

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. (45) 공고일자 2006년05월26일
C12N 9/02 (2006.01) (11) 등록번호 10-0583538
(24) 등록일자 2006년05월19일

(21) 출원번호	10-1999-7008133	(65) 공개번호	10-2000-0076045
(22) 출원일자	1999년09월07일	(43) 공개일자	2000년12월26일
번역문 제출일자	1999년09월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1998/001253	(87) 국제공개번호	WO 1998/40470
국제출원일자	1998년03월05일	국제공개일자	1998년09월17일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 가나, 감비아, 기니 비사우, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장	97810132.7	1997년03월07일	유럽특허청(EPO)(EP)
	97810954.4	1997년12월08일	유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자 노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

로얄 베테리너리 앤드 어그리컬처 유니버시티
덴마크 데카-1871 프레데리크스베르그 체 코펜하겐 토르팔트젠스베요 40

(72) 발명자 할키어바르바라안
덴마크데카-1366코펜하겐케이.1.테파우난젠스가데43

박죄렌
덴마크데카-2200코펜하겐엔.3.테파우에스퍼브록크만스가데4

칸레이첼엘리스

덴마크데카-1366코펜하겐에스테.테하난젠스가데69

필러비르거린트베르그

덴마크데카-2700브윈스회요콘그슈테트베요5

(74) 대리인

이병호

김영관

홍동오

심사관 : 조영균

(54) 사이토크롬 P 450 모노옥시게나제

요약

본 발명은 시안생성성 글리코사이드의 전구체인, 알독심의 니트릴로의 생합성 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 생합성 전환을 촉매할 수 있는 사이토크롬 P450_{II} 의존성 모노옥시게나제 및 당해 모노옥시게나제를 암호화하는 DNA 분자를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 DNA 분자를 획득하는 방법 및 해충, 진드기 또는 선충류에 내성인 형질전환 식물 또는 개선된 영양가를 갖는 식물을 획득하는 방법을 제공한다.

색인어

사이토크롬 P450 모노옥시게나제, 시안생성성 글리코사이드, 알독심, 시아노하이드린, 형질전환 식물

명세서

본 발명은 일반적으로 재조합 DNA 기술을 사용하는 식물에서의 유전 공학, 및 시안생성성 글리코사이드의 생합성에 관련된 효소 및 특히 이들 효소를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단백질 및 유전자를 사용하여 식물의 영양가 또는 해충 내성을 향상시킬 수 있다.

시안생성성 글리코사이드는 2000종 이상의 식물에서의 2차 식물 대사산물의 구성 성분이다. 특정 경우에, 이들은 영양물로서 섭취할 경우 식물 독성이 될 수 있는 HCN의 공급원이다. 예를 들어, 시안생성성 작물 카사바(마니호트 에스쿨렌타(Manihot esculenta))의 껍질은 열대 지역에서 중요한 주요 식품의 구성 성분이다. 껍질에 존재하는 시안생성성 글리코사이드는 불충분하게 처리된 카사바 생성물로 인해 사람에게 유독한 시아나이드를 발생시킬 수 있다. 식품으로서 과잉으로 섭취하거나 동물 먹이로서 사용할 경우 HCN의 효소적 생성이 이들의 잠재적인 독성의 원인이 되는 다른 식물 종은 흰토끼풀(트리폴리움 레펜스(Trifolium repens)), 수수(소르굼 비콜로르(Sorghum bicolor)), 아마(리눔 우스타티시뮴(Linum usitatissimum)), 트리글로킨(트리글로킨 마리티마(Triglochin maritima)), 리마 콩(파세올루스 루나투스(Phaseolus lunatus)), 아몬드(아미그달루스(Amygdalus)) 및 살구(프루누스(Prunus)), 체리 및 사과(말루스(Malus)) 열매를 포함한다. 독성 특성은 상기 식물에서의 시안생성성 글리코사이드의 생합성을 차단함으로써 감소시킬 수 있다.

천연 발생 시안생성성 글리코사이드의 1차 전구체는 5종의 소수성 단백질 아미노산, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌 및 티로신 및 단일 비-단백질 아미노산, 사이클로펜테닐글리신에 한정된다. 상기 아미노산은 일련의 반응으로 당 잔기에 기본적으로 연결된 시아노하이드린으로 전환된다. 예를 들어, 아미그달린은 O-β-겐티오비오사이드 및 프루나신, 즉 (R)-만델로니트린의 O-β-글리코사이드의 구성 성분이다. 방향족 아글리콘을 갖는 시안생성성 글리코사이드의 또 다른 예는 각각 수수 및 주목 속에서 발견되는 시안생성성 글리코사이드 듀린 및 탁시펠린의 예이며 쌍이다. 예를 들어, p-하이드록시만델로니트릴은 UDPG-글리코실트랜스퍼라제에 의해 듀린(β-D-글루코피라노실록시-(S)-p-하이드록시만델로니트릴)으로 전환된다. 유사한 글리코실트랜스퍼라제는 대부분의 식물에 존재하는 것으로 간주된다. 비시아닌 및 루쿠민은 아미그달린과 유사한 이당류 유도체에 대한 추가의 예이다. 삼부니그린은 이의 아글리콘으로서 (S)-만델로니트릴을 함유하므로 이는 프루나신에 대한 예피머이다.

지방족 아글리콘을 갖는 시안생성성 글리코사이드의 예는 토끼풀, 아마, 카사바 및 콩에서 발견되는 리나마린 및 로타우스트랄린이다. 시안생성성 글리코사이드 및 이의 생합성에 관한 상세한 검토는 본원에 참고로 인용된 문헌[참조: Conn, *Naturwissenschaften* 66:28-34, 1979]에서 찾아볼 수 있다.

티로신으로부터 유도된 시안생성성 글리코사이드 듀린의 생합성 경로는 널리 연구되어 왔다[참고 문헌: Halkier et al., 'Cyanogenic glucosides: the biosynthetic pathway and the enzyme system involved' in: 'Cyanide compounds in biology', Wiley Chichester(Ciba Foundation Symposium 140), pages 49-66, 1988; Halkier and Moller, *Plant Physiol.* 90:1552-1559, 1989; Halkier et al., *The J. of Biol. Chem.* 264:19487-19494, 1989; Halkier and Moller, *Plant Physiol.* 96:10-17, 1990, Halkier and Moller, *The J. of Biol. Chem.* 265:21114-21121, 1990; Halkier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:487-491, 1991; Sibbesen et al., in: 'Biochemistry and Biophysics of cytochrome P450. Structure and Function, Biotechnological and Ecological Aspects', Archakov, A.I.(ed.), 1991, Koch et al., 8th Int. Conf. on Cytochrome P450, Abstract PII.053; 및 Sibbesen et al., 8th Int. Conf. on Cytochrome P450, Abstract PII.016]. L-티로신은 N-하이드록시티로신, N,N-디하이드록시티로신, (E)- 및 (Z)-p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심 및 p-하이드록시페닐아세트니트릴이 중간체인 p-하이드록시만델로니트릴(듀린의 전구체)로 전환된다. 사이토크롬 P450 유형의 2종의 모노옥시게나제가 상기 경로에 관여한다. 카사바의 경우 사이토크롬 P450 의존성 모노옥시게나제가 관계하는 유사한 경로가 발현 및 이소류신으로부터의 리나마린 및 로타우스트랄린의 각각의 합성에 사용된다[참고 문헌: Koch et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292:141-150, 1992]. 소르굼 비콜로르내에서의 L-티로신으로부터의 p-하이드록시만델로니트릴의 복잡한 경로는 2종의 다기능성 사이토크롬 P450 의존성 모노옥시게나제만을 필요로 하는 것으로 입증되어 있다. P450_{TYR}로 명명되는 제1 효소는 티로신을 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심으로 전환시킨다. P450_{OX}로 명명되는 제2 효소는 알독심을 p-하이드록시만델로니트릴로 전환시킨다. 상이한 식물에서의 시안생성성 글리코사이드의 생합성 경로간의 유사성의 관점에서, 상기 경로들에 전구체 아미노산을 상응하는 알독심으로 및 알독심을 상응하는 시아노하이드린으로 각각 전환시키는 2종의 다기능성 P450 의존성 모노옥시게나제, P450_I 및 P450_{II}가 관계하는 것으로 일반적으로 추정된다. P450_I이 기질 특이성 및, 따라서, 생성되는 글리코사이드의 종류를 결정하는 특이적 효소인 반면, P450_{II}는 구조적으로 상이한 알독심의 부류를 상응하는 시아노하이드린으로 전환시키는데 보다 덜 특이적인 것으로 예상된다.

글루코시놀레이트는 쌍자엽식물강 피자식물의 여러 목에서 발견되는 친수성, 비휘발성 티오글리코사이드이다[참고 문헌: Cronquist, 'The Evolution and Classification of Flowering Plants' New York Botanical Garden, Bronx, 1998]. 시안생성성 글루코시놀레이트 및 글리코사이드의 발생은 상호간에 배타적이다. 글루코시놀레이트의 가장 큰 실용적인 의미는 다수의 품종이 수세기 동안 인간에게 조미료, 향미료, 샐러드용 야채 및 채소뿐만 아니라 사료 및 마초 작물을 제공해 온 브라시카세아에(Brassicaceae)의 모든 성원(캡팔라레스(Capparales)의 목)에 이들이 존재한다는 것이다. 보다 최근에, 평지(특히 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 및 브라시카 캄페스트리스(*Brassica campestris*))가 상업적으로 주요한 오일 종자로서 판명되고 있다. 약 100종의 상이한 글루코시놀레이트는 동일한 일반적 구조를 가지나 측쇄의 특성에서 상이한 것으로 공지되어 있다. 글루코시놀레이트는 단백질 아미노산으로부터 직접적으로 또는 단일 또는 다중 섀 연장 이후에 형성된다[참고 문헌: Underhill et al., *Biochem. Soc. Symp.* 38:303-326, 1973]. 시안생성성 글리코사이드의 생합성에서 중간체로서 확인된 N-하이드록시 아미노산 및 알독심은 또한 글루코시놀레이트의 생합성에 대해 유효한 전구체로서 작용한다[참고 문헌: Kindl et al., *Phytochemistry* 7:745-756, 1968; Matsuo et al., *Phytochemistry* 11:697-701, 1972; Underhill, *Eur. J. Biochem.* 2:61-63, 1967]. 따라서, 시안생성성 글리코사이드 합성에 관련된 사이토크롬 P450_I은 글루코시놀레이트 합성에서 상응하는 생합성 효소와 기능적으로 매우 유사하여, P450 효소의 동일한 계열의 한 일원인 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명자들은 P450_{TRY}(CYP79)와 54% 동일성을 갖는 P450 효소(서열 17)를 암호화하고, 모체 아미노산으로부터의 알독심의 형성인 글루코시놀레이트의 생합성에서의 첫번째 단계를 촉매하는 시나피스 알바(*Sinapis alba*)로부터 cDNA를 분리하였다. 상기 cDNA 클론은 아리비둡시스(*Aribidopsis*) EST 서열(T42902)과의 약 90% 동일성을 나타내며, 이는 사이토크롬 P450 효소가 글루코시놀레이트 함유 종에서 고도로 보존됨을 강력하게 나타낸다.

상기한 시아노하이드린에 대한 복잡한 생합성 경로의 단지 2종의 효소, 사이토크롬 P450_I 및 P450_{II}의 촉매 활성의 감소는 식물에서의 시안생성성 글리코사이드의 생합성 경로의 조작을 가능케한다. 모노옥시게나제 중 하나 또는 둘다를 암호화하는 유전자 작제물의 형질감염에 의해 시안생성성 글리코사이드에 대한 생합성 경로를 변형시키거나, 재구성하거나, 새롭게 수립할 수 있다.

당해 분야에서 공지된 방법에 의한 식물에서의 시안생성성 글리코사이드에 대한 생합성 경로의 변형 또는 도입은, 시안생성성 글리코사이드가 곤충, 진드기 및 선충류에 대해 독성일 수 있기 때문에 매우 흥미롭다. 따라서, 식물 또는 특정 식물 조직에서의 시안생성성 글리코사이드에 대한 생합성 경로의 변형, 도입 또는 재구성은 식물을 곤충, 진드기 또는 선충류에 대해 구미에 맞지 않도록 만들어 해충에 의한 손상을 감소시킬 수 있다. 바실러스 튜링지엔시스 엔도톡신(*Bacillus thuringiensis* endotoxin)과 같은 다른 살충제 성분과 배합하여, 해충에 의한 작물 손상을 더욱더 감소시킬 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 모노옥시게나제를 암호화하는 유전자의 서열을 사용하여 카사바, 수수 또는 보리와 같은 시안생성성 글리코사이드를 함유하는 식물로의 형질감염시 야생형 식물에서 통상적으로 생성되는 시안생성성 글리코사이드를 제거하는 DNA 플라스미드를 디자인할 수 있다. 이는 본 발명에 따른 모노옥시게나제의 발현을 억제하는, EP-458367-A1, EP-240208-A2, US-5,231,020, WO89/05852 및 WO90/11682에 기술된 바와 같은 안티센스 또는 센스 RNA 또는 리보자임의 발현에 의해 성취될 수 있다. 이는, 수많은 노력에도 불구하고, 전통적인 식물 육종을 통해, 예를 들어, 카사바 또는 수수로부터 시안생성성 글리코사이드를 완전히 제거할 수 없었기 때문에 매우 흥미롭다. 한편, 보리 품종의 표피 세포에서의 시안생성성 글리코사이드의 상승된 양은 곰팡이 진균류 에리시페 그라미니스(*Erysiphe graminis*)에 의한 공격에 대해 증가된 감수성을 부여하는 것으로 제시되어 왔다[참고 문헌: Pourmohensi, PhD thesis, Gottingen, 1989; Ibenthal et al., *Angew. Bot.* 67:97-106, 1993]. 유사한 효과는 진균류 마이크로시클루스 울레이(*Microcyclus ulei*)에 의한 공격시 시안생성성 고무 나무 헤베아 브라질리엔시스(*Hevea brasiliensis*)[참고 문헌: Lieberei et al., *Plant Phys.* 90:3-36, 1989] 및 콜레토티리움 리니에 의해 공격받은 아마[참고 문헌: Ludtke et al., *Biochem. Z.* 324:433-442, 1953]에서 관찰된다. 상기 경우에, 시안생성성 글리코사이드가 미생물에 의한 공격에 대해 증가된 감수성을 부여하는, 상기한 식물 또는 다른 식물의 정량적 내성은 상기 식물에서의 시안생성성 글리코사이드의 생성을 억제함으로써 증가시킬 수 있다. 보리에서, 시안생성성 글리코사이드는 표피 세포에 위치한다. 따라서, 안티센스, 센스 또는 리보자임 작제물의 발현은 바람직하나, 표피 특이적 프로모터에 의해 반드시 유도되는 것은 아니다.

식물에 매우 적은 양의 시안생성성 글리코사이드가 존재할 경우, 보리에서 입증된 바와 같이 바람직하지 못한 발암 물질의 생성으로 인해 영양적 문제를 유발할 수도 있다. 예를 들어, 맥아는 곡물-기재 주정제의 생산 과정에서 발암 물질로 간주되는 에틸카바메이트로 전환될 수 있는 시안생성성 글리코사이드 에피히테로텐드린을 소량 함유한다. 발효 식품, 음료 및 주정제내에서 에틸카바메이트의 필수적인 최대 허용가능한 농도를 도입하고자 하는 시도가 이루어지고 있다[참고 문헌: *Food Chemical News* 29:33.35, 1988].

WO 95/16041은 아미노산의 상응하는 N-하이드록시아미노산, N,N-디하이드록시아미노산으로의 전환, 및 상기 N,N-디하이드록시아미노산의 상응하는 알독심으로의 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450_I 모노옥시게나제를 암호화하는 DNA 분자를 기술하고 있다. 모체 아미노산은 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 류신, 이소류신 및 사이클로펜테닐글리신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. DNA 분자는 천연 발생 유전자, 또는 변이, 결실, 절단 등의 결과이나, 여전히 시안생성성 글리코사이드의 생합성 경로 중 하나 이상의 반응을 촉매할 수 있는 사이토크롬 P450_I 모노옥시게나제를 암호화하는 이의 기능적 상동체에 상응한다. 모노옥시게나제는 바람직하게는 단일 촉매 중심을 함유한다.

또한, WO 95/16041은 소르굼 비콜로르(L.) 모엔크(Moench)의 P450_{OX}와 같은 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 DNA 분자를 기술하고 있다. 이들은 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드리드로의 전환을 촉매한다. 2종의 다기능성 P450 효소에 의한 티로신의 p-하이드록시페닐아세트니트릴로의 전환의 촉매반응은 (Z)-p-하이드록시페닐아세트알독심을 제외한 상기 전환에서의 모든 중간체가 채널화되는 이유를 설명한다.

P450_{OX}의 분리에 대해 제안된 방법은 수수로부터의 P450_{TYR}(CYP79, Sibbesen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9740-9744, 1994)의 분리에 사용함을 기초로 한다. 상기 접근법에서, DEAE Sepharose 이온 교환 칼럼은 P450 효소를 결합시키는 역할을 하나, 샘플내의 황색 안료는 결합시키지 않는다. 안료의 제거는 이중 목적을 만족시킨다. 이는 P450 효소의 후속적인 칼럼에의 결합에 대해 전제조건이고, 이는 분광계에 의한 P450의 함량의 평가(일산화탄소 및 기질 결합)를 가능하게 한다. 본 발명은 P450_{OX}이 대조적으로 DEAE 칼럼에 대해 낮은 결합 친화성을 나타내고 본질적으로 분획 유출 및 세척시 회수됨을 입증한다. Triton X-114 기재 상에 의해 황색 안료로부터 P450_{OX} 활성을 분리하기 위해 분배 방법을 적용시킨다. 우선적으로 0.6 내지 1% Triton X-114를 사용하여, P450_{OX}는 세제가 풍부한 상부 상에서 회수되는 P450_{TYR}과 대조적으로 두 상으로 분배되는 것으로 밝혀졌다. Triton X-114의 농도를 6%로 증가시킴으로써, P450_{OX}의 대부분은 세제가 부족한 하부 상으로부터 회수되는 반면, 황색 안료는 상부 상에 존재한다. 6% Triton X-114를 사용할 경우의 단점은 P450_{OX}의 변성된 P420 형태로의 전환의 증대이다. 이러한 지식은 본 발명에서 이용하여 처음으로 P450_{OX}와

같은 P450_{II} 모노옥시게나제를 정제하고, 모노옥시게나제를 암호화하는 유전자를 클로닝시키고, 식물을 모노옥시게나제 암호화 유전자로 안정하게 형질전환시킨다. P450_{OX}의 분리 및 부분적 아미노산 서열의 결정은 올리고뉴클레오타이드 프로브의 디자인 및 P450_{OX}를 암호화하는 cDNA의 분리를 가능하게 한다. 그러나, 당해 경우에서 클로닝은 비의존성 접근법에 의해 달성한다.

