



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월25일
(11) 등록번호 10-2126318
(24) 등록일자 2020년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 13/12 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 11/00 (2006.01)
C12P 19/40 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12P 13/12 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7009704
- (22) 출원일자(국제) 2013년10월25일
심사청구일자 2018년10월25일
- (85) 번역문제출일자 2015년04월15일
- (65) 공개번호 10-2015-0076159
- (43) 공개일자 2015년07월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/072380
- (87) 국제공개번호 WO 2014/064244
국제공개일자 2014년05월01일
- (30) 우선권주장
12190150.8 2012년10월26일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (73) 특허권자
아디제오 프랑스 에스에이에스
프랑스, 에프-92160 안토니, 플레이스 듀 제너럴 드 팔, 10, 안토니 파크 2
- (72) 발명자
메르캄프 뤼리엘
프랑스 에프-91940 레 줄리 헤지당스 르 부아 뒤 화 32
루이스 도미니끄
프랑스 에프-91470 포르쥬 레 뱅 생 장 르 샤희도 네 22 뤼
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

- (56) 선행기술조사문헌
W02011031285 A1
Nucleic Acid Research, Vol. 24, pp. 2627-2631 (1996.)
Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, pp. 36380-36386 (2002.)
Plant Physiology, Vol. 128, pp. 454-462 (2002.)

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 **돌연변이된 시스타티오닌 감마 신타제를 이용한 0-포스포-L-호모세린 및 메탄티올로부터 L-메티오닌의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 효소적으로 변환시키는 L-메티오닌의 제조 방법을 제공한다. 상기 변환은 0-포스포-L-호모세린(OPHS) 의존적인 메티오닌 신타제라고 하는 효소에 의해 달성된다. 또한, 0-포스포-L-호모세린(OPHS) 의존적인 메티오닌 신타제, 즉, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 (뒷면에 계속)

대표도

	330	340	350	360	370	380	390	400
CGS1 A. thaliana AAC25687.1	LFTESFFNPLKVDIILVSEKGRGFLVCIQDTEATPLNQGLALGADLVESATRYLGGNDVLAGCIGSILKLS							
CGS1 0845 A. thaliana							
MFT02 CGS1-4							
MFT04 CGS1-4							
MFT13 CGS1-4V.R.....							
MFT18 CGS1-4							
MFT19 CGS1-4							
AD309 CGS1-5							
AD310 CGS1-5							
AD311 CGS1-5V.R.....							
AD312 CGS1-5							
AD313 CGS1-5							
AD242 CGS1-1							
AD328 CGS1-1							
AD329 CGS1-1							
MFT24 CGS1-1							
MFT27 CGS1-1							
MFT67 CGS1-1							
MFT68 CGS1-1							
MFT70 CGS1-1							
MFT71 CGS1-1							
MFT72 CGS1-1L.....F.....							
MFT74 CGS1-1							
MFT75 CGS1-1							
MFT78 CGS1-1							
MFT79 CGS1-1							

L-메티오닌과 H_3PO_4 로 효소적으로 변환할 수 있는 단백질과, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올로부터 L-메티오닌을 생산할 수 있도록 유전자 변형된 미생물을 개시한다. 또한, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 과정을 촉매하는 효소의 스크리닝 방법도 기술한다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/1085 (2013.01)

C12P 11/00 (2013.01)

C12P 19/40 (2013.01)

C12P 21/02 (2013.01)

C12Y 201/01013 (2013.01)

C12Y 205/01048 (2013.01)

(72) 발명자

자일라흐동 카린

프랑스 에프-91240 생 미셸 쉬르 오르주 튀 데 드
라공 22

토마스 도미니끄

프랑스 에프-91190 지프 쉬르 이베트 알레 데 그하
비에흐 드 라 살무이에 34

마리에르 필립

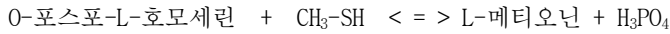
벨기에 비-7700 무스크론 튀 드 룰레그렘 173

명세서

청구범위

청구항 1

하기 반응식에 따라 O-포스포-L-호모세린(OPHS)과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는, L-메티오닌의 제조 방법으로서,



상기 효소에 의한 변환은, 돌연변이 유발에 의해 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)로부터 유래되는 단백질을, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제를 사용하여 달성되고,

상기 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제가 서열번호 6-29 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질로 이루어진 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 시험관내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 방법은 상기 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제를 생산하는 미생물을 사용함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을, 돌연변이 유발에 의해 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)로부터 유래되는 서열번호 6-29 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 통하여 효소에 의해 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 방법.

청구항 5

O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 가지며, 돌연변이 유발에 의해 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)로부터 유래되는 서열번호 6-29 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, O-포스포-L-호모세린과 설파이드를 L-호모시스테인 + H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 추가로 나타내는 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 따른 단백질을 코딩하는 핵산 분자로서,

상기 단백질은 O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 가진 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 8

제7항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 9

제7항에 따른 핵산 분자 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 10

제5항 또는 제6항에 따른 단백질을 코딩하는 핵산 분자 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포로서, 제5항 또는 제6항에 따른 단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 11

제9항에 따른 숙주 세포를 이용하여 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는, L-메티오닌의 제조 방법.

청구항 12

S-아데노실 메티오닌의 제조 방법으로서,

L-메티오닌을 생산하기 위해 제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 따른 방법을 포함하며, L-메티오닌을 S-아데노실 메티오닌으로 변환하는 단계를 더 포함하는, S-아데노실 메티오닌의 제조 방법.

청구항 13

시스테인의 제조 방법으로서,

L-메티오닌을 생산하기 위해 제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 따른 방법을 포함하며, L-메티오닌을 시스테인으로 변환하는 단계를 더 포함하는, 시스테인의 제조 방법.

청구항 14

글루타티온의 제조 방법으로서, L-메티오닌을 생산하기 위해 제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 따른 방법을 포함하며, L-메티오닌을 글루타티온으로 변환하는 단계를 더 포함하는, 글루타티온의 제조 방법.

청구항 15

2-옥소-4-메틸티오부타노에이트의 제조 방법으로서,

L-메티오닌을 생산하기 위해 제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 따른 방법을 포함하며, L-메티오닌을 2-옥소-4-메틸티오부타노에이트로 변환하는 단계를 더 포함하는, 2-옥소-4-메틸티오부타노에이트의 제조 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는, L-메티오닌의 제조 방법에 관한 것이다. 이러한 변환은 0-포스포-L-호모세린 (OPHS) 의존적인 메티오닌 신타제라고 하는 효소에 의해 달성된다. 또한, 본 발명은 0-포스포-L-호모세린 의존적인 메티오닌 신타제, 즉, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 효소적으로 변환할 수 있는 단백질을 제공한다. 또한, 본 발명은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올로부터 L-메티오닌을 생산할 수 있도록 유전자 변형된 미생물에 관한 것이다.
- [0002] 본 발명의 효소 및 방법은 또한 S-아데노실 메티오닌, 글루타티온, 시스테인, S-아데노실 호모시스테인 및 메틸-티오-아데노신 등의 메티오닌 유사체를 합성하는데에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올의 L-메티오닌과 H₃PO₄로의 변환을 촉매하는 효소를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

배경 기술

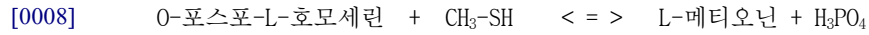
- [0003] L-메티오닌은, L-아스파르트릴 포스페이트의 활성화와 이후의 L-아스파르테이트 세미알데하이드 및 L-호모세린으로의 환원을 통해, L-아스파르테이트의 대사에 의해 합성되는, 필수 아미노산이다. 박테리아와 진균의 경우, L-호모세린은 0-아세틸화되어 숙시닐 또는 아세틸 에스테르를 형성하게 되며, 이는 설파이드 (SH₂)와 직접 황 축합됨으로써 L-호모시스테인을 형성하거나 또는 L-시스테인과 간접적으로 황 축합됨으로써 호모시스테인으로 변환되기에 앞서 L-시스타티오닌을 형성하게 된다. 호모시스테인은 메틸테트라하이드로폴레이트를 이용한 연속적인 메틸화에 의해 L-메티오닌으로 형성된다.
- [0004] 식물의 경우, 시스타티오닌의 전구체로서 사용되는 L-호모세린 에스테르는 0-포스포-L-호모세린이다. 시스타티오닌은 시스타티오닌 β 리아제 (lyase)의 작용에 의해, 호모시스테인으로 변환된다. 그런 다음, 호모시스테인이 메틸화되어, 메티오닌이 된다. 또한, 0-포스포-L-호모세린은, 박테리아, 식물, 진균 및 포유류 세포의 대사에서는, 포스포-피리독살 효소인 트레오닌 신타제 (EC 4.2.3.1)의 작용에 의해 L-트레오닌의 직접적인 전구체로서 형성된다. 식물의 경우, 0-포스포-L-호모세린 분기점에서 메티오닌과 트레오닌으로의 탄소 유입을 제어하기 위해 엄격한 조절이 존재하고 있다 (Amir et al., TRENDS Plant Science 7 (2002), 153). 문헌에 보고된 바에 따르면 (예컨대, Kreft et al., Plant Physiol. 104 (1994), 1215; Ravel et al., Arch. Biochem. Biophys. 316 (1995), 572), L-시스테인과 설파이드 (SH₂) 모두 식물의 시스타티오닌 감마 신타제에 의해 0-포스포-L-호모세린과 축합되어 L-시스타티오닌 및 L-호모시스테인이 되고, 동시에 포스페이트가 방출된다. 또한, 티올 기질 범위가 매우 한정적이어서, L-시스테인 이외에는 허용되는 기질의 수가 몇 종되지 않는 것으로 보고되어 있다.
- [0005] 메티오닌은 필수 아미노산이지만, 동물에서 드노보 (de novo) 합성되지 않기 때문에, 동물은 메티오닌 또는 메티오닌-함유 단백질이나 관련 황 함유 화합물을 섭취하여야 한다. 특히, 메티오닌은 가금류와 가축 사료에 필수적이지만, 이들이 섭취하는 식물성 물질에는 그 양이 충분하지 않다. 따라서, 효과적인 사육을 위해서는 외부 메티오닌이 공급되어야 한다. 지금까지 모두가 그런 것은 아닐지라도 동물 사료에 사용되는 대부분의 메티오닌은 석유화학에서 기원한 것이다. 메티오닌 생산에 있어 한가지 제약은 황의 환원에 소요되는 에너지 비용이다. 이에, 이 아미노산을, 바람직하게는 상업적인 규모의 메티오닌 합성에 적합한 미생물을 이용할 수 있는 재생가능한 자원을 이용함으로써, 아미노산을 생산하는 대안적인 방법을 제공할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

- [0006] 본 발명은, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는, L-메티오닌의 제조 방법을 제공함으로써, 이러한 과제를 해결한다. 상기한 방법에서, 황 소스는 메탄티올이다. 이 화합물에서, 황

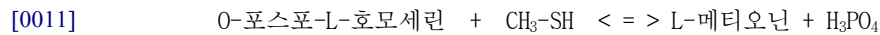
은 이미 환원된 설파이드로서 제공된다. 아울러, 전구체로서 0-포스포-L-호모세린을 사용하면, 아세틸화되거나 또는 숙시닐화된 호모세린 유도체의 사용에 의존하는 표준 대사 경로와 비교해, 합성되는 메티오닌 1 분자 당 탄소 원자가 2개 이상이 절약된다. 요컨대, 이 경로에 의하면 메티오닌 및 이의 유도체의 합성 수율이 훨씬 높아진다.

[0007] 이에, 본 발명은 L-메티오닌이 하기 반응식에 따라 효소적으로 생산되는, L-메티오닌 제조 방법에 관한 것이다:



[0009] 지금까지 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환하는 능력을 가진 단백질이 자연에 존재한다는 것은 보고된 바 없다. 본 발명자들은 비용 효율적인 방식으로 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올로부터 L-메티오닌을 생산하는 방법을 생각하게 되었고, 이를 위해 자연에 존재하지 않는 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 능력을 가지고 있는 단백질을 만들게 되었다. 첨부된 실시예들에서 확인되는 바와 같이, 본 발명자들은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 능력을 가진 효소를 구축할 수 있는 시스템을 개발하였다. 또한, 본 발명자들은 이 시스템을 활용함으로써, 기존 효소로부터, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 능력을 가진 새로운 효소 변이체를 구축하는데 성공하게 되었다. 이를 위해, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 능력이 없는 기존 효소를 출발 물질로하여, 이러한 기존 효소로부터 돌연변이를 제작하고, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 능력을 보이는 효소를 선별하게 되었다. 즉, 본 발명자들은 지금까지 개시된 바 없는 새로운 효소 활성을 확립하여, 해당 효소를 제조하는 신뢰성있고 재현가능한 방법을 제공할 수 있게 되었다. 이 효소는 본 발명의 내용에서는 0-포스포-L-호모세린 의존적인 메티오닌 신타제로 언급된다.

[0010] 이에, 본 발명은, 특히, 아래 반응식에 따라 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 효소적으로 변환하는, L-메티오닌 제조 방법에 관한 것으로서:



[0012] 상기한 효소 변환은 0-포스포-L-호모세린 의존적인 메티오닌 신타제를 사용함으로써 달성된다.

[0013] 기본적으로, 모든 0-포스포-L-호모세린 의존적인 메티오닌 신타제, 즉, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 능력을 가진 모든 단백질이 본 발명에 따른 방법에 채택될 수 있다. 본 발명은 최초로 이러한 활성을 발휘하는 단백질을 개시하며, 이러한 활성을 발휘하는 추가적인 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환하는 능력을 본래 가지고 있지 않은 식물의 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)에서 출발하여, 돌연변이 유발 및 선별을 통해 이러한 능력을 가진 변이체를 구축할 수 있다는 것을 개시한다.

[0014] 0-포스포-L-호모세린 의존적인 메티오닌 신타제는 아래 본 발명에 따른 단백질 내용에서 추가로 설명될 것이며, 기술된 임의의 0-포스포-L-호모세린 의존적인 메티오닌 신타제가 본 발명에 따른 방법에 채택될 수 있다.

[0015] 첨부된 실시예에서 명확하게 확인되는 바와 같이, 본 발명자들은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 능력을 나타내는 수종의 여러가지 단백질을 구축하는데 성공하였다. 이들 단백질의 서열들은 서열번호 6 - 29로 기재된다. 이들 단백질은, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환시키는 능력이 본래 없는 식물성 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)로부터, 실시예에 기술된 스크리닝 시스템으로 돌연변이 유발 및 선별함으로써, 구축한다.

[0016] 아울러, 서열번호 6 - 29로 기재된 서열에서 시작하여, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H_3PO_4 로 변환하는 활성을 보유한 추가의 단백질을 제공하는 것도 가능하다. 예를 들어, 기질 0-포스포-L-호모세린 및/또는 기질 메탄티올에 대한 단백질의 친화성을 더욱 높이거나, 또는 추가로 후술하는 바와 같이 단백질의 다른 특성을 개선하는 것도 가능한 일이다. 따라서, 본 발명에 따른 방법에 대한 바람직한 구현예에서, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올의 L-메티오닌과 H_3PO_4 로의 효소적 변환은 아래 열거된 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질을 이용함으로써 달성된다:

[0017] (a) 서열번호 6-29 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질; 및

[0018] (b) 서열번호 6-29 중 어느 하나와 60% 이상의 서열 동일성을 가지며, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을

L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 가진, 단백질.

