(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0139817
(43) 공개일자 2013년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 1/04 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0148576(분할)
(22) 출원일자 2013년12월02일
심사청구일자 2013년12월02일
(62) 원출원 특허 10-2011-0065649
원출원일자 2011년07월01일
심사청구일자 2011년07월01일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이정국
서울특별시 마포구 백범로25길 63 (염리동, 염리삼성래미안) 105동 1504호
김미선
대전광역시 유성구 궁동로 5 (궁동, 다솔아파트) 103동 702호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한라특허법인

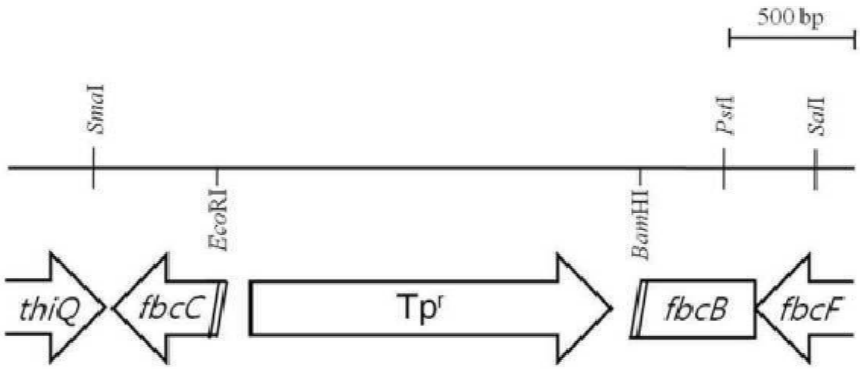
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **로도박터 스페로이데스 변이주에서의 남세균 유래 수소 효소의 발현을 이용한 산소 저항성 수소 효소 선별 방법**

(57) 요 약

본 발명은 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주를 이용하여 산소 저항성 수소 효소를 선별하는 방법, 산소 저항성 수소 효소를 제조하는 방법 및 외래 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환된 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 혐기 암조건에서 배양하여 수소를 생성하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

김의진

서울특별시 서대문구 통일로35길 25 (홍제동)

오은경

경기도 용인시 기흥구 구성로 395 (청덕동, 휴먼시아물푸레마을7단지아파트) 703동 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201032067

부처명 교육기술과학부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 로도박터 스페로이데스 변이주에서의 남세균 유래 수소효소의 발현을 이용한 산소저항성 수소효소 선별방법

기 여 율 1/1

주관기관 (재)한국연구재단

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 9 내지 14로 표시되는 아미노산 서열의 단백질을 포함하여 이루어지는 양방향성 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환한 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 혐기 암조건에서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 15 내지 20으로 표시되는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 수소의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)는 혐기 발효 성장하는 것을 특징으로 하는 수소의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주를 이용하여 산소 저항성 수소 효소를 선별하는 방법, 산소 저항성 수소 효소를 제조하는 방법 및 외래 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환된 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 혐기 암조건에서 배양하여 수소를 생성하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화석연료와 같은 한정된 에너지원의 이용은 경제적 문제와 함께 다양한 환경문제를 발생시키고 있으며, 이와 같은 상황에서 태양광을 이용하는 에너지 생산 기술은 인류가 의존해야 할 궁극적인 신재생에너지 기술 중 하나에 해당한다. 빛 에너지 이용기술은 다양한 전환방법에 의해 가능할 수 있으나, 그 중에서도 광합성은 자연계에서의 35억년의 진화과정을 거치면서 현재의 높은 빛에너지 전환 효율을 보유하게 되었다. 광합성 균주의 대사활동으로 방출되는 수소는 청정에너지로서 미래의 궁극적인 대체 에너지 중 하나로 꼽히고 있다. 현재의 화석 연료나 원자력 등에 비해, 수소는 연소 시 극소량의 공해물질만을 배출한다. 또한 수소는 가스나 액체로 저장할 수 있고, 그 사용의 폭이 매우 넓을 수 있는 큰 잠재력을 갖고 있다.

[0003] 로도박터 스페로이데스의 수소 발생은 질소고정효소(nitrogenase)의 작용에 의한 것으로, 배지 내 질소원이 고갈된 조건에서 질소고정효소는 암모니움(NH_4^+) 이온을 합성하는 고유 역할을 수행함과 동시에 수소가스를 발생시킨다(Wall et al. 1975. Nature 258: 630??631). 산소 비발생 광합성 균주의 수소 생성은 주로 질소고정효소에 의한 양자 (proton, H^+) 고정의 결과이며, 이때 소모되는 에너지는 전적으로 명반응에 의존한다.

[0004] 질소고정효소는 NifH(dinitrogenase reductase) 및 NifD-NifK (dinitrogenase)로 구성되는 효소복합체이며, 그 반응을 위해 ATP (adenosine triphosphate)를 소모한다(Peters and Szilagyi 2006. Curr. Opin. Chem. Biol. 10: 101-108). 이러한 질소고정효소에 의한 수소생성은 암모니움 이온에 의한 저해, 산소 민감도 및 광의존성 등의 문제점을 이유로 수소생성의 상업적 이용으로의 이행이 더딘 상황이다.

[0005] 광합성 세균을 이용한 수소생성 증진 기술개발은 이러한 질소고정효소와 수소생성효소를 이용한 균주 개량보다는 배양기의 설계를 통해 명반응을 최적화 시키는 방식으로 진행되어 왔다. 따라서, 보다 많은 에너지가 수소생

성과 관련된 대사로 흐르게 유도함과 동시에 질소고정효소 뿐만 아니라 외래 수소생성효소의 발현 및 활성화를 유도할 수 있는 배양조건을 규명하는 연구는 이러한 한계를 뛰어넘기 위해 반드시 이루어져야 할 과제이다.

[0006] 한편, 광합성 세균은 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria), 자색유황세균(purple sulfur bacteria), 녹색비유황세균(green non-sulfur bacteria) 및 녹색유황세균(green sulfur bacteria)으로 구분되고, 이들은 조류(algae)나 식물의 광합성과는 달리 그 과정 중에 산소를 발생시키지 않는 것을 특징으로 한다.

[0007] 자색비유황세균인 로도박터 속 미생물은 다양한 대사조건, 즉, 호기적 조건, 혐기 어둠조건, 혐기 광조건 모두에서 성장할 수 있다. 또한 로도박터 속 미생물은 태양에너지를 청정 화학 에너지인 수소로 전환시키는 능력으로 인해 미생물을 이용한 대체에너지 기술 개발의 주된 대상으로 사용되어 왔다. 지난 50년의 연구를 통해 로도박터 속 미생물은 그 유전자 조작이 대장균과 유사할 정도로 용이하게 확립되어 있으며, 수소생성 질소고정효소 및 수소생성 관련 구성 요소들의 유전자들도 비교적 명확하게 알려져 있다. 로도박터 스페로이데스 KCTC 12085는 자연계에서 분리된 광합성 균주로서 높은 수소생성능과 염에 대한 높은 저항성을 가지고 있으며, 분자유전학적 접근이 용이하여 수소생성이 보다 증진되는 변이주의 제조가 가능하다는 장점을 갖고 있다. 상기 균주는 야생형 자체로도 기존에 보고되었던 다른 수소생성 광합성 균주들에 비해 유사하거나 보다 높은 수소생산 능력을 가지고 있으며(Lee *et al*. 2002. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 147-153), 그 유전체의 염기서열에 대한 분석이 완료되어 보고된 바 있다 (Lim SK *et al*. 2009. J. Bacteriol. 191: 1118-1119). 로도박터 속 미생물에 의한 수소생성은 일본을 비롯한 유럽의 기술개발 선진국에서 시도되어 왔고, 그 결과 수소 생성능의 상당한 증진이 있었으나, 아직 상용화의 단계에 이르지는 못하였다. 이는 광합성 발효에 의한 수소생산법이 대체로 낮은 효율을 보이는 등의 기술적 문제를 가지고 있기 때문이며, 이에 대한 지속적인 연구가 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 상기 광합성 세균을 이용하여 보다 빠르게 산소 저항성 수소 효소를 선별하고 산소 저항성 수소 효소를 제조하며, 수소를 보다 효율적으로 생산하는 방법을 개발하고자 연구, 노력한 결과, 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주 내에서 외래 수소 효소를 발현시켜 호기성 조건에서 생장 여부를 확인하면 산소 저항성 수소 효소를 선별해 낼 수 있고, 상기 변이 균주에서 수소 효소를 확보할 수 있으며, 외래 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환한 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 혐기 암조건에서 배양하면 수소 생성량을 크게 증진시킬 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명은 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주를 이용하여 산소 저항성 수소 효소를 선별하는 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 외래 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환한 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 혐기 암조건에서 배양하여 수소를 제조하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은,

[0012] 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주를 제조하는 단계; 및

[0013] 상기 변이 균주 내에서 서열번호 9 내지 14로 표시되는 아미노산 서열의 단백질을 포함하여 이루어지는 양방향성 수소 효소를 발현시키고, 호기성 조건에서 생장 여부를 확인하는 단계

[0014] 를 포함하는 산소 저항성 수소 효소의 선별 방법을 특징으로 한다.

[0015] 또한 본 발명은,

[0016] 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주를 제조하는 단계;

[0017] 상기 변이 균주 내에서 서열번호 9 내지 14로 표시되는 아미노산 서열의 단백질을 포함하여 이루어지는 양방향성 수소 효소를 발현시키고, 호기성 조건에서 배양시켜 돌연변이체를 얻는 단계; 및

[0018] 상기 돌연변이체로부터 변이된 수소 효소를 분리하는 단계

[0019] 를 포함하는 것을 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주로부터 제조된 산소 저항성 수소 효소의 제조방법을 특징으로 한다.