본 발명은 우선 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 DNA 분자에 관한 것이다. 바람직하게는 알독심은 WO 95/16041에 기술된 바와 같은 P450_I 모노옥시게나제에 의해 촉매되는, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 류신, 이소류신 및 사이클로펜테닐글리신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 또는 L-티로신, L-발린 및 L-이소류신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산의 전환 생성물이다. 본 발명에 따른 DNA 분자는 천연 발생 유전자, 또는 변이, 결실, 절단 등의 결과이나, 여전히 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 후속적 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 이의 상동체에 상응한다. 본 발명에 따른 모노옥시게나제는 시안생성성 글리코사이드의 생합성 경로 중 하나 이상의 반응을 촉매하고 바람직하게는 단일 촉매 중심을 함유한다.

사이토크롬 P450_{II} 효소는 대부분의 살아있는 유기체에 존재할 수 있다. P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 본 발명에 따른 DNA 분자는 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 각종 식물로부터 수득가능한 DNA 분자와 구조적으로 및 기능적으로 유사하다. 본 발명의 바람직한 양태에서, DNA 분자는 서열 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 분자의 단편에 하이브리드화한다. 상기 단편은 10개 이상의 뉴클레오타이드 길이이고 바람직하게는 15, 20, 25, 30 또는 50개 뉴클레오타이드보다 길다. 하이브리드의 안정성에 영향을 미치는 인자는 하이브리드화 조건의 엄격성을 결정하며 형성된 하이브리드의 용점 T_m의 의존도로 측정할 수 있다. T_m의 계산은 여러 교본에 기술되어 있다. 예를 들어, 문헌[참조: Keller et al., "DNA Probes: Background, Applications, Procedures", Macmillan Publishers Ltd, 1993, 페이지 8 내지 10]에는 하이브리드화 반응에 대해 T_m 값의 계산에서 고려된 인자를 기술하고 있다. 본 발명에 따른 DNA 분자는 형성된 하이브리드의 계산된 T_m보다 30℃ 낮은 온도에서 서열 1의 단편과 하이브리드화한다. 바람직하게는 이들을 계산된 T_m보다 25, 20, 15, 10 또는 5℃ 낮은 온도에서 하이브리드화시킨다.

제조할 DNA 기술을 사용하는 유전자 조작의 목적으로, 본 발명에 따른 DNA 분자는 모노옥시게나제를 암호화하는 유전자와 더불어, 예를 들어, 이. 콜라이(E. coli), 바실러스, 아그로박테리움(Agrobacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces) 또는 효모와 같은 미생물내에서 본 발명의 DNA를 복제하고 선택할 수 있게 하는 DNA를 포함할 수 있다. 또한, 이는 모노옥시게나제 유전자를 동종성 또는 이종성 식물내에서 발현시키고 선택할 수 있게 하는 DNA를 포함할 수 있다. 이러한 서열은 코돈 사용법이 WO93/07278에 기술된 바와 같은 이종성 식물의 코돈 사용법에 맞춰진 유전자; 네오마이신, 가나마이신, 메토타렉세이트, 하이그로마이신, 블레오마이신, 스트렙토마이신 또는 겐타마이신, 아미노에틸시스테인, 글리오포스페이트, 설로닐우레아 또는 포스포노트리신에 대한 내성을 부여하는 유전자; 갈락토시다제와 같은 기록가능한 마커 유전자; 이의 천연 프로모터 및 전사 종결 시그널; 프로모터 소자, 예를 들어, 35S 및 19S CaMV 프로모터, 또는 조직 특이적 식물 프로모터, 뿌리에 특이적인 프로모터(예를 들어, EP-452269-A2, WO91/13992, US-5,023,179에 기술됨), 녹색 잎, 예를 들어, 옥수수 포스포에놀 피루베이트 카복실라제(PEPC), 목수 또는 화분(예를 들어, WO93/07278에 기술됨), 또는 유도가능한 식물 프로모터(EP-332104); 및 이종성 전사 종결 시그널을 포함하나, 이에 국한되지는 않는다.

또한, 본 발명은 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 P450_{II} 모노옥시게나제에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 양태에서는, 모노옥시게나제를 정제하고 이를 사용하여 모노옥시게나제에 특이적으로 결합하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 확립할 수 있다. 특히, SDS-PAGE에 의해 측정된 바와 같은 분자량이 55kD인 사이토크롬 P450_{OX}를 소르굽 비콜로르(L.) 모엔크로부터 분리할 수 있다. 이의 아미노산 서열은 서열 2로 제시한다.

P450_{OX}의 촉매 특성은 래트 간으로부터의 마이크로솜에서 보고된 사이토크롬 P450 활성의 것과 유사하다[참고 문헌: DeMaster et al., J. Org. Chem. 5074-5075, 1992]. 사이토크롬 P450_{OX} 및 사이토크롬 P450_{OX} 계열에 속하는 다른 구성원의 특성은 알독심의 상응하는 니트릴로의 탈수화가 NADPH의 존재에 의존하나, 특정 경우에 이러한 의존성은 나트륨 디티오나이트 또는 다른 환원제의 첨가에 의해 극복할 수 있다는 것이다.

사이토크롬 P450 효소의 모든 공지된 서열 중, 사이토크롬 P450_{OX}는 아보카도 효소 CYP71A1에 대해 가장 높은 아미노산 서열 동일성(44%) 및 CYP71 계열의 다른 모든 성원에 대해 40% 미만의 동일성을 나타낸다. 아보카도는 시안생성성 글리코사이드를 생성시키지 않으며, CYP71A1은 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하지 않는다. 따라서, 본 발명에 따라 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제의 계열은 알독심의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하고 사이토크롬 P450_{OX}의 아미노산 서열과 40% 이상의 동일성을 갖는 것의 일원으로 규정될 수 있다. 바람직하게는 사이토크롬 P450_{OX}와의 아미노산 서열 동일성은 50% 이상 또는 55% 이상이다.

P450_{OX}는 다중 서열 정렬의 그래프식 출력인 덴드로그램에서 다른 CYP71과 집락을 이루기 때문에 P450_{OX}를 신규한 CYP71 아계열(CYP71E1)의 제1 성원으로 선정하도록 제안되고 있다. 일반적으로, 명명법 위원회에 따라, 아미노산 수준에서의 40% 미만의 서열 동일성은 사이토크롬 P450이 신규한 CYP 계열로 선정되는데 필요하며 55% 이상 동일한 서열은 동일한 아계열로 선정한다. 다중 서열 정렬을 조립할 경우, 서열 동일성뿐만 아니라, 각각의 아미노산의 동일한 순수한 장입량 또는 비교가능한 소수성/친수성과 같은 서열 유사성을 고려한다. 이러한 정렬에서, P450_{OX}는 다른 CYP71 서열과 집락을 이루므로, 아보카도로부터의 CYP71A1을 제외하고는 CYP71 계열의 다른 모든 성원과 40% 미만의 동일성을 나타낸다는 사실에도 불구하고 CYP71 계열에 포함되어야 한다. 이는 다른 성원과의 낮은 서열 동일성을 나타내기 때문에, 신규한 아계열로 선정되어야 한다. 다른 CYP71 계열 성원은 모두 비-시아노생성성 종으로부터 유래된 것이며, 이들의 기능은 공지되어 있지 않다. CYP71에 속하는 이미 확인된 P450의 촉매 특성은 여전히 알 수 없다. 이들은 테르펜 하이드록실화에 관련되는 것으로 간주된다. 이들 중 어느 것도 옥심을 기질로서 사용하거나 알독심을 니트릴 및 시아노하이드린으로 다기능성 전환시키기 위해 제안되고 있지 않다.

본 발명의 추가의 양태는 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 cDNA의 제조 방법을 제시하고 있다. 당해 제조 방법은 (a) 마이크로솜을 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물 조직으로부터 분리하고 용해시키는 단계, (b) 사이토크롬 P450 모노옥시게나제를 정제하는 단계, (c) 정제된 모노옥시게나제에 대해 항체를 생성시키는 단계, (d) 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물 조직의 cDNA 발현 라이브러리를 상기 항체로 프로빙화하는 단계, 및 (e) 상기 모노옥시게나제를 발현시키는 클론을 분리하는 단계를 포함한다.

마이크로솜은 시안생성성 글리코사이드의 생합성을 유발하는 효소 시스템의 높은 활성을 나타내는 식물 조직으로부터 분리할 수 있다. 상기 조직은 식물 종마다 상이할 수 있다. 마이크로솜의 바람직한 공급원은 발아한 지 1 내지 20일, 바람직하게는 2 내지 10일 및 가장 바람직하게는 2 내지 4일 후 수거된, 갓 분리된 발아종자이다. 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물로부터의 황화된 발아종자가 바람직하나, 광 성장된 발아종자를 사용할 수도 있다. 분리한 후, 마이크로솜을 하나 이상의 세제를 함유하는 완충액에 용해시킨다. 바람직한 세제는 RENEX 690(J. Lorentzen A/S, Kvistgard, Denmark), 환원된 Triton X-100(RTX-100), Triton X-114 및 CHAPS이다.

사이토크롬 P450 모노옥시게나제는 단백질 정제용 표준 기술, 예를 들어, 초원심분리, 분별 침전, 투석, SDS-PAGE 및 칼럼 크로마토그래피를 적용시킴으로써 정제할 수 있다. 가능한 칼럼은 이온 교환 칼럼, 예를 들어, DEAE Sepharose, 리액티브 다이 칼럼(Reactive dye column), 예를 들어, 시마크론 옐로우 3 아가로스(Cibacron yellow 3 agarose), 시마크론 블루 아가로스 및 리액티브 레드 120 아가로스, 및 겔 여과 칼럼, 예를 들어, Sephacryl S-1000을 포함하나, 이에 국한되지는 않는다. 각각의 분획의 사이토크롬 P450 함량은 일산화탄소 시차 스펙트럼으로부터 측정할 수 있다. 또한, P450_{OX}의 정량화를 곤란하게 하는, P450_{OX}의 분리 동안의 특정한 어려움은, 예를 들어, P450_{TYR}과 같은 P450 효소의 정제에 통상적으로 사용되는 이온 교환 칼럼에 결합하는 대신 초기 정제 단계 동안 황색 안료와 공동 이동하는 것이다. 황색 안료의 존재는, P450_{OX}가 다수의 상이한 칼럼 물질에 결합하여, 추가 정제에 대한 주요 장애물을 구성하는 것을 방지한다. 그러나, 황색 안료로부터의 P450_{OX}의 분리는 온도 유도된 Triton X-114 분배에 의해 완수할 수 있다. 당해 방법은 Triton X-114의 양을 증가시킴으로써 P450_{OX} 회수 및 안료의 제거와 관련하여 최적화시킨다. 다른 P450에 대해 사용되는 수준의 6 내지 10배인 6%에서, P450_{OX} 활성의 약 80%가 청정한 하부 상으로 분배된다. 상기 정제 단계에서는 황색 안료의 제거에 비해 거의 정제가 일어나지 않는다. 그러나, P450_{OX} 함유 하부 상을 시마크론 블루 다이 칼럼에 적용시킬 경우, 염 구배 용출은 재구성에 의해 P450_{OX} 활성을 나타내는 상기 분획에서 55kDa의 겔보기 분자 질량을 갖는 주요한 쿠마시 염색된 밴드의 존재로부터 판정되는 바와 같이 거의 동종성 P450_{OX}를 생성시킨다.

분리된 P450_{OX}는 450nm에서 흡수 피크를 갖는 일산화탄소 스펙트럼을 생성시키나, 분리된 효소의 비교적 대부분은 변성된 P420 형태로 존재한다. 분리 과정에서의 상이한 단계에서 P450_{OX}의 총 함량 및 특이적 활성의 정량적 측정은 P450_{OX}의 변성된 P420 형태로의 연속적 전환에 의해 방해된다. 또한, P450_{OX}의 특이적 활성은 사용되는 상이한 세제에 의해 발휘되는 억제 효과에 의존적이다. 따라서, 분획 중의 총 P450 함량은 반정량적인 것으로 간주된다.

정제된 단백질을 사용하여, 예를 들어, 마우스, 염소, 양, 토끼 또는 닭에서 항체를 주사로 유도할 수 있다. 단백질 5 내지 50 μ g을 약 14일 간격 동안 수회 주사한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 10 내지 20 μ g을 14일 간격내에 2 내지 6회 주사한다. 보조제의 존재 또는 부재하에 주사한다. 면역글로불린을 항혈청으로부터 정제하고 비장을 본원에 참고로 인용된 문헌[참조: Harlow and Lane, 'Antibodies: A Laboratory Manual', Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988]에 기술된 바와 같이 하이브리도마 융합에 사용할 수 있다. 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제에 특이적으로 결합한 항체를 또한 식물 육종에 사용하여 변화된 양의 사이토크롬 P450 모노옥시게나제, 및 따라서 변화된 양의 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물을 검출할 수도 있다.

식물 조직 cDNA 라이브러리의 제조 방법은 cDNA 라이브러리의 제조에 관한 주요부는 본원에 참고로 인용된 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에 광범위하게 기술되어 있다. PolyA⁺ RNA를 시안생성성 글리코사이드의 생합성을 유발하는 효소 시스템의 높은 활성을 나타내는 식물 조직으로부터 분리한다. 상기 조직은 식물 종마다 상이할 수 있다. PolyA⁺ RNA 분리에 바람직한 조직은 발아한 지 1 내지 20일, 바람직하게는 2 내지 10일 및 가장 바람직하게는 2 내지 4일 후 수거된, 갓 분리된 발아종자의 조직이다. 수득된 cDNA 라이브러리를 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제에 특이적으로 결합하는 항체로 프로빙할 수 있고 모노옥시게나제를 발현하는 클론을 분리할 수 있다.

사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 cDNA의 또다른 제조 방법은 (a) 마이크로솜을 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물 조직으로부터 분리하고 용해시키는 단계, (b) 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 정제하는 단계, (c) 모노옥시게나제의 완전한 또는 부분적인 단백질 서열을 수득하는 단계, (d) 상기 모노옥시게나제 단백질 서열 중 4 내지 15개의 아미노산을 암호화하는 DNA를 특정하는 올리고뉴클레오타이드를 디자인하는 단계, (e) 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물 조직의 cDNA 라이브러리를, 상기 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 cDNA의 PCR 증폭으로부터 수득된 DNA 분자로 프로빙하는 단계, 및 (f) 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 클론을 분리하는 단계를 포함한다.

프로테아제 분해의 결과인 내부 펩타이드의 아미노산 서열은 표준 기술, 예를 들어, 에드만 분해(Edman degradation)에 의해 수득할 수 있다. 본 발명의 모노옥시게나제의 부분적 단백질 서열을 암호화하는 DNA를 명시하는 올리고뉴클레오타이드는 유전자 코드에 따른 단백질 서열의 일부분의 역해독에 의해 수득한다. 낮은 축퇴도의 DNA 서열에 의해 암호화되는 단백질 서열이 역해독에 바람직하다. 이들의 길이는 4 내지 15개, 바람직하게는 5 내지 10개 아미노산의 범위이다. 필요한 경우, 올리고뉴클레오타이드에 사용되는 코돈을 식물 공급원의 코돈 사용법[참고 문헌: Murray et al., Nucleic Acids Research 17:477-498, 1989]에 맞출 수 있다. 수득된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 상기 올리고뉴클레오타이드와 염기 쌍으로 만들 수 있는 클론에 대해 문헌[참조: Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에 기술된 바와 같이 cDNA 라이브러리를 프로빙할 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드를, 폴리머라제 연쇄 반응에 사용할 수 있는데, 여기서, 이의 방법론은 당해 분야에 공지되어 있으며, 식물 cDNA를 증폭에 대한 주형으로서 사용한다. 상기 경우에, 수득된 증폭 생성물을 사용하여 cDNA 라이브러리를 프로빙한다. 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 클론을 분리한다.

유전자를 클로닝하는 또 다른 방법은 발현 벡터로 구성된 유전자 라이브러리의 작제를 기초로 한다. 이들 방법에서는, 상기한 방법과 유사하게, 게놈 DNA, 그러나 바람직하게는 cDNA를 먼저 P450_{II} 모노옥시게나제를 발현시킬 수 있는 세포 또는 조직으로부터 분리한 다음, 적합한 발현 벡터로 스플라이싱시킨다. 다음, 이렇게 생성된 유전자 라이브러리를 적합한 수단, 바람직하게는 항체를 사용하여 스크리닝한다. 목적하는 유전자 또는 당해 유전자의 적어도 일부분을 포함하는 클론을 삽입물로서 선택한다.

또한, 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450 모노옥시게나제를 암호화하는 cDNA는;

(a) A형 사이토크롬의 보존된 영역 중 3 내지 10개의 아미노산을 포함하는 축퇴된 올리고뉴클레오타이드를 디자인하고, (b) 축퇴된 올리고뉴클레오타이드를 사용하고 폴리머라제 연쇄 반응을 사용하여 하나 이상의 사이토크롬 특이적 DNA 단편을 증폭시키고, (c) cDNA 라이브러리를 사이토크롬 특이적 단편으로 스크리닝하여 완전한 길이의 cDNA를 수득하고, (d) 완전한 길이의 cDNA를 미생물 숙주내에서 발현시키고, (e) 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450 모노옥시게나제를 발현시키는 숙주를 동정하고, (f) 클로닝된 DNA를 상기 숙주로부터 정제함으로써 획득할 수 있다.

