카로틴으로부터 아스타잔틴 생산 유전자 클로닝

pCR-XL-TOPO-*crtfull*(참조: 도4) 벡터로부터 제한 효소인 *kpn*I 으로 *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*를 제거하고, DNA ligase로 재조합하여 pCR-XL-TOPO-*crtWZ*를 클로닝하였다. 또한 프라이머 1,2 (참조: 표2)로 pCR-XL-TOPO-*crtfull*을 주형으로 PCR하여 *crtW*와 *crtZ*를 포함한 product를 얻고, 이 product를 pGEM-T 벡터로 클로닝한 후, pET-44a(+)벡터(Novagen)로 *Nde*I 과 *Xho*I 으로 클로닝하여 pET-*crtWZ*를 완성하였다.

[표 2]

	염기서열	비고
프라이머 1	5' -CCATATGAGCGCACATGCCCTGCC-3'	<i>crtW</i> 의 앞부분에 <i>Nde</i> I 첨가
프라이머 2	5' -CTCGAGATGGGTCACGTGCGCTCC-3'	<i>crtZ</i> 의 뒷부분에 <i>Xho</i> I 첨가

실시예2: 재조합된 벡터를 이용한 아스타잔틴 생산과 분석

pCR-XL-TOPO-*crtfull* 및 pCR-XL-TOPO-*crtWZ* 와 pET-*crtWZ* 벡터를 각각 BL21(DE3)에 형질전환시키고, kanamycin과 ampicillin으로 선별한 후, 선별된 균주는 50 ml LB배지에 37°C, 6시간 동안 배양하였다(OD₆₀₀=0.5). 이후, pCR-XL-TOPO-*crtfull*의 배양조건은 LB 배양액 외에 어떠한 첨가된 기질 없이 배양하였고, pCR-XL-TOPO-*crtWZ*와 pET-*crtWZ*의 형질전환된 전환체의 경우는 LB 배양액 0.5 pg/ml의 베타카로틴(메탄올에 용해)과 1 mM의 IPTG를 각각 첨가 후, 10시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 균주를 13,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 버리고, 균체를 회수하였

다. 회수된 균체에 메탄올 20 ml을 첨가하여 vortexing 한 후, 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 이후, 13,000 rpm에서 원심분리한 후, 상등액을 수득하였다. 카로티노이드의 생산 유무를 확인하기 위하여, 상기 상등액 1 ml을 취하여 직경 0.45 μm 의 필터로 여과한 후, HPLC 분석(column: 4.6 $\times$ 250 mm, uBondapak C18, Waters, Milford, MA; mobile phase: acetonitrile-methanol-water(49:44:7 v/v), Flow: 10 ml/min., Detector: 470 nm)을 수행하였다. 이때 표준물질로는 시그마(Sigma)에서 구입한 β -카로텐과 아스타잔틴을 사용하였다. 그 결과, 본 발명의 균주로부터 생산된 물질이 아스타잔틴임을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 균주로부터 생산된 아스타잔틴의 양을 측정한 결과, pCR-XL-TOPO-crtfull 및 pCR-XL-TOPO-crtWZ와 pET-crtWZ에서 각각 50 $\mu\text{g/g}$, 35 $\mu\text{g/g}$, 40 $\mu\text{g/g}$ (dry weight)인 것을 확인하였다. 이상의 결과는 형질전환된 대장균에서 어떠한 기질 첨가 없이 생산할 수 있음을 pCR-XL-TOPO-crtfull 형질전환체에서 알 수 있으며, 또한 상대적으로 원가가 저렴한 베타카로틴의 기질로부터 고부가의 아스타?틴을 생합성할 수 있음을 pCR-XL-TOPO-crtWZ와 pET-crtWZ의 형질전환체로 알 수 있다. 또한 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스(기탁번호:KCCM-10460)가 생산하는 25 $\mu\text{g/g}$ (dry weight)의 아스타잔틴 생산량에 비해 많은 양임을 알 수 있다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 대장균에서 카로티노이드를 생산하는 재조합 유전자를 제공하고, 이를 함유하는 재조합 벡터로 형질전환시킨 미생물로부터 천연 아스타잔틴을 생산할 수 있다. 또한 본 발명의 유전자들은 다양한 숙주세포에 도입되어 카로티노이드를 생산하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 아스타잔틴의 전구물질인 베타카로틴의 구조도이다.

도 2는 아스타잔틴의 구조도이다.

도 3는 파라코커스 해운대시스로부터 분리된 *crt* 유전자의 구성(organization)을 도시한 것이다.

