



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년10월05일
 (11) 등록번호 10-1070110
 (24) 등록일자 2011년09월27일

(51) Int. Cl.
C12N 15/53 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2005-7005353
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년09월22일
 심사청구일자 2008년09월17일
 (85) 번역문제출일자 2005년03월28일
 (65) 공개번호 10-2005-0052664
 (43) 공개일자 2005년06월03일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2003/010498
 (87) 국제공개번호 WO 2004/029235
 국제공개일자 2004년04월08일
 (30) 우선권주장
 02021650.3 2002년09월27일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 US05437989 A
 W02002034919 A1
 전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자
 디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.
 네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1
 (72) 발명자
 호시노 다츠오
 일본 248-0027 가나가와켄 가마쿠라시 후에타
 2-18-14
 미야자키 다로
 일본 252-0813 가나가와켄 후지사와의 가메이노
 2-14-8
 스기사와 테루히데
 스위스 체하-4125 리헨 인즐링거슈트라세 80
 (74) 대리인
 제일특허법인, 장성구

심사관 : 최준호

(54) 알데히드 데하이드로게나제 유전자

(57) 요약

본 발명은 알데히드 데하이드로게나제(SNDH)를 코딩하는 신규한 DNA, 상기 DNA를 함유하는 발현 벡터, 및 상기 DNA를 함유하는 재조합 유기체에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 재조합 알데히드 데하이드로게나제 단백질의 생산 방법, 및 상기 재조합 알데히드 데하이드로게나제 단백질, 또는 발현 벡터를 함유하는 재조합 유기체를 사 용함으로써 L-소르보손으로부터 2-케토-L-글론산(2-KGA) 및/또는 L-아스코르브산(바이타민 C)을 생산하는 방법에 관한 것이다. 또한, 상기 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 유전자가 붕괴된 미생물을 사용하는 2-KGA의 생산 방법이 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드,

(ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드,

(iii) (a) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2084, (b) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-2084, (c) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-1955, 및 (d) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-1955로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드, 및

(iv) (a) 서열번호 2의 아미노산 32-609, (b) 서열번호 2의 아미노산 1-566 및 (c) 서열번호 2의 아미노산 32-566으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드

로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 알테히드 데하이드로게나제를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 5 항의 발현 벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 7 항에 있어서,

글루코노박터(*Gluconobacter*), 아세트박터(*Acetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 아시네토박터(*Acinetobacter*) 및 에세리키아(*Escherichia*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 미생물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*) DSM 4025인 재조합 미생물.

청구항 12

- (a) 제 7 항의 재조합 미생물을 배양 배지에서 배양하는 단계, 및
- (b) 상기 배양 배지로부터 바이타민 C를 회수하고 분리하는 단계를 포함하는, L-소르보손으로부터 바이타민 C를 생산하는 방법.

청구항 13

- (a) 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025에 속하며 서열번호 2로 표현된 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 유전자가 봉피되어 있는 미생물을 배양 배지에서 배양하는 단계, 및
- (b) 상기 배양 배지로부터 2-케토-L-굴론산(2-KGA)을 회수하고 분리하는 단계를 포함하는, L-소르보손으로부터 2-KGA를 생산하는 방법.

청구항 14

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans*) DSM 4025로부터 유래된 알데히드 데하이드로게나제(SNDH)를 코딩하는 신규한 DNA, 상기 DNA를 함유하는 발현 벡터, 및 상기 DNA를 함유하는 재조합 미생물에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 재조합 알데히드 데하이드로게나제 단백질의 생산 방법, 및 상기 재조합 알데히드 데하이드로게나제 단백질, 또는 발현 벡터를 함유하는 재조합 미생물을 사용함으로써 L-소르보손으로부터 L-아스코르브산(바이타민 C) 및/또는 2-케토-L-굴론산(2-KGA)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이타민 C는 인간의 필수 영양 인자들 중 하나이며, 약 60년 동안 라이스타인(Reichstein) 방법에 의해 상업적으로 합성되어 왔다. 합성 바이타민 C는, 비록 가축이 그들 자신의 신체 내에서 합성할 수 있지만, 동물 사료에도 또한 사용되고 있다. 라이스타인 방법이 산업용 바이타민 C 생산에 여러 유리한 점들을 가졌지만, 이는 여전히 높은 에너지 소모, 및 상당량의 유기 및 무기 용매의 사용과 같은 바람직하지 않은 문제점들을 갖고 있다. 따라서, 여러 세기를 거쳐오면서, 더욱 환경적일 뿐만 아니라 경제적인 효소 전환을 사용하여 바이타민 C를 제조하려는 여러 시도가 연구되어 왔다.

발명의 상세한 설명

[0008] 본 발명은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0009] 본원에 사용된 바와 같이, "SNDH"는 알데히드 데하이드로게나제를 의미한다.

[0010] 본원에 사용된 바와 같이, "핵산 분자"는 DNA 및 RNA를 모두 포함하며, 달리 지적되지 않는 한, 이중가닥, 단일가닥 핵산 및 그의 뉴클레오타이드를 포함한다. 또한, DNA-RNA 하이브리드, DNA-RNA-단백질 하이브리드, RNA-단백질 하이브리드 및 DNA-단백질 하이브리드가 포함된다.

[0011] 본원에 사용된 바와 같이, "돌연변이"는 해당 뉴클레오타이드 서열에서 단일 염기쌍 변화, 삽입 또는 결실을 지칭한다.

[0012] 본원에 사용된 바와 같이, "돌연변이유발(mutagenesis)"은 돌연변이가 DNA 내에서 발생하는 과정을 지칭한다. "랜덤" 돌연변이유발에서, 돌연변이의 정확한 부위는 미생물의 염색체 내의 어디에서 발생하는지 예측이 불가능

하며, 돌연변이는 방사선 또는 화학적 처리와 같은 제제에 의해 초래되는 물리적 손상의 결과로서 나타난다.

- [0013] 본원에 사용된 바와 같이, "프로모터"는 시작 코돈에 근접하게 위치하는 유전자의 5'-영역으로서 일반적으로 기술되는 DNA 서열을 의미한다. 인접 유전자(들)의 전사는 프로모터 영역에서 개시된다. 프로모터가 유도성 프로모터이면, 전사율은 유도제(inducing agent)에 반응하여 증가한다. 반면, 프로모터가 구성적 프로모터인 경우에는 전사율이 유도제에 의해 조절되지 않는다.
- [0014] 본원에 사용된 바와 같이, "~와 ~% 동일한"은 아래 예시되는 바와 같이 서열 분석에 의해 비교되는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에서 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산과 일치되는 본 발명의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 백분율을 지칭한다.
- [0015] 본 발명은, (a) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2084, (b) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-2084, (c) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-1955, 및 (d) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-1955로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태는, (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 2의 아미노산 32-609로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (c) 서열번호 2의 아미노산 1-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (d) 서열번호 2의 아미노산 32-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 또한, 전술된 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산(들)의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가에 의해 전술된 단백질로부터 유도되고 SNDH 활성을 갖는 단백질이 포함된다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태로서의 작용성 유도체는, 본 발명의 아미노산 서열에 기초하여 상기 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기의 첨가, 삽입, 결실 및/또는 치환에 의해 정의되며, 여기서 이러한 유도체는 당해 분야에 공지되어 있거나 또는 본원에 구체적으로 기술된 검정에 의해 측정하였을 때 여전히 SNDH 활성을 갖는다. 이러한 작용성 유도체는 당해 분야의 기술에서 공지된 화학적 펩타이드 합성에 의해 제조되거나, 또는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 본원에 개시된 DNA 서열에 기초한 재조합 기술에 의해서 제조될 수 있다. 이러한 분자의 활성을 일반적으로 변형시키지 않는 펩타이드 및 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0018] 본 발명의 특정 실시양태에서, 관심있는 보존적 치환들은 다음과 같다. 치환의 예로서, Ala의 Val/Leu/Ile로의 치환, Arg의 Lys/Gln/Asn로의 치환, Asn의 Gln/His/Lys/Arg로의 치환, Asp의 Glu로의 치환, Cys의 Ser로의 치환, Gln의 Asn로의 치환, Glu의 Asp로의 치환, Gly의 Pro/Ala로의 치환, His의 Asn/Gln/Lys/Arg로의 치환, Ile의 Leu/Val/Met/Ala/Phe/norLeu로의 치환, Lys의 Arg/Gln/Asn로의 치환, Met의 Leu/Phe/Ile로의 치환, Phe의 Leu/Val/Ile/Ala/Tyr로의 치환, Pro의 Ala로의 치환, Ser의 Thr로의 치환, Thr의 Ser로의 치환, Trp의 Tyr/Phe로의 치환, Tyr의 Trp/Phe/Thr/Ser로의 치환, 및 Val의 Ile/Leu/Met/Phe/Ala/norLeu로의 치환이 적당하다. 바람직한 예로서, Ala의 Val로의 치환, Arg의 Lys로의 치환, Asn의 Gln로의 치환, Asp의 Glu로의 치환, Cys의 Ser로의 치환, Gln의 Asn로의 치환, Glu의 Asp로의 치환, Gly의 Ala로의 치환, His의 Arg로의 치환, Ile의 Leu로의 치환, Leu의 Ile로의 치환, Lys의 Arg로의 치환, Met의 Leu로의 치환, Phe의 Leu로의 치환, Pro의 Ala로의 치환, Ser의 Thr로의 치환, Thr의 Ser로의 치환, Trp의 Tyr로의 치환, Tyr의 Phe로의 치환, 및 Val의 Leu로의 치환이 적당하다. 이러한 치환들이 생물학적 활성에서 변화를 초래하면, 전술된 예시적인 치환으로 명명된 더욱 실질적인 변화가 도입되며, 생산물이 스크리닝된다.
- [0019] 더욱이, 본 발명은, 서열번호 2로서 서열 목록에 개시된 SNDH 활성을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또한 상보적 가닥 또는 이들 서열, DNA 서열 또는 이들의 단편을 포함하는 것, 및 표준 조건 하에서 상기 서열과 하이브리드화하지만 정확하게 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA 서열에 관한 것이다.
- [0020] 따라서, 본 발명은 알데히드 데하이드로게나제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 단리된 핵산 분자로서, 상기 핵산 분자의 상보체가 전술된 바와 같이 표준 조건 하에서 핵산 분자와 하이브리드화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 한 양태는, 표준 조건 하에서
- [0022] (i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 알데히드 데하이드

로게나제;