- [0019] O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 효소 활성은, 예를 들어, 첨부된 실시예에 기술된 분석에 의해 평가할 수 있다. 이를 위해, 예를 들어, 메티오닌에 대한 영양요구 표현형을 가지고 있는 사카로마이세스 세레비지에 (*S. cerevisiae*)를 이용할 수 있다. 이러한 균주의 예는, 호모세린 트랜스-아세틸라제 및 호모시스테인 신타제 효소들이 제거되거나 또는 기능부전화된 균주이다. 바람직하게는, 이들 2가지 효소가 제거되거나 기능부전화 된다. 도 1에 도시된 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지에는 O-아세틸-호모세린만을 이용해 호모시스테인을 합성한 다음 이를 메티오닌으로 변환한다. O-아세틸-호모세린의 합성을 담당하는 효소 호모세린 트랜스아세틸라제는 MET2 유전자에 의해 코딩되어 있다. MET2가 불활성화되면, 호모세린은 더이상 O-아세틸 호모세린으로 변환되지 못하고, 호모세린 플럭스 전체는 포스포호모세린 쪽으로 방향을 돌리게 된다. MET2 촉매화된 반응은 효모의 경우 O-아세틸 호모세린의 유일한 소스이기 때문에, MET2 유전자의 불활성화시 효모 균주는 엄격한 메티오닌 영양요구성 표현형을 띄게 된다. 그러나, 호모시스테인 (마지막 메티오닌 전구체)은 시스테인 (황전달 (transsulfuration) 경로를 통해) 또는 S-아데노실메티오닌의 재순환으로부터도 유래될 수 있다. 메티오닌이 전혀 합성될 수 없다는 것을 보장하기 위해서는, 호모시스테인과 메틸-테트라하이드로폴레이트로부터 메티오닌을 합성하는 역할을 하는 호모시스테인 메틸-트랜스퍼라제의 코딩 유전자, 즉 MET6도 또한 제거한다.
- [0020] 이에, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 단백질의 능력을 검정하기 위한 분석에서는, MET2 유전자 및/또는 MET6 유전자, 바람직하게는 둘다가 결손 또는 파괴된 사카로마이세스 세레비지에를 이용할 수 있다. 2중 met2Δ met6Δ 파괴 균주는 메티오닌이 없는 조건에서는 성장할 수 없으며, 특히 황 소스로서 메탄티올이 존재하는 조건에서도 성장할 수 없다. 이러한 균주는 더이상 O-아세틸 호모세린을 합성 못하지만 O-포스포-호모세린은 생산할 수 있다. 이 효모 균주에, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 능력에 대해 테스트할 단백질을 코딩하는 핵산을 형질전환시킬 수 있다. 이 균주는 유일한 황 소스로서 메탄티올을 함유한 배지에서/배지 상에서 배양하며, 상기 배지에서의 증식력은 발현되는 단백질이 O-포스포-L-호모세린 (OPHS)과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환시킬 수 있음을 의미한다. 더 바람직하게는, 트레오닌 신타제를 코딩하는 유전자가, 예를 들어, 결손 또는 파괴에 의해 불활성화된 균주를 사용하는 것이다. met2Δ met6Δ 균주의 경우, THR1 유전자에 의해 코딩된 호모세린 키나제에 의해 촉매되는 반응을 통해 OPHS이 합성되지만, THR4 유전자에 의해 코딩된 트레오닌 신타제에 의해 트레오닌으로 활발히 변환되기 때문에 효과적으로 축적되지 못할 수 있다. 따라서, 이러한 3중 met2Δ met6Δ thr4Δ 돌연변이 균주는 매우 활성이 낮은 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제를 검출할 수 있어, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제 활성을 부여받은 새로운 단백질을 분리하는 1차 탐색 세포로서 사용된다.
- [0021] 또한, 이러한 효소 활성은, 검출할 단백질을 발현하는 효모 균주의 무세포성 추출물 또는 검출할 (부분) 정제된 단백질이 첨가된 적정 조건 하에 O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 인큐베이션하고, 내부 대조군으로서 C¹³ 메티오닌을 이용한 액체크로마토그래피/질량 분광측정/질량 분광측정 (LC/MS/MS)을 통해 메티오닌의 생성을 검출하는, 시험관내 분석으로 더욱 검증할 수 있다 (Ravanel et al. Archives of Biochemistry and Biophysics 316 (1995), 572-584).
- [0022] 상기한 시험관내 분석에 기질로서 사용되는 O-포스포-L-호모세린은 예를 들어 도 2에 도시된 공정에 따라 제공될 수 있다 (Barclay et al., J. Chem. Soc, Chem. Com (1994) 815-816).
- [0023] 전술한 바와 같이, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 발휘하는 단백질의 예는, 서열번호 6-29 중 어느 하나로 기술된 아미노산 서열을 가지는 단백질이다. 즉, 바람직한 일 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 서열번호 6-29 중 어느 하나에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 이용한다. 그러나, 이들 단백질의 변이체, 즉, 서열번호 6-29 중 어느 하나에 나타낸 서열과 서열 동일성이 높은 아미노산 서열을 포함하면서 O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 나타내는 단백질도, 물론 가능하다. 서열번호 6-29 중 어느 하나에 따른 서열에 대한 서열 동일성은 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상이며, 가장 바람직하게는 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다.
- [0024] 바람직하게는, 동일성 수준은 서열번호 6-29 중 임의의 하나로 기술된 아미노산 서열과 해당 서열을 비교함으로써 측정한다. 비교되는 서열들이 동일 길이를 가지지 않는 경우에는, 동일성 수준은 바람직하게는 긴 서열의

아미노산 잔기에 대한 짧은 서열에서의 동일한 아미노산 잔기의 퍼센트를, 또는 짧은 서열의 아미노산 잔기에 대한 긴 서열에서의 동일한 아미노산 잔기의 퍼센트를 나타낸다. 서열 동일성 수준은 바람직하게는 CLUSTAL 등의 적절한 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법에 따라 결정할 수 있다.

[0025] 특정 서열이 기준 서열에 대해 예를 들어 동일성이 80%인지를 확인하기 위해 Clustal 분석 방법을 이용하는 경우, 디폴트 세팅을 사용하거나, 또는 세팅은 바람직하게는 다음과 같다: 아미노산 서열 비교시, 매트릭스: blosum 30; 오픈 갭 패널티 (Open gap penalty): 10.0; 연장 갭 패널티 (Extend gap penalty): 0.05; 딜레이 다이버전트 (Delay divergent): 40; 갭 간격 (Gap separation distance): 8. 뉴클레오티드 서열 비교시, 연장 갭 패널티가 바람직하게는 5.0으로 설정된다.

[0026] 바람직하게는, 동일성 수준은 서열 전체 길이에 대해 계산한다. 아울러, "상동성"이라는 용어가 본 발명의 내용에 사용된다면, 이 용어는 바람직하게는 "서열 동일성"을 의미하는 것이다.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 방법은 L-메티오닌으로부터 유래되는 기타 황 함유 화합물을 생산할 수 있다. 상기한 화합물의 예는 S-아데노실 메티오닌, 글루타티온, 시스테인, S-아데노실 호모시스테인, 메틸-티오-아데노신 및 2-옥소-4-메틸티오타노에이트이다.

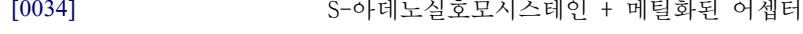
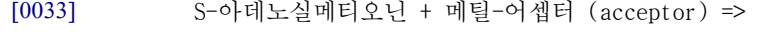
[0028] 이에, 본 발명은, 또한, 전술한 본 발명에 따른 L-메티오닌의 제조 방법을 포함하며, L-메티오닌이 하기 반응에 따라 S-아데노실 메티오닌으로 더욱 변환되는, S-아데노실 메티오닌의 제조 방법에 관한 것이다:



[0030] 이 효소 반응은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 반응을 촉매하는 효소 역시 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 이 효소를 S-아데노실메티오닌 신타제 (EC 2.5.1.6)라고 한다. 효모에서 이 효소에 해당되는 예가 SAM1 과 SAM2이다. 따라서, 상기 방법을 유기체에서 수행하는 경우, 이 유기체는 바람직하게는 L-메티오닌을 S-아데노실 메티오닌을 변환시키는/변환시킬 수 있는 대응되는 효소(들)를 과다 발현한다.

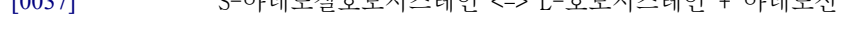
[0031] 또한, S-아데노실 메티오닌이 다른 대사 경로로 흘러가지 않도록 하기 위해 상기한 유기체를 더 변형시키는 것이 유익할 수 있다. 효모의 경우, 예를 들어, S-아데노실 메티오닌이 S-아데노실 호모시스테인으로 진행되는 유입율을 낮추기 위해 아데노신 키나제 활성 (효모의 경우 ADO1 유전자에 코딩된 EC 2.7.1.20)을 불활화하는 것이 유용할 수 있다.

[0032] 아울러, 본 발명은 전술한 본 발명에 따른 L-메티오닌 제조 방법을 포함하며, L-메티오닌을 시스테인으로 추가로 변환시키는, 시스테인 제조 방법에 관한 것이다. L-메티오닌의 시스테인으로의 변환은 종래 기술 분야에 공지되어 있으며, 당업자에게 공지된 수단 및 방법을 통해 달성할 수 있다. 예를 들어, L-메티오닌을 일차로 S-아데노실 메티오닌으로 변환시킨 후, 하기 반응에 따라 S-아데노실 호모시스테인으로 변환한다:



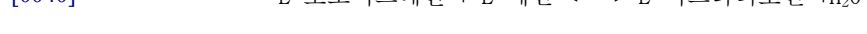
[0035] 상기 반응은 S-아데노실메티오닌-의존적인 메틸트랜스퍼라제에 의해 촉매된다.

[0036] 그런 후, S-아데노실 호모시스테인을 하기 반응에 따라 L-호모시스테인으로 추가적으로 변환시킬 수 있다:



[0038] 상기 반응은 S-아데노실호모시스테인 하이드롤라제, EC 3.3.1.1에 의해 촉매된다.

[0039] 이후, L-호모시스테인은 하기 반응에 따라 L-시스타티오닌으로 변환시킬 수 있다:



[0041] 상기 반응은 시스타티오닌 beta-신타제 (EC 4.2.1.22)에 의해 촉매된다.

[0042] 마지막으로, L-시스타티오닌은 하기 반응에 따라 시스테인으로 변환된다:

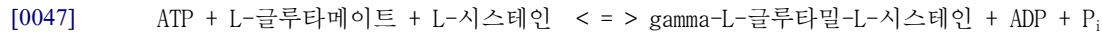


[0044] 상기 반응은 시스타티오닌 감마 리아제 (EC 4.4.1.1)에 의해 촉매된다.

[0045] 이 방법이 효모에서 수행된다면, 다음과 같은 유전자들이 과다발현되는 것이 좋다: SAM1, SAM2, SAH1, STR4 및

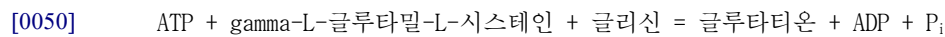
STR1. 아울러, 효모의 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 유전자 STR2는, 시스테인에서 호모시스테인으로의 역 합성을 줄이기 위해, 제거되어야 한다. 이와 같이, 효모는 유리하게는 메틸테트라하이드로폴레이트-의존적인 메티오닌 신타제를 무력하게 만드는 MET6 돌연변이 뿐만 아니라 주요 글루타티온 분해 경로에 참여하는 DUG2 유전자의 결손을 포함한다.

[0046] 아울러, 본 발명은, 전술한 본 발명에 따른 L-메티오닌 제조 방법을 포함하며, L-메티오닌을 글루타티온으로 추가적으로 변환하는, 글루타티온 제조 방법에 관한 것이다. L-메티오닌의 글루타티온으로의 변환은 종래 기술 분야에 공지되어 있으며, 당업자에게 공지된 수단 및 방법으로 달성할 수 있다. 예를 들어, L-메티오닌을 먼저 S-아데노실 메티오닌으로 변환한 다음, 이를 전술한 바와 같이 시스테인으로 변환하고, 수득한 시스테인을 다시 하기 반응에 따라 Glu-Cys (감마-L-글루타밀-L-시스테인)으로 변환한다:



[0048] 상기 반응은 글루타메이트 시스테인 리가제 (EC 6.3.2.2)에 의해 촉매된다.

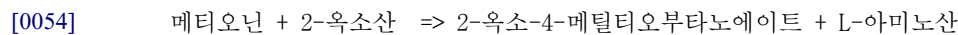
[0049] 제조된 Glu-Cys는 하기 반응에 따라 글루타티온으로 변환된다:



[0051] 상기 반응은 글루타티온 신타제 (EC 6.3.2.3)에 의해 촉매된다.

[0052] 이 방법이 효모에서 수행된다면, 효모는 시스테인 제조 방법과 관련한 전술한 바와 같이 조작하는 것이 바람직하며, 또한 효모는 시스테인을 글루타티온으로 변환하는데 참여하는 GSH1과 GSH2 유전자를 과다발현하여야 한다. 특히 바람직한 구현예에서, GSH1 유전자는 피드-백 내성 효소를 발현한다.

[0053] 또한, 본 발명은, 전술한 본 발명에 따른 L-메티오닌 제조 방법을 포함하며, L-메티오닌이 하기 반응에 따라 2-옥소-4-메틸티오투타노에이트로 추가로 변환되는, 2-옥소-4-메틸티오투타노에이트 제조 방법에 관한 것이다:



[0055] 상기 효소 반응은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 이 반응을 촉매하는 효소는 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 이들 효소를 메티오닌 트랜스아미나제 (EC 2.6.1.88)라 한다. 효모에서 이에 해당되는 효소의 예는 ARO8, BAT1, BAT2이다. 따라서, 이 방법을 유기체에서 수행하는 경우, 이 유기체는 바람직하게는 L-메티오닌을 2-옥소-4-메틸티오투타노에이트로 변환하는/변환할 수 있는 해당 효소(들)을 과다발현한다.

[0056] 2-옥소-4-메틸티오투타노에이트가 다른 대사 경로로 유입되는 것을 방지하기 위해, 유기체를 추가로 변형시키는 것이 유익할 수 있다. 효모의 경우, 예를 들어, 2-옥소-4-메틸티오투타노에이트가 3-(메틸티오)프로피온알데하이드으로 변환되는 공정에 유입되는 것을 낮추기 위해, 페닐피루베이트 데카르복실라제 활성 (EC 4.1.1.43, 효모의 경우 ARO10 유전자에 의해 코딩됨) 또는 피루베이트 데카르복실라제 활성 (EC 4.1.1.1, 효모의 경우 PDC1, PDC5 및 PDC6 유전자에 의해 코딩됨)을 불활화하는 것이 유용할 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 방법은 시험관내 또는 생체내에서 수행할 수 있다. 시험관내 반응은 세포가 사용되지 않는 반응, 즉 무세포성 반응으로 이해된다. 이에, 시험관내는 바람직하게는 세포-결핍 시스템을 의미한다. 용어 "시험관내"는 일 구현예에서 분리된 효소가 존재하는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 본 방법에 사용되는 효소는 정제된 형태로 사용된다.