DNA 라이브러리, 바람직하게는 cDNA 라이브러리로부터의 전체 DNA를, 통상의 식물 사이토크롬 P450 선조로부터 유래한 것으로 간주되는 A형 사이토크롬[참고 문헌: Durst et al., Drug Metabolism and Drug Interactions 12: 189-206, 1995]의 보존된 영역을 나타내는 하나 이상의 프라이머를 사용하는 PCR 반응에서 주형으로서 사용할 수 있다. A형 사이토크롬 P450의 다중 서열 정렬을 기초로 하여, 아미노산 수준에서 3개의 고도로 보존된 영역을 다음과 같이 정의할 수 있다: 영역 1(V/I)KEX(L/F)R, 영역 2 FXPERF, 및 영역 3 PFGXGRRXCXG. 프라이머를 함유하는 축퇴성 이노신(I)은 2개의 영역의 3 내지 10개, 바람직하게는 5 또는 6개의 아미노산을 각각 포함하도록 디자인할 수 있다. PCR은, 예를 들어, 3회의 연속적인 라운드로 수행한다. 콘센서스 영역 FXPERF를 포함하는 프라이머 및 라이브러리 벡터내에 T7 프로모터를 포함하는 표준 T7 프라이머를 사용하는 라운드 1은 A형 사이토크롬 P450을 암호화하는 mRNA로부터 유래된 cDNA를 증폭시킨다. 2개의 콘센서스 영역 및 라운드 1의 증폭된 DNA를 주형으로서 포함하는 프라이머를 사용하는 PCR의 제2 라운드는 우선적으로 100bp 단편을 증폭시킨 다음, 이를 pBluescript로 결합시키고 서열화시킨다. 유전자 특이적 프라이머를 수득된 DNA 서열을 기초로 하여 디자인한다. 이들을 폴리 A 미부(프라이머 dT+ V)에 상보적인 프라이머 및 주형으로서 PCR 라운드 1의 DNA와 함께 라운드 3에서 사용하여 유전자 특이적 프로브로서 사용할 수 있는 약 500bp DNA 단편을 증폭시켜 완전한 길이의 cDNA를 분리한다. 상기 PCR 접근법은 P450_{OX}의 분리에는 유일한 것은 아니나, A형 사이토크롬 P450의 분리에 대해서는 일반적이다. 수득된 A형 사이토크롬 P450은 이들의 기능을 측정하기 위해 이중적으로 발현시킬 필요가 있다.

상기한 바와 같이 제조한 cDNA 클론 또는 PCR 생성물, 또는 이의 단편을, P450_{II} 모노옥시게나제 활성을 나타내는 단백질 생성물을 암호화하는 추가의 DNA 서열을 동종성 또는 이종성 근원 유기체, 예를 들어, 진균류 또는 이종성 식물로부터 동정하는 방법에서 하이브리드화 프로브로서 사용할 수 있다. 적합한 공급원은 시안생성성 글리코사이드를 함유하는 식물로부터의 조직이다.

상기 클론 또는 PCR 생성물은 또한 RFLP 마커로서 사용하여, 예를 들어, 사이토크롬 P450 모노옥시게나제 유전자의 위치 또는 식물 게놈내의 밀접하게 결합된 흔적 또는 마커 보조된 육종에 대해 측정할 수 있다[참고 문헌: EP-A 306139; WO 89/07647].

상기한 방법을 사용하여, P450_{II} 모노옥시게나제를 암호화하는 각종 유전자를 분리할 수 있다. 상기 유전자를, 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 정제된 재조합 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제를 생성시키는, 다음 단계를 포함하는 방법에 사용할 수 있다:

(a) 숙주 유기체, 예를 들어, 세균, 효모 또는 곤충 세포내에서 발현시킬 수 있는 상기 모노옥시게나제를 암호화하는 유전자를 조작하는 단계,

(b) 상기 숙주 유기체를 조작된 유전자로 형질전환시키는 단계 및

(c) 단백질을 숙주 유기체 또는 배양물 상청액으로부터 분리하는 단계.

본 발명의 바람직한 양태에서, 상기 방법을 사용하여 정제된 재조합 사이토크롬 P450_{OX}, 또는 유전자 공학의 공지된 기술에 의해 변형된 사이토크롬 P450_{OX}를 수득한다. 바람직하게는 이러한 변형은 재조합 단백질의 증가된 발현 또는 변화된 기질 특이성을 초래한다.

본 발명의 DNA 분자를 사용하여 해충 또는 진드기에 내성인 형질전환 식물을 수득할 수 있다. 특정 양태는 WO 95/16041의 표 B(페이지 45)에 기재되어 있는 것뿐만 아니라 하기한 선충류를 포함하나, 이에 국한되지는 않는다. 편의상 상기 표만을 본 명세서에서 반복하지 않으나, WO 95/16041의 명세서에 관하여 설명함으로써 본원에 인용하고자 한다. 바람직하게는 형질전환 식물은 콜레오프테라(Coleoptera) 및 레피도프테라(Lepidoptera), 예를 들어, 서부 옥수수 뿌리 벌레(디아

브로티카 비르기페라 비르기페라(*Diabrotica virgifera virgifera*), 북부 옥수수 뿌리 벌레(디아브로티카 롱기코르니스 바르베리(*Diabrotica longicornis barberi*), 남부 옥수수 뿌리 벌레(디아브로티카 언데심퐁크타타 호워드디(*Diabrotica undecimpunctata howardi*)), 면화씨 벌레, 유럽 조명나방, 옥수수 뿌리 유충, 핑크 면화씨 벌레 및 담배나방에 대한 내성을 갖는다.

선충류는 매년 100조 달러가 넘는 것으로 예상되는 농예에 대한 세계적인 손실을 일으키는 식물의 주요 동물 기생충이다. 특정 선충류는 식물 세포 변형을 포함하는 섭식 부위 및 몇 시간 또는 상당한 그 이상의 시간 동안 한 부위에서의 섭식을 유발한다. 이들은 멜로이도기네 글로보데라(*Meloidogyne Globodera*), 헤테로데라(*Heterodera*), 로틸렌쿨루스(*Rotylenchulus*), 틸렌쿨루스(*Tylenchulus*), 나코부스(*Nacobus*), 크시피네마(*Xiphinema*), 롱기도루스(*Longidorus*), 파라롱기도루스(*Paralongidorus*), 크리포데라(*Cryphodera*), 트로포틸렌쿨루스(*Trophotylenchulus*), 헤미시클리오포라(*Hemicycliophora*), 크리코네멜라(*Criconemella*), 베루투스(*Verutus*) 및 헬리오코틸렌쿠스(*Heliocotylenchus*) 속의 종을 포함한다. 한 부위에서 보다 제한된 기간 동안 섭식하는 것으로 간주되는 속은 프라틸렌쿠스(*Pratylenchus*), 라도폴루스(*Radopholus*), 히르스크만니엘라(*Hirschmanniella*), 트리코도루스(*Trichodorus*), 파라트리코도루스(*Paratrachodorus*), 디틸렌쿠스(*Ditylenchus*), 아펠렌코이데스(*Aphelenchoides*), 스쿠텔로네마(*Scutellonema*) 및 벨로놀라이무스(*Belonolaimus*)를 포함한다.

형질전환 식물은 상기 알독심의 니트릴로의 전환 및 상기 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매하는 신규한 모노옥시게나제를 암호화하는 DNA를 포함한다. 또한, 형질전환 식물은 제초제 내성 유전자에 유전적으로 연결되는 모노옥시게나제 유전자를 포함할 수 있다. 형질전환 식물은 바람직하게는 단자엽 또는 쌍자엽 식물이다. 특정 양태는 WO 95/16041의 표 A(페이지 33-44)에 기재되어 있다. 편의상 상기 표만을 본 명세서에서 반복하지 않으나, WO 95/16041의 명세서에 관하여 설명함으로써 본원에 인용하고자 한다. 바람직하게는 이들은 옥수수, 벼, 밀, 보리, 수수, 목화, 콩, 해바라기, 목초, 오일 종자 평지, 사탕수수, 브로콜리, 콜리플라워, 양배추, 오이, 사탕 옥수수, 다이콘, 베나스, 상추, 멜론, 후추, 호박, 토마토 및 수박으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 상기 식물들은 다음 단계를 포함하는 방법에 의해 수득할 수 있다:

(a) 본 발명의 모노옥시게나제를 암호화하는 상기 식물내에서 발현가능한 유전자를 포함하는 DNA를 완전한 식물로 재생시킬 수 있는 식물 세포 또는 식물 조직내에 도입하는 단계 및

(b) 형질전환 식물을 선택하는 단계.

유사하게 본 발명의 DNA 분자를 사용하여 내생성 P450_{II} 모노옥시게나제의 유전자를 표적으로 하는 안티센스 또는 센스 RNA 또는 리보자임을 발현시키는 형질전환 식물을 수득할 수 있다. 상기 분자의 형질전환 식물내에서의 발현은 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제의 발현을 감소시킨다. 이러한 식물은 시안생성성 글리코사이드의 감소된 발현으로 인해 개선된 병 내성 또는 영양가를 나타낸다. 상기 식물은 다음 단계를 포함하는 방법을 사용하여 수득할 수 있다:

(a) 센스 RNA, 안티센스 RNA 또는 리보자임을 암호화하는 DNA(이의 발현은 사이토크롬 P450_{II} 모노옥시게나제의 발현을 감소시킨다)를 완전한 식물로 재생시킬 수 있는 식물 세포 또는 식물 조직내에 도입하는 단계 및

(b) 형질전환 식물을 선택하는 단계.

다수의 매우 유효한 방법은 DNA를 식물 세포에 도입하기 위해 이용가능하고, 이들 방법은 유전자 전이 벡터의 사용 또는 직접 유전자 전이 방법을 기초로 한다.

유전자 작제물을 세포내로 삽입하는 특정의 가능한 방법은 상기 유전자 작제를 이용하여 형질전환된 아그로박테륨 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 및/또는 아그로박테륨 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)에의 식물 세포의 감염을 이용한다. 다음, 형질전환 식물 세포를 당해 분야의 숙련자에게 공지된 적합한 배양 조건하에 배양하면, 이들은 발아종자 및 뿌리를 형성시키고 전체 식물이 최종적으로 형성된다.

아그로박테륨을 이용한 소위 엽반 형질전환은 본 발명의 범주내에 있다[참고 문헌: Horsch et al., Science 227:1229-1231, 1985]. 적합한 표적 식물로부터의 멸균 엽반을 본 발명에 따른 키메라 유전자 작제 중 하나를 포함하는 아그로박테륨 세포와 함께 배양한 다음, 적합한 영양 배지내로 또는 영양배지상에 전이시킨다. 아가 첨가에 의해 응고되고 통상적으로 사용되는 식물 성장 조절제, 특히 α-나프틸아세트산, 피클로람, 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 인돌-3-부티르산, 인돌-3-락트산, 인돌-3-석신산, 인돌-3-아세트산 및 p-클로로페녹시아세트산으로 이루어

어진 옥신의 그룹으로 선택되고, 키네티ن, 6-벤질아데닌, 2-이소펜테닐아데닌 및 제아틴으로 이루어진 사이토키닌의 그룹으로부터 선택된 것 중 하나 이상을 강화시킨 LS 배지가 본 발명의 범주내에서 특히 적합하고, 따라서 바람직하다. 옥신 및 사이토키닌의 바람직한 농도는 0.1mg/l 내지 10mg/l이다.

수일 동안, 바람직하게는 2 내지 3일 동안 20℃ 내지 40℃, 바람직하게는 23℃ 내지 35℃, 보다 바람직하게는 25℃에서 및 산광에서의 배양 후, 엽반을 받아 유도의 목적으로 적합한 배지로 전이시킨다. 옥신을 함유하지 않으나 대신 사이토키닌을 함유하고 선택 물질이 첨가된 LS 배지가 형질전환체의 선택에 특히 바람직하다. 배양물을 광원에 방치하고 적합한 간격, 바람직하게는 1주일 간격으로 신선한 배지로 전이시킨다. 발육하고 있는 녹색 발아종자를 절단하여, 발아를 유도하는 배지내에서 추가로 배양하여 뿌리를 형성시킨다. 옥신 또는 사이토키닌을 함유하지 않으나, 선택 물질이 첨가된 LS 배지가 본 발명의 범주내에서 형질전환체의 선택에 특히 바람직하다.

아그로박테륨-매개된 형질전환과 더불어, 본 발명의 범주내에서 본 발명에 따른 유전자 작제물을 식물체에 삽입하는 직접 형질전환 방법을 사용할 수도 있다.

예를 들어, 벡터내에 함유된 유전 물질을, 예를 들어, 순수하게 물리학적 과정을 사용하여, 예를 들어, 미세 인발 마이크로 피펫을 사용하는 미세주사[참고 문헌: Neuhaus et al., Theoretical and Applied Genetics 74:363-373, 1987]에 의해, 전기천공[참고 문헌: D'Halluin et al., The Plant Cell 4:1495-1505, 1992; WO92/09696]에 의해 또는 바람직하게는 형질전환된 DNA로 피복된 미소추진체를 사용한 세포의 파괴[참고 문헌: "Microprojectile Bombardment": Wang et al., Plant Molecular Biology 11:433-439, 1988; Gorden-Kamm et al., The Plant Cell 2:603-618, 1990; McCabe et al., Bio/Technology 11:596-598, 1993; Christou et al., Plant Physiol. 87:671-674, 1988; Koziel et al., Biotechnology 11:194-200, 1993]에 의해 식물 세포로 직접 삽입할 수 있다. 또한, 형질전환된 식물체는 임의로 삼투적으로 활성 물질, 예를 들어, 수크로스, 솔비톨, 폴리에틸렌 글리콜, 글루코스 또는 만니톨로 전처리할 수 있다.

유전 물질을 식물 세포로 직접적으로 전이시키는 다른 가능한 방법은 원형질 막을 개질시키는 과정을 사용하는 원형질체의 처리, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 처리, 열 속 처리 또는 전기천공, 또는 상기 과정의 조합을 포함한다[참고 문헌: Shillito et al., Biotechnology 3:1099-1103, 1985].

순수하게 화학적 방법을 기초로 하고 형질전환을 매우 효율적이고 신속하게 수행가능하게 하는, 유전 물질의 식물 세포로의 직접 도입을 위한 추가의 방법은 문헌[참조: Negrutiu et al., Plant Molecular Biology 8:363-373, 1987]에 기술되어 있다.

또한, 공형질전환을 사용하는 직접 유전자 전이[참고 문헌: Schocher et al., Bio/Technology 4:1093-1096, 1986]가 식물체의 형질전환에 적합하다.

예로서 위에서 제시한 가능한 형질전환 방법의 목록은 전부를 청구한 것은 아니며, 어떠한 방법으로도 본 발명의 주제를 한정하고자 하는 것은 아니다.

상기한 형질전환 종자 및 식물로 조작된 유전적 특성은 유성 생식 또는 영양 증식에 의해 전달되어, 자손 식물에서 유지되고 유전될 수 있다. 일반적으로 상기 유지 및 유전은 특정 목적, 경작, 파종 또는 수확에 적합하도록 개발된 공지된 농예 방법을 이용한다. 전문화된 방법, 예를 들어, 수경법 또는 또는 온실 생산기술을 또한 적용시킬 수 있다. 성장하는 작물은 해충에 의해 유발되는 공격 및 손상 또는 감염뿐만 아니라, 잡초에 의한 경쟁에 취약하므로, 잡초, 식물 병, 해충, 선충류 및 이외의 불리한 조건을 방제하도록 조치를 취하여 생산량을 향상시킨다. 이들은 기계적 조치, 예를 들어, 토양의 경작 또는 잡초 및 감염된 식물의 제거뿐만 아니라, 농약, 예를 들어, 제초제, 살진균제, 생식자소멸제, 살선충제, 성장 조절제, 숙성제 및 살충제의 적용을 포함한다.

또한, 본 발명에 따른 형질전환 식물 및 종자의 유리한 유전적 특성은 개선된 특성, 해충, 제초제 또는 스트레스의 내성, 개선된 영양가, 증가된 생산량, 또는 도복(倒伏) 또는 탈립(脫粒)으로부터의 손실을 보다 적게 하는 개선된 구조를 갖는 식물의 개발을 목적으로 하는 식물 육종에 사용할 수 있다. 각종 육종 단계는 교배할 계통을 선택하거나, 아버지 계통의 수분을 지시하거나, 적합한 자손 식물을 선택하는 것과 같은 익히 규정된 사람 개입을 특징으로 한다. 목적하는 특성에 따라 상이한 육종 수단을 취한다. 관련 기술은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며, 하이브리드화, 근교배, 역교배 육종, 다계통 육종, 품종 혼성, 이종간 하이브리드화, 이수성 기술 등을 포함하나, 이에 국한되지는 않는다. 하이브리드화 기술은 또한 기계, 화학 또는 생화학 수단에 의해 웅성 또는 자성 불임성 식물을 수득하기 위해 식물의 불임법을 포함한다. 상이한 계통의 화분을 사용한 웅성 불임성 식물의 타화 수분은 웅성 불임성이나 자성 수정가능한 식물의 계통은 양쪽 아버지 계통의 특성을 균일하게 수득할 수 있음을 확실하게 한다. 따라서, 본 발명에 따른 형질전환 종자 및 식물은, 예를 들어, 제초제 또는 살충

제 처리와 같은 통상적인 방법의 효능을 증가시키거나 이들의 개질된 유전적 특성으로 인해 상기 방법을 불필요하게 하는 개선된 식물 계통의 육종에 사용할 수 있다. 또한, 최적화된 유전자 "장착(equipment)"으로 인해 유사한 불리한 발육상 조건을 견뎌낼 수 없는 산물보다 우수한 품질의 수확물을 산출하는 개선된 스트레스 내성을 갖는 신규한 작물을 수득할 수 있다.