[0020] 또한 본 발명은,

[0021] 서열번호 9 내지 14로 표시되는 아미노산 서열의 단백질을 포함하여 이루어지는 양방향성 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환한 재조합 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 혐기 암조건에서 배양하는 단계를 포함하는 수소의 제조방법을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 기존의 산소 저항성 수소 효소 선별 방법들이 시험관 내에서 돌연변이를 유도하고 이후 산소를 주입하여 수소를 발생하는 정도를 측정하는 것을 주된 특징으로 하는데, 이 경우 선별할 수 있는 실험대상의 수에 한계가 있다는 문제가 있으나, 본 발명은 변이 균주의 생사를 통하여 산소 저항성 수소 효소를 선별함으로써, 1회의 실시를 통해 10^9에서 10^{11}개 이상의 실험 대상을 동시에 선별할 수 있으며, 산소에 대한 저항성을 가지는 수소 효소를 수소 생성량의 측정 없이도 선별하는 것이 가능해진다. 이렇게 선별된 대상에 대하여서만 산소 존재시의 수소의 발생 정도를 측정하면 되므로, 보다 많은 대상을 빠르게 선별해낼 수 있는 장점을 갖는다.

[0023] 또한, 본 발명의 의해 확보된 수소 효소를 이용하는 경우, 산소가 존재하는 일반적인 환경에서 단백질을 발현시키고 분리 및 정제하여 사용하는 것이 가능하다. 이 경우 혐기시설에서 단백질을 정제하는 공정에 비해 그 비용 및 시간이 획기적으로 감소될 수 있다.

[0024] 그리고 수소 효소를 광합성 균주에서 발현시켜 수소를 생산하는 방법의 경우, 산소 저항성 수소 효소를 사용함으로써 그 효율을 증진시킬 수 있다. 남세균 및 미세조류 (microalgae)를 수소생산에 이용하는 경우 이들은 광합성 명반응 도중에 최종 전자수용체로서 물(H_2O)을 이용하기 때문에 산소를 발생시킨다. 따라서 이들 균주 내에서 수소 효소의 불활성화가 쉽게 일어나게 되는데, 산소 저항성 수소 효소의 발현을 통해 수소를 생산할 경우 이러한 문제점을 극복할 수 있으며, 본 발명은 계절적 또는 환경적 요인에 의해 변화하는 광량의 정도에 민감하지 않고 주야간 모두 수소 생산이 가능하다.

[0025] 또한, 로도박터 속의 광합성 미생물은 조류 및 어류의 사료로 이용되고 있으며 유용한 2차 대사산물들을 동시에 생산해 낼 수 있기 때문에, 수소 생산 후 남는 바이오매스와 대사산물을 확보하는 이차적인 공정과 연계하여 그 경제적 가치를 극대화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 남세균 유래 양방향성 수소 효소를 발현시키기 위한 재조합 벡터 *pRKHOX*를 도식화한 것이다.

도 2는 광합성 조건에서 로도박터 스페로이데스 균주들의 수소 생산량을 비교한 그래프이다.

도 3은 혐기 암조건에서 로도박터 스페로이데스 균주들의 수소 생산량을 비교한 그래프이다.

도 4는 로도박터 스페로이데스 QxtA1 변이주의 제조를 도식화한 것으로, 퀴놀 산화효소(quinol oxidase)의 파괴를 위해 qxtA 유전자의 중간 부분에 항생제 저항성 유전자를 포함하는 전사 및 번역 종결 염기서열을 삽입하는 나타낸 것이다.

도 5는 로도박터 변이주 QxtA1-FbcBC1 변이주의 제조를 도식화한 것으로, 시토크롬 bc1(cytochrome bc1)의 파괴

를 위해 fbcBC 오페론의 중간 부분을 제거하고 트리메토프림(trimethoprim) 저항성 유전자를 삽입하는 것을 나타낸 것이다.

도 6은 로도박터 스페로이데스의 변이주에서 남세균 유래 수소 효소의 발현을 이용한 산소 저항성 수소 효소의 선별 방법을 도식화하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0028] 본 발명은 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 변이 균주를 이용하여 산소 저항성 수소 효소를 선별하는 방법에 관한 것이다.

[0029] 로도박터 스페로이데스는 질소고정효소의 작용을 통해 수소가스를 생산하며, 따라서 이 효소 활성도의 크기에 따라 수소 생성량이 결정된다. 그러나 발생된 수소를 사용하는 효소인 니켈-철 함유 수소 효소(uptake-Hydrogenase, Appel et al. 2000. Arch Microbiol. 173: 333-338)의 작용에 따라 수소생성량이 감소될 수 있다. 따라서 로도박터 스페로이데스 야생형에서의 수소생성 효율은 두 효소의 상대적인 활성 정도에 의해 결정된다고 할 수 있다. 본 발명에서는, 남세균 유래 수소 효소를 도입하여 로도박터 스페로이데스의 수소 생성능에 미치는 영향을 확인하였다. 상기 수소 효소는 수소생성 활성을 갖는 HoxH 단량체(large subunit)와 HoxY(small subunit) 단량체 및 전자전달에 관여하는 HoxE, HoxF, HoxU(diaphorase) 단량체들로 구성된다(Tamagnini et. al. 2007. FEMS Microbiol. Rev. 31: 692-720). 또한 상기 효소가 활성화(maturation)되도록 HoxH 단량체의 C-말단의 24개 아미노산의 펩타이드(peptide)를 제거하는 기능을 갖는 펩타이드 (peptide) 분해효소(protease) HoxW가 요구된다. 이러한 남세균 유래 수소 효소의 발현을 통한 수소생성 증진방법은 현재까지 보고된 바 없으며, 외래 균주에서도 상기 효소가 발현 가능하다는 사실만 보고되었을 뿐 수소 효소의 활성평형이 수소의 생성 방향으로 나타나지는 않았다.

[0030] 로도박터 스페로이데스는 유기호흡, 혐기호흡 또는 빛이 주어지는 광합성조건에서 성장이 가능하다. 본 발명은 로도박터 스페로이데스의 일반적인 성장 조건의 하나인 유기호흡을 차단한 변이주를 제조하고 이를 이용하여 산소 저항성 수소 효소를 선별하는 방법을 제공한다. 시토크롬 BC를 형성하는 FbcBC 및 퀴놀 산화효소 QxtAB의 유전자를 로도박터 스페로이데스 균주에서 파괴할 경우 전자전달계가 파괴되어 유기호흡과 광합성 성장을 수행하지 못하는데, 이 경우 혐기호흡 조건으로의 세포 성장만이 가능하다. 그러나 혐기호흡을 위해서는 배지 내에 최종 전자수용체(final electron acceptor)를 첨가하여야 한다. 이러한 전자수용체를 첨가하지 않을 경우 균주는 대사물질의 발효를 통해서만 성장할 수 있다. 하지만 로도박터 스페로이데스는 원활한 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)의 재생을 위한 효소를 갖고 있지 않으므로 여기에 외래의 수소 효소를 발현시켜줄 경우 발효조건으로의 성장이 촉진된다.

[0031] 상기 로도박터 스페로이데스의 특성을 이용하여, 본 발명의 산소 저항성 수소 효소 선별방법은 염색체 DNA에서 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자와 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스 변이 균주를 사용한다.

[0032] 상기 변이 균주는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 사용하여 증폭시킨 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자의 5'-말단에 위치한 DNA 단편과, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머를 사용하여 증폭시킨 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자의 3'-말단에 위치한 DNA 단편을 포함하는 자살 벡터를 제조하고, 상기 자살 벡터를 로도박터 스페로이데스 균주의 염색체 DNA에 접합시켜 퀴논 산화효소(QxtAB) 유전자의 결실을 유도할 수 있으며, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머를 사용하여 증폭시킨 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자의 5'-말단에 위치한 DNA 단편과, 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머를 사용하여 증폭시킨 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자의 3'-말단에 위치한 DNA 단편을 포함하는 자살 벡터를 제조하고, 상기 자살 벡터를 로도박터 스페로이데스 균주의 염색체 DNA에 접합시켜 시토크롬 bc1(FbcBC) 유전자의 결실을 유도할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 "유전자의 결실"은 유전자 중의 하나 이상의 염기가 제거되는 것으로, 해당 유전자가 코딩하는 단백질의 활성이 불활성화되거나, 해당 유전자가 코딩하는 단백질이 합성되지 않는 것을 의미한다.

[0034] 본 발명에서, "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나,

또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하며, 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다.

[0035] 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0036] 상기 변이 균주 내에서 외래 수소 효소를 발현시키고, 호기성 조건에서 생장 여부를 확인하는 단계를 거쳐서 산소 저항성 수소 효소를 선별할 수 있다.

[0037] 이 때, 상기 외래 수소 효소는 남세균(cyanobacteria) 유래의 양방향성 수소 효소(bidirectional hydrogenase)가 사용될 수 있으며, 상기 양방향성 수소 효소는로 서열번호 9 내지 14로 표시되는 아미노산 서열의 단백질을 포함하여 이루어진 HoxEFUYHW를 사용할 수 있다.

