



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0065831
(43) 공개일자 2011년06월16일

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01) C12N 9/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0122504

(22) 출원일자 2009년12월10일

심사청구일자 2009년12월10일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

박천석

경기도 남양주시 와부읍 덕소리 현대홈타운아파트 106동 1303호

서동호

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 650번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

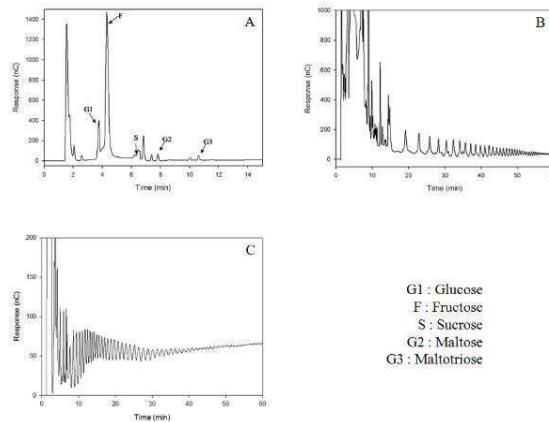
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 메틸로바실러스 플라겔라투스로부터 유래한 신규의 아밀로수크라아제

(57) 요약

본 발명은 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 유래한 신규의 아밀로수크라아제에 관한 것으로, 서열번호 1에 기재된 핵산 서열 및 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는데, 본 발명의 아밀로수크라아제는 가수분해 최적 활성 온도가 45℃이고, 반감기는 50℃에서 0.32 시간, 55℃에서 0.07 시간이며, 약 알칼리 조건인 pH 8.0에서 최적 활성을 나타낸다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

정중현

서울특별시 강서구 가양2동 가양아파트 402-504호

하석진

경기도 수원시 권선구 호매실동 목화빌라 11동 202호

유상호

서울특별시 송파구 방이동 올림픽 선수촌아파트 242동 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090087146

부처명 교육과학기술부 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 일반연구자지원사업, 협동기본연구지원

연구과제명 신규 디브랜칭 효소의 클로닝, 측쇄길이 특이성 및 응용연구

기여율

주관기관 인천대학교

연구기간 2009년 9월 1일~2012년 8월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 아밀로수크라아제

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아미노산 서열은,

서열번호 1에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 아밀로수크라아제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아밀로수크라아제는,

메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 아밀로수크라아제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 아밀로수크라아제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 유래한 신규의 아밀로수크라아제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아밀로수크라아제(EC 2.4.1.4)는 설탕을 기질로 사용하여, 설탕을 포도당과 과당으로 가수분해하는데, 생성된 포도당을 이용하여 알파-1,4-결합의 비수용성 글루칸을 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 현재 아밀로수크라아제에 관한 연구는 주로 비수용성 글루칸을 생성하는 쪽에 많이 치우쳐 있는데, 최근 본 발명자들이 아밀로수크라아제를 이용한 알부틴 및 살리신 당전이 반응에 관한 연구를 발표한 바 있다.

[0004] 한편, 상기와 같은 특성을 갖는 아밀로수크라아제는 현재 나이세리아 폴리사카리아(*Neisseria polysaccharea*) 유래의 효소가 가장 많이 연구되었고, 최근에는 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래의 효소가 보고된 바 있다.