종자 생산에서, 종자의 발아 품질 및 균일성은 본질적인 산물 특성인 반면에, 농부에 의해 수확되고 판매되는 종자의 발아 품질 및 균일성은 중요하지 않다. 다른 작물 또는 잡초로부터 자유롭게 하고, 종자내생 병을 방제하고, 우수한 발아율을 갖는 종자를 생성시키는 것이 어렵기 때문에, 매우 광범위하고 익히 규정된 종자 생산 시행은 순수한 종자의 재배, 조절 및 마케팅 분야에 종사하는 종자 생산자에 의해 개발되어 있다. 따라서, 농부가 그의 작물로부터 수확된 종자를 사용하는 대신 특정 품질 표준에 부합하는 보증된 종자를 구입하는 것이 관례이다. 종자로서 사용할 번식 물질은 통상적으로 제초제, 살충제, 살진균제, 살균제, 살선충제, 살연체동물제 또는 이의 혼합물을 포함하는 보호성 피복제로 처리한다. 통상적으로 사용되는 보호성 피복제는 캡탄, 카복신, 티람(TMTD^R), 메탈락실(Apron^R) 및 피리미포스메틸(Actellic^R)과 같은 화합물을 포함한다. 필요한 경우, 상기 화합물을 제형화 분야에 통상적으로 사용되는 추가의 담체, 계면활성제 또는 살포 촉진 보조제와 함께 제형화시켜 세균, 진균 또는 동물 해충에 의해 유발되는 손상에 대한 보호를 제공한다. 보호성 피복제는 액체 제형으로 번식 물질 침지시키거나 복합 습식 또는 건식 제형으로 피복시킴으로써 적용시킬 수 있다. 싹 또는 열매에 직접적으로 처리하는 이외의 적용 방법도 또한 가능하다.

본 발명에 따른 형질전환 식물, 형질전환 식물체 또는 형질전환 종자의 사용을 특징으로 하는 위에서 예시한 방법과 같은 신규한 농예 방법을 제공하는 것이 본 발명의 추가의 국면이다.

하기 실시예는 본 발명을 수행하는데 필요한 물질 및 방법과 후속적인 결과를 추가로 기술한다. 이들은 예시로서 제공하고, 이의 상술은 청구된 발명을 제한하는 것으로서 간주되어서는 안된다.

실시예

실시예 1: 마이크로솜의 제조

마이크로솜의 제조를 포함하는 모든 단계는 달리 지시하지 않는 한 4℃에서 수행한다. 모든 완충액은 진공하에 교반하고 아르곤을 플러싱시켜 탈기시킨다.

소르굼 비콜로르(L.) 모엔크의 종자(하이브리드 SS1000, 구입원: AgriPro, Texas, USA)를 가제로 덮은 금속 스크린 상에서 28℃에서 40시간 동안 암실에서 발아시킨다. 마이크로솜을 약 3cm의 황화된 발아로부터 제조한다. 싹을 수거하고 막자사발 및 막자를 사용하여 250mM 수크로스, 100mM Tricine(pH 7.9), 2mM EDTA 및 2mM DTT 2용적(v/w) 중에 균질화시킨다. 폴리비닐피롤리돈(0.1g/새로운 중량 g)을 균질화 전에 가한다. 균질화물을 22μm 나일론 천을 통해 여과하고 16500xg에서 10분 동안 원심분리한다. 테플론 막자가 장착된 포터-엘페엠(Potter-Elvehjem) 균질화기를 사용하여 마이크로솜 펠릿을 분리 완충액에 재현탁시키고 균질화시킨다. 재원심분리 및 재균질화 후, 균질화물을 액체 질소내에서 동결시키고 사용할 때까지 -80℃에서 저장한다.

실시예 2: 효소 검정: 전체 사이토크롬 P450의 측정

환원된 사이토크롬 P450과 일산화탄소간의 부가물에 대한 91mM⁻¹cm⁻¹의 흡광 계수(A₄₅₀₋₄₉₀)를 사용하는 시차 분광계에 의해 전체 사이토크롬 P450의 정량적 측정을 수행한다[참고 문헌: Omura et al., J. Biol. Chem. 239:2370-2378, 1964].

실시예 3: 사이토크롬 P450_{OX}의 정제

효소의 정제를 포함하는 모든 단계를 달리 지시하지 않는 한 4℃에서 수행한다.

완충액 A: 완충액 C:

8.9% 글리세롤 8.9% 글리세롤

10mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.9) 40mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.9)

0.2mM EDTA 5.0mM EDTA

2.0mM DTT 2.0mM DTT

1.0%(v/v) Renex 690 1.0%(w/v) CHAPS

0.0% RTX-100

세제 및 DTT를 첨가하기 전에 완충액을 진공하에 교반함으로써 3회 탈기시킨다. 각각의 탈기 사이에 완충액을 아르곤으로 플러싱한다. 방사선표지된 p-하이드록시페닐아세트알독심을 대사하는 상이한 칼럼 분획의 능력을 정제 과정을 통해 모니터링하여 분획내의 p450_{OX} 의 존재를 동정한다.

마이크로솜(20ml 중의 400mg 단백질을) 8.9% 글리세롤, 10mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.9), 0.2mM EDTA, 2mM DTT로 구성된 완충액을 사용하여 100ml로 희석시킨 후, 10mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.9), 8.9% 글리세롤, 0.2mM EDTA, 2mM DTT, 0.1% RTX-100(v/v), 2% Renex의 100ml를 일정하게 교반하면서 서서히 가한다. 30분 동안 추가로 교반하고 후속적으로 150000xg에서 35분 동안 초원심분리한 후, 약 190ml의 상청액을 100ml/h의 유속으로 완충액 A에 평형화된 DEAE Sepharose FF/S-100 Sepharose(20/80 습윤 용적, Pharmacia)의 5x5cm 칼럼에 적용시킨다. DEAE Sepharose 이온 교환 수지는 S-100 Sepharose 겔 여과 물질을 사용하여 비 1:4로 희석시켜, 비가역적 응집을 유발할 수 있는, 결합시 사이토크롬 P450 효소의 매우 높은 농도를 방지한다. 다음, 칼럼을 완충액 A 150ml로 세척한다. P450_{OX} 는 칼럼에 약하게 결합하고 본질적으로 황색 안료를 함유하는 유출 및 세척액 분획의 것에서 회수된다. CO 결합 스펙트럼 및 재구성 실험(실시예 4 참조)에서 옥심을 대사하는 능력을 420nm에서의 흡광도에 의해 동정된, P450_{OX} 를 함유하는 분획을 합한다(약 200ml). 이들은 추가의 정제에 사용하거나 동결시킬 수 있다.

합한 P450_{OX} 분획을 적합한 양의 글리세롤 및 Triton X-114의 혼합물의 적가에 의해 30%(v/v) 글리세롤 및 6% Triton X-114로 일정한 교반 동안 조정한다. 교반을 20분 동안 계속한 다음, 24500xg, 25°C에서 제동 없이 25분 동안 원심분리한다(온도 유도된 Triton X-114 상 분배). 황색 상부 상 및 청정한 하부 상의 2개 상이 형성된다. 수집된 사이토크롬 P450_{OX} 활성의 대부분을 함유하는 하부 상을 완충액 C를 사용하여 약 350ml로 2.5배 희석시키고 유속 70ml/h로 완충액 C에 평형화된 시바크론 블루 3GA-아가로스의 1.9x5cm에 적용시킨다. 칼럼을 완충액 C 50ml로 세척하고 보유된 사이토크롬 P450_{OX} 을 완충액 C 중의 약 60ml 0-1.5M KCl 선형 구배로 용출시킨다. SDS-PAGE에 의해 50-60kDa 영역에서의 단일 폴리펩타이드 밴드의 존재를 나타내는 분획을 합하고 질소하에 24시간 동안 8.9% 글리세롤, 10mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.9), 5mM EDTA, 2mM DTT(투석 완충액)의 1ℓ에 대하여 투석하여 염 및 세제 함량을 감소시킨다. 효소 제제를 액체 질소내에서 동결시킨 다음 -80°C에서 저장한다.

실시예 4: 수수 마이크로솜으로부터 분리시켜 수득된 사이토크롬 P450_{OX} 의 특성화

4.1 분자량 및 아미노산 서열 데이터

SDS-PAGE에 의해 측정된 P450_{OX} 의 분자량은 55kD이다. 시바크론 블루 3GA-아가로스 칼럼으로부터 분리된 P450_{OX} 에 상응하는 단백질 밴드를 8-25% SDS-폴리아크릴아미드 겔로부터 잘라내어 전기용리한다. 전기용리된 단백질을 프로테아제와 단백질간에 약 1:100 중량비를 사용하여 제조업자(Boehringer Mannheim)에 따라 엔도프로테아제 Glu-C(프로테아제 V8 서열화 등급, 18시간, 23°C)로 분해시킨다. 전기용리된 단백질 및 분해된 단백질 샘플을 SDS-PAGE에 적용시키고, 단백질 및 단백을 ProBlott 막(Applied Biosystems)으로 전이시킨다. 막의 쿠마시 염색된 영역을 잘라내어 온-라인 모델 120A 페닐티오하이드란토인 아미노산 분석기가 장착된 Applied Biosystems 모델 470A 서열화기 상에서 N-말단 아미노산 서열화시킨다.

N-말단 아미노산 서열화에 의해, 상대적인 풍부도의 차이로 인해 독립적으로 해독될 수 있는 2개의 서열이 생성된다. 데이터베이스 탐색(BLAST)으로 서열 -GLVKEGVDMEEGTL이 단지 단일 위치에서 MGLVKEGADMEEGTL(수탁 번호

L11862)인 보리(호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*))의 액포 ATPase의 B 유니트의 N-말단 서열과 상이하다는 것을 알 수 있다. 보리 B 서브유니트의 예상 분자 질량은 54kDa(20)이다. P450_{OX} 제제내의 오염물로서의 액포 ATPase의 B 서브 유니트의 존재를 해본 스체 박사(Dr. Heven Sze)에 의해 제공된 귀리 뿌리로부터의 액포 ATPase의 B 서브유니트에 대해 발생한 모노클로날 항체를 사용할 경우 55kDa에서 단일 밴드를 나타내는 웨스턴 블롯팅에 의해 추가로 실증한다. B 서브 유니트는 항체 피복된 미세역가 웰 상에서의 고정화에 의해 P450_{OX} 제제로부터 제거할 수 있다. 상기 접근법은 - ATTATPQLLGGSVPEQ로서의 P450_{OX}의 N-말단 아미노산 서열의 명백한 측정을 가능하게 하고 또한 특정한 내부 P450_{OX} 펩타이드 단편의 서열, MDRLVADLDRAAA를 제공한다. 액포 ATPase의 B 서브유니트의 잔류량을 제거하고자 하는 시도는 420nm 성분이 P450_{OX}의 불활성의 변성된 P420 형태가 매우 증가되고 수득된 분획에서 P450_{OX} 활성을 재구성하는 능력이 손실되거나 상당히 감소됨을 나타내는 일산화탄소 시차 스펙트럼의 형성을 유도한다. 이는 P450_{OX}의 내재 적 불안정성을 반영한다. 액포 ATPase의 B 서브유니트는 P450_{OX}와 관련된 이의 촉매 특성을 갖는 것으로 예상되지 않는다. 따라서, 오염물로서의 B 서브유니트의 존재는 아래에 보고된 P450_{OX}의 대사 연구에서 용인된다.

N-말단 서열:

--ATTATPQLLGGSVPEQ--(서열 3)

내부 서열:

--MDRLVADLDRAAA--(서열 4)

4.2. NADPH-P450 옥시도리덕타제의 분리

NADPH-P450 옥시도리덕타제는 DEAE-Sepharose FF/S-100-Sepharose 칼럼에 결합하고 0.5M KCl을 함유하는 완충액 A를 증가시킴으로써 용출시킨다. 상기 리덕타제를 후속적으로 상기한 바와 같이[참고 문헌: Halkier and Moller, Plant Physiol. 96:10-17, 1990] 2',5'-ADP-Sepharose 4B(Pharmacia)의 칼럼 상에서 균질하게 정제하고 약 15유니트/ml로 농축시킨다.

4.3. 가용성 UDPG 글루코실트랜스퍼라제의 제조

글루코실트랜스퍼라제를 마이크로솜의 제조 동안 수득된 원심분리 상청액의 암모늄 설페이트 분별에 의해 부분적으로 정제한다. 글루코실트랜스퍼라제 분획이 40% 및 60% (NH₄)₂SO₄ 사이에 침전되면 50mM Tricin(pH 7.9), 2mM DTT의 5ml에 용해시키고 동일한 완충액 2ℓ에 대해 밤새 투석한다.

4.4. 사이토크롬 P450_{OX} 활성의 재구성

마이크로솜 사이토크롬 P450의 효소 활성의 재구성은 사이토크롬 P450 효소 및 상응하는 NADPH 사이토크롬 P450 옥시도리덕타제를 지질 미셀에 삽입함으로써 달성한다. 지질의 혼합물을 사용할 수 있으나, 사이토크롬 P450_{OX}의 경우, 디라우로일포스파티딜콜린(DLPC)이 최상의 효소 활성을 제공한다. 사이토크롬 P450_{OX} 및 NADPH 사이토크롬 P450 옥시도리덕타제의 정확하게 형성된 복합체의 수는 속도 제한 인자이다. 과량의 옥시도리덕타제 및 농축된 효소 용액을 사용하여 충분한 수의 활성 복합체를 확보한다.

다음 성분을 사용하여 기능적으로 재구성된 효소를 수득한다:

사이토크롬 P450_{OX}: 투석 완충액 중의 20μg/ml

소르굼 비콜로르로부터 정제된 NADPH 50mM 인산칼륨 완충액(pH 7.9) 중의

사이토크롬 P450 옥시도리덕타제: 100μg/ml

지질: 50mM Tricine(pH 7.9) 중의 초음파처리된

10mg/ml 디라우로일포스파티딜콜린

NADPH: H₂O 중의 25mg/ml

재구성된 P450_{TYR}을 사용하여 [U-¹⁴C]- 0.01μCi/μl, 394mCi/mmol

L-티로신으로부터 효소에 의해 생성

시킴고 HPLC 상에서 정제한 ¹⁴C-옥심

5μl 지질 현탁액을 에펜도르프 튜브내에서 NADPH 사이토크롬 P450 옥시도리덕타제(0.075 유닛) 5μl, 사이토크롬 P450_{OX} 용액(약 0.4pmol) 10μl, 및 ¹⁴C-옥심(0.014μCi/μl, 394mCi/mmol) 0.5μl와 혼합한다. 50mM Tricine(pH 7.9)을 사용하여 최종 용적을 30μl로 조정하고 효소 반응을 NADPH 용액 1μl의 첨가에 의해 개시한다. 반응 혼합물로부터 NADPH 사이토크롬 P450 옥시도리덕타제 또는 NADPH를 제거함으로써 대조군 샘플을 제조한다. 튜브를 30℃에서 1시간 동안 일정하고 온화한 교반하에 배양한다. 배양 후, 반응 혼합물을 실리카 피복된 TLC 시트(Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)에 적용시킨 다음, 에틸 아세테이트/톨루엔(1:5 v/v) 혼합물을 이동 상으로 사용하여 전개시킨다. 상기 시트를 저장 인 스크린(storage phosphor screen) 상에 밤새 정치시키고 STORM 840 포스포리미저(phosphorimager)(구입원: Molecular Dynamics)를 사용하여 생성된 생성물, p-하이드록시 페닐아세트아세트알데히드 및 p-하이드록시벤즈알데히드를 가시화시킨다.

지질 미셀내로 재구성시킬 경우, 사이토크롬 P450_{OX}는 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심의 p-하이드록시벤즈알데히드 및 HCN으로 분해되는 p-하이드록시만델로니트릴로의 전환을 촉매한다. 이는 사이토크롬 P450_{OX}이 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심의 p-하이드록시페닐아세트아세트알데히드로의 전환, 및 p-하이드록시페닐아세트아세트알데히드의 p-하이드록시만델로니트릴로의 전환을 둘다 촉매하는 다기능성 단백질임을 입증한다. P450_{OX} 활성은 엄격하게 NADPH-P450 옥시도리덕타제 및 NADPH의 존재에 의존한다. 나트륨 디티오나이트(10mM)는 p-하이드록시페닐아세트알데히드의 대사를 원조하지 않는다. 재구성 전의 효소 투석의 생략은 p-하이드록시벤즈알데히드와 비교하여 p-하이드록시페닐아세트아세트알데히드의 축적의 상대적 증가를 유발한다.

4.5. 모체 아미노산 티로신으로부터의 듀린 합성의 완전한 경로의 실험관내에서의 재구성

완전한 반응 혼합물은 다음 성분을 함유한다: 분리된 재조합 P450_{TYR} 3μl[6pmol, 이. 콜라이내에서 이중적으로 발현시키고 문헌(참조: Halkier et al., Arch. Biochem. Biophys. 322:369-377, 1995)에서와 같이 분리함], 분리되고 투석된 P450_{OX}(약 0.4pmol) 10μl, NADPH-P450 옥시도리덕타제(0.075U) 5μl, 수수로부터의 부분적으로 정제된 UDPG 글루코실트랜스퍼라제 1μl, DLPC(50mM K_p(pH 7) 중의 10mg/ml) 5μl, [U-¹⁴C]-티로신(0.05μCi/μl, 443mCi/mmol, Amersham) 0.25μl, UDPG(50mM K_p(pH 7) 중의 33mg/ml) 3μl, 및 카스타노스페르민(50mM K_p(pH 7) 중의 2mM) 3μl. 상기 성분들을 반복된 현탁에 의해 혼합하고, 필요한 경우, 최종 용적을 50mM K_p(pH 7)의 사용에 의해 30μl로 조정한다. 효소 반응은 NADPH(25mg/ml) 1μl로 개시한다.

또한, 듀린은 P450_{OX}의 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심을 사용한 재구성을 통해 합성한다(반응 혼합물로부터 P450_{TYR} 및 티로신은 생략하고 추가의 성분은 변화없음). 상기 검정은 [U-¹⁴C]-p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심(0.014μCi/μl, 394mCi/mmol) 0.5μl 또는 미표지된 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심(20mM) 3μl를 P450_{OX}에 대한 기질로서 함유한다. 후자의 경우, 방사능 표지는 [U-¹⁴C]-UDPG(0.025μCi/μl, 287mCi/mmol, Amersham) 1μl이다. 모든 반응 혼합물은 2개씩 제조한다. 30℃에서 1시간 동안 배양시킨 후, 반응 혼합물의 각각의 세트를 TLC 시트에 적용시킨다. 반응 혼합물의 제1 세트를 에틸 아세테이트/톨루엔 용매를 사용하여 실시예 4.5에서와 같이 분석한다. 티로신으로부터 및 소수성 중간체로부터 친수성 생성물 듀린을 분리하기 위해, 반응 혼합물의 제2 세트를 에틸 아세테이트/아세톤/디클로로메탄/메탄올/물(20/15/6/5/4, v/v/v/v/v)로 이루어진 용매 시스템을 사용하여 분석한다. STORM 840 포스포리미저를 사용하여 방사선표지된 기질 및 생성물을 가시화시킨다.