[0038] 상기 수소 효소 또한 다른 수소 효소들과 마찬가지로 그 활성부위(active site)가 산소에 대해 민감하여 불활성화가 일어나기 때문에, 산소가 존재하는 호기조건에서는 이러한 한계를 극복하는 자발적 돌연변이(spontaneous mutation)가 유도된 경우에만 그 활성을 유지할 수 있다. 따라서 산소에 대한 저항성이 획득된 수소 효소를 함유하는 변이주만이 평판배지 상에서 성장하여 콜로니를 형성할 수 있으므로, 이를 통하여 산소 저항성 수소 효소를 선별할 수 있다.

[0039] 또한 본 발명은 상기 호기성 조건에서 배양시켜 얻은 돌연변이체로부터 변이된 산소 저항성 수소 효소를 분리하는 단계를 포함하는 산소 저항성 수소 효소의 제조방법을 제공한다.

[0040] 상기 돌연변이주가 함유한 수소 효소 유전자들을 분석하여 산소 저항성을 갖는 수소 효소를 확보하고, 이를 발현하여 그 생화학적 특성을 확인할 수 있다.

[0041] 이러한 방법으로 개량된 수소 효소는 산소발생 광합성 균주에 의한 수소생산에 이용할 수 있으며, 혐기조건을 마련해주지 않아도 수소 효소를 정제하는 것이 가능하므로, 시험관 내 수소생산(in vitro H_2 evolution)의 현실화를 앞당기는데 기여할 수 있다.

[0042] 또한 본 발명은 남세균 유래 양방향성 수소 효소가 로도박터 스페로이데스 내 빛이 주어지지 않는 성장 조건에서 수소를 생성할 수 있는 특성을 이용하여, 외래 수소 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 형질 전환한 재조합 로도박터 스페로이데스를 혐기 암조건에서 배양하는 단계를 포함하는 수소를 생성시키는 방법을 제공한다.

[0043] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 본 발명의 내용을 한정하는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1: 남세균 유래 양방향성 수소 효소 Hox의 수소 생성능 측정**

[0045] 수소생산을 위해서는 로도박터 스페로이데스 2.4.1을 대상 균주로 사용하였으며, 이 균주들의 성장을 위하여 시스트롬 최소배지[20 mM 인산이수소칼륨(KH_2PO_4), 3.8 mM 황산암모늄($(NH_4)_2SO_4$), 34 mM 숙신산(succinate), 0.59 mM L-글루탐산(L-glutamate), 0.30 mM L-아스파르트산(L-aspartate), 8.5 mM 염화나트륨, 1.05 mM 니트릴로트리아세트산(nitrilotriacetic acid), 1.2 mM 염화마그네슘 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 0.23 mM 염화칼슘($CaCl_2 \cdot 7H_2O$), 25 μM 황산제일철($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.16 μM 몰리브덴산암모늄($(NH_4)6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$), 4.7 μM EDTA, 38 μM 황산아연($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 9.1 μM 황산망간($MnSO_4 \cdot H_2O$), 1.6 μM 황산동($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 0.85 μM 질산코발트(II) ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), 1.8 μM 붕산(H_3BO_3), 8.1 μM 니코틴산, 1.5 μM 티아민염산염, 41 nM 비오틴(biotin)(Sistrom, W. R, 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616)]를 기본 조성으로 사용하였다. 시스트롬 최소배지의 조성 중 암모늄 이온을 제거하기 위해 몰리브덴산암모늄을 동량의 몰리브덴산나트륨으로 대체하여 사용하였고, 황산암모늄을 배재하고 그 대신 L-글루탐산을 7 mM의 농도로 늘려서 사용하였다. 혐기발효 성장조건

을 마련하기 위해서 숙신산을 30 mM의 포도당 (D-glusose)으로 대체하여 사용하였다.

[0046] 로도박터 스페로이데스 균주를 광합성 성장을 위해서는 10 Watts/m^2의 빛이 주어지는 혐기 광조건을 유지하여 성장시켰고, 혐기발효 조건을 위해서는 빛이 주어지지 않는 혐기 암조건에서 성장시켜 그 균주성장 및 수소생성 능력을 시험하였다. 수소의 생성량을 측정하기 위해서 세포는 공기가 세어나가지 않도록 고안된 병 (serum vial)에 담아 성장 시켰으며, 병 내부의 산소 제거를 위해 아르곤 (argon)으로 치환한 후 성장을 시작하였다. 시간에 따라 공기층(gas phase)의 일부를 역시 공기가 세어나가지 않도록 고안된 주사기(gas-tight syringe)를 통해 빼내어 기체 크로마토그라피 (Gas Chromatography; GC, Shimadzu)를 이용하여 분석하였다.

[0047] 남세균 유래 양방향성 수소 효소를 구성하는 HoxE(서열번호 15), HoxF(서열번호 16), HoxU(서열번호 17), HoxY(서열번호 18) 및 HoxH(서열번호 19)의 유전자들을 pRK415(Keen *et al*. 1988. Gene 70: 191-197) 벡터(vector) 상에 클로닝 (cloning)하고 아울러 그 활성화 (maturation)에 관여하는 특이적 펩타이드 (peptide) 분해효소(protease) 활성을 갖는 단백질인 HoxW를 코딩하는 유전자(서열번호 20)를 하나의 벡터 상에 삽입하여 *pRKHOX* 벡터를 제조하였다(도 1). 상기 수소 효소를 구성하는 유전자들의 확보를 위해 남세균인 시네코시스티스 아종 PCC 6803(Synechocystis sp. PCC 6803)의 전체 염색체 DNA를 분리하고, 이를 원형모형 (template)으로 하여 해당 염기서열을 폴리메라아제 연쇄 반응을 통하여 시험관내에서 합성하였다. HoxW의 유전자는 *pRK415* 벡터 상의 테트라사이클린 (tetracycline) 저항성 유전자 하기 지역에 동일 방향으로 배치하여 발현이 유도되도록 하였고, HoxE, HoxF, HoxU, HoxY 및 HoxH의 유전자들은 16S 리보솜 RNA(16S ribosomal RNA)의 프로모터(Dryden *et al*. Nucleic Acids Res. 1990. 18: 7267-7277)의 하기 지역에 동일 방향으로 배치하여 발현이 유도되도록 하였다. DNA의 절단과 접합을 위해 해당되는 제한효소(restriction endonuclease) 및 리가아제(ligase)를 사용하였다. 완성된 재조합(recombinant) 벡터 *pRKHOX*는 접합법(conjugation)을 이용하여, 대장균 S17-1으로부터 로도박터 스페로이데스 야생형 균주(WT) 및 그 활성이 수소의 흡수 방향으로 치우쳐있는 수소 효소(uptake hydrogenase, HupSL) 결손 변이주인 H1(Lee *et al*. 2002. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 147-153)으로 삽입하였다. 상기 재조합 벡터 *pRKHOX*를 함유하는 재조합 균주는 시스트롬 최소배지에 아가(agar)를 첨가하여 제조한 평판최소배지 상에서 항생제 테트라사이클린에 대한 저항성을 통하여 선별하였다.

[0048] 광합성 조건에서 상기 재조합 벡터 *pRKHOX*를 함유한 로도박터 스페로이데스 2.4.1 유래 변이주 H1에서의 수소 생산량을 도 2에 나타내었다. 암모니움 이온을 제거하여 변형된 조성의 시스트롬 최소배지를 이용하여 시험하였고, Hox 유전자들을 포함하지 않는 벡터 pRK415를 함유한 대조군을 동시에 시험하였다. 광합성 성장 조건에서 재조합 벡터 *pRKHOX*를 함유한 균주들은 *pRK415*를 함유한 대조군에 비해 다소 느린 초반 성장속도를 나타내었으나 최종적인 균주의 성장 정도에는 큰 차이가 관찰되지 않았다.

[0049] 상기 조성에 따라 변형된 시스트롬 최소 배지를 사용할 경우 로도박터 스페로이데스는 질소 고정 효소의 활성을 통해 수소를 발생하는데, Hox 유전자들을 포함하지 않는 대조군은 광합성 조건에서 1.61 mole H_2/ mole glucose의 수소생성 효율을 나타내었다. 반면 Hox 유전자들을 포함하는 재조합 균주의 경우 동일 조건에서 0.75 mole H_2/ mole glucose의 수소를 발생하여, 오히려 수소생성 정도가 절반 정도로 감소하는 효과가 나타났다. 이는 남세균 유래의 양방향성 수소 효소 HoxEFUYHW의 활성 평형이 광합성 성장 조건에서는 수소가스의 흡수 방향으로 치우쳐 있기 때문이다.

[0050] 혐기 암조건에서 배양된 재조합 벡터 *pRKHOX*를 함유한 로도박터 스페로이데스 2.4.1 유래 변이주 H1에서의 수소 생산량을 도 3에 나타내었다. 로도박터 스페로이데스의 질소 고정 효소는 빛이 주어지지 않는 암조건에서는 그 활성을 나타내지 못하며, 따라서 Hox 유전자들을 포함하지 않는 대조군은 혐기발효 조건에서 수소가스를 생성하지 못하였다. 반면 Hox 유전자들을 포함하는 재조합 균주의 경우 동일 조건에서 114 mmole의 수소를 발생하는 것이 관찰되었다. 따라서 남세균 유래의 양방향성 수소 효소 HoxEFUYHW의 활성 평형이 빛이 주어지지 않는 혐기발효 성장 조건에서는 수소의 생성 방향으로 작용할 수 있음을 확인할 수 있었다. 아울러 상기 수소 효소의 활성평형이 수소의 생성 방향으로 작용할 경우 균주 내에서 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+)를 재생하는데 기여하기 때문에 발효 조건에서의 성장을 촉진시킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0051] **실시예 2 : 호기호흡 관련 인자 결손 변이주 제조**

[0052] 퀴놀 산화효소(quinol oxidase) QxtAB를 발현하지 못하도록 구성된 변이주 QxtA1은 로도박터 스페로이데스 KCTC 12085 야생형 균주로부터 하기 방법에 의해 제조하였다(도 4). 로도박터 스페로이데스 KCTC 12085의 전체 염색

체 DNA를 분리하고, 이를 원형모형으로 하여 QxtAB 유전자의 5'-말단 지역을 포함하는 약 0.8 kb의 염기서열 및 3'-말단 지역을 포함하는 약 0.7 kb의 염기서열을 폴리메라아제 연쇄 반응을 통하여 시험관 내에서 합성하였다. QxtAB 유전자의 결실을 위하여 하기 서열번호 1 내지 4의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 각각의 DNA 단편을 얻었다.

