



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0107021
(43) 공개일자 2012년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01) *C12P 7/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0022359

(22) 출원일자 2011년03월14일

심사청구일자 2011년03월14일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수
기자촌아파트 201-1601호 (방이동)

이수진

서울특별시 마포구 백범로25길 63, 삼성래미안아
파트 105동 1504호 (염리동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

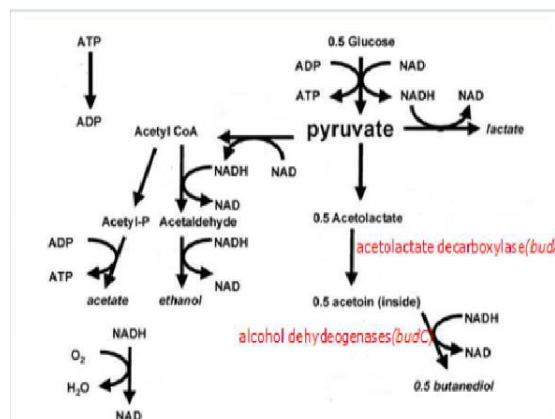
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 비병원성 2,3-부탄다이올 생산을 위한 이종 대장균 및 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드; 및 (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공한다. 본 발명의 형질전환 대장균은 야생종 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC 2242와 비교하였을 때, 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량이 20% 증가하였다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김보림

서울특별시 금천구 금하로23라길 31, 507호 (시흥
동, 현대아파트)

최우주

서울특별시 성동구 옥수동 한남하이츠 3동 105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035578

부처명 지식경제부

연구사업명 산업원천기술개발사업

연구과제명 2,3-부탄다이올 생산용 균주 발굴 및 대사회로 최적화 기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균:

- (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드; 및
- (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 2,3-부탄다이올 과발현 대장균은 (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동 형질전환된 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 3 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 4 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 3의 유전자 지도를 갖는 대장균-크렙시엘라 셔틀벡터 pUC18K이고, 상기 뉴클레오티드 서열은 pUC18K의 MCS(multiple cloning site)에 삽입되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) (i) 크렙시엘라 뉴모니아의 아세토락테이트 디카복실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 (ii) 크렙시엘라 뉴모니아의 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

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

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 대장균을 발현시키는 단계 (b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 2,3-부탄다이올 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생합성 방법:

(a) 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 생합성된 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 2,3-부탄다이올 생산을 위한 이종 대장균 및 제조방법에 관한 것이다.

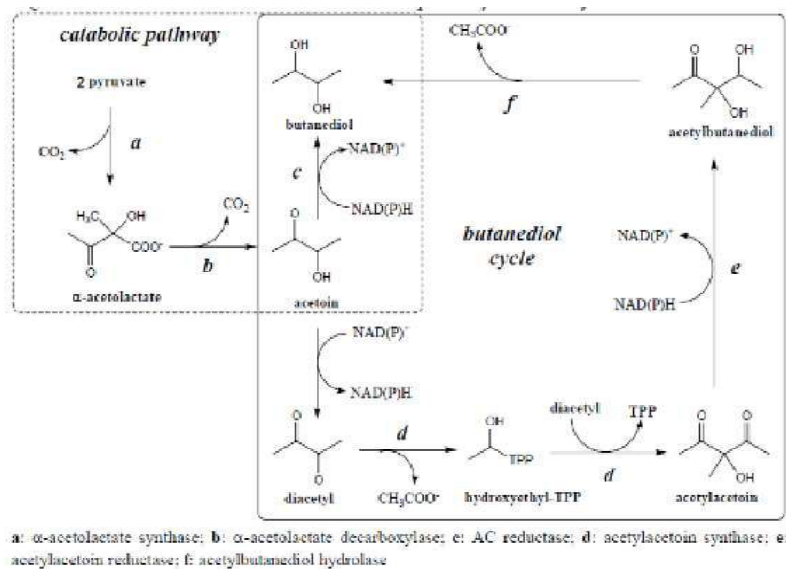
배경 기술

[0002] 화석연료들의 사용은 지구온난화 가스 및 폐기물을 대량생산하여 인류에게 심각한 환경적인 위기를 초래하고 있다. 화석연료로부터 생산되어지는 화학공업을 대체할 수 있는, 즉 인류에게 유해한 폐기물의 생산 및 에너지 소비를 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는 환경 친화적인 새로운 생물 공정의 개발이 필요하다. 바이오에너지로 대표되어지는 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오가스, 부탄올에 대한 관심이 증가하고 있지만, 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소(hydrocarbon) 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 다양한 산업적 가치를 지닌 플랫폼용 화합물인 2,3-부탄다이올을 대사산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)는 페렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(Enterobacteriaceae)의 크렙시엘라(*Klebsiella*) 속으로 크렙시엘라 옥시토카와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과 멜레치토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트(hydroxybutyrate)배지에서 생장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. 크렙시엘라 뉴모니아는 페렴(*Klebsiella pneumonia*) 질병을 일으킨다.

[0004] 2,3-부탄다이올은 용매, 부동액(anti-freeze solution), 가소제(plasticizer)의 합성에 이용되는 화합물이다. 화학적인 전환을 통해 합성고무 제조에 사용되는 부타디엔(1,3-butadiene), 액체연료 첨가제(liquid fuel additive)인 MEK(methyl ethyl ketone), 식품 첨가제 향료로써 사용되는 아세트인(acetoin)과 디아세틸(diacetyl), 폴리우레탄의 전구체 등의 생산이 가능하다.

[0005] 2,3-부탄다이올은 생물학적 방법으로 생산이 가능하며, 2차 세계대전 당시 상업적 규모로 개발되어졌다가, 최근 산업바이오 기술 개발과 함께 다시 관심을 받고 있다. 2,3-부탄다이올은 혼합산 발효(mixed acid fermentation) 대사경로를 통해 생산되며 균주와 탄소원에 따라서 다양한 생산 양산을 보여준다. 글루코스를 탄소원으로 이용하는 경우, 피루베이트(pyruvate)와 아세트인(acetoin)을 거쳐 2,3-부탄다이올이 생산되거나 디아세틸(diacetyl)을 거치는 부탄다이올 사이클(butanediol cycle)을 통해 2,3-부탄다이올이 생산되는 선택적 경로를 갖고 있다.



[0006]

[0007] 미생물의 2,3-부탄다이올 생산을 위한 균주의 발굴, 제조한 균주의 개량, 효율적인 전환기술에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 특히, 대장균은 효소 생산 시스템은 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다. 그러나 다른 종들의 유전자들이 대장균에서 함께 공동발현 되었을 때 미치는 영향에 대해서는 연구가 미흡하다.

[0008] 대장균은 다루기 쉬운 미생물로 성장력이 좋으며 경로 조절이 쉬운 것으로 알려져 있으나 2,3-부탄다이올은 생산하지 못했다. 따라서 산업용 균주로써 유용한 대장균에 2,3-부탄다이올의 생산성이 높은 크랩시엘라의 유전자도입을 통해 2,3-부탄다이올 생산을 가능하게 하였다.