방사선표지된 티로신을 기질로서 사용하는 재구성 실험에서의 $P450_{TYR}$ 및 $P450_{OX}$ 의 혼합 사용은 p-하이드록시페닐아세트 니트릴 및 p-하이드록시벤즈알데히드의 생성을 유발한다. 이는 $P450_{TYR}$ 및 $P450_{OX}$ 이 실험관내에서 함께 작용할 수 있다는 것을 입증한다. 따라서, $P450_{TYR}$ 에 의해 생성된 p-하이드록시페닐아세트알독심은 $P450_{OX}$ 에 의하여 기질로서 유효하게 사용된다. NADPH- $P450$ 옥시도리덕타제의 부재 또는 NADPH의 부재하에서는 활성이 전혀 관찰되지 않는다.

p-하이드록시페닐아세트알독심을 기질로서 사용한 듀린의 실험관내 생성은 NADPH 및 UDPG의 존재하에 부분적으로 정제된 가용성 UDPG 글루코실트랜스퍼라제와 함께 $P450_{OX}$ 의 재구성에 의해 달성한다. p-하이드록시만델로니트릴을 기질로서 특이적으로 사용하는, UDPG 글루코실트랜스퍼라제를 암호화하는 수수로부터의 cDNA 클론은 입수가가능하지 않다. 따라서, 본 연구에서는 수수로부터의 가용성 UDPG 글루코실트랜스퍼라제의 조 추출물을 사용하여 p-하이드록시만델로니트릴을 글루코실화시키고 완전한 듀린 생합성 경로의 실험관내 재구성을 입증한다. 적용시킨 방사선표지된 p-하이드록시페닐아세트알독심을 완전히 대사시킨다. 카스타노스페르민을 가하여 UDPG 글루코실트랜스퍼라제 제제내에 존재하는 글루코시다제 활성을 억제한다. 소수성 화합물의 분리를 위해 위에서 사용한 TLC 시스템 이외에, 추가의 TLC 시스템을 듀린과 같은 친수성 화합물의 분리를 위해 도입한다. 정격 듀린과 공동 이동하는 방사선표지된 화합물의 형성에 의해 입증되는 바와 같이 재구성 검정에서 형성된 p-하이드록시만델로니트릴은 부분적으로 듀린으로 전환된다. 실험을 방사선표지된 p-하이드록시페닐아세트알독심 대신에 방사선표지된 UDPG를 사용하여 반복할 경우, 상기 방사선표지된 화합물의 듀린으로서의 선정은 카스타노스페르민의 부재하에서의 이의 분해에 의해, 및 공동 이동성 방사선표지된 생성물의 형성에 의해 추가로 실증된다. 방사선표지된 UDPG는 비특이적으로 비교적 친수성인 화합물의 범위를 표지한다. p-하이드록시만델로니트릴의 불안정성으로 인해 이의 듀린으로의 전환은 p-하이드록시벤즈알데히드의 소실로서 실험적으로 검출된다. 방사선표지된 p-하이드록시페닐아세트알독심을 기질로서 사용할 경우, 듀린 이외에 다수의 미확인된, 소수성, 방사선표지된 화합물이 생성된다. 상기 화합물의 형성은 UDPG의 부재하에 발생하나 가용성 추출물의 존재를 필요로 하며, 이는 UDPG 글루코실트랜스퍼라제 추출물이 추가의 효소 활성을 갖는다는 것을 지시한다. p-하이드록시만델로니트릴의 페놀 그룹의 글루코실화는 p-글루코피라노실옥시만델로니트릴의 형성을 유발할 수 있다. 정격 표준의 p-글루코피라노실옥시만델로니트릴과 공동 이동하는 방사선표지된 생성물은 전혀 관찰되지 않는다. UDPG 글루코실트랜스퍼라제 추출물에 존재하는 글루코시다제 활성은 카스타노스페르민에 의해 유효하게 억제된다.

실험관내에서의 재구성시, $P450_{TYR}$ (CYP79)의 전환수는 230min^{-1} 이다[참고 문헌: Sibbesen et al., J. Biol. Chem. 270: 3506-3511, 1995]. $P450_{OX}$ 의 이의 변성된 P420 형태로의 부분 전환은 이의 전환수의 측정을 방해한다. 마이크로솜 시스템을 사용한, 티로신, p-하이드록시페닐아세트알독심 및 p-하이드록시페닐아세트 니트릴로부터의 p-하이드록시만델로니트릴 생성에 대한 K_m 및 V_{max} 값은 각각 0.03, 0.05 및 0.10mM, 및 145, 400 및 50nmole mg 단백질 $^{-1}\text{h}^{-1}$ 이다[참고 문헌: Moller et al., J. Biol. Chem. 254: 8575-8583, 1979].

모체 아미노산 티로신으로부터 출발하는 완전한 듀린 생합성 경로는 DLPC 미셀내의 $P450_{TYR}$, $P450_{OX}$, NADPH- $P450$ 옥시도리덕타제를 UDPG 글루코실트랜스퍼라제, 티로신, NADPH, UDPG 및 카스타노스페르민과 혼합함으로써 실험관내에서 재구성한다. 티로신은 $P450_{TYR}$ 에 의해 p-하이드록시페닐아세트알독심으로 전환되고, 이는 추가로 $P450_{OX}$ 에 의해 p-하이드록시페닐아세트 니트릴 및 p-하이드록시벤즈알데히드로 전환된다. 얼마간의 p-하이드록시페닐아세트 니트릴은 축적되는 반면, 형성된 모든 p-하이드록시만델로니트릴은 듀린 및 일부 미확인된 화합물로 전환된다. 상기 실험 세트에서, $P450_{TYR}$ 과 $P450_{OX}$ 간의 화학량론적 비는 약 15이다. 따라서, 재구성 검정에서 p-하이드록시페닐아세트알독심의 축적을 검출하는 것은 놀랍지 않다. 수수 마이크로솜을 사용한 이전의 실험은 p-하이드록시페닐아세트 니트릴이 축적되고 트랩된다는 것이 어렵다는 것을 제시하였기 때문에 관찰된 p-하이드록시페닐아세트 니트릴의 축적은 예상외다. 분리된 $P450_{OX}$ 의 부분 변성 또는 불활성화는 p-하이드록시페닐아세트 니트릴이 분리된 $P450_{OX}$ 를 사용하는 재구성 실험에서 축적되는 이유를 설명할 수 있다.

4.6. 기질 결합

p-하이드록시페닐아세트알독심을 중간체로서의 p-하이드록시페닐아세트 니트릴과 함께 p-하이드록시만델로니트릴로 전환시키는 다기능성 효소로서 $P450_{OX}$ 를 동정한 것으로 본 발명자들은 자극되어 $P450_{OX}$ 의 기질 결합 능력을 조사하였다. 381nm에서의 흡광도 최소치 및 418nm에서의 흡광도 최대치를 갖는 역 I형 스펙트럼은 기질 첨가시 높은 스핀 상태에

서 낮은 스핀 상태로의 이동을 시사하는 p-하이드록시페닐아세트알독심을 사용하여 수득한다. 진폭은 항온처리시 크기가 증가하고 약 45분 후에 안전한 최대치에 이른다. p-하이드록시페닐아세트니트릴의 첨가시 기질 결합 스펙트럼은 전혀 수득되지 않는다.

P450_{OX}는 수수로부터 분리된 다른 P450 효소와 비교하여 매우 불안정한 것으로 밝혀졌다. 분리된 P450_{OX}는 p-하이드록시페닐아세트알독심과 함께 항온처리시 역 I형 기질 결합 스펙트럼을 생성시킨다. 특정 스핀 상태에서부터 다른 스핀 상태로의 완전한 전이에 해당하는 흡광 계수 $E_{420-390}$ 은 $130\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이다. 수득된 기질 결합 스펙트럼에서, 최대 진폭은 높은 스핀 상태에서부터 낮은 스핀 상태로의 완전한 이동을 가정할 경우에 이론적으로 계산되는 것의 약 2배이다. 이러한 모순은 P450_{OX} 농도가 일산화탄소 결합 스펙트럼내의 450nm로부터 정량화할 경우 과소평가됨을 지시한다. 또한, P450_{OX}의 P420 형태는 옥심에 결합하여, 형성된 기질 결합 스펙트럼의 크기에 기여할 수 있다. 후자의 가능성은 최대 진폭이 장기 항온처리 후에만 수득되는 이유를 설명할 수 있다.

알독심의 니트릴로의 P450 매개된 탈수화는 간 마이크로솜을 사용하여 이미 보고되어 있다[참고 문헌: DeMaster et al., J. Org. Chem. 5074-5075, 1992]. 간 마이크로솜 시스템과 P450_{OX}간의 주요한 차이점은 전자는 엄격한 혐기성 조건을 필요로 하는 반면, 후자는 후속적인 C-하이드록실화 반응을 호기적으로 처리하고, 촉매하고, (E)- 뿐만 아니라 (Z)-이성체를 대사시킨다는 점이다. 혐기성 조건하에, 간 마이크로솜을 사용하여 약한 I형 스펙트럼을 수득한다. NADPH 또는 디티오나이트의 첨가시, 442-444nm에서 두드러진 소렛(Soret) 피크가 형성된다. 이는 Fe(II) 상태에서의 P450의 주요 활성 종을 나타내는 것으로 판단된다. 혐기성 조건하에서의 P450_{OX}의 스펙트럼 조사는 442nm 흡수 복합체의 형성을 나타내지 않으나, NADPH의 존재는 P450_{OX}가 또한 탈수화 반응을 중재하기 위해 Fe(II) 상태에서 존재할 필요가 있음을 나타내는 촉매 활성화에 필요하다.

실시예 5: A형 사이토크롬 P450 프로브 생성

PCR을 A형 사이토크롬 P450에 대해 우선적으로 선택된 프라이머를 함유하는 고도로 축퇴된 이노신(I)을 사용하여 소르굽 비콜로르(L.) 모엔크의 1-2cm의 황화된 실험물로부터 제조된 단향성 플라스미드 cDNA 라이브러리로부터 분리된 플라스미드 DNA(Invitrogen) 상에서 수행한다[참고 문헌: Nelson and Durst, Drug Metabolism and Drug Interactions 12: 189-206(1995)]. 서열 5'-GCGGAATTCTTYYIIICNGARMGNTT-3'(서열 5)를 갖는 프라이머 1(센스 쇠)은 X가 특정 아미노산인 콘센서스 아미노산 서열 FXPERF(서열 6)를 포함한다. 서열 5'-GCGGATCCIIIRCAIIINCKNCKNCC-3'(서열 7)를 갖는 프라이머 2(안티센스 쇠)는 콘센서스 아미노산 서열 GRRXCXG(서열 8)를 포함한다. 프라이머 1 및 프라이머 2는 미부에 EcoII 및 BamHI 부위를 각각 연결하여 두 프라이머로부터 생성된 PCR 생성물만이 EcoRI/BamHI 분해된 pBluscript II SK(Stratagene)내에서 클로닝된다는 것을 보증한다. PCR을 연속적인 2 라운드로 수행한다. 프라이머 1 및 표준 T7 5'-AATACGACTCACTATAG-3'(서열 9)를 사용하는 라운드 2는 A형 사이토크롬 P450을 암호화하는 cDNA의 풀을 풍부하게 한다. 프라이머 1 및 프라이머 2를 포함하는 라운드 2는 A형 사이토크롬 P450에 특이적인 약 100bp의 특정 밴드를 우세하게 생성시킨다. 라운드 1에 대한 PCR 반응은 완충액 중의 5% DMSO, 200μM dNTP, 200pmol 프라이머 1, 표준 T7 프라이머 100pmol, 2.5유닛 Taq DNA 폴리머라제 및 cDNA 라이브러리로부터 100배 희석된 플라스미드 DNA 1μl를 함유하는 전체 용적 100μl내에서 수행한다. 라운드 2에 대한 PCR 반응은 완충액 중의 5% DMSO, 200μM dNTP, 200pmol 프라이머 1 및 프라이머 2, 2.5유닛 Taq DNA 폴리머라제 및 PCR 라운드 1로부터 수득된 생성물 1μl를 함유하는 전체 용적 100μl내에서 수행한다. PCR의 두 라운드의 경우, 95℃에서 5분의 1주기 다음에 95℃에서 30초, 50℃에서 1분, 및 72℃에서 30초의 35주기가 잇따른다. PCR 라운드 2의 약 100bp 생성물을 2% 아가로스 겔로부터 잘라내어 pBluscript로 클로닝시키기 전에 재증폭시킨다. 서열화된 19개의 클론 중, 10개는 아미노산 수준에서 신남산 하이드록실라제(CYP74)와 매우 높은 서열 동일성을 가지므로, 추가로 연구하지 않는다. 나머지 9개 서열의 서열 비교는 이들을 8개 및 1개 서열의 2개 그룹으로 나누어 "12" 및 "7"로 각각 표시한다. 둘다 BamHI를 미부에 연결한, 서열 "12" 유전자 특이적인, 프라이머 1과 프라이머 2 사이에 위치한 프라이머: 5'-GCGGATCCGACTACTACGGCTCGC-3'(서열 10) 및 프라이머 5'-GCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'(서열 11)를 사용하여 PCR 라운드 1로부터의 약 500bp의 "12" 유전자 특이적 단편을 증폭시키고 pBluscript로 클로닝시킨다. 유사하게 "7"에 대한 유전자 특이적 단편을 "7" 유전자 특이적 프라이머 5'-GCGGATCCGACATCAAGGGCAGCG-3'(서열 12) 및 프라이머 5'-GCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'(서열 11)를 사용하여 수득한다. 삽입물을 제조업자 지시에 따라 표준 T7 및 T3 프라이머를 사용하는 PCR 증폭에 의해 Digoxigenin-11-dUTP(Boehringer Mannheim)로 표지하여 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는데 사용한다.

실시예 6: 라이브러리 스크리닝 및 DNA 서열화

모든 필터 하이브리드화는 DIG 시스템(Boehringer Mannheim)을 사용하여 수행한다. 콜로니 리프트를 나일론 막(Boehringer Mannheim)을 사용하여 제조하고 5xSSC, 0.1% N-라우로일사르코신, 0.02% SDS, 1% 블로킹 제제(Boehringer Mannheim) 중에서 밤새 68°C에서 하이브리드화시킨다. 검출 전에 필터를 0.1xSSC, 0.1% SDS로 15분 동안 65°C에서 2회 세척한다. 완전한 길이의 클론을 서열 분석에 의해 증명된 바와 같은 "12" 및 "7" 둘다에 대해 수득한다. 써모 시퀀스 플루오레센트 라벨드 프라이머 사이클 시퀀싱 키트(Thermo Sequence Fluorescent labelled Primer cycle sequencing kit)(7-deaza dGTP)(Amersham)를 사용하여 서열화를 수행하고 ALF-Express(Pharmacia) 상에서 분석한다. 서열 컴퓨터 분석은 GCG Wisconsin Sequence Analysis Package 중의 프로그램을 사용하여 수행한다. P450_{OX}의 완전한 길이의 cDNA 서열 및 "12"의 뉴클레오타이드 서열화로부터 수득된 바와 같은 암호화 영역의 유도된 아미노산 서열은 서열 1 및 서열 2로 각각 제시한다.

실시예 7: 이. 콜라이내에서의 발현

발현 벡터 pSP19g10L[참고 문헌: Barnes, Methods in Enzymology 272: 3-14, 1996]을 헨리 바르네스 박사(Dr. Henry Barnes)(Synthetic Genetics/Immune Complex Incorporation, San Diego, CA)로부터 구입한다. 상기 플라스미드는 각종 이중성 단백질의 발현에 우수한 리더 서열로서 문헌[참조: Olin et al., 1988]에서 입증된 T₇ 박테리오파지, g10L로부터의 유전자 10의 짧은 리더 서열에 융합된 lacZ 프로모터를 함유한다. "7" 및 "12"는 Pwo-폴리머라제(Boehringer Mannheim)를 함유하는 PCR에 의해 변형시켜 개시 코돈에서 NdeI 부위를 도입하고 종결 코돈을 HindIII 부위에 바로 이은 ochre 종결 코돈으로 변화시킨다. "7"에 대한 발현 코돈의 생성의 경우, 프라이머 3(센스 채) 5'-CGCGGATCCATATGGACGCATCATTACTCCTCTCCGTCGCGCTC-3'(서열 13) 및 프라이머 4(안티센스 채) 5'-CGCAAGCTTATTACATCTCAACGGGGACCCT-3'(서열 14)를 사용한다. 프라이머 3은 사일런트 변이를 코돈 3, 4 및 5에 도입하여 NdeI 부위의 상부에 인접하여 전이 개시 부위 및 BamHI 부위 주변의 G/C 함량을 감소시킨다. 수득된 PCR 단편을 BamHI 및 HindIII로 분해하고 BamHI 및 HindIII 분해된 pBluescript로 연결시키고 서열화에 의해 조절하여 PCR 오차를 배제한다. 유사하게 "12"를 프라이머 5(센스 채) 5'-CGCGGATCCATATGGCAACAACAGCAACCCCGCAGCTCCTC-3'(서열 15) 및 프라이머 6(안티센스 채) 5'-CGCAAGCTTATTATGCTGCGCGCGGTTCTTGTATTTGG-3'(서열 16)를 사용하여 pBluescript로 도입한다. 프라이머 5는 사일런트 변이를 코돈 2, 3, 4 및 5에 도입하고 프라이머 6은 사일런트 변이를 마지막 2개 코돈에 도입하여 G/C 함량을 감소시킨다. 삽입물을 NdeI 및 HindIII를 사용하여 잘라내어 NdeI 및 HindIII 분해된 pSP19g10L에 연결시킨다. 발현 플라스미드를 이. 콜라이 JM109 세포내로 형질전환시킨다. 단일 콜로니를 100mg 암피실린/ml를 함유하는 LB 배지내에서 37°C에서 성장시키고, 밤새 배양시킨 배양물 5ml를 사용하여 50mg/ml 암피실린, 1mM 티아민, 1mM 이소프로필-β-티오갈락토피라노사이드 및 1mM δ-아미노레불린산을 함유하는 TB 배지 500ml에 접종시킨다. 세포를 125rpm에서 48 시간 동안 28°C에서 증식시킨다. "7", "12" 및 pSP19g10L의 발현 작제물로 형질전환된 이. 콜라이 1ml를 원심분리(2000g, 10분)에 의해 펠릿화시키고, 세척하고 50mM Tricine(pH 7.9)내에서 10배 농축시키고 394mCi/mmol의 특정 활성을 갖는 14nCi[U-¹⁴C] p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심과 함께 배양한다. 배양 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고, TLC 플레이트(Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)에 적용시켜, 에틸 아세테이트/톨루엔(1:5 v/v) 혼합물을 고정 상으로서 사용하여 전개시키고, STORM 840(구입원: Molecular Dynamics)을 사용하여 가시화시킨다. "12"를 발현시키는 작제물로 형질전환된 이. 콜라이는 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심을 p-하이드로시페닐아세토니트릴로 전환시킬 수 있다.