[0053] QxtAB5-F : 5'-gat tgc tcc cgc tat ggg-3' (서열번호 1)

[0054] QxtAB5-R-BamHI : 5'-gcg gat cca tcc agc tgt tca ccg-3' (서열번호 2)

[0055] QxtAB3-F-PstI : 5'-cag ctg cag gca cac gcc cgc ggg c-3' (서열번호 3)

[0056] QxtAB3-R : 5'-ctg cgg tgc gca gat gcc-3' (서열번호 4)

[0057] 또한, 상기 결실의 대상이 되는 QxtAB 유전자의 서열은 서열번호 21에 나타내었다.

[0058] 이후 각각의 DNA 단편을 클로닝 벡터 상에서 연결하고, 그 사이에 약 2.0 kb에 해당하는 스트렙토마이신(streptomycin, Sm) 및 스펙티노마이신(spectinomycin, Sp) 저항성 유전자(Prentki and Krisch. 1984. Gene 29: 303-313)를 포함하는 전사 및 번역 종결 서열을 끼워 넣었다. 완성된 DNA 절편은 자살 벡터(suicide vector)인 pLO1(Lenz O *et al*. 1994. J. Bacteriol. 176: 4385-4393)에 클로닝 하였다. DNA의 절단과 접합을 위해 해당되는 제한효소 및 리가아제를 사용하였다. 클로닝 된 구조물은 pLO1 벡터 상에 존재하는 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자를 이용하여 카나마이신, 스트렙토마이신, 스펙티노마이신을 각각 25, 50, 50 ㎍/ml의 농도로 사용하여 대장균(*E. coli*) 내에서 선별하였다. 상기 재조합 벡터를 대장균 S17-1에 형질전환(transformation)한 다음 로도박터 스페로이데스에 하기 방법으로 접합법을 통해 넣어 주었다. 벡터가 들어가 있는 대장균 세포를 대상 숙주세포와 섞은 후 평판배지에 올려놓고 6시간에서 12시간 정도 접합이 일어나게 한 후 해당 항생제가 첨가된 시스트롬 최소 평판배지에 도말하여 형질전환된 숙주세포를 얻었다. 대장균 S17-1은 아미노산 중 프롤린(proline)을 합성하지 못하는 영양요구성변이주(auxotroph)로서 프롤린이 결핍된 최소 평판배지에서 자라지 못하며, 형질전환되지 않은 숙주세포는 항생제 카나마이신을 25 ㎍/ml의 농도로 첨가한 배지에서 자라지 못하므로 항생제 저항성을 가지는 형질전환된 숙주세포를 확보할 수 있다. 아울러 pLO1 벡터는 자살 벡터로서 로도박터 스페로이데스 내에서 복제되지 않으므로, 상동재조합(homologous recombination)을 통해 로도박터 스페로이데스 2.4.1의 염색체 상에 단일 교차(single crossover)가 유도되었다. 또한 pLO1 벡터는 레반슈크레이즈(Levansucrase)를 코딩하는 *sacB* 유전자를 함유하고 있어, 서당(sucrose)이 존재하는 배지에서 서당의 폴리머를 형성하여 세포를 죽이게 된다. 따라서 스트렙토마이신과 스펙티노마이신을 각 50 ㎍/ml의 농도로 사용하고 서당을 15%의 농도로 평판배지에 첨가하여, 스트렙토마이신과 스펙티노마이신에 대해서는 저항성을 보이는 동시에 카나마이신에 대해서는 민감성을 나타내는 이중 교차 (double crossover)콜로니를 선별하였다. 이 콜로니는 퀴놀 산화효소를 구성하는 QxtAB를 발현하지 못하도록 구성된 변이주로서 퀴놀의 산화 활성을 나타내지 못하며, 이를 로도박터 스페로이데스 QxtA1 변이주로 명명하였다.

[0059] 시토크롬 bc1(cytochrome bc1) 복합체를 발현하지 못하도록 구성된 변이주 QxtA1-FbcBC1은 상기 로도박터 스페로이데스 변이주 QxtA1로부터 하기 방법에 의해 제조하였다(도 5). 로도박터 스페로이데스 KCTC 12085의 전체 염색체 DNA를 원형모형으로 하여 FbcBC 유전자의 5'-말단 지역을 포함하는 약 0.4 kb의 염기서열 및 3'-말단 지역을 포함하는 약 0.5 kb의 염기서열을 폴리메라아제 연쇄 반응을 통하여 시험관 내에서 합성하였다. FbcBC 유전자의 결실을 위하여 하기 서열번호 5 내지 8의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 각각의 DNA 단편을 얻었다.

[0060] FbcBC5-F : 5'-caa gtt cat cga cga aac cac c-3' (서열번호 5)

[0061] FbcBC5-R-BamHI : 5'-gat gag gat ccc cac gat cca gg-3' (서열번호 6)

[0062] FbcBC3-F-EcoRI : 5'-cgc cga att cca tga gcc gga cg-3' (서열번호 7)

[0063] FbcBC3-R : 5'-gct gat ggt cac gca cga ccc-3' (서열번호 8)

[0064] 또한, 상기 결실의 대상이 되는 FbcBC 유전자의 서열은 서열번호 22(FbcB) 및 23(FbcC)에 나타내었다.

[0065] 이후 각각의 DNA 단편을 클로닝 벡터 상에서 연결하고, 그 사이에 약 1.4 kb에 해당하는 트리메토프림(trimethoprim) 저항성 유전자를 포함하는 DNA 절편을 끼워 넣었다. 완성된 DNA 절편은 자살 벡터인 pLO1 상에 클로닝 하였다. 클로닝 된 구조물은 pLO1 벡터 상에 존재하는 카나마이신 저항성 유전자를 이용하여 카나마이신, 트리메토프림을 각각 25 ㎍/ml의 농도로 사용하여 대장균 내에서 선별하였다. 상기 재조합 벡터를

대장균 S17-1에 형질전환한 다음 로도박터 스페로이데스에 접합법을 통해 넣어 주었다. pLO1 벡터는 자살 벡터로서 로도박터 스페로이데스 내에서 복제되지 않으므로, 상동재조합을 통해 로도박터 스페로이데스 QxtA1 변이주의 염색체 상에 단일 교차가 유도되었다. 이후 트리메토프림을 25 μg/ml의 농도로 사용하고, 서당을 15%의 농도로 평판배지에 첨가하여, 트리메토프림에 대해서는 저항성을 보이는 동시에 카나마이신에 대해서는 민감성을 나타내는 이중 교차 콜로니를 선별하였다. 이때 얻어지는 이중 변이주 QxtA1-FbcBC1은 퀴놀 산화효소의 단량체 중 QxtA를 발현하지 못하는 동시에 시토크롬 bc1 복합체를 발현하지 못하기 때문에 호기 호흡 조건에서 성장하지 못하므로, 혐기 호흡 조건을 마련해 주기 위한 최종 전자수용체로서 디메틸 설폭사이드 (dimethyl sulfoxide, DMSO)를 75 mM이 되도록 배지에 첨가하였다. 혐기 조건의 유지를 위해서는 혐기성 용기(anaerobic jar) 내부에서 수소를 발생시키는 시약 (GasPak EZ Gas generating container system, BD)을 사용하였고, 이때 생성된 수소는 혐기성 용기내의 팔라디움(palladium) 촉매에 의해 산소와 반응하여 물을 생성함으로서 산소를 제거할 수 있었다.

[0066] **실시예 3 : 변이주에서의 남세균 유래 수소 효소 발현을 통한 산소 저항성 수소 효소 선별**

[0067] 상기 실시예 2에서 제조된 호기호흡 관련 유전자가 결실된 로도박터 스페로이데스 변이주 QxtA1 및 로도박터 스페로이데스 변이주 QxtA1-FbcBC1를 디메틸 설폭사이드 (75 mM)가 함유된 시스트롬 배지를 이용하여 성장시켰다.