[0005] 그런데, 상기의 두 가지 미생물 외에 다른 미생물로부터 유래한 아밀로수크라아제에 관한 연구는 전무한 상태이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 이에 본 발명은 새로운 미생물 유래의 신규 아밀로수크라아제를 클로닝하여 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 아밀로수크라아제를 제공한다. 이때, 상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열은 바람직하게 서열번호 1에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다.
- [0008] 본 발명의 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 본 발명의 아밀로수크라아제는 가수분해 최적 활성 온도가 45℃인데, 이는 기존에 연구된 나이세리아 폴리스카리아(*Neisseria polysaccharea*) 유래 아밀로수크라아제보다 높은 최적 활성 온도이며, 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제와는 유사한 정도의 최적 활성 온도이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 아밀로수크라아제의 반감기는 50℃에서 0.32 시간, 55℃에서 0.07 시간이며, 최적 활성 온도인 45℃에서는 안정한 것으로 나타났다.
- [0010] 한편, 본 발명의 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 아밀로수크라아제의 가수분해 최적 활성 pH는 Tris-HCl 완충용액에서 pH 8로 나타났는데, 기존에 연구된 나이세리아 폴리스카리아(*Neisseria polysaccharea*) 유래 아밀로수크라아제가 소듐 시트레이트(sodium citrate) 완충용액의 pH 6에서 최적 활성을 보이고, 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제가 Tris-HCl 완충용액의 pH 7에서 최적 활성을 보이는 것과 비교하여 볼 때, 약 알칼리 조건에서 최적 활성을 나타내는 것이다.
- [0011] 한편, 본 발명에 있어, 상기 아밀로수크라아제는 바람직하게 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 유래한 것이다.

효 과

- [0012] 본 발명에서 새롭게 분리한 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질은 기질인 설탕을 포도당 및 과당으로 분해하고, 분해된 포도당으로 알파-1,4 결합을 형성 또는 신장시킬 수 있어, 아밀로수크라아제로서의 활성을 갖는다 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

- [0014] 실시예 1: 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)로부터 아밀로수크라아제(amylosucrase)로 추정되는 유전자의 클로닝

- [0015] 메틸로바실러스 플라겔라투스(*Methylobacillus flagellatus*)의 염색체 유전자를 주형 DNA로 하여, 표 1과 같은 서열을 가지는 정방향 프라이머 pHCMFAS1 및 역방향 프라이머 pHCMFAS2을 설계한 후, 표 2에 기재된 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다.

표 1

- [0016] PCR에 사용된 프라이머

명칭	유전자서열	비고
pHCMFAS1	5'-CATATGTACGAACAAGTCTCCCACTCG-3'	정방향 프라이머
pHCMFAS2	5'-CTCGAGAAGCTGTAACCAATAAAAGCC-3'	역방향 프라이머

표 2

[0017] PCR 조건

변성 (denaturation)	사전 변성(pre-denaturation)	95/ 5 min	
증폭 (amplification)	변성(denaturation)	95/ 0.5 min	30 회
	결합(annealing)	55/ 0.5 min	
	확장(extension)	68/ 2.5 min	
최종 확장 (final extension)	최종 확장(final extension)	72/ 5 min	

[0018] 상기의 PCR을 통해 수득한 약 1.9 kb의 PCR 산물을 pGEM-T Easy 벡터와 함께 접합(ligation)하여 pGEM-T-MFAS를 제조하였다. 이후, 시퀀싱을 통하여 약 1.9 kb의 PCR 산물이 서열번호 1의 핵산 서열을 갖고, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0019] 실시예 2: 상기 실시예 1에서 클로닝한 유전자가 아밀로수크라아제의 활성을 갖는 단백질을 암호화하고 있는지 여부 확인

[0020] 본 실시예 2에서는 실시예 1에서 클로닝한 유전자가 아밀로수크라아제 활성을 갖는 단백질을 암호화하고 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0021] 먼저, 상기 실시예 1에서 제조한 pGEM-T-MFAS를 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*로 처리하고, 수득된 약 1.9 kbp 길이의 조각을 아가로스 전기영동을 통해 분리한 후, 동일한 제한 효소로 처리한 pHCEXHD 발현벡터(His tag 포함 벡터)와 함께 라이게이션하여, pHc-MFAS를 제조하였다. pHc-MFAS의 제조합 벡터의 개열지도는 도 1과 같았다. 도 1에 나타난 바와 같이, 재조합 벡터 pHc-MFAS는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 포함하고 있으며, 서열번호 1의 3' 말단에 6개의 부가적인 아미노산 잔기(6-His)를 포함하고 있고, 앰피실린 내성유전자(ampicillin resistance gene)를 포함하고 있다.