P450_{OX}를 발현하는 이. 콜라이의 가용화된 스펙트로블라스트의 CO 시차 스펙트럼은 417nm에서 메이저 피크 및 457nm에서 마이너 피크를 함유한다. 일반적으로, 420nm 근처에 흡광 피크를 갖는 CO 스펙트럼은 비기능성 배좌의 사이토크롬 P450를 지시한다[참고 문헌: Imai et al., Eur. J. Biochem. 1: 419-426, 1964]. 417nm에서의 메이저 피크의 존재는 대부분의 발현된 사이토크롬 P450이 비기능성 배좌로 존재한다는 것을 암시한다. 450nm로부터 457nm로의 흡광 피크의 명백한 이동은 비-배좌 상태로 다량의 사이토크롬 P450이 존재하는 것에 기인할 수 있다. 457nm에서의 피크를 기초로 하여, 생산율은 65시간당 이. 콜라이 배양물 리터당 p450_{OX} 50nmol로 추정된다.

"12"를 발현시키는 이. 콜라이로부터 문헌[참조: Halkier et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 322: 369-377, 1995]에 기술된 바와 같이 분리한 5μl 막을 30mM Tricine(pH 7.9)의 전체 용적 100μl 중의 0.225유니트 NADPH-사이토크롬 P450-리덕타제, 50μg NADPH, 42nCi p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심 및 100μg 디라우렐 포스파티딜콜린으로 재구성한다. 30°C에서의 30분 동안의 배양 후, 반응 혼합물을 TLC 플레이트에 적용시키고 상기한 바와 같이 분석한다. "12"를 발현시키는 이. 콜라이로부터의 막의 재구성은 시안생성성 글리코사이드 듀린의 생합성에서의 마지막 중간체인 p-하이드록시만델로니트릴의 안정한 분해 생성물인 p-하이드록시벤즈알데히드의 축적을 유발한다. 이

는 "12"가 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심의 p-하이드록시만델로니트릴로의 전환을 촉매하는 사이토크롬 P450임을 입증한다. cDNA는 P450_{OX}로 명명한다. 상기한 P450_{OX}의 cDNA를 포함하는 클론은 1997년 1월 10일에 데-381244 브라운슈바이그 마쉴로더 백 1배 소재의 DSMZ-도이체 잠룻 폰 미크로오르가니스멘 운트 첼쿨투렌 게엠베하에 수탁 번호 DSM 11367로 기탁되었다.

방사능으로 표지된 p-하이드록시페닐아세트알독심을 P450_{OX}로 형질전환된 이. 콜라이 세포에 투여할 경우, p-하이드록시페닐아세트니트릴은 P450_{OX}를 발현시키는 이. 콜라이 세포내에 축적된다. 내생성 사이토크롬 P450 또는 NADPH-사이토크롬 P450-리덕타제를 함유하지 않는 이. 콜라이는 이중적으로 발현되는 사이토크롬 P450의 촉매 활성을 지지하는 것으로 나타났다. 2종의 가용성 이. 콜라이 황색단백질, 플라보독신 및 NADPH-플라보독신 리덕타제는 재조합 사이토크롬 P450에 환원 당가를 부여한다. 분리된 이. 콜라이 막 또는 정제된 재조합 효소의 수수 NADPH-사이토크롬 P450-리덕타제로의 재구성은 p-하이드록시페닐아세트알독심의 p-하이드록시만델로니트릴로의 전환을 유발하는 반면, P450_{OX}를 발현시키는 이. 콜라이 세포는 p-하이드록시페닐아세트알독심을 p-하이드록시페닐아세트니트릴로만 대사시킨다. p-하이드록시페닐아세트니트릴의 p-하이드록시만델로니트릴로의 전환을 지지하는 이. 콜라이 무능의 첫번째 예로서는 이. 콜라이 플라보독신/NADPH-플라보독신 리덕타제 시스템이 마이크로솜 사이토크롬 P450 반응의 촉매 활성을 지지할 수 없다는 것이다. P450_{OX}를 발현시키는 이. 콜라이 세포의 막 및 가용성 분획을 사용한 예비 재구성 실험으로 가용성 플라보독신/NADPH-플라보독신 리덕타제 시스템은 p-하이드록시페닐아세트알독심의 p-하이드록시페닐아세트니트릴로의 전환에 서만 P450_{OX}를 지지하며, 후속적인 하이드록실화 반응을 방해하는 억제 인자는 가용성 분획에 존재하지 않는다는 것을 알 수 있다. 완전한 P450_{OX} 활성을 지지하는 이. 콜라이의 무능은 P450_{OX}의 부정형 촉매 반응성을 반영하는 것일 수 있다. P450_{OX} 또는 발현 벡터로 형질전환된 이. 콜라이내에서 p-하이드록시페닐아세트알독심보다 약간 낮은 이동성을 갖는 화합물은 축적된다. 이는 이. 콜라이가 P450_{OX}의 존재와는 독립적으로 p-하이드록시페닐아세트알독심을 대사시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 8: 재조합 P450_{OX}(CYP71E1)의 정제

P450_{OX}를 발현시키는 이. 콜라이 2ℓ로부터의 스페로블라스트를 상기한 바와 같이 1% Triton X-114를 사용하여 온도 유도된 상 분배에 적용시킨다[참고 문헌: Halkier et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 322: 369-377, 1995]. P450_{OX} 함유 상부 상을 10mM KP_i pH 7.0, 0.05% 환원된 Triton X-100, 1mM DTT, 0.5mM PMSF로 100배 희석시키고, 아세트산을 사용하여 pH를 7.0으로 조정하고 완충액 D(10mM KP_i pH 7.0, 0.2% Triton X-114, 0.05% 환원된 Triton X-100, 10% 글리세롤, 1mM DTT, 0.5% PMSF)내에 평형화시킨 16ml 급속 유출 CM-Sepharose 칼럼(Pharmacia)에 적용시킨다. 합한 P450_{OX} 함유 분획(43ml)은 재구성 실험에 사용하고 전기용리된 재조합 P450_{OX}는 닭에 서의 항체 생성에 사용한다.

DLPC내에서 NADPH-사이토크롬 P450-리덕타제로 재구성된 정제된 재조합 P450_{OX}는 식물 효소의 정제에 대한 실시예 4 부분 4.2에 기술한 바와 같이 NADPH의 존재하에 p-하이드록시페닐아세트알데히드 옥심의 p-하이드록시만델로니트릴로의 전환을 촉매한다.

실시예 9: 형질전환 아라비도시스(Arabidopsis) 및 담배내에서의 듀린의 발현

9.1 벡터 플라스미드의 작제

아그로박테륨 투메파시엔스 매개된 형질전환을 위한 3종의 2원 벡터, 즉 pPZP111.79, pPZP221.71E1 및 pPZP111.79.71E1을 작제한다.

pPZP111.79의 작제를 위해, P450_{TYR}의 cDNA 클론[참고 문헌: WO 95/16041; Koch et al., Arch Biochem Biophys 323: 177-186, 1995]을 먼저 EcoRI를 사용하여 잘라내어 pRT101[참고 문헌: Kopfer et al., Nucleic Acids Research 15: 5890, 1987]의 EcoRI 부위로 도입하여 cDNA를 35S-프로모터 및 CaMV 폴리아데닐화 시그널 생성 플라스미드 pRT101.79에 기능적으로 결합시킨다. P450_{TYR} cDNA의 도입 전에 pRT101 폴리링커의 일부분을 SacI 및 XbaI로 분해하여 제거한 다음, 클레노우 처리에 의해 수득된 평면-말단화 말단을 재연결시켜, EcoRI 및 XhoI 부위만을 이용가능하게 한다. 35S-프로모터 및 CaMV 폴리아데닐화 시그널을 포함하는 P450_{TYR}을 SphI를 사용하여 pRT101.79로부터 잘라낸

다. 플라스미드 pPZP111.79를 생성시키기 위해, 말단을 클레노우 폴리머라제로 평체-말단화시키고 수득된 단편을 EcoRI 절단 플라스미드 pPZ111(이의 말단은 클레노우 폴리머라제로 평면-말단화시키고 탈인산화시켰다)[참고 문헌: Hajdukiewicz et al., Plant Mol Biol 25: 989-994, 1994]로 연결시킨다.

pPZP221.71E1의 작제를 위해, P450_{OX}의 cDNA 클론을 먼저 KpnI 및 XbaI을 사용하여 잘라내어 pRT101의 KpnI 및 XbaI 부위에 연결시켜 pRT101.71E1을 생성시킨다. 후속적으로 35S-프로모터 및 CaMV 폴리아데닐화 시그날을 포함하는 P450_{OX}를 HindIII를 사용하여 pRT101.71E1로부터 잘라낸 다음 pPZP221[참고 문헌: Hajdukiewicz et al., Plant Mol Biol 25: 989-994, 1994]의 HindIII 부위로 연결시켜, pPZ221.71E1을 생성시킨다.

pPZP111.79.71E1의 작제를 위해, 35S-프로모터 및 CaMV 폴리아데닐화 시그날을 포함하는 P450_{OX}의 cDNA 클론을 HindIII를 사용하여 pRT221.71E1로부터 잘라낸 다음, 클레노우 폴리머라제로 평면-말단화시키고 pPZ111.79의 SmaI 부위로 연결시킨다.

9.2. 아라비돕시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana)의 형질전환

2원체 벡터, pPZP111, pPZP221, pPZP111.79, pPZP221.71E1 및 pPZP111.79.71E1을 문헌[참조: Wenjun and Forde, Nucleic Acids Research 17: 8385, 1989]에 기술된 바와 같이 전기천공에 의해 아그로박테륨 투메파시엔스 균주 C58C1/pGV3850내로 도입한다. 아라비돕시스 탈리아나 생태형 콜롬비아(Colombia)를 문헌[참조: Bechtold et al., Molecular Biology and Genetics 316: 1194-1199, 1993]의 방법에 의해 본질적으로 기술된 바와 같이 진공 침윤에 의해 형질전환시킨다. 형질전환체를 pPZP111 벡터 계열에 대한 가나마이신 50 μ g/ml, 또는 pPZP221 벡터 계열에 대한 겐타마이신 설페이트 200 μ g/ml를 함유하는 MS 플레이트 상에서 선택한다. 발아한지 4 내지 6주 후, 가나마이신 또는 겐타마이신 내성 식물을 토양으로 전이시킨다.

9.3 니코티아나 타바쿰 cv 크한티(Nicotiana tabacum cv Xhanti)의 형질전환

니코티아나 타바쿰 cv 크한티를 pPZP111.79, pPZP221.71E1 또는 pPZP111.79.71E1로 형질전환된 아그로박테륨 투메파시엔스 C58C1/pGV3850을 사용하여 본질적으로 문헌[참조: Svab et al., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor, pp. 55-60, 1995]의 엽반 방법에 의해 형질전환시킨다. 가나마이신 100 μ g/ml를 pPZP111.79 벡터로의 형질전환체의 선택에 사용하고, 겐타마이신 설페이트 100 μ g/ml를 pPZP221.71E1 벡터로의 형질전환체의 선택에 사용하고, G-418 50 μ g/ml를 pPZP111.79.71E1 벡터로의 형질전환체의 선택에 사용한다. 뿌리를 내린 후, 담배 식물을 토양으로 이식하여 온실에서 성장시킨다.

9.4 듀린의 측정

듀린 함량을, 5 내지 10cm의 잎 조직을 동결시키고 β -d-글루코시다제 II형(Sigma) 0.1mg의 첨가 전에 3회 해동시키는 것을 제외하고는 문헌[참조: Halkier et al., Plant Physiol 90: 1552-1559, 1989]에 이미 기술된 분광 광도계 시아나이드 검정을 사용하여 정량화시킨다.

9.5 형질전환 아라비돕시스 탈리아나의 분석

에이. 탈리아나에서 분리된 잎에 (U-14C)-티로신(0.05 μ Ci/ μ l, 443mCi/mmol, Amersham) 2 μ l를 제공하고, 밀봉된 에펜도르프 튜브내의 H₂O 100 μ l 중에 밤새 정치시킨다. 대사산물을 비등하는 90% 메탄올로 5분 동안 추출한 다음, 추출물을 농축시키고 이를 TLC 시트(Silica gel 60 F₂₅₄)에 적용시킨다. 대사산물을 이의 소수성/친수성에 따라 3종의 상이한 용매 시스템에 분리한다. 용매 시스템 에틸 아세테이트/아세톤/디클로로메탄/메탄올/물(20/15/6/5/4, v/v/v/v/v)로 우선적으로 상이한 시안생성성 글리코사이드를 분리한다. 용매 시스템 이소프로판올/에틸 아세테이트/물(7/1/2)로 상이한 글루코시놀레이트를 분리한다. 용매 시스템 톨루엔/에틸 아세테이트(5/1)로 소수성 중간체를 분리한다. 방사선표지된 기질 및 생성물을 STORM 840 포스포리미저(Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 가시화시킨다.

에이. 탈리아나 잎의 메탄올 추출물을 에이. 투메파시엔스 C58C1/pGV3850/pPZP111.79.71E1을 사용하여 P450_{TYR} 및 P450_{OX} 둘다로 형질전환된 식물의 TLC에 의해 분석한 결과 시안생성성 글리코사이드 듀린과 공동 이동하는 신규한 화합물의 존재가 밝혀졌다. 방사선표지된 티로신을 분리된 잎에 공급할 경우 방사선표지는 듀린과 공동 이동하는 밴드내에 함유되어 있는 것으로 나타난다. 형질전환된 식물의 전체 조직의 비색계 시아나이드 검정[참고 문헌: Lambert et al., 1975,

Analytic Chemistry 47, 917-919]에 의한 분석으로 T1 형질전환체는 1 내지 6nmol 시아나이드/mg 새로운 중량을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 비교로, 에이. 투메파시엔스 C58C1/pGV3850/pPZP111을 사용하여 nptII로만 형질전환된 대조군 식물은 1.2 ± 0.35 nmol 시아나이드/mg 새로운 중량의 시아나이드 함량을 나타낸다. 에이. 탈리아나의 야생형 식물은 시안생성성 글리코사이드를 함유하는 것으로 보고된 적이 없으며, 대조군 식물내에서 검출된 시아나이드의 명백한 수준은 티오시아네이트의 존재를 반영하는 것으로 보인다. 티오시아네이트는 글루코시놀레이트의 분해 생성물이며, 비색계 시아나이드 검정에서 양성 반응을 제공하는 것으로 공지되어 있다[참고 문헌: Epstein, 1974, Analytic Chemistry 19, 272-274].

에이. 탈리아나로 예시된 바와 같이 P450_{TYR} 및 P450_{OX} 둘다의 도입의 결과로서 관찰된 다량의 시안생성성 글리코사이드 듀린의 생성은 정확한 위치에서 형성된 p-하이드록시만델로니트릴을 글리코실화시키는 적합한 UDP-글루코실트랜스퍼라제가 존재한다는 것을 입증한다. 글리코실트랜스퍼라제의 입체특이성은 공지되어 있지 않기 때문에, 생성된 시안생성성 글리코사이드는 실제로 듀린의 에피머(거울 상 이성체)인 탁시필린일 수도 있다는 가능성이 존재한다.

P450_{TYR}을 에이. 투메파시엔스 C58C1/pGV3850/pPZP111.79에 의해 에이. 탈리아나로 도입할 경우, 티로신 유도된 글루코시놀레이트 p-하이드록벤질 글루코시놀레이트와 공동 이동하는 화합물이 다량 축적된다. 이는 P450_{TYR}의 도입이 티로신으로부터의 p-하이드록시페닐아세트알독심의 생성을 초래한다는 것을 입증한다. 다음, 티로신 유도 옥심을 글루코시놀레이트 경로에서 효소에 의해 추가로 p-하이드록시벤질 글루코시놀레이트로 대사시킨다. 이는 글루코시놀레이트 경로에서의 옥심의 효소 하부가 측쇄 구조와 관련하여 낮은 기질 특이성을 가지며, 일반적으로 글루코시놀레이트 프로파일은 경로내에서의 첫번째 사이토크롬 P450의 기질 특이성에 의해 측정된다는 것을 강력하게 시사한다.

P450_{OX}의 기질 특이성은 P450_{TYR}의 것보다 협소하지는 않다. P450_{OX}는 페닐알라닌 유도된 옥심, 페닐아세트알독심에 의해 예시된 바와 같이 다른 아미노산 유도된 옥심을 대사시킬 수 있는 반면, P450_{TYR}은 티로신만을 대사시킬 수 있다. P450_{OX}의 글루코시놀레이트 생성 식물로 도입함으로써, 시안생성성 글리코사이드가 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 아미노산 유도된 옥심으로부터 생성된 바와 같이 축적될 것이라고 예상할 수 있다.

P450_{TYR} 및 P450_{OX}는 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 효소 및 전구체와 상호작용하므로, 글루코시놀레이트 프로파일은 변화할 수도 있을 것으로 예상된다.