[0058] 시험관내 공정을 수행하기 위해서는, 효소가 작용하고 효소적 변환이 이루어질 수 있는 조건 (완충제, 온도 등) 하에 반응 기질 및 효소를 인큐베이션한다. 반응은 L-메티오닌 생산에 충분한 기간 동안 진행될 수 있다. L-메티오닌의 생산은 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0059] 효소는 효소적 반응이 이루어질 수 있는 임의의 적절한 형태를 취할 수 있다. 효소는, 정제되거나 또는 부분 정제될 수 있거나, 또는 세포 조추출물 또는 부분 정제된 추출물 형태일 수 있다. 또한, 효소는 적정 담체에 고정된 형태일 수도 있다.

[0060] 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 능력을 가진 단백질을 생산하는 유기체, 바람직하게는 미생물의 존재 하에 배양 중에 수행된다. 이러한 단백질은 본원에 기술된 단백질이다.

[0061] 이러한 방법에 사용되는 유기체는 바람직하게는 본원에 기술된 본 발명에 따른 숙주 세포이다.

- [0062] 또한, 본 발명은 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환하는 능력을 가진 단백질에 관한 것이다. 본 발명에서는, 이런 효소를 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제로 언급한다. 전술한 바와 같이, 지금까지 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환하는 능력을 가진 단백질이 자연에 존재한다는 보고는 없었으며, 본 발명에서 최초로 전술한 본 발명의 방법에 따라 L-메티오닌을 생산할 수 있는 단백질을 제공하는 것이다.
- [0063] 바람직한 구현예에서, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환하는 능력을 가진 본 발명에 따른 단백질은 돌연변이 유발에 의해 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)로부터 유래된 것이다. 상기한 돌연변이 유발은, 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)의 아미노산 서열에서의, 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환 및/또는 하나 이상의 아미노산 잔기의 결손, 및/또는 하나 이상의 아미노산 잔기의 부가일 수 있다.
- [0064] 다양한 유기체들에서 시스타티오닌 감마 신타제가 알려져 있으며, 개시되어 있다. 예를 들어, 식물의 경우, 특히, 아라비둡스 탈리아나 (*A. thaliana*), 니코티나 타바쿰 (*Nicotiana tabacum*), 트리티쿰 아에스티붐 (*Triticum aestivum*), 솔라눔 라이코퍼시쿰 (*Solanum lycopersicum*), 램나 파우시코스타타 (*Lemna paucicostata*), 솔라눔 투베로섬 (*Solanum tuberosum*), 스피나시아 올레라시아 (*Spinacia oleracea*), 아스트라갈루스 라세모수스 (*Astragalus racemosus*), 아스트라갈루스 비설카투스 (*Astragalus bisulcatus*), 아스트라갈루스 시니쿠스 (*Astragalus sinicus*) 및 넵투니아 암플렉시카울리스 (*Neptunia amplexicaulis*)에서 350건 이상의 시스타티오닌 감마 신타제 서열들이 공지되어 있다.
- [0065] 시스타티오닌 감마 신타제는 또한 박테리아와 진균에서도 공지되어 있다. 박테리아의 경우 22,000개 이상의 서열이 개시되어 있으며, 박테리아 또는 진균 서열의 예는, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*), 살모넬라 에르테리카 (*Salmonella enterica*), 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 아그로박테리움 투메팩시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*), 알칼리게네스 패칼리스 (*Alcaligenes faecalis*), 아누리니바실러스 아누리닐라이티쿠스 (*Aneurinibacillus aneurinilyticus*), 바실러스 푸미우스 (*Bacillus pumilus*), 바실러스 섭틸리스 (*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 헬리코박터 필로리 (*Helicobacter pylori*), 라이시니바실러스 스페리쿠스 (*Lysinibacillus sphaericus*), 미코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 펙토박테리움 카로토보룸 (*Pectobacterium carotovorum*), 슈도모나스 다쿤헤 (*Pseudomonas dacunhae*), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*), 스트렙토마이세스 페오크로모게네스 (*Streptomyces phaeochromogenes*) 유래의 서열이다.
- [0066] 포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 활성을 발휘하는 단백질을 제공하는 방법은 첨부된 실시예에서 설명되며, 이는 아래에서 더욱 상세히 기술될 것이다. 기본적으로, 임의의 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)를 포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 활성을 발휘하는 단백질을 제공하기 위한 출발 물질로서 사용할 수 있다. 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)로부터 유래된, 포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 활성을 발휘하는 단백질은, 천연 시스타티오닌 감마 신타제의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 가진다.
- [0067] 바람직한 일 구현예에서, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 기원이 되는 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)는 식물의 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48), 바람직하게는 아라비둡시스 탈리아나의 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48) CGS1, 가장 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)이다. 더 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 방법에 사용되는 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제는 서열번호 2에 기재된 서열로부터 유래된다. 이 서열은 서열번호 1에 대응되지만, 84번 위치의 글리신 잔기가 세린 잔기로 치환된 것이다. 이런 치환, 즉 mto 돌연변이는 S-아데노실메티오닌에 의해 CGS1에 발휘되는 번역 후 역제를 완화한다 (Onoue et al. Journal of Biological Chemistry 286 (2011), 14903-14911). 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 방법에 사용되는 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제는 서열번호 3에 기재된 서열로부터 유래된다. 이 서열은, 아미노 말단에 위치한 염록체 타겟팅 서열 (1-57의 아미노산 잔기들)이 제거되고, 메티오닌 잔기가 N-말단에 부가된 것을 제외하고는, 서열번호 2와 동일하다.
- [0068] 본 발명에 따른 방법에 사용가능한 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 예는 다음과 같다:
- [0069] (i) 서열번호 3에서 하기 잔기로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환 또는 결손됨

으로써, 서열번호 3으로 나타낸 아미노산 서열을 가진 시스타티오닌 감마 신타제로부터 유래된, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제:

- [0070] (a) 프롤린 10;
- [0071] (b) 아스파라긴 11;
- [0072] (c) 글루타민 15;
- [0073] (d) 이소루신 27;
- [0074] (e) 알라닌 30;
- [0075] (f) 루신 45;
- [0076] (g) 세린 47;
- [0077] (h) 발린 60;
- [0078] (i) 알라닌 68;
- [0079] (j) 페닐알라닌 150;
- [0080] (k) 트레오닌 178;
- [0081] (l) 아스파르테이트 183;
- [0082] (m) 이소루신 185;
- [0083] (n) 트레오닌 220;
- [0084] (o) 메티오닌 232;
- [0085] (p) 발린 245;
- [0086] (q) 알라닌 257;
- [0087] (r) 아스파라긴 259;
- [0088] (s) 페닐알라닌 261;
- [0089] (t) 페닐알라닌 275;
- [0090] (u) 이소루신 287;
- [0091] (v) 히스티딘 289;
- [0092] (w) 티로신 324;
- [0093] (x) 글리신 326;
- [0094] (y) 프롤린 356;
- [0095] (z) 트레오닌 371;
- [0096] (aa) 발린 396;
- [0097] (bb) 프롤린 405;
- [0098] (cc) 아스파르테이트 431;
- [0099] (dd) 이소루신 436;
- [0100] (ee) 이소루신 457;
- [0101] (ff) 아스파르테이트 459;
- [0102] (gg) 프롤린 470;
- [0103] (hh) 글루타메이트 472;

- [0104] (ii) 알라닌 506;
- [0105] (jj) 이소루신 507.
- [0106] 또는
- [0107] (ii) 서열번호 3에서 상기 열거된 (a) - (jj) 중 임의의 하나에 해당되는 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환 또는 결손됨으로써, 서열번호 3으로 나타낸 아미노산 서열과의 서열 동일성이 60% 이상인 아미노산 서열을 가지는, 시스타티오닌 감마 신타제로부터 유래된 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제. 바람직하게는, 서열 동일성은 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상이다.
- [0108] 용어 "치환"은 지정된 위치에 존재하는 아미노산이 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것을 의미한다. 본 발명에서, "다른 아미노산 잔기들로 치환된다"는 것은, 지정된 위치에 존재하는 각 아미노산 잔기들이 임의의 다른 가능한 아미노산 잔기들로, 바람직하게는, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다. 특정 위치에 대한 바람직한 치환은 아래에 언급된다.
- [0109] 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 전술한 (a) - (jj) 위치들로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 해당되는 위치에 존재하는 아미노산 잔기들은, 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 당업자들이 파악할 수 있다. 예를 들어, 이러한 아미노산 잔기들은 서열번호 3에 나타낸 서열과 대상 서열을 정렬하고, 서열번호 3의 지정된 위치에 해당되는 위치를 찾음으로써, 파악할 수 있다. 정렬은, 예를 들어, Lipman-Pearson 방법 (Science 227 (1985), 1435) 또는 CLUSTAL 알고리즘 등의 공지된 컴퓨터 알고리즘을 이용함으로써, 당업자에게 공지된 수단 및 방법으로 행할 수 있다. 이러한 정렬시, 아미노산 서열에 존재하는 보존된 아미노산 서열에 최대 상동성이 할당되도록 하는 것이 바람직하다.
- [0110] 아미노산 서열에서 발생하는 삽입 또는 결손과 무관하게 아미노산 서열을 이런 방법을 이용하여 정렬하는 경우, 대응되는 아미노산 잔기의 위치는 주어진 서열에서 정해될 수 있다.
- [0111] 일 구현예에서, 본 발명의 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제는, 하기로 특정되는 아미노산 서열을 가진다:
- [0112] (i) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 10번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 루신으로 치환됨; 및/또는
- [0113] (ii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 11번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 아스파르테이트로 치환됨; 및/또는
- [0114] (iii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 15번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 아르기닌으로 치환됨; 및/또는
- [0115] (iv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 27번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0116] (v) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 30번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 트레오닌으로 치환됨; 및/또는
- [0117] (vi) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 45번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0118] (vii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 47번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 트레오닌으로 치환됨; 및/또는
- [0119] (viii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 60번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 아스파르테이트로 치환됨; 및/또는
- [0120] (ix) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 68번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 트레오닌으로 치환됨; 및/또는
- [0121] (x) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 150번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 루신으로 치환됨; 및/또는

- [0122] (xi) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 178번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 이소루신으로 치환됨; 및/또는
- [0123] (xii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 183번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 글루타메이트로 치환됨; 및/또는
- [0124] (xiii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 185번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 발린으로 치환됨; 및/또는
- [0125] (xiv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 220번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0126] (xv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 232번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 루신으로 치환됨; 및/또는
- [0127] (xvi) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 245번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 알라닌으로 치환됨; 및/또는
- [0128] (xvii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 257번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 트레오닌으로 치환됨; 및/또는
- [0129] (xviii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 259번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 아스파르트레이트 또는 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0130] (xiv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 261번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0131] (xx) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 275번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 루신으로 치환됨; 및/또는
- [0132] (xxi) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 287번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 발린 또는 페닐알라닌으로 치환됨; 및/또는
- [0133] (xxii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 289번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 티로신 또는 아르기닌으로 치환됨; 및/또는
- [0134] (xxiii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 324번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 페닐알라닌으로 치환됨; 및/또는
- [0135] (xxiv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 326번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0136] (xxv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 356번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 트레오닌으로 치환됨; 및/또는
- [0137] (xxvi) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 371번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 알라닌으로 치환됨; 및/또는
- [0138] (xxvii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 396번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 알라닌으로 치환됨; 및/또는
- [0139] (xxviii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 405번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0140] (xxix) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 431번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 글리신으로 치환됨; 및/또는
- [0141] (xxx) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 436번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 트레오닌으로 치환됨; 및/또는
- [0142] (xxxii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 457번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 루신으로 치환됨; 및/또는

- [0143] (xxxii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 459번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 아스파라긴으로 치환됨; 및/또는
- [0144] (xxxiii) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 470번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 세린으로 치환됨; 및/또는
- [0145] (xxxiv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 472번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 글리신으로 치환됨; 및/또는
- [0146] (xxxv) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 506번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 글리신으로 치환됨; 및/또는
- [0147] (xxxvi) 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 507번 위치의 아미노산 잔기 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 발린으로 치환됨.
- [0148] 또한, 본 발명은, 전술한 (i) - (xxxvi)로 정의되는 변이체에 관한 것으로서, 서열번호 3의 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 치환하는 것으로서 표시된 아미노산 잔기는, 특별한 아미노산 잔기가 아니라 언급된 치환 아미노산과 보존적인 아미노산 잔기이다.
- [0149] 아미노산이 다른 아미노산과 보존적인지는 당해 기술 분야에 공지된 방법과 수단으로 판단할 수 있다. 한가지 방법은 PAM 250 매트릭스이며; 다른 예로, Blosum Family Matrices를 이용할 수 있다.
- [0150] 일 구현예에서, 본 발명은, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 356번 위치 또는 이 위치에 대응되는 위치의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환된, 서열번호 3과 60% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가진, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은, 10, 11, 15, 27, 28, 30, 32, 45, 47, 60, 68, 104, 150, 178, 183, 185, 220, 232, 245, 257, 259, 261, 275, 287, 289, 324, 326, 371, 396, 405, 431, 436, 457, 459, 470, 472, 506 및 507번 위치들로 이루어진 군으로부터 선택되는, 바람직하게는 10, 11, 15, 30, 32, 45, 47, 68, 104, 150, 178, 183, 185, 220, 232, 245, 257, 259, 261, 275, 287, 289, 326, 371, 396, 405, 431, 436, 459, 470, 472, 506 및 507번 위치들로 이루어진 군으로부터 선택되는, 보다 더 바람직하게는 275 및 396번 잔기들로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서, 하나 이상의 다른 아미노산이 치환된, 단백질에 관한 것이다.
- [0151] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 다음과 같다:
- [0152] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 10, 27, 60, 324 및 457번 위치이다.
- [0153] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 32, 287, 289 및 356번 위치이다.
- [0154] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 10, 232, 245, 259, 356, 431 및 436번 위치이다.
- [0155] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 11, 15, 30, 45, 47, 68, 178, 356, 371 및 459번 위치이다.
- [0156] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 32 및 356번 위치이다.
- [0157] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 32, 60, 324 및 457번 위치이다.
- [0158] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 32, 287, 289 및 356번 위치이다.
- [0159] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 32, 232, 245, 259, 356, 431 및 436번 위치이다.
- [0160] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 32, 45, 47, 68, 178, 356, 371 및 459번 위치이다.
- [0161] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 232, 245, 259, 356, 431 및 436번 위치이다.
- [0162] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 178, 356, 371 및 459번 위치이다.
- [0163] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 150, 257, 259, 261, 275, 289, 356 및 506번 위치이다.
- [0164] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 185, 356 및 405번 위치이다.
- [0165] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 356, 396 및 472번 위치이다.
- [0166] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 326, 356 및 396번 위치이다.