- [0023] (ii) (a) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2084, (b) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-2084, (c) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-1955, 및 (d) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-1955로 이루어진 균으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 알데히드 데하이드로게나제;
- [0024] (iii) (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 2의 아미노산 32-609로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (c) 서열번호 2의 아미노산 1-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (d) 서열번호 2의 아미노산 32-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 균으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 알데히드 데하이드로게나제
- [0025] 를 코딩하는 핵산 분자의 상보적 가닥과 하이브리드화하며, 알데히드 데하이드로게나제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0026] 하이브리드화를 위한 "표준 조건"은 본원에서 특정 하이브리드화 신호를 검출하기 위해 당해 분야의 숙련자에게 일반적으로 사용되는 조건, 또는 바람직하게는 당해 분야의 숙련자에게 사용되는 소위 엄격한 하이브리드화 조건을 의미한다.
- [0027] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "엄격한 하이브리드화 조건"은 서열들 중 95%, 바람직하게는 97% 이상 동일할 경우 하이브리드화가 일어남을 의미한다. 엄격한 하이브리드화 조건은, 예컨대 50% 포름아미드, 5×SSC(150mM NaCl, 15mM 트라이소듐 시트레이트), 0.2% 소듐 도데실 설페이트, 0.1% N-라우로일사코신 및 2% 블록화 시약(독일 68298 만하임 소재의 로슈 다이아그노스틱스 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH))를 포함하는 용액 중에서 디곡시제닌(digoxigenin, DIG)-표지된 DNA 프로브(probe)(DIG 표지화 시스템을 사용하여 구성됨; 로슈 다이아그노스틱스 게엠베하)를 사용하여 42°C에서 밤새도록 항온처리한 후 필터를 약 60°C의 0.1×SSC 중에서 세척하는 조건이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 전술된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 즉 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 적합한 숙주 세포 내에서 작용하는 것이다. 본 발명의 핵산 분자의 발현에 바람직한 벡터는 pQE, pUC, pBluescript II, pACYC177, pACYC184, pVK100 및 RSF1010으로 이루어진 균으로부터 선택되는 벡터 또는 그의 유도체이다.
- [0029] 본 발명의 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 숙주 세포는 박테리아, 효모 및 식물 세포로 이루어진 균으로부터 선택되는 재조합 미생물이다. 바람직하게는, 상기 미생물은 글루코노박터(*Gluconobacter*), 아세토박터(*Acetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 클렙시엘라(*Klebsiella*) 및 에세리키아(*Escherichia*)로 이루어진 균으로부터 선택된다. 이러한 바람직한 미생물의 예로는 대장균(*Escherichia coli*)이 있다. 더욱 바람직한 숙주 세포는 글루코노박터 옥시단스, 가장 바람직하게는 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025(FERM BP-3812)(이는 부다페스트 조약의 조건 하에서 독일 브라운슈바이그 소재의 도이치 삼룽 폰 마이 크로오르가니즘 언트 쉐콜투렌 게엠베하(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 1987년 3월 17일자로 기탁되었다)이다.
- [0030] 미생물 "글루코노박터 옥시단스"는 또한 원핵생물의 명명법의 국제 규약에 의해 정의된, 동일한 물리-화학적 특성을 갖는 종의 동의어 또는 기본명(basonym)을 포함한다.
- [0031] 본 발명은, 전술된 바와 같은 발현 벡터로 형질전환된 재조합 미생물, 또는 그의 염색체 DNA 내에 통합되어 있는 전술된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명의 이중가닥 뉴클레오타이드 서열을 클로닝하기 위해 다양한 숙주/벡터 조합이 사용될 수 있다. 대장균이 바람직한 숙주 세포이므로, 대장균에 통상적으로 사용되는 임의의 벡터가 본 발명에 유용하다. 이러한 벡터로는 His-표식된(tagged) 재조합 단백질을 발현할 수 있는 pQE 벡터(일본 도쿄 소재의 퀴아진(QIAGEN K.K.)), pBR322 또는 pUC18 및 pBluescript II(미국 캘리포니아주 소재의 스트래타진 클로닝 시스템즈(Stratagene Cloning Systems))를 비롯한 그의 유도체, pACYC177 및 pACYC184, 및 이들의 유도체, 및 RK2 및 RSF1010과 같은 넓은 숙주 범위 플라스미드로부터 유도된 벡터가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 따라서, 본 발명에 사용되는 발현 벡터는 pQE-플라스미드, pUC-플라스미드, pBluescript II, pACYC177, pACYC184 및 이들의 유도체 플라스미드, 및 넓은 숙주 범위 플라스미드(예: pVK100 및 RSF1010)로부터 유도된다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같은 "발현 벡터"는 적합한 숙주 내로 형질전환된 후, 그 내로 클로닝된 유전자의 발현을

증강시킬 수 있는 클로닝 벡터를 의미한다. 클로닝된 유전자는 통상적으로 프로모터 서열과 같은 특정 제어 서열의 제어 하에(즉, 특정 제어 서열과 작동적으로 연결되게) 위치한다. 프로모터 서열은 구성적이거나 또는 유도성이다.

- [0034] 본원에 사용된 바와 같은 "클로닝 벡터"는, 숙주 세포 내에서 자가 복제가 가능하며, 그 부위에서 DNA 서열이 벡터의 필수 생물학적 기능의 손실 없이 결정가능한 방식으로 절단되고 DNA 단편이 복제 및 클로닝되도록 그 부위로 DNA 단편이 도입될 수 있는 단일 또는 소수의 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위를 특징으로 하는, 플라스미드 또는 파아지 DNA 또는 기타 DNA 서열을 의미한다. 클로닝 벡터는 그로 형질전환된 세포를 확인하는데 사용하기에 적합한 표지자(marker)를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 표지자는 예컨대 테트라시클린 또는 암피실린 내성을 제공한다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같은 "제조합 벡터"는 목적하는 클로닝된 유전자(들)를 함유하는 임의의 클로닝 또는 발현 벡터를 포함한다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같은 "발현"은 폴리펩타이드가 구조 유전자로부터 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 유전자의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 폴리펩타이드(들)로의 해독을 포함한다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같은 "제조합 미생물"은 목적하는 클로닝된 유전자(들)를 발현 또는 클로닝 벡터 상에 함유하는 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 세포일 수 있는 제조합 숙주를 포함한다. 또한, 이 용어는 상기 미생물의 염색체 또는 게놈에 목적하는 유전자(들)를 함유하도록 유전자-조작된 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 포함한다.
- [0038] 본원에 사용된 바와 같은 "숙주"는 복제가 가능한 발현 벡터 또는 클로닝 벡터의 수용체(recipient)인 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "숙주"는 또한 염색체 또는 게놈 상에 목적하는 유전자(들)를 함유하도록 잘 공지된 기술에 의해 유전자-조작될 수 있는 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 포함한다. 이러한 숙주의 예는 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.
- [0039] 제조합 DNA(예: 제조합 벡터)를 갖는 제조합 미생물을 구축하기 위해, 형질전환, 형질도입, 접합교배(conjugal mating) 또는 전기천공(electroporation)을 포함하지만 이에 국한되지 않는 다양한 유전자 전달 방법이 사용될 수 있다. 이들 방법은 분자생물학 분야에 잘 공지되어 있다. 통상적인 형질전환 시스템이 글루코노박터, 아세트박터, 슈도모나스, 아시네토박터, 클렙시엘라 또는 에세리키아에 사용될 수 있다. 또한, 형질도입 시스템이 대장균에 사용될 수 있다. 접합교배 시스템은 대장균, 슈도모나스 푸티다(*putida*) 및 글루코노박터를 비롯한 그람-음성 및 그람-양성 박테리아에 널리 사용될 수 있다. 접합교배의 예는 WO 89/06,688 호에 개시되어 있다. 접합(conjugation)은 액체 배지 중 또는 고체 표면에서 발생할 수 있다. SNDH 생산에 적합한 수용체의 예로는 글루코노박터, 아세트박터, 슈도모나스, 아시네토박터, 클렙시엘라 또는 에세리키아의 미생물을 포함한다. 접합교배용 수용체에는 날리딕산 또는 리팜피신에 대한 내성을 갖는 것과 같은 선택적 표지자가 첨가될 수 있다. 천연 내성물질이 또한 사용될 수 있다. 예컨대, 폴리믹신 B에 대한 내성이 여러 글루코노박터에 유용하다.
- [0040] 본 발명에 유용한 바람직한 벡터는 넓은 숙주 범위(broad host-range) 벡터, 예컨대 pVK100 및 그의 유도체, 및 RSF1010과 같은 코스미드 벡터이다. 벡터의 복제수 및 안정성은 클로닝된 핵산 분자의 안정하고 효과적인 발현 및 클로닝된 분자를 갖는 숙주 세포의 효율적인 배양을 위해 조심스럽게 고려되어야 한다. 목적하는 DNA를 바람직한 숙주 내로, 특히 염색체 상에 도입하기 위해, Tn5와 같은 전위가능한(transposable) 요소를 함유하는 핵산 분자가 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 함께 바람직한 숙주로부터 단리된 임의의 DNA를 함유하는 핵산 분자는, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열을 바람직한 숙주 세포 내로, 특히 염색체 상에 도입하는데 또한 유용하다. 이러한 핵산 분자는, 숙주 세포 및 핵산 분자의 속성을 고려하여 당해 분야에 잘 공지된 임의의 통상적인 방법, 예컨대 형질전환, 형질도입, 접합교배 또는 전기천공을 적용하여 바람직한 숙주에 전달될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 제공된 SNDH 유전자를 포함하는 뉴클레오타이드 서열은, 당해 분야에 주지된 방법을 사용하여 상기한 숙주 세포에서 작동가능한 조절 영역, 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종료자를 함유하는 적합한 벡터 내로 결합되어 적합한 발현 벡터를 생산할 수 있다.
- [0042] 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025로부터 단리된 목적하는 유전자/뉴클레오타이드 서열을 발현시키기 위해, 다양한 프로모터가 사용되며, 예를 들면 유전자의 고유 프로모터; 항생물질 내성 유전자(예: Tn5의 카나마이신(kanamycin) 내성 유전자, pBR322의 암피실린 내성 유전자) 및 대장균(lac)의 β -갈락토시다제의 프로모터;

trp-프로모터, tac-프로모터, trc-프로모터; 람다 파아지(lambda phage)의 프로모터; 및 숙주 세포에서 작용성 인 임의의 프로모터를 들 수 있다. 이 목적을 위해, 숙주 세포는 박테리아, 효모 및 식물 세포로 이루어진 군 으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 글루코노박터, 아세토박터, 슈도모나스, 아시네토박터, 클렙시엘라 또는 에세리키아 속에 속한다.