9.6 형질전환 니코티아나 타바쿰 cv 크한티의 분석

pPZP111.79로 형질전환되고 기능적으로 CYP79를 발현시키는 담배 식물로부터 분리된 마이크로솜은 티로신의 p-하이드록시페닐아세트알독심으로의 형성을 촉매한다. CYP79를 발현시키고 방사능 표지된 티로신을 공급한 분리된 담배 잎으로부터의 메탄올 추출물을 용매 시스템 이소프로판올/에틸 아세테이트/물(7/1/2)을 사용하여 TLC에 의해 분석할 경우 야생형 담배 식물과 비교하여 3개의 추가의 표지된 밴드를 함유한다. 추가의 3개의 밴드는 방사능 표지된 p-하이드록시페닐아세트알독심을 공급한 야생형 담배 식물에서 검출된 표지된 밴드와 함께 TLC 상에서 공동 이동한다. 용매 시스템 톨루엔/에틸 아세테이트(5/1)내에서 분석할 경우, 상기 밴드 중 하나가 객관적인 표준과의 공동 이동에 의해 입증된 바와 같이 p-하이드록시페닐아세트알독심으로 확인된다. 2개의 추가의 밴드의 정체는 아직 밝혀지지 않았으나, 2종의 용매 시스템 내에서의 이의 이동성으로부터 p-하이드록시페닐아세트알독심보다 덜 소수성인 것으로 판명되고, 이들은 아마 p-하이드록시페닐아세트알독심의 글리코실화 유도체일 것이다. CYP79 식물의 분석으로 CYP79가 담배내에서 기능적으로 발현될 수 있으며 몇몇 유리 p-하이드록시페닐아세트알독심이 생성되나, 생성된 대부분의 p-하이드록시페닐아세트알독심이 추가로 식물에 의해 대사된다는 것을 확인한다.

P450_{TYR} 및 P450_{OX} 둘다를 발현시키는 식물은 P450_{TYR}를 발현시키는 식물과 P450_{OX}를 발현시키는 식물과 교배시킴으로써 획득할 수 있다. 또한, P450_{TYR} 또는 P450_{OX}를 발현시키는 식물들, 2개의 사이토크롬 P450 작제물이 2종의 상이한 비배타적 내성 마커, nptII 및 aacCI에 연결된다는 사실을 이용하여 에이. 투메파시엔스 C58C1/pGV3850/pPZP221.71E1 또는 에이. 투메파시엔스 C58C1/pGV3850/pPZP111.79로 재형질전환시킬 수 있다.

실시예 10: 형질전환 옥수수내에서의 듀린의 발현

10.1 벡터 플라스미드의 작제

다음 2개의 벡터, pCIB 9842 및 pCIB 9833을 P450_{TYR} 및 P450_{OX}을 사용한 옥수수의 바이오리스틱(biolistic) 형질 전환을 위해 작제한다

pCIB 9842: WO 95/16041에 기술된 바와 같이 pBluescript II SK의 EcoRI 부위에 클로닝시킨, P450_{TYR}를 암호화하는 cDNA 클론을 사용하여 PCR에 의해 개시 ATG 코돈에 BamHI 부위 및 종결 코돈에 Bgl II 부위를 생성시킨다. P450_{TYR} 유전자를 함유하는 BamHI-Bgl II 단편을, HindIII 부위의 상부의 256개 염기쌍 및 Bgl II 부위의 하부의 778bp를 AflIII/NotI/AscI 부위로 유전자조작되고 EP-A-452269에 기술된 메탈로티오닌(methallothionin)형 프로모터 및 35S 터미네이터를 함유하는 pUC19계 식물 발현 벡터인 BamHI 및 Bgl II 절단 pCIB 9805로 클로닝시킨다.

pCIB 9833: pcDNAII(Invitrogen)의 NotI-BstXI 부위로 클로닝된 실시예의 P450_{OX} cDNA 클론을 사용하여 개시 ATG 코돈에 BamHI 부위를, 종결 코돈에 Bgl II 부위를 생성시킨다. 또한, P450_{OX} 유전자를 함유하는 BamHI-Bgl II 단편을 BamHI 및 Bgl II로 절단된 pCIB 9805로 클로닝시킨다.

10.2 옥수수의 형질전환 방법

근교배된 랭커스트형의 I형 배형성 유합조직 배양[참고 문헌: Green et al., 1983; Wan et al., 1994]을 1.5 내지 2.5mm 길이의 미성숙 배아로부터 개시한다. 수분한지 약 14일 후에 표면-멸균시킨, 온실-생장된 옥수수 알로부터 배를 무균적으로 잘라내어, 2% 수크로스 및 5mg/l 클로르암벤을 함유하는 단칸 유합조직 개시 배지 상에 놓고, 암실에서 배양한다. 약 14일 후에 배형성 반응을 외식편으로부터 제거하고 2% 수크로스 및 0.5ml/l 2,4-d를 함유하는 단칸 유지 배지 상에 놓는다. 매주 신선한 유지 배지로 계대배양한지 4 내지 8주 후, 고품질의 치밀한 배형성 배양물을 수득한다. 활성적으로 성장하고 있는 배형성 유합조직편을 유전자 전달용 표적 조직으로서 선택한다. 유전자 전달 약 4시간 전에 12% 수크로스 함유 유지 배지를 함유하는 표적 플레이트 상에 유합조직편을 플레이팅시킨다. 유합조직편을 표적 플레이트의 중앙으로부터 8 내지 10mm 떨어져 원형으로 배열한다. 플라스미드 DNA를 듀폰 바이오리스틱스(Dupont Biolistics) 매뉴얼에 기술된 바와 같이 금 마이크로캐리어에 부착시킨다. 각각의 플라스미드 2 내지 3 μ g을 각각의 6개의 겹자 마이크로캐리어 제조에 사용한다. 유전자를 PDS-1000He 바이오리스틱스 장치를 사용하여 표적 세포에 전달한다. 바이오리스틱스 장치 상의 세팅은 다음과 같다: 파열 디스크와 매크로캐리어간에 8mm, 매크로캐리어와 차단 스크린간에 10mm 및 차단 스크린과 표적간에 7cm. 각각의 표적 플레이트를 650psi 파열 디스크를 사용하여 파괴한다. 200x200 스테인레스 스틸 메쉬(McMaster-Carr, New Brunswick, NJ)를 차단 스크린과 표적 조직 사이에 위치시킨다. 유전자 전달 후 7일 뒤, 표적 조직편을 고삼투압 배지로부터 100-120mg/l 글루코시놀레이트 암모늄(Basta)을 함유하는 선택 배지로 전이시킨다 모든 아미노산을 선택 배지로부터 제거한다. 고수준 선택 배지 상에서의 5 내지 8주 후, 성장하고 있는 콜로니를 20mg/l Basta를 함유하는 배지로 계대배양한다. 배형성 유합조직을 4 내지 8주 동안 2주마다 계대배양한 다음, 3% 수크로스, 0.25mg/l 안시미돌, 0.5mg/l 키네틴을 함유하고 선택 제제를 전혀 함유하지 않는 개질된 MS 배지로 전이시키고 빛을 비춘다. 안시미돌 및 키네틴을 2주 후에 제거한다. 뿌리를 갖거나 갖지 않는 재생 발아를 3% 수크로스 함유 MS 배지를 함유하는 마젠타(Magenta) 박스로 전이시키고 뿌리를 갖는 소형 식물을 마지막으로 회수하고 온실내의 토양으로 전이시킨다.

실시예 11: 종을 함유하는 글루코시놀레이트내의 P450_{TYR} 상동체의 PCR에 의한 동정

아라비돕시스 P450_{TYR} 상동체 EST(수탁 번호 T42902) 및 시나피스로부터의 P450_{TYR} 상동체의 컴퓨터 서열 정렬을 기초로 하여, 종을 함유하는 글루코시놀레이트의 게놈 DNA로부터의 P450_{TYR} 상동체의 PCR 단편을 증폭시킬 수 있도록 2개의 축퇴성 프라이머 올리고뉴클레오타이드를 디자인한다. 센스 쉘 프라이머(5'-GCGGAATTCAARCCIGARMGICAYYT-3')는 보존된 아미노산 서열 KPERHL(서열 18)을 포함하고 EcoRI 클로닝 부위를 포함한다. 안티센스 쉘 프라이머 2(5'-GCGGATCCRCAICCKYTTICNGT-3')는 보존된 아미노산 서열 TGKRG(서열 19)를 포함하고 BamHI 클로닝 부위를 포함한다. PCR은 뉴클레온 파이트퓨어 플랜트 DNA 익스트랙션 키트(Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction kit, 제조원: Amersham) 상에서 수행한다. PCR 반응은 시나피스 알바, 에이. 탈리아나, 브라시카 나푸스, 트로페올룸 마주스(Tropaeolum majus) 또는 엔. 타바쿰 cv 크한티로부터의 게놈 DNA 1 μ g을 사용하여 PCR 완충액(50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.8), 1.5mM MgCl₂ 및 0.1% Triton X-100) 중의 5% DMSO, 200 μ M dNTP, 각각의 프라이머 200pmol, 2.5유닛 Taq DNA 폴리머라제를 함유하는 전체 용적 100 μ l내에서 수행한다. PCR은 다음의 연속적인 4단계를 사용하여 수행한다:

1단계: 95°C에서 5분의 1주기,

2단계: 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초의 5주기,

3단계: 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초의 30주기, 및

4단계: 72℃에서 5분의 1주기.

티. 마주스로부터 약 100bp 밴드를 충분한량으로 생성시키기 위해, 2단계를 95℃에서 30초, 50℃에서 30초, 71℃에서 30초의 5주기로 변경시킬 수 있다.

PCR 생성물을 QIAquick PCR 퓨리피케이션(Purification) 키트(Qiagen)를 사용하여 정제하고, EcoRI 및 BamHI로 제한 분해하고 3% TAE 아가로스 겔 상에서 분리한다. 두드러진 약 100bp 밴드를 잘라내어 EcoRI/BamHI 선형화 pBluescript II SK(Stragene)에 연결한다. 5개의 중 각각으로부터의 약 10개의 클론을 써모 시퀀스 플루오레센트 라벨드 프라이머 사이클 시퀀싱 키트(7-deaza dGTP)(Amersham)를 사용하여 서열화시키고 ALF-Express(Pharmacia) 상에서 분석한다.

에스. 알바, 에이. 탈리아나, 비. 나푸스 및 티. 마주스 종을 함유하는 4개의 글루코시놀레이트로부터 보존된 아미노산 서열, KPERH(L/F)NECSEVTLTENDLRFISFSTGKRG(C) 각각 서열 20 및 21)를 암호화하는 PCR 단편을 동정한다. 상기 콘센서스 아미노산 서열은 이미 동정된 에스. 알바 및 에이. 탈리아나로부터의 P450_{TYR} 상동체 서열과 동일하고 수수

P450_{TYR} 아미노산 서열과 매우 유사하다. 식물 엔. 타바쿰 cv 크한티를 함유하는 비-글루코시놀레이트로부터는 상기 콘센서스 서열을 암호화하는 PCR 단편을 동정할 수 없다. 예시된 식물 종을 함유하는 4종의 글루코시놀레이트내에서의 상기 P450_{TYR} 상동체 콘센서스 아미노산 서열의 존재는 P450_{TYR} 계열 중 아미노산 N-하이드록실라제 사이토크롬 P450은 모체 아미노산 또는 채 신장된 모체 아미노산을 글루코시놀레이트 종내에서 상응하는 옥심으로 전환시킨다는 것을 제시한다. P450_{TYR} 상동체에 특이적인 PCR 단편의 생성은 동종성 cDNA 또는 상응하는 라이브러리로부터의 게놈 클론의 분리를 가능하게 한다.

상기 발명은 이해를 명백하게 하기 위해 예증 및 실시예로써 다소 상세하게 기술하였으나, 특정 변화 및 변형을 첨부된 청구의 범위내에서 실행할 수 있다는 것은 명백하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물 조직으로부터 마이크로솜을 분리하여 용해시키는 단계,
- 용해된 마이크로솜을 DEAE 세파로즈(Sepharese) 칼럼에 적용시키고, 칼럼을 세척하여 유출(run-through) 및 세척액 분획들을 수거하는 단계,
- 알독심의 니트릴로의 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 포함하는 분획들을 확인하는 단계, 및
- (c)단계로부터의 분획들에 트리톤(Triton) X-114를 가하고 원심분리하여 두개의 상을 형성시키는 단계(여기서, 하부상이 상기 효소를 포함한다)를 포함하여, 알독심의 니트릴로의 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 분리하는 방법.

청구항 2.

서열 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이토크롬 P450_{II}-모노옥시게나제 효소.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제2항에 따른 효소를 암호화하는 DNA 분자.

청구항 5.

제4항에 있어서, 서열 1에 기재된 서열을 갖는 DNA 분자.

청구항 6.

제5항에 있어서, 소르굼(*Sorghum*), 트리폴륨(*Trifolium*), 리눔(*Linum*), 탁수스(*Taxus*), 트리글로킨(*Triglochin*), 만니호트(*Mannihot*), 아미그달루스(*Amygdalus*), 프루누스(*Prunus*) 속 및 겨자과 식물로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 식물로부터 수득가능한 DNA 분자.

청구항 7.

제4항에 있어서, 프로모터에 작동적으로 연결된 DNA 분자.

청구항 8.

제4항에 있어서, 소르굼 비콜로르(*Sorghum bicolor*)로부터의 사이토크롬 P450_{OX} 모노옥시게나제를 암호화하는 DNA 분자.

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

(a) 제1항에 따른 방법을 사용하여 효소를 분리하는 단계,

(b) 임의로 (a)단계로부터의 효소의 완전한 또는 부분적인 아미노산 서열을 수득하고 올리고뉴클레오티드를 디자인하는 단계,

(c) 시안생성성 글리코사이드를 생산하는 식물 조직의 cDNA 라이브러리를 상기 효소에 대해 생성된 항체 또는 상기 효소의 단백질 서열 중 4 내지 15개의 아미노산을 암호화하는 DNA를 특징하는 올리고뉴클레오티드로 프로빙(probing)하는 단계, 및

(d) 상기 cDNA 라이브러리로부터 알독심의 니트릴로의 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 암호화하는 cDNA 분자를 포함하는 클론을 동정하는 단계를 포함하여, 알독심의 니트릴로의 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 암호화하는 cDNA 분자를 분리하는 방법.

청구항 12.

(a) 제2항에 따른 효소를 암호화하는 식물내에서 발현가능한 유전자를 포함하는 DNA, 또는 제4항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 따른 DNA 분자를 식물 세포 내로 도입하는 단계, 및

(b) 상기 DNA를 함유하는 형질전환 식물 세포를 선택하는 단계를 포함하여, 식물 세포의 계층 내로 알독심의 니트릴로의 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매할 수 있는 효소를 암호화하는 DNA를 안정적으로 삽입시킴을 포함하여, 형질전환 식물 세포를 수득하는 방법.

청구항 13.

(a) 제4항에 따른 DNA 분자로부터 유도되는, 센스 RNA 또는 안티센스 RNA를 암호화하는 DNA(이의 발현은 제2항에 따른 효소의 발현을 감소시킨다)를 식물세포 내로 도입하는 단계, 및

(b) 상기 DNA를 포함하는 형질전환 식물 세포를 선택하는 단계를 포함하여, 알독심의 니트릴로의 전환 및 당해 니트릴의 상응하는 시아노하이드린으로의 전환을 촉매할 수 있는 효소의 감소된 발현을 나타내는 형질전환 식물 세포를 수득하는 방법.

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

제12항에 따른 방법을 사용하여 수득된 형질전환 식물 세포.

청구항 19.

삭제

청구항 20.

제18항에 있어서, 식물 세포가 옥수수 또는 보리로부터 유래하는 형질전환 식물 세포.

청구항 21.

제18항에 있어서, 곤충, 진드기 또는 선충류에 대해 내성을 가지는 형질전환 식물 세포.

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

제13항에 따른 방법을 사용하여 수득된 형질전환 식물 세포.

청구항 30.

제29항에 있어서, 식물 세포가 옥수수 또는 보리로부터 유래하는 형질전환 식물 세포.

청구항 31.

제29항에 있어서, 곤충, 진드기 또는 선충류에 대해 내성을 가지는 형질전환 식물 세포.