- [0167] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 220, 275, 356 및 396번 위치이다.
- [0168] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 183, 275, 356, 396 및 507번 위치이다.
- [0169] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 287, 356, 396 및 507번 위치이다.
- [0170] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 356, 396 및 470번 위치이다.
- [0171] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 356 및 507번 위치이다.
- [0172] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 356 및 396번 위치이다.
- [0173] 일 구현예에서, 치환 및/또는 결손이 발생하는 위치는 275, 287 및 356번 위치이다.
- [0174] 이들 위치들에서의 바람직한 치환은 전술한 바와 같다.
- [0175] 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제는 또한 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열에서 1-103번 아미노산들에 해당되는 하나 이상의 N-말단 아미노산을 결손시킴으로써, 전술한 임의의 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제로부터 유래될 수 있는 효소이다. 실시예들에 기술된 바와 같이, 또한 전술한 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 절단된 형태 (truncated form), 예컨대 서열번호 3과 비교해 아미노산 잔기 31 또는 아미노산 103이 N-말단에서 결손된 절단된 형태 역시 효과적인 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제 활성을 발휘한다.
- [0176] 바람직한 일 구현예에서, 본 발명에 따른 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제는 또한 0-포스포-L-호모세린과 설파이드를 L-호모시스테인 + H₃PO₄로 변환하는 효소 활성을 나타낸다. 바람직하게는, 상기 설파이드는 Na₂S 등의 금속 설파이드이다. 이 경우, 변환은 하기 반응식에 따라 이루어진다:
- [0177] 0-포스포-L-호모세린 + Na₂S <=> L-호모시스테인 + H₃PO₄
- [0178] 0-포스포-L-호모세린 (OPHS)과 금속 설파이드를 L-호모시스테인 및 H₃PO₄로 변환하는 활성은, 0-포스포-L-호모세린 (OPHS)과 메탄티올을 L-메티오닌과 H₃PO₄로 변환하는 활성을 검출하는 것과 관련하여 전술된 바와 기본적으로 동일한 분석으로 검출할 수 있다. 이 경우, 이중 met2Δ met25Δ 효모 균주가 사용되며, 단독 설페이트 소스로서 Na₂S가 첨가된 배지에서 배양한다. 실제 MET25는 효모에서 공지된 유일한 공지된 호모시스테인 신타제 활성을 코딩하며, 0-아세틸-L-호모세린과 설파이드를 축합하는 과정을 촉매한다. 분석의 민감도는, 이중 met2 met25 돌연변이 외에도, 0-포스포-L-호모세린 축적을 유도하는 thr4 돌연변이를 포함하도록 조작된 사카로마이세스 세레비지에 균주를 이용함으로써, 쉽게 개선시킬 수 있다.
- [0179] 이러한 효소 활성은, 또한, 0-포스포-L-호모세린과 Na₂S를 검사할 단백질을 발현하는 효모 균주로부터 유래된 무세포성 추출물 또는 검사할 (일부) 정제된 단백질이 첨가된 적정 조건 하에 인큐베이션하고, 호모시스테인의 생산은 비색계 방법으로 검출하는, 시험관내 분석으로 추가로 검증할 수 있다 (Becker et al., Journal of Biochemical Chemistry 244(1969), 2418).
- [0180] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산 분자는 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 바람직하게는 DNA이다.
- [0181] 아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 벡터는 본 발명에 따른 단백질의 생산을 허용하기 위해 본 발명에 따른 핵산의 발현을 허용하는 벡터이다. 즉, 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 핵산은 바람직한 숙주 세포 또는 숙주 세포 시스템에서 발현을 허용하는 조절 서열의 발현과 작동가능하게 연결된다. 본 명세서 전체에서 사용되는 "작동가능하게 연결된다" 또는 "작동가능하게 연결된다"라는 용어는 발현 조절 서열에 적합한 조건 하에 발현이 달성되는 방식으로 발현되게 하는 핵산 분자에서 하나 이상의 발현 조절 서열과 코딩 영역 간의 연결을 지칭한다.
- [0182] 발현은 이중의 DNA 서열을, 바람직하게는 번역가능한 mRNA로의 전사를 포함한다. 식물 세포, 동물 세포 및 균 뿐만 아니라 박테리아에서 발현을 보장하는 조절 인자들이 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 것으로는 프로모터, 인핸서, 종결신호, 타겟팅 신호 등을 포괄한다. 그 예는 벡터에 대한 상세한 설명과 연계하여 아래에서 추가로 제공된다.
- [0183] 핵산 분자와 연결하여 사용하기 위한 프로모터는 이의 오리진 및/또는 발현시킬 유전자에 대해 동종 또는 이중

일 수 있다. 적합한 프로모터로는, 예를 들어, 그 자신을 구성적인 발현 (constitutive expression)이 되게 하는 프로모터이다. 그러나, 외부 영향에 의해 측정하는 지점에만 활성화되는 프로모터를 사용할 수도 있다. 인공 및/또는 화학적 유도성 프로모터도 이러한 상황에 사용할 수 있다.

- [0184] 본 발명에 따른 벡터는 O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환시킬 수 있는 단백질을 발현 및 생산하도록 (마이크로)유기체에 도입시킬 수 있다.
- [0185] 여러가지 발현 시스템에 대한 개괄은 예를 들어 Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516, in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544) and in Sawers et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4), Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463), Griffiths et al., (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440)에 기술되어 있다. 효모 발현 시스템에 대한 개괄은 예를 들어 Hensing et al. (Antonie van Leeuwenhoek 67 (1995), 261-279), Bussineau et al. (Developments in Biological Standardization 83 (1994), 13-19), Gellissen et al. (Antonie van Leeuwenhoek 62 (1992), 79-93), Fleer (Current Opinion in Biotechnology 3 (1992), 486-496), Vedvick (Current Opinion in Biotechnology 2 (1991), 742-745) 및 Buckholz (Bio/Technology 9 (1991), 1067-1072)에 기술되어 있다.
- [0186] 발현 벡터는 문헌에 널리 기술되어 있다. 일반적으로, 발현 벡터는 선택 마커 유전자와 선택한 숙주에서의 복제를 보장하는 복제-오리진 뿐만 아니라 박테리아 또는 바이러스 프로모터를 포함하며, 대부분의 경우에는 전사 종결 신호도 포함한다. 프로모터와 종결 신호 사이에, 일반적으로 코딩 DNA 서열을 삽입하기 위한 하나 이상의 제한 부위 또는 폴리링커가 존재한다. 선택한 숙주 유기체에서 활성인 경우에는, 해당 유전자의 전사를 본래 조절하는 DNA 서열을 프로모터 서열로서 사용할 수 있다. 그러나, 이 서열은 다른 프로모터 서열로 치환될 수도 있다. 유전자의 구성적인 발현을 보장하는 프로모터와 유전자의 발현을 의도적으로 조절할 수 있는 유도성 프로모터를 이용하는 것도 가능하다. 이러한 특성을 가진 박테리아 프로모터 서열 및 바이러스 프로모터 서열들은 문헌에 상세히 기술되어 있다. 미생물 (예, *E. coli*, *S. cerevisiae*)에서의 발현 조절 서열 발현도 문헌에 자세히 기술되어 있다. 하류 서열의 특히 높은 수준의 발현을 허용하는 프로모터로는, 예컨대 T7 프로모터 (Studier et al., Methods in Enzymology 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer et al., in Rodriguez and Chamberlin (Eds), Promoter, Structure and Function; Praeger, New York, (1982), 462-481; DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 21-25), lp1, rac (Boros et al., Gene 42 (1986), 97-100)를 포함한다. 유도성 프로모터는, 바람직하게는, 폴리펩타이드의 합성에 사용된다. 이들 프로모터는 대개 구성적인 프로모터 보다 폴리펩타이드의 수율을 더 높인다. 폴리펩타이드를 최적량으로 수득하기 위해, 2단계 공정이 보통 사용된다. 먼저, 숙주 세포를 최적 조건 하에 비교적 고 세포 밀도로 배양한다. 두번째 단계에서는, 사용되는 프로모터의 타입에 따라 전사를 유도한다. 이와 관련하여, tac 프로모터는 특히 락토스 또는 IPTG (=이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드)에 의해 유도될 수 있어 특히 적합하다 (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25). 전사 종결 신호 역시 문헌에 기술되어 있다.
- [0187] 숙주 세포를 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질전환하는 것은, 예를 들어 Sambrook 및 Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990에 기술된 바와 같이, 표준 방법으로 수행할 수 있다. 숙주 세포는 사용되는 구체적인 숙주 세포의 요건, 특히 pH 값, 온도, 염 농도, 호기, 항생제, 비타민, 미량 원소 등을 충족시키는 영양분 배지에서 배양한다.
- [0188] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터를 포함하거나/형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 이러한 숙주 세포는 본 발명에 따른 단백질을 발현하며, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환할 수 있다. 기본적으로, 숙주 세포는 임의의 인지가능한 숙주 세포, 예컨대, 동물 세포, 식물 세포, 진균 세포 또는 박테리아 세포일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아 세포 또는 진균 세포이다. 특히 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는, 박테리아 세포, 예를 들어, 에스케리키아, 코리네박테리움, 클로스트리듐, 바실러스 또는 액시네토박터 속의 박테리아 세포이며, 더 바람직하게는 에스케리키아 콜라이 (*E. coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 바실러스 썬틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 액시네토박터 빌란디 (*Acinetobacter villandi*) 중이다.
- [0189] 다른 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 진균 세포, 예컨대, 사카로마이세스, 칸디다, 아시비야, 클루베로마이세스, 피키아, 야로이와, 지고사카로마이세스, 아스퍼질러스, 데바리오마이세스 또는 토룰롭시스 속의 진균 세포, 더 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지애 (*S. cerevisiae*), 사카로마이세스 막시무스 (*Saccharomyces*

maximus), 칸디다 말토사 (*Candida maltosa*), 아시비야 고싹피 (*Ashbya gossypii*), 클루베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 피키아 패스토리스 (*Pichia pastoris*), 피키아 스티비티스 (*Pichia stipitis*), 야로이와 리폴리티카 (*Yarrowia lipolitica*), 아스퍼질러스 나이거 (*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 니둘란스 (*Aspergillus nidullans*), 데바리오마이세스 한센이 (*Debaryomyces hansenii*) 또는 톨룰롭시스 유틸리스 (*Torulopsis utilis*) 중이다. 특히 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 효모 세포이다.

- [0190] 전술한 바와 같이, 본 발명은, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 제조 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0191] (i) 돌연변이된 시스타티오닌 감마 신타제를 생산하기 위해, 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)를 코딩하는 핵산 분자에 돌연변이를 유발하는 단계;
- [0192] (ii) (i) 단계에서 수득한 돌연변이된 핵산 분자를 숙주 세포에서 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 선별할 수 있는 배양 조건 하에 발현하는 단계;
- [0193] (iii) 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 단백질을 발현하는 숙주 세포를 동정하는 단계; 및
- [0194] (iv) 단계 (iii)에서 동정한 숙주 세포로부터 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 돌연변이된 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 핵산 분자를 수득하는 단계.
- [0195] 또한, 본 발명은, 본 발명에 따른 전술한 방법에 따라 수득되는 핵산 분자를 발현하는 단계 및 코딩된 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0196] 용어 "시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)"는 시스타티오닌 감마 신타제의 효소 활성을 가진 임의의 효소를 지칭한다. 시스타티오닌 감마 신타제는 하기 반응을 촉매하는 효소이다:
- [0197] $O_4\text{-숙시닐-L-호모세린} + \text{L-시스테인} \rightleftharpoons \text{L-시스타티오닌} + \text{숙시네이트}$
- [0198] 이 활성은 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다 (Ravanel, Biochem. J. 331 (1998), 639-648).
- [0199] 본 발명에 따른 전술한 방법에서 단계 (i)에서, 돌연변이된 시스타티오닌 감마 신타제를 생산하기 위해 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 핵산 분자의 돌연변이된 버전을 제조한다. 핵산 분자의 돌연변이 유발 방법은 당해 기술 분야의 당업자에 널리 공지되어 있다. 즉, 분자 생물에서 공통적으로 사용되는 방법에 의해 여러가지 타입의 돌연변이를 핵산 분자에 삽입하여 (예, Sambrook and Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA), 출발 서열과 비교해 변형된 아미노산 서열을 가진 시스타티오닌 감마 신타제의 합성을 유도한다. 기본적으로, 핵산 분자 수준에서의 임의 타입의 돌연변이는 결손, 부가 및/또는 치환과 같이 인지가능하다. 바람직한 구현예에서, 핵산에 실시되는 돌연변이는 아미노산 서열 수준에서의 아미노산의 치환을 유도한다.
- [0200] 핵산 분자 당 오직 1개의 돌연변이를 수행할 수 있지만, 물론 핵산 분자에 하나 이상의 돌연변이를 수행하여, 아미노산 수준에서 하나 이상의 돌연변이를 만들 수 있다. 원칙적으로 돌연변이의 수에는 상한이 없다. 그러나, 돌연변이된 핵산 분자는 전술한 방법의 단계 (i)에서 사용된 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 출발 신호와 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 80%, 특히 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 가지는 것이 바람직하다.
- [0201] 바람직한 구현예에서, 상기 방법의 단계 (i)에서 수득되는 돌연변이된 핵산 분자는, 출발 핵산 분자에 의해 코딩되는 시스타티오닌 감마 신타제와 비교하여, 아미노산 잔기들에서 20개 보다 많지 않은, 바람직하게는 15개 보다 많지 않은, 더 바람직하게는 10개 보다 많지 않은, 특히 바람직하게는 5개 보다 많지 않은 수의 변화를 나타내는, 시스타티오닌 감마 신타제의 돌연변이된 버전을 코딩한다.
- [0202] 본 발명에 따른 방법의 단계 (i)에서, 용어 "시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48)를 코딩하는 핵산 분자"는 전술한 바와 같은 시스타티오닌 감마 신타제의 효소 활성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 지칭한다. 기본적으로, 이러한 효소를 코딩하는 임의의 핵산 분자는 출발 물질로서 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있다. 시스타티오닌 감마 신타제와 이의 천연 발생은 상기에 상세히 기술되어 있다. 이들 시스타티오닌 감마 신타제

중 임의의 것을 코딩하는 임의 핵산은, 본 발명에 따른 방법의 단계 (i)에서 사용할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 단계 (i)에서 사용되는 핵산 분자는 식물의 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 핵산 분자이다. 보다 더 바람직하게는, 시스타티오닌 감마 신타제는 아라비둡시스 탈리아나 (*A. thaliana*) 유래의 것이며, 바람직하게는 서열번호 1에 나타난 바와 같이 아라비둡시스 탈리아나의 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0203] 단계 (i)에 사용되는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열은 단계 (ii)에서 사용되는 숙주 세포에 사용하도록 개조될 수 있다. 예를 들어, 사용된 숙주 세포의 번역 장치 (translation machinery)의 코돈 용법에 더 가까워지도록 코돈 용법에 변화를 가할 수 있다. 즉, 핵산 분자는 단계 (ii)에서 사용된 숙주 세포와 관련하여 최적화된 코돈 용법을 나타내도록 변형시킬 수 있다.