[0022] 한편, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질을 대량 생산하기 위하여, 상기 재조합 벡터 pHc-MFAS로 형질전환된 대장균(*E. coli*) MC1061를 제조하였다. 이 후, 형질전환된 대장균을 앰피실린이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 원심분리하여 균체를 수득하였다.

[0023] 한편, His-tag(히스-태그)가 결합된 재조합 단백질을 정제하기 위해, 상기에서 형질전환 대장균(*E. coli*) MC1061를 37℃에서 15시간 배양하였다. 배양 후, 4℃ 및 4,000 rpm의 조건으로 30분 동안 원심분리를 수행하여 균체를 회수하였다. 이 후, 라이시스 버퍼(Lysis buffer) [50mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH 7.0]에 현탁하고, 초음파 분쇄하였다.

[0024] 이 후, 상기 초음파를 이용하여 분쇄한 분쇄액을 4℃ 및 12,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리를 수행한 후, 상등액을 수득하였다. 상기 상등액을 Ni-NTA 친화 크로마토그래피에 주입하여, 재조합 단백질을 정제 하였으며, 이에 대한 전기영동 사진을 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 정제된 재조합 단백질은 분자량이 아밀로수크라아제의 이론값과 일치하는 약 75kDa의 분자량을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0025] 이후, 정제된 재조합 단백질이 아밀로수크라아제의 활성을 갖는지 실험하였다.

[0026] 설탕 50 g/L를 Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)에 혼합한 후, 상기 정제된 재조합 아밀로수크라아제 효소 10 U/ml을 첨가하고 35℃에서 15시간 동안 반응시켰다. 반응 후 5분 동안 용액을 끓이고, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수용성 산물과 불용성 산물을 분리하였다.

[0027] 이후, 하기 실험예에서 반응생성물을 분석하였다.

[0028] 실험예 1: 고성능양이온교환크로마토그래피를 이용한 수용성반응생성물 분석

[0029] 실시예 2에서 얻은 수용성반응생성물을 고성능양이온교환크로마토그래피 (HPAEC)를 이용하여 분석하였다. 시료를 실시예 2에서 얻은 수용성 반응생성물은 0.45 μm 박막여과지로 여과하여 25 μl를 주입하였고, 유속

은 1.0 ml/분으로 하여 분석하였다. HPAEC 분석은 다이오넥스 (미국)의 DX-600 system와 ED50 electrochemical 검출기 및 CarboPac™ PA-100 컬럼을 이용하여 시행하였으며, 용매는 A 용액 (100 mM 수산화나트륨)에서 B 용액 (100 mM 수산화나트륨 + 500 mM 소듐아세테이트)으로 70 분간 선형으로 농도 구배를 주었다.

결과를 도 3의 A, B와 같았는데, 기존에 알려진 아밀로수크라아제 생성물과 유사함을 확인할 수 있었다.

실험예 2: 고성능양이온교환크로마토그래피를 이용한 불용성반응생성물 분석

실시에 2에서 얻은 불용성반응생성물을 고성능이온교환크로마토그래피 (HPAEC)를 이용하여 분석하였다. 시료를 1 M KOH에 불용성반응생성물에 완전히 녹인 후, 0.45 μ m 박막여과지로 여과하여 25 μ l를 주입하였고, 유속은 1.0 ml/분으로 하여 분석하였다. HPAEC 분석에 사용된 기기는 실험예 1과 동일하며, 용매는 A 용액 (100 mM 수산화나트륨)에서 B 용액 (100 mM 수산화나트륨 + 500 mM 소듐아세테이트)으로 60 분간 다중 농도 구배를 주었다.

결과를 도 3의 C와 같았는데, 기존에 알려진 아밀로수크라아제 생성물과 유사함을 확인할 수 있었다.

실시에 3: 상기 실시예 1에서 클로닝되고, 그 활성이 실시예 2로부터 확인된 본 발명 아밀로수크라아제의 특성 조사

(1) 효소의 활성 및 안정성에 대한 온도의 효과

상기 실시예 1에서 클로닝되고, 그 활성이 실시예 2로부터 확인된 본 발명 아밀로수크라아제의 최적 활성 온도 및 온도의 안정성 테스트를 수행하였다.