[0009] 본 발명에서는 2,3-부탄다이올을 효율적으로 생산하는 재조합 대장균을 개발하기 위해서 생물학적 대사 네트워크의 이해와 유전자 삽입의 유전자 조작을 통해 재조합 균주를 개발하여 본 발명이 완성되었다.

[0010] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 2,3-부탄다이올 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 크랩시엘라 뉴모니아의 *budA* 유전자 및 *budC* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 대장균을 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 2,3-부탄다이올 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.

- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 대장균을 이용하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 2,3-부탄다이올 생합성 대사산물을 안정적이고, 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였고, 그 결과 *크렙시엘라 뉴모니아*의 *budA* 유전자 및 *budC* 유전자군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자와 함께 대장균을 공동형질전환시키는 경우 효과적으로 2,3-부탄다이올 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면 본 발명은 다음의 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공한다: (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드; 및 (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드.
- [0018] 본 명세서에서의 용어 ‘2,3-부탄다이올’은 용매, 부동액(anti-freeze solution), 가소제(plasticizer)의 합성에 이용되는 화합물이다. 화학적인 전환을 통해 합성고무 제조에 사용되는 부타디엔(1,3-butadiene), 액체연료 첨가제(liquid fuel additive)인 MEK(methyl ethyl ketone), 식품 첨가제 향료로써 사용되는 아세토인(acetoin)과 디아세틸(diacetyl), 폴리우레탄의 전구체 등의 생산이 가능하다.
- [0019] 본 명세서에서의 용어 ‘*크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)’는 폐렴간균으로 그람음성이며 운동성이 없고 유당 발효를 하는 조건적 혐기성 균주이다. 뉴모니아는 장내세균과(Enterobacteriaceae)의 *크렙시엘라*(*Klebsiella*) 속으로 *크렙시엘라 옥시토카*와 유사하지만, 인돌음성(indole-negative)과 멜레지토스(melezitose), 3-하이드록시부티레이트(hydroxybutyrate)배지에서 성장할 수 있다는 특성으로 구분된다. 주로 흙에서 발견되며 30% 정도는 혐기 조건에서 질소 고정 능력을 갖고 있다. *크렙시엘라 뉴모니아*는 폐렴(*Klebsiella pneumonia*) 질병을 일으킨다.
- [0020] 본 명세서에서의 용어 ‘아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)’는 2,3-부탄다이올의 전구체인 아세토인을 생산하는 효소로서, *budA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0021] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈는 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세토락테이트 디카복실실레이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시될 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서의 용어 ‘알코올 디하이드로지네이즈’는 부탄다이올을 생산하는 효소로서 *budC* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.
- [0023] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 알코올 디하이드로지네이즈는 *크렙시엘라 뉴모니아*(*Klebsiella pneumoniae*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시되는 알코올 디하이드로지네이즈를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 알코올 디하이드로지네이즈를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오티드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and

Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [0025] 상기 유전자들은 발현벡터 내부에 도입되어 대장균에서 발현되게 된다. 본 명세서에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0026] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0027] 본 발명의 상기 유전자를 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0028] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ 프로모터, pR^λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0029] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET28a, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC18K 등), 파지(예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 2,3-부탄다이올 생합성에 이용될 박테리아인 대장균을 위한 특정 유전자를 미생물 생체 내로 운반하여 외부로부터 삽입된 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 pUC18K를 사용한다.
- [0030] pUC18K 벡터는 pET28a의 카나마이신 저항성 유전자를 pUC18의 NDE1 제한효소 site에 삽입하여서 pUC18K를 제작한 것으로서, 크랩시엘라 종이 엠포실린에 대한 내성을 가지고 있어서 카나마이신이라는 새로운 항생제 내성 유전자를 벡터에 도입함으로써 유전자 조작을 가능하게 하기 위함이다.
- [0031] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 엠포실린, 젠타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0032] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 *bud4*와 *budC*로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 서열이 5'-3' 순서대로 연결되어 제공되었다.
- [0033] 본 발명의 발현벡터에는 상기 유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal bindingsite) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다.

- [0034] 상기 유전자가 포함된 발현벡터는 이후 대장균 내부로 도입되는데, 본 발명의 벡터를 대장균 내로 운반하는 방법은 CaCl_2 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으나, 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다: (a) (i) 크랩시엘라 뉴모니아의 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 (ii) 크랩시엘라 뉴모니아의 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오티드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.
- [0036] 본 발명의 2,3-부탄다이올 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법은 상술한 형질전환 대장균을 생산하는 방법에 관한 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 2,3-부탄다이올 생합성 방법을 제공한다: (a) 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 2,3-부탄다이올을 생합성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 생합성된 2,3-부탄다이올을 수득하는 단계.
- [0038] 본 발명의 2,3-부탄다이올 과발현용 형질전환 대장균의 배양은 당업계에 공지된 통상의 대장균 배양 방법에 의해 배양될 수 있다.
- [0039] 바람직하게는, 단계 (a)는 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시된다.
- [0040] 상기 형질전환 대장균 내에서 생합성된 2,3-부탄다이올을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0042] (a) 본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터로 형질전환된(cotransformed) 2,3-부탄다이올 과발현용 대장균을 제공한다: (a) 아세토락테이트 디카복실실레이즈(acetolactate decarboxylase)를 코딩하는 뉴클레오티드; 및 (b) 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)를 코딩하는 뉴클레오티드.
- [0043] (b) 본 발명의 형질전환 대장균은 야생종 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC 2242와 비교하였을 때, 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량이 20% 증가하였다.
- [0044] (c) 본 발명의 형질전환 대장균은 야생종에서는 생산하지 못하는 2,3-부탄다이올을 생산할 수 있다. 따라서 당으로부터 2,3-부탄다이올 생합성 경로 발현과 다른 종의 유전자 삽입에 의한 대사 흐름 변경을 통해 대량의 2,3-부탄다이올 생합성이 가능하다. 화학공업에 유용한 기초가 될 플랫폼용 화합물인 2,3-부탄다이올을 비병원성 균주에서 대량 생산하는 것은 친환경적이며 경제적으로도 큰 강점을 갖출 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 크랩시엘라 뉴모니아 생체 내에서 포도당에서부터 2,3-부탄다이올까지의 2,3-부탄다이올 생합성 경로를 보여주는 도식이다.
- 도 2는 크랩시엘라 뉴모니아 유전자를 도입한 이중 대장균 생체 내에서 포도당에서부터 2,3-부탄다이올까지의

2,3-부탄다이올 생합성 경로를 보여주는 도식이다.

도 3는 발현 벡터인 pUC18을 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터(*Escherichia coli*-*Klebsiella settle* vector)로 사용하기 위해 카나마이신 저항성(Kanamycin resistance) 유전자를 삽입한 구조의 도식화이다. 이를 pUC18K라 명명하였다.

도 4은 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터인 pUC18K에 *budA* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB1라 명명하였다.

도 5는 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터인 pUC18K에 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB2라 명명하였다.