- [0043] 발현을 위해, 다른 조절 요소, 예컨대 (코딩 서열이 도입되어 본 발명의 재조합 세포를 생산하게 되는) 숙주 세포에서 작동가능한, 샤인-달가노(Shine-Dalgarno; SD) 서열(예컨대, 숙주 세포에서 작동가능한 천연 서열 및 합성 서열을 포함하는 AGGAGG), 및 전사 종료자(숙주 세포에서 작동가능한 임의의 천연 및 합성 서열을 포함하는 역전 반복 구조)가 전술된 프로모터와 함께 사용될 수 있다.
- [0044] 원형질막주위 공간(periplasmic space)에 위치하는 폴리펩타이드, 즉 본 발명의 SNDH 단백질의 발현을 위해, 통상적으로 15 내지 50개의 아미노산 잔기를 포함하고 전체적으로 소수성인 신호 펩타이드가 관련되어 있는 것이 바람직하다. 신호 펩타이드를 코딩하는 DNA는 목적하는 숙주 세포에서 작동가능한 임의의 천연 및 합성 서열로부터 선택될 수 있다. 서열번호 2의 아미노산 잔기 1 내지 31개를 함유하는 잠정(putative) 신호 펩타이드(서열번호 4)가 또한 본 발명의 SNDH 유전자에 의해 발현된 단백질에서 발견되었다.
- [0045] 달리 언급이 없는 한, 본원에서 정제된 SNDH 단백질을 서열화하여 결정된 모든 아미노산 서열은 자동화 아미노산 서열분석기(sequencer)(예컨대, 모델 470A, 퍼킨-엘머 어플라이드 바이오시스템즈(Perkin-Elmer Applied Biosystems))를 사용하여 결정되었다.
- [0046] 달리 지적되지 않는 한, 본원에서 DNA 분자를 서열화하여 결정된 모든 뉴클레오타이드 서열은 자동화 DNA 서열 분석기(예컨대, 모델 ALF 익스프레스(express) II, 아메르삼 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech))를 사용하여 결정되었으며, 본원에서 결정된 DNA 분자에 의해 코딩된 폴리펩타이드의 모든 아미노산 서열은 상기한 바와 같이 결정된 DNA 서열의 해독에 의해 예측되었다. 따라서, 이 자동화 방법에 의해 결정된 임의의 DNA 서열의 경우, 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 본원에서 결정된 임의의 뉴클레오타이드 서열은 일부 오류를 함유할 수 있다. 자동화에 의해 결정된 뉴클레오타이드 서열은 서열화된 DNA 분자의 실제 뉴클레오타이드 서열에 대해 전형적으로 약 90% 이상, 더욱 전형적으로 약 95% 이상 내지 약 99.9% 이상 동일하다. 실제 서열은 당해 분야에 잘 공지된 수동 DNA 서열화 방법을 비롯한 다른 방법들에 의해 더욱 정확하게 결정될 수 있다. 당해 분야에서도 공지되어 있는 바와 같이, 실제 서열과 비교되는 결정된 뉴클레오타이드 서열에서의 단일 삽입 또는 결실은, 이러한 삽입 또는 결실 지점부터 시작되는 뉴클레오타이드 서열의 해독 프레임을 이동시켜 결정된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 예측된 아미노산 서열이 서열화된 DNA 분자에 의해 실제 코딩된 아미노산 서열과 완전히 상이해진다.
- [0047] 본 발명은 효소(SNDH)를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 단리된 핵산 분자의 조작용을 위해 디자인된 방법 및 기술은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 진핵생물 및 원핵생물 숙주 세포의 사용 및 숙주 세포에서 핵산 및 단백질 발현에 관한 방법 및 기술 뿐만 아니라 핵산 분자의 단리, 정제 및 클로닝 방법은 숙련자에게 공지되어 있다.
- [0048] 간략하게 말하자면, 본 발명에서 사용되는 SNDH 유전자, 상기 유전자를 함유하는 DNA 분자, 재조합 발현 벡터 및 재조합 미생물은 하기 단계 (1) 내지 (4)에 의해 수득될 수 있다:
- [0049] (1) 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025로부터 염색체 DNA를 단리하고, 적절한 숙주 세포(예: 대장균)에서 염색체 DNA로 유전자 라이브러리(library)를 구축하는 단계;
- [0050] (2) 콜로니-하이브리드화(colony-hybridization), 플라크-하이브리드화(plaque-hybridization), 서던-하이브리드화(Southern-hybridization), PCR(중합효소 연쇄 반응) 클로닝 또는 웨스턴-블롯 분석(Western-blot analysis) 또는 당해 분야에 공지된 다른 기술에 의해 염색체 DNA로부터 SNDH 유전자를 클로닝하는 단계;
- [0051] (3) 통상적인 방법에 의해 상기한 바와 같이 수득된 SNDH 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 결정하여 상기 SNDH 유전자가 함유된 DNA 분자를 선택하고, 상기 SNDH 유전자를 효과적으로 발현시킬 수 있는 재조합 발현 벡터를 구축하는 단계; 및
- [0052] (4) 숙주 세포 내에 DNA를 도입시키기 위한 적절한 방법(예: 형질전환, 형질도입, 형질접합 및/또는 전기천공)에 의해 SNDH를 갖는 재조합 미생물을 구축함으로써, 숙주 세포가 본 발명의 재조합 미생물이 되게 하는 단계.
- [0053] 본 발명의 상기 양태에 사용되는 물질 및 기술은 하기에 상세하게 예시하였다.
- [0054] 전체 염색체 DNA는 당해 분야에 공지된 방법에 따라 정제될 수 있다. 목적하는 유전자는 전형적으로 하기 예시

적인 방법중 어느 하나에 의해 전체 염색체 DNA로부터 플라스미드 또는 파아지 벡터에서 클로닝될 수 있다:

- [0055] (i) 부분 아미노산 서열은 정제된 단백질 또는 그의 펩타이드 단편으로부터 결정된다. 이러한 전체 단백질 또는 펩타이드 단편은 이러한 전체 단백질을 단리하거나 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 후에 겔로부터 펩타이드 제-처리함으로써 준비될 수 있다. 이렇게 수득된 단백질 또는 그의 단편은 단백질 서열분석기(예: 어플라이드 바이오시스템즈 자동 기상 서열분석기(Applied Biosystems automatic gas-phase sequencer) 470A)에 적용된다. 아미노산 서열을 이용하여 DNA 합성기(예: 어플라이드 바이오시스템즈 자동 DNA 서열분석기 381A)로 올리고뉴클레오타이드 프로브 및/또는 프라이머를 디자인하고 제조할 수 있다. 상기 프로브는 서던-하이브리드화, 콜로니-하이브리드화 또는 플라크-하이브리드화에 의해 표적 유전자를 갖는 균주의 유전자 라이브러리로부터 표적 유전자를 갖는 클론을 단리하는데 사용될 수 있다.
- [0056] (ii) 다르게는, 유전자 라이브러리로부터 표적 단백질을 발현하는 클론을 선택하기 위해서, 표적 단백질에 대해 제조된 항체를 사용하는 면역 방법이 적용될 수 있다.
- [0057] (iii) 표적 유전자의 DNA 단편은 일련의 프라이머(즉, 상기한 바와 같이 결정된 아미노산 서열에 따라 합성된 2개의 올리고뉴클레오타이드)를 사용하는 PCR 방법에 의해 전체 염색체 DNA로부터 증폭될 수 있다. 그 다음, 전체 표적 유전자를 갖는 클론은, 앞서 프로브로서 수득된 PCR 생산물을 사용하는 서던-하이브리드화, 콜로니-하이브리드화 또는 플라크-하이브리드화에 의해 예컨대 대장균에서 구축된 유전자 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0058] 또한, 당해 분야에 공지된 방법에 의해 본원에서 개시된 DNA 서열에 기초하여 디자인된 프라이머를 사용함으로써 PCR에 의해 제조될 수 있는 DNA 서열이 본 발명의 목적이다.
- [0059] 진술한 항체는 항원으로서 정제된 SNDH 단백질, 정제된 재조합 SNDH 단백질, 예컨대 대장균에서 발현된 His-표식된 SNDH, 또는 그의 펩타이드 단편을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0060] 목적하는 유전자를 갖는 클론이 수득되면, 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 M13 파아지로 다이테옥시 쇠종료 방법과 같은 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 유전자는 도 2에 도시된 바와 같이 31개의 아미노산 잔기의 잠정 신호 펩타이드(서열번호 2의 아미노산 1-31로 이루어진 서열번호 4)와 함께 578개의 아미노산 잔기의 SNDH 효소(서열번호 2의 아미노산 32-609로 이루어진 서열번호 5)를 코딩한다. 뉴클레오타이드 서열에 있어서, SNDH 유전자의 코딩 영역은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2087을 포함하고, 잠정 신호 펩타이드의 코딩 서열(서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-350) 및 중지 코돈(서열번호 1의 뉴클레오타이드 2085-2087)을 포함한다. 따라서, 중지 코돈이 없는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1의 위치 258-2084로부터의 뉴클레오타이드 서열이며, 추가로 신호 서열이 없는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-2084를 포함한다.
- [0062] 본 발명에 개시된 바와 같은 핵산 분자는 2-KGA 및/또는 바이타민 C의 생산을 위한 재조합 미생물에 사용될 수 있다. 글루코노박터, 아세토박터, 슈도모나스, 아시네토박터, 클렙시엘라 및 에세리키아로부터 선택되는 재조합 미생물은 호기성(aerobic) 조건 하에서 적절한 영양소로 보충된 수성 배지 중에서 배양될 수 있다. 배양은 pH 4.0 내지 9.0, 바람직하게는 pH 6.0 내지 8.0에서 실시될 수 있다. 배양 기간은 사용되는 pH, 온도 및 영양 배지에 따라 변하며, 바람직하게는 약 1 내지 5일이다. 배양을 실시하기에 바람직한 온도는 약 13 내지 약 36 °C, 바람직하게는 약 18 내지 약 33°C이다. 통상적으로, 배양 배지에는 동화가능한(assimilable) 탄소 공급원, 예컨대 글라이세롤, D-만니톨, D-소르비톨, 에리트리톨, 리비톨, 자일리톨, 아라비톨, 이노시톨, 돌시톨, D-리보스, D-프럭토스, D-글루코스 및 수크로스, 바람직하게는 D-소르비톨, D-만니톨 및 글라이세롤; 및 소화가능한 질소 공급원, 예컨대 유기 물질(예: 펩톤, 효모 추출물, 베이커 효모(baker's yeast), 유레아, 아미노산 및 옥수수 침지액(steep liquor))과 같은 영양소를 함유할 것이 요구된다. 다양한 무기 물질(예: 질산염 및 암모늄염)이 또한 질소 공급원으로서 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지는 통상적으로 무기 염(예: 황산마그네슘, 인산칼륨 및 탄산칼슘)을 함유한다. 배양은 단지 발효기, 플라스크 또는 튜브와 같은 적절한 장비 내에서 실시된다. 재조합 미생물은 상기한 바와 같은 핵산 분자를 함유하는 발현 벡터로 형질전환되거나, 또는 염색체 DNA 내에 통합된 본 발명의 핵산 분자를 포함한다.
- [0063] 2-KGA 및/또는 바이타민 C의 생산을 위한 기질로서 사용되는 적절한 당 화합물은 L-소르보손이다. 2-KGA 및 바이타민 C의 대사 경로는 D-소르비톨로부터 L-소르보스를 통해 L-소르보손까지 이어진 후, 이는 2-KGA 및/또는 바이타민 C로 전환된다. 따라서, 상기 양자의 생산물을 위한 직접적인 기질은 L-소르보손이다.
- [0064] 따라서, 본 발명의 한 양태는, (a) 본 발명에 따라 형질전환되거나 또는 염색체 DNA 내에 통합된 본 발명의 핵

산 분자를 포함하는 재조합 미생물을 적절한 배양 배지에서 증식 또는 배양하는 단계, 및 (b) 상기 배양 배지로부터 2-KGA 및/또는 바이타민 C를 회수 및 분리시키는 단계를 포함하는, L-소르보손으로부터 2-KGA 및/또는 바이타민 C를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0065] 본 발명의 한 양태는, (a) 재조합 유기체를 적절한 배양 배지에서 증식시키며, 여기서 상기 재조합 유기체에 본 발명의 핵산 분자가 이질적으로 도입되어 있는 단계, 및 (b) 상기 배양 배지로부터 2-KGA 및/또는 바이타민 C를 회수 및 분리시키는 단계를 포함하는, L-소르보손으로부터 바이타민 C 및/또는 2-KGA를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0066] 본 발명은 재조합 SNDH를 제공한다. 본 발명에 의해 제공된 SNDH 유전자를, 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025를 포함하는 숙주 세포 내로 도입시킴으로써, SNDH 효소의 생산 수율을 증가시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 SNDH 유전자를 사용함으로써 글루코노박터, 아세트박터, 슈도모나스, 아시네토박터, 클렙시엘라 및 에세리키아로 이루어진 군으로부터 선택된 숙주 세포에서 SNDH 단백질을 더욱 효율적으로 생산할 수 있다. 상기 미생물은 전술된 바와 같이 배양될 수 있다.

