(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0060384
(43) 공개일자 2011년06월08일

(51) Int. Cl.
C12N 9/20 (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)
C12R 1/72 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0116957
(22) 출원일자 2009년11월30일
심사청구일자 2009년11월30일

(71) 출원인
한국화학연구원
대전 유성구 장동 100번지
충남대학교산학협력단
대전 유성구 궁동 220 충남대학교
(72) 발명자
송재광
대전광역시 유성구 관평동 666 대덕테크노밸리 4단지아파트 405동 1701호
김동명
대전광역시 서구 삼천동 청솔아파트 7동 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일광장특허법인, 김선장, 김애라

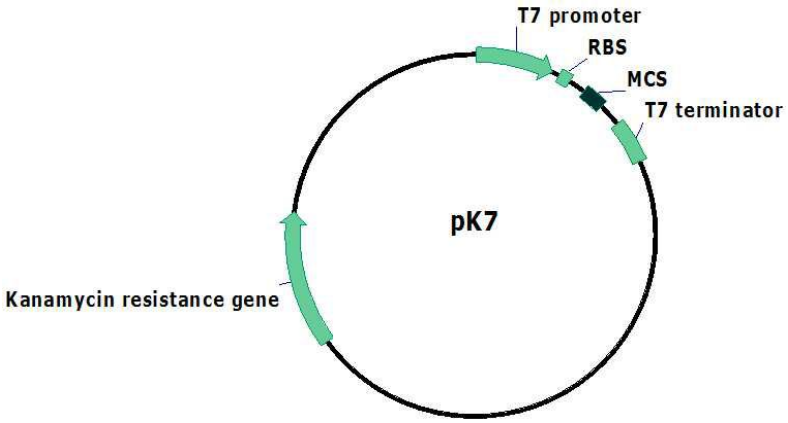
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 효소 활성이 증가된 신규한 리파제 변이체

(57) 요 약

본 발명은 캔디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파제 B(CalB) 단백질 변이체에 관한 것으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질의 274 위치 내지 289 위치의 아미노산 중 일부가 치환된, 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열로 표시되는 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 본 발명에 따른 CalB 단백질 변이체는, 기존의 CalB 단백질보다 최대 35 배 증가된 효소 활성을 가지므로 리파제를 이용하는 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

박창길

대전광역시 동구 용전동 24-27

권민아

충청남도 공주시 장기면 금암리 314-117

권용찬

대전광역시 유성구 궁동 480-2

송봉근

대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 109동 804호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10866020003-08N6602-00310/SI-0901

부처명 과학기술부/기획예산처

연구관리전문기관

연구사업명 바이오연구개발사업/정부출연 일반사업

연구과제명 효소 다양성 및 탐색 효율성 극대화를 위한 메타게놈 라이브러리 구축 핵심 신기술개발/화학산업용 바이오촉매 활용기술 기반구축

기여율

주관기관 한국생명공학연구원/한국화학연구원

연구기간 2008년 08월 01일~2009년 7월 31일/2009년 01월 01일~2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 캔디다 안타르크티카 유래의 리파제 B(CalB) 단백질의 274 위치 내지 289 위치의 아미노산 중 일부가 치환된, 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열로 표시되는 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CalB 단백질 변이체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 CalB 단백질 변이체의 효소 활성이 CalB 보다 3 내지 35 배 증가한 것을 특징으로 하는, CalB 단백질 변이체.

청구항 3

제 1 항에 따른 CalB 단백질 변이체 서열을 코딩하는 유전자.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 유전자가 서열번호 10 내지 16의 염기 서열로 표시되는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 유전자.

청구항 5

제 3 항에 따른 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 재조합 벡터가 pK7 벡터에 상기 유전자를 삽입하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 7

제 5 항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 숙주 세포가 피키아 파스토리스인 숙주 세포.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소 활성이 증가된, 캔디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파제 B(CalB) 단백질 변이체에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 기존의 CalB 단백질보다 높은 활성을 갖는 CalB 단백질 변이체, 이를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리파제(lipase)란 다양한 범위의 수용성 혹은 비수용성 카르복실산 에스테르나 아마이드(amide)의 가수분해 혹

은 합성을 촉매하는 효소를 말하며, 가수분해(hydrolysis), 알콜분해(alcoholysis), 산분해(acidolysis), 에스테르화(esterification), 아미노분해(aminolysis) 등과 같이 다양한 생물 촉매 반응에 관여한다.

[0003] 리파제는 수용액 상태에서 뿐 아니라 유기 용매에서도 활성을 유지하고, 촉매반응 과정에 별도의 보조인자(cofactor)를 필요로 하지 않고, 다양한 기질에 대해 기질 특이성을 나타내며, 광학이성질체 중 어느 한 쪽에 대해서만 활성을 나타내는 이성질체 선택성을 가지고 있어 산업적 응용성이 높은 효소 중의 하나이다. 현재까지 많은 종류의 동물, 식물, 미생물이 리파제를 생산하는 것으로 알려졌으며, 리파제의 생화학적 특성에 대한 연구, 리파제 유전자를 확보하기 위한 연구가 진행되고 있다. 특히, 식품, 세제, 정밀화학, 화장품 및 대체에너지산업 등 산업 전반에 걸쳐서 리파제를 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 의약품을 비롯한 부가가치가 높은 선도물질을 합성하는 정밀화학분야에서 리파제가 중요시되는 이유 중의 하나는, 산업에 널리 쓰이는 키랄 소재에 에스테르 결합이 많이 포함되어 있기 때문이다. 키랄성(chirality)을 지닌 대부분의 의약품이나 농약들은 특정 에난티오머(enantiomer)만 약리활성을 가지고 다른 에난티오머는 활성이 없거나 심지어 독성을 보이기도 하므로 활성 에난티오머만을 생산하는 것이 중요하다. 비대칭 화학 합성법으로 에스테르 화합물을 합성하는 경우, 최고 700 psi의 고압과 250℃ 이상의 고온에서 반응이 진행되기 때문에 에너지가 많이 소모되며 품질에 좋지 않은 영향을 미치는 여러 부반응이 일어나고, 전환율 및 광학순도가 낮아 고순도의 키랄 화합물의 생산이 어렵다. 최근에는 이러한 문제점을 보완하기 위해서, 위치특이성과 입체특이성 및 다양한 기질특이성을 나타내는 리파제를 생촉매로 하는 반응이 활발히 연구되고 있으나, 산업적으로 적용하기에 리파제의 활성이 충분치 못한 단점 때문에 응용 가능성에 제한을 받고 있다.

