



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월22일

(11) 등록번호 10-1562528

(24) 등록일자 2015년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/06 (2006.01) *C12M 1/40* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) *C12Q 1/28* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-7024299
 (22) 출원일자(국제) 2013년01월29일
 심사청구일자 2014년08월29일
 (85) 번역문제출일자 2014년08월29일
 (65) 공개번호 10-2014-0116557
 (43) 공개일자 2014년10월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2013/051894
 (87) 국제공개번호 WO 2013/115180
 국제공개일자 2013년08월08일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2012-016165 2012년01월30일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02006129513 A1

(73) 특허권자
아지노모토 가부시카가이사
 일본국 도쿄도 주오구 교바시 1쵸메15반1고
토야마켄
 일본 토야마 토야마시 신소우가와 1-7 (우:
 930-8501)
 (72) 발명자
아사노 야스히사
 일본 토야마켄 9390398 이미즈시 쿠로카와 5180
 토야마켄 유니버시티 내
마쓰이 다이스케
 일본 토야마켄 9390398 이미즈시 쿠로카와 5180
 토야마켄 유니버시티 내
 (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **신규 L-아미노산 옥시다제, L-라이신의 측정 방법, 키트 및 효소 센서**

(57) 요약

변이형 효소를 이용한 L-라이신의 측정 방법, L-라이신 측정용 키트, 및 효소 센서를 제공한다. 소정의 아미노산 변이를 가지며, L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 변이형 L-아미노산 옥시다제, 및 이의 변이형 효소를 이용한 L-라이신의 측정 방법, L-라이신 측정용 키트 및 효소 센서.

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2에 나타난 아미노산 서열에서 제254번째의 시스테인이 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 알라닌, 글리신, 발린, 이소류신, 류신, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 글루타민산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 또는 프롤린으로 치환된 아미노산 서열로 이루어진 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 254번째 아미노산이 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 아스파라긴산, 글루타민산 또는 세린인, 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 254번째 아미노산이 이소류신 또는 티로신인, 단백질.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제2항에 기재된 단백질을 코딩하는, 핵산.

청구항 6

제5항에 기재된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 7

제6항에 기재된 벡터에 의해 형질전환된, 형질전환체.

청구항 8

이하의 공정을 포함하는, L-라이신을 검출 또는 정량하는 방법:

(A) 물과 산소의 존재 하에, 검체와 제1항 또는 제2항에 기재된 단백질을 유지하는 공정; 및

(B) 상기 단백질의 L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 작용에 의해 반응액 중에 생성되는 반응 생성물 중 적어도 하나를 검출 또는 정량하는 공정

을 포함하는, 상기 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 공정 (B)에서 검출 또는 정량하는 반응 생성물이 과산화수소인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 과산화수소를, 퍼옥시다제를 이용하여 검출 또는 정량하는, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 공정 (B)에서 검출 또는 정량하는 반응 생성물이 암모니아인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 암모니아를, 암모니아 검출 시약을 이용하여 검출 또는 정량하는, 방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 공정 (B)에서 검출 또는 정량하는 반응 생성물이 L-라이신의 탈아미노화 생성물인, 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 기재된 단백질을 포함하는, L-라이신의 검출 또는 정량용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서, 반응용 완충액, 과산화수소 검출 시약, 암모니아 검출 시약, 및 L-라이신의 탈아미노화 생성물 검출 시약 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 16

과산화수소 검출용 전극을 포함하는, L-라이신 검출 또는 정량용 효소 센서로서,

상기 과산화수소 검출용 전극의 표면 또는 근방에 제1항 또는 제2항에 기재된 단백질이 배치되어 있는, 상기 센서.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 과산화수소 검출용 전극은, 효소식 과산화수소 전극 또는 격막식 과산화수소 전극인, 센서.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원의 상호 참조

[0001]

본 출원은, 2012년 1월 30일 출원인 일본 특원 2012-16165호에 대한 우선권을 주장하고, 이의 전체 기재는, 여기에 구체적으로 개시되어 채용된다.

[0002]

기술 분야

[0003]

본 발명은, 신규 L-아미노산 옥시다제, 및 이의 신규 L-아미노산 옥시다제를 사용한 L-라이신의 측정 방법, 이에 사용되는 키트 및 효소 센서에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은, L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 변이형 L-아미노산 옥시다제, 및 이의 변이형 효소를 이용한 L-라이신의 측정 방법, L-라이신 측정용 키트 및 효소 센서에 관한 것이다.

[0004]

배경 기술

[0005]

L-라이신은, 단백질 구성 아미노산의 하나이지만, 체내에서 생산할 수 없는 필수 아미노산이다. L-라이신을 포함한 아미노산의 농도는, 생체 내에서는 항상성이 유지되고 있지만, 선천성 대사 이상이나 내장 질환에 의해 혈중 농도가 크게 변동된다. L-라이신에 한정되지 않고, 생체 내의 아미노산 농도는 질병을 검출하는 유용한 수단이 될 수 있다. 이 때문에, 1종류 또는 많은 종류의 아미노산의 혈중 농도를 측정함으로써, 이러한 질병을 검출하는 것이 가능하게 된다(특허문헌 1 및 비특허문헌 1).

[0006]

최근, 아미노산의 정량법으로서 효소를 이용하는 방법이 다수 알려져 있다. 효소를 이용하는 방법은, 기기 분석적 방법과 비교하여 저렴하고 단순하게 행할 수 있다는 이점이 있다. 정량용 효소로서는, 예를 들면, 데하이드로게나제 또는 옥시다제가 많이 사용된다. 옥시다제를 사용하는 경우, 아미노산 옥시다제를 작용시킴으로써 생성되는 과산화수소를, 퍼옥시다제로 검출하고 정량하는 방법이 열거된다(특허문헌 2). 이의 검출 및 정량에는 비색법, 형광법, 전극법의 여러가지 방법도 이용 가능하다.

[0007]

L-라이신의 정량법으로서도 효소를 이용하는 방법이 알려져 있다. 예를 들면, 옥시다제에 의한 정량에는 L-라이신 α 옥시다제[EC 1.4.3.14]가 사용되어 왔다. 트리코더마·비리데 유래의 L-라이신 α 옥시다제는 다른 L-아미노산 옥시다제에 비하여 기질 특이성이 높고, 시판되고 있기 때문에 효소 센서 등의 소자로서 이용되어 왔다(비특허문헌 2, 비특허문헌 3, 및 비특허문헌 4).

[0008]

또한, 슈도모나스·플루오레스센스(Pseudomonas fluorescens) 유래의 L-라이신 모노옥시게나제에 L-라이신 옥시다제 활성이 있다고 하는 보고가 있다(비특허문헌 5 및 비특허문헌 6). 이 효소는 L-라이신, L-오르니틴, L-아르

기닌을 기질로 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 국제 공개 W02006/129513호 공보
- (특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본 특개 소55-43409호 공보

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Anal. Chem. 81: 307-314 (2009)
- (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Sens. Actuators, B 126: 424-430 (2007)
- (비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Anal. Bioanal. Chem. 391: 1255-1261 (2008)
- (비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Anal. Bioanal. Chem. 406: 19-23 (2010)
- (비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: J. Biol. Chem. 249: 2579-2586 (1974)
- (비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: J. Biol. Chem. 249: 2587-2592 (1974)

발명의 내용

[0011] 발명의 개요

[0012] 그러나, 트리코더마·비리데 유래의 L-라이신 α-옥시다제는, L-라이신 이외의 아미노산에 대해서도 옥시다제 활성을 나타낸다. 이 때문에, 혈장과 같은 많은 종류의 아미노산을 함유하는 시료를 L-라이신 α-옥시다제를 사용하여 정량하는 경우, 과잉 평가되는 경향이 있다.

[0013] 또한, 최근, 상기 L-라이신 α-옥시다제에 비하여, 기질 특이성이 높은 해수어(海水魚)의 점액 유래의 L-라이신 α-옥시다제가 보고되어있다(비특허문헌 3). 그러나, 이의 L-라이신 α-옥시다제는, 해수어의 점액 유래이며, 배양에 의한 효소 생산에 대한 보고는 없다. 따라서, 이 효소를 대량 생산하여 L-라이신의 정량에 이용하는 것은 곤란하다.

[0014] 또한, 슈도모나스·플루오레센스 유래의 L-라이신 모노옥시게나제를 L-라이신 정량에 이용한 보고는 없다. 또한, 이 효소를 L-라이신 정량에 이용했다고 해도, 상술한 바와 같이, L-라이신 이외의 L-오르니틴 및 L-아르기닌에 대해서도 옥시게나제 활성을 갖는다는 점에서는, 혈장과 같은 많은 종류의 아미노산을 함유하는 시료에 대해서는 L-라이신의 정량을 엄밀하게 행할 수 없다.

[0015] L-라이신 옥시다제에 의한 정량법은, 실현될 수 있으면, 기기 분석적 방법에 비하여 저렴하고 간이적으로 행할 수 있다는 관점에서 유용하다. 그러나, 상술한 바와 같이, 혈장과 같은 많은 종류의 아미노산을 함유하는 시료에 대해서는, 현재까지 이용 가능한 효소로는, 기질 특이성이 낮거나, 또는 효소 생산성에 문제가 있는 등의 점에서 실용에 제공할 수 있는 상황이 아니었다.

[0016] 그래서, 본 발명은, 많은 종류의 아미노산을 함유하는 생체 시료에 있어서도 L-라이신을 특이적으로 정량 가능한 효소로서, L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 효소를 제공하는 것, 또한 이 효소를 이용한 L-라이신 효소 측정법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은, 상기 효소적 측정법을 실시할 때에 이용할 수 있는 측정용의 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은, 상기 효소적 측정법에 이용할 수 있는 효소 센서를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0019] 본 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위해 예의 검토한 결과, 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3주에서 유래하는 상기 L-아미노산 옥시다제의 아미노산 서열에서 제254번째의 시스테인을 소정의 아미노산으로 치환함으로써 얻어지는 변이형 L-아미노산 옥시다제가 L-라이신에 대하여 높은 기질 특이성을 갖는 것을 발견하였

다. 본 발명은 이러한 지견에 의해 완성된 것이다.

[0020]

즉, 본 발명은, 이하에 나타낸 바와 같다.