[0067] 배양 후 미생물로부터 재조합 SNDH를 단리 및 정제하는 실시양태는 이후 본원에서 간략하게 기술되고 있다. 세포는 원심분리 또는 여과에 의해 액체 배양 브로스(broth)로부터 수확된다. 수확된 세포는 물, 생리 식염수 또는 적절한 pH를 갖는 완충 용액으로 세척된다. 세척된 세포는 완충 용액 중에 현탁되고, 균질화기, 초음파기 또는 프렌치 프레스(French press)에 의해 또는 라이소자임으로 처리함으로써 파괴되어 파괴된 세포의 용액을 수득한다. 파괴된 세포의 무세포 추출물로부터, 바람직하게는 미생물의 사이토솔(cytosol) 단편으로부터 재조합 SNDH를 단리 및 정제한다. 고체 상 효소 반응의 경우, 재조합 SNDH를 고체 담체 상에서 고정화(immobilize)시킬 수 있다.

[0068] 또한, 본 발명은 (a) 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025에 속하며 서열번호 2로 표현된 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 유전자가 붕괴되어 있는 미생물을 적절한 배양 배지에서 배양하는 단계, 및 (b) 상기 배양 배지로부터 2-KGA를 회수하고 분리하는 단계를 포함하는, L-소르보손으로부터 2-KGA를 생산하는 방법에 관한 것이다. 붕괴는 유전자 내의 어느 부위에서든 발생할 수 있으며, 이는 코딩된 효소의 기능을 무효화한다.

[0069] 따라서, 본 발명은, 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025에 속하며 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 유전자가 붕괴되어 있는 미생물을 적절한 배양 배지에서 배양하며, 여기서 상기 알데히드 데하이드로게나제가

- (i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드;
- (ii) (a) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2084, (b) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-2084, (c) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-1955, 및 (d) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-1955로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드; 및
- (iii) (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 2의 아미노산 32-609로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (c) 서열번호 2의 아미노산 1-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (d) 서열번호 2의 아미노산 32-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 단계를 포함하는, 적절한 당 화합물로부터 L-소르보손을 통해 2-KGA를 생산하는 방법을 제공한다.

[0070] 삭제

[0071] 삭제

[0072] 삭제

[0073] 삭제

- [0074] 생성된 2-KGA는 상기 배양 배지로부터 추가로 회수 및 단리된다.
- [0075] 한 실시양태에서, 본 발명은 생체 외뿐만 아니라 생체 내에서 임의의 돌연변이 시약(예컨대, N-메틸-N'-나이트로-N-나이트로소구아니딘(NTG), ICR170 또는 아크리딘 오렌지(acrydine orange))에 의한 화학적 처리 또는 UV-조사와 같은 제제를 사용하는 종래의 돌연변이유발에 의해 SNDH 유전자를 붕괴시키는 방법을 제공한다.
- [0076] 다른 실시양태에서, 본 발명은 생체 외뿐만 아니라 생체 내에서 전위(transposition) 삽입 또는 부위-지향(site-directed) 돌연변이유발과 같은 DNA 재조합 기술에 의해 SNDH 유전자를 붕괴시키는 방법을 제공한다.
- [0077] 다른 실시양태에서, 본 발명은 적절한 기질, 즉 L-소르보손, D-글루코스, D-소르비톨 및 L-소르보스로 이루어진 군으로부터 선택된 당 화합물로부터의 발효에 의해 전술된 붕괴체를 사용하여 2-KGA를 생산하는 방법을 제공한다. 공정은 단지 발효기, 플라스크 또는 튜브와 같은 적절한 장비 내에서 실시된다. 더욱이, 본 발명은 적절한 장비(예: 바이오리액터(bioreactor)) 내에서 적절한 기질(예: L-소르보손, D-글루코스, D-소르비톨 및 L-소르보스)로부터 향온처리함으로써 전술된 붕괴체의 무세포 추출물을 사용하여 2-KGA를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0078] 본 발명은 재조합 SNDH를 제공한다.
 더욱이, (A) (i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드;
 (ii) (a) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2084, (b) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-2084, (c) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-1955, 및 (d) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 351-1955로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와 95% 이상 동일한 폴리뉴클레오타이드; 및
 (iii) (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (b) 서열번호 2의 아미노산 32-609로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, (c) 서열번호 2의 아미노산 1-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (d) 서열번호 2의 아미노산 32-566으로 이루어진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 알데히드 데하이드로게나제를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 미생물을 적절한 배양 배지에서 배양하는 단계, 및
 (B) 상기 알데히드 데하이드로게나제를 상기 배양 배지로부터 회수 및 분리하는 단계를 포함하는 알데히드 데하이드로게나제를 생산하는 방법을 제공한다.

[0079] 삭제

[0080] 삭제

[0081] 삭제

[0082] 삭제

실시예

[0083] 실시예 1. SNDH의 N-말단으로부터의 아미노산 서열화

[0084] SNDH 단백질의 N-말단 75kDa 서브유닛(subunit)의 부분 아미노산 서열을 결정하였다. 75kDa 서브유닛으로 이루어진 SDS-처리된 정제된 SNDH 약 10 μ g을 SDS-PAGE에 가하고, 단백질 밴드를 PVDF 멤브레인 상에 전기블로팅(electroblotting)시켰다. 멤브레인 상에 블로팅된 단백질을 소화 완충액(100mM 인산칼륨 완충액, 5mM 다이싸이오트레이톨, 10mM EDTA, pH 5.0) 중에 적시고, 24시간 동안 30 $^{\circ}$ C에서 피로글루타메이트 아미노펩티다제(미국 소재의 시그마(SIGMA)) 5.04 μ g과 함께 향온처리하였다. 향온처리 후, 멤브레인을 탈이온수로 세척하고, 자동화 아미노산 서열분석기(ABI 모델 490, 미국 코넥티컷주 소재의 퍼킨 엘머 코퍼레이션(Perkin Elmer Corp.))를 사

용하여 N-말단 아미노산 서열화를 수행하였다. 결과적으로, 서열번호 3에 나타난 바와 같이, N-말단 아미노산 서열의 14개 잔기가 획득되었다.

[0085] 실시예 2. PCR에 의한 부분적 SNDH 유전자의 클로닝

[0086] 부분적 SNDH 유전자 단편의 증폭을 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025(FERM BP-3812)의 염색체 DNA 및 축퇴된 (degenerated) 올리고뉴클레오타이드 DNA 프라이머, P11(서열번호: 6) 및 P12(서열번호: 7)를 사용하는 PCR에 의해 실시하였다. 프라이머는 둘 모두 글루코노박터 코돈 용법에 대한 바이어스(bias)를 갖는 축퇴된 DNA 혼합물이다. 열안정성 taq 중합효소(TAKARA Ex Taq(상표명), 일본 520-2193 시가켄 오즈 세타 3-4-1 소재의 다카라 스조 캄파니 리미티드(Takara Shuzo Co., Ltd.))를 사용하는 PCR을, 열 순환기(유전자 Amp PCR 시스템 2400-R(Gene Amp PCR System 2400-R), 미국 캘리포니아주 94404 포스터시 링컨 센터 드라이브 850 소재의 PE 바이오시스템즈(PE Biosystems))를 사용하여 실시하였다. 반응 혼합물(25 μ l)은 공급업자로부터 제공된 완충액 중의 200 μ M dNTP, 각각 50pmol의 프라이머(24 내지 48 축퇴(degeneracy)), 염색체 DNA 5ng 및 1.25유닛의 DNA 중합효소로 이루어졌다. 30초 동안 94 $^{\circ}$ C에서의 변성 단계, 30초 동안 37 $^{\circ}$ C에서의 어닐링 단계 및 1분 동안 70 $^{\circ}$ C에서의 합성 단계를 5회 반복한 후, 후속적으로 30초 동안 94 $^{\circ}$ C에서의 변성 단계, 30초 동안 50 $^{\circ}$ C에서의 어닐링 단계 및 1분 동안 70 $^{\circ}$ C에서의 합성 단계를 25회 반복하여 수행함으로써 반응을 실시하였다. 결과적으로, 41bp DNA 단편이 특이적으로 증폭되고, 벡터 pCR 2.1-TOPO(미국 캘리포니아주 92008 파라데이 애비뉴 칼스바드 1600 소재의 인비트로젠(Invitrogen)) 내로 클로닝되어 재조합 플라스미드 pMTSN2를 획득하였다. 성숙한 SNDH 단백질의 N-말단 부분 아미노산 서열을 코딩하는 클로닝된 41bp DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열은, 다이데옥시-쇄 종료의 방법(상거(F. Sanger) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977])에 의해 확인하였다.

[0087] 실시예 3. SNDH 유전자의 완전한 클로닝

[0088] (1) 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025의 유전자 라이브러리 구축

[0089] 5% D-만니톨, 1.75% 옥수수 침지액, 5% 베이커 효모, 0.25% MgSO₄ · 7H₂O, 0.5% CaCO₃(실용 등급), 0.5% 유레아 및 2.0% 한천(pH 7.0)을 함유하는 M 한천 배지 상에서 27 $^{\circ}$ C에서 4일 동안 성장된 세포로부터 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025의 염색체 DNA를 제조하였다. 반응 혼합물 20 μ l 중의 4 유닛의 EcoR I로 염색체 DNA(4 μ g)를 부분적으로 소화시켰다. 전기영동(1% 아가로스 겔)에 의해, 부분적으로 소화된 DNA 단편을 함유하는 샘플 부분(8 μ l)을 분리시켰다. 15 내지 35 kb의 단편을 절단하고, QIAEX II(미국 캘리포니아주 91355 발렌시아 애비뉴 스탠포드 28159 소재의 퀴아진 인포코레이티드(QIAGEN Inc.))를 사용하여 화학적으로 용융시켜 상기 단편들을 회수하였다. 회수된 목적 DNA 단편을 H₂O 중에 현탁시켰다. 한편, 코스미드 벡터 pVK100 2 μ g을 EcoR I로 완전히 소화시키고, 박테리아 알칼리 포스파타제(대장균 C75)(다카라 스조(Takara Shuzo))로 처리하여 5'-말단을 탈인산화시켰다. 결찰 키트(다카라 스조)를 사용하여 반응 혼합물 36 μ l 중에서 처리된 pVK100(220ng)을 15 내지 35kb EcoR I 단편(1 μ g)과 결찰시켰다. 에탄올 침전되고 적절한 부피의 TE 완충액(10mM 트리스-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) 중에 용해되어 있는 결찰된 DNA를 생체 외 포장(packaging)(기가팩 III 골드 패키징 익트랙트(Gigapack III Gold Packaging Extract), 스트라타젠, 미국 캘리포니아주 92037 라 줄라 노스 토레이 파인즈 로드 11011 소재)을 위해 사용하여 게놈 라이브러리를 위한 숙주 균주인 대장균 VCS257을 감염시켰다. 결과적으로, 약 25kb의 삽입된 DNA 단편을 함유하는 총 400,000 내지 670,000개 클론을 획득하였다.