[0005] 따라서, 리파제의 광범위한 적용을 위하여 효소 활성이 증가된 리파제의 제공 및 확보가 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 효소 활성이 증가된 CalB 단백질 변이체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은 상기 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질의 274 위치 내지 289 위치의 아미노산 중 일부가 치환된, 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열로 표시되는 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CalB 단백질 변이체를 제공한다.

[0011] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 CalB 단백질 변이체 서열을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0012] 상기 또다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0013] 상기 또다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

효 과

[0014] 본 발명에 따른 효소 활성이 증가된 CalB 단백질 변이체는 생체외에서 효소의 활성이 약 27배 증가하고, 생체내에서 효소의 활성이 약 34배 증가하는 등 천연형 CalB 단백질보다 높은 활성을 나타내어 고부가가치의 정밀화학 산업과 화장품, 세제 산업 등에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 캔디다 안타르크티카 유래의 리파제 B(CalB) 단백질의 274 위치 내지 289 위치의 아미노산 중 일부가 치환된, 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열로 표시되는 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CalB 단백질 변이체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 CalB 단백질 변이체는 또한 이와 기능적으로 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 동등물 또는 기능적 유도체를 본 발명의 범위에 포함한다. 이러한 기능적 동등물에는 서열번호 2 내지 8로 표시되는 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 변이체를 포함한다.

[0017] 경우에 따라, 본 발명의 CalB 단백질 변이체는 이들의 물리, 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가질 수 있어 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수 있으며, 이러한 수식에 의해 증가된 CalB 단백질 변이체의 활성이 실질적으로 유지되는 한, 이러한 기능적 유도체도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0018] 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 280 위치의 류신이 프롤린으로, 283 위치의 알라닌이 글리신으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약 11배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0019] 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 280 위치의 류신과 283 위치의 알라닌 모두가 글리신으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약 18배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0020] 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 275 위치의 알라닌이 아르기닌으로, 277 위치의 알라닌이 히스티딘으로, 278 위치의 알라닌이 아르기닌으로, 280 위치의 류신이 글리신으로, 281 위치의 알라닌이 류신으로, 282 위치의 프롤린이 글리신으로, 283 위치의 알라닌이 류신으로, 284 위치의 알라닌이 트립토판으로, 285 위치의 알라닌이 아르기닌으로, 286 위치의 알라닌이 발린으로, 287 위치의 아이소류신이 세린으로, 288 위치의 발린이 글리신으로, 289 위치의 알라닌이 글리신으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약 17배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0021] 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 274 위치의 발린이 세린으로, 275 위치의 알라닌이 발린으로, 276 위치의 알라닌이 류신으로, 277 위치의 알라닌이 발린으로, 278 위치의 알라닌이 세린으로, 279 위치의 류신이 리신으로, 280 위치의 류신이 트레오닌으로, 281 위치의 알라닌이 아르기닌으로, 282 위치의 프롤린이 아르기닌으로, 284 위치의 알라닌이 메티오닌으로, 285 위치의 알라닌이 세린으로, 286 위치의 알라닌이 발린으로, 287 위치의 아이소류신이 류신으로, 288 위치의 발린이 글루타민으로, 289 위치의 알라닌이 세린으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약 17배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0022] 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 274 위치의 발린이 타이로신으로, 275 위치의 알라닌이 글리신으로, 276 위치의 알라닌이 세린으로, 277 위치의 알라닌이 트레오닌으로, 278 위치의 알라닌이 아이소류신으로, 279 위치의 류신이 트레오닌으로, 281 위치의 알라닌이 메티오닌으로, 282 위치의 프롤린이 글루탐산으로, 283 위치의 알라닌이 글리신으로, 284 위치의 알라닌이 트레오닌으로, 285 위치의 알라닌이 리신으로, 286 위치의 알라닌이 아르기닌으로, 287 위치의 아이소류신이 발린으로, 288 위치의 발린이 히스티딘으로, 289 위치의 알라닌이 리신으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약 35배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0023] 서열번호 7의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 274 위치의 발린이 알라닌으로, 275 위치의 알라닌이 글리신으로, 276 위치의 알라닌이 트레오닌으로, 277 위치의 알라닌이 류신으로, 278 위치의 알라닌이 아르기닌으로, 279 위치의 류신이 발린으로, 280 위치의 류신이 히스티딘으로, 281 위치의 알라닌이 발린으로, 283 위치의 알라닌이 페닐알라닌으로, 284 위치의 알라닌이 아스파라긴으로, 285 위치의 알라닌이 류신으로, 286 위치의 알라닌이 아스파라긴으로, 287 위치의 아이소류신이 발린으로, 289 위치의 알라닌이 아스파틱산으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약