본 발명 아밀로수크라아제의 가수분해 최적 활성 온도는 45℃로 나타났으며, 이는 기존에 연구된 나이세리아 폴리사카리아(*Neisseria polysaccharea*) 유래 아밀로수크라아제보다 높은 활성온도를 보이며 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제와는 유사한 활성 온도를 보인다.

본 발명 아밀로수크라아제의 반감기는 50℃에서 0.32 시간, 55℃에서 0.07 시간을 나타냈고, 최적 활성 온도인 45℃에서는 안정한 것으로 나타났다.

(2) 효소의 활성 및 안정성에 대한 pH의 효과

상기 실시예 1에서 클로닝되고, 그 활성이 실시예 2로부터 확인된 본 발명 아밀로수크라아제의 최적 활성 pH 테스트를 수행하였다.

본 발명 아밀로수크라아제의 가수분해 최적 활성 pH는 Tris-HCl 완충용액에서 pH 8로 나타났는데, 기존에 연구된 나이세리아 폴리사카리아(*Neisseria polysaccharea*) 유래 아밀로수크라아제가 소듐 시트레이트 (sodium citrate) 완충용액의 pH 6에서 최적 활성을 보이고, 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 유래 아밀로수크라아제가 Tris-HCl 완충용액의 pH 7에서 최적 활성을 보이는 것과 비교하여 볼 때, 약 알칼리 조건에서 최적 활성을 나타내는 것이다.

한편, Tris-HCl 완충용액 pH 8에서 본 발명 아밀로수크라아제의 안정성이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터인 pHC-MFAS의 개열지도이다.

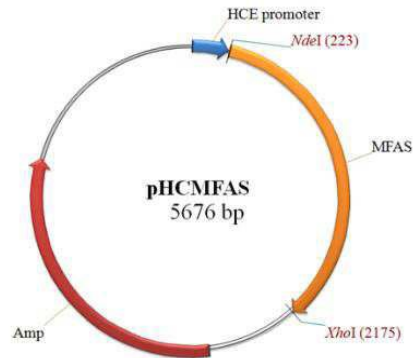
도 2은 재조합 벡터 pHC-MFAS로 형질전환된 대장균(*E. coli*) MC1061로부터 수득한 재조합 단백질의 전기영동 사진이다. M은 사이즈 마커이고, 레인 1은 상기 형질전환체인 대장균(*E. coli*) MC1061/pHC-MFAS를 초음파 분쇄하여 수득한 상등액이며, 레인 2는 상기 상등액을 Ni-NTA 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제한 것이다. 밴드 상에서 굵게 보이는 부분은 본 발명에서 클로닝한 재조합 단백질(아밀로수크라아제)이다.

도 3은 발명의 아밀로수크라아제가 설탕과 반응하여 생성된 수용성, 불용성 생성물을 HPAEC로 분석한 결과이다.

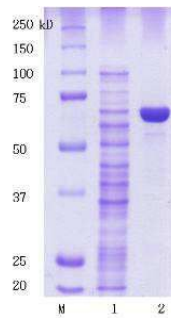
A는 수용성 생성물 중 과당, 포도당, 설탕, 말토오스, 말트트라이오스 부분을 분석한 것이며, B는 수용성 생성물 중의 글루칸을 분석한 것이고, C는 1 M KOH 용액에 녹인 불용성 생성물을 분석한 것이다. 크로마토그래피상 다양한 피크는 사이즈가 다양한 크기의 글루칸이 생성된 것을 의미한다.