[0090] (2) 콜로니 하이브리드화에 의한 SNDH 유전자의 완전한 클로닝

[0091] 콜로니 하이브리드화 방법에 의해 완전한 SNDH 유전자를 갖는 클론을 검출하기 위해서 전술한 코스미드 라이브러리를 스크리닝하는데 사용되는 프로브를 구축하였다. SNDH의 N-말단 아미노산 서열을 코딩하는 41bp DNA 단편을 PCR-DIG 표지(labeling) 방법(로슈 몰레큘라 시스템즈 인코포레이티드(Roche Molecular Systems Inc.), 미국 캘리포니아주 94501 알라바마 아틀란틱 애비뉴 1145 소재)에 의해 증폭 및 표지하였다. 주형으로서의 플라스미드 pMTSN2 DNA 및 올리고뉴클레오타이드 DNA 프라이머 P13(서열번호 8) 및 P14(서열번호 9)를 이용하는 PCR을 열안정성 taq 중합효소(TAKARA Ex Taq(상표명), 다카라 스조 캄파니 리미티드)를 이용하여 열 순환기(진 Amp PCR 시스템 2400-R(Gene Amp PCR System 2400-R), PE 바이오시스템즈(PE Biosystems))에서 실시하였다. 반응은 30초 동안 94 $^{\circ}$ C에서의 변성 단계, 30초 동안 55 $^{\circ}$ C에서의 어닐링 단계 및 1분 동안 70 $^{\circ}$ C에서의 합성 단계를 25회 반복하여 실시하였다. DIG-표지된 프로브를 사용하여, 콜로니 하이브리드화에 의한 코스미드 라이브러리(약 1,000개 클론)의 스크리닝, 및 공급자(로슈 몰레큘라 시스템즈 인코포레이티드)로부터 제공된 방법에 따른 화학발광 검출(chemiluminescent detection)을 실시하였다. 결과적으로, 3개의 포지티브 클론을

단리시키고, 이들 중 하나를 pVSN5로 명명하였으며, 이는 pVK100 벡터 중에 약 25kb 삽입 DNA를 갖는다. 이로부터, 여러 크기의 25kb DNA 삽입 단편을 pUC18 벡터 내로 추가로 서브클로닝시켰다(도 2). (1) SNDH 유전자의 업스트림 부분(N-말단 부분)을 포함하는 3.2kb *EcoR* I 단편은 pUCSN19를 생성하고, (2) SNDH 유전자의 다운스트림 부분(C-말단 부분)을 포함하는 7.2kb *EcoR* I 단편은 pUCSN5를 생성하고, (3) 각각 무손상 또는 완전한 SNDH 유전자를 포함하는 1.8kb *Pst* I 단편은 pUCSNP4 및 pUCSNP9를 각각 생성한다. pUCSNP4 및 pUCSNP9 중의 삽입체들은 동일하지만 반대 방향을 취하고 있음에 유의한다.

[0092] (3) SNDH 유전자의 뉴클레오타이드 서열화

[0093] SNDH 유전자 또는 유전자 단편을 포함하는 영역의 뉴클레오타이드 서열화를 위해 플라스미드 pUCSN19, pUCSN5 및 pUCSNP4를 사용하였다. 결정된 뉴클레오타이드 서열(서열번호 1; 3,408bp)은, SNDH 유전자의 ORF(서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-2084, 1,827bp)가 609개 아미노산 잔기의 폴리펩타이드(서열번호 2)를 코딩하는 것으로 나타났다. 도 1에 도시된 바와 같이, 추가의 ORF인 ORF-A가 SNDH ORF의 다운스트림에서 발견되었다. ORF-A(서열번호 1의 뉴클레오타이드 2214-3314; 1,101bp)는 367개 아미노산의 폴리펩타이드를 코딩한다.

[0094] SNDH 유전자의 ORF에서, 신호-펩타이드 유사 서열(31개 아미노산을 갖는 서열번호 4)은 가능하게는 추론된 아미노산 서열에 포함되는데, 이는 (i) 다수의 소수성 잔기, (ii) N-말단에 근접한 양전하-하전된 잔기, 및 (iii) 신호 서열의 분할 부위를 위한 Ala-Xaa-Ala 모티프를 함유한다. SNDH 유전자를 위한 잠정 리보솜-결합 부위(사인-달가노, SD 서열)는 개시 코돈의 6bp 업스트림(서열번호 1의 뉴클레오타이드 위치 247-252; AGGAGA)에 위치하였다. 더욱이, heme c 결합 부위로서 정의된 모티프(Cys-Xaa-Xaa-Cys-His)를 서열번호 2의 위치 530-534에서 발견하였다. 앞서 제시된 바와 같은 유전자 분석에 의해, SNDH 단백질은 퀴노헤모프로틴(quinohemoprotein) 중 하나로 생각된다.

[0095] GCG(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 FASTA 프로그램을 사용하는 SNDH 유전자의 상동성에 대한 연구에서, 서열번호 5의 Arg227, Asn228, Gln230, Gly246 및 Asp251이 오우브리예(Oubrie) 등의 문헌 [J. Mol. Biol. 289: 319-333 (1999)]에 기술된 에이. 칼코아세티쿠스(*A. calcoaceticus*) GDH-B 단백질의 추정 활성 부위 내의 몇몇 고도의 보존된 잔기에 상응하는 것으로 나타났다.

[0096] 실시예 4. 대장균에서의 SNDH 유전자의 발현

[0097] 무손상, 즉 완전한 SNDH 유전자와 함께 8.0kb *Pst* I-단편을 함유하는 플라스미드 pUCSNP4 및 pUCSNP9(도 3)를 대장균 JM109로 형질전환시켜 SNDH 단백질의 발현 및 활성을 확인하였다. 효소 활성으로서 생산된 바이타민 C의 양을 UV 검출기(TOSOH UV8000; 도소(Tosoh), 일본), 이중펌프(dualpump)(TOSOH CCPE; 도소), 적산기(integrator)(Shimadzu C-R6A; 시마즈(Shimadzu), 일본) 및 칼럼(YMC-팩 폴리아민-II(YMC-Pack Polyamine-II), 4.6mm의 내부 직경 ×15cm, YMC, 미국)으로 구성된 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(HPLC)에 의해 264nm의 파장에서 측정하였다.

[0098] 제조합 대장균의 사이토솔 분획을 사용하여 L-소르보손의 바이타민 C로의 전환 활성을 시험하였다(표 1). 10 μM PQQ 및 1.0mM CaCl₂로 선택적으로 보충된 LB 배지 중에서 세포를 배양하였다. 50mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0) 중의 무세포 추출물의 초원심분리(100,000xg, 45분)에 의해 사이토솔 분획을 제조하였다. 반응 혼합물(100 μl)은 경우에 따라, 공동인자(cofactor)로서 1.0 μM PQQ 및 1.0mM CaCl₂를 첨가하거나 첨가하지 않은, 제조합 대장균의 사이토솔 분획 125 μg, 50mM L-소르보손, 1.0mM 페나진 메소설페이트(PMS)로 이루어졌다. 효소 반응을 30분 동안 30°C에서 실시하였다. 10 μM PQQ 및 1.0mM CaCl₂를 함유하는 LB 배지 중에서 배양된 세포의 holo-SNDH는 PQQ 및 CaCl₂의 공동인자가 없는 규정된 반응 조건 하에서 바이타민 C를 명확하게 생산하였다. 공동인자를 첨가하면, pUCSNP4 및 pUCSNP9로 발현된 apo-SNDH가 holo-효소와 거의 동일한 활성을 나타냈다.

표 1

미생물	재조합 SNDH의 활성 측정		
	배지 중 PQQ 및 CaCl ₂	고유 활성(mU/mg 단백질)	
		PQQ 및 CaCl ₂ 를 사용	PQQ 및 CaCl ₂ 를 사용하지 않음
대장균 JM109/pUCSNP4	+	0.187	0.224
대장균 JM109/pUCSNP9	+	0.198	0.252
대장균 JM109/pUC18	+	0.000	0.000
대장균 JM109/pUCSNP4	-	0.155	0.000
대장균 JM109/pUCSNP9	-	0.176	0.000
대장균 JM109/pUC18	-	0.000	0.000
글루코노박터 옥시단스 DSM 4025	-	0.026	0.026

효소의 1유닛(U)은 규정된 반응에서 바이타민 C 1.0mg을 생산하는 효소의 양으로 정의된다.

[0099]

[0100]

[0101]

[0102]

[0103]

실시에 5. 글루코노박터 옥시단스 균주의 SNDH 유전자 붕괴체의 구축 및 배양

도 4는 SNDH 유전자 표적 벡터, GOMTR1SN::Km(SNDH-붕괴체) 구축에 대한 개략도를 도시한다. 우선, 플라스미드 pUCSNP4에서 나온 SNDH 유전자를 함유하는 8.0kb *Pst* I 단편을 자살 벡터 pSUP202(시몬(Simon) 등의 문헌 "A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria, Biotechnology, 1, 784-791, 1983" 참조)와 결합함으로써, 플라스미드 pSUPSN을 구축하였다. 그 다음, 카나마이신-내성 유전자 카세트(Km 카세트)를 플라스미드 pSUPSN 내에 클로닝된 SNDH 유전자의 *EcoR* I 부위 내로 삽입하여 플라스미드 pSUPSN::Km(Km^rTc^r)을 획득하였다. 그 다음, 야생형 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025 균주로부터 자발적으로 유도된 리팜피신(Rif) 내성인 GOMTR1 내로 플라스미드 pSUPSN::Km을 도입시켜 SNDH-무효 돌연변이체(Km^rRif^rTc^s)를 획득하였다.