[0204] 아울러, 본 발명에 따른 방법을 위해 식물의 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 핵산 분자 등의 특정 핵산 분자를 개조하기 위해, 다른 변형이 필수적이거나 또는 바람직할 수 있다. 예를 들어, 식물의 시스타티오닌 감마 신타제는 일반적으로 아미노 말단에 단백질을 염록체로 가게 하는 염록체 타겟팅 서열을 포함한다. 단계 (ii)에 사용되는 숙주 세포에 따라, 이 타겟 서열을 제거하는 것이 필요하거나 바람직할 수 있다. 예를 들어, 단계 (i)에 효소 세포가 사용된다면, 염록체 타겟 서열을 제거하는 것이 바람직하다. 아울러, 식물의 시스타티오닌 감마 신타제는, 식물의 세포내 S-아데노실메티오닌 (SAM) 풀의 증가에 의해 매개되는 번역 조절을 허용하는, 조절 영역 (mto 영역이라고도 함)을 포함할 수 있다. SAM은 번역되는 동안에 이 mto 영역과 일부 리보솜에 의해 형성되는 포켓 안에서 시스타티오닌 감마 신타제의 초기 펩타이드에 결합함으로써, 번역을 정지시킨다. 본 발명에 따른 방법을 실시하는 경우에는 이런 조절은 피하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 단계 (i)에서는, SAM에 의한 이러한 조절을 방지하기 위해 변형된 식물의 시스타티오닌 감마 신타제 코딩 서열을 사용한다. 이러한 변형은 종래 기술 분야에, 예를 들어 Onoue al. (*Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), 14903-14911)에 기술되어 있다. 아울러, 시스타티오닌 감마 신타제의 보다 안정적인 버전을 만드는 서열을 출발 핵산 분자로 사용할 수도 있다. 2번째 N 말단 서열의 아이덴티티가 전체 단백질 안정성을 결정하는 것으로 알려져 있다 (Varshavsky, *Annual Review of Biochemistry* 81 (2012), 167-176). 따라서, 불안정한 잔기 (특히 Tyr, Gln, Leu, Phe, Asp, Lys, Arg)는 피하고, Val 또는 Ser 등의 안정성 잔기를 선호하는 것이 좋다 (Varshavsky, *Annual review of Biochemistry* 81 (2012), 167-176).

[0205] 본 발명의 단계 (ii)에 따른 돌연변이된 핵산 분자의 발현은 당해 기술 분야의 당업자에 공지된 방법으로 달성할 수 있다. 또한, 발현 시스템은 본 발명에 따른 벡터 및 숙주 세포와 관련하여 이미 앞에서 언급하였다.

[0206] 본 발명에 따른 방법의 단계 (ii)에서, 숙주 세포는 돌연변이된 시스타티오닌 감마 신타제를 발현시키기 위해 사용되며, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소에 의해 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 선별할 수 있다. 이런 맥락에서, 예를 들어, 숙주 세포가 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌을 변환시킬 수 있다면, 단독 황 소스로서 메탄티올을 포함하는 배지에서 배양하였을 때 생존할 수 있는 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이런 숙주 세포에 대한 일례가, met2의 기능이 적어도 결여되도록 유전자 변형된 사카로마이세스 세레비지에 세포이다. MET2 유전자는 호모세린과 아세틸-CoA를 0-아세틸 호모세린과 CoA로 변환하는 과정을 촉매하는 호모세린 트랜스-아세틸라제를 코딩한다. Met2 유전자의 불활성화로 효모 균주는 메티오닌 영양 요구성 표현형을 나타내게 된다. 바람직하게는, 또한 met6 유전자는 MET2 기능이 결여된 효모 균주에 기능부전을 추가하여야 한다. MET6 유전자는 호모시스테인과 메틸테트라하이드로폴레이트를 메티오닌으로 변환하는 호모시스테인 메틸-트랜스퍼라제를 코딩한다. 사카로마이세스 세레비지에는 필수 아미노산인 메티오닌을 호모시스테인으로부터 합성하는 방식 이외의 다른 임의의 방식은 가지고 있지 않기 때문에, MET2 기능 (및 선택적으로 MET6 기능도)이 결여된 사카로마이세스 세레비지에 균주는 다른 수단에 의해 메티오닌을 생산할 수 있는 경우에만 생존할 수 있다.

[0207] 단계 (ii)에서 배양 조건 역시 숙주 세포가 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 경우에만 생존할 수 있는 방식으로 개조된다. 이는 배양 배지에 단독 황 소스로서 메탄티올을 사용함으로써 달성할 수 있다.

[0208] 더 바람직하게는, MET2 및 MET6 유전자 외에도, THR4 유전자도 불활성화된다. 이러한 불활성화는 OPHS의 세포내 풀을 증대하기 위한 것이다. 이 경우, 형질전환된 숙주 세포를 메티오닌 대신 트레오닌과 메탄티올이 첨가된 배지에서 배양한다. 이 숙주 세포를 사용하게 된다면, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 활성을 매우 약하게만 나타내는 돌연변이를 분리할 수 있다.

[0209] 상기 방법의 단계 (iii)에서 동정된 숙주 세포는 이후 이를 사용하여, 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 효소

에 의해 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 돌연변이된 시스타티오닌 감마 신타제를 코딩하는 핵산 분자를 수득한다. 이는 당해 기술 분야의 당업자에 공지된 방법으로 행할 수 있다.

- [0210] 분리된 핵산 분자는 이후 해당 효소를 발현하는데 사용하거나, 또는 다른 숙주 세포에 도입할 수 있다.
- [0211] 바람직한 구현예에서, O-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌으로 변환할 수 있는 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 제조 방법은, 수회의 스크리닝, 즉, 돌연변이화 및 원하는 활성을 나타내는 해당 돌연변이의 분리를 포함한다.
- [0212] 이런 맥락에서, 1차 스크리닝에서는, MET2, MET6 및 THR4 유전자가 불활성화된 숙주 세포를 사용하는 것이 바람직하다. 전술한 바와 같이, 이런 숙주 세포를 사용함으로써, OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 활성을 매우 약하게 나타내는 돌연변이를 분리할 수 있다. 그런 후, 분리된 돌연변이를 다음 회차의 돌연변이화를 수행한 다음, MET2와 MET6 유전자만 불활성화되고 thr4 유전자는 활성형인 숙주 세포에서 OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 활성을 선별한다. OPHS의 일부가 트레오닌 신타제에 의해 이용되기 때문에 이 스크리닝은 매우 엄격하다. 이 경우, 원하는 효소 특성을 가진 클론 선별에 사용되는 숙주 세포는 황 소스로서 메탄티올이 첨가된 배지에서 배양한다.
- [0213] 2차 스크리닝은 반복적으로 수행할 수 있으며, 배지에 첨가하는 메탄티올의 양을 줄이고 가장 빠른 증식율을 나타내는 형질전환된 균주를 선별함으로써 선별압을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0214] **도 1**은 사카로마이세스 세레비지에의 메티오닌 생합성 경로를 간단히 도시한 것이다 (출처: Thomas D. and Y. Surdin-Kerjan; Microbiological and Molecular Reviews 61 (1997); Metabolism of Sulfur Amino-acids in *Saccharomyces cerevisiae.*, page 503-532).

도 2는 O-포스포-L-호모세린의 화학적인 합성 경로를 도시한 것이다.

도 3은 효소의 돌연변이 버전을 구축하기 위해 출발 물질로서 사용된 CGS1의 절단된 형태를 도식적으로 나타낸 것이다.

도 4는 AD242 또는 the AD328 CGS1 변이체를 발현하거나, 또는 대조군 벡터 pAL06를 보유한, YA246-4A 균주의 메티오닌 0.05mM 첨가 배지에서의 증식을 나타낸 것이다.

도 5는 각각 CGS1-4 (A), CGS1-5 (B) 및 CGS1-1 (C) 돌연변이 패밀리를 발현하는 YA246-4A계 균주의 메티오닌 0.1mM 첨가 배지에서의 증식을 나타낸 것이다. CGS1-4 (G84S)와 pAL06 빈 벡터를 가진 음성 대조군을 모든 그래프에 도시한다.

도 6은 메탄티올 1mM (A) 또는 0.1mM (B) 첨가된 배지에서, CGS1-4 돌연변이 패밀리 AD242, AD328, MUT24 및 MUT27을 발현하는 YA247-5A계 균주의 증식을 나타낸 것이다. CGS1-4 (G84S)와 pAL06 빈 벡터를 가진 음성 대조군을 모든 그래프에 도시한다.

도 7은 CGS1의 동정된 돌연변이들을 정렬한 것이다.

서열에 대한 설명:

서열번호 1은 아라비돕시스 탈리아나 유래 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48) CGS1의 아미노산 서열 (AAC25687.1)이다.

서열번호 2는 아라비돕시스 탈리아나 유래 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48) CGS1의 아미노산 서열 (AAC25687.1)에서, 84번 글리신이 세린으로 치환된 것이다. 이 서열은 CGS1 G84S 또는 CGS1-0으로도 언급된다.

서열번호 3은 아라비돕시스 탈리아나 유래 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48) CGS1의 아미노산 서열 (AAC25687.1)에서, 84번 글리신이 세린으로 치환되고, N-말단의 57개의 아미노산이 제거되고, 메티오닌 잔기가 N-말단에 부가된 것이다. 이 서열은 CGS1 1-4 G84S로도 언급된다.

서열번호 4는 아라비돕시스 탈리아나 유래 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48) CGS1의 아미노산 서열 (AAC25687.1)의 절단된 형태로서, N-말단의 88개의 아미노산이 제거되고, 메티오닌 잔기가 N-말단에 부가된 것이다. 이 서열은 CGS1 1-5 G84S로도 언급된다.

서열번호 5는 아라비돕시스 탈리아나 유래 시스타티오닌 감마 신타제 (EC 2.5.1.48) CGS1의 아미노산 서열

(AAC25687.1)의 절단된 형태로서, N-말단의 160개의 아미노산이 제거되고, 메티오닌 잔기가 N-말단에 부가된 것이다. 이 서열은 CGS1 1-1 G84S로도 언급된다.

- 서열번호 6은 돌연변이 MUT02의 서열이다.
- 서열번호 7은 돌연변이 MUT04의 서열이다.
- 서열번호 8은 돌연변이 MUT13의 서열이다.
- 서열번호 9는 돌연변이 MUT18의 서열이다.
- 서열번호 10은 돌연변이 MUT19의 서열이다.
- 서열번호 11은 돌연변이 AD309의 서열이다.
- 서열번호 12는 돌연변이 AD310의 서열이다.
- 서열번호 13은 돌연변이 AD311의 서열이다.
- 서열번호 14는 돌연변이 AD312의 서열이다.
- 서열번호 15는 돌연변이 AD313의 서열이다.
- 서열번호 16은 돌연변이 AD242의 서열이다.
- 서열번호 17은 돌연변이 AD328의 서열이다.
- 서열번호 18은 돌연변이 AD329의 서열이다.
- 서열번호 19는 돌연변이 MUT24의 서열이다.
- 서열번호 20은 돌연변이 MUT27의 서열이다.
- 서열번호 21은 돌연변이 MUT67의 서열이다.
- 서열번호 22는 돌연변이 MUT68의 서열이다.
- 서열번호 23은 돌연변이 MUT70의 서열이다.
- 서열번호 24는 돌연변이 MUT71의 서열이다.
- 서열번호 25는 돌연변이 MUT72의 서열이다.
- 서열번호 26은 돌연변이 MUT74의 서열이다.
- 서열번호 27은 돌연변이 MUT75의 서열이다.
- 서열번호 28은 돌연변이 MUT78의 서열이다.
- 서열번호 29는 돌연변이 MUT79의 서열이다.

본원에 인용된 문헌의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

본 발명의 그외 측면들과 이점은 아래 실시예들에서 기술될 것이며, 실시예들은 예를 들기 위한 것일 뿐 한정하고자 하는 것은 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0215]

실시예

[0216]

실시예 1: 돌연변이 제조를 위해 출발 물질로서 사용되는 CGS1의 절단된 형태 제조

[0217]

CGS1-4 유전자는 합성 유전자이다. 합성은 사카로마이세스 세레비지애에서의 이의 발현을 개선시키고자 코돈 용법을 최적화하기 위해 GENEius 알고리즘을 이용하여 Eurofins MWG Operon (Ebersberg)에서 수행하였다. 사용되는 사카로마이세스 세레비지애의 코돈 용법 표는 Kazusa Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon>)에서 입수하였다. 절단형 CGS1-5와 CGS1-1은 매트릭스로서 CGS1-4를 이용하고 CGS1-5의 경우 정방향 올리고뉴클레오티드 GTACCGCTCGAGATGGTTGCTGGTAAGTGGTCTAACAATC와 CGS1-1의 경우 GTACCGCTCGAGATGCTGTTCAATTGACCGATTCTAAG을 이용하여 PCR함으로써 제조된 것이다. CGS1-5 및 CGS1-1 포맷에

는 동일한 역방향 올리고뉴클레오티드 AGTACGGGATCCTCAAAATGGCTCCA를 사용하였다.

[0218] CGS1에 대한 기술된 절단 변이형은 도 3에 개략적으로 도시된다.

[0219] **실시예 2: CGS1의 절단된 돌연변이 형태의 제조**

[0220] CGS1 유전자의 절단된 형태를, pRS316 벡터로부터 유래된 효모 복제가능한 벡터인 pAL06 플라스미드에 클로닝하였다 (Sikorski RS & Hieter P., Genetics. 1989, 122:19-27). pAL06 플라스미드는 강력한 효모 프로모터 TEF1의 통제 하에 클로닝된 유전자를 발현시킨다. Vartanian JP et al., (Nucleic Acids Res. 1996 24:2627-2631)에 기술된 프로토콜로 편향된 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dNTP) 농축물을 사용하여 과잉돌연변이 유발성 PCR에 의해, CGS1 라이브러리를 제작하였다. 돌연변이 유발성 PCR 중에 [dTTP] > [dCTP] 및 [dGTP] > [dATP] 편향을 사용하였다. [dTTP]/[dCTP] = [dGTP]/[dATP] = 1000 μM / 200 μM 또는 [dTTP]/[dCTP] = [dGTP]/[dATP] = 1000 μM / 150 μM을 0.5 mM MnCl₂ 존재 하에 사용하였다.

[0221] **실시예 3: 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올로부터 L-메티오닌을 생산할 수 있는 돌연변이의 스크리닝**

[0222] CGS1 라이브러리를 효모 균주 YA247-5A (MAT-α, ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, trp1, ura3) 또는 YA246-4A (MAT-a, ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, thr4::loxP, trp1, ura3)에 메티오닌이 보충되고 플라스미드 마커를 선별하기 위해 우라실은 결여된 최소 배지에서 형질전환하였다. 48시간 배양 후, 세포를 수집하여 세척한 다음, 황 소스로서 메틸머캅탄이 첨가된 최소 액체 배지에 재-현탁하였다. 7일 후, 배양물의 취하여, 동일 액체 배지에 OD_{600nm} 약 0.2로 희석하였다. 3번의 연속적인 희석 사이클을 수행하였다.

[0223] 수득한 배양 효모 세포에 존재하는 플라스미드를 이후 추출하여, E. coli에서 증폭시킨 다음, 수득한 DNA를 사용하여 균주 YA247-5A (MAT-α, ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, trp1, ura3) 또는 YA246-4A (MAT-a, ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, thr4::loxP, trp1, ura3)에 재-형질전환하였다. 형질전환된 효모는 메티오닌이 첨가되나 우라실은 결핍된 최소 고체 배지에서 선별하였다. 그런 후, 각 개별 콜로니가 황 소스로서 메틸머캅탄을 이용하여 증식하는 증식력을, 황 원소로서 메탄티올이 함유된 액체 배지에서 개개 클론을 배양함으로써, 평가하였다. 각 증폭 사이클에서, 메탄티올 존재 하에 최상의 증식율을 보이는 효모 클로니에 존재하는 플라스미드를 추출하여, 서열분석하였다. 선별된 돌연변이는 시험관내 분석을 위해 YA247-5A 균주에 형질전환하였고, 새로운 과잉 돌연변이 유발성 PCR의 출발 물질로서 사용하였다.