서열목록

<110>	Ciba-Geigy AG
	Royal Veterinary and Agricultural University
<120>	Cytochrome P450 Monooxygenases
<130>	5-1998-060300-2 & 5-1999-045962-6
<150>	EP 97810132.7
<151>	1997-03-07
<150>	EP 97810954.4
<151>	1997-12-08
<160>	21
<170>	KOPATIN 1.5
<210>	1
<211>	1929
<212>	DNA

```

<213>      Unknown
<220>
<223>      double, linear, Immediate source: P450ox
<220>
<221>      CDS
<222>      (81)..(1673)
<400>      1
cagagctaga agcagctcac actccacact cgtctcgccc ggccataccc caaggcaagc      60
aggggcacgg gcaattaaca atg gcc acc acc gcc acc ccg cag ctc ctc ggc      113
                Met Ala Thr Thr Ala Thr Pro Gln Leu Leu Gly
                1                5                10
ggc agc gtg ccg cag cag tgg cag acg tgc ctc ctg gtg ctc ctc cct      161
Gly Ser Val Pro Gln Gln Trp Gln Thr Cys Leu Leu Val Leu Leu Pro
                15                20                25
gtg ctg ctg gtg tcc tac tac ctc ctc acc agc agg agc agg aac agg      209
Val Leu Leu Val Ser Tyr Tyr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Arg Asn Arg
                30                35                40
agc agg agc ggc aag ctg ggc ggg gcg ccg cgg ctg ccg ccg ggc cct      257
Ser Arg Ser Gly Lys Leu Gly Gly Ala Pro Arg Leu Pro Pro Gly Pro
                45                50                55
gcg cag ctg ccg atc ctg ggc aac ctg cac ctg ctg ggc ccg ctg ccg      305
Ala Gln Leu Pro Ile Leu Gly Asn Leu His Leu Leu Gly Pro Leu Pro
                60                65                70                75
cac aag aac ctc cgc gag ctg gcg cgg cgg tac ggc ccc gtg atg cag      353
His Lys Asn Leu Arg Glu Leu Ala Arg Arg Tyr Gly Pro Val Met Gln
                80                85                90
ctc cgt cta ggc acc gtg ccg acg gtg gtg gtg tcc agc gcg gag gcg      401
Leu Arg Leu Gly Thr Val Pro Thr Val Val Val Ser Ser Ala Glu Ala
                95                100                105
gcg cgg gag gtt ctc aag gtg cac gac gtc gac tgc tgc agc cgg ccg      449
Ala Arg Glu Val Leu Lys Val His Asp Val Asp Cys Cys Ser Arg Pro
                110                115                120
gcg tcg ccc ggt ccc aag cgc ctc tcc tac gac ctc aag aac gtc ggc      497
Ala Ser Pro Gly Pro Lys Arg Leu Ser Tyr Asp Leu Lys Asn Val Gly
                125                130                135
ttc gcg ccc tac ggc gag tac tgg cgc gag atg cgc aag ctc ttc gcg      545
Phe Ala Pro Tyr Gly Glu Tyr Trp Arg Glu Met Arg Lys Leu Phe Ala
                140                145                150                155
ctc gag ctc ctc agc atg cgc cgc gtc aag gcc gcc tgc tac gcg cgc      593
Leu Glu Leu Leu Ser Met Arg Arg Val Lys Ala Ala Cys Tyr Ala Arg
                160                165                170
gag cag gag atg gac agg ctc gtc gcc gac ctc gac cgc gcc gcc gcg      641
Glu Gln Glu Met Asp Arg Leu Val Ala Asp Leu Asp Arg Ala Ala Ala
                175                180                185
tcc aag gcc tcc atc gtc ctc aac gac cac gtc ttc gcc ctc acc gac      689
Ser Lys Ala Ser Ile Val Leu Asn Asp His Val Phe Ala Leu Thr Asp
                190                195                200
ggc atc atc ggc acc gtc gcg ttc ggc aac atc tac gcc tcc aag cag      737
Gly Ile Ile Gly Thr Val Ala Phe Gly Asn Ile Tyr Ala Ser Lys Gln
                205                210                215
ttc gcg cac aag gag cgc ttc cag cac gtg ctg gac gac gcc atg gac      785
Phe Ala His Lys Glu Arg Phe Gln His Val Leu Asp Asp Ala Met Asp

```

220	225	230	235	
atg atg gcc agc ttc tcc gcc gag gac ttc ttc ccc aac gcc gcc ggc				833
Met Met Ala Ser Phe Ser Ala Glu Asp Phe Phe Pro Asn Ala Ala Gly				
240	245	250		
cgc ctc gcc gac cgc ctc tcg ggc ttc ctc gcc cgc cgc gag cgc atc				881
Arg Leu Ala Asp Arg Leu Ser Gly Phe Leu Ala Arg Arg Glu Arg Ile				
255	260	265		
ttc aac gag ctc gac gtc ttc ttc gag aag gtc atc gac cag cac atg				929
Phe Asn Glu Leu Asp Val Phe Phe Glu Lys Val Ile Asp Gln His Met				
270	275	280		
gac ccg gcg cgc ccc gtg ccg gac aac ggc ggc gac ctc gtc gac gtc				977
Asp Pro Ala Arg Pro Val Pro Asp Asn Gly Gly Asp Leu Val Asp Val				
285	290	295		
ctc atc aac ctg tgc aag gag cac gac ggc acg ctc cgc ttc acc agg				1025
Leu Ile Asn Leu Cys Lys Glu His Asp Gly Thr Leu Arg Phe Thr Arg				
300	305	310	315	
gac cac gtc aag gcc atc gtc ctc gac acc ttc atc ggc gcc atc gac				1073
Asp His Val Lys Ala Ile Val Leu Asp Thr Phe Ile Gly Ala Ile Asp				
320	325	330		
acc agc tcc gtc acc atc ctg tgg gcc atg tcg gag ctg atg cgg aag				1121
Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Trp Ala Met Ser Glu Leu Met Arg Lys				
335	340	345		
ccg cag gtg ctg agg aag gcg cag gcc gag gtg cgg gcc gcc gtg ggc				1169
Pro Gln Val Leu Arg Lys Ala Gln Ala Glu Val Arg Ala Ala Val Gly				
350	355	360		
gac gac aag ccg cgc gtc aac tcg gaa gac gcc gcc aag atc ccg tac				1217
Asp Asp Lys Pro Arg Val Asn Ser Glu Asp Ala Ala Lys Ile Pro Tyr				
365	370	375		
ctg aag atg gtg gtc aag gag acg ctg cgg ctg cac ccg ccg gcg acg				1265
Leu Lys Met Val Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu His Pro Pro Ala Thr				
380	385	390	395	
ctg ctg gtg ccc cgg gag acg atg cgg gac acc acc atc tgc ggc tac				1313
Leu Leu Val Pro Arg Glu Thr Met Arg Asp Thr Thr Ile Cys Gly Tyr				
400	405	410		
gac gtg ccg gcc aac acg cgc gtc ttc gtc aac gcc tgg gcc atc ggc				1361
Asp Val Pro Ala Asn Thr Arg Val Phe Val Asn Ala Trp Ala Ile Gly				
415	420	425		
agg gac ccg gcg agc tgg ccg gcg ccc gac gag ttc aac ccg gac cgc				1409
Arg Asp Pro Ala Ser Trp Pro Ala Pro Asp Glu Phe Asn Pro Asp Arg				
430	435	440		
ttc gtg ggg agc gac gtc gac tac tac ggc tcg cac ttc gag ctc ata				1457
Phe Val Gly Ser Asp Val Asp Tyr Tyr Gly Ser His Phe Glu Leu Ile				
445	450	455		
ccg ttc ggg gcc ggc cgc cgg atc tgc ccg gga ctc acc atg ggc gag				1505
Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Leu Thr Met Gly Glu				
460	465	470	475	
acc aac gtc acc ttc acc ctc gcc aac ctg ctc tac tgc tac gac tgg				1553
Thr Asn Val Thr Phe Thr Leu Ala Asn Leu Leu Tyr Cys Tyr Asp Trp				
480	485	490		
gcg ctg ccg ggg gcc atg aag ccg gag gac gtc agc atg gag gag acc				1601
Ala Leu Pro Gly Ala Met Lys Pro Glu Asp Val Ser Met Glu Glu Thr				
495	500	505		

gga gcg ctc acg ttc cac cgg aag acg ccg ctt gtg gtg gtg ccc acc 1649
 Gly Ala Leu Thr Phe His Arg Lys Thr Pro Leu Val Val Val Pro Thr
 510 515 520

aaa tac aag aac cgc cgc gcc gcc tagtgagcag agccgagcag agcaatggtc 1703
 Lys Tyr Lys Asn Arg Arg Ala Ala
 525 530

gacgacgacg acgacgacga ctgaataagc gtgccaaagt ttagtactac gtacgtacgt 1763
 acctactgct actacgtaca gctagccaac agtcagagtt ggacactggt ggagctatca 1823
 tccggtcctc ttctttttgt gatacgtatt tgttatgtgt tttagtgccg caaagcacia 1883
 aagaaataaaa gcccatcaca gtcgcgagtc aaaaaaaaaa aaaaaa 1929

<210> 2
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Sorghum bicolor
 <400> 2

Met Ala Thr Thr Ala Thr Pro Gln Leu Leu Gly Gly Ser Val Pro Gln
 1 5 10 15
 Gln Trp Gln Thr Cys Leu Leu Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Val Ser
 20 25 30
 Tyr Tyr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Arg Asn Arg Ser Arg Ser Gly Lys
 35 40 45
 Leu Gly Gly Ala Pro Arg Leu Pro Pro Gly Pro Ala Gln Leu Pro Ile
 50 55 60
 Leu Gly Asn Leu His Leu Leu Gly Pro Leu Pro His Lys Asn Leu Arg
 65 70 75 80
 Glu Leu Ala Arg Arg Tyr Gly Pro Val Met Gln Leu Arg Leu Gly Thr
 85 90 95
 Val Pro Thr Val Val Val Ser Ser Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Leu
 100 105 110
 Lys Val His Asp Val Asp Cys Cys Ser Arg Pro Ala Ser Pro Gly Pro
 115 120 125
 Lys Arg Leu Ser Tyr Asp Leu Lys Asn Val Gly Phe Ala Pro Tyr Gly
 130 135 140
 Glu Tyr Trp Arg Glu Met Arg Lys Leu Phe Ala Leu Glu Leu Leu Ser
 145 150 155 160
 Met Arg Arg Val Lys Ala Ala Cys Tyr Ala Arg Glu Gln Glu Met Asp
 165 170 175
 Arg Leu Val Ala Asp Leu Asp Arg Ala Ala Ala Ser Lys Ala Ser Ile
 180 185 190
 Val Leu Asn Asp His Val Phe Ala Leu Thr Asp Gly Ile Ile Gly Thr
 195 200 205
 Val Ala Phe Gly Asn Ile Tyr Ala Ser Lys Gln Phe Ala His Lys Glu
 210 215 220
 Arg Phe Gln His Val Leu Asp Asp Ala Met Asp Met Met Ala Ser Phe
 225 230 235 240
 Ser Ala Glu Asp Phe Phe Pro Asn Ala Ala Gly Arg Leu Ala Asp Arg
 245 250 255
 Leu Ser Gly Phe Leu Ala Arg Arg Glu Arg Ile Phe Asn Glu Leu Asp
 260 265 270
 Val Phe Phe Glu Lys Val Ile Asp Gln His Met Asp Pro Ala Arg Pro
 275 280 285
 Val Pro Asp Asn Gly Gly Asp Leu Val Asp Val Leu Ile Asn Leu Cys

```

290                295                300
Lys Glu His Asp Gly Thr Leu Arg Phe Thr Arg Asp His Val Lys Ala
305                310                315                320
Ile Val Leu Asp Thr Phe Ile Gly Ala Ile Asp Thr Ser Ser Val Thr
                325                330                335
Ile Leu Trp Ala Met Ser Glu Leu Met Arg Lys Pro Gln Val Leu Arg
                340                345                350
Lys Ala Gln Ala Glu Val Arg Ala Ala Val Gly Asp Asp Lys Pro Arg
                355                360                365
Val Asn Ser Glu Asp Ala Ala Lys Ile Pro Tyr Leu Lys Met Val Val
                370                375                380
Lys Glu Thr Leu Arg Leu His Pro Pro Ala Thr Leu Leu Val Pro Arg
385                390                395                400
Glu Thr Met Arg Asp Thr Thr Ile Cys Gly Tyr Asp Val Pro Ala Asn
                405                410                415
Thr Arg Val Phe Val Asn Ala Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Ala Ser
                420                425                430
Trp Pro Ala Pro Asp Glu Phe Asn Pro Asp Arg Phe Val Gly Ser Asp
                435                440                445
Val Asp Tyr Tyr Gly Ser His Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly
                450                455                460
Arg Arg Ile Cys Pro Gly Leu Thr Met Gly Glu Thr Asn Val Thr Phe
465                470                475                480
Thr Leu Ala Asn Leu Leu Tyr Cys Tyr Asp Trp Ala Leu Pro Gly Ala
                485                490                495
Met Lys Pro Glu Asp Val Ser Met Glu Glu Thr Gly Ala Leu Thr Phe
                500                505                510
His Arg Lys Thr Pro Leu Val Val Val Pro Thr Lys Tyr Lys Asn Arg
                515                520                525
Arg Ala Ala
530
<210>      3
<211>      16
<212>      PRT
<213>      Unknown
<220>
<223>      linear, N-terminal, Immediate source: N-terminal peptide
<400>      3
Ala Thr Thr Ala Thr Pro Gln Leu Leu Gly Gly Ser Val Pro Glu Gln
  1              5              10              15
<210>      4
<211>      13
<212>      PRT
<213>      Unknown
<220>
<223>      linear, internal, Immediate source: Internal peptide
<400>      4
Met Asp Arg Leu Val Ala Asp Leu Asp Arg Ala Ala Ala
  1              5              10
<210>      5
<211>      26
<212>      DNA

```

```

<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: Primer 1
<400>      5
gcggaattct tyiiiccnga rmgntt                                26
<210>      6
<211>      6
<212>      PRT
<213>      Unknown
<220>
<223>      linear, internal, Immediate source: Amino acids encoded by Primer
              1
<400>      6
Phe Xaa Pro Glu Arg Phe
  1              5
<210>      7
<211>      26
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: Primer 2
<400>      7
gcggatccii ircaiiinck nckncc                                26
<210>      8
<211>      7
<212>      PRT
<213>      Unknown
<220>
<223>      linear, internal, Immediate source: Amino acids encoded by Primer
              2
<400>      8
Gly Arg Arg Xaa Cys Xaa Gly
  1              5
<210>      9
<211>      17
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: T7 Primer
<400>      9
aatacgactc actatag                                          17
<210>      10
<211>      24
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: "12" gene specific primer
<400>      10
gcggatccga ctactacggc tcgc                                  24
<210>      11
<211>      25
<212>      DNA

```

```

<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear
<400>      11
gcggatcctt tttttttttt ttttv                               25
<210>      12
<211>      24
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: "7" gene specific primer
<400>      12
gcggatccga catcaagggc agcg                               24
<210>      13
<211>      44
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: Primer 3
<400>      13
cgcgatcca tatggacgca tcattactcc tctccgtcgc gctc         44
<210>      14
<211>      31
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: Primer 4
<400>      14
cgcaagctta ttacatctca acggggaccc t                       31
<210>      15
<211>      41
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: Primer 5
<400>      15
cgcgatcca tatggcaaca acagcaaccc cgcagctcct c           41
<210>      16
<211>      39
<212>      DNA
<213>      Unknown
<220>
<223>      single, linear, Immediate source: Primer 6
<400>      16
cgcaagctta ttatgctgcg cggcggttct tgtatttgg             39
<210>      17
<211>      542
<212>      PRT
<213>      Sinapis alba
<400>      17
Met Asn Thr Phe Thr Ser Asn Ser Ser Asp Leu Thr Ser Thr Thr Lys
  1              5              10              15

```

Gln Thr Leu Ser Phe Ser Asn Met Tyr Leu Leu Thr Thr Leu Gln Ala
 20 25 30
 Phe Val Ala Ile Thr Leu Val Met Leu Leu Lys Lys Val Leu Val Asn
 35 40 45
 Asp Thr Asn Lys Lys Lys Leu Ser Leu Pro Pro Gly Pro Thr Gly Trp
 50 55 60
 Pro Ile Ile Gly Met Val Pro Thr Met Leu Lys Ser Arg Pro Val Phe
 65 70 75 80
 Arg Trp Leu His Ser Ile Met Lys Gln Leu Asn Thr Glu Ile Ala Cys
 85 90 95
 Val Arg Leu Gly Ser Thr His Val Ile Thr Val Thr Cys Pro Lys Ile
 100 105 110
 Ala Arg Glu Val Leu Lys Gln Gln Asp Ala Leu Phe Ala Ser Arg Pro
 115 120 125
 Met Thr Tyr Ala Gln Asn Val Leu Ser Asn Gly Tyr Lys Thr Cys Val
 130 135 140
 Ile Thr Pro Phe Gly Glu Gln Phe Lys Lys Met Arg Lys Val Val Met
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Val Cys Pro Ala Arg His Arg Trp Leu His Gln Lys Arg
 165 170 175
 Ala Glu Glu Asn Asp His Leu Thr Ala Trp Val Tyr Asn Met Val Asn
 180 185 190
 Asn Ser Asp Ser Val Asp Phe Arg Phe Val Thr Arg His Tyr Cys Gly
 195 200 205
 Asn Ala Ile Lys Lys Leu Met Phe Gly Thr Arg Thr Phe Ser Gln Asn
 210 215 220
 Thr Ala Pro Asn Gly Gly Pro Thr Ala Glu Asp Ile Glu His Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Met Phe Glu Ala Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Cys Ile Ser Asp
 245 250 255
 Tyr Leu Pro Ile Leu Thr Gly Leu Asp Leu Asn Gly His Glu Lys Ile
 260 265 270
 Met Arg Asp Ser Ser Ala Ile Met Asp Lys Tyr His Asp Pro Ile Ile
 275 280 285
 Asp Ala Arg Ile Lys Met Trp Arg Glu Gly Lys Lys Thr Gln Ile Glu
 290 295 300
 Asp Phe Leu Asp Ile Phe Ile Ser Ile Lys Asp Glu Glu Gly Asn Pro
 305 310 315 320
 Leu Leu Thr Ala Asp Glu Ile Lys Pro Thr Ile Lys Glu Leu Val Met
 325 330 335
 Ala Ala Pro Asp Asn Pro Ser Asn Ala Val Glu Trp Ala Met Ala Glu
 340 345 350
 Met Val Asn Lys Pro Glu Ile Leu Arg Lys Ala Met Glu Glu Ile Asp
 355 360 365
 Arg Val Val Gly Lys Glu Arg Leu Val Gln Glu Ser Asp Ile Pro Lys
 370 375 380
 Leu Asn Tyr Val Lys Ala Ile Leu Arg Glu Ala Phe Arg Leu His Pro
 385 390 395 400
 Val Ala Ala Phe Asn Leu Pro His Val Ala Leu Ser Asp Ala Thr Val
 405 410 415
 Ala Gly Tyr His Ile Pro Lys Gly Ser Gln Val Leu Leu Ser Arg Tyr
 420 425 430

Gly Leu Gly Arg Asn Pro Lys Val Trp Ala Asp Pro Leu Ser Phe Lys
435 440 445
Pro Glu Arg His Leu Asn Glu Cys Ser Glu Val Thr Leu Thr Glu Asn
450 455 460
Asp Leu Arg Phe Ile Ser Phe Ser Thr Gly Xaa Arg Gly Cys Ala Ala
465 470 475 480
Pro Ala Leu Gly Thr Ala Leu Thr Thr Met Leu Leu Ala Arg Leu Leu
485 490 495
Gln Gly Phe Thr Trp Lys Leu Pro Glu Asn Glu Thr Arg Val Glu Leu
500 505 510
Met Glu Ser Ser His Asp Met Phe Leu Ala Lys Pro Leu Val Met Val
515 520 525
Gly Glu Leu Arg Leu Pro Glu His Leu Tyr Pro Thr Val Lys
530 535 540
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> single, linear, internal
<400> 18
Lys Pro Glu Arg His Leu
1 5
<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> single, linear, internal
<400> 19
Thr Gly Lys Arg Gly Cys
1 5
<210> 20
<211> 31
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> single, linear, internal
<400> 20
Lys Pro Glu Arg His Leu Asn Glu Cys Ser Glu Val Thr Leu Thr Glu
1 5 10 15
Asn Asp Leu Arg Phe Ile Ser Phe Ser Thr Gly Lys Arg Gly Cys
20 25 30
<210> 21
<211> 31
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> single, linear, internal
<400> 21
Lys Pro Glu Arg His Phe Asn Glu Cys Ser Glu Val Thr Leu Thr Glu
1 5 10 15
Asn Asp Leu Arg Phe Ile Ser Phe Ser Thr Gly Lys Arg Gly Cys
20 25 30