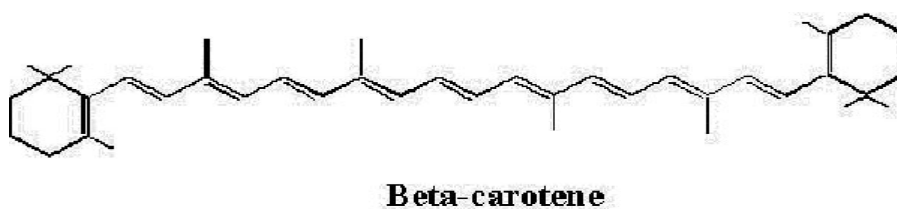
도 4는 *crtW*, *crtZ*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtE* 유전자가 재조합된 pCR-XL-TOPO-crtfull 벡터의 유전자 지도이다.

도 5는 미생물에서 아스타잔틴을 생산하는 pCR-XL-TOPO-crtWZ 벡터를 나타낸 것이다.

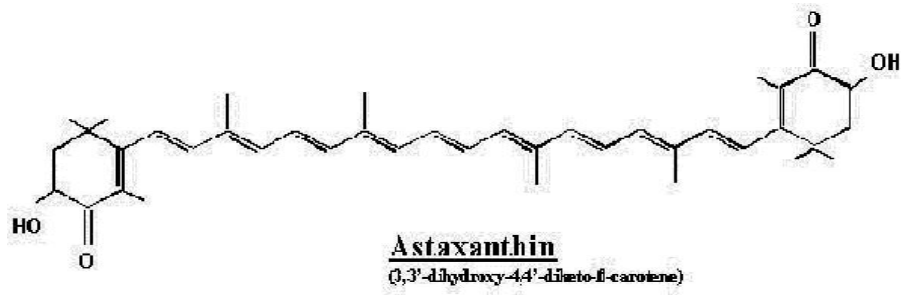
도 6은 미생물에서 아스타잔틴을 생산하는 pET-crtWZ 벡터를 나타낸 것이다.