[0021]

[1]

[0022]

하기의 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 단백질:

[0023]

(1) 서열번호 2에 나타낸 아미노산 서열에서 제254번째의 시스테인이 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 알라닌, 글리신, 발린, 이소류신, 류신, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 글루타민산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 또는 프롤린으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 단백질;

[0024]

(2) 상기 (1)에 규정된 단백질에 있어서, 상기 제254번째 아미노산을 제외한 영역 중에서 1개 또는 수개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 또한, 서열번호 2에 나타낸 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질; 또는

[0025]

(3) 상기 (1)에 규정된 단백질의 아미노산 서열에 대하여 적어도 67%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 또한, 서열번호 2에 나타낸 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질[단, 당해 단백질의 아미노산 서열에 있어서 상기 제254번째의 아미노산에 대응하는 아미노산은 변하지 않는 것으로 한다].

[0026]

[2]

[0027]

상기 254번째 아미노산이 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 아스파라긴산, 글루타민산 또는 세린인, [1]에 기재된 단백질.

[0028]

[3]

[0029]

상기 254번째의 아미노산이 이소류신 또는 티로신인, [1] 또는 [2]에 기재된 단백질.

[0030]

[4]

[0031]

상기 (2) 또는 (3)으로 규정되고, 제254번째의 시스테인이 트립토판, 글리신, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 또는 프롤린 이외의 아미노산으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 단백질에 있어서, 당해 단백질의 L-라이신에 대한 옥시다제 활성을 100%로 한 경우, 상기 단백질의 L-아르기닌에 대한 옥시다제 활성이 15% 이하이고, 또한, L-오르니틴에 대한 옥시다제 활성이 80% 이하인, [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 기재된 단백질.

[0032]

[5]

[0033]

[1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 단백질을 코딩하는, 핵산.

[0034]

[6]

[0035]

[5]에 기재된 핵산을 포함하는, 벡터.

[0036]

[7]

[0037]

[6]에 기재된 벡터에 의해 형질전환된, 형질전환체.

[0038]

[8]

[0039]

이하의 공정을 포함하는, L-라이신을 검출 또는 정량하는 방법:

[0040]

(A) 물과 산소의 존재 하에, 검체와 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 단백질을 유지하는 공정; 및

[0041]

(B) 상기 단백질의 L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 작용에 의해 반응액 중에 생성되는 반응 생성물 중 적어도 하나를 검출 또는 정량하는 공정

[0042]

을 포함하는, 상기 방법.

[0043]

[9]

[0044]

공정 (B)에서 검출 또는 정량하는 반응 생성물이 과산화수소인, [8]에 기재된 방법.

- [0045] [10]
- [0046] 상기 과산화수소를, 퍼옥시다제를 이용하여 검출 또는 정량하는, [9]에 기재된 방법.
- [0047] [11]
- [0048] 공정 (B)에서 검출 또는 정량하는 반응 생성물이 암모니아인, [8]에 기재된 방법.
- [0049] [12]
- [0050] 암모니아를, 암모니아 검출 시약을 이용하여 검출 또는 정량하는, [11]에 기재된 방법.
- [0051] [13]
- [0052] 공정 (B)에서 검출 또는 정량하는 반응 생성물이 L-라이신의 탈아미노화 생성물인, [8]에 기재된 방법.
- [0053] [14]
- [0054] [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 단백질을 포함하는, L-라이신의 검출 또는 정량용 키트.
- [0055] [15]
- [0056] 반응용 완충액, 과산화수소 검출 시약, 암모니아 검출 시약, 및 L-라이신의 탈아미노화 생성물 검출 시약 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, [14]에 기재된 키트.
- [0057] [16]
- [0058] 과산화수소 검출용 전극을 포함하는, L-라이신 검출 또는 정량용 효소 센서로서,
- [0059] 상기 과산화수소 검출용 전극의 표면 또는 근방에 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 단백질이 배치되어 있는, 상기 센서.
- [0060] [17]
- [0061] 상기 과산화수소 검출용 전극은, 효소식 과산화수소 전극 또는 격막식 과산화수소 전극인, [16]에 기재된 센서.
- [0062] 본 발명에 의하면, L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 신규의 변이형 L-아미노산 옥시다제를 제공할 수 있다. 이 변이형 L-아미노산 옥시다제를 이용함으로써, 다른 아미노산 등 많은 협잡물을 포함하는 시료에 있어서도 L-라이신을 특이적이고, 정밀도가 양호한 간편·신속한 검출 및 정량이 가능하다. 특히, 혈장, 혈청 또는 뇨와 같은 생체 시료에 대하여 본 발명은 유효하고, 퍼옥시다제 등의 효소와 커플링함으로써 발색법이나 형광법으로 L-라이신을 정량할 수 있을 뿐만 아니라, 전극형 효소 센서를 제공하는 것이 가능하다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0063] [도 1] 도 1은, 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래의 L-아미노산 옥시다제(야생형 효소)가 촉매하는 L-라이신을 기질로 한 모노옥시게나제 반응 및 옥시다제 반응의 반응 기구와 이의 비율을 도시한다.
- [도 2] 도 2는, 상기 야생형 효소의 SDS-PAGE의 사진을 도시한다.
- [도 3] 도 3은, 상기 야생형 효소를 코딩하는 염기 서열로부터 예측되는 아미노산 서열을 도시한다.
- [도 4] 도 4는, 상기 야생형 효소의 아미노산 서열, 본 발명의 단백질인 변이형 효소 C254I의 아미노산 서열, 및 공지의 호모로그 유전자의 아미노산 서열에 대해서 정렬 분석을 행한 결과를 도시한다. 도 4에서, LysOX Wild type은 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래의 L-아미노산 옥시다제, LysOX C254I는 본 발명의 변이형 효소 C254I를 나타내고, 그 이외는 공지의 아미노산 서열은 액세스 번호로 나타내어진다.
- [도 5] 도 5는, 도 4에 나타난 정렬 분석을 상세하게 도시한다.
- [도 6] 도 6은, 실시예에 있어서 정제된 야생형 효소의 L-라이신(Lys) L-오르니틴(Orn), 및 L-아르기닌(Arg)에 대한 효소 활성(pH 의존성)을 도시한다.
- [도 7] 도 7은, 실시예에 있어서 정제된 야생형 효소 표본을 이용한 1 ~ 6mM의 L-라이신 수용액을 검체로 한 경우의 L-라이신 농도와 492nm에서의 흡광도(absorbance)와의 상관 관계를 도시한다.
- [도 8] 도 8은, 야생형 효소 및 본 발명의 변이형 효소 C254I 대해서, L-라이신, L-오르니틴, 및 L-아르기닌을

기질로 하여 효소 활성(pH 의존성)을 조사한 결과를 도시한다.

[도 9] 도 9는, 야생형 효소 및 본 발명의 변이형 효소 C254I 대하여 기질 특이성을 조사한 결과를 도시한다.

[도 10] 도 10은, 야생형 효소 및 본 발명의 변이형 효소 C254I를 이용하여 1 ~ 10mM의 L-라이신 수용액을 시료로 한 경우의 L-라이신 농도와 흡광도(absorbance)와의 관계를 도시한다. 도 10에 있어서, LysOX Wild type이 야생형 효소의 결과를 나타내고, LysOX C254I가 본 발명의 변이형 효소 C254I의 결과를 나타낸다.

[도 11] 도 11은, 야생형 효소의 아미노산 서열에 있어서의 제254번째 시스테인을 각종 아미노산에 변이시켜 얻어진 각종 변이형 효소의 기질 특이성을 조사한 결과를 도시한다.

[도 12] 도 12는, 도 11의 결과에 관하여, L-라이신에 대한 옥시다제 활성을 100%로 하여 L-아르기닌 및 L-오르니틴의 상대 활성을 도시한다.

[도 13] 도 13은, L-라이신, L-아르기닌, 및 L-오르니틴을 첨가한 혈장 샘플에 대해서 야생형 효소를 이용하여 각 아미노산을 정량한 결과를 도시한다.

[도 14] 도 14는, L-라이신, L-아르기닌, 및 L-오르니틴을 첨가한 혈장 샘플에 대해서 본 발명의 변이형 효소 C254I를 이용하여 각 아미노산을 정량한 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0064] <변이형 L-아미노산 옥시다제>
- [0065] 본 발명은, 하기의 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 단백질에 관한 것이다.
- [0066] (1) 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열에서 제254번째의 시스테인이 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 알라닌, 글리신, 발린, 이소류신, 류신, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 글루타민산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 또는 프롤린으로 치환된 아미노산 서열을 갖는 단백질;
- [0067] (2) 상기 (1)에 규정된 단백질에 있어서, 상기 제254번째 아미노산을 제외한 영역 중에서 1개 또는 수개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 또한, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질; 또는
- [0068] (3) 상기 (1)에 규정된 단백질의 아미노산 서열에 대하여 적어도 67%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 또한, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질[단, 당해 단백질의 아미노산 서열에 있어서 상기 제254번째의 아미노산에 대응하는 아미노산은 변이하지 않는 것으로 한다].
- [0069] 상기 (1)에 기재된 단백질에 있어서, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열은 슈도모나스속 균주를 새롭게 자연계로부터 분리하고, 본 슈도모나스속에 속하는 미생물이 생산하는 L-아미노산 옥시다제를 코딩하는 유전자를 클로닝함으로써 얻어지는 것이다. 이 점에 대해서는 실시예에서 상술한다.
- [0070] 상기 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 단백질은, 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, L-아미노산 옥시다제 활성을 갖는 단백질이다. 상기 단백질이 갖는 L-아미노산 옥시다제 활성은, 산소 및 물의 존재 하에 pH 7.0(30℃)에서 L-라이신, L-오르니틴, 및 L-아르기닌의 각각에 작용하여 과산화수소와 암모니아를 생성하는 활성이다. 본 명세서에서는, 이하, L-라이신, L-오르니틴, 및 L-아르기닌 대한 상기 옥시다제 활성을 각각 L-라이신 옥시다제 활성, L-오르니틴 옥시다제 활성 및 L-아르기닌 옥시다제 활성이라고 말한다. 또한, 이들 옥시다제 활성은 이하의 실시예에 기재된 측정 시약 및 측정 방법을 이용함으로써 측정할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 상기 (1)에 규정된 단백질은, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열에서 제254번째 시스테인을 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 알라닌, 글리신, 발린, 이소류신, 류신, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴산, 글루타민산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 또는 프롤린으로 치환함으로써 얻어지는 변이형 L-아미노산 옥시다제이다. 상기 제254번째 아미노산을 이들 아미노산으로 치환하여 얻어지는 단백질은, 실시예에 나타내는 바와 같이, 서열번호 2에 나타내는 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 특이성이 높다.
- [0072] 「서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성」을 갖는 본 발명의 단백질은, 야생형 아미노산 옥시다제(이하, 야생형 효소)와 비교하

여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 상대적으로 높은 단백질을 말한다. 구체적으로는, 야생형 효소와 비교하여, L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-아르기닌 옥시다제 활성의 비율이, L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-오르니틴 옥시다제 활성의 비율이, 또는 L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-아르기닌 옥시다제 활성의 비율 및 L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-오르니틴 옥시다제 활성의 비율 둘 다가 낮은 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 「서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성」을 갖는 단백질로서는, L-라이신에 대한 기질 특이성이 보다 높다고 하는 관점에서는, L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-아르기닌 옥시다제 활성의 비율 및 L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-오르니틴 옥시다제 활성의 비율 둘 다가 상기 야생형 효소와 비교하여 낮은 단백질이 바람직하다.