18배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0024] 서열번호 8의 아미노산 서열로 표시되는 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 천연형 CalB 단백질의 274 위치의 발린이 글루타민으로, 275 위치의 알라닌이 시스테인으로, 276 위치의 알라닌이 프롤린으로, 277 위치의 알라닌이 류신으로, 278 위치의 알라닌이 아이소류신으로, 280 위치의 류신이 리신으로, 281 위치의 알라닌이 발린으로, 282 위치의 프롤린이 알라닌으로, 283 위치의 알라닌이 류신으로, 284 위치의 알라닌이 세린으로, 285 위치의 알라닌이 타이로신으로, 287 위치의 아이소류신이 알라닌으로, 288 위치의 발린이 세린으로, 289 위치의 알라닌이 글루탐산으로 치환된 것으로, 천연형 CalB 단백질과 비교하여 약 17배의 증가된 효소 활성을 갖는다(표 1 참조).

[0025] 본 발명은 또한, 상기 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0026] 상기 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 유전자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 CalB 단백질 변이체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 상기 CalB 단백질 변이체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고 코딩 영역을 제외한 부분에서도 단백질의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명에서 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 유전자는 바람직하게는 서열번호 10 내지 16의 염기 서열로 표시되는 유전자이다. 본 발명의 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 유전자는 이를 발현하는 벡터에 의해 제공될 수 있다.

[0027] 본 발명은 상기 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0028] 본 발명에서 "벡터"는 숙주 세포에 CalB 단백질 변이체를 코딩하는 DNA를 도입하여 CalB 단백질 변이체를 발현시키기 위한 수단을 말하며, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함하고, 바람직하게는 플라스미드 벡터이다.

[0029] 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 숙주가 효모인 경우에는 PHO5 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터 등이 사용될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0030] 구체적으로, 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터는 T7 프로모터를 포함하는 pK7 벡터에 상기 CalB 단백질 변이체 서열을 코딩하는 유전자를 삽입하여 제조될 수 있다.

[0031] 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환되어 CalB 단백질 변이체를 생산하는 숙주세포를 제공한다.

[0032] 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용한다. 숙주세포로는 에쉐리키아 콜라이(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스타필로코쿠스(Staphylococcus)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(Aspergillus)), 효모(예를 들어, 피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 사카로마이세스 세르비지애(Saccharomyces cerevisiae), 쉬조사카로마이세스(Schizosaccharomyces), 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa)등과 같은 진핵 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다. 이 중에서 특히, 피키아 파스토리스가 바람직하다.

[0033] 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시키기 위하여, 당 분야에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 이러한 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합법, 인산 칼슘($CaPO_4$) 침전법, 염화 칼슘($CaCl_2$) 침전법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0034] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하

기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

실 시 예

[0035] **실시예 1: 변이체 라이브러리의 구축 및 무세포 단백질 합성법을 이용한 CalB 단백질 변이체의 제조**

[0036] Genbank accession No. P41365의 서열정보를 바탕으로 서로 중첩된 50개 내외의 뉴클레오티드 염기로 구성된 올리고머를 인공적으로 합성한 후, overlapping PCR 법을 이용하여 완전한 형태의 천연형 CalB 유전자를 획득하였다. 이러한 천연형 CalB 유전자에 대하여 서열번호 17 내지 21의 정방향 프라이머 및 서열번호 22 내지 26의 역방향 프라이머의 축퇴성 프라이머(degenerate primer)를 이용하여 중복-연장(overlap-extension) PCR을 실시하여, 천연형 CalB 단백질의 여러 위치의 아미노산에 무작위로 변이가 일어난 변이체 유전자의 라이브러리를 구축하였다. 상기 PCR은 94℃에서 5분, 94℃에서 1분, 55 ~ 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 반응시키는 것을 1 사이클로 하여 25 사이클 반응시킨 후 72℃에서 10분 반응시킴으로써 종결시켰다. PCR 생성물을 NdeI/SalI으로 절단하고, 이를 pK7 플라스미드(Kim et al., Eur. J. Biochem., 239:881-886 (1996); 도 1 참조)에 클로닝하여 대장균(*E.coli*) JM109 컴피턴트(competent) 셀을 형질전환시켰다. LB-아가(agar) 플레이트에서 밤새 배양시킨 후, 각각의 콜로니의 각 CalB 단백질 변이체 유전자를, 서열번호 17 및 22의 프라이머를 이용하여 콜로니 PCR 반응(94℃에서 5분, 94℃에서 1분, 55 ~ 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 반응시키는 것을 1 사이클로 하여 25 사이클 반응시킨 후 72℃에서 10분 반응시킴)으로 증폭시키고 바로 96 웰 플레이트에서 무세포 단백질 합성을 위한 주형으로 사용하였다(도 2 참조).