도면

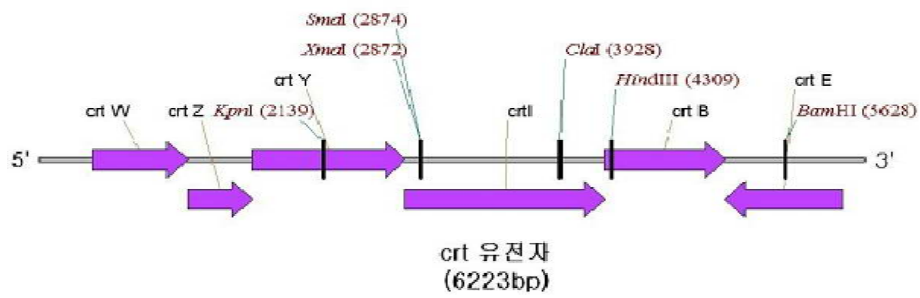
도면1



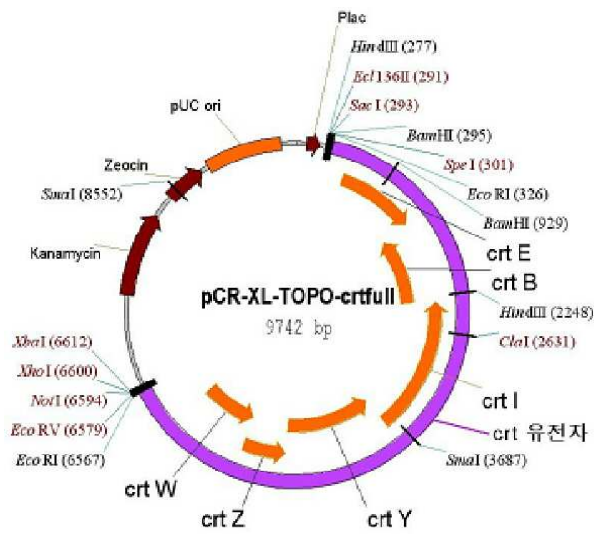
도면2



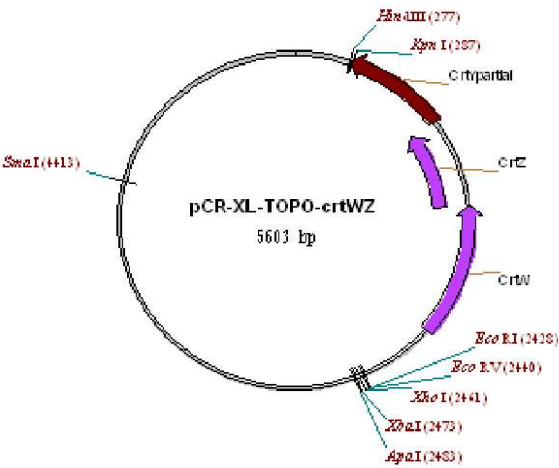
도면3



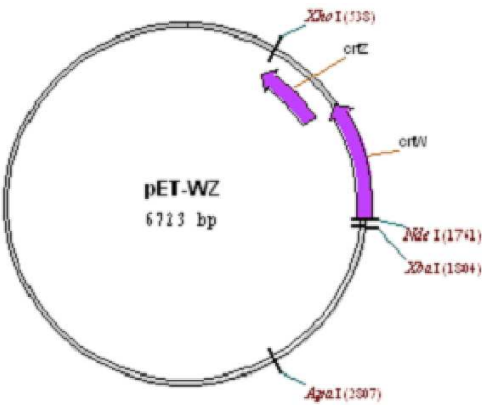
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110>	Pukyong National University	
<120>	Production of astaxanthin from E. coli transformed carotenoid biosynthesis gene	
<160>	6	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	729	
<212>	DNA	
<213>	Paracoccus haeundaensis	
<400>	1	
	atgagcgcac atgccctgcc caaggcagat ctgaccgccca ccagcctgat cgtctcgggc	60
	ggcatcatcg ccgcgtggct ggccctgcat gtgcatgcgc tgtggtttct ggacgcggcg	120

gcgcatccca tcctggcgat cgcgaaatttc ctgggggctga cctgggctgtc ggtcgggtctg 180
 ttcttcatcg cgcatgacgc gatgcacggg tcgggtcgtgc cggggcggtcc gcgcggcaat 240
 gcggcgatgg gccagctggt cctgtggctg tatgccggat ttctgtggcg caagatgac 300
 gtcaagcaca tggcccatca ccgccatacc ggaaccgacg acgaccccgga ttctgaccat 360
 ggcgggcccg tccgctggta cgcgcgcttc atcggcacct atttcggctg gcgcgagggg 420
 ctgctgctgc ccgtcatcgt gacggtctat gcgctgatcc tgggggatcg ctggatgtac 480
 gtggtcttct ggccgctgcc gtcgatactg gcgtcgatcc agctgttcgt gttcggcacc 540
 tggctgccgc accgccccg ccacgacgcg ttccccggacc gccataatgc gcggtcgtcg 600
 cggatcagcg accccgtgtc gctgctgacc tgctttcact ttggtgggta tcatcacgaa 660
 caccacctgc acccgacggt gccttggtgg cgctgcca gcacccgcac caagggggac 720
 accgcatga 729

<210> 2
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Paracoccus haeundaensis

<400> 2
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
 20 25 30
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala
 35 40 45
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Phe Ile Ala
 50 55 60
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Gly Asn
 65 70 75 80
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Thr Gly Thr
 100 105 110
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 3
<211> 489
<212> DNA
<213> Paracoccus haeundaensis

<400> 3
atgaccaatt tcctgatcgt cgtcgccacc gtgctggtga tggagttgac ggcctattcc 60
gtccaccgtt ggatcatgca cggccccctg ggctggggct ggcacaagtc ccaccacgag 120
gaacacgacc acgcgctgga aaagaacgac ctgtacggcc tggctctttgc ggtgatcgcc 180
acggtgctgt tcacggtggg ctggatctgg ggcgcggtcc tgtggtggat cgctttgggc 240
atgaccgtct atgggctgat ctatttcgtc ctgcatgacg ggctgggttca tcagcgctgg 300
ccgttccgct atatcccgcg caagggctat gcccgccgcc tgtatcaggc ccaccgcctg 360
caccacgcgg tcgagggacg cgaccattgc gtcagcttcg gcttcatcta tgcgccgccg 420
gtcgacaagc tgaagcagga cctgaagacg tcgggcgtgc tgcgggccga ggcgcaggag 480
cgcacgtga 489

<210> 4

<211> 162
 <212> PRT
 <213> Paracoccus haeundaensis

<400> 4
 Met Thr Asn Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu
 1 5 10 15
 Thr Ala Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp
 20 25 30
 Gly Trp His Lys Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys
 35 40 45
 Asn Asp Leu Tyr Gly Leu Val Phe Ala Val Ile Ala Thr Val Leu Phe
 50 55 60
 Thr Val Gly Trp Ile Trp Ala Pro Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly
 65 70 75 80
 Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Val Leu His Asp Gly Leu Val
 85 90 95
 His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Lys Gly Tyr Ala Arg
 100 105 110
 Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly Arg Asp
 115 120 125
 His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu
 130 135 140
 Lys Gln Asp Leu Lys Thr Ser Gly Val Leu Arg Ala Glu Ala Gln Glu
 145 150 155 160
 Arg Thr

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer1

<400> 5
 ccatatgagc gcacatgccc tgccc

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer 2

<400> 6
ctcgagatgg gtcacgtgcg ctcc

24