[0073] 또한, 야생형 효소와 비교하여, 「L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성」을 부여한다고 하는 점에서는, 상기 (1)에 규정되는 단백질에서, 상기 제254번째의 아미노산 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 아스파라긴산, 글루타민산 또는 세린인 것이 바람직하다. 상기 제254번째 아미노산을 이들 아미노산으로 치환한 경우에는 이하의 실시예에 나타난 바와 같이, L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-아르기닌 옥시다제 활성의 비율 및 L-라이신 옥시다제 활성에 대한 L-오르니틴 옥시다제 활성의 비율 둘 다가, 상기 야생형 효소와 비교하여 낮기 때문이다. 또한, 추가로, L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 기질 특이성이 현저하게 향상된 단백질(아미노산 옥시다제)이라고 하는 관점에서는, 상기 제254번째 아미노산은 이소류신 또는 티로신인 것이 바람직하다.

[0074] 본 발명의 단백질은, 상기 (2) 및 (3)으로 규정된 범위에 있어서, 상기 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 한 특별히 한정되는 것은 아니지만, 당해 단백질의 L-라이신 옥시다제 활성을 100%로 한 경우, 상기 단백질의 L-아르기닌 옥시다제 활성은 15% 이하인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.01% 이하, 0%이다. 또한, 상기 단백질의 L-오르니틴 옥시다제 활성은 80% 이하인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 60% 이하, 더욱 바람직하게는 50% 이하, 더욱 더 바람직하게는 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.01% 이하, 0%이다. 이와 관련하여, 기준이 되는 야생형 효소의 경우, pH 7.0, 30℃에서 L-라이신 옥시다제 활성을 100%로 한 경우, L-아르기닌 옥시다제 활성은 20% 정도이고, 그리고, L-오르니틴 옥시다제 활성은 83% 정도이다.

[0075] 또한, 본 발명의 단백질은, 상술의 「L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성」을 나타내는 한, 이 L-라이신 옥시다제 활성의 절대치는 특별히 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 본 발명의 단백질 L-라이신 옥시다제 활성은, 적어도 야생형 효소의 L-라이신 옥시다제 활성과 동등하거나, 또는 그 이상인 것이 바람직하다. 구체적으로는 본 발명의 단백질은, pH 7.0에서 L-라이신 옥시다제 활성이 0.6U/mg 이상인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1.0U/mg 이상이다.

[0076] 또한, L-라이신, L-오르니틴 및 L-아르기닌 이외의 단백질 구성 아미노산인 L-티로신, L-알라닌, L-시스테인, L-아스파라긴산, L-글루타민산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-메티오닌, L-아스파라긴, L-프롤린, L-글루타민, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-페닐알라닌, L-트립토판 대하여, 본 발명의 단백질의 변이형 L-아미노산 옥시다제는 활성을 나타내지 않는다.

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 (2)에 규정된 단백질은, 「상기 (1)에 규정된 단백질에서 상기 제254번째 아미노산을 제외한 영역 중에서 1개 또는 수개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열 이루어지고, 또한, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질」이다. 여기에서, 「1개 내지 수개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열」에 있어서 「1개 내지 수개」의 범위는, 결실 등을 갖는 단백질이 상기 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 한 특별히 한정되는 것은 아니다. 상기 「1개 내지 수개」의 범위는, 상기 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질인 비율이 높은 점으로부터, 예를 들면, 1개 내지 30개, 바람직하게는 1개 내지 20개, 보다 바람직하게는 1개 내지 10개, 더욱 바람직하게는 1개 내지 7개, 더욱 바람직하게는 1개 내지 5개, 특히 바람직하게는 1개 내지 3개, 1개 내지 2개, 1개 정도인 것이 가능하다.

[0078] 본 발명에 있어서, 상기 (3)에 규정된 단백질은, 「상기 (1)에 규정된 단백질의 아미노산 서열에 대하여 적어도 67%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 또한, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 옥시다제와 비교하여 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 단백질[단, 당해 단백질의 아미노산 서열에서 상기 제254번째 아미노산에 대응하는 아미노산은 변이하지 않는 것으로 한다.]이다.

- [0079] 본 발명에 있어서, 「상기 (1)에 규정된 단백질의 아미노산 서열에 대해 적어도 67%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열」에 있어서 「서열 동일성」은, 상기 아미노산 서열의 동일성을 갖는 단백질이, 상기 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 효소인 한, 특별히 한정되지 않는다. 상기 아미노산 서열의 서열 동일성은 67% 이상이면 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 68% 이상, 69% 이상, 70% 이상, 71% 이상, 72% 이상, 73% 이상, 74% 이상, 더욱 바람직하게는 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 한층 더 바람직하게는 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상이다. 본 발명에서 「서열 동일성」이라고 하는 용어는, 2개 이상의 아미노산 서열의 서로에 대한 아미노산 동일성의 정도를 가리킨다. 따라서, 어느 2개의 아미노산 서열 동일성이 높을 수록, 이들의 서열의 동일성 내지 유사성이 높다. 2종류의 아미노산 서열이 동일성을 갖는지의 여부는, 서열의 직접 비교에 의해 분석될 수 있고, 구체적으로는 시판 서열 분석 소프트웨어 등을 이용하여 분석할 수 있다.
- [0080] 또한, 본 발명에 있어서, 「단, 당해 단백질의 아미노산 서열에서 상기 제254번째의 아미노산에 대응하는 아미노산은 변이하지 않는 것으로 한다.」에 있어서, 「변이」는, 구체적으로 아미노산의 결실 또는 치환을 의미한다. 즉, 「단, 당해 단백질의 아미노산 서열에서 상기 254번째 아미노산에 대응하는 아미노산은 변이하지 않는 것으로 한다.」란, 상기 (3)에 규정된 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 서열 동일성의 판단의 기준이 되는 상기 (1)의 단백질의 아미노산 서열에서의 제254번째 아미노산에 대응하는 아미노산이, 상기 (1)의 단백질의 아미노산 서열의 제254번째 아미노산과 동일하다는 것을 의미한다. 따라서, 상기 (1)의 단백질에서의 치환된 아미노산이 이소류신이면, 상기 (3)의 단백질의 아미노산 서열에서의 상기 제254번째 아미노산에 대응하는 아미노산은 이소류신이 된다.
- [0081] 상기 (3)에 규정된 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 서열 동일성의 판단의 기준이 되는 상기 (1)의 단백질의 아미노산 서열에서의 제254번째 아미노산에 대응하는 아미노산은, 상술한 서열 동일성 내지 상동성의 분석에 의해 조사할 수 있다. 구체적으로는, 시판 서열 분석 소프트웨어 등을 이용하여 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열 또는 상기 (1)의 단백질의 아미노산 서열에 대해서 분석 대상의 아미노산 서열 정렬 분석을 행하면, 상기 제254번째 아미노산에 대응하는 아미노산을 검색할 수 있다. 이와 같은 정렬 분석 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다.
- [0082] 본 발명의 상기 단백질은, 상기 (1) 내지 (3)에 규정된 범위에 속하는 것인한, 이의 유래는 특별히 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 본 발명의 단백질은, 각종 유전자 공학적 기술에 의해 제조된 재조합 단백질이어도 좋고, 화학 합성에 의해 제조된 합성 단백질이어도 좋고, 또는 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열로 이루어진 L-아미노산 옥시다제의 유전자 호모로그를 갖는 특정 생물 중(예를 들면, 세균)에 변이원을 부여함으로써 본 발명의 변이형 효소를 생산할 수 있는 변이체를 획득하고, 당해 변이체가 생산하는 단백질을 추출 및 생성함으로써 제조된 단백질이어도 좋다.
- [0083] 유전 공학 기술에 의해 본 발명의 재조합 단백질을 제조하는 경우에는, 상술한 단백질 (1), (2) 또는 (3)을 코딩하는 핵산(DNA 또는 RNA)을 작성하고, 각종 발현 벡터에 삽입함으로써, 본 발명의 단백질을 발현시킬 수 있다. 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 작제함에 있어서, 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열에서의 제254번째 시스테인 또는 상기 시스테인에 상응하는 아미노산을 상기 (1)에 기재된 소정의 아미노산으로 치환하기 위해, 또는 상기 (2)에 규정된 단백질에서 아미노산의 결실, 치환 및/또는 추가를 실시하기 위해, 또는 상기 (3)에 규정된 단백질에서 서열번호 2의 아미노산 서열과 소정의 동일성을 갖는 단백질을 코딩하는 핵산을 준비하기 위해, 예를 들면, 에러-프론 PCR법, DNA 서플링법, 각종 부위 특이적 변이 도입법 등에 의해, 임의의 염기의 결실, 치환 및/또는 삽입을 행할 수 있다. 이와 같이 작제한 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 적당한 발현계에 도입함으로써, 본 발명의 단백질을 제조할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 단백질을 제조하는데 이용가능한 발현계로서는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 각종 생물종(호스트)에 있어서 재조합 단백질의 발현을 가능하게 하는 발현 벡터를 이용할 수 있다. 이용가능한 발현 벡터로서는, 세균, 균류(예 : 효모류) 등의 미생물, 식물, 곤충 세포, 포유류 세포 등의 호스트에 있어서 단백질의 발현을 가능하게 하는 각종 발현 벡터를 이용하는 것이 가능하며, 바이러스 벡터(과지 벡터를 포함)이어도 플라스미드 벡터이어도 좋다. 또는, 토끼 망상 적혈구 용해물, 밀 배아 용해물, 대장균 용해물 등을 이용한 무세포 단백질 발현계를 이용하여, 본 발명의 단백질을 제조해도 좋다.
- [0085] 특정의 생물종을 호스트로서 이용한 발현계에서 본 발명의 단백질을 발현시키는 경우에는, 상기 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 벡터 상에 탑재하고, 이 벡터에 의해 숙주 세포를 형질전환한 후, 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 배양물 중에 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 축적하고, 축적된 단백질을 수집하는 것을 포함하는

제조 방법에 의해 제조할 수 있다.