상기 변이주의 호기성 호흡조건과 혐기성 호흡조건에서의 성장 여부를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0068]

	야생형	변이주	
		QxtA1	QxtA1-FbcBC1
혐기호흡성장[1]	+	+	+
호기호흡성장	+	+	-

[0069] 1 : 혐기호흡성장을 위해 75 mM의 DMSO를 사용

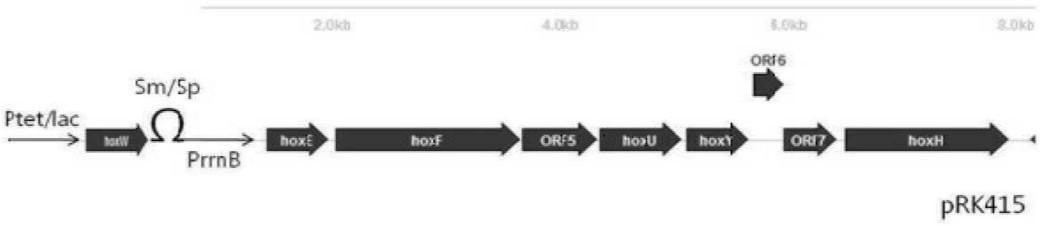
[0070] 상기 모든 균주에서 디메틸 설폭사이드를 최종 전자수용체로 사용하는 혐기호흡이 가능하였으나, 디메틸 설폭사이드가 주어지지 않고 산소를 제공하는 호기호흡 조건의 경우에는 로도박터 스페로이데스 변이주 QxtA1-FbcBC1가 성장하지 못하는 것을 확인하였다.

[0071] 상기 로도박터 스페로이데스 변이주 QxtA1-FbcBC1의 특성을 이용하여, 이 균주 내에서 수소 효소를 발현시키고 호기 조건에서 발효를 통해 성장이 가능한 돌연변이주를 확보하고자 하였다. 이를 위하여 실시예 1에서 재조합 벡터 *pRKHOX*를 접합법을 이용하여 상기 변이주에 넣어주었다. 상기 재조합 벡터 *pRKHOX*에 의해 발현되는 수소 효소의 활성평형이 수소의 생성 방향으로 작용하여 균주 내에서 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드를 재생하는데 기여하기 때문에 포도당의 발효에 의한 성장을 촉진시킬 수 있다. 그러나 상기 수소 효소의 활성부위(active site)가 산소에 대해 민감하여 불활성화가 일어나기 때문에, 산소가 존재하는 호기조건에서는 이러한 한계를 극복하는 자발적 돌연변이(spontaneous mutation)가 유도된 균주만이 평판배지 상에서 성장하여 콜로니를 형성하며, 상기 수소 효소 유전자 상에 돌연변이가 유도된 돌연변이체를 변이주의 생사 여부에 의해 선별할 수 있다.

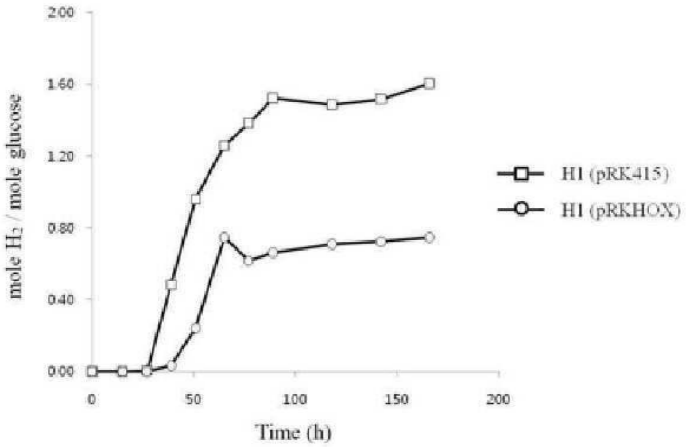
[0072] 상기 확보한 돌연변이체로부터 *pRKHOX*를 수득하여 수소 효소 단백질체의 아미노산 서열의 변형 여부를 확인할 수 있고, 아울러 변형된 수소 효소 단백질체를 발현시키고 분리정제하면 수소 효소의 활성을 측정할 수 있으며, 이 때 산소를 처리해줌으로서 산소에 대한 저항성 획득 정도를 정량적으로 측정할 수 있다. 상기 산소 저항성 수소 효소의 선별방법을 도 6에서 도식화하여 나타내었다.

도면

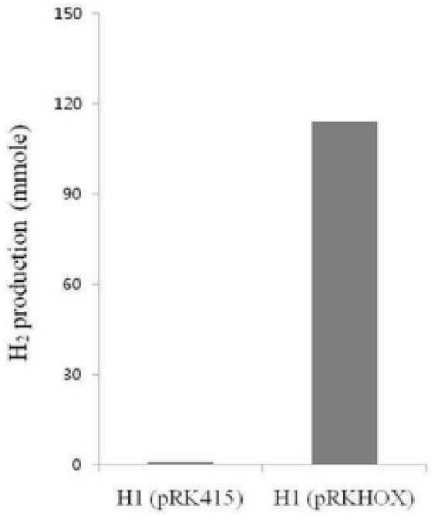
도면1



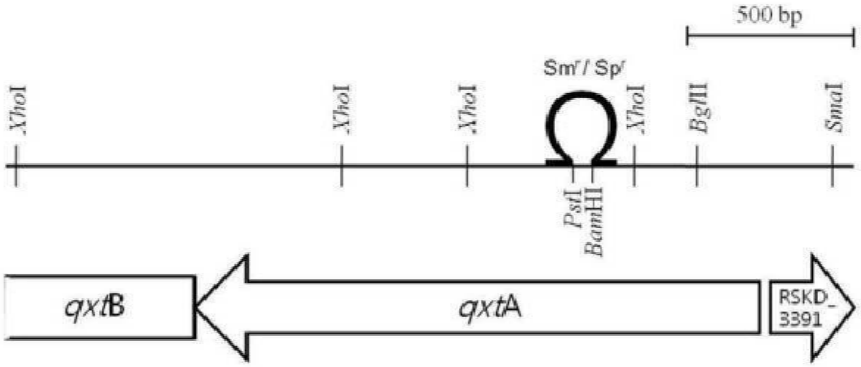
도면2



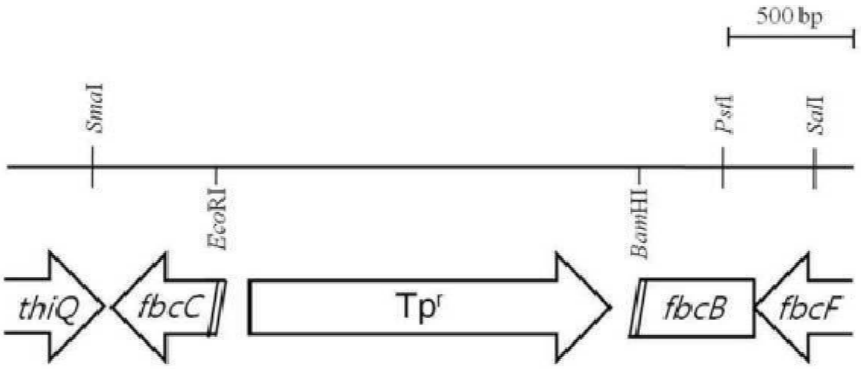
도면3



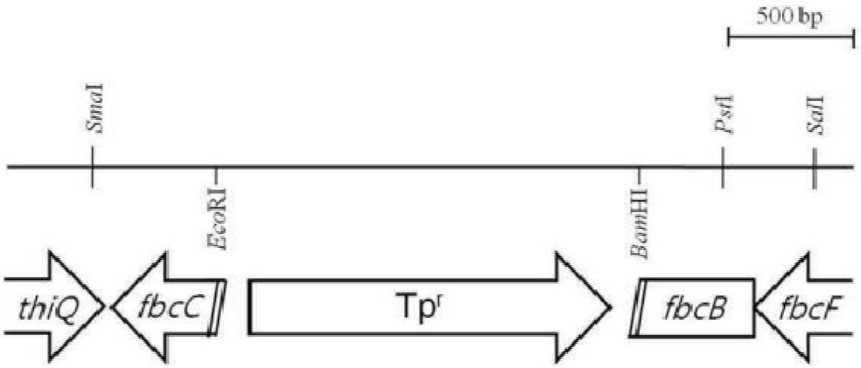
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> A screening method for oxygen-tolerant hydrogenase by the expression of cyanobacterial hydrogenase in Rhodobacter sphaeroides mutant

<160> 23

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> QxtAB5-F primer

<400> 1

gattgctccc gctatggg 18

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> QxtAB5-R-BamHI primer

<400> 2

gcggatccat ccagctgttc accg 24

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> QxtAB3-F-PstI primer

<400> 3

cagctgcagg cacacgcccg cgggc 25

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> QxtAB3-R primer

<400> 4

ctgcggtgcg cagatgcc 18

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FbcBC5-F primer

<400> 5

caagttcatc gacgaaacca cc 22

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FbcBC5-R-BamHI primer

<400> 6

gatgaggatc cccacgatcc agg 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FbcBC3-F-EcoRI primer

<400

> 7

cgccgaattc catgagccgg acg 23

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FbcBC3-R primer

<400> 8

gctgatggtc acgcacgacc c 21

<210> 9

<211> 173

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 9

Met Thr Val Ala Thr Asp Arg Gln Thr Val Pro Pro Ser Ala Ala His

1 5 10 15

Pro Ser Gly Asp Lys Arg Phe Lys Val Leu Asp Ala Thr Met Lys Arg

20 25 30

Asn Gln Phe Asn Gln Asp Ala Leu Ile Glu Ile Leu His Lys Ala Gln

35 40 45

Glu Ile Phe Gly Tyr Leu Glu Glu Asp Val Leu Leu Tyr Val Ala Arg

50 55 60

Gly Leu Lys Leu Pro Leu Ser Arg Val Phe Gly Val Ala Thr Phe Tyr

65 70 75 80

His Leu Phe Ser Leu Lys Pro Ser Gly Lys His Thr Cys Val Val Cys

85 90 95

Leu Gly Thr Ala Cys Tyr Val Lys Gly Ala Gly Asp Leu Leu Lys Thr

100 105 110

Leu Asp Gln Glu Val His Leu Lys Pro Gly Glu Thr Thr Glu Asp Gly

115 120 125

Gln Met Ser Leu Val Thr Ala Arg Cys Ile Gly Ala Cys Gly Ile Ala

130 135 140

Pro Ala Val Val Tyr Asp Gly Lys Val Leu Gly Lys Gln Asn Asp Glu

145 150 155 160

Ala Val Leu Ala Ala Ile Gln Pro Trp Leu Ser Asn Ser

165 170

<210> 10

<211> 533

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 10

Met Asp Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ile Ala Thr Lys Ser Arg Glu Lys