트립티카제 소이 브로스(Trypticase Soy Broth)(BBL; 미국 미들랜드주 21030 록케이스빌 소재의 벡톤 디킨슨 앤드 캠퍼니(Becton Dickinson and Company)) 30g/l 및 효모 추출물(Difco; 미국 미들랜드주 21152 스팅크스 소재의 벡톤 디킨슨 마이크로바이올로지 시스템즈(Becton Dickinson Microbiology Systems), 벡톤 디킨슨 앤드 캠퍼니) 3g/l로 구성된 T 브로스 50ml를 함유하는 200ml 플라스크 중에서 GOMTR1을 리팜피신 100µg/ml와 함께 밤새도록 30°C에서 배양하였다. 대장균 HB101(pRK2013)[피구르스키(D. H. Figurski)의 문헌 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1648-1652, 1979"] 및 대장균 JM109(pSUPSN::Km)를 카나마이신 50µg/ml와 함께 LB 배지 2ml를 함유하는 시험관 내에서 밤새도록 30°C에서 배양하였다. GOMTR1, 대장균 HB101(pRK2013) 및 대장균 JM109(pSUPSN::Km)의 배양된 세포를 원심분리하여 개별적으로 수거하고, LB 배지 중의 각각의 세포 현탁액을 각각 10:1:1의 비율로 혼합하였다. 그 다음, 세포 현탁액을 동일한 부피로 혼합하고, 대장균 공여체에서 나온 자살 플라스미드가 수용체인 GOMTR1로 접합 전달되도록 5.0% 만니톨, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 1.75% 옥수수 침지액, 5.0% 베이커 효모, 0.5% 유레아, 0.5% CaCO₃ 및 2.0% 한천으로 구성된 한천 배지 상에 놓인 0.45µm 나이트로셀룰로스 멤브레인(프로트란(PROTRAN), 독일 테-37582 다젤 포스트파흐 4 소재의 슈라이처 운트 슈엘 게엠베하(Schleicher & Schuell GmbH) 상에 혼합물을 도말하였다. 1일 동안 27°C에서 배양한 후, 교차접합체(transconjugant)를 함유하는 세포를 현탁시키고, T 브로스로 적절하게 희석시키고, 리팜피신 100µg/ml 및 카나마이신 50µg/ml를 함유하는 스크리닝 한천 플레이트 상에 도말하였다. 최종적으로, Km 카세트로 붕괴된 SNDH 유전자를 갖는 몇몇의 교차접합체(Km^rRif^rTc^s)를 획득하였다.

GOMTR1 및 붕괴체(GOMTR1SN::Km)를 8.0% L-소르보스, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 1.75% 옥수수 침지액, 5.0% 베이커 효모, 0.5% 유레아, 0.5% CaCO₃ 및 2.0% 한천을 함유하는 한천 플레이트 상에서 27°C에서 4일 동안 성장시켰다. 500ml 엘렌마이어 플라스크 중의 4% D-소르비톨, 0.4% 효모 추출물, 0.05% 글라이세롤, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 1.75% 옥수수 침지액, 0.1% 유레아 및 1.5% CaCO₃을 함유하는 씨드 배양 배지(pH 6.0) 50ml 내로 루프 하나 가득한(loopful) 세포를 접종하고, 회전 진탕기 상에서 1일 동안 180rpm으로 30°C에서 배양시켰다. 이렇게 하여 제조된 씨드 배양액을 500ml 엘렌마이어 플라스크 중의 12.0% L-소르보스, 2.0% 유레아, 0.05% 글라이세롤, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 3.0% 옥수수 침지액, 0.4% 효모 추출물 및 1.5% CaCO₃으로 구성된 주 배양 배지 50ml에 접종하였다. 4일 동안 30°C에서 180rpm으로 배양시켰다. 실시예 4에 기술된 바와 같이 활성 검정을 실시하였다. UV 검출기(TOSOH UV8000; 도소), 이중펌프(TOSOH CCPE; 도소), 적산기(Shimadzu C-R6A; 시마즈) 및 칼럼(YMC-

팩 Pro C18, YMC)으로 구성된 HPLC 시스템에 의해 340nm의 파장에서, 효소 활성으로서 생산된 2-KGA의 양을 측정하였다. 표 2에 제시된 바와 같이, SNDH-유전자 붕괴체의 2-KGA의 생산 효율은 모 균주 GOMTR1보다 높았다. 1몰의 L-소르보스가 2-KGA로 전환되는 비율 차이는 약 3%이었다.

표 2

붕괴된 SNDH-유전자를 갖는 글루코노박터 옥시단스 균주의 2-KGA 생산성			
균주	2-KGA(g/l)	잔여 L-소르보스(g/l)	*몰 수율(몰%)
GOMTR1SN::Km	96.7	15.3	99.2
GOMTR1	98.8	9.8	95.5

* 몰 수율: 생산된 2-KGA(몰)/소모된 L-소르보스(몰)

[0104]

[0105]

실시에 6. SNDH 유전자를 갖는 플라스미드의 글루코노박터 옥시단스 DSM 4025의 SNDH 유전자 붕괴체 내로의 도입

[0106]

도 5에 도시된 바와 같이, 넓은 숙주 범위 벡터 pVK100을 사용하여 여러 종류의 SNDH-발현 플라스미드를 구축하였다. 이들 플라스미드는 아래와 같이 기술된 pVK100의 Hind III 부위에서 상이한 삽입 DNA를 갖는다. pVSN117은 서열번호 5의 Gly535(서열번호 2의 아미노산 잔기 566)에서 폴리펩타이드 단부를 코딩하는 불완전 SNDH 유전자, 즉 55kDa 단백질만을 발현하는 C-말단 결실된 SNDH 유전자를 함유하는 삽입 DNA를 갖는다. 플라스미드 pVSN106 및 pVSN114는 각각 완전한 SNDH 유전자를 함유하는 삽입 DNA를 갖는다. 이들 플라스미드를 접합 전달 방법에 의해 균주 GOMTR1SN::Km 내로 도입시켰다.

[0107]

도 5에 도시된 플라스미드를 갖는 교차접합체를, 10.0% L-소르보스, 0.25% MgSO₄ · 7H₂O, 1.75% 옥수수 침지액, 5.0% 베이커 효모, 0.5% 유레아, 0.5% CaCO₃ 및 2.0% 한천을 함유하는 한천 플레이트 상에 4일 동안 27°C에서 성장시켰다. 효소 반응 혼합물은 재조합 글루코노박터 균주의 무세포 추출물 80µg, 25mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0), 50mM L-소르보스 및 0.05mM PMS로 이루어졌다. 1,000rpm으로 진탕시키면서 30분 동안 30°C에서 효소 반응을 실시하였다. 실시에 4에 따라 활성 검정을 실시하였다. 결과를 표 3에 제시한다.

표 3

상이한 SNDH 구조물에 의한 바이타민 C의 생산성		
숙주 세포	벡터 DNA	생산된 바이타민 C(mg/l)
GOMTR1SN::Km-2	pVK100	0.0
	pVSN117	473.2
	pVSN106	845.3
	pVSN114	860.2

[0108]

도면의 간단한 설명

[0003]

도 1은 본 발명의 알데히드 데하이드로게나제 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자를 도시한다. SNDH 유전자 및 ORF-A 유전자의 제한효소 지도가 제공되며, 여기서 ORF는 개방 판독 프레임을 의미하고, 신호 서열은 SNDH 유전자의 잠정 신호 펩타이드 서열을 의미한다.

[0004]

도 2는, 코스미드(cosmid) pVSN5 내로 클로닝된 SNDH 유전자 및 ORF-A 유전자의 제한효소 지도, 및 pUC 플라스미드 pUCSNP4, pUCSNP9, pUCSN19 및 pUCSN5 내로의 여러 크기의 삽입 DNA의 클로닝을 도시한다. pVSN5의 물리적 지도에서, 회색 화살표는 SNDH 유전자를 나타낸다.

[0005]

도 3은, pVSN5에서 나온 무손상 SNDH 유전자를 pUC18 벡터로 도입하여 pUCSNP4 및 pUCSNP9를 생성하는 것을 포함하는 8.0kb PstI 단편의 클로닝 전략을 도시한다.

[0006]

도 4는, 카나마이신 카세트(Km)를 이용하여 붕괴된 SNDH 유전자를 갖는 자살(suicide) 벡터 플라스미드를 사용하는 GOMTR1SN::Km(SNDH-붕괴체(disruptant))의 구축을 개략적으로 도시한다. 상응하는 영역에서 모 균주로서 GOMTR1의 염색체 DNA와 벡터 플라스미드 사이의 상동적 재조합으로 인해 붕괴체 균주가 수득된다. "G.O."는 글루코노박터 옥시단스를 의미한다.

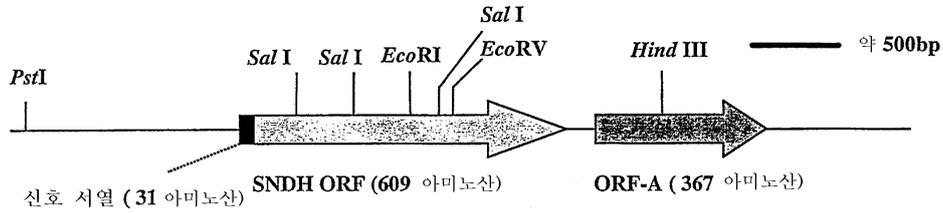
[0007]

도 5는 pVSN117, pVSN106 및 pVSN114의 삽입 DNA의 물리적 지도를 도시한다. 플라스미드 pVSN117은 단지 55kDa 단백질만을 발현하는 C-말단 결실된 SNDH 유전자를 코딩하는 삽입 DNA(서열번호 1의 뉴클레오타이드 258-

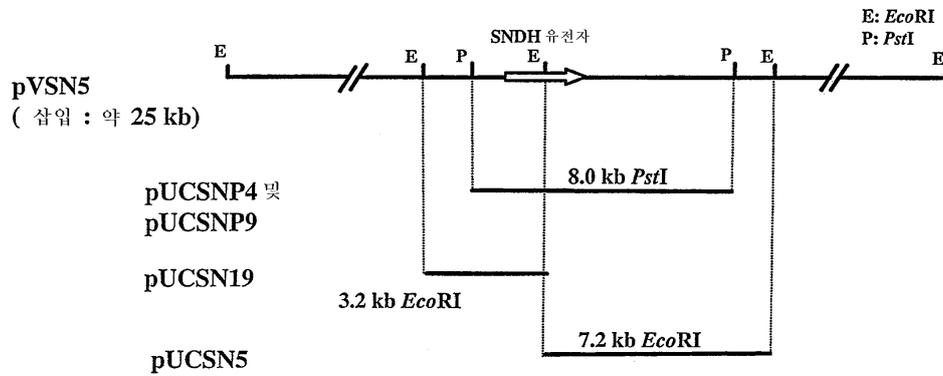
1955, 즉 서열번호 2의 아미노산 1-566)를 갖는다. 플라스미드 pVSN106 및 pVSN114는 무손상 SNDH 유전자를 코딩하는 삽입 DNA를 갖는다.