- [0086] 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체는 본 발명의 하나의 양태이다.
- [0087] 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산의 취득 방법은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 이하의 실시예에 기재된 바와 같이, 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주에서 단리된 L-아미노산 옥시다제 유전자(서열번호 1 및 서열번호 2)를 코딩하는 핵산을 재료로 해서 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 취득해도 좋고, 또는 본 발명의 단백질 내지 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열(L-아미노산 옥시다제)와 상동성을 갖는 유전자를 각종 세균으로부터 단리하고, 당해 유전자를 코딩하는 핵산을 조제하여, 상기 254번째 아미노산에 대응하는 아미노산 치환을 행하여, 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 제조해도 좋다. 또한, 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산은, 서열번호 1에 기재된 염기 서열 또는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 1에 기재된 염기 서열과 일정한 동일성을 갖는 공지의 염기 서열 또는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 일정한 동일성을 갖는 공지의 아미노산 서열 정보에 근거해서, 화학 합성, 유전자 공학적 방법 또는 돌연변이 유발 등의 당업자에게 알려진 임의의 방법으로 작제할 수 있다.
- [0088] 서열번호 2에 나타낸 아미노산 서열은, 본 발명자들이 자연계에서 단리한 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래의 L-아미노산 옥시다제(야생형 효소)의 아미노산 서열이지만, 본 L-아미노산 옥시다제로는 일정한 상동성을 나타내는 유전자가 다수 알려져 있다. 예를 들면, 표 1에 나타낸 세균 유래의 유전자가 알려져 있다.

표 1

종 명칭	유전자 명칭 (효소명)	엑세스 번호	서열번호	변이형 효소 C 2 5 4 I 와의 서열 동일성	제 254 번째의 아미노산에 대응하는 아미노산
슈도모나스 · 푸티다 (Pseudomonas putida)	리신 2 - 모노옥시계 나제	BAG 54787. 1	서열번호 5	93.75%	제 254 번째
슈도모나스 · 엔토모필라 (Pseudomonas entomophila)	아미노옥시 다제	YP_606177. 1	서열번호 6	93.75%	제 254 번째
슈도모나스 · 플루오레센스 Pf-5 (Pseudomonas fluorescens Pf-5)	모노아민 · 옥시다제	YP_262728. 1	서열번호 7	92.5%	제 254 번째
슈도모나스 · 플루오레센스 F113 (Pseudomonas fluorescens F113)	리신 2 - 모노옥시계 나제	ACT32386. 1	서열번호 8	91.07%	제 254 번째
슈도모나스 · 플루오레센스 Pf0-1 (Pseudomonas fluorescens Pf-5)	트립토판 2 - 모노옥시계 나제	YP_350882. 1	서열번호 9	90.18%	제 254 번째
슈도모나스 · 플루오레센스 WH6 (Pseudomonas fluorescens WH6)	트립토판 2 - 모노옥시계 나제	ZP_07777919. 1	서열번호 1 0	88.18%	제 261 번째
슈도모나스 · 시린게 (Pseudomonas syringae) pv. Lachrymans str. M3022780PT	트립토판 2 - 모노옥시계 나제	EGH95128. 1	서열번호 1 1	88.39%	제 253 번째
알파 · 프로테오박테리움 (alpha proteobacterium)BAL199	트립토판 2 - 모노옥시계 나제	ZP_02189967. 1	서열번호 1 2	72.73%	제 254 번째
슈도노카르디아 · 에스피 (Pseudonocardia sp. P1)	트립토판 2 - 모노옥시계 나제	ZP_08123759. 1	서열번호 1 3	70.54%	제 247 번째
고르도니아 · 아마라에 (Gordonia amarae)NBRC 15530	아미노옥시 다제	ZP_09216582. 1	서열번호 1 4	67.91%	제 246 번째
로제오박터 · 테니트리피칸스 (Roseobacter denitrificans)Och 114	트립토판옥 시다제	YP_681814. 1	서열번호 1 5	67.86%	제 243 번째
마이코박테리움 · 아브세스스 (Mycobacterium abscessus)ATCC 19977	트립토판 2 -옥시다제	YP_001701566. 1	서열번호 1 6	68.81%	제 254 번째

[0089]

[0090]

야생형 효소의 아미노산 서열, 본 발명의 단백질인 변이형 효소 C254I의 아미노산 서열, 및 표 1에 나타난 알려진 유전자의 아미노산 서열에 대해 정렬 분석을 행한 결과를 도 4 및 도 5에 도시한다. 도 4에 있어서, 화살표로 나타난 위치의 아미노산이 상기 254번째 아미노산에 대응하는 아미노산이다. 도 4에 도시한 바와 같이, 상기 야생형 효소와 동일하게 표 1에 나타난 알려진 유전자도 상기 254번째 아미노산에 대응하는 아미노산은 시스테인이다. 본 발명의 단백질의 아미노산 서열은 이러한 알려진 유전자의 서열에 근거해서 설계되어도 좋고, 이외의 공지의 호모로그 유전자의 서열 정보에 근거하여 설계되어도 좋다.

[0091]

본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산은, 구체적으로는, 예를 들면, 서열목록의 서열번호 1에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA에 대하여, 변이원이 되는 약제를 접촉 작용시키는 방법, 자외선을 조사하는 방법, 유전자 공학적 방법 등을 이용하여 행할 수 있다. 또한, 유전자 공학적 방법의 하나인 부위 특이적 변이 유발법은 특정 위치에 특정 변이를 도입할 수 있는 방법이므로, 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 제조하는데 있어서, 핵산에 부위

특이적인 변이를 도입하는데 유용하다.

- [0092] 예를 들면, 본 명세서 중의 서열목록의 서열번호 1에 기재된 염기 서열 또는 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열의 정보에 근거하여 적당한 프로브나 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주를 포함한 세균의 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써, 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 제조하기 위한 재료가 되는 핵산을 준비할 수 있다. cDNA 또는 게놈 라이브러리는 통상적인 방법에 의해 작제할 수 있다.
- [0093] 또한, PCR법에 의해 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 제조하기 위한 재료를 취득할 수 있다. 예를 들면, 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주를 포함한 세균의 게놈 DNA, cDNA 또는 게놈 라이브러리를 주형으로서 사용하고, 서열번호 1에 기재된 염기 서열을 증폭시킬 수 있도록 설계한 1쌍의 프라이머를 사용하여 PCR을 행한다. PCR의 반응 조건은 적당히 설정할 수 있으며, 예를 들면, 94℃에서 30초간(변성), 55℃에서 30초 ~ 1분간(어닐링), 72℃에서 2분간(신장)으로 이루어진 반응 공정을 1사이클로 해서, 예를 들면, 30사이클 행한 후, 72℃에서 7분간 반응시키는 조건 등을 들 수 있다. 증폭된 DNA 단편은, 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 제조하기 위한 재료로서 사용될 수 있다. 또한, 증폭된 DNA 단편을, 이어서, 대장균(*E. coli*) 등의 숙주로 증폭 가능한 적절한 벡터 중에 클로닝함으로써 얻은 벡터도 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 제조하기 위한 재료로서 사용할 수 있다.
- [0094] 상술한 바와 같이 준비한 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 제조하기 위한 재료에 있어서, 상기 254번째의 아미노산에 대응하는 아미노산을 코드하는 염기 서열(코돈)에 각종 변이 도입법을 이용하여 염기의 치환을 실시하고, 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함한 벡터를 제조할 수 있다. 또한, 상기한 프로브 또는 프라이머의 조제, 게놈 라이브러리의 구축, 게놈 라이브러리의 스크리닝, 및 목적 유전자의 클로닝 등의 조작은 당업자에게 알려져 있다.
- [0095] 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산은 적당한 벡터 중에 삽입한 상태에서 사용할 수 있다. 본 발명에서 이용하는 벡터의 종류는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 자립적으로 복제하는 벡터(예를 들면, 플라스미드 등)이어도 좋고, 또는 숙주 세포에 도입된 때에 숙주 세포의 게놈에 삽입되어 삽입된 염색체와 함께 복제되는 것이어도 좋다. 바람직하게는 벡터는 발현 벡터이다. 발현 벡터에 있어서, 상기 핵산에는 전사에 필요한 요소(예를 들면, 프로모터 등)가 기능적으로 연결되어 있다. 프로모터는 숙주 세포에 있어서 전사 활성을 나타내는 DNA 서열이며, 숙주의 종류에 따라 적당하게 선택할 수 있다.
- [0096] 세균 세포에서 작동 가능한 프로모터로서는, 게오바실러스·스테아로써모필러스·말토게닉·아밀라제 유전자(*Geobacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*), 바실러스·리케니포르미스 α 아밀라제 유전자(*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*), 바실러스·아밀로리퀘파시엔스·BAN 아밀라제 유전자(*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*), 바실러스·서브틸리스·알칼리프로테아제 유전자(*Bacillus subtilis alkaline protease gene*) 또는 바실러스·푸밀러스·크실로시다제 유전자(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)의 프로모터, 또는 파지·람다의 P_R 또는 P_L 프로모터, 대장균(*E. coli*)의 lac, trp 또는 tac 프로모터 등이 열거된다.
- [0097] 포유 동물 세포에서 작동 가능한 프로모터의 예로서는, SV40 프로모터, MT-1(메타로티오네인 유전자) 프로모터, 또는 아데노 바이러스 2주 후기 프로모터 등이 있다. 곤충 세포에서 작동 가능한 프로모터의 예로서는, 폴리헤드린 프로모터, P10 프로모터, 오토그라파·칼리포르니카·폴리헤드로시스 염기성 단백 프로모터, 배칼로 바이러스 즉시형 초기 유전자 1 프로모터, 또는 배칼로 바이러스 39K 지연형 초기 유전자 프로모터 등이 있다. 효모 숙주 세포에서 작동 가능한 프로모터의 예로서는, 효모 해당계 유전자 유래의 프로모터, 알콜 데하이드로게나제 유전자 프로모터, TPI1 프로모터, ADH2-4c 프로모터 등이 열거된다. 사상균 세포에서 작동 가능한 프로모터의 예로서는, ADH3 프로모터 또는 tpiA 프로모터 등이 있다.
- [0098] 또한, 상기 벡터에 있어서, 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산은, 필요에 따라서, 적절한 터미네이터에 기능적으로 결합되어도 좋다. 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 포함하는 벡터는, 또한, 폴리아데닐레이션 신호(예를 들면, SV40 또는 아데노 바이러스 5E1b 영역 유래의 것), 전사 인핸서 서열(예를 들면, SV40 인핸서) 등의 요소를 가져도 좋다. L-아미노산 옥시다제의 유전자를 포함하는 재조합 벡터는, 또한, 상기 벡터가 숙주 세포 내에서 복제하는 것을 가능하게 하는 DNA 서열을 구비하여도 좋고, 그 예로서는 SV40 복제 기점(숙주 세포가 포유류 세포의 기점)이 열거된다.
- [0099] 본 발명의 단백질을 코드하는 핵산을 포함하는 벡터는, 또한, 선택 마커를 함유하고 있어도 좋다. 선택 마커로

서는, 예를 들면, 디하이드로 엽산 리덕타제(DHFR) 또는 시조사카로마이세스·폼베 TPI 유전자 등과 같은 그의 보체가 숙주 세포에 결합되어 있는 유전자, 또는 예를 들면, 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 네오마이신, 또는 하이그로마이신과 같은 약제 내성 유전자를 들 수 있다. 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산, 프로모터, 및 소망에 의해 터미네이터 및/또는 분비 신호 서열을 각각 연결하고, 이를 적절한 벡터에 삽입하는 방법은 당업자에게 주지이다.