도면

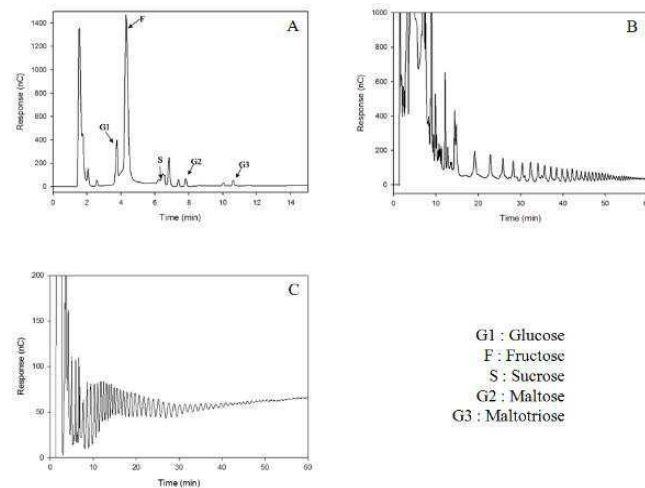
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
<120> Novel amylosucrase from Methylobacillus flagellatus

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1950

<212> DNA

<213> Methylobacillus flagellatus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1950)

<400> 1

atg tac gaa caa gtc tcc cac tcg tta ctg aac gat atc ctc atc ggc 48
Met Tyr Glu Gln Val Ser His Ser Leu Leu Asn Asp Ile Leu Ile Gly
1 5 10 15

ctg gac ccc aag gtg ggt tgc gaa gac ctc aag cac ttc tat atc cgc 96
Leu Asp Pro Lys Val Gly Cys Glu Asp Leu Lys His Phe Tyr Ile Arg
20 25 30

ctg ggg gcg aat ttc tac gcc att cac tca ttg ttc cac cag ctt tac 144
Leu Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Ile His Ser Leu Phe His Gln Leu Tyr
35 40 45

ggc gac cgg cag gat ttc cgc ctg cag atg cac aag ctg gtg gcc gtc 192
Gly Asp Arg Gln Asp Phe Arg Leu Gln Met His Lys Leu Val Ala Val
50 55 60

atg gcg aag caa tac gtc agc cga ccc cag gag ctg cgc cat cgc gac 240
Met Ala Lys Gln Tyr Val Ser Arg Pro Gln Glu Leu Arg His Arg Asp
65 70 75 80

ctt gcg cgc gaa aag gat cac aac tgg ttc ctg agc cag aag ctc gcg 288
Leu Ala Arg Glu Lys Asp His Asn Trp Phe Leu Ser Gln Lys Leu Ala

85	90	95	
ggc tat gcg ctc tat tgc cag gaa ttt gca caa agc ctg aaa ggc atg			336
Gly Tyr Ala Leu Tyr Cys Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Lys Gly Met			
100	105	110	
cat gag aag ctg gac tac ctg cag gag ctg ggc atc aac ctg atc cat			384
His Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Leu Gly Ile Asn Leu Ile His			
115	120	125	
atc atg ccc att ctc gat ggc cca aag gga cgt aac gat ggc ggc tat			432
Ile Met Pro Ile Leu Asp Gly Pro Lys Gly Arg Asn Asp Gly Gly Tyr			
130	135	140	
gcc gtg cgt gac ttc cgc aag atc gat gag aaa tac ggc acg ctg gaa			480
Ala Val Arg Asp Phe Arg Lys Ile Asp Glu Lys Tyr Gly Thr Leu Glu			
145	150	155	160
gat ctc gat acc ctg agc gcc gaa ctg cgc agc cgc gat atg ctg ctg			528
Asp Leu Asp Thr Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ser Arg Asp Met Leu Leu			
165	170	175	
gtg ctc gac gtc gtg gtg aac cat aca tcc gac gag cac gaa tgg gcg			576
Val Leu Asp Val Val Val Asn His Thr Ser Asp Glu His Glu Trp Ala			
180	185	190	
ctg aaa gcc cag cag ggc aac aag aag tac cag gag tac tac tac acg			624
Leu Lys Ala Gln Gln Gly Asn Lys Lys Tyr Gln Glu Tyr Tyr Tyr Thr			
195	200	205	
tat ccg gat cga aag atc ccc gac ctg ttc gag cag acc atg ccc gag			672
Tyr Pro Asp Arg Lys Ile Pro Asp Leu Phe Glu Gln Thr Met Pro Glu			
210	215	220	
gta ttt ccc gat acc gcg ccc ggc aac ttc acc tgg aac gag aag atg			720
Val Phe Pro Asp Thr Ala Pro Gly Asn Phe Thr Trp Asn Glu Lys Met			
225	230	235	240
ggg cgc tgg gtg atg acg gtg ttc aac aac ttc cag tgg gat ctc aac			768
Gly Arg Trp Val Met Thr Val Phe Asn Asn Phe Gln Trp Asp Leu Asn			
245	250	255	
tac agg aac ccg tct gta ttc atc gag atg atc gat atc atc ctg ttc			816
Tyr Arg Asn Pro Ser Val Phe Ile Glu Met Ile Asp Ile Ile Leu Phe			