[0224] 전술한 스크리닝 공정을 이용하여, 단독 황 소스로서 메탄티올에서 증식하며 0-포스포-L-호모세린과 메탄티올을 L-메티오닌로 변환할 수 있는 것으로 추측되는 상당수의 CGS1 돌연변이를 동정하였다. 이들 돌연변이들에서 서열을 결정하였으며, 돌연변이를 하기 표 1A에 요약개시하며, 표에서 돌연변이의 위치는 서열번호 3 (CGS 1-4)으로 제시된 서열을 기준으로 표시된다. 또한, 돌연변이를 정렬하여 도 7에 요약 개시한다.

[0225] **표 1A**

표 1

[0226]

아미노산	위치	돌연변이(들)
P	10	L
N	11	D
Q	15	R
I	27	S
A	30	T
L	45	S
S	47	T
V	60	D
A	68	T
F	150	L
T	178	I
D	183	E
I	185	V
T	220	S
M	232	L
V	245	A
A	257	T

N	259	D, S
F	261	S
F	275	L
I	287	V, F
H	289	Y, R
Y	324	F
G	326	S
P	356	T
T	371	A
V	396	A
P	405	S
D	431	G
I	436	T
I	457	L
D	459	N
P	470	S
E	472	G
A	506	G
I	507	V

[0227] 아래 표 1B는 분석한 변이주들을 모두 열거한 것으로서, 서열번호 1의 전장 서열 (CGS1)에서 확인된 돌연변이 위치를 나타낸다. 대응되는 출발 서열에서의 위치는 괄호 안에 나타낸다.

[0228] 표 1B

표 2

변이주	돌연변이들	출발 서열
MUT02	P412(356)T	1-4
MUT04	P66(10)L, I83(27)S, V116(60)D, Y380(324)F, I513(457)L	1-4
MUT13	M57(1)K, I88(32)M, I343(287)V, H345(289)R, P412(356)T, stop564(508)W	1-4
MUT18	P66(10)L, M288(232)L, V301(245)A, N315(259)D, P412(356)T, D487(431)G, I492(436)T	1-4
MUT19	N67(11)D, Q71(15)R, A86(30)T, L101(45)S, S103(47)T, A124(68)T, T234(178)I, P412(356)T, T427(371)A, D515(459)N	1-4
AD309	I88(1)M, P412(325)T	1-5
AD310	I88(1)M, V116(29)D, Y380(293)F, I513(426)L	1-5
AD311	I88(1)M, I343(256)V, H345(258)R, P412(325)T	1-5
AD312	I88(1)M, M288(201)L, V301(214)A, N315(228)D, P412(325)T, D487(400)G, I492(405)T	1-5
AD313	I88(1)M, L101(14)S, S103(16)T, A124(37)T, T234(147)I, P412(325)T, T427(340)A, D515(428)N	1-5
AD242	G160(1)M, P412(325)T	1-1
AD328	G160(1)M, M288(129)L, V301(142)A, N315(156)D, P412(253)T, D487(328)G, I492(333)T	1-1
AD329	G160(1)M, T234(75)I, P412(253)T, T427(268)A, D515(356)N	1-1
MUT24	G160(1)M, F206(47)L, A313(154)T, N315(156)S, F317(158)S, F331(172)L, H345(186)Y, P412(253)T, A562(403)G	1-1
MUT27	G160(1)M, I241(82)V, P412(253)T, P461(302)S	1-1
MUT67	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A, E528(369)G	1-1
MUT68	G160(1)M, F331(172)L, G382(223)S, P412(253)T, V452(293)A	1-1
MUT70	G160(1)M, T276(117)S, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A	1-1
MUT71	G160(1)M, D239(80)E, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A, I563(404)V	1-1
MUT72	G160(1)M, F331(172)L, I343(184)F, P412(253)T, V452(293)A, I563(404)V	1-1
MUT74	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A, P526(367)S	1-1
MUT75	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, I563(404)V	1-1
MUT78	G160(1)M, F331(172)L, P412(253)T, V452(293)A	1-1
MUT79	G160(1)M, F331(172)L, I343(184)F, P412(253)T	1-1

[0230] 출발 서열 1-4는 서열번호 3에 해당된다.

[0231] 출발 서열 1-5는 서열번호 4에 해당된다.

[0232] 출발 서열 1-1은 서열번호 5에 해당된다.

[0233] 아래 표 1C는 분석한 모든 변이주들을 열거하고 있으며, 서열번호 3 (CGS1-4)의 서열에서 확인된 돌연변이 위치가 표시된다. 대응되는 출발 서열에서의 위치는 괄호 안에 나타낸다.

[0234] 표 1C

표 3

변이주	돌연변이	출발 서열
MUT02	P356T	1-4
MUT04	P10L, I27S, V60D, Y324F, I457L	1-4
MUT13	M1K, I32M, I287V, H289R, P356T, stop508W	1-4
MUT18	P10L, M232L, V245A, N259D, P356T, D431G, I436T	1-4
MUT19	N11D, Q15R, A30T, L45S, S47T, A68T, T178I, P356T, T371A, D459N	1-4
AD309	I32(1)M, P356(325)T	1-5
AD310	I32(1)M, V60(29)D, Y324(293)F, I457(426)L	1-5
AD311	I32(1)M, I287(256)V, H289(258)R, P356(325)T	1-5
AD312	I32(1)M, M232(201)L, V245(214)A, N259(228)D, P356(325)T, D431(400)G, I436(405)T	1-5
AD313	I32(1)M, L45(14)S, S47(16)T, A68(37)T, T178(147)I, P356(325)T, T371(340)A, D459(428)N	1-5
AD242	G104(1)M, P356(253)T	1-1
AD328	G104(1)M, M232(129)L, V245(142)A, N259(156)D, P356(253)T, D431(328)G, I436(333)T	1-1
AD329	G104(1)M, T178(75)I, P356(253)T, T371(268)A, D459(356)N	1-1
MUT24	G104(1)M, F150(47)L, A257(154)T, N259(156)D, F261(158)S, F275(172)L, H289(186)Y, P356(253)T, A506(403)G	1-1
MUT27	G104(1)M, I185(82)V, P356(253)T, P405(302)S	1-1
MUT67	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A, E472(369)G	1-1
MUT68	G104(1)M, F275(172)L, G326(223)S, P356(253)T, V396(293)A	1-1
MUT70	G104(1)M, T220(117)S, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A	1-1
MUT71	G104(1)M, D183(80)E, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A, I507(404)V	1-1
MUT72	G104(1)M, F275(172)L, I287(184)F, P356(253)T, V396(293)A, I507(404)V	1-1
MUT74	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A, P470(367)S	1-1
MUT75	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, I507(404)V	1-1
MUT78	G104(1)M, F275(172)L, P356(253)T, V396(293)A	1-1
MUT79	G104(1)M, F275(172)L, I287(184)F, P356(253)T	1-1

[0236] 실시예 4: 효모 사카로마이세스 세레비지에에서의 효소의 활성 검정

[0237] 사카로마이세스 세레비지에 균주 YA247-5A (MAT- α , ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, trp1, ura3) 및 YA246-4A (MAT- α , ade2, his3, leu2, met2::loxP, met6::HIS3, thr4::loxP, trp1, ura3)에서 전술한 변이주들 중 임의의 변이주의 발현은 이의 메티오닌 영양 요구성을 완화한다.

[0238] 즉, 전술한 임의의 변이주의 발현시, 메티오닌 합성에 결함이 있는 효모 균주 YA247-5A와 YA246-4A는 아테닌, 히스티딘, 루신, 트립토판 및 우라실의 첨가된 최소 배지에서 배양하였다.

[0239] 검정의 실험 설계:

[0240] 돌연변이 뉴클레오티드 서열을 복제가능한 플라스미드 pAL06 (pRS316의 유도체)에 전사 프로모터 (pTEF1)의 하류에 그리고 전사 종결인자 (tADH1)의 상류에 각각 클로닝하였다.

[0241] 이렇게 수득한 12종의 플라스미드를 각각 효모 균주 YA247-5A 및 YA246-4A에 형질전환하였다. 형질전환체를 메티오닌 0.2 mM이 첨가된 배지 A (Difco™ 효모 질소 베이스 6.7%, 글루코스 2%, 아테닌 0.3 mM, 루신 0.75 mM,

히스티딘 1.3 mM, 트립토판 0.1 mM)에서 배양하였다.

- [0242] 각 형질전환주를 0.05 mM 메티오닌이 첨가된 배지 A 또는 메탄티올 0.1 또는 1 mM이 첨가된 배지 A에 접종 ($OD_{590} = 0.015$)하였다.
- [0243] 증식은 590 nm에서 광학 밀도(OD_{590})를 추적함으로써 모니터링하였다. 2종의 배지에서의 각 클론의 각 증식을 빈 벡터 pAL06로 형질전환된 음성 대조군 YA246-4A 또는 YA247-5A의 증식과 비교하였다.
- [0244] 메티오닌이 첨가된 배지 A의 경우, 모든 검사 균주들은 재생 시간이 약 4시간이었다. 예를 들어, 돌연변이 CGS 1-4 (G84S), AD242 및 AD328을 발현하는 균주 YA246-4A와 대조군 pAL06 균주의 증식을 도 4에 나타낸다.
- [0245] 포스포호모세린의 축적 측면에서의 증식:
- [0246] 포스포호모세린을 추적하며 0.1mM 메탄티올이 첨가된 배지 A에서 CGS1 단백질 변이체를 발현하는, YA246-4A계 균주들의 증식을 도 5에 나타낸다.
- [0247] 모든 경우들에서, 대조군 CGS1-4 (G84S) 및 pAL06 플라스미드 균주에서 증식이 관찰되지 않았다.
- [0248] CGS1-4 패밀리 (도 5A)의 경우, 재생 시간은 MUT19의 경우 13시간에서 MUT02의 경우 42시간이다. CGS1-5 패밀리 (도 5B)의 경우, 재생 시간은 AD312 및 AD313의 9.5시간에서 AD310의 12.5시간이다. CGS1-1 패밀리 (도 5C)의 경우, 재생 시간은 AD242, AD328 및 AD329의 경우 약 9.5시간이다.
- [0249] 포스포호모세린이 축적되지 않는다는 측면에서의 증식:
- [0250] 포스포호모세린을 추적하지 않으며 1mM 메탄티올 또는 0.1mM 메탄티올이 첨가된 배지 A에서 CGS1 단백질 변이체를 발현하는, YA247-5A계 균주들의 증식을 각각 도 6A 및 6B에 나타낸다.
- [0251] 메탄티올 1 mM 첨가시, CGS1-1과 pAL06 빈 벡터로 형질전환된 음성 대조군에서는 증식이 관찰되지 않는다. 재생 시간은, AD242 또는 AD328의 경우 약 21시간, MUT27의 경우 10.5시간, MUT24의 경우 8시간이다. 메탄티올 0.1 mM 첨가시, MUT24 및 MUT27 균주들에서만 증식이 관찰된다. 재생 시간은 각각 19시간 및 40시간이다.
- [0252] **실시예 5: OPHS 의존적인 메티오닌 신타제의 시험관내 활성**
- [0253] 효모에서 발현된 효소의 시험관내 활성을 효모의 라이세이트 (lysate) 조산물에서 검정하였다.
- [0254] O-포스포-L-호모세린 (OPHS) 및 메탄티올 (CH_3SNa)의 존재 하에 라이세이트에서 메티오닌의 합성을 모니터링함으로써, 활성을 추적하였다. 효모 세포 YA246-5A, 빈 플라스미드 pAL06을 보유한 YA246-5A, CGS1-4를 발현하는 YA246-5A 및 돌연변이 AD246, AD239, MUT24, MUT27, MUT67 또는 MUT79를 발현하는 YA246-5A의 라이세이트들을 비교하였다.
- [0255] 실험 공정:
- [0256] 라이세이트 제조
- [0257] 효모 세포를 일차로 완전 배지에서 배양하였다. 1차 배양물을 사용하여 배지 A 100 ml에 접종하여 ($OD_{590nm} = 0.3$), 16시간 동안 교반하면서 28°C에서 배양하였다.
- [0258] 단백질의 총량을 브래드포드 분석을 이용하여 측정하였다.
- [0259] 반응을 개시하기 위해, 총 단백질 0.03 - 0.06 mg을 100 mM Tris pH8, 0.2 mM 피리독살 포스페이트, 5 mM CH_3SNa 및 25mM OPHS로 구성된 총 100 μ l에서 37°C에서 15분간 인큐베이션하였다. 반응 혼합물의 분액 10 μ l를 15분과 60분에 취하고, 과염소산 90 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이들 분액내 메티오닌의 양은, 내부 표준 물질로서 ^{13}C Met를 이용하여 LCMS로 측정하였다. 형성된 메티오닌의 양을 분석에 사용된 단백질의 양에 대해 표준화하였다.
- [0260] 그 결과를 아래 표 2에 나타낸다:
- [0261] **표 2**

표 4

	활성 (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	표준 편차
CGS1-4 (G84S)	미검출	-
pAD242	142	±13
pAD329	143	±11
pMUT24	354	±14
pMUT27	343	±38
pMUT67	864	±91
pMUT79	462	±35

[0263] **실시예 6: 호모시스테인 신타제 활성을 측정하기 위한 시험관내 분석**

[0264] 효모에서 발현되는 효소의 호모시스테인 신타제 활성을 효모의 라이세이트 조산물을 이용하여 시험관내 분석으로 검정하였다.

[0265] 활성은, 0-포스포-L-호모세린 (OPHS) 및 메탄티올 (CH₃SNa)의 존재 하에 라이세이트에서 메티오닌의 합성을 모니터링함으로써, 활성을 추적하였다. 효모 세포 YA246-5A, 빈 플라스미드 pAL06을 보유한 YA246-5A, CGS1-4를 발현하는 YA246-5A 및 돌연변이 AD246, AD239, MUT24, MUT27, MUT67 또는 MUT79를 발현하는 YA246-5A의 라이세이트들을 비교하였다.

[0266] 실험 공정:

[0267] 라이세이트 제조

[0268] 효모 세포를 일차로 완전 배지에서 배양하였다. 1차 배양물을 사용하여 배지 A 100 ml에 접종하여 (OD_{590nm} = 0.3), 16시간 동안 교반하면서 28℃에서 배양하였다. 단백질의 총량을 브래드포드 분석을 이용하여 측정하였다. 형성된 호모시스테인의 양을 비색 분석으로 측정하였다.

[0269] 반응을 개시하기 위해, 총 단백질 0.03 - 0.06 mg을 0.1 M Tris pH8, 0.2 mM 피리독살 포스페이트, 10 mM Na₂S 및 12.5 mM OPHS로 구성된 총 100 μl에서 30℃에서 15분간 인큐베이션하였다.

[0270] - 1% NaNO₂ (H₂SO₄에 0.4N로 용해됨) 500 μl을 첨가하여 5분간 인큐베이션

[0271] - NH₄SO₃NH₂ 100 μl을 첨가하여 2분간 인큐베이션

[0272] - 1 부피 de HgCl₂ 750 μl 첨가

[0273] - 설파닐아미드 4 부피 첨가

[0274] - N-(1-나프틸)에틸렌다이아민 다이하이드로클로라이드 2 부피 첨가

[0275] 15분간 인큐베이션

[0276] OD 450 nm 측정 (호모시스테인의 양과 비례하여 증가함 - 양은 기지 범위의 호모시스테인에서 관찰된 결과와 비교함으로써 결정함).