[0037] 무세포 단백질 합성 반응을 위한 표준 반응액은 총 부피 50㎕에서 다음의 조성을 갖는다: 57mM Hepes-KOH(pH 8.2), 1.2mM ATP, CTP, GTP 및 UTP 각각 0.85mM, 90mM 글루타민산 칼륨, 80mM 아세트산 암모늄, 12mM 아세트산 마그네슘, 34㎍/ml L-5-포밀-5,6,7,8-테트라히드로폴산(폴린산), 각각 1.0mM의 20개 아미노산, 67mM 크레아틴 인산, 3.2㎍/ml 크레아틴 인산화 효소, 0.01mM L-[U-^{14}C] 류신(11.3 GBq/mmol), 10.0㎍/ml의 PCR-증폭시킨 유전자 및 27%(v/v)의 S30 추출물을 포함한다. 산화 글루타티온:환원 글루타티온을 4:1의 비율로 혼합한 글루타티온 완충액(5mM)을 반응액에 가하여 산화조건을 제공하여, 합성된 CalB 분자의 이황화 결합을 형성하였다. 이상의 방법으로 합성된 단백질의 양을 트라이클로로아세트산(TCA)-불용성 방사성 분석을 통하여 계산하였다. 0.1N NaOH 수용액으로 시료를 희석하여 상온에서 1시간 방치한 후, 종이 필터 위에 떨어뜨렸다. 이 필터를 저온으로 유지된 5% TCA 수용액에 15분 동안 담근 후, 새로운 5% TCA 수용액으로 교체하는 과정을 3회 반복하였다. 불용성 침전 과정을 모두 마친 종이필터의 방사성량은 액체섬광계측기(Wallac 1410 liquid scintillation counter, Pharmacia LKB)를 이용하여 측정하였다.

[0038] **실시예 2: CalB 단백질 변이체의 효소 활성 측정**

[0039] 실시예 1에서 무세포 단백질 합성 반응을 통하여 생성된 CalB 단백질 변이체에서 천연형 CalB 단백질과 비교하여 높은 효소 활성을 나타내는 변이체를 선별하였다. 이러한 선별과정을 통하여 실시예 1의 CalB 변이체 라이브러리에서 서열번호 2에서 8에 이르는 고활성 변이체를 획득하였다.

[0040] CalB의 리파제 활성도 측정에는 기질로서 p-니트로페닐 팔미테이트(pNPP)를 사용하였다. 무세포 단백질 합성 반응을 위한 표준 반응액을 200배로 희석한 40㎕ 또는 피키아 파스토리스 스트레인 X-33에서 발현하여 배양액으로부터 정제한 CalB 단백질 변이체(100ug/ml)의 40ul를 미리 37 ℃로 가온한 1ml의 분석 완충액(아세토니트릴 중에 용해시킨 10㎕의 10mM pNPP, 40㎕의 에탄올 및 950㎕의 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 8.0))에 가하고, 시간에 따른 초기 흡광도의 변화를 405 nm에서 관찰하였다. 측정된 흡광도를 표준 곡선과 비교하여 생성된 p-니트로페놀의 양을 측정하였다. 이때, 효소 활성 1 유닛(unit)은 1분당 1㎛mol의 p-니트로페놀을 생산하는 데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

[0041] CalB 단백질 변이체의 상대적인 활성을 측정하기 위해, pNPP 가수분해로 인한 흡광도의 변화를 96 웰 플레이트 리더로 측정하였다(표 1 참조). 변화된 흡광도의 값으로부터 상기 효소 활성 유닛 단위로 계산하여 천연형 CalB 단백질과 대비하여 높은 효소활성을 나타내는 변이체를 선별하였다. 천연형 CalB 단백질 대비 고활성 변이체의 흡광도 증가, 즉 효소활성 유닛의 증가를 표 1에 나타내었다(반응용액의 흡광도 측정값이 1.0 이상일 경

우, 적절한 배수로 희석하여 측정하였음).

[0042] **실시예 3: CalB 단백질 변이체의 피키아 파스토리스에서의 발현 및 정제**

[0043] CalB 단백질 변이체 라이브러리의 스크리닝에서 높은 활성을 보이는 서열번호 2 내지 8의 CalB 단백질 변이체를 다음과 같이 피키아 파스토리스에서 발현시켰다. 서열번호 10 내지 16의 CalB 변이체를, 서열번호 27 및 28의 프라이머(각각 EcoRI 및 NotI 제한효소 부위로 플랭킹함)를 사용하여 PCR-증폭(94℃ 1분, 58℃ 1분, 72℃ 1분의 온도 사이클을 20회 반복함)시켰다. pPICZαA 발현 벡터(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)의 α-팩터 신호 서열의 프레임에 CalB 단백질 변이체를 클로닝하는 과정은 다음과 같다. PCR 생성물을 아가로스 젤로 정제하고, EcoRI과 NotI 제한효소를 이용하여 벡터와 PCR 산물을 처리하였다. 다시 아가로스 젤에서 회수한 후, T4 DNA 라이게이즈(Takara)를 이용하여 접합하였다. 피키아 파스토리스 스트레인 X-33(Invitrogen)을 SacI로 자른 플라스미드로 제조자의 매뉴얼(Invitrogen)에 따라 전기충격유전자전달법에 의해 형질전환시켰다. CalB-분비 형질전환체를 0.5% 트라이뷰티린을 함유한 BMMY 아가 플레이트(Invitrogen) 상에서 선별하고, 이후 피키아 파스토리스에서의 발현 및 CalB 단백질의 정제에 사용하였다.