[0100] 또한, 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 적당한 숙주에 도입함으로써, 본 발명의 형질전환체를 작제할 수 있다. 본 발명의 벡터를 도입시키는 숙주 세포는, 세포 내에서 본 발명의 벡터가 복제되는 것이면 임의의 세포이어도 좋다. 또한, 본 발명의 단백질을 발현하는 형질전환체를 작제하는 경우에는, 벡터의 복제에 추가하여, 말할 것도 없이 본 발명의 단백질의 발현이 가능한 임의의 세포이다. 이와 같은 숙주 세포의 예로서는 세균, 효모, 진균 및 고등 진핵 세포 등이 열거된다.

[0101] 세균 세포의 예로서는, 바실러스 또는 스트렙토마이세스 등의 그람 양성균 또는 대장균(*E. coli*) 등의 그람 음성균이 열거된다. 이러한 세균의 형질전환은 프로토플라스트법 또는 공지의 방법으로 컴피턴트 세포를 이용함으로써 행해도 좋다. 포유류 세포의 예로서는, HEK293 세포, HeLa 세포, COS 세포, BHK 세포, CHL 세포 또는 CHO 세포 등이 열거된다. 포유류 세포를 형질전환하고, 상기 세포에 도입된 DNA 서열을 발현시키는 방법도 공지되어 있고, 예를 들면, 일렉트로포레이션법, 인산칼슘법, 리포펙션법 등을 사용할 수 있다.

[0102] 효모 세포의 예로서는, 사카로마이세스 또는 시조사카로마이세스에 속하는 세포가 열거되고, 예를 들면, 사카로마이세스·세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 사카로마이세스·클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*) 등이 열거된다. 효모 숙주에의 재조합 벡터의 도입 방법으로는, 예를 들면, 일렉트로포레이션법, 스페로플라스트법, 아세트산리튬법 등을 열거할 수 있다.

[0103] 다른 진균 세포의 예는, 사상균, 예를 들면, 아스퍼질러스, 뉴로스포라, 프사리움, 또는 트리코더마에 속하는 세포이다. 숙주 세포로서 사상균을 사용하는 경우, DNA 구조물을 숙주 염색체에 삽입하여 재조합 숙주 세포를 얻음으로써 형질전환을 행할 수 있다. DNA 구조물의 숙주 염색체에의 삽입은, 공지의 방법에 따라, 예를 들면, 상동 재조합 또는 이중 재조합에 의해 행할 수 있다.

[0104] 곤충 세포를 숙주로서 이용하는 경우에는, 재조합 유전자 도입 벡터 및 배칼로 바이러스를 곤충 세포에 공동 도입하여 곤충 세포 배양 상정 중에 재조합 바이러스를 얻은 후, 또한 재조합 바이러스를 곤충 세포에 감염시켜 단백질을 발현시킬 수 있다.

[0105] 배칼로 바이러스로서는, 예를 들면, 밤나방 곤충에 감염되는 바이러스인 오토그라파·칼리포르니카·뉴클리어·폴리헤드로시스·바이러스(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 등을 이용할 수 있다.

[0106] 곤충 세포로서는, *Spodoptera frugiperda*의 난소 세포인 Sf9, Sf21, *Trichoplusia ni*의 난소 세포인 Hi Five (인비트로젠사 제조) 등을 이용할 수 있다.

[0107] 재조합 바이러스를 제조하기 위한, 곤충 세포에의 재조합 유전자 도입 벡터와 상기 배칼로 바이러스의 공동 도입 방법으로는, 예를 들면, 인산 칼슘법 또는 리포펙션법 등을 열거할 수 있다.

[0108] 상기의 형질전환체는, 본 발명의 벡터의 복제를 가능하게 하는 조건 하, 또는 본 발명의 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 적절한 영양 배지 중에서 배양한다. 본 발명의 단백질을 발현시킨 경우에는, 형질전환체의 배양물(형질전환체 및 배양 배지를 포함)로부터 본 발명의 단백질을 단리 정제하는 것은 통상의 단백질의 단리, 정제법을 사용하면 된다. 예를 들면, 본 발명의 단백질이 세포 내에 용해 상태로 발현된 경우에는 배양 종료 후, 세포를 원심 분리에 의해 회수하여 수계 완충액에 현탁 후, 초음파 분쇄기 등에 의해 세포를 파쇄하고, 무세포 추출액을 얻는다. 상기 무세포 추출액을 원심 분리함으로써 얻어진 상정으로부터 통상의 단백질의 단리 정제법, 즉, 용매 추출법, 황산 암모늄 등에 의한 염석법, 탈염법, 유기 용매에 의한 침전법, 디에틸아미노에틸(DEAE) 세파로스 등의 레진을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피법, S-Sepharose FF(파르마시아사 제조) 등의 레진을 이용한 양이온 교환 크로마토그래피법, 부틸 세파로스, 페닐 세파로스 등의 레진을 이용한 소수성 크로마토그래피법, 분자체를 이용한 겔 여과법, 어피티티 크로마토그래피법, 크로마토 포커싱법, 등전점 전기영동 등의 전기영동법 등의 방법을 단독으로 또는 조합하여 이용하여 본 발명의 단백질을 정제 표본품으로 얻을 수 있다.

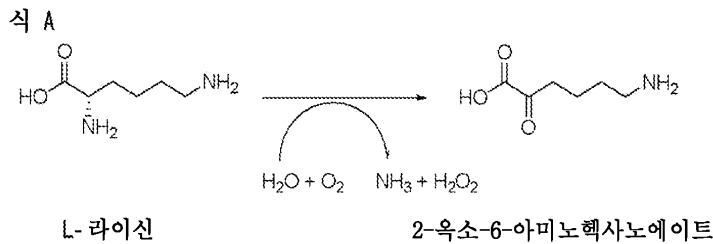
[0109] <L-라이신의 정량 방법>

[0110] 본 발명의 L-라이신의 정량 방법은 이하와 같다.

- [0111] 이하의 공정을 포함하는, L-라이신을 검출 또는 정량하는 방법:
- [0112] (A) 물과 산소의 존재 하에, 검체와 본 발명의 단백질을 유지하는 공정; 및
- [0113] (B) 상기 단백질의 L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 작용에 의해 반응액 중에 생성된 반응 생성물 중 적어도 하나를 검출 또는 정량하는 공정
- [0114] 을 포함하는, 상기 방법.

[0115] 본 발명의 방법에서, 검체로서 사용되는 생체 시료는, L-라이신을 포함할 수있는 시료라면 어떤 것이어도 좋다. 생체 시료에 본 발명의 단백질을 작용시켜 생성되는 어떤 생성물을 정량하여 생체 시료 중의 L-라이신의 농도를 측정하는지에 따라, 생체 시료는 적당히 선택할 수 있다. 예를 들면, 발색제나 형광제를 이용하여 상기 생성물을 정량하는 경우에는 무색의 수용액인 것이 바람직하고, 혈청 및 혈장 등이 예로서 열거된다.

[0116] 본 발명의 단백질에 의한 L-라이신(L-Lysine)의 산화 반응을 이하의 반응식 A에 나타낸다.



- [0117]
- [0118] 본 발명의 방법에서 이용하는 상술한 단백질은, 상기 식 A로 나타내는 반응을 촉매한다.

[0119] 공정 (A)

[0120] 공정 (A)에 있어서의 본 발명의 단백질의 혼합량은 10mU/ml(라이신 1 μmol을 1분간 소비하는 활성을 나타내는 효소량을 1U로 한다) 이상으로 하는 것이 적당하고, 물의 혼합량은 샘플 중의 라이신 농도에 따라서 적당히 결정할 수 있지만, 예를 들면, 5 ~ 95%의 범위로 할 수 있다. 본 발명의 단백질의 혼합량의 상한은 특별히 없지만, 실용적으로는 예를 들면, 100mU/ml 이하일 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질의 혼합량 및 물의 혼합량은, 이 범위로 한정하는 의도는 아니며, 적당하게 조정할 수 있다.

[0121] 또한, 본 발명의 단백질 및 물 이외에, 바람직하게는, 반응용 완충액을 포함할 수 있다. 반응용 완충액의 pH는, 상술한 본 발명의 단백질이 갖는 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성이 확보되는 한 특별히 한정되는 것은 아니고, L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 최적 pH와 L-라이신에 대한 기질 특이성의 관계를 고려해서 적당하게 조정하면 된다. 예를 들면, pH 1.0 ~ 14의 범위로부터, 각 효소의 특성을 고려하여 L-라이신의 검출을 가능하게 하는 L-라이신에 대한 옥시다제 활성과 L-라이신에 대한 높은 기질 특이성을 확보할 수 있는 범위로 설정할 수 있다. 이하의 실시예에 나타내는 변이형 효소 C254I를 이용하는 경우에는 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성이 얻어지는 범위를 고려하여, 반응용 완충액의 pH는, 예를 들면, pH 6.0 ~ 10.5, 바람직하게는 pH 6.5 ~ 10, 더욱 바람직하게는 pH 7 ~ 9, 더욱 더 바람직하게는 pH 7.0 ~ 8.0의 범위로 조정할 수 있다.