도 6은 에스케리치아 콜라이-크렙시엘라 셔틀 벡터인 pUC18K에 *budA*와 *budC* 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. 이를 pSB3라 명명하였다.

도 7은 크렙시엘라 뉴모니아 염색체를 주형으로 하여 *budA*, *budC* 각각의 유전자를 삽입한 도4, 도5와 *budA*, *budC* 두 개의 유전자를 삽입한 도 6의 재조합 플라스미드를 제한효소를 이용하여 확인한 전기영동 사진이다. 레인 1: 사이즈마커, 레인 2: *E. coli*에서 EcoR I 과 BamH I 로 절단한 *budA* ::pUC18K::*budA*, 레인 3: *E. coli*에서 BamH I 과 Xba I 로 절단한 *budC* ::pUC18K::*budC* 레인 4: *E. coli*에서 EcoR I 과 BamH I 로 절단한 *budA* ::pUC18K::*budA*::*budC* , 레인 5: *E. coli*에서 BamH I 과 Xba I 로 절단한 *budC* ::pUC18K::*budA*::*budC*

도 8은 대장균 야생종과 재조합체의 시간에 따른 생장(OD)를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 *E. coli* ::pSB1 재조합 균주가 글루코즈를 소모함에 따라 생성한 아세트산의 양을 나타낸 그래프이다.

도 10는 본 발명의 *E. coli* ::pSB2 재조합 균주가 배지에 넣어준 아세트산을 소모함에 따라 생성한 2,3-부탄다이올의 양을 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주가 글루코즈를 소모함에 따라 생성한 2,3-부탄다이올 및 생산물의 양을 나타낸 그래프이다.

도 12는 야생종 크렙시엘라 뉴모니아가 글루코즈를 소모함에 따라 생성한 2,3-부탄다이올 및 생산물의 양을 나타낸 그래프이다.

도 13은 본 발명의 *E. coli* ::pSB3 재조합 균주와 야생종 크렙시엘라 뉴모니아의 2,3-부탄다이올 생산량 및 수율을 비교한 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

실시예

실시예 1: 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용한 *budA*와 *budC* 유전자를 발현하는 재조합 플라스미드의 제조.

크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC 2242의 염색체를 주형으로 하여 2,3-부탄다이올 생산을 위한 효소를 암호화하는 *budA*와 *budC*의 유전자서열(genebank, NCBI)의 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소연쇄반응(PCR, DaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다.

표 1

유전자	생산 효소
<i>budA</i>	acetolactate decarboxylase
<i>budC</i>	alcohol dehydrogenase

표 2

[0051]

표 1의 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 및 제한효소

유전자	프라이머 서열	제한 효소
<i>budA</i>	F 5'-GAA TTC ATG AAC CAT TCT GTT GAA TGC TC-3'	EcoR I
	R 5'-GGA TCC TTA GTT TTC GAC TGA GCG AAT G-3'	BamHI
<i>budC</i>	F 5'-GGA TCC ATG AAA AAA GTC GCA CTT GTT ACC-3'	BamH I
	R 5'-TCT AGA TTA GTT AAA CAC CAT GCC GC-3'	Xba I

[0052]

표 1의 유전자들은 타겟 유전자들만 특이적으로 증폭하도록 제작된 표 2에 제공된 프라이머(primer)를 사용하여 증폭하였다. 이 유전자들 중 *budA*는 780 bp, *budC*는 771 bp의 크기로 증폭되었다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄, Taq DNA 중합효소(DaKaRa)) 아래에서 95°C/5분(denaturation), 66°C/1분(annealing), 72°C/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95°C/1분(denaturation), 66°C/30초(annealing), 72°C/1분(extension)로 30회 반복 수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장(extension)을 위해 95°C/1분(denaturation), 66°C/1분(annealing), 72°C/5분(extension) 반응하였다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 0.8% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 T-vector 클로닝에 이용하였다. pGEM-T 이지 벡터(DaKaRa)에 라이게이션을 수행하여 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*와 pGEM-T::*budC*, pGEM-T::*budA*::*budC*를 제작하였다. 상기 재조합 플라스미드들은 대장균(E. coli DH5a competent cell, RBS)에서 형질 전환하여 균주를 제조하였다.

[0053]

실시예 2: 재조합 플라스미드 pSB1, pSB2, pSB3의 제조

[0054]

상기 실시예 1의 재조합 플라스미드인 pGEM-T::*budA*와 pGEM-T::*budC*, pGEM-T::*budA*::*budC*를 대장균과 크렙시엘라의 서틀 벡터인 pUC18K(도 3)를 표 2에 열거된 제한효소 들로 37°C 항온수조(water bath)에서 약 2시간 반응하였다. 여기서 사용한 pUC18K는 기존의 pET28a벡터에 카나마이신에 저항성을 갖는 유전자를 클로닝한 후 pUC18벡터에 삽입하여 제작하였다. 보다 상세하게 pUC18 벡터는 Takara Shuzo Co. Ltd., Kyoto에서 구입하였고, pET28a(Takara Shuzo Co. Ltd., Kyoto 똑같은 업체에서 구입)의 카나마이신 저항성 유전자를 pUC18의 NDE1 제한효소 사이트에 삽입하여서 pUC18K를 제작하였다. 이것은 크렙시엘라 종이 엠피실린에 대한 내성을 가지고 있어서 카나마이신이라는 새로운 항생제 내성 유전자를 벡터에 도입함으로써 유전자 조작을 가능하게 하기 위함이었다. 위의 열거한 제한효소들로 각각의 DNA 절편들을 절단한 뒤 pUC18K 벡터의 다중삽입부위(multicloning site)에 도 4, 5 및 6에 개시된 것과 같이 T4 라이게이즈(Dakara)를 이용, 16°C에서 반응, 라이게이션을 하여 재조합 플라스미드를 완성하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 대장균(E. coli DH5a competent cell, RBS)에 형질 전환 시킨 후 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조작의 크기를 0.8% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다. 도면 7에서는 재조합된 플라스미드가 제한효소에 의해 절단된 결과를 보여주었다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한효소들을 이용하여 pUC18K 벡터에 도입하여 pSB1, pSB2, pSB3를 제조하였다. 도 4, 5 및 6은 상기 pSB1(*budA*를 암호화하는 유전자 포함), pSB2(*budC*를 암호화하는 유전자 포함), pSB3(*budA*, *budC*를 암호화하는 유전자 포함)라 명명된 벡터의 지도(map)를 나타내는 도면이다.