[0044] 양성 클론을 200ml의 BMGY 배지(Invitrogen)에서 24 시간 동안 30℃에서 배양하였다. 배양액을 8,000xg 10분간 원심분리한 후, 셀 펠렛을 1%(v/v) 글리세롤 대신 0.5%(v/v) 메탄올을 함유시킨, 바로 만든 BMMY 배지에 옮겼다. 배양하는 동안, 24 시간마다 0.5%(v/v)의 메탄올을 첨가하였다. 160 시간 동안 배양한 후, 상청액을 8,000 x g 10분 간 원심분리하고 0.45μm의 기공을 갖는 막을 통해 여과시켜 잔여 박테리아 세포를 제거하였다. 이후, 여과시킨 상청액을 약 5배로 농축시키고 이를 3,000 Da의 분자량 한계를 갖는 직교류여과(tangential flow filtration) 막(Millipore; 미국 메사추세츠주 빌러리카 소재)을 이용하여 4배 부피의 Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 투석여과시켰다. SDS-PAGE 분석상에서 함께 나타나는 오염 단백질을 추가로 제거하기 위하여, 각 샘플을 5,000 Da의 분자량 한계 막을 갖는 센트리콘(centricon) 원심분리 장치(Millipore)로 한외여과(ultrafiltration)시켰다. 이와 같이 서열번호 2 내지 8의 CalB 단백질 변이체에 대하여 피키아 파스토리스 스트레인 X-33에서 발현하여 정제 과정을 수행하였다(도 3 참조).

[0045] **실시예 4: CalB 단백질 변이체의 비활성 측정**

[0046] 고활성 CalB 단백질 변이체를 탐색하는 방법으로서 사용되었던 무세포단백질합성법에 의한 라이브러리 발현과 재조합세포내 발현의 호환성을 검증하기 위하여, 실시예 3에서 정제한 서열번호 2 내지 8의 CalB 단백질 변이체의 비활성(specific activity)을 측정하였다. 그 결과를 아래 표 2에 나타내었다.

[0047] **비교예 1: 천연형 CalB의 효소 활성 측정**

[0048] 서열번호 10 내지 16의 변이 유전자가 아닌 서열번호 9의 천연형 CalB 유전자를 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일하게 실시하여 천연형 CalB의 리파제 활성도를 측정하였다(표 1 참조).

[0049] **비교예 2: 천연형 CalB의 정제**

[0050] 피키아 파스토리스 스트레인 X-33에서 발현하여 서열번호 1의 CalB 단백질을 정제하였다(도 3 참조).

[0051] **비교예 3: 천연형 CalB의 비활성 측정**

[0052] 서열번호 1의 천연형 CalB의 비활성(specific activity)을 측정하였다(표 2 참조).

[0053] 도 3에 나타낸 바와 같이, 서열번호 1의 CalB 단백질과 서열번호 2 및 3의 CalB 단백질 변이체에 대하여 피키아 파스토리스 스트레인 X-33에서 발현하여 정제 과정을 수행한 결과, 활성이 증가된 CalB 단백질 변이체가 천연형 CalB 단백질에 비하여 결코 생산효율과 정제과정에 있어서 문제가 발생하지 않음을 알 수 있다.

표 1

[0054]

변이체 서열 번호	흡광도 변화값 (△OD/min)	효소 활성 (unit/ml)	증가율
1 (천연형 CalB)	0.09	1.13	1.0
2 (변이체 #33-PG)	0.99	12.5	11.1
3 (변이체 #33-GG)	1.60	20.1	17.8
4 (변이체 B1-37)	1.50	18.7	16.5
5 (변이체 B3-92)	1.74	19.3	17.1
6 (변이체 B4-17)	1.54	39.5	35.0
7 (변이체 G4-58)	1.62	20.3	18.0
8 (변이체 H2-79)	1.52	19.1	16.9

[0055] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 서열번호 2 내지 8의 CalB 단백질 변이체는 서열번호 1의 천연형 CalB 단백질과 비교하여 각각 약 11배, 18배, 17배, 17배, 35배, 18배 및 17배의 증가된 효소 활성을 갖는다.

표 2

[0056]

변이체 서열 번호	흡광도 변화값 (△OD/min)	효소 활성 (unit/mg)	증가율
1 (천연형 CalB)	0.05	34.5	1.0
2 (변이체 #33-PG)	0.84	580	16.8
3 (변이체 #33-GG)	1.37	945	27.4
4 (변이체 B1-37)	1.32	911	26.4
5 (변이체 B3-92)	1.38	955	27.7
6 (변이체 B4-17)	2.23	1,540	44.6
7 (변이체 G4-58)	1.46	1010	29.3
8 (변이체 H2-79)	1.34	925	26.8

[0057] 또한, 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 서열번호 1의 천연형 CalB 단백질 및 서열번호 2 내지 8의 CalB 단백질 변이체는 각각 34.5 units/mg, 580 units/mg, 945 units/mg, 911 units/mg, 955 units/mg, 1540 units/mg, 1010 units/mg 및 925 units/mg 의 비활성(specific activity)을 나타내었다. 즉, CalB 단백질 변이체들은 각각 천연형 CalB 단백질 대비 약 17배, 28배, 26배, 28배, 45배, 29배 및 27배의 비활성 증가율을 나타내었다. 이는 본 발명의 탐색법이 기존 세포 기반 탐색시스템과 호환가능하며, 향후 대량 생산 방법으로서 무세포가 아닌 숙주세포 기반시스템에서도 본 발명의 CalB 단백질 변이체들이 유효함을 입증하는 것이다.