260	265	270	
tgg gcc aac cac ggc gca gac gtg ata cgt ctc gat gca gtc gcc ttc			864
Trp Ala Asn His Gly Ala Asp Val Ile Arg Leu Asp Ala Val Ala Phe			
275	280	285	
ctc tgg aag aaa atc ggc agc ccc tgt cag aac gag cgg gag gcg cac			912
Leu Trp Lys Lys Ile Gly Ser Pro Cys Gln Asn Glu Arg Glu Ala His			
290	295	300	
ctc atc ctc cag ctc atg aaa gac tgc tgc cag gta acc gcg ccc ggc			960
Leu Ile Leu Gln Leu Met Lys Asp Cys Cys Gln Val Thr Ala Pro Gly			
305	310	315	320
acc ttg ttc atc gcc gag gcc atc gtc gcc ccg ctg gag atc atc aag			1008
Thr Leu Phe Ile Ala Glu Ala Ile Val Ala Pro Leu Glu Ile Ile Lys			
325	330	335	
tat ttc ggc gag gat gca gtc aat gcc aag gaa tgc gag atc gcc tac			1056
Tyr Phe Gly Glu Asp Ala Val Asn Ala Lys Glu Cys Glu Ile Ala Tyr			
340	345	350	
aac gcc acc tat atg gcc ctg ctg tgg gat gcc gtc gcc acc aag aag			1104
Asn Ala Thr Tyr Met Ala Leu Leu Trp Asp Ala Val Ala Thr Lys Lys			
355	360	365	
acc ctg ttg ctc aac cgc ggg ctg cgt agc ctg ccc acc aag ctc gac			1152
Thr Leu Leu Leu Asn Arg Gly Leu Arg Ser Leu Pro Thr Lys Leu Asp			
370	375	380	
ggt gcc acc tgg ctc aac tac gtg cgc tgc cac gac gat atc ggc ctg			1200
Gly Ala Thr Trp Leu Asn Tyr Val Arg Cys His Asp Asp Ile Gly Leu			
385	390	395	400
ggc ttc gac gac aac gac att cgc gcc tcg ggc tac gac ccg cag gca			1248
Gly Phe Asp Asp Asn Asp Ile Arg Ala Ser Gly Tyr Asp Pro Gln Ala			
405	410	415	
cac cgc cgc ttc ctg gtc gat tac tac acc ggc gcc tat caa ggc tcc			1296
His Arg Arg Phe Leu Val Asp Tyr Tyr Thr Gly Ala Tyr Gln Gly Ser			
420	425	430	
acg gca acc ggc gtt gcc ttc ggc gtc aac ccc aag acc ggg gac gca			1344
Thr Ala Thr Gly Val Ala Phe Gly Val Asn Pro Lys Thr Gly Asp Ala			