도면

도면1

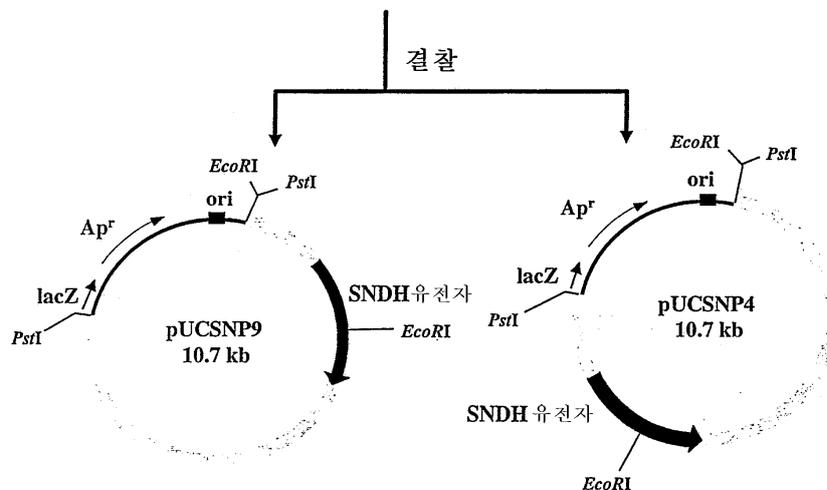


도면2



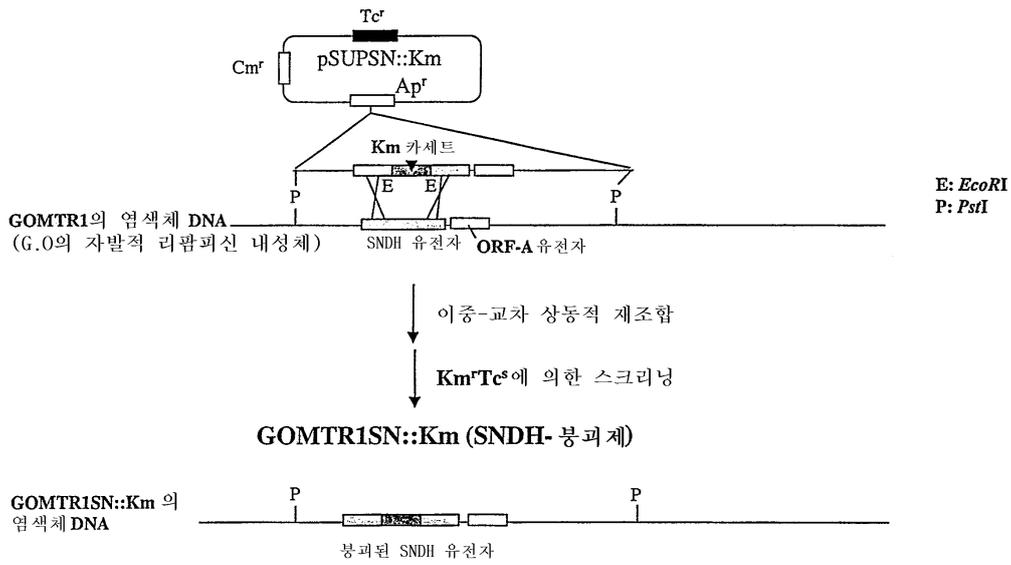
도면3

- pVSN5로부터의 무손상 SNDH 유전자를 포함하는 8.0 kb PstI 단편
- PstI로 소화된 pUC18 플라스미드 벡터

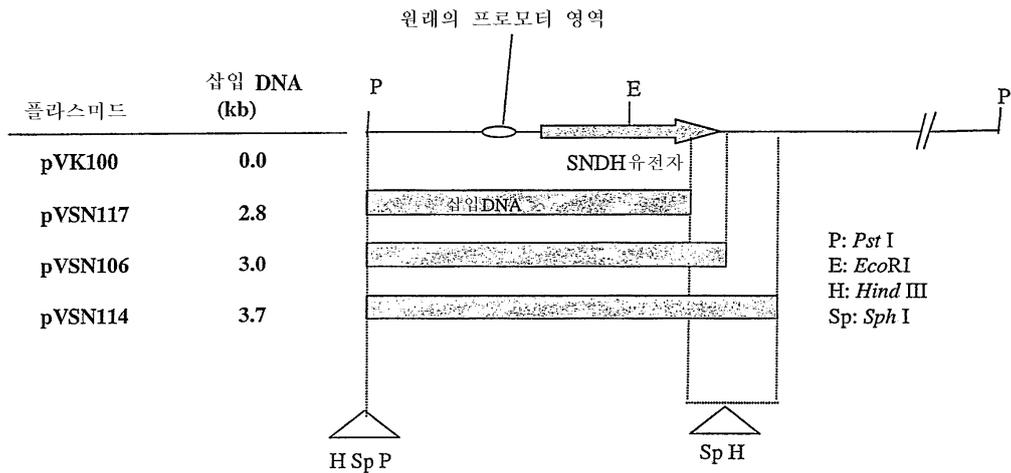


신규 SNDH ORF-A

도면4



도면5



서열 목록

- <110> Roche Vitamins AG
- <120> A gene encoding aldehyde dehydrogenase and use thereof
- <130> 21424
- <140><141>

- <160> 9
- <170> Patent In Ver. 3.1

- <210> 1
- <211> 3408
- <212> DNA
- <213> Gluconobacter oxydans
- <220>
- <221> CDS

<222> (258)..(2087)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2214)..(3317)

<400> 1

```

GCGACTGGCA GCAGCGCAAC TATGACCACT ATGGCCTGCC GCCCTATTGG 50
ATCTAACTGA TCCAGTAAGC CACCATCAGC CGGCCCTGC GGGGGCCGGC 100
TTTTTGCGCT AGACCCCGCC GAGGTGCTGT CGTAACCTAA GGTCACATCT 150
TACTTCCAC ATCCGCCCTT GTCAGTTCTG ACGTGACAAA TTGTCGCGGT 200
CATGCTGCTG AATGCGGATG CCAGTCCCAG ATCCAAGCCC GACGCAAGGA 250
GACGTAGATG TTACCCAAAT CATTGAAACA TAAGAATGGC GCCATGCGCC 300
TTGTCGAGC CTCGACCCTT GCGCTGATGA TCGGCGCGGG TGCCCATGCG 350
CAGGTA AACCGTCAAGT GCCGGTGGG GCGAACGAGA CCTTACCTC 400

GCGCGTGCTG ACCACCGGCC TGTCGAACCC TTGGGAAATC ACCTGGGGCC 450
CCGACAATAT GCTGTGGGTG ACCGAGCGAT CTCCGGCGA AGTGACGCGC 500
GTCGACCCCA ATACCGCGA GCAGCAGGTC CTGCTGACCC TGACCGATTT 550
CAGCGTCGAT GTCAACACC AGGGCCTACT TGGCCTCGCG CTGCATCCTG 600
AGTTTATGCA AGAGAGCGGC AACGACTACG TCTATATCGT CTACACTTAT 650
AACACCGGCA CCGAAGAAGC GCCCGATCCG CATCAAAAGC TGGTGCCTTA 700
TGCCTATGAC GCTGCCGCGC AGCAGCTGGT CGATCCGGTT GATCTGGTCG 750
CAGGCATTCC CGCAGGCAAC GACCACAATG GCGGTCGCAT CAAATTCGCC 800
CCCGATGGCC AACACATCTT TTACACGCTG GCGGAGCAAG GCGCGAACTT 850

TGGCGGTAAC TTCCGCCGTC CGAACACGC GCAACTGCTG CCGACGCAAG 900
AGCAGGTCGA CGCGGGCGAT TGGGTGCGCT ATTCGGGCAA GATCCTGCGC 950
GTGAACCTTG ACGGCACGAT CCCCGAAGAC AACCCCGAGA TCGAGGGCGT 1000
GCGTAGCCAT ATCTTTACCT ATGGCCACCG TAACCCGCG GGCATCACCT 1050
TTGGCCCGA CGGCACCATT TATGCCACCG AACACGGCCC CGATACGGAT 1100
GACGAGCTGA ACATCATCGC CGGCGGTGGC AACTATGGGT GGCCGAATGT 1150
GGCCGGCTAT CGCGATGGCA AATCCTATGT CTACGCTGAT TGGAGCCAAG 1200
CGCCCGCTGA CCAGCGTTAC ACCGGTCGCG CCGGTATCCC CGACACCGTG 1250
CCGCAATTCC CCGAGCTGGA ATTCGCGCCC GAGATGGTCG ATCCGCTGAC 1300

AACCTATTGG ACGGTGGATA ATGATTACGA TTTCACCGCC AATTGCGGCT 1350
GGATCTGTAA TCCGACGATC GCGCCTTCGT CTGCCTATTA CTATGCGGCG 1400
GGCGAGAGCG GTATCGCGG TTGGGATAAT TCGATCCTGA TCCCAGCGCT 1450
GAAACATGCG GCATCTATG TGCAGCACCT CAGCGATGAT GGCCAATCTG 1500
TCGACGGCCT GCCCGAGCTG TGGTTCAGCA CCCAGAACCG CTATCGCGAT 1550
ATCGAGATCA GCCCGATAA CCATGTTTTT GTGGCGACCG ACAACTTTGG 1600
CACCTCGGCG CAGAAATATG GCGAGACCGG CTTTACCAAC GTGCTGCATA 1650
ACCCCGGCGC GATCCTTGTC TTTAGCTATG TCGGCGAGGA TGCTGCGGGT 1700
CAGACCGGAA TGATGACCGC GCCCGACCG CAGACGCAAT ACACGCAAGT 1750

GCCCGCCGAG GGTGCAGGCG CGGGCGCGAC TGAGGTTGCG GATGTCGATT 1800
ACGACACGCT GTTACCGGAA GGCCAGACCC TTTATGGCAG CGCATGTGCC 1850
GCGTGCCATG GTGCCGCTGG CCAAGGTGCG CAGGGCCCGA CCTTTGTGGG 1900
CGTGCCGGAT GTGACGGGTG ACAAGGACTA CCTTGCCCGC ACCATCATCC 1950
ACGGTTTTGG CTATATGCCG TCGTTTTGCGA CTCGGCTGGA TGACGAGGAG 2000
GTTGCCGCCA TCGGACCTT TATCCGCAAC AGCTGGGGCA ATGACGAAGG 2050
CATCTGACC CCGGCCGAGG CCGCTGCCAC CCGCTGAATG CTGTAAAAAC 2100
CACCCTCGCC TGCACATCAG GCGGGGGTAT TTCATTTATT TTCACATCTG 2150
CCTTTGACAT GTGCCGCTAT CACGGTTAAT GCGGCCCTTC GGCTGTTCTG 2200

GGTCTAAGCG GGTGTGTTGC CCGATAAGAG AGACGGTTCA GTCCTCCCG 2250
    
```

CCCTATTTAG GGCCATTTA GGCAGAATAG TTTTACTCA TCAAAATATC 2300
 GCCGCGCCTC TGGCCGCGGC CCTTTCGCAA CGTGGATATG AAACGCTGAC 2350
 CGCCGTGCAG CAAGCTGTGC TTGCGCCCGA GGCTGATGGC CGCGACCTGC 2400
 TGGTGTGCGC ACAGACCGGT TCGGGTAAGA CGGTGGCCTT TGGTATCGCA 2450
 GTCGCGCCCG ACCTTTTGGG CGACGACAAT ATCCTGCCGC TGAACACGCC 2500
 GCCTGTTGCG CTGTTTCATCG CCCCCACGCG CGAGCTTGCG CTGCAAGTTG 2550
 CTCAGGAAC TACCTGGCTT TACGCCAATG CAGGTGCCCA GATCGCGACC 2600
 TCGTTCGCGG GTATGGATTA CCGCACCGAG CGCCGCGCCC TTGCACGTCT 2650