도면의 간단한 설명

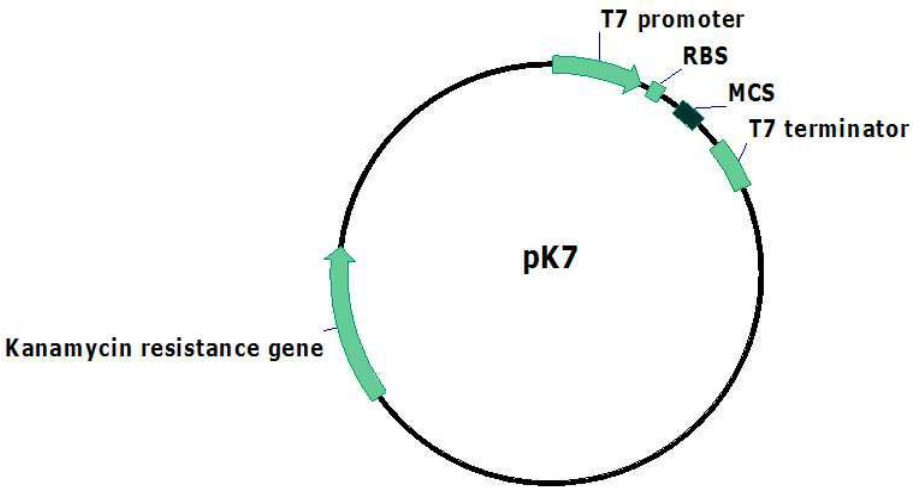
[0058] 도 1a는 pK7 벡터의 유전자지도이고, 도 1b는 pK7 벡터에 천연형 CalB 또는 변이체 CalB 유전자가 삽입된 경우의 유전자지도이다.

[0059] 도 2는 CalB 변이 유전자 라이브러리의 제조 및 발현을 위한 도식이다.

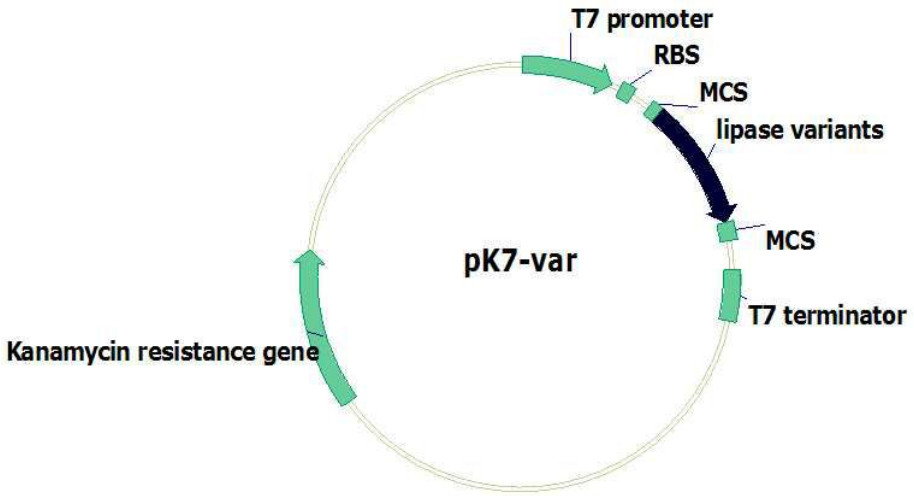
[0060] 도 3a 및 도 3b는 각각 천연형 CalB와 고활성으로 선발된 서열번호 2 및 3의 CalB 단백질 변이체를 피키아 파스토리스 세포에서 발현하였을 때의 배양 상등액(도 3a), 및 정제효소액(도 3b)의 폴리아크릴아미드 젤 분석 사진이다.