435	440	445	
cgc atc tcg ggt tcg ctg gcc tcc ctg gcg ggg ctg gaa acc gcc ctg			1392
Arg Ile Ser Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Thr Ala Leu			
450	455	460	
ttg cgg aat gac gcg cag gcc atc gac acc agt atc cgc acc atc atc			1440
Leu Arg Asn Asp Ala Gln Ala Ile Asp Thr Ser Ile Arg Thr Ile Ile			
465	470	475	480
ctg ctg cat agc atg atc gcg tcc ttt ggc ggc att ccg ctc atc tat			1488
Leu Leu His Ser Met Ile Ala Ser Phe Gly Gly Ile Pro Leu Ile Tyr			
485	490	495	
tac ggg gat tcg atc ggc acc ctc aac gac aac acc tat ctg gat gat			1536
Tyr Gly Asp Ser Ile Gly Thr Leu Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Asp Asp			
500	505	510	
gaa aac aag cac cat gac agc cgc tgg gtg cac cgt ccc agc ctg gac			1584
Glu Asn Lys His His Asp Ser Arg Trp Val His Arg Pro Ser Leu Asp			
515	520	525	
tgg aac aag gct gcc cgc cgc cac gaa cct ggc acg gtg gaa aat cgc			1632
Trp Asn Lys Ala Ala Arg Arg His Glu Pro Gly Thr Val Glu Asn Arg			
530	535	540	
ata ttc act gct atc cag agg ata ctg gcc gtg cgc aag cag att cct			1680
Ile Phe Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Ala Val Arg Lys Gln Ile Pro			
545	550	555	560
gct ttt gcc gac ctc aac aat cgc gag atc ttc gaa acc agc aac ccg			1728
Ala Phe Ala Asp Leu Asn Asn Arg Glu Ile Phe Glu Thr Ser Asn Pro			
565	570	575	
cac tta ttc act ttc ctg cgc ttc aca tcc cag ggc atg cat tcg cgc			1776
His Leu Phe Thr Phe Leu Arg Phe Thr Ser Gln Gly Met His Ser Arg			
580	585	590	
gtg ctc gtg atc gcc aac ttc gac gcc tcc ccg cag tac atg aac ctg			1824
Val Leu Val Ile Ala Asn Phe Asp Ala Ser Pro Gln Tyr Met Asn Leu			
595	600	605	
cgg gag ctg gat tcg gtc aat ctg ttc agg cat gtc gaa gtc aag gat			1872
Arg Glu Leu Asp Ser Val Asn Leu Phe Arg His Val Glu Val Lys Asp			

610 615 620

ctc tat agc ggg gag acc ctg tcc acc aaa cac ggc acc ctg gag att 1920
Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Lys His Gly Thr Leu Glu Ile
625 630 635 640

ccg cca ctc ggc ttt tat tgg tta cag ctt 1950
Pro Pro Leu Gly Phe Tyr Trp Leu Gln Leu
645 650

<210> 2
<211> 650
<212> PRT
<213> Methylobacillus flagellatus

<400> 2
Met Tyr Glu Gln Val Ser His Ser Leu Leu Asn Asp Ile Leu Ile Gly
1 5 10 15

Leu Asp Pro Lys Val Gly Cys Glu Asp Leu Lys His Phe Tyr Ile Arg
20 25 30

Leu Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Ile His Ser Leu Phe His Gln Leu Tyr
35 40 45

Gly Asp Arg Gln Asp Phe Arg Leu Gln Met His Lys Leu Val Ala Val
50 55 60

Met Ala Lys Gln Tyr Val Ser Arg Pro Gln Glu Leu Arg His Arg Asp
65 70 75 80

Leu Ala Arg Glu Lys Asp His Asn Trp Phe Leu Ser Gln Lys Leu Ala
85 90 95

Gly Tyr Ala Leu Tyr Cys Gln Glu Phe Ala Gln Ser Leu Lys Gly Met
100 105 110

His Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Leu Gly Ile Asn Leu Ile His
115 120 125

Ile Met Pro Ile Leu Asp Gly Pro Lys Gly Arg Asn Asp Gly Gly Tyr
130 135 140

Ala Val Arg Asp Phe Arg Lys Ile Asp Glu Lys Tyr Gly Thr Leu Glu
145 150 155 160

Asp Leu Asp Thr Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ser Arg Asp Met Leu Leu
165 170 175