[0055]

실시예 3: 이중 대장균 형질전환체 제조

[0056]

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 CaCl₂ 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열 충격(42°C) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기천공법(electroporation)에 의한 형질전환방법을 사용하였다. 상기 전기 충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 전 배양 된 30 µl(0.1 %)의 야생종 *에스케리키아 콜라이*(*Escherichia coli*) DH5 α 배양액을 시험관에 들어있는 3 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)배지에 접종하여 배양액의 흡광도 (absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 3 mL의 배양액은 원심 분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 1 mL로 1

회 세척해준 후, 다시 원심분리(12000 rpm, 1분)하여 상등액과 세포로 나누어 주었다. 세포는 10% 글리세롤 80 μ l로 현탁하였다. 현탁된 세포에 1-3 μ l의 재조합 플라스미드(pJS01, pJS02, pJS03, pJS04와 pJS07)를 첨가시켜주었다. 상기 플라스미드가 들어있는 분주된 80 μ l의 액체는 전기천공법(electroporation)용 큐벳(BIO-RAD, Gene pulser cuvette)에 담아 BIO-RAD, Gene pulser Xcell로 전기 충격(1800 v, 25 μ F, 200 Ω)을 가하였다. 미리 준비해둔 1 mL LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract)를 첨가한 뒤 1시간 동안 200 rpm, 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양된 형질전환체는 암피실린(50 ug/mL)과 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 LB 아가(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, agar 20 g/L)에서 단일 균체가 생성될 때까지 37°C에서 배양하였다. 이를 통해 재조합 플라스미드인 pSB1, pSB2, pSB3를 *에스케리키아 콜라이*(*Escherichia coli*) DH5 α 균주에 형질 전환한 *E. coli* SGSB1, *E. coli* SGSB2, *E. coli* SGSB3 재조합 균주를 개발하였다(표 3).

표 3

개발균주	
<i>E. coli</i> SGSB1	<i>E. coli</i> DH5a::pUC18K::budA
<i>E. coli</i> SGSB2	<i>E. coli</i> DH5a::pUC18K::budC
<i>E. coli</i> SGSB3	<i>E. coli</i> DH5a::pUC18K::budA::budC

재조합 균주

실시예 4: 이중 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산

에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5 α 균주에 형질 전환한 재조합 균주들을 LB(암페실린 50 ug/mL와 카나마이신 50 ug/mL 포함) 배지에 16시간 정도 전 배양 시키고 그 배양액을 다시 암페실린 50 ug/mL과 카나마이신 50 ug/mL이 포함된 LB 배지에 접종하여 흡광도가 600 nm에서 0.6-1.0 되었을 때 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80°C에서 배양실험 시까지 저장하였다. 상기에서 개발된 재조합 균주의 배양은 보관용 균액 30 μ l을 10 mL 바텀 튜브(bottom tube)에 들어있는 암페실린(50 ug/mL)과 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 3 mL의 LB에 16시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 mL 플라스크에 들어있는 암페실린(50 ug/mL)과 카나마이신(50 ug/mL)이 첨가된 200 mL의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract) 배지에 0.5 %의 전기 배양액을 접종하여 37°C, 170 rpm 상태에서 24시간동안 배양하였다. 재조합 균주와 비교하기 위한 크랩시엘라 뉴모니아 KCTC 2242야생종은 암페실린은 들어있고, 카나마이신은 들어있지 않은 LB에서 재조합 균주와 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm 파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside, sigma, USA)를 첨가(최종농도 1 mM/mL)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 또한 알코올 디하이드로지네이즈(alcohol dehydrogenase)의 확인 실험에서는 위와 동일한 배지조성에 아세트인 15 mM을 첨가해주었고, 나머지 배양조건은 동일하다. 본 발명에서 개발된 이중 대장균 재조합 균주들은 생장곡선에서 야생종 대장균과 비교하였을 때, *E. coli* SGSB1은 약간 더 높은 OD값을 보였고, 다른 두 재조합체는 야생종에 비해 약간 저해되는 현상을 보였다(도8). 이는 다른 종의 유전자의 삽입에 의한 독성이나 저해가 약간은 있었던 것으로 사료된다. 그러나 크랩시엘라와 대장균에 모두 발현이 가능한 안정적인 벡터를 사용하였기 때문에 반복적으로 배양한다면, 성장능력을 높일 수 있을 것이라 판단된다.

실시예 5: 세포외로부터 재조합 대장균의 아세트인(acetoin) 및 2,3-부탄다이올(2,3-butanediol)의 측정

재조합 균주의 배양액 내의 2,3-부탄다이올 중간물질이면서 2,3-부탄다이올 생산의 유도체 물질인 아세트인과 2,3-부탄다이올의 농도를 측정하기 위해 배양 중 일정시간마다 채취한 시료를 원심분리(12000 rpm, 10분)후 상등액과 세포를 분리하여 -40°C에서 보관하였다. 상기 배양액로부터 분리된 상등액은 각각 1 mL씩 0.2 μ m 필터를 이용하여 정제한 후, 하단의 조건하에서 고속액체크로마토그래피(HPLC) 정량 분석을 실시하였다.

표 4

[0063]

아세트산과 말론산 분석을 위한 HPLC 조건

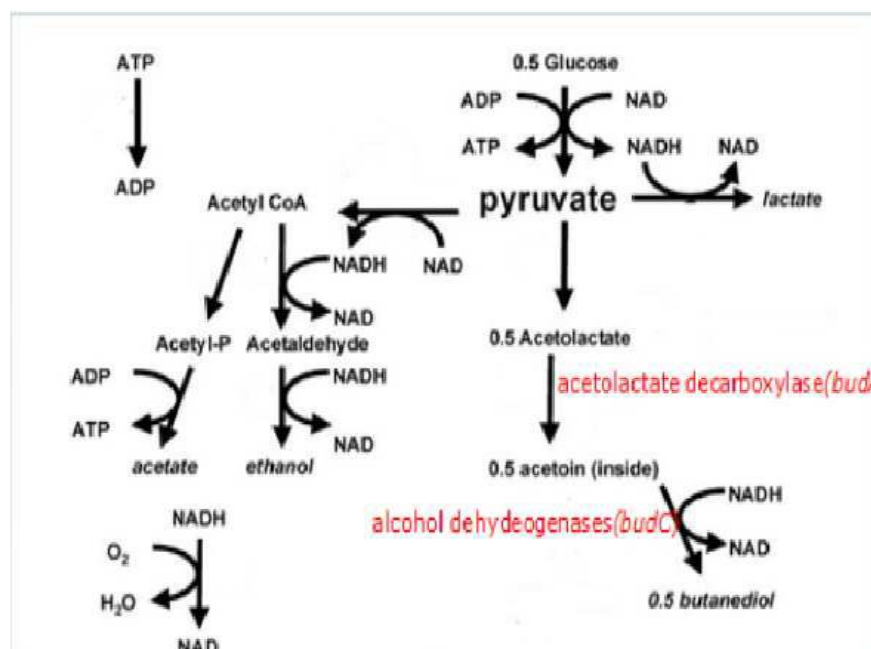
품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, Korea), UV730D (영린기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, USA)
유속	0.8 ml/min
주입부피	30ul
이동상	0.001N 황산
오븐 온도	60℃
작동 시간	20분

[0064]