[0122] 이어서, 상기 혼합에 의해 얻어진 반응액을 산소의 존재 하에 소정 시간 유지한다. 본 발명의 단백질에 의한 L-라이신 산화 반응에서는 반응식 A에 나타낸 바와 같이, L-라이신 탈아미노화 생성물인 2-옥소-6-아미노헥산산과 함께, 암모니아(NH₃)와 과산화수소(H₂O₂)가 생성물로 얻어진다. 상기 반응을 공기 중에서 실시함으로써, 반응액 중의 용존 산소로서 상기 산소가 공급된다. 반응액 중의 산소를 공급하는 목적으로 반응액에 공기 등의 산소 함유 기체를 강제적으로 공급할 필요는 통상적으로는 없다. 본 발명의 단백질에 의한 효소 반응에 필요한 산소량이 미량이며, 용존 산소에 의해 충분히 조달되기 때문이다. 효소 반응을 위한 유지 시간은, 예를 들면, 사용하는 효소량(본 발명의 단백질량)에 따라 다르지만, 예를 들면, 10분 ~ 1시간의 범위로 할 수 있다. 추가로, 효소 반응을 위한 유지 온도는, 검체 중에 L-라이신이 존재하는 경우에 반응식 A에 나타낸 본 발명의 단백질에 의한 촉매 반응이 발생할 수 있는 한, 특별히 한정되는 것은 아니고, 유지 기간 중 일정 기간이어도 좋고, 또는 변동되어도 좋다. 유지 온도는, 예를 들면, 사용하는 효소(본 발명의 단백질)의 최적 온도나 그 온도에서 발휘되는 L-라이신에 대한 기질 특이성에 따라 다르지만, 예를 들면, 10 ~ 60℃의 범위에서 바람직한 반응 온도를 선택할 수 있으며, 예를 들면, 20 ~ 55℃의 범위, 또는 25 ~ 40℃의 범위로 할 수 있다. 그러나, 유지 시간

및 유지 온도를 이 범위로 한정하려는 의도는 없으며, 필요에 따라 적당하게 조정할 수 있다.

[0123] 공정 (B)

[0124] 공정 (B)에서는, 공정 (A)에 있어서 상기 유지 후의 반응액 중에 존재하는 본 발명의 단백질의 작용에 의한 반응 생성물의 적어도 1종을 검출 또는 정량한다.

[0125] 검출 또는 정량에 이용되는 생성물이 과산화수소인 경우, 예를 들면, 퍼옥시다제 반응을 이용하여 측정하는 방법 등의 공지의 방법에 의해 과산화수소를 검출 또는 정량할 수 있다. 퍼옥시다제 반응을 이용하여 측정하는 경우, 사용 가능한 퍼옥시다제는 과산화수소의 검출 또는 정량에 이용 가능한 효소이면 좋고, 예를 들면, 서양 고추냉이 유래 퍼옥시다제가 열거된다. 또한, 사용하는 퍼옥시다제의 기질이 될 수 있는 것이면 발색제로서 사용 가능하며, 서양 고추냉이 유래 퍼옥시다제를 사용하는 경우에는 4-아미노안티피린:페놀 등이 열거된다. 서양 고추냉이 유래 퍼옥시다제를 사용한 과산화수소의 검출 또는 정량을 위한 반응은 이하에 나타낸 바와 같다.

[0126] $2H_2O_2 + 4\text{-아미노안티피린} + \text{페놀} \rightarrow \text{퀴논이민 색소} + 4H_2O$

[0127] 4-아미노안티피린 등의 발색제나 형광제는, 사용되는 퍼옥시다제의 종류에 따라 적당히 선택하는 것이 가능하다.

[0128] 본 발명의 단백질에 의한 L-아미노산 옥시다제 반응의 생성물인 과산화수소는, 과산화수소 전극을 이용한 전류 검출형 센서를 이용하여 측정할 수 있다. 과산화수소 전극으로서, 예를 들면, 퍼옥시다제를 소 혈청 알부민과 함께 글루타르알데하이드에 고정화된 막과 페로센을 카본 페이스트에 함유시킨 것을 전극으로서 이용하는 센서를 열거할 수 있다.

[0129] 검출 또는 정량에 사용되는 생성물이 암모니아인 경우에는, 암모니아 검출 시약을 이용하여 측정할 수 있다. 암모니아 검출 시약으로서, 예를 들면, 페놀과 차아염소산의 조합에 의한 인도페놀법을 열거할 수 있다. 구체적으로는 샘플을 페놀·니트로프루시드 용액 및 과염소산 용액과 혼합하여 발색시켜 635nm의 흡광도를 측정함에 의한 암모니아의 검출 또는 정량이 가능하다.

[0130] 검출 또는 정량에 이용되는 생성물이 L-라이신의 탈아미노화 생성물인 2-옥소-6-아미노헥산산인 경우에는, 2-옥소-6-아미노헥산산을 3-메틸-2-벤조티아졸론 하이드라진 하이드로클로라이드(3-methyl-2-benzothiazolone hydrazine hydrochloride)와 반응시켜 하이드라존(hydrazone) 유도체를 분광 정량함으로써 2-옥소-6-아미노헥산산의 정량을 행할 수 있다.

[0131] <L-라이신의 정량용 키트>

[0132] 또한, 본 발명은, 본 발명의 상기 단백질을 포함하는, L-라이신의 검출 또는 정량용 키트를 포함한다.

[0133] 본 발명의 키트는, 반응용 완충액, 과산화수소 검출 시약, 암모니아 검출 시약, 및 L-라이신의 탈아미노화 생성물인 2-옥소-6-아미노헥산산 검출 시약 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다.

[0134] 반응용 완충액은, 반응액 속을 본 발명의 단백질에 의한 효소 반응에 적합한 pH로 유지하기 위해 사용된다. 반응용 완충액의 pH는 상술한 본 발명의 단백질이 갖는 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성이 확보되는 한 특별히 한정되는 것은 아니고, L-라이신에 대한 옥시다제 활성의 최적 pH와 L-라이신에 대한 기질 특이성의 관계를 고려하여 적당히 조정하면 된다. 예를 들면, pH 1.0 ~ 14의 범위에서, 각 효소의 성질을 고려하여 L-라이신의 검출을 가능하게 하는 L-라이신에 대한 옥시다제 활성과 L-라이신에 대한 높은 기질 특이성을 확보할 수 있는 범위로 설정할 수 있다. 이하의 실시예에 나타내는 변이형 효소 C254I를 이용하는 경우에는, L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성이 얻어지는 범위를 고려하여, 반응용 완충액의 pH는, 예를 들면, pH 6.0 ~ 10.5, 바람직하게는 pH 6.5 ~ 10, 더욱 바람직하게는 pH 7 ~ 9, 한층 더 바람직하게는 pH 7.0 ~ 8.0의 범위로 조정할 수 있다.

[0135] 과산화수소 검출 시약은, 과산화수소의 검출을, 예를 들면, 발색 또는 형광에 의해 행하는 경우에 사용한다. 과산화수소 검출 시약으로는, 예를 들면, 퍼옥시다제와 이의 기질이 될 수 있는 발색제의 조합일 수 있다. 구체적으로는 서양 고추냉이 퍼옥시다제 및 2-아미노안티피린·페놀의 조합을 들 수 있다.

[0136] 암모니아 검출 시약으로는, 예를 들면, 페놀과 차아염소산의 조합에 의한 인도페놀법을 들 수 있다.

[0137] L-라이신의 탈아미노화 생성물인 2-옥소-6-아미노헥산산 검출 약물로는, 예를 들면, 2-옥소-6-아미노헥산산과 3-메틸-2-벤조티아졸론 하이드라진 하이드로클로라이드(3-methyl-2-benzothiazolone hydrazine hydrochlorid

e)을 반응시켜 하이드라존(hydrazone) 유도체를 분광 정량하는 방법을 사용할 수 있다.

[0138]

<효소 센서>

[0139]

본 발명은, 과산화수소 검출용 전극을 포함하는, L-라이신의 검출 또는 정량용 효소 센서로서, 상기 과산화수소 검출용 전극의 표면 또는 근방에 본 발명의 단백질이 배치되는, 상기 센서도 포함한다.

[0140]

상기 검출용 전극은 과산화수소 검출용 전극이다. 과산화수소 검출용 전극은, 효소식 과산화수소 전극 또는 격막식 과산화수소 전극일 수 있다. 본 발명의 단백질이 L-라이신과 반응함으로써 과산화수소를 생성하기 때문에, 이 과산화수소를 과산화수소 검출용 전극으로 검출할 수 있다. 효소식 과산화수소 전극으로는, 예를 들면, 피옥시다제를 소 혈청 알부민과 함께 글루타르알데하이드에 고정화된 막과 페로센을 카본 페이스트에 함유시킨 것을 전극으로 이용하는 센서를 들 수 있다. 격막식 과산화수소 전극은, 격막에 의해 과산화수소와 반응하는 전극이 격리된 타입의 전극이다.

[0141]

본 발명의 단백질은, 검출용 전극의 표면 또는 검출용 전극의 근방에 배치되는 것이 바람직하고, 검출용 전극의 표면에 배치되는 경우에는, 검출용 전극의 표면에 고정화되어도 고정화되지 않아도 좋다. 검출용 전극의 표면에 고정화됨으로써 본 발명의 센서를 반복 사용할 수 있는 이점은 있다.

[0142]

이하, 본 발명에 대하여, 실시예에 의해 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0143]

실시예

[0144]

실시예 중, 활성 측정 시약, L-라이신 측정용 시약 조성물은 이하와 같은 조성물로 조제하였다. 측정 조건은, 이하와 같이 행하였다. 또한, L-아미노산 옥시다제의 활성은, 이하와 같이 측정했다.