1 5 10 15

Gln Thr Lys Ile Arg Ile Arg Cys Cys Ser Ala Ala Gly Cys Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Leu Glu Glu Lys Val Glu Val Cys Gly Val Gly Cys Met Lys

50 55 60

Phe Cys Gly Arg Gly Pro Leu Val Ala Val Asp Asp Arg Asn Gln Leu

65 70 75 80

Tyr Glu Phe Val Thr Pro Asp Gln Val Gly Asp Ile Val Lys Lys Leu
85 90 95
Gln Lys Pro Asp Ala Val Ala Glu Thr Gly Leu Ile Ser Gly Asp Pro
100 105 110
His His Pro Phe Tyr Ala Leu Gln Arg Asn Ile Ala Leu Glu Asn Ser

115 120 125
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Ser Ile Asp Glu Tyr Ile Ala Leu Gly Gly
130 135 140
Tyr Glu Gln Leu His Lys Val Val Tyr Glu Met Thr Pro Glu Glu Val
145 150 155 160
Ile Val Glu Met Asn Lys Ser Gly Leu Arg Gly Arg Gly Gly Gly Gly
165 170 175
Tyr Pro Thr Gly Leu Lys Trp Ala Thr Val Ala Lys Met Pro Gly Gln
180 185 190

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

260 265 270
Pro Ile Asp Phe Lys Ile Asp Ile Arg Val Gly Ala Gly Ala Phe Val
275 280 285
Cys Gly Glu Glu Thr Ala Leu Ile Ala Ser Val Glu Gly Lys Arg Gly
290 295 300
Thr Pro Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Pro Ala Gln Ser Gly Leu Trp Gln
305 310 315 320
Ser Pro Thr Leu Ile Asn Asn Val Glu Thr Tyr Ala Asn Val Val Pro

325 330 335

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

405 410 415
Pro Ile Glu Tyr Asp Thr Leu Leu Ala Leu Gly Thr Met Met Gly Ser
420 425 430
Gly Gly Met Ile Val Met Asp Glu Ser Thr Asn Met Val Asp Val Ala
435 440 445
Gln Phe Tyr Met Asp Phe Cys Lys Ser Glu Ser Cys Gly Lys Cys Ile
450 455 460
Pro Cys Arg Ala Gly Thr Val Gln Leu Tyr Asp Leu Leu Thr Arg Phe
465 470 475 480

Leu Glu Gly Glu Ala Thr Gln Glu Asp Leu Ile Lys Leu Glu Asn Leu
485 490 495
Cys His Met Val Lys Glu Thr Ser Leu Cys Gly Leu Gly Met Ser Ala
500 505 510
Pro Asn Pro Val Ile Ser Thr Leu Arg Tyr Phe Arg His Glu Tyr Glu
515 520 525
Glu Leu Leu Lys Val
530

<210> 11
<211> 238
<212> PRT
<213> Synechocystis PCC6803
<400> 11

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

1 5 10 15

Glu Gly Ala Ser Ile Leu Gln Ala Ala Lys Glu Ala Gly Val Pro Ile

20 25 30

Pro Thr Leu Cys His Leu Glu Gly Ile Ser Glu Ala Ala Ala Cys Arg

35 40 45

Leu Cys Met Val Glu Val Glu Gly Thr Asn Lys Leu Met Pro Ala Cys

50 55 60

Val Thr Ala Val Ser Glu Glu Met Val Val His Thr Asn Thr Glu Lys

65 70 75 80

Leu Gln Asn Tyr Arg Arg Met Thr Val Glu Leu Leu Phe Ser Glu Gly

85 90 95

Asn His Val Cys Ala Ile Cys Val Ala Asn Gly Asn Cys Glu Leu Gln

100 105 110

Asp Met Ala Ile Thr Val Gly Met Asp His Ser Arg Phe Lys Tyr Gln

115 120 125

Phe Pro Lys Arg Glu Val Asp Leu Ser His Pro Met Phe Gly Ile Asp

130 135 140

His Asn Arg Cys Ile Leu Cys Thr Arg Cys Val Arg Val Cys Asp Glu

145 150 155 160

Ile Glu Gly Ala His Val Trp Asp Val Ala Tyr Arg Gly Ala Glu Cys

165 170 175

Lys Ile Val Ser Gly Leu Asn Gln Pro Trp Gly Thr Val Asp Ala Cys

180 185 190

Thr Ser Cys Gly Lys Cys Val Asp Ala Cys Pro Thr Gly Ser Ile Phe

195 200 205

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

210 215 220

Glu Phe Leu Ala Thr Ala Arg Lys Glu Lys Glu Trp Val Arg

225 230 235

<210> 12

<211> 182

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 12

Met Ala Lys Ile Arg Phe Ala Thr Val Trp Leu Ala Gly Cys Ser Gly
1 5 10 15

Cys His Met Ser Phe Leu Asp Met Asp Glu Trp Leu Ile Asp Leu Ala
20 25 30

Gln Lys Val Asp Val Val Phe Ser Pro Val Gly Ser Asp Leu Lys Glu
35 40 45

Tyr Pro Asp Asn Val Asp Val Cys Leu Val Glu Gly Ala Ile Ala Asn
50 55 60

Glu Glu Asn Leu Glu Leu Ala Leu Glu Leu Arg Gln Lys Thr Lys Val
65 70 75 80

Val Ile Ser Phe Gly Asp Cys Ala Val Thr Ala Asn Val Pro Gly Met
85 90 95

Arg Asn Met Leu Lys Gly Ser Asp Pro Val Leu Arg Arg Ala Tyr Ile
100 105 110

Glu Leu Gly Asp Gly Thr Pro Gln Leu Pro Asp Glu Pro Gly Ile Val
115 120 125

Pro Pro Leu Leu Asp Lys Val Ile Pro Leu His Glu Val Ile Pro Val
130 135 140

Asp Ile Phe Met Pro Gly Cys Pro Pro Asp Ala His Arg Ile Arg Ala
145 150 155 160

Thr Leu Glu Pro Leu Leu Asn Gly Glu His Pro Leu Met Glu Gly Arg
165 170 175

Ala Met Ile Lys Phe Gly
180

<210> 13

<211> 474

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 13

Met Ser Lys Thr Ile Val Ile Asp Pro Val Thr Arg Ile Glu Gly His
1 5 10 15

Ala Lys Ile Ser Ile Phe Leu Asn Asp Gln Gly Asn Val Asp Asp Val
20 25 30

Arg Phe His Val Val Glu Tyr Arg Gly Phe Glu Lys Phe Cys Glu Gly
35 40 45

Arg Pro Met Trp Glu Met Ala Gly Ile Thr Ala Arg Ile Cys Gly Ile

50 55 60

Cys Pro Val Ser His Leu Leu Cys Ala Ala Lys Thr Gly Asp Lys Leu
65 70 75 80

Leu Ala Val Gln Ile Pro Pro Ala Gly Glu Lys Leu Arg Arg Leu Met
85 90 95

Asn Leu Gly Gln Ile Thr Gln Ser His Ala Leu Ser Phe Phe His Leu
100 105 110

Ser Ser Pro Asp Phe Leu Leu Gly Trp Asp Ser Asp Pro Ala Thr Arg
115 120 125

Asn Val Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asp Pro Asp Leu Ala Arg Ala Gly
130 135 140

Ile Arg Leu Arg Gln Phe Gly Gln Thr Val Ile Glu Leu Leu Gly Ala
145 150 155 160

Lys Lys Ile His Ser Ala Trp Ser Val Pro Gly Gly Val Arg Ser Pro
165 170 175

Leu Ser Glu Glu Gly Arg Gln Trp Ile Val Asp Arg Leu Pro Glu Ala
180 185 190

Lys Glu Thr Val Tyr Leu Ala Leu Asn Leu Phe Lys Asn Met Leu Asp

195 200 205

Arg Phe Gln Thr Glu Val Ala Glu Phe Gly Lys Phe Pro Ser Leu Phe
210 215 220

Met Gly Leu Val Gly Lys Asn Asn Glu Trp Glu His Tyr Gly Gly Ser
225 230 235 240

Leu Arg Phe Thr Asp Ser Glu Gly Asn Ile Val Ala Asp Asn Leu Ser

245 250 255

Glu Asp Asn Tyr Ala Asp Phe Ile Gly Glu Ser Val Glu Lys Trp Ser

260 265 270

Tyr Leu Lys Phe Pro Tyr Tyr Lys Ser Leu Gly Tyr Pro Asp Gly Ile

275 280 285

Tyr Arg Val Gly Pro Leu Ala Arg Leu Asn Val Cys His His Ile Gly

290 295 300

Thr Pro Glu Ala Asp Gln Glu Leu Glu Glu Tyr Arg Gln Arg Ala Gly

305 310 315 320

Gly Val Ala Thr Ser Ser Phe Phe Tyr His Tyr Ala Arg Leu Val Glu

325 330 335

Ile Leu Ala Cys Leu Glu Ala Ile Glu Leu Leu Met Ala Asp Pro Asp

340 345 350

Ile Leu Ser Lys Asn Cys Arg Ala Lys Ala Glu Ile Asn Cys Thr Glu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys His Tyr Ile Arg Asn His Asp Val Gln Glu Gly Phe Leu Asn Arg