도면

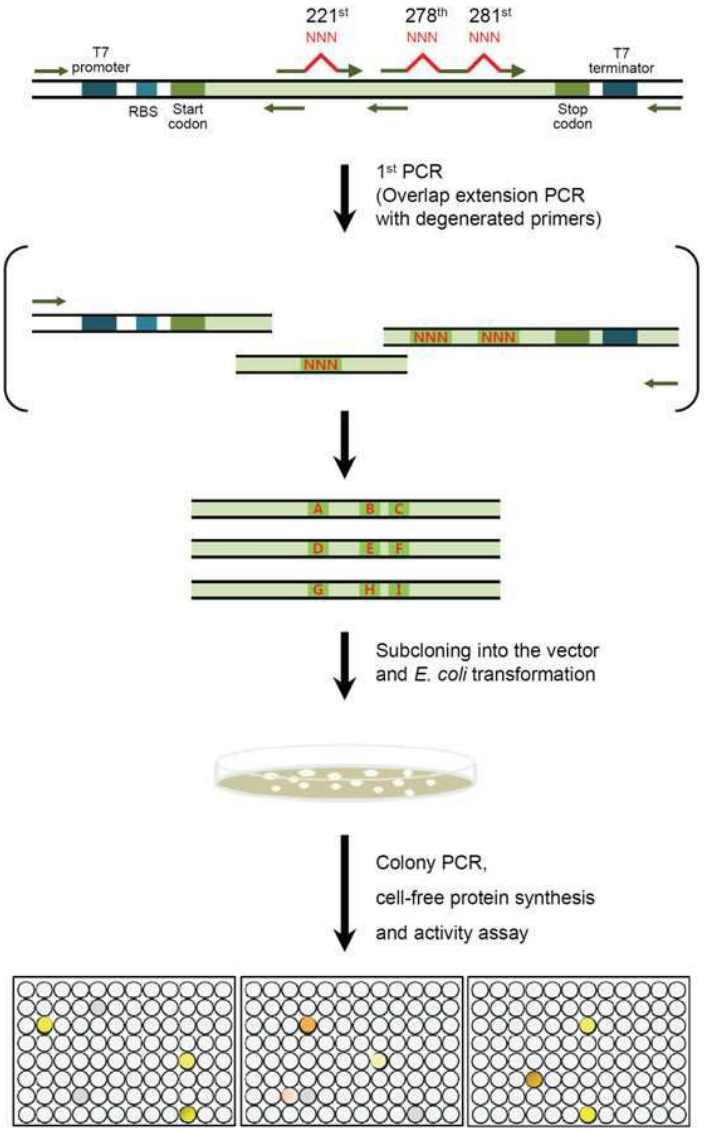
도면1a


T7 promoter
RBS
MCS
T7 terminator
pK7
Kanamycin resistance gene

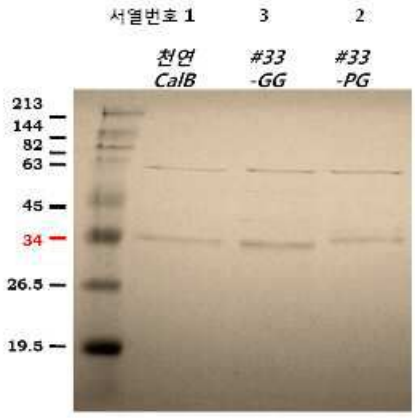
도면1b


T7 promoter
RBS
MCS
lipase variants
MCS
pK7-var
T7 terminator
Kanamycin resistance gene

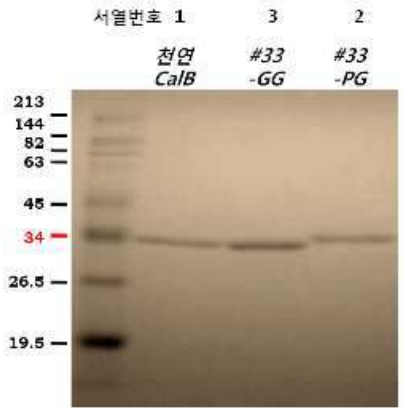
도면2


221st
278th
281st
NNN
NNN
NNN
T7
promoter
T7
terminator
RBS
Start
codon
Stop
codon
1st PCR
(Overlap extension PCR
with degenerated primers)
NNN
NNN
NNN
A
B
C
D
E
F
G
H
I
Subcloning into the vector
and E. coli transformation
Colony PCR,
cell-free protein synthesis
and activity assay

도면3a


서열번호 1
3
2
천연
CalB
#33
-GG
#33
-PG
213
144
82
63
45
34
26.5
19.5

도면3b



서 열 목 록

<110> KOREA research institute of chemical technology
CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY
<120> LIPASE VARIANTS HAVING IMPROVED LIPASE ACTIVITY

<130> FPD/200906-0051

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein derived from Candida Antarctica without signal sequence

<400> 1
Met Lys Leu Pro Ser Gly Phe Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
1 5 10 15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
20 25 30

```
Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
         35                  40                  45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
     50                  55                  60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
 65                  70                  75                  80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
                165                 170                 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
            180                 185                 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
        195                 200                 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
    210                 215                 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225                 230                 235                 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
                245                 250                 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
            260                 265                 270
```

Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val
275 280 285

Ala Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Xaa Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 2
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained substitutions at positions 280 and 283(#33-PG)

<400> 2
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
1 5 10 15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
20 25 30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
35 40 45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
50 55 60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
65 70 75 80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val

100 105 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
115 120 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
130 135 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145 150 155 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
165 170 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
180 185 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
195 200 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
210 215 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225 230 235 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
245 250 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
260 265 270

Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Pro Ala Pro Gly Ala Val Ala Ile Val
275 280 285

Ala Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 3
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained glycine substitution at postitions 280 and 283(#33-GG)

<400> 3

```
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
  1               5                  10                  15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
             20                  25                  30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
         35                  40                  45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
     50                  55                  60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
 65                  70                  75                  80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
                165                 170                 175
```

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
180 185 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
195 200 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
210 215 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225 230 235 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
245 250 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
260 265 270

Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Gly Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ile Val
275 280 285

Ala Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 4
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained substitutions at postions 274 to 289(B1-37)

<400> 4
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser

```
  1               5                  10                  15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
             20                  25                  30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
         35                  40                  45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
     50                  55                  60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
 65                  70                  75                  80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
                165                 170                 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
            180                 185                 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
        195                 200                 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
    210                 215                 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225                 230                 235                 240
```

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
245 250 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
260 265 270

Lys Val Arg Ala His Arg Leu Gly Leu Gly Leu Trp Arg Val Ser Gly
275 280 285

Gly Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 5
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained substitutions at positions 274 to 289(B3-92)

<400> 5
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
1 5 10 15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
20 25 30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
35 40 45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
50 55 60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
65 70 75 80

```
Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
                165                 170                 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
            180                 185                 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
        195                 200                 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
    210                 215                 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225                 230                 235                 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
                245                 250                 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
            260                 265                 270

Lys Ser Val Leu Val Ser Lys Thr Arg Arg Ala Met Ser Val Leu Gln
        275                 280                 285

Ser Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
    290                 295                 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305                 310                 315                 320
```

Leu

<210> 6
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained substitutions at positions 274 to 289(B4-17)

<400> 6

```
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
  1               5                  10                  15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
             20                  25                  30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
         35                  40                  45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
     50                  55                  60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
 65                  70                  75                  80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
```

145 150 155 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
165 170 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
180 185 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
195 200 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
210 215 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225 230 235 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
245 250 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
260 265 270

Lys Tyr Gly Ser Thr Ile Thr Leu Met Glu Gly Thr Lys Arg Val His
275 280 285

Lys Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 7
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained substitutions at positions 274 to 289(G4-58)

<400> 7

```
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
  1               5                  10                  15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
             20                  25                  30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
         35                  40                  45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr
     50                  55                  60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
 65                  70                  75                  80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
                165                 170                 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
            180                 185                 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
        195                 200                 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
```