[0145]

(1) L-아미노산 옥시다제 활성 측정용 시약의 조제

표 2

활성 측정 시약	
서양 고추냉이 피옥시다제	0.66 U
기질 ※	40 mM
4-아미노안티피린	0.005 %
TOOS (N-에틸-N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3-메틸아닐린, 나트륨염, 탈수화물)	0.03 %
40mM 인산 칼륨 완충액 (pH 7.0)	

[0146]

표 3

사용한 아미노산					
L-Lys	L-Cys	L-Arg	L-Asn	L-Asp	L-Tyr
L-Gln	L-Glu	L-Ala	L-Leu	L-Ile	D-Lys
L-Val	L-Phe	L-His	L-Trp	L-Pro	D-Arg
L-Ser	L-Met	L-Thr	L- 오르니틴	Gly	D- 오르니틴

[0147]

[0148]

(2) L-아미노산 옥시다제의 활성 측정법

[0149]

L-아미노산 옥시다제 활성은, L-아미노산의 산화로 생성된 과산화수소량을 표 2의 발색액을 이용하여 비색법으로 구했다. 마이크로플레이트를 이용한 활성 측정은, 발색액 100 μL에 표 3에 나타난 아미노산의 100mM 용액

100 μL, 및 50 μL의 효소액을 첨가하여, 빙상(氷上)에 분주(分注)한 후 30℃에서 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 시간 반응시켜, 마이크로플레이트 리더로 550nm의 흡광도를 측정했다. L-아미노산 옥시다제 활성의 기질은, 표 3에 나타낸 20종류의 아미노산(100mM 용액)을 이용하고, 블랭크에는, 기질 대신에 100mM 인산 칼륨 완충액(pH 7.0)을 첨가하였다.

- [0150] 또한, 효소 정제에 있어서 1cm 석영셀을 이용한 흡광도계에서의 측정에서는, 반응액의 전량은 1mL로 했다. 얻어진 흡광도 변화에 따라, 하기 계산식에 근거하여 L-라이신 옥시다제 효소 활성을 계산하였다. 또한, 상기 조건에서, 1분당 1마이크로몰의 기질을 부여하는 효소량을 1U로 했다. 얻어진 흡광도 변화보다는 하기 계산식에 따라 L-아미노산 옥시다제의 효소 활성을 계산하였다.
- [0151] (3) L-아미노산 옥시다제 활성의 계산식
- [0152]
$$\text{활성치(U/ml)} = \{ \Delta OD / \min (\Delta OD_{\text{test}} - \Delta OD_{\text{blank}}) \times 3.1 \text{ (ml)} \times \text{희석 배율} \} / \{ 13 \times 1.0 \text{ (cm)} \times 0.1 \text{ (ml)} \}$$
- [0153] 3.1 (ml): 전액량
- [0154] 13: 밀리몰 흡광 계수
- [0155] 1.0cm: 셀의 광로 길이
- [0156] 0.1(ml): 효소 샘플액량
- [0157] (4) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제의 효소 정제
- [0158] (i) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주의 배양법
- [0159] 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주를, 전배양(前培養)으로 하여 5ml의 TGY 배지(0.5% 폴리펩톤, 0.5% 이스트 추출물, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% D-글루코스, pH 7.0)에 접종하고, 30℃, 200rpm에서 12시간 배양하였다. 그 후, 500ml의 TGY 배지를 포함하는 2L의 사카구치 플라스크에 접종하고, 30℃, 96rpm에서 48시간 배양하였다. 배양 후, 5000xg, 20분간 원심 분리하여 균체를 얻었다.
- [0160] (ii) 무세포 추출액의 조제
- [0161] 5mL의 TGY 배지에서 H8-1-3 주를 전배양(200rpm, 30℃, 12시간)하여, 전배양액을 500mL의 TGY 배지에 접종하고, 2L 사카구치 플라스크를 이용하여, 30℃에서 2일간 진탕 배양(96rpm)하였다(전량 20L). 대형 원심기에서 집균하고(5,000rpm, 10분간, 4℃), 생리 식염수(0.9% NaCl)로 세척한 후, 배지 5L분의 균체를 100mL의 20mM 인산 완충액(pH 7.0)(KPB)에 현탁시켰다. 100mL의 균체액을 15분간 초음파 처리하고, 원심 분리(8,000rpm, 20분간, 4℃)에서 얻어진 상청을 무세포 추출액으로 했다.
- [0162] (iii) 프로타민 황산에 의한 제핵산(除核酸) 처리
- [0163] 무세포 추출액에 프로타민 황산 나트륨을 0.5% 첨가하고, 30분간 교반한 후 대형 원심기로 분리하여(3,000rpm, 10분간, 4℃) 상청을 얻었다.
- [0164] (iv) 황산 암모늄 분획
- [0165] 제핵산 처리를 한 무세포 추출액을 빙중에서 스테러로 교반하면서, 30% 포화가 되도록 분말상 황산 암모늄을 조금씩 첨가했다. 30분간 교반한 후, 원심 분리하였다(8,000rpm, 10분간, 4℃). 상청을 빙중에서 교반하면서 60% 포화가 되도록 분말상 황산 암모늄을 첨가하고, 30분간 교반한 후 원심 분리하였다. 마찬가지로, 90% 포화가 되도록 분말상 황산 암모늄을 첨가하고 원심 분리하였다. 각 분획에서 얻어진 침전(0 내지 30% 분획, 30 내지 60% 분획, 및 60 내지 90% 분획)을 10ml의 20mM KPB(pH 7.0)에 현탁하여 5L의 동일한 완충액(×3회)에서 하룻밤 투석을 행하였다.
- [0166] (v) 음이온 교환 크로마토그래피(DEAE-토요필)
- [0167] 20mM KPB에 의해 평형화된 DEAE-토요필 수지 15ml를 컬럼에 충전하고, 투석된 30 내지 60% 분획의 효소액을 흡착시켰다. 100mL의 20mM KPB로 컬럼을 세척한 후, 20mM KPB 200ml, 및 500mM NaCl을 포함하는 20mM KPB 200ml를 사용하여, 그라디언트에 의해 NaCl 농도를 서서히 상승시켜 효소를 용출시켰다. 분획 수집기를 이용하여 15mL씩 시험관에 분획을 채취하여 활성이 확인된 분획을 수집하여 동일한 완충액에 의해 하룻밤 투석했다.

- [0168] (vi) 하이드록시아파타이트 컬럼 크로마토그래피(GIGA-PITE)
- [0169] 20mM 인산 완충액에 의해 평형화된 GIGA-PITE 수지 5ml를 컬럼에 충전하고, 효소액을 흡착시켰다. 50mL의 20mM KPB로 컬럼을 세척한 후, 20mM KPB 50ml 및 500mM KPB 200ml를 사용하여, 그라디언트에 의해 KPB 농도를 서서히 상승시켜 효소를 용출시켰다. 활성이 확인된 비흡착 분획을 5L의 동일한 완충액(x3회)으로 하룻밤 투석을 행하였다.
- [0170] (vii) 강이온 교환 크로마토그래피(MonoQ HR10/100)
- [0171] 중압 고속 액체 크로마토그래피(FPLC 컬럼: 20mM KPB로 평형화된 MonoQ HR 10/100 컬럼)를 사용하였다. 샘플 루프에 한외 여과(센트리콘 튜브)에 의해 농축 효소액 200 µL를 주입하고, 20mM KPB 및 0.5mM NaCl을 포함하는 20mM KPB의 2개의 용매를 사용하여 FPLC의 그라디언트 시스템에 의해 효소를 용출시켰다. 각 분획(0.5mL)의 활성이 확인된 분획을 수집하여 하룻밤 투석했다. 투석한 후, 센트리콘을 이용하여 효소액을 200 µL까지 농축시켰다.
- [0172] (viii) 겔 여과 크로마토 그래피(Superdex 200 10/30)
- [0173] 중압 고속 액체 크로마토그래피(FPLC 컬럼: 150mM NaCl을 포함하는 20mM KPB로 평형화된 Superdex 200 10/30 컬럼)를 사용하였다. 샘플 루프에 효소액 200 µL를 주입하고, 150mM NaCl을 포함하는 20mM KPB의 용매를 사용하여, FPLC의 시스템에 의해 효소를 용출시켰다. 활성이 확인된 분획을 수집하여 하룻밤 투석했다.
- [0174] 각 정제 스텝의 단백질량과 효소 활성을 표 4에 나타내었다.

표 4

단계	총 단백질 (mg)	총 활성 (munit)	비활성 (munit/mg)	수율 (%)	정제 (fold)
(iii) 세포-불포함 추출물	4,300	0.83	0.20	-	-
(iii) 핵산의 제거	3,700	1.11	0.30	-	-
(iv) 황산 암모늄 분획화 (30-60%)	1,100	3.30	3.03	100	1
(v) DEAE-Toyopearl	970	1.42	1.46	43	0.4
(vi) Giga-pite(통과액)	700	0.57	0.82	17	0.3
(vii) MonoQ 10/100	130	0.32	2.51	9	0.8
(viii) Superdex 200 10/30	9	0.31	35.0	9	11.6

- [0175]
- [0176] (5) SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의한 H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제의 분자량 측정
- [0177] 영동 겔로서, 36% 아크릴아미드 5.25ml, 0.68M 트리스-HCl 완충액(pH 8.8) 8.25mL, 1% SDS 1.58mL, 10% TEMED 187 µL, 2% APS 562.5 µL 조성의 겔에 36% 폴리아크릴아미드 0.5mL, 0.179M 트리스-HCl(pH 6.8) 3.5mL, 1% SDS 0.5mL, 10% TEMED 125 µL 2% APS 375 µL 조성의 농축 겔을 중층(重層)한 것을 이용하여, 완충액(글리세롤 200 µL, 1M 트리스-HCl (pH 8.0) 40 µL, 물 360 µL, 2-메르캅토에탄올 200 µL 및 10% SDS 200 µL)과 등량 혼합한 정제 효소 샘플 10 µL를 러닝 완충액(트리스 3.0g, 글리신 14.1g, 및 SDS 10g) 중 30mA에서 전기 영동을 행하고, 그 후, 1시간 단백질 염색액(CBB 2.5g, 메탄올 500mL, 아세트산 50mL 및 물 450mL)로 염색하고, 탈색액(메탄올:아세트산:물 = 3:1:6)으로 밴드가 선명해질 때까지 탈색시켰다.
- [0178] 분자량 마커(Bio-Rad)는 phosphorylase(97,400), bovine serum albumin(66,267) aldolase(42,200) carbonic anhydrase(30,000) and soybean trypsin inhibitor (20,000)의 것을 사용하였다.
- [0179] 도 2에 슈도모나스 · 에스피(Pseudomonas sp.) H8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제(야생형 효소)의 SDS-PAGE의 사진을 도시했다.
- [0180] (6) 슈도모나스 · 에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제의 N 말단 아미노산 서열의 결정
- [0181] 정제된 슈도모나스 · 에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제를 Edman 분해법에 의해 N 말단으로부터 8 잔기 결정했다.