GCCGCAAATC GTTGTGCGCA CGCCCGGCG TCTGCGCGAC CATATCGACC 2700
 GTGGCGGCCT TGACCTGTCC GAATTGCGCG TGACCGTGCT GGACGAAGCG 2750
 GATGAGATGC TCGACCTCGG CTTCCGCGAT GATCTGCAAT ATATCTTGCA 2800
 AGCCGCGCCC GAAGATCGCC GCACGCTGAT GTTCTCGGCC ACCGTGCCGC 2850
 GCGAGATTGA AAAACTGGCC CGCGACTTCC AAAATGACGC CCTGCGTCTG 2900
 GAAACCCGTG GCGAGGCCAA GCAGCACAAC GACATCAGCT ACCAAGCTTT 2950
 GTCGCTACCC ATGCGCGATC GCGAAAACGC CATTTTCAAC ATGCTGCGTT 3000
 TTTATGAATC GCGCACGGCG ATCATCTTCT GCAAGACCCG CGCCAATGTG 3050
 AATGATCTGC TGTCGCGGAT GAGCGGTCTG GGCTTCCGCG TGGTGGCCCT 3100

GTCGGGCGAG CTGTCGCAAC AGGAACGCAC CAACGCGCTG CAAGCGCTGC 3150
 GTGATGGCCG CGCCAACGTT TGTATCGCGA CCGACGTGCG GCGCGCGGCG 3200
 ATTGACTTGC CGGCCTCGA GCTGGTGATC CACTACGATC TGCCGACCAA 3250
 TGCCGAAACC CTGCTGCACC GCTCGGGCCG TACCGGCCGC CGGGTGCCAA 3300
 GGGCGTCTCG GCGCTGATCG TCACCCCGG CGATTTCAAA AAAGCGCAGC 3350
 GTTTGCTGAG CTTTGCCAAA GTGACCGCGG AATGGGGCAA GCGCCTTCG 3400
 GCCGAAGA 3408

<210> 2
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> Gluconobacter oxydans
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(31)
 <220>
 <221> CHAIN
 <222> (32)..(609)

<400> 2
 Met Leu Pro Lys Ser Leu Lys His Lys Asn Gly Ala Met Arg Leu 15

Val Ala Ala Ser Thr Leu Ala Leu Met Ile Gly Ala Gly Ala His 30

Ala Gln Val Asn Pro Val Glu Val Pro Val Gly Ala Asn Glu Thr 45

Phe Thr Ser Arg Val Leu Thr Thr Gly Leu Ser Asn Pro Trp Glu 60

Ile Thr Trp Gly Pro Asp Asn Met Leu Trp Val Thr Glu Arg Ser 75

Ser Gly Glu Val Thr Arg Val Asp Pro Asn Thr Gly Glu Gln Gln 90

Val Leu Leu Thr Leu Thr Asp Phe Ser Val Asp Val Gln His Gln 105

Gly Leu Leu Gly Leu Ala Leu His Pro Glu Phe Met Gln Glu Ser 120

Gly Asn Asp Tyr Val Tyr Ile Val Tyr Thr Tyr Asn Thr Gly Thr 135

Glu Glu Ala Pro Asp Pro His Gln Lys Leu Val Arg Tyr Ala Tyr 150

Asp Ala Ala Ala Gln Gln Leu Val Asp Pro Val Asp Leu Val Ala 165

Gly Ile Pro Ala Gly Asn Asp His Asn Gly Gly Arg Ile Lys Phe 180

Ala Pro Asp Gly Gln His Ile Phe Tyr Thr Leu Gly Glu Gln Gly 195

Ala Asn Phe Gly Gly Asn Phe Arg Arg Pro Asn His Ala Gln Leu 210

Leu Pro Thr Gln Glu Gln Val Asp Ala Gly Asp Trp Val Ala Tyr 225

Ser Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Leu Asp Gly Thr Ile Pro Glu 240

Asp Asn Pro Glu Ile Glu Gly Val Arg Ser His Ile Phe Thr Tyr 255

Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Ile Thr Phe Gly Pro Asp Gly Thr 270

Ile Tyr Ala Thr Glu His Gly Pro Asp Thr Asp Asp Glu Leu Asn 285

Ile Ile Ala Gly Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly 300

Tyr Arg Asp Gly Lys Ser Tyr Val Tyr Ala Asp Trp Ser Gln Ala 315

Pro Ala Asp Gln Arg Tyr Thr Gly Arg Ala Gly Ile Pro Asp Thr 330

Val Pro Gln Phe Pro Glu Leu Glu Phe Ala Pro Glu Met Val Asp 345

Pro Leu Thr Thr Tyr Trp Thr Val Asp Asn Asp Tyr Asp Phe Thr 360

Ala Asn Cys Gly Trp Ile Cys Asn Pro Thr Ile Ala Pro Ser Ser 375

Ala Tyr Tyr Tyr Ala Ala Gly Glu Ser Gly Ile Ala Ala Trp Asp 390

Asn Ser Ile Leu Ile Pro Thr Leu Lys His Gly Gly Ile Tyr Val 405

Gln His Leu Ser Asp Asp Gly Gln Ser Val Asp Gly Leu Pro Glu 420

Leu Trp Phe Ser Thr Gln Asn Arg Tyr Arg Asp Ile Glu Ile Ser 435

Pro Asp Asn His Val Phe Val Ala Thr Asp Asn Phe Gly Thr Ser 450

Ala Gln Lys Tyr Gly Glu Thr Gly Phe Thr Asn Val Leu His Asn 465

Pro Gly Ala Ile Leu Val Phe Ser Tyr Val Gly Glu Asp Ala Ala 480

Gly Gln Thr Gly Met Met Thr Ala Pro Ala Pro Gln Thr Gln Tyr 495

Thr Gln Val Pro Ala Glu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Glu Val 510

Ala Asp Val Asp Tyr Asp Thr Leu Phe Thr Glu Gly Gln Thr Leu 525

Tyr Gly Ser Ala Cys Ala Ala Cys His Gly Ala Ala Gly Gln Gly 540

Ala Gln Gly Pro Thr Phe Val Gly Val Pro Asp Val Thr Gly Asp 555

Lys Asp Tyr Leu Ala Arg Thr Ile Ile His Gly Phe Gly Tyr Met 570

Pro Ser Phe Ala Thr Arg Leu Asp Asp Glu Glu Val Ala Ala Ile 585

Ala Thr Phe Ile Arg Asn Ser Trp Gly Asn Asp Glu Gly Ile Leu 600

Thr Pro Ala Glu Ala Ala Ala Thr Arg 609

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 3

Gln [Xaa/Gly] Asn [Pro/Lys] Val Glu Val Pro Val Gly Ala Asn Glu Thr 14

<210> 4
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Gluconobacter oxydans

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(31)

<400> 4
 Met Leu Pro Lys Ser Leu Lys His Lys Asn Gly Ala Met Arg Leu 15

Val Ala Ala Ser Thr Leu Ala Leu Met Ile Gly Ala Gly Ala His 30

Ala 31

<210> 5
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> Gluconobacter oxydans

<220>
 <221> CHAIN
 <222> (1)..(578)

<400> 5
 Gln Val Asn Pro Val Glu Val Pro Val Gly Ala Asn Glu Thr Phe 15

Thr Ser Arg Val Leu Thr Thr Gly Leu Ser Asn Pro Trp Glu Ile 30

Thr Trp Gly Pro Asp Asn Met Leu Trp Val Thr Glu Arg Ser Ser 45

Gly Glu Val Thr Arg Val Asp Pro Asn Thr Gly Glu Gln Gln Val 60

Leu Leu Thr Leu Thr Asp Phe Ser Val Asp Val Gln His Gln Gly 75

Leu Leu Gly Leu Ala Leu His Pro Glu Phe Met Gln Glu Ser Gly 90

Asn Asp Tyr Val Tyr Ile Val Tyr Thr Tyr Asn Thr Gly Thr Glu 105

Glu Ala Pro Asp Pro His Gln Lys Leu Val Arg Tyr Ala Tyr Asp 120

Ala Ala Ala Gln Gln Leu Val Asp Pro Val Asp Leu Val Ala Gly 135

Ile Pro Ala Gly Asn Asp His Asn Gly Gly Arg Ile Lys Phe Ala 150

Pro Asp Gly Gln His Ile Phe Tyr Thr Leu Gly Glu Gln Gly Ala 165

Asn Phe Gly Gly Asn Phe Arg Arg Pro Asn His Ala Gln Leu Leu 180

Pro Thr Gln Glu Gln Val Asp Ala Gly Asp Trp Val Ala Tyr Ser 195

Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Leu Asp Gly Thr Ile Pro Glu Asp 210

Asn Pro Glu Ile Glu Gly Val Arg Ser His Ile Phe Thr Tyr Gly 225

His Arg Asn Pro Gln Gly Ile Thr Phe Gly Pro Asp Gly Thr Ile 240

Tyr Ala Thr Glu His Gly Pro Asp Thr Asp Asp Glu Leu Asn Ile 255

Ile Ala Gly Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr 270

Arg Asp Gly Lys Ser Tyr Val Tyr Ala Asp Trp Ser Gln Ala Pro 285

Ala Asp Gln Arg Tyr Thr Gly Arg Ala Gly Ile Pro Asp Thr Val 300

Pro Gln Phe Pro Glu Leu Glu Phe Ala Pro Glu Met Val Asp Pro 315

Leu Thr Thr Tyr Trp Thr Val Asp Asn Asp Tyr Asp Phe Thr Ala 330

Asn Cys Gly Trp Ile Cys Asn Pro Thr Ile Ala Pro Ser Ser Ala 345

Tyr Tyr Tyr Ala Ala Gly Glu Ser Gly Ile Ala Ala Trp Asp Asn 360

Ser Ile Leu Ile Pro Thr Leu Lys His Gly Gly Ile Tyr Val Gln 375

His Leu Ser Asp Asp Gly Gln Ser Val Asp Gly Leu Pro Glu Leu 390

Trp Phe Ser Thr Gln Asn Arg Tyr Arg Asp Ile Glu Ile Ser Pro 405

Asp Asn His Val Phe Val Ala Thr Asp Asn Phe Gly Thr Ser Ala 420

Gln Lys Tyr Gly Glu Thr Gly Phe Thr Asn Val Leu His Asn Pro 435

Gly Ala Ile Leu Val Phe Ser Tyr Val Gly Glu Asp Ala Ala Gly 450

Gln Thr Gly Met Met Thr Ala Pro Ala Pro Gln Thr Gln Tyr Thr 465

Gln Val Pro Ala Glu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Glu Val Ala 480

Asp Val Asp Tyr Asp Thr Leu Phe Thr Glu Gly Gln Thr Leu Tyr 495

Gly Ser Ala Cys Ala Ala Cys His Gly Ala Ala Gly Gln Gly Ala 510

Gln Gly Pro Thr Phe Val Gly Val Pro Asp Val Thr Gly Asp Lys 525

Asp Tyr Leu Ala Arg Thr Ile Ile His Gly Phe Gly Tyr Met Pro 540

Ser Phe Ala Thr Arg Leu Asp Asp Glu Glu Val Ala Ala Ile Ala 555

Thr Phe Ile Arg Asn Ser Trp Gly Asn Asp Glu Gly Ile Leu Thr 570

Pro Ala Glu Ala Ala Ala Thr Arg 578

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

carggyaacc csgtbga

17

<210> 7

<211> 17

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> 9
<223> n is a or g or c or t

<400> 7
gtytcgttng crccvac 17

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8
cagggtaacc cggtc 15

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9
gactcgtttg cgccc 15