[0277] 그 결과는 표 3에 나타낸다.

[0278] **표 3:**

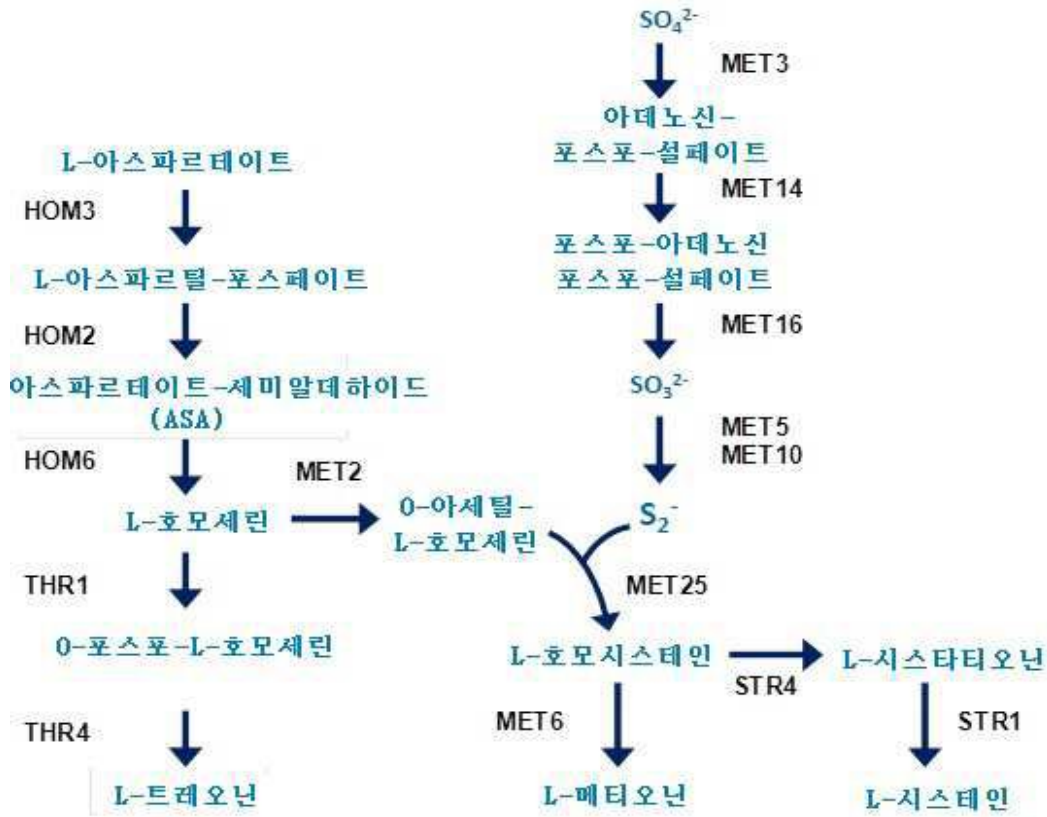
표 5

	활성 (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	표준편차
CGS1-4 (G84S)	미검출	-
pAD242	18	±4
pAD328	21	±2
pMUT24	59	±9
pMUT27	47	±2
pMUT67	239	±32

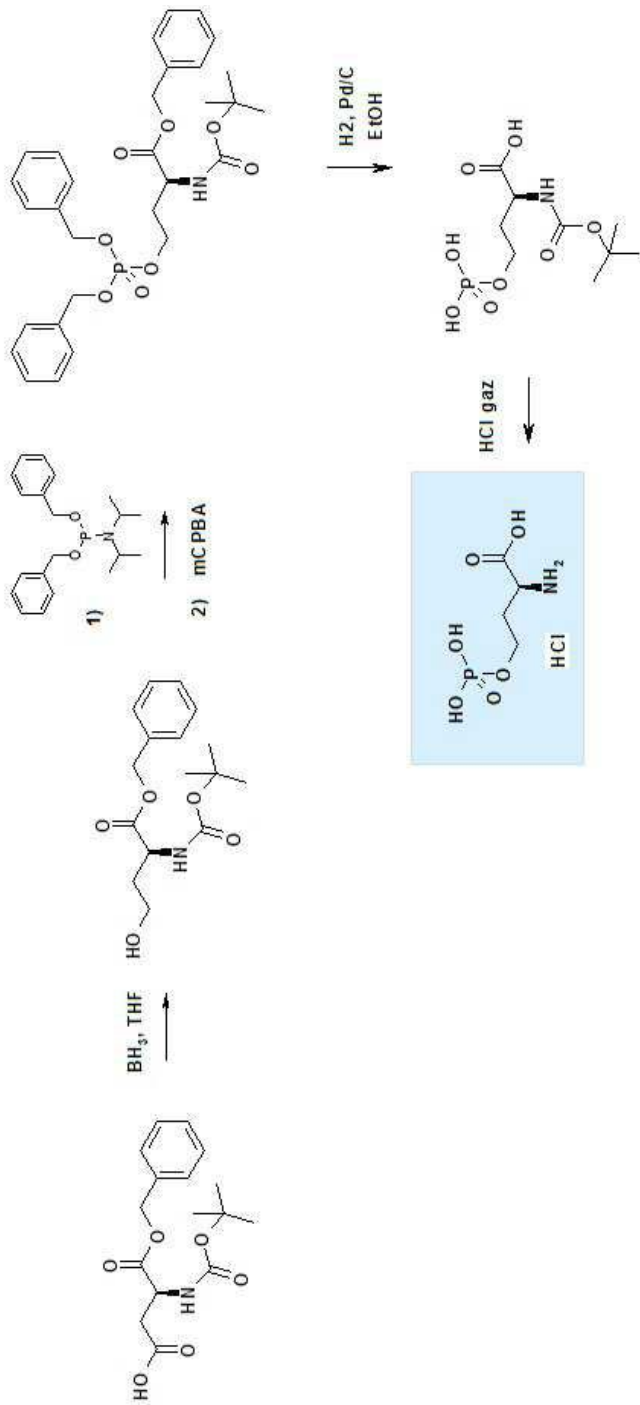
pMUT79	215	±29
--------	-----	-----

도면

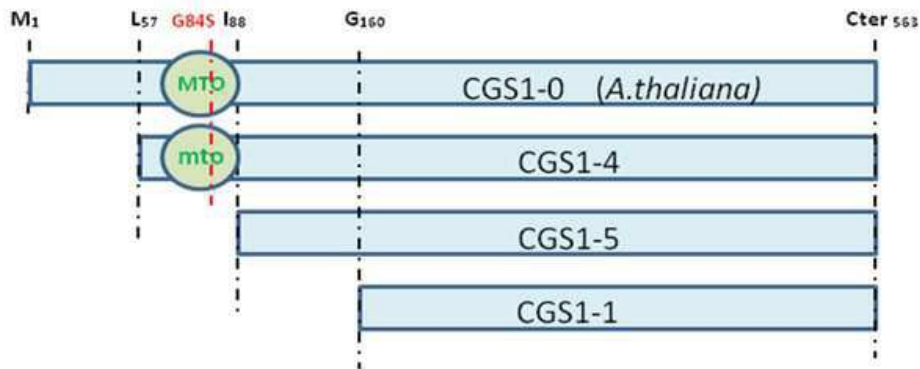
도면1



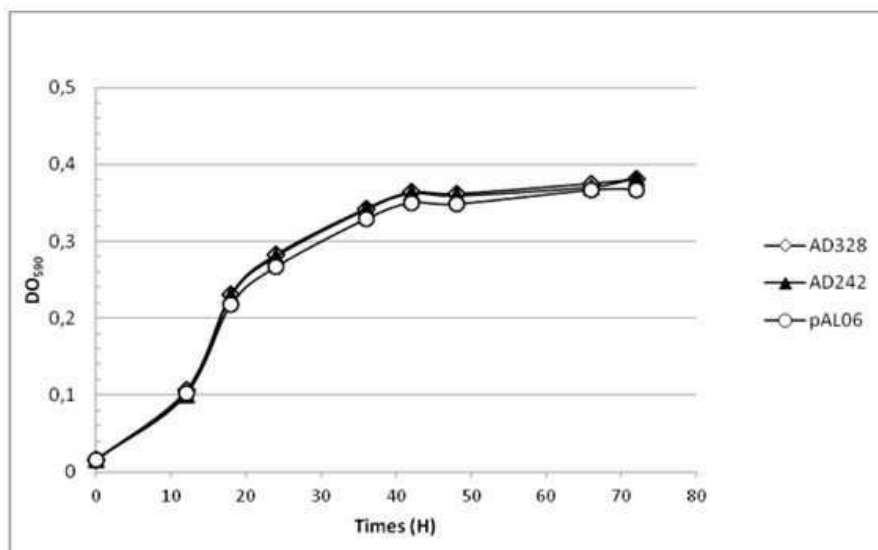
도면2



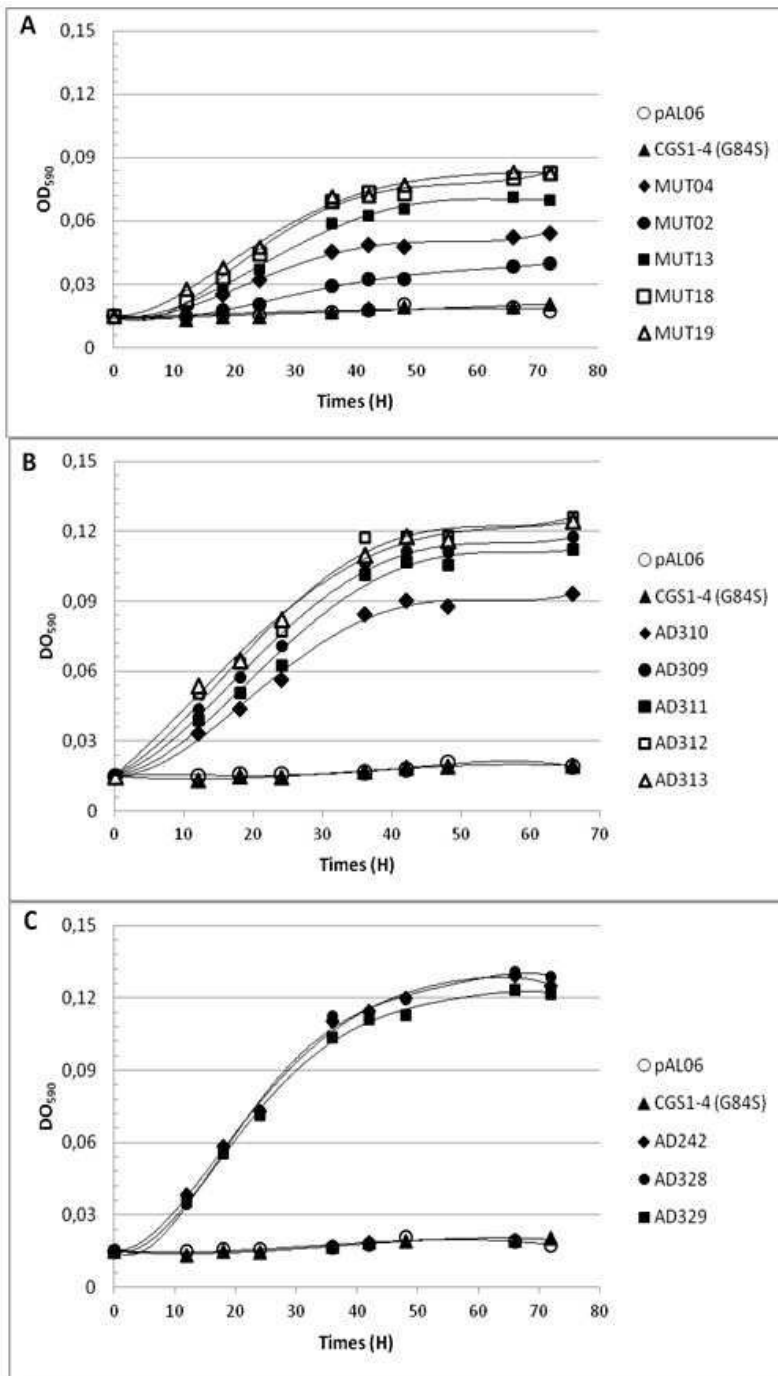
도면3



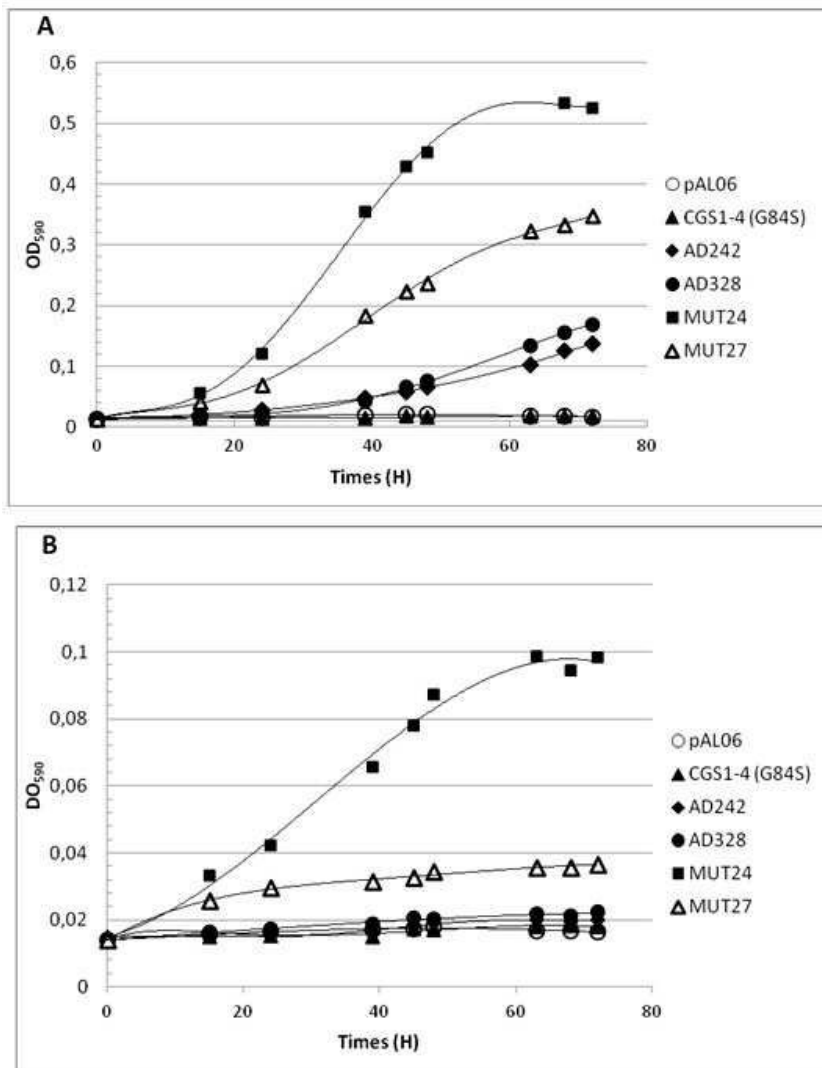
도면4



도면5



도면6



도면 7bb

	250	260	270	280	290	300	310	320
CGS1 A. thaliana AAC25687.1
CGS1 G84S A. thaliana	ISALEGAESTLVN	MASGMCSTVML	LALVPAGGHIVTT	DCYRKRTRIFM	ENFLPKLGI	TVTVIDPADIA	GLEAAVNEFK	VYS
MUT02 CGS1-4
MUT04 CGS1-4
MUT13 CGS1-4
MUT18 CGS1-4
MUT19 CGS1-4
AD309 CGS1-5
AD310 CGS1-5
AD311 CGS1-5
AD312 CGS1-5
AD313 CGS1-5
AD242 CGS1-1
AD328 CGS1-1
AD329 CGS1-1
MUT24 CGS1-1
MUT27 CGS1-1
MUT67 CGS1-1
MUT68 CGS1-1
MUT70 CGS1-1
MUT71 CGS1-1
MUT72 CGS1-1
MUT74 CGS1-1
MUT75 CGS1-1
MUT78 CGS1-1
MUT79 CGS1-1