420 425 430

Val Glu Ala Gly Ile Arg Cys Tyr Asp Pro Cys Leu Ser Cys Ser Thr

435 440 445

His Ala Ala Gly Gln Met Pro Leu Met Ile Asp Leu Val Asn Pro Gln

450 455 460

Gly Glu Leu Ile Lys Ser Ile Gln Arg Asp

465 470

<210> 14

<211> 157

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 14

Met Pro Gly Gln Ser Thr Lys Ser Thr Leu Ile Ile Gly Tyr Gly Asn
1 5 10 15

Thr Leu Arg Gly Asp Asp Gly Val Gly Arg Tyr Leu Ala Glu Glu Ile
20 25 30

Ala Gln Gln Asn Trp Pro His Cys Gly Val Ile Ser Thr His Gln Leu
35 40 45

Thr Pro Glu Leu Ala Glu Ala Ile Ala Ala Val Asp Arg Val Ile Phe
50 55 60

Ile Asp Ala Gln Leu Gln Glu Ser Ala Asn Glu Pro Ser Val Glu Val

65 70 75 80

Val Ala Leu Lys Thr Leu Glu Pro Asn Glu Leu Ser Gly Asp Leu Gly
85 90 95

His Arg Gly Asn Pro Arg Glu Leu Leu Thr Leu Ala Lys Ile Leu Tyr
100 105 110

Gly Val Glu Val Lys Ala Trp Trp Val Leu Ile Pro Ala Phe Thr Phe
115 120 125

Asp Tyr Gly Glu Lys Leu Ser Pro Leu Thr Ala Arg Ala Gln Ala Glu
130 135 140

Ala Leu Ala Gln Ile Arg Pro Leu Val Leu Gly Glu Arg
145 150 155

<210> 15

<211> 522

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 15

atgaccgttg ccaccgatcg ccaaactgtg cccccatctg cggcccatcc tagtggagac 60

aagcgtttta aggtgttaga cgccaccatg aagcgcaacc aatttaatca ggatgccctc 120

attgaaatcc tgcataaagc ccaggaaatt tttggctacc tggaagagga tgttctgctc 180

tacgtagccc gggggcttaa attacccctc agccgggtgt ttggagtggc gacttttac 240

catctttttt cccttaaacc cagtgggaaa catacctgtg tggtctgctt gggaacggct 300

tgctacgtta aaggggcggg ggatttgctg aaaaccctag atcaggaagt ccatctgaaa 360

ccgggggaaa cgacagagga tggacaaatg tccttggtga cggcccgttg cattggagcc 420

tgtggcattg ccccagccgt ggtctatgac ggcaaagtgt tgggcaagca gaatgacgaa 480

gcggtattgg cggcgataca accttggtta agtaacagtt aa 522

<210> 16

<211> 1602

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 16

atggacatta aagaattaaa ggaaattgcc accaaaagcc gtgagaaaca aacaaaaatt 60

cgcattcgtt gttgtagtgc tgccggttgt ctttcttctg aaggggagac ggtgaaaaaa 120

aatctcacca cggcgatcgc cgcagcagga ttggaagaaa aagtggaagt ctgtggggta 180

ggctgtatga agttttgtgg ccggggcccc ctagtggcgg tggatgaccg gaatcaactc 240

tacgaatttg ttaccccaga ccaggtgggg gatattgtca aaaaattgca gaaacccgat 300

gcagttgcag aaacaggctt aatcagtggt gatccccacc atcccttcta cgccctgcaa 360

aggaatattg ctttggaaaa ttcaggccgg attgatcccg aatccattga tgaatacatc 420

gccctagggg gctacgaaca gcttcataag gttgtctatg aaatgacccc agaggaagtg 480

atcgtggaaa tgaacaaaag tggtctgcgg ggtcggggtg ggggcggtta tcccaccggc 540

ttgaaatggg ccacagtggc caaaatgccc ggccagcaaa aatatgtcat ctgcaatgct 600

gacgaaggcg atcccggtgc tttcatggac cgcagtgtgt tggaaagtga tccccatcgc 660

atcctcgaag gtatggcgat cgccgcctat gcagtggggg ctaaccatgg ttacatttat 720

gtgcgggcgg aatacccccc agctatccaa cgactgcaaa aagcgatcca acaggctaaa 780

cgttatggcc tgatgggcac ccaaattttt gactctccca ttgatttcaa gattgatata 840

cgagtaggag ccggtgcctt tgtctgcggt gaagaaacag cattaattgc ctcagtggaa 900

ggaaaacggg gaacgccccg accaagacca ccctatccag cccaatcggg tttgtggcaa 960

agtcccaccc tgattaacaa tgtggaaacc tacgccaacg ttgtacccat cattcgggaa 1020

gggggagatt ggtatggctc cattggtacg gaaaaaagta aaggcaccaa ggtttttgcc 1080

ctcacaggaa aagtggaaaa cgctggtctg attgaagtgc ccatgggaac caccgtgcga 1140

caagtggtgg aggaaatggg gggcggtgta cccaatggtg gccaagtcaa agcagtgcaa 1200

actgggggcc cttccggagg ctgtatcccc gccgataaat tggatactcc catcgaatat 1260

gacaccctat tagccctggg caccatgatg ggttccgggg gcatgattgt catggatgaa 1320

agcaccaata tggtggacgt ggcccagttt tatatggatt tttgcaaatc ggaatcctgt 1380

ggcaaatgta ttccctgccg agcgggcaca gtgcaacttt atgacctttt aacccgcttt 1440

ttagaagggg aagctaccca agaagacttg atcaaactag aaaatctttg ccatatggtt 1500

aaggaaacta gcctttgtgg attggggatg agtgcgccta atccggtaat aagtaccctg 1560

cgctattttc gtcatgaata tgaagaatta ctcaaagtct ag 1602

<210> 17

<211> 717

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 17

atgtctgttg ttactttaac cattgatgat aaggcgatcg ccattgaaga aggcgcaagt 60

attttgcaag cggctaaaga agcaggggtt cccattccca ccctttgcca tttagaaggg 120

atttcagaag cggcagcctg tcgtttgtgc atggtggaag tggaaggcac gaataaattg 180

atgcccgcct gcgttaccgc tgtgagcgaa gaaatggtag tccacaccaa cacagaaaaa 240

ttgcaaaatt accgacgtat gacagtggaa ttacttttt ccgaaggcaa tcatgtctgt 300

gccatttgtg tggctaacgg caactgtgaa ttgcaagata tggccattac ggtgggtatg 360

gatcacagcc gatttaaata tcaatttccc aagcgagaag tggatttatc ccatcccatg 420

tttggcattg atcataaccg ttgtattctc tgtacccgtt gtgtgcgagt ttgcgatgaa 480

attgagggag cccacgtttg ggatgtggct taccggggcg cagaatgcaa aattgtttct 540

ggtttaaatc agccctgggg aaccgttgat gcctgtactt cctgtggcaa atgtgtggat 600

gcctgtccca cgggttctat cttccataaa ggagaaacta ctgctgaaaa aattggcgat 660

cgccgtaagg tggagttttt agccactgcc cgtaaagaaa aggaatgggt caggtag 717

<210> 18

<211> 549

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 18

atggctaaaa ttcgttttgc taccgtttgg ctcgctggtt gttccggctg tcatatgtcc 60

ttccttgata tggacgaatg gctcattgat ctcgctcaaa aagttgatgt ggttttcagt 120

cccgttggtt ctgatctcaa ggaatacccg gacaatgtgg atgtttgcct agtggaaggg 180

gcgatcgcca acgaagaaaa tttagagtta gctttggagt tgagacagaa aacgaaggta 240

gtaatttcct ttggggactg tgctgtaacc gccaatgtcc ccggtatgcg taatatgctc 300

aaaggtagcg atccggttct gcgccgagcc tatattgaac tgggagatgg gacgcctcaa 360

ctgcccgatg aacctggtat tgtgccgcct ctattagaca aggttattcc cctacatgag 420

gttattccgg tggatatttt tatgcccggt tgtcctcccg atgcccaccg tattcgagca 480

acgctagaac cattattaaa tggggaacat cccctcatgg aagggcgagc aatgatcaaa 540

tttggttaa 549

<210> 19

<211> 1425

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 19

atgtctaaaa ccattgttat cgatcccgtt acccggattg aaggccatgc caaaatctcc 60

attttcctca acgaccaggg caacgtagat gatgttcgtt tccatgtggt ggagtatcgg 120

ggttttgaaa aattttgcga aggtcgtccc atgtgggaaa tggctggtat taccgcccgt 180

atttgcggca tttgtccggt tagccatctg ctctgtgcgg ctaaaaccgg ggataagtta 240

ctggcggtgc aaatccctcc agccggggaa aaactgcgcc gtttaatgaa tttagggcaa 300

attacccaat cccacgccct aagtttttc catctcagca gtcctgattt tctgcttggt 360

tgggacagtg atcccgctac tcgcaatgtg tttggtttaa ttgctgctga ccccgattta 420

gctagggcag gtattcggtt acggcaattt ggccaaacgg taattgaact tttgggagct 480

aaaaaaatcc actctgcttg gtcagtgccc ggtggagtcc gatcgccgtt gtcggaagaa 540

ggcagacaat ggattgtgga ccgtttacca gaagcaaaag aaaccgttta tttagcctta 600