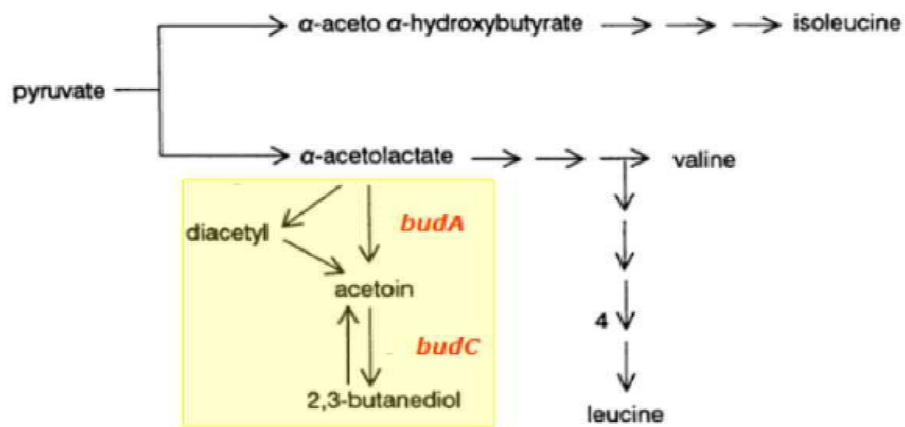
본 발명에서 측정된 아세트산은 2,3-부탄다이올 생합성 과정의 중간체이면서 유도체이다. 따라서 이와 관련된 유전자를 포함하고 있는 *E. coli* SGSB1과 *E. coli* SGSB3의 두개의 재조합 균주와 야생종 대장균과 생산량의 변화를 관찰하였다. 야생종의 경우에는 이와 관련된 유전자가 존재하지 않으므로 아세트산이 생산되지 않으며, *E. coli* SGSB2는 아세트산을 2,3-부탄다이올로 전환시키는 효소에 관련된 유전자를 삽입하였기 때문에 배지에 아세트산을 첨가해주어서 그 변화량을 관찰하였다. 재조합 대장균들은 엑스트라셀룰라(extracellular)에서 분석되어지는 아세트산과 2,3-부탄다이올의 생산량 경향에 차이를 보였다. 배양이 시작된 후 *budA* 유전자의 삽입으로 발현된 *E. coli* SGSB1은 야생종이 생산할 수 없는 아세트산을 생산하는 것을 확인하였다(도 9). *budC* 유전자가 삽입된 *E. coli* SGSB2는 배지에 넣어준 아세트산이 줄어들면서 2,3-부탄다이올을 생산하는 것을 확인하였다(도10). 마지막으로 *E. coli* SGSB3는 *budA*, *budC* 두 개 유전자의 삽입으로 아세트산과 2,3-부탄다이올이 둘 다 생산되는 것을 확인하였으며, 아세트산은 2,3-부탄다이올로 전환되기 때문에 아세트산의 양은 배양 후기에 일정한 값을 유지하였다(도 11). 대조균인 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아*도 *E. coli* SGSB3와 비슷한 경향성을 보였다(도 12). 이는 *budA* 유전자가 발현되면서 생성된 아세토락테이트 디카복실라제(acetolactate decarboxylase) 효소가 야생종 *E. coli*에서도 생산되는 아세토락테이트를 아세트산으로 전환시켰고, *budC* 유전자가 발현되면서 생성된 알코올 디하이드로지네이스(alcohol dehydrogenase) 효소가 아세트산을 2,3-부탄다이올로 전환시켰다. 이 결과로, 야생종 *E. coli*에서는 생산하지 못하는 2,3-부탄다이올을 재조합 *E. coli*를 통해 생산하였다. 야생종 *크렙시엘라 뉴모니아* KCTC 2242와 비교하였을 때, OD값으로 비교한 성장 정도는 더 낮지만, 포도당의 소모량에 따른 2,3-부탄다이올의 생산량인 수율의 측면에서는 20%정도 더 높았다(도13).