Val Leu Asp Val Val Val Asn His Thr Ser Asp Glu His Glu Trp Ala
180 185 190

Leu Lys Ala Gln Gln Gly Asn Lys Lys Tyr Gln Glu Tyr Tyr Tyr Thr
195 200 205

Tyr Pro Asp Arg Lys Ile Pro Asp Leu Phe Glu Gln Thr Met Pro Glu
210 215 220

Val Phe Pro Asp Thr Ala Pro Gly Asn Phe Thr Trp Asn Glu Lys Met
225 230 235 240

Gly Arg Trp Val Met Thr Val Phe Asn Asn Phe Gln Trp Asp Leu Asn
245 250 255

Tyr Arg Asn Pro Ser Val Phe Ile Glu Met Ile Asp Ile Ile Leu Phe
260 265 270

Trp Ala Asn His Gly Ala Asp Val Ile Arg Leu Asp Ala Val Ala Phe
275 280 285

Leu Trp Lys Lys Ile Gly Ser Pro Cys Gln Asn Glu Arg Glu Ala His
290 295 300

Leu Ile Leu Gln Leu Met Lys Asp Cys Cys Gln Val Thr Ala Pro Gly
305 310 315 320

Thr Leu Phe Ile Ala Glu Ala Ile Val Ala Pro Leu Glu Ile Ile Lys
325 330 335

Tyr Phe Gly Glu Asp Ala Val Asn Ala Lys Glu Cys Glu Ile Ala Tyr
340 345 350

Asn Ala Thr Tyr Met Ala Leu Leu Trp Asp Ala Val Ala Thr Lys Lys
355 360 365

Thr Leu Leu Leu Asn Arg Gly Leu Arg Ser Leu Pro Thr Lys Leu Asp
370 375 380

Gly Ala Thr Trp Leu Asn Tyr Val Arg Cys His Asp Asp Ile Gly Leu
385 390 395 400

Gly Phe Asp Asp Asn Asp Ile Arg Ala Ser Gly Tyr Asp Pro Gln Ala
405 410 415

His Arg Arg Phe Leu Val Asp Tyr Tyr Thr Gly Ala Tyr Gln Gly Ser
420 425 430

Thr Ala Thr Gly Val Ala Phe Gly Val Asn Pro Lys Thr Gly Asp Ala
435 440 445

Arg Ile Ser Gly Ser Leu Ala Ser Leu Ala Gly Leu Glu Thr Ala Leu
450 455 460

Leu Arg Asn Asp Ala Gln Ala Ile Asp Thr Ser Ile Arg Thr Ile Ile
465 470 475 480

Leu Leu His Ser Met Ile Ala Ser Phe Gly Gly Ile Pro Leu Ile Tyr
485 490 495

Tyr Gly Asp Ser Ile Gly Thr Leu Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Asp Asp
500 505 510

Glu Asn Lys His His Asp Ser Arg Trp Val His Arg Pro Ser Leu Asp
515 520 525

Trp Asn Lys Ala Ala Arg Arg His Glu Pro Gly Thr Val Glu Asn Arg
530 535 540

Ile Phe Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Ala Val Arg Lys Gln Ile Pro
545 550 555 560

Ala Phe Ala Asp Leu Asn Asn Arg Glu Ile Phe Glu Thr Ser Asn Pro
565 570 575

His Leu Phe Thr Phe Leu Arg Phe Thr Ser Gln Gly Met His Ser Arg
580 585 590

Val Leu Val Ile Ala Asn Phe Asp Ala Ser Pro Gln Tyr Met Asn Leu
595 600 605

Arg Glu Leu Asp Ser Val Asn Leu Phe Arg His Val Glu Val Lys Asp

610

615

620

Leu Tyr Ser Gly Glu Thr Leu Ser Thr Lys His Gly Thr Leu Glu Ile
625 630 635 640

Pro Pro Leu Gly Phe Tyr Trp Leu Gln Leu
645 650