aatttgttta aaaatatgtt ggaccgcttc caaacagaag tggcagaatt tggcaaattt 660

ccctccctat ttatgggctt agttgggaaa aataatgaat gggaacatta tggcggctcc 720

ctgcggttta ccgacagtga aggcaatatt gtcgcggaca atctcagtga agataattac 780

gctgatttta ttggtgaatc ggtggaaaaa tggtcctatt taaaatttcc ctactacaaa 840

tctctgggtt atcccgatgg catttatcgg gttggtcccc ttgcccgcct taatgtttgt 900

catcacattg gcaccccgga agcagaccaa gaattagaag aatatcggca acgggctgga 960

ggtgtggcca cgtcctcttt cttttatcat tacgcccgct tggtggaaat tcttgcctgt 1020

ttagaagcca tcgaattgtt aatggctgac cctgatattt tgtccaaaaa ttgtcgagct 1080

aaggcagaaa ttaattgtac cgaagcggtg ggagtgagcg aagcaccccg gggtacttta 1140

ttccaccatt acaagataga tgaagatggt ctaattaaga aagtgaattt gatcattgcc 1200

acgggcaaca ataacttagc catgaataaa accgtggccc aaattgccaa acactacatt 1260

cgcaatcatg atgtgcaaga agggttttta aaccgggtgg aagcgggtat tcgttgttat 1320

gatccctgcc ttagttgttc tacccatgca gcgggacaaa tgccattgat gatcgattta 1380

gttaaccctc agggggaact aattaagtcc atccagcggg attaa 1425

<210> 20

<211> 474

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 20

atgccaggcc aatccaccaa gtccacttta atcatcggtt acggcaatac cctgcggggg 60

gacgacggcg tggggcgtta cctagcggaa gaaattgctc agcaaaactg gccccattgt 120

ggagttattt ccacccatca actcacccca gaattggccg aggcgatcgc cgctgtggac 180

cgggtaattt tcattgatgc ccaactgcag gaatcagcaa acgaaccatc ggtggaagtt 240

gtggccttaa aaaccctgga acccaacgaa ctgtcagggg atttggggca ccggggtaat 300

cccagggaac tcttgaccct ggctaaaatt ctctacggcg ttgaggtaaa ggcttggtgg 360

gtgttgattc cggccttcac ctttgattat ggagagaaat tgtctcccct gaccgcccgg 420

gcccaagccg aagccttagc ccagatccgc cccttggtat tgggggagag ataa 474

<210> 21

<211> 1398

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 21

atgctgaccg cggaaatcct ggcacggata cagttcgcct tcaccgtgtc gttccacatc 60

atctttcccg ccttctcgat cgggctggcg agcttccttg ccgtgctgaa cgtgctctgg 120

ctgaggacaa aggacgagac ctacctcaag ctcttcaatc actggaagaa gatcttcgcc 180

gtggccttcg gcatgggggt cgtctcgggc atcgtcatgt cttaccagtt cggcaccaac 240

tgggcggtct tctcggaccg ggccgggccg gtggtgggcc cgctcatggc ctacgaggtg 300

ctgacggcct tcttcctcga ggcgggcttc ctcgggatca tgctcttcgg acgcaagcgc 360

gtgggcgacg ggctgcacat gctggcgacc gccatggtcg ccatcggcac gctgatctcg 420

gccacctgga tcctcgcggt gaacagctgg atgcacacgc ccgcgggctt ctcgatgggc 480

gagaacggcc agttcctgcc cgaggactgg tgggccatca tcttcaaccc ctccttcccc 540

taccggctcg tgcatatggt gctggcggcc tatctcacca ccgcgcttgt ggtggcggga 600

acggcgggtt accatctgct gcgcgaccgg accaacccgg ccacgcggcg catgttctcg 660

atggcgaccg ggatgatcct cgtggtggcg ccgatccaga tcctcgcggg cgacatgcac 720

gggctgaaca cgctcgagca tcagccggtg aaggtcatgg cgatggaggg ccatttcgaa 780

agccaccccg agggcgcgcc gctgatcctg ttcggcctgc ccgatcagga agcgcaggag 840

atgcgctggt cggtcgagat ccccaagctc tcgagcctga tcctgaaaca ttcgctgaac 900

gcgccgctcg acgggctcga cggggtgccg cgcgacgaac agcccccggt ggccatcgtc 960

ttctggtcgt tccgcgtgat ggtcacgctc gggatgctga tgctgggtct cgggctctgg 1020

tcgctctggg cgcgcttccg cggccggctc tacgactgga aggcgctgca ccgcgcggcg 1080

ctcgcgatgg ggcccgcggg cttcgtggcc gtgctcgcgg gctggatcac gaccgaggtc 1140

ggccgccagc cctggacggt ctacgggcat ctgcgcaccg cagacagcct ctcgccgctc 1200

gatgcctcgg cggtgggcac gtcgctcgtg gccttcatcg tggtctattt cttcgtcttc 1260

ggggctggca ccttttacct gctgcgcatg atgtcgatga cgcccggaac cgagcgcatg 1320

ggcctgcgcg acgggccgat ccgcacggcg ggcataacgc ccggcctgca cgaggacccg 1380

cgcgagagga gcgactga 1398

<210> 22

<211> 1338

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 22

atgtccggaa tccctcacga ccattacgag ccgcggacgg gcatcgagaa gtggctgcac 60

agccggctgc cgattgtcgc gctggcttat gacaccatca tgatccccac ccccagaaac 120

ctgaactgga tgtggatctg gggcgtcgtc ctcgccttct gtctcgtgct gcagatcgtc 180

accggcatcg tgcttgcgat gcattacacg ccgcatgtcg acctggcctt cgcctcggtc 240

gagcacatca tgcgcaacgt gaacggcggc ttcatgctgc gctacctgca tgcgaacggc 300

gcctcgctgt tcttcatcgc ggtctatctg cacatcttcc gcggcctcta ctacggcagc 360

tacaaggcgc cgcgcgaggt cacctggatc gtggggatgc tcatctatct cgcgatgatg 420

gcgaccgcct tcatgggcta cgtgctgccg tggggccaga tgtccttctg gggcgccacc 480

gtgatcaccg gcctcttcgg cgcgatcccg ggcatcggcc attcgatcca gacctggctg 540

ctcggcggcc cggcggtgga caatgccacg ctcaaccgct tcttctcgct gcactacctg 600

ctgcccttcg tgatcgcggc cctcgtggcc atccacatct gggccttcca ctcgacgggc 660

aacaacaacc cgaccggcgt cgaagtgcgc cgcacctcga aggcggaagc ccagaaggac 720

acggttccgt tctggcccta cttcatcatc aaggacgtct tcgccctggc cgtcgtcctg 780

ctggtgttct tcgccatcgt gggcttcatg ccgaactacc tcggccaccc cgacaactac 840

atcgaggcga acccgctctc gacgcccgcg cacatcgtgc cggaatggta cttcctgccc 900

ttctacgcga tcctgcgcgc cttcaccgcc gacgtctggg tggtgcagat cgccaacttc 960

atcagcttcg gcatcatcga cgccaagttc ttcggcgtgc tcgcgatgtt cggcgcgatc 1020

ctcgtgatgg cgctggtgcc gtggctcgac acctcgccgg tgcggtcggg gcgctaccgc 1080

ccgatgttca agatctactt ctggctgctc gcggcggact tcgtgatcct gacctgggtc 1140

ggcgcccagc agaccacctt cccctacgac tggatctcgc tcatcgcatc ggcctactgg 1200

ttcgcctact tcctggtgat cctgccgatc ctcggcgcga tcgagaagcc ggtggctccg 1260

cccgcgacca tcgaagaaga cttcaacgcc cactactcgc cggcgaccgg cggcacgaaa 1320

acggtcgtgg cagagtaa 1338

<210> 23

<211> 858

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 23

atgatccgca aactcactct cacagccgcc acggcgctcg ccctctcggg cggcgcggcg 60

atggcggccg gcggcggcca tgtcgaggac gtgcccttct cgttcgaggg cccgttcgga 120

accttcgacc agcaccagct ccagcggggc ctgcaggtct ataccgaggt ctgcgcagcc 180

tgccacggga tgaagttcgt cccgatccgc agcctgtcgg aaccgggcgg ccccgagctg 240

cccgaggatc aggtccgggc ctatgccacg cagttcaccg tgaccgacga ggaaacgggt 300

gaggaccgcg agggcaagcc caccgaccac ttcccccatt cggcgctgga gaacgcgccc 360

gacctctcgc tcatggcgaa ggcgcgggcg ggcttccacg gcccgatggg caccggcatc 420

agccagctct tcaacggcat cggcgggccg gaatacatct actcggtgct gacgggcttc 480

ccggaagagc cgccgaaatg cgccgaaggc catgagccgg acggcttcta ctacaaccgc 540

gccttccaga acggttcggt ccccgacacc tgcaaggacg cgaacggcgt gaagaccacc 600

gccggctcgt ggatcgccat gccgcctccg ctcatggacg atctggtgga atatgccgac 660

ggccacgacg ccagcgttca tgcgatggca gaagacgtct cggccttcct gatgtgggcg 720

gccgaaccga agctgatggc ccgcaagcag gccggcttca ccgccgtcat gttcctgacc 780

gtgctgtcgg tgctgctcta cctcacgaac aagcggctct gggccggcgt gaagggcaag 840

aagaagacga acgtctga 858