도면

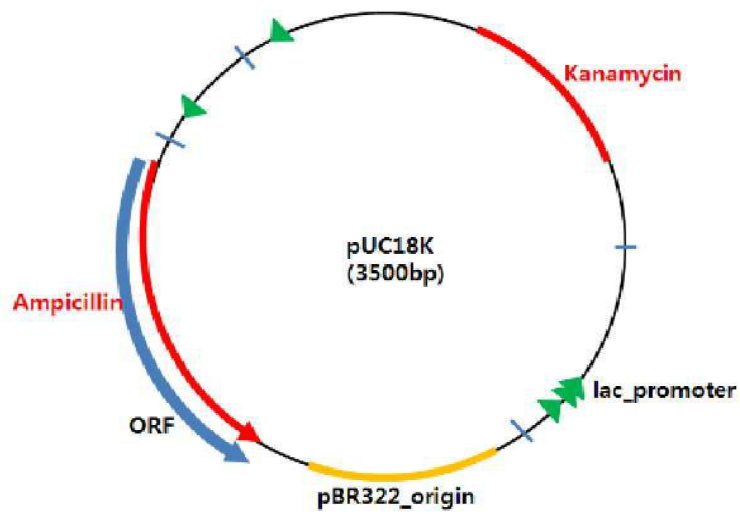
도면1



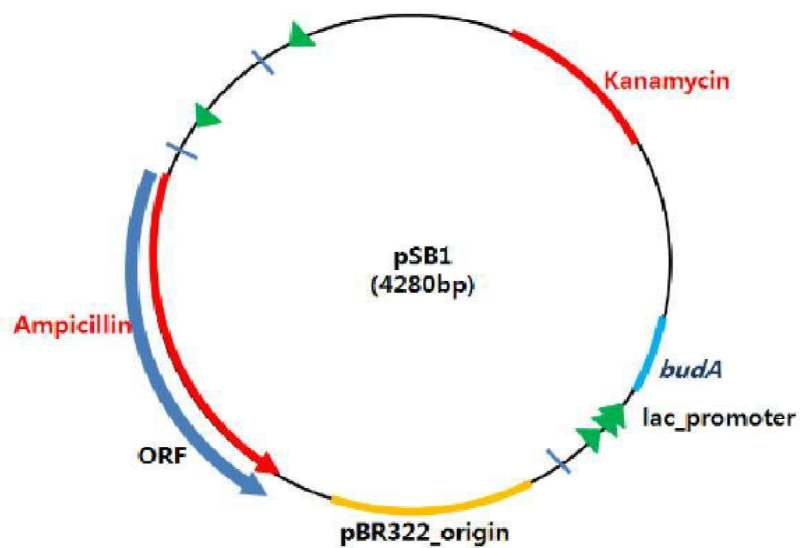
도면2



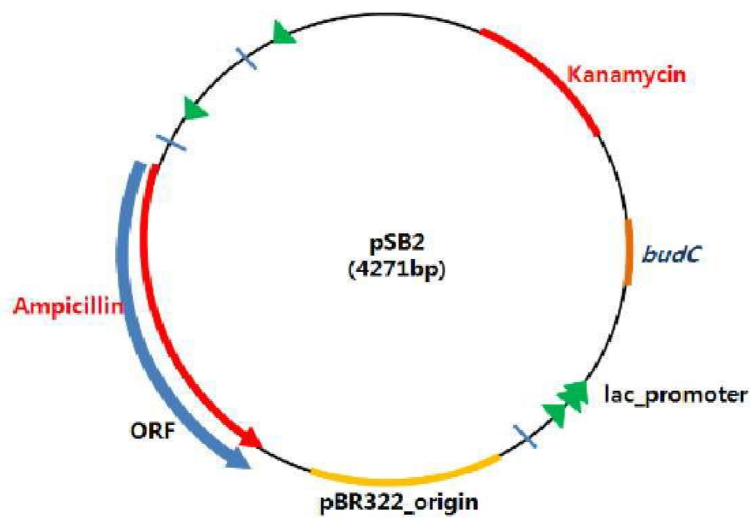
도면3



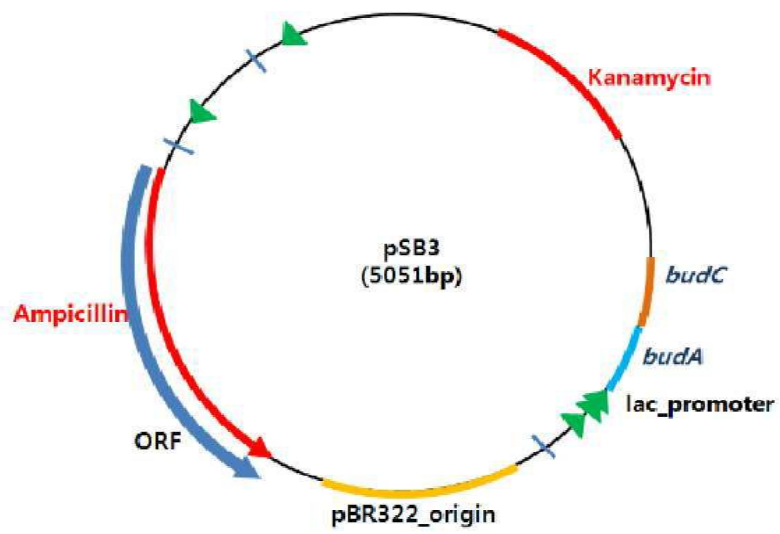
도면4



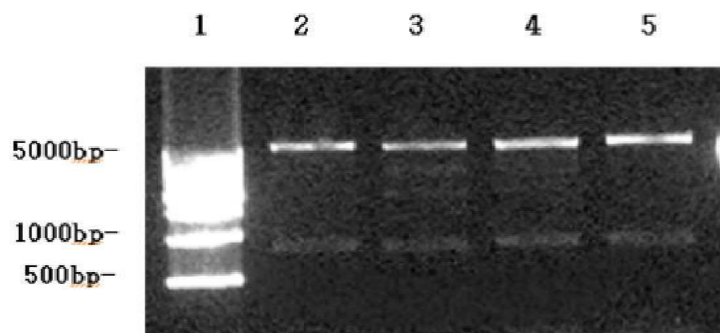
도면5



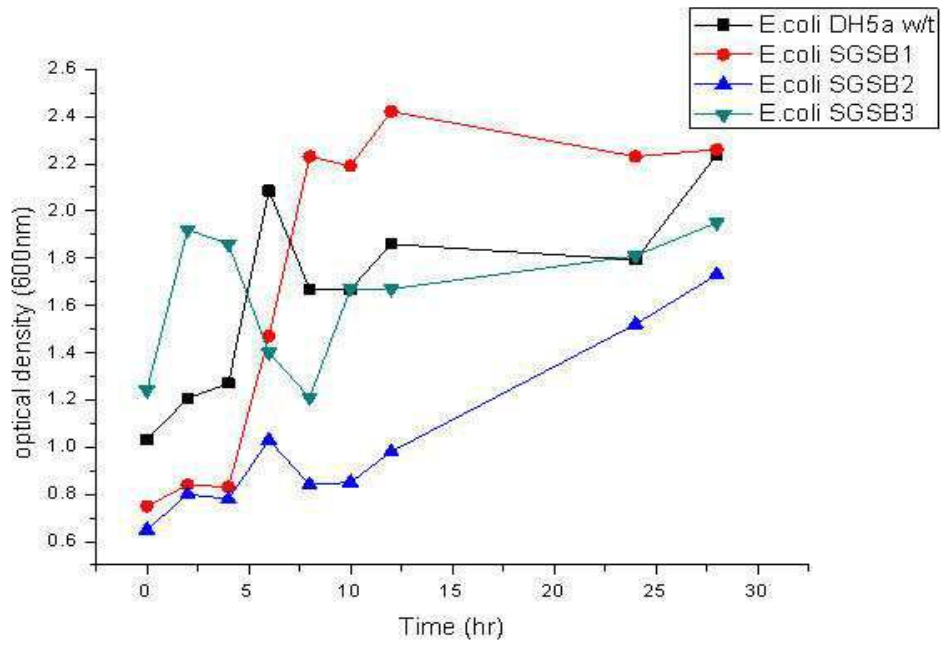
도면6



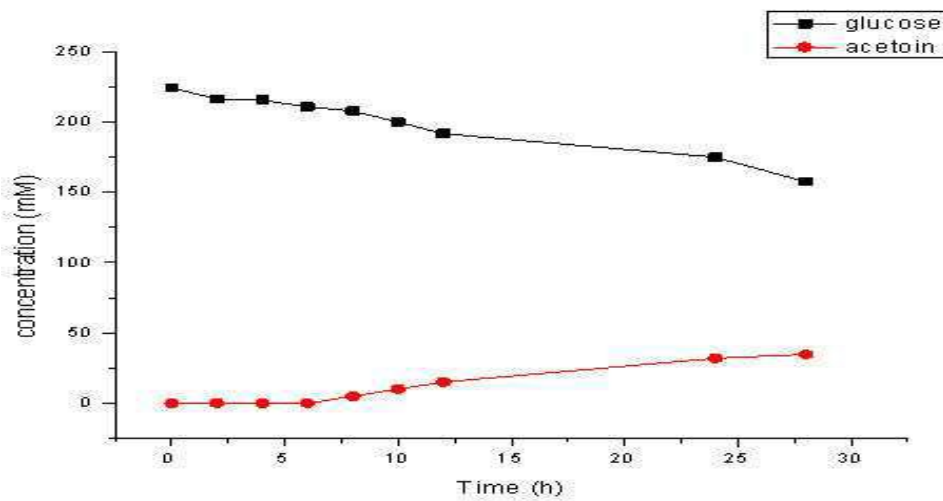
도면7



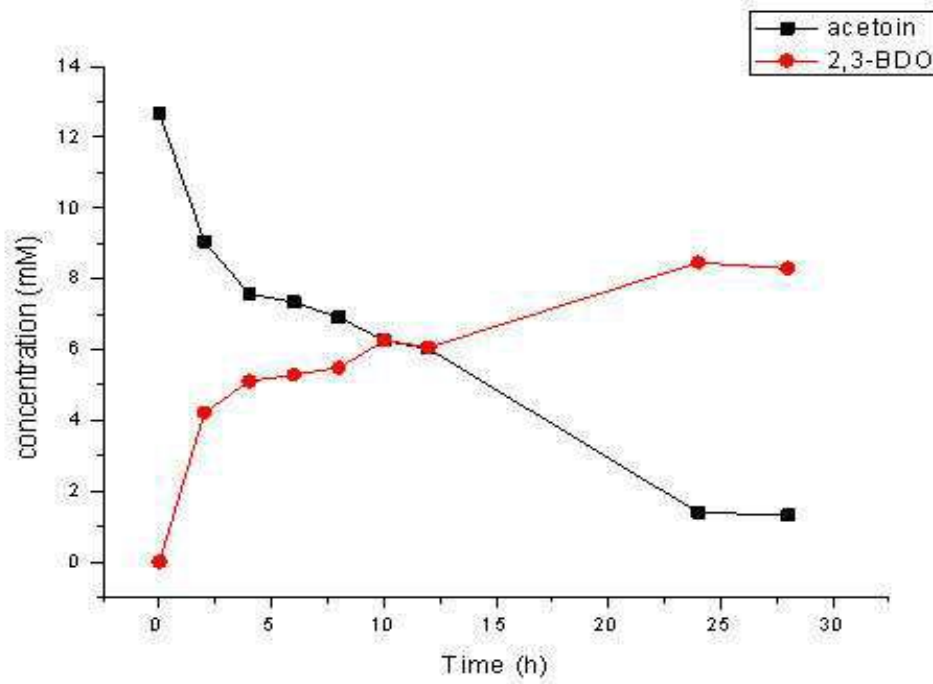
도면8



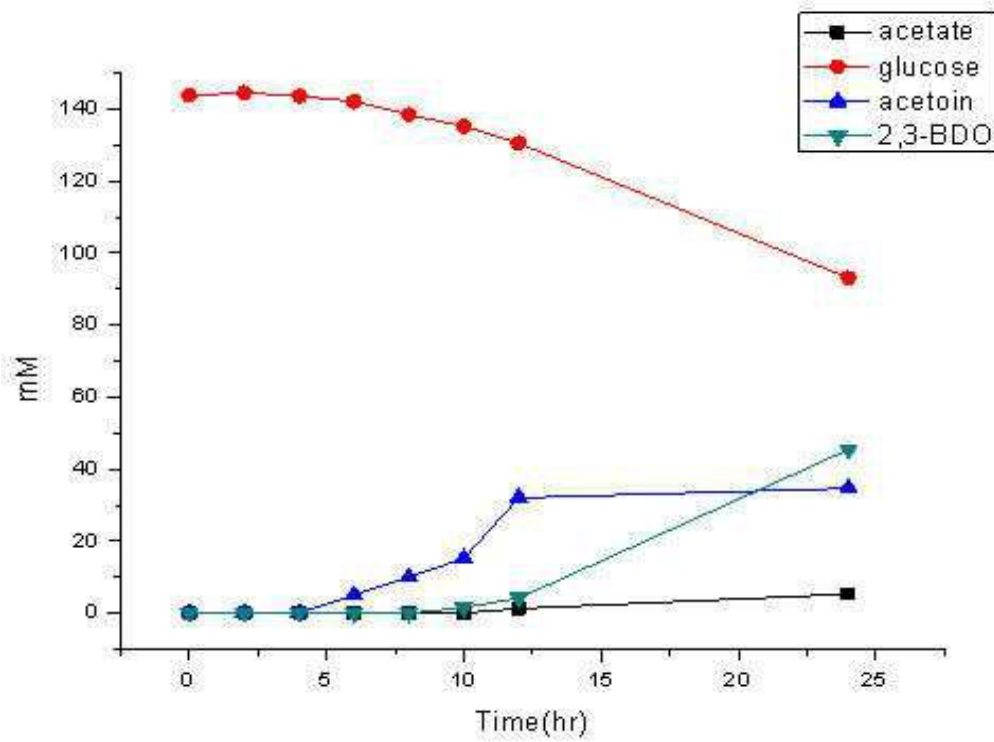
도면9



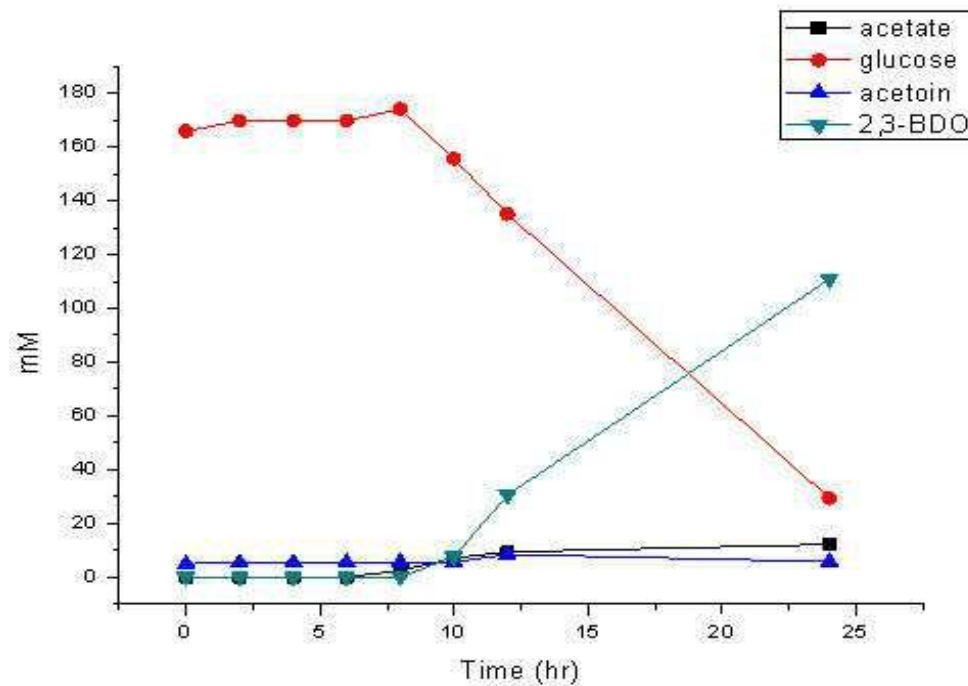
도면10



도면11



도면12



도면13

	<i>E.coli</i> DH5a::pUC18K::budAC	<i>K.pneumoniae</i> 2242 w/t
OD max	1.81	6.27
μ max	0.22	0.30
Production(g/L)	4.09	12.28
Volumetric productivity (g/L/h)	0.31	2.51
Volumetric productivity (mM/h)	3.44	27.86
Specific productivity (g/g DCW/h)	0.15	0.47
Specific productivity (mM/g DCW/h)	1.66	5.22
Yield (g/g Glu.)	0.45	0.37
Yield (mM/mM Glu.)	0.90	0.74

서열 목록

- <110> sogang university
- <120> Heterologous Escherichia coli strains for producing avirulent
2,3-butanediol and manufacturing method
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 260