도면7cc

CGS1 A. thaliana AAC25687.1	410	420	430	440	450	460	470	480
CGS1 G84S A. thaliana
MUT02 CGS1-4	EIRNLHVLGGLPNPNAAYLIIRGKMTLHLRVQQNSTAFRMAEILLEAHPKVSHYVYPLPSHPEHELAKRQMTGFGGV							
MUT04 CGS1-4
MUT13 CGS1-4
MUT18 CGS1-4
MUT19 CGS1-4
AD309 CGS1-5
AD310 CGS1-5
AD311 CGS1-5
AD312 CGS1-5
AD313 CGS1-5
AD242 CGS1-1
AD328 CGS1-1
AD329 CGS1-1
MUT24 CGS1-1
MUT27 CGS1-1
MUT67 CGS1-1
MUT68 CGS1-1
MUT70 CGS1-1
MUT71 CGS1-1
MUT72 CGS1-1
MUT74 CGS1-1
MUT75 CGS1-1
MUT78 CGS1-1
MUT79 CGS1-1

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

275 280 285
 Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro
 290 295 300
 Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp
 325 330 335
 Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys

 340 345 350
 Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu
 355 360 365
 Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His
 370 375 380
 Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn

 405 410 415
 Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val
 420 425 430
 Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala
 435 440 445
 His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro
 450 455 460
 Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val

 465 470 475 480
 Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp
 485 490 495
 Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser
 500 505 510
 Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu
 515 520 525

Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe

530 535 540

Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu

545 550 555 560

Glu Ala Ile

<210> 2

<211> 563

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Val Ser Ser Phe Gln Ser Pro Thr Ile Phe Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Ile Ser Gly Phe Gln Cys Arg Ser Asp Pro Asp Leu Val Gly Ser Pro

20 25 30

Val Gly Gly Ser Ser Arg Arg Arg Val His Ala Ser Ala Gly Ile Ser

35 40 45

Ser Ser Phe Thr Gly Asp Gly Gly Leu Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe

50 55 60

Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys

65 70 75 80

Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn

85 90 95

Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser

100 105 110

Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala

115 120 125

Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val

130 135 140

Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly

145 150 155 160

Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly
 165 170 175
 Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr
 180 185 190
 Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys
 195 200 205
 Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe
 210 215 220

 Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys
 225 230 235 240
 Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly
 245 250 255
 Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly
 260 265 270
 His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met
 275 280 285

 Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro
 290 295 300
 Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp
 325 330 335
 Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys
 340 345 350

 Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu
 355 360 365
 Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His
 370 375 380
 Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn

405 410 415

Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val

420 425 430

Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala

435 440 445

His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp

485 490 495

Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser

500 505 510

Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu

515 520 525

Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe

530 535 540

Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu

545 550 555 560

Glu Ala Ile

<210> 3

<211> 507

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu

1 5 10 15

Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile

20 25 30

Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala

His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro

290 295 300

Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser

305 310 315 320

Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile

325 330 335

Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val

340 345 350

Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly

355 360 365

Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe

370 375 380

Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr

385 390 395 400

Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln

405 410 415

Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile

420 425 430

Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala

435 440 445

Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met

450 455 460

Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys

465 470 475 480

Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val

485 490 495

Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile

500 505

<210> 4

<211> 476

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

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

225 230 235 240
 Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
 245 250 255
 Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 265 270
 Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 280 285
 Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys

 290 295 300
 Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 330 335
 Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 345 350
 Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val

 355 360 365
 Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 375 380
 Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
 385 390 395 400
 Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
 405 410 415
 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile

 420 425 430
 Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
 435 440 445
 Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
 450 455 460
 Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 465 470 475
 <210> 5

<211> 404

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp

1 5 10 15

Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val

20 25 30

Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe

35 40 45

Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser

50 55 60

Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp

65 70 75 80

Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser

85 90 95

Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly

100 105 110

Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe

115 120 125

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val

145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val

165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val

180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

195 200 205

Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly

Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile
 20 25 30
 Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45

 Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110

 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 165 170 175

 Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu
 180 185 190
 Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu
 195 200 205
 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly
 225 230 235 240

 Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr

	260		265		270	
Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys						
	275		280		285	
His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro						
	290		295		300	
Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser						
305		310		315		320
Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile						
		325		330		335
Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val						
	340		345		350	
Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly						
	355		360		365	
Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe						
	370		375		380	
Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr						
385		390		395		400
Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln						
		405		410		415
Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile						
	420		425		430	
Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala						
	435		440		445	
Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met						
	450		455		460	
Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys						
465		470		475		480
Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val						
		485		490		495
Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile						
	500		505			

<210> 7

<211> 507

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Phe Val Arg Gln Leu

1 5 10 15

Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ser Ser Val Ala Gln Ile

 20 25 30

Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala

 35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Asp Ser Ser Ala Ala

 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala

65 70 75 80

Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu

 85 90 95

Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys

 100 105 110

His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu

 115 120 125

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

 130 135 140

Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe

145 150 155 160

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

 165 170 175

Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu

 180 185 190

Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu

 195 200 205

Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys

Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 470 475 480

Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 485 490 495

Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 500 505

<210> 8

<211> 531

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Lys Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Met
 20 25 30

Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95

Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110

His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125

Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140

Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160

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

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

Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile
 420 425 430

Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala
 435 440 445

Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met
 450 455 460

Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys
 465 470 475 480

Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val
 485 490 495

Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile Trp Gly Ser Thr Ser
 500 505 510

Ser Arg Ala Ala Ala Ala Val Gly Glu Phe Leu Met Ile Tyr Asp
 515 520 525

Phe Tyr Tyr
 530

<210> 9

<211> 507

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Leu Asn Phe Val Arg Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Ala Gln Ile
 20 25 30

Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Ala
 35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala Ala
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala Glu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys
 100 105 110
 His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu
 115 120 125
 Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val
 130 135 140
 Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe
 145 150 155 160
 Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro
 165 170 175
 Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu
 180 185 190
 Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu
 195 200 205
 Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Leu Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Thr Val Thr Ala Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Ala Val Asp Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr
 260 265 270
 Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys
 275 280 285
 His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro
 290 295 300
 Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser
 305 310 315 320
 Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile

325 330 335
 Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val

340 345 350
 Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly

355 360 365
 Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe

370 375 380
 Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr

385 390 395 400
 Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln

405 410 415
 Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Gly Ile

420 425 430
 Glu Thr Thr Thr Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala

435 440 445
 Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met

450 455 460
 Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys

465 470 475 480
 Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val

485 490 495
 Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile

500 505

<210> 10

<211> 507

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Ser Ser Arg Ile Leu Arg Phe Pro Pro Asp Phe Val Arg Arg Leu

1 5 10 15

Ser Ile Lys Ala Arg Arg Asn Cys Ser Asn Ile Ser Val Thr Gln Ile

Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys

275 280 285

His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro

290 295 300

Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser

305 310 315 320

Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile

325 330 335

Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val

340 345 350

Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly

355 360 365

Met Lys Ala Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe

370 375 380

Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr

385 390 395 400

Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln

405 410 415

Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile

420 425 430

Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala

435 440 445

Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asn Gln Pro Ala Ile Met

450 455 460

Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys

465 470 475 480

Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val

485 490 495

Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile

500 505

<210> 11

<211> 476

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

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

Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile

465 470 475

<210> 12

<211> 476

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Asp Ser Ser Ala

20 25 30

Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala

35 40 45

Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala

50 55 60

Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser

65 70 75 80

Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly

85 90 95

Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val

100 105 110

Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp

115 120 125

Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn

130 135 140

Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp

180 185 190

Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
 195 200 205
 Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
 210 215 220
 Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
 225 230 235 240

 Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
 245 250 255
 Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 265 270
 Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 280 285
 Ser Ala Thr Lys Phe Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
 290 295 300

 Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Gly Pro Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 330 335
 Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 345 350
 Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
 355 360 365

 Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 375 380
 Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
 385 390 395 400
 Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
 405 410 415
 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Leu Val Asp Gln Pro Ala Ile
 420 425 430

 Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile

Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp
 180 185 190
 Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
 195 200 205

 Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
 210 215 220
 Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
 225 230 235 240
 Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Val
 245 250 255
 Cys Arg Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 265 270

 Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 280 285
 Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
 290 295 300
 Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 330 335

 Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 345 350
 Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
 355 360 365
 Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 375 380
 Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp
 385 390 395 400

 Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile
 405 410 415
 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile

Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met
 165 170 175

Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp
 180 185 190

Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe Leu Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu
 195 200 205

Gly Ile Thr Val Thr Ala Ile Asp Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu
 210 215 220

Ala Ala Val Asp Glu Phe Lys Val Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro
 225 230 235 240

Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile
 245 250 255

Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr
 260 265 270

Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His
 275 280 285

Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys
 290 295 300

Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His
 305 310 315 320

Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg
 325 330 335

Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala
 340 345 350

Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu Ala His Pro Lys Val Ser His Val
 355 360 365

Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg
 370 375 380

Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Gly
 385 390 395 400

Ile Glu Thr Thr Thr Lys Phe Val Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile

405 410 415
 Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile
 420 425 430

Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile
 435 440 445

Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp
 450 455 460

Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala Leu Glu Ala Ile
 465 470 475

<210> 15

<211> 476

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

Met Val Ala Gly Lys Trp Ser Asn Asn Pro Ser Ser Ala Ser Pro Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ala Val Ser Ser Ala
 20 25 30

Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Ala Ala
 35 40 45

Ala Pro Pro Val Val Leu Lys Ser Val Asp Glu Glu Val Val Val Ala
 50 55 60

Glu Glu Gly Ile Arg Glu Lys Ile Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser
 65 70 75 80

Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly
 85 90 95

Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val
 100 105 110

Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp
 115 120 125

Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn

Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
 165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205

Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220

His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240

Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255

Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270

Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285

Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300

Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320

Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335

Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350

Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln

<210> 18

<211> 404

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 18

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp

1 5 10 15

Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val

 20 25 30

Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe

 35 40 45

Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser

 50 55 60

Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Ile Val Val Leu Glu Asp

65 70 75 80

Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser

 85 90 95

Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly

 100 105 110

Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe

 115 120 125

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

 130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val

145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val

 165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val

 180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30

Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Leu Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95

Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Thr Val Ser Glu Ser Lys Val
 145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys Tyr Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220

His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro

245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg

260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285

Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300

Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320

Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335

Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350

Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365

Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 370 375 380

Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 385 390 395 400

Leu Glu Gly Ile

<210> 20

<211> 404

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp

1 5 10 15

Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val
 20 25 30

Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 35 40 45

Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp

 65 70 75 80
 Lys Val Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser
 85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Phe Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg

 260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Ser Ser His

Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110

Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205

Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220

His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240

Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255

Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270

Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285

Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300

Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320

Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335

Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu

340 345 350
 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365

Gly Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser
 370 375 380
 Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala
 385 390 395 400
 Leu Glu Ala Ile

<210> 22

<211> 404

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val

20 25 30
 Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe
 35 40 45
 Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser
 50 55 60
 Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser

85 90 95
 Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly
 100 105 110
 Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe
 115 120 125
 Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val

145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val

 165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val

 180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

 195 200 205

Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Ser Gly

 210 215 220

His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val

225 230 235 240

Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro

 245 250 255

Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg

 260 265 270

Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu

 275 280 285

Ala His Pro Lys Ala Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His

 290 295 300

Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val

305 310 315 320

Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val

 325 330 335

Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu

 340 345 350

Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln

 355 360 365

Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser

 370 375 380

Phe Gly Val Glu Asp Phe Glu Asp Val Lys Ala Asp Ile Leu Gln Ala

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp

1 5 10 15

Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val

 20 25 30

Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe

 35 40 45

Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser

 50 55 60

Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Glu

65 70 75 80

Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser

 85 90 95

Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly

 100 105 110

Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe

 115 120 125

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

 130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val

145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val

 165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val

 180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

 195 200 205

Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly

 210 215 220

His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val

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

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val
 165 170 175
 Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Ile Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val
 180 185 190
 Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala
 195 200 205
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly
 210 215 220
 His Asn Asp Val Leu Ala Gly Cys Ile Cys Gly Ser Leu Lys Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Arg Asn Leu His His Val Leu Gly Gly Thr Leu Asn Pro
 245 250 255
 Asn Ala Ala Tyr Leu Ile Ile Arg Gly Met Lys Thr Leu His Leu Arg
 260 265 270
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Thr Ala Phe Arg Met Ala Glu Ile Leu Glu
 275 280 285
 Ala His Pro Lys Val Ser His Val Tyr Tyr Pro Gly Leu Pro Ser His
 290 295 300
 Pro Glu His Glu Leu Ala Lys Arg Gln Met Thr Gly Phe Gly Gly Val
 305 310 315 320
 Val Ser Phe Glu Ile Asp Gly Asp Ile Glu Thr Thr Ile Lys Phe Val
 325 330 335
 Asp Ser Leu Lys Ile Pro Tyr Ile Ala Pro Ser Phe Gly Gly Cys Glu
 340 345 350
 Ser Ile Val Asp Gln Pro Ala Ile Met Ser Tyr Trp Asp Leu Pro Gln
 355 360 365
 Glu Glu Arg Leu Lys Tyr Gly Ile Lys Asp Asn Leu Val Arg Phe Ser

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

<210> 29

<211> 404

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

Met Ser Val Gln Leu Thr Asp Ser Lys His Ser Phe Leu Ser Ser Asp

1 5 10 15

Gly Ser Leu Thr Val His Ala Gly Glu Arg Leu Gly Arg Gly Ile Val

 20 25 30

Thr Asp Ala Ile Thr Thr Pro Val Val Asn Thr Ser Ala Tyr Phe Phe

 35 40 45

Lys Lys Thr Ala Glu Leu Ile Asp Phe Lys Glu Lys Arg Ser Val Ser

 50 55 60

Phe Glu Tyr Gly Arg Tyr Gly Asn Pro Thr Thr Val Val Leu Glu Asp

65 70 75 80

Lys Ile Ser Ala Leu Glu Gly Ala Glu Ser Thr Leu Val Met Ala Ser

 85 90 95

Gly Met Cys Ala Ser Thr Val Met Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Gly

 100 105 110

Gly His Ile Val Thr Thr Thr Asp Cys Tyr Arg Lys Thr Arg Ile Phe

 115 120 125

Met Glu Asn Phe Leu Pro Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Val Ile Asp

 130 135 140

Pro Ala Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ala Ala Val Asn Glu Phe Lys Val

145 150 155 160

Ser Leu Phe Phe Thr Glu Ser Pro Thr Asn Pro Leu Leu Arg Cys Val

 165 170 175

Asp Ile Glu Leu Val Ser Lys Phe Cys His Lys Arg Gly Thr Leu Val

 180 185 190

Cys Ile Asp Gly Thr Phe Ala Thr Pro Leu Asn Gln Lys Ala Leu Ala

 195 200 205

Leu Gly Ala Asp Leu Val Val His Ser Ala Thr Lys Tyr Ile Gly Gly