210 215 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225 230 235 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
245 250 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
260 265 270

Lys Ala Gly Thr Leu Arg Val His Val Pro Phe Asn Leu Asn Val Val
275 280 285

Asp Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 8
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CalB protein contained substitutions at positions 274 to 289(H2-79)

<400> 8
Met Lys Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser
1 5 10 15

Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val
20 25 30

Ser Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln
35 40 45

Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr

```
     50                  55                  60

Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val
 65                  70                  75                  80

Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser
                 85                  90                  95

Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val
            100                 105                 110

Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp
        115                 120                 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly
    130                 135                 140

Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145                 150                 155                 160

Thr Gly Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr
                165                 170                 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val
            180                 185                 190

Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn
        195                 200                 205

Gly Lys Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile
    210                 215                 220

Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg
225                 230                 235                 240

Ser Ala Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly
                245                 250                 255

Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln
            260                 265                 270

Lys Gln Cys Pro Leu Ile Leu Lys Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Ser
        275                 280                 285
```

Glu Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro Ser
305 310 315 320

Leu

<210> 9
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding CalB protein of sequence No:1

<400> 9
atgaaactgc cgtcaggttt tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gcccttttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagg tagcggctgc ggctttgtta 840

gcgccggccg ctgccgcgat tgtggcaggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtactngct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 10
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:2(#33-PG)

<400> 10
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagg tagcggctgc ggctttgccg 840

gcgccgggtg ctgtcgcgat tgtggcaggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 11
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:3(#33-GG)

<400> 11
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagg tagcggctgc ggctttgggc 840

gcgccgggtg ctgccgcgat tgtggcaggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 12
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:4(B1-37)

<400> 12
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagg ttcgcgctca ccgcctaggg 840

ttgggtttgt ggcgtgtaag cgggggcggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 13
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:5(B3-92)

<400> 13
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagt ctgtgcttgt tagtaagacg 840

cggcgcgcta tgtcggtgct acagtcaggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 14
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:6(B4-17)

<400> 14
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagt atggaagtac gattactctc 840

atggaaggca ccaaacgagt gcataaaggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 15
<211> 966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:7(G4-58)

<400> 15
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gcccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagg cgggcacgtt gcgcgtccat 840

gtaccttca atcttaacgt ggttgatggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 16
<211> 966
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene sequence encoding protein of sequence No:8(H2-79)

<400> 16
atgaaactgc cgtcaggttc tgacccggcc tttagccagc cgaagtctgt tctggatgct 60

ggcctgacat gtcagggtgc aagcccgtcg tccgtaagca aaccaattct gcttgtacca 120

ggcacgggca ctacgggccc gcagagcttt gattctaatt ggattcccct gtctacccag 180

cttgggtaca ccccttgttg gattagcccg cctcccttca tgctgaacga tacacaagtg 240

aatactgagt acatggtcaa cgcaattacc gccctttatg cgggaagtgg taacaataaa 300

cttcccgtgc tgacatggag tcaggggggc ctggtggcac agtggggatt gacgtttttc 360

ccatcgatcc gctcgaaagt tgatcgtctg atggcatttg cgcctgatta taaaggcaca 420

gtgctcgcgg ggccattaga tgccctggct gtgtcagcac ctagtgtctg gcaacagacg 480

accggttccg cgctgacgac cgccctccgg aacgcaggtg gactgaccca aattgtgccg 540

acaaccaact tgtatagcgc caccgacgaa attgttcagc cgcaggtctc caattcgcct 600

ctcgattcaa gctatctgtt taacggcaaa aatgtacagg cacaggctgt ttgcgggcca 660

ttattcgtca tcgaccatgc cggtagctta acctcccagt tcagttacgt ggttggtcgc 720

tctgccctgc gtagtaccac gggccaagcg cgctcagcgg actacggtat cactgattgc 780

aatccgttac cggcgaatga cctgactccg gaacaaaagc agtgcccatt gatattaaaa 840

gtggctctct cctatgctgc gtcggaaggt cctaaacaaa actgtgaacc ggatctgatg 900

ccctatgccc gtccgtttgc ggtcggcaaa cgtacttgct caggtatcgt tacgccaagc 960

ttataa 966

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer(T7-15UP)

<400> 17
tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta tagg 34

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer(278/281NNN-1st-F)

<400> 18
tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta tagg 34

<210> 19
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer(278/281NNN-2nd-F)

<400> 19
aaggtagcgg ctgcggcttt gnnngcgccg nnngctgccg cgatt 45

<210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer(272NNN287-1stF)

<400> 20
tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta tagg 34

<210> 21
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer(272NNN287-2ndF)

<400> 21
gacctgactc cggaacaaaa gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng gtcctaaaca aaactgtgaa ccgg 94

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer(GTB)

<400> 22
caaaaaaccc ctcaagaccc gttta 25

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer(278/281NNN-1st-R)

<400> 23
caaagccgca gccgctac 18

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer(278/281NNN-2nd-R)

<400> 24
caaaaaaccc ctcaagaccc gttta 25

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer(272NNN287-1stR)

<400> 25
cttttgttcc ggagtcaggt c 21

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer(272NNN287-2ndR)

<400> 26
caaaaaaccc ctcaagaccc gttta 25

<210> 27
<211> 29

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer(PIC-F)

<400> 27
tagaattcaa actgccgtca ggttctgac 29

<210> 28
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer(PIC-R)

<400> 28
ctgcggccgc tggcgtaacg atacctgagc aagt 34