<212> PRT

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 1

Met Asn His Ser Ala Glu Cys Thr Cys Glu Glu Ser Leu Cys Glu Thr

1 5 10 15

Leu Arg Ala Phe Ser Ala Gln His Pro Glu Ser Val Leu Tyr Gln Thr

20 25 30

Ser Leu Met Ser Ala Leu Leu Ser Gly Val Tyr Glu Gly Ser Thr Thr

35 40 45

Ile Ala Asp Leu Leu Lys His Gly Asp Phe Gly Leu Gly Thr Phe Asn

50 55 60

Glu Leu Asp Gly Glu Leu Ile Ala Phe Ser Ser Gln Val Tyr Gln Leu

65 70 75 80

Arg Ala Asp Gly Ser Ala Arg Lys Ala Gln Pro Glu Gln Lys Thr Pro

85 90 95

Phe Ala Val Met Thr Trp Phe Gln Pro Gln Tyr Arg Lys Thr Phe Asp

100 105 110

His Pro Val Ser Arg Gln Gln Leu His Glu Val Ile Asp Gln Gln Ile

115 120 125

Pro Ser Asp Asn Leu Phe Cys Ala Leu Arg Ile Asp Gly His Phe Arg

130 135 140

His Ala His Thr Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Pro Pro Tyr Arg Ala

145 150 155 160

Met Thr Asp Val Leu Asp Asp Gln Pro Val Phe Arg Phe Asn Gln Arg

165 170 175

Glu Gly Val Leu Val Gly Phe Arg Thr Pro Gln His Met Gln Gly Ile

180 185 190

Asn Val Ala Gly Tyr His Glu His Phe Ile Thr Asp Asp Arg Lys Gly

195 200 205

Gly Gly His Leu Leu Asp Tyr Gln Leu Asp His Gly Val Leu Thr Phe

210 215 220

Gly Glu Ile His Lys Leu Met Ile Asp Leu Pro Ala Asp Ser Ala Phe

225 230 235 240

Leu Gln Ala Asn Leu His Pro Asp Asn Leu Asp Ala Ala Ile Arg Ser

245 250 255

Val Glu Ser ***

260

<210> 2

<211> 257

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 2

Met Lys Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Gln Gly Ile Gly Lys

1 5 10 15

Ala Ile Ala Leu Arg Leu Val Lys Asp Gly Phe Ala Val Ala Ile Ala

20 25 30

Asp Tyr Asn Asp Ala Thr Ala Lys Ala Val Ala Ser Glu Ile Asn Gln

35 40 45

Ala Gly Gly Arg Ala Met Ala Val Lys Val Asp Val Ser Asp Arg Asp

50 55 60

Gln Val Phe Ala Ala Val Glu Gln Ala Arg Lys Thr Leu Gly Gly Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ile Thr Pro Glu Ile Val Asp Lys Val Tyr Asn Ile Asn Val Lys

100 105 110

Gly Val Ile Trp Gly Ile Gln Ala Ala Val Glu Ala Phe Lys Lys Glu

115 120 125

Gly His Gly Gly Lys Ile Ile Asn Ala Cys Ser Gln Ala Gly His Val

130 135 140

Gly Asn Pro Glu Leu Ala Val Tyr Ser Ser Ser Lys Phe Ala Val Arg

145 150 155 160

Gly Leu Thr Gln Thr Ala Ala Arg Asp Leu Ala Pro Leu Gly Ile Thr

165 170 175

Val Asn Gly Tyr Cys Pro Gly Ile Val Lys Thr Pro Met Trp Ala Glu

180 185 190

Ile Asp Arg Gln Val Ser Glu Ala Ala Gly Lys Pro Leu Gly Tyr Gly

195 200 205

Thr Ala Glu Phe Ala Lys Arg Ile Thr Leu Gly Arg Leu Ser Glu Pro

210 215 220

Glu Asp Val Ala Ala Cys Val Ser Tyr Leu Ala Ser Pro Asp Ser Asp

225 230 235 240

Tyr Met Thr Gly Gln Ser Leu Leu Ile Asp Gly Gly Met Val Phe Asn

245 250 255

<210>

3

<211> 780

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 3

atgaatcatt ctgctgaatg cacctgcgaa gagagtctat gcgaaaccct gcgggcgttt 60

tccgcgcagc atcccagagc cgtgctctat cagacatcgc tcatgagcgc cctgctgagc 120

ggggtttacg aaggcagcac caccatcgcc gacctgctga aacacggcga tttcggcctc 180

ggcaccttta atgagctgga cggggagctg atcgccctca gcagtcaggt ctatcagctg 240

cgcgccgacg gcagcgcgcg caaagcccag ccggagcaga aaacgccgtt cgcggtgatg 300

acctggttcc agccgcagta ccggaaaacc ttgaccatc cggtagccg ccagcagctg 360

cacgaggtga tcgaccagca aatcccctct gacaacctgt tctgcgcctt gcgcatcgac 420

ggccatttcc gccatgccca taccgcacc gtgccgcgcc agacgccgcc gtaccgggcg 480

atgaccgacg tactcgacga tcagccggtg ttcgcttta accagcgcga aggggtgctg 540

gtcggcttcc ggaccccga gcatatgcag gggatcaacg tcgccgggta tcacgagcat 600

tttattaccg atgaccgcaa aggcggcggg cacctgctgg attaccagct cgaccacggg 660

gtgtgacct tcggcgaat tcacaagctg atgatcgacc tgcccgcga cagcgcgttc 720

ctgcaggcta atctgcatcc cgataatctc gatgccgcca tccgttcgt agaaagttaa 780

780

<210> 4

<211> 771

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 4

atgaaaaaag tcgcacttgt taccggcgcc ggccagggga ttggtaaagc tatcgccctt	60
cgctctggta aggatggatt tgccgtggcc attgccgatt ataacgacgc caccgccaaa	120
gcggtcgcct ccgaaatcaa ccaggccggc ggccgcgcca tggcggtgaa agtggatgtt	180
tctgaccgcg accaggtatt tgccgccgtc gaacaggcgc gcaaaacgct gggcggcttc	240
gacgtcatcg tcaacaacgc cggcgtggcg ccatccacgc cgatcgagtc cattaccccg	300
gagattgtcg acaaagtcta caacatcaac gtcaaagggg tgatctgggg catccaggca	360
gcggtcgagg cctttaagaa agagggtcac ggcgggaaaa tcatcaacgc ctgttcccag	420
gccggccacg tcggcaaccc ggagctggcg gtatatagct cgagtaaatt cgcggtacgc	480
ggcttaaccc agaccgccgc tcgcgacctc gcgccgtgg gcatcacggt caacggctac	540
tgcccgggga ttgtcaaac gccgatgtgg gccgaaattg accgccaggt gtccgaagcc	600
gccggtaaac cgctgggcta cggtagccgc gatttcgcca aacgcatcac cctcggccgc	660
ctgtccgagc cggaagatgt cgccgcctgc gtctcctatc ttgccagccc ggattctgat	720
tatatgaccg gtcagtcatt gctgatcgac ggcggcatgg tgtttaacta a	771