- [0182] (7) 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자의 클로닝
- [0183] (i) 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주의 염색체 DNA의 추출
- [0184] 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주를 TGY 배지 3mL에 접종하고, 30°C, 200rpm에서 12시간 배양하였다. 배양액 1mL에서 균체를 원심 분리하여(15,000rpm, 5분, 4°C) 집균하였다. STE 완충액(NaCl 0.58g, 1M 트리스-HCl (pH 8.0) 1mL 및 0.5M EDTA (pH 8.0) 200µL를 물로 100mL로 정량한 것) 1mL로 세척한 후, 동일한 완충액에 현탁시켰다. 68°C에서 15분간 가열한 후, 원심 분리하고(15,000rpm, 5분, 4°C), 상청을 제거하고, 라이소자임-RNase 액(라이소자임 5mg, 10mg/mL RNase 10mL를 1액:글루코스 0.9g, 1M 트리스-HCl (pH 8.0) 2.5mL, 0.5M EDTA (pH 8.0) 2mL를 초순수로 100mL에 정량한 것의 1mL에 용해된 것) 300µL에 현탁시켰다. 37°C에서 30분간 배양한 후, 프로테이나제 K 액(프로테이나제 K 10mg/1액 1mL) 6µL를 첨가하여 온화하게 혼합하고, 37°C에서 10분간 인큐베이트하였다. N-라우로일사르코신 3mg을 첨가하여 온화하게 혼합한 후, 37°C에서 3시간 인큐베이트한 후 페놀-클로로포름 처리를 온화하게 2회 행하였다. 상청 300µL에 5M NaCl 용액 10µL와 에탄올 600µL를 첨가하여 혼합한 후, 원심 분리하였다(15,000rpm, 10분간, 4°C). 70% 에탄올로 세척한 후, 바람 건조하고, TE 완충액 100µL에 용해시켜 목적으로 하는 염색체 DNA를 얻었다.
- [0185] (ii) PCR에 의한 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자의 증폭
- [0186] PCR 반응액의 조성은, 물 35µL, 10 × Ex Taq buffer 5µL, 2mM dNTP 5µL, 100pmol 프라이머 1 (5'-ATGAACAANAANAACCGCCACCCSGCCGAC-3')(서열번호 17) 1µL, 100pmol 프라이머 2 (5'-TCARTCYGCCAGGGCAGTYGGSCCGATYTC-3')(서열번호 18) 1µL, 주형 DNA 2µL 및 Ex Taq 1µL로 했다. PCR 반응 조건은, (i) 98°C에서 5분간, (ii) 96°C에서 10초간, (iii) 50°C에서 5초간, (iv) 60°C에서 4분간, 및 (ii)까지를 31사이클로 했다. 증폭된 유전자는, 아가로스 겔 전기영동에 의해 확인하였다. 증폭된 유전자를 VIOGENE(USA)사의 Gel-M 겔 추출 키트를 사용하여 추출하였다.
- [0187] (iii) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자 서열의 시퀀싱
- [0188] 유전자의 양방의 쇠에 대해서 시퀀싱을 행하기 위한, 프라이머 1, 프라이머 2, 프라이머 3 (5'-AGCACGGTAATCGATCTGGA-3')(서열번호 19) 및 프라이머 4 (5'-CATCGAGTGCCAGTTGCACG-3')(서열번호 20)를 사용하여 시퀀싱 반응을 행하였다. 반응액 조성은, 1.6µL의 각 프라이머, 1.6µL의 주형 DNA, 1µL의 BigDye 프리믹스 솔루션, 1.6µL의 5xBigDye 시퀀싱 버퍼와 2.8µL의 멸균수로 하고, 전량 10µL로 하였다. PCR 반응의 조건은, (i) 96°C에서 2분간, (ii) 96°C에서 10초간, (iii) 50°C에서 5초간, (iv) 60°C에서 4분간, (v) (ii) ~ (iv)를 25회, 및 (vi) 72°C에서 5분간으로 했다. PCR 산물에, 1µL의 3M 아세트산 나트륨(pH 5.2), 1µL의 0.125M EDTA와 25µL의 에탄올을 첨가하여, 실온에서 15분간 방치한 후 원심 분리에 의해(15,000rpm, 8분간, 4°C) 침전시켰다. 상청을 폐기한 후, 10µL의 Hi Di Formamide를 첨가하고, 100°C에서 5분간 가열한 후, 빙수에서 급냉한 것을 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer에서 염기 서열의 해독을 행했다. 얻어진 시퀀스 데이터의 분석은 Genetyx로 행하고, 각각의 프라이머로 증폭한 단편의 염기 서열을 연결했다. 도 3은, 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제(야생형 효소)의 염기 서열로부터 예측되는 1차 구조를 도시하였다.
- [0189] (iv) 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자의 대장균(*E.coli* JM 109)으로의 형질전환
- [0190] 라이게이션 반응의 조성은, PCR 산물 5µL, pT7 Blue T-Vector (Novagen) 1µL, 라이게이션 믹스 (Takara) 6µL로 하고, 16°C에서 30분간 반응시켰다. 대장균(*E.coli* JM 109)의 컴피턴트 셀 100µL에 12µL의 라이게이션 반응액을 첨가하여 히트 쇼크법으로 형질전환을 행하였다. 80µg/mL의 암피실린을 포함하는 LB 배지(1.0% 폴리펩톤, 0.5% 이스트 추출물 및 1.0% NaCl)에 생육한 콜로니를 몇 주 선발하여 플라스미드 추출하고, 0.7% 아가로스 전기 영동에 의해 인서트의 유무의 확인을 행하였다.
- [0191] (8) 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자의 대장균(*E.coli* BL21)에 있어서의 발현
- [0192] (i) 슈도모나스·에스피(*Pseudomonas* sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 효소 유전자의 증폭
- [0193] 상기 클로닝에서 얻어진 플라스미드를 주형 DNA로 하여 PCR을 행하였다. PCR 반응액의 조성은, 물 35µL, 10 × Ex Taq buffer 5µL, 2mM dNTP 5µL, 100pmol/µL 프라이머 5 (5'-TATAATCATATGAACAAGAACAACCGCCA-3')(서열번호 21) 1µL, 100pmol/µL 프라이머 6 (5'-TATTACTCGAGTCAGTCCGCCAGGGCGATTG-3')(서열번호 22) 1µL, 주형 DNA

100ng 및 Ex Taq 5unit로 했다. 프라이머 5 및 프라이머 6은 각각 NdeI 및 XhoI의 제한 효소 사이트를 설계했다. PCR 반응의 조건은, (i) 98℃에서 5분간, (ii) 96℃에서 10초간, (iii) 50℃에서 5초간, (iv) 60℃에서 4분간 및 (ii)까지 31사이클로 했다.

[0194] (ii) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자의 pET15b 벡터에 재조합과 대장균 (E. coli BL21)에의 형질전환

[0195] PCR 반응에서 얻어진 PCR 산물 5μL에, 1μL NdeI와 1μL XhoI을 첨가하고, 37℃에서 1시간 배양한 후, 제한 효소 처리를 행하였다. 라이게이션 반응은, 5μL DNA, 1μL pET15b(증폭 유전자와 같은 제한 효소 처리를 행한 것), 6μL 라이게이션 Mix로 하고, 16℃에서 30분 동안 인큐베이트하였다. 얻어진 라이게이션 반응액 전량을 히트 쇼크법에 의해, 대장균(E. coli BL21)에 도입했다. 또한, 본 재조합 대장균이 생성하는 L-아미노산 옥시다제는 N 말단측에 6×히스티딘·태그가 부가된 융합 단백질로 하여 생성되도록 발현용 플라스미드를 구축했다.

[0196] (iii) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제 유전자의 발현과 Ni-Sepharose를 이용한 히스티딘 tag6 융합 효소의 정제

[0197] 80 μg/mL의 암피실린을 포함하는 4L의 LB 배지(1.0% 폴리펩톤, 0.5% 이스트 추출물, 1.0% NaCl, pH 7.0)에 재조합 대장균(BL21)을 접종하고, 37℃에서 12시간 배양 후, 0.5mM IPTG를 첨가하여 계속해서 30℃에서 12시간 배양하여 L-아미노산 옥시다제를 유도했다. 대형 원심기에서 집균하고(5,000rpm, 10분간, 4℃), 생리 식염수(0.9% NaCl)로 세척한 후, 100mL의 20mM 인산 완충액(pH 7.0)(KPB)에 현탁시켰다. 100mL의 균체액을 15분간 초음파 처리하고, 원심 분리(8,000rpm, 20분, 4℃)에서 얻어진 상청액을 무세포 추출액으로 했다. 무세포 추출액을 20mM KPB로 치환한 Ni-Sepharose 컬럼에 흡착시켜 20mM KPB로 컬럼을 세척 후, 500mM 이미다졸을 포함하는 20mM KPB 효소액을 용출시켰다.

[0198] (9) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제의 활성 측정

[0199] 정제 효소 표본품의 효소 활성을, 표 3에 있어서의 아미노산을 각각 단독으로 함유하는 측정 시약으로 측정하고, 본 효소 표본품이 이하의 성질을 갖는 것임을 확인했다:

[0200] (a) L-라이신, L-아르기닌, L-오르니틴을 기질로 한다(표 5). 이들 이외의 단백질 구성 아미노산(L-티로신, L-알라닌, L-시스테인, L-아스파라긴산, L-글루타민산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-메티오닌, L-아스파라긴, L-프롤린, L-글루타민, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-페닐알라닌, L-트립토판)에 대해서는 L-아미노산 옥시다제는 활성을 나타내지 않았다.

표 5

	효소 활성 (munit/ml)	상대 활성
L-라이신	0.532	100
L-오르니틴	0.146	27
L-아르기닌	0.108	20

[0201]

[0202] (b) pH 6.5 이하의 범위에서는 L-라이신에만 작용한다(도 6).

[0203] (10) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H-8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제를 이용한 L-라이신의 정량

[0204] 상기 (8) (iii)에서 정제된 N 말단에 히스티딘·태그가 추가된 L-아미노산 옥시다제 표본품을 이용하여, 상술의 L-라이신 측정용 시약 조성물을 조제하였다. 본 시약 조성물을 이용하여 L-라이신 측정을 실시했다. 검체로서는 1 ~ 6mM의 L-라이신 수용액을 조제하였다.

[0205] 결과로서, L-라이신 수용액을 검체로 한 경우에는 반응성이 확인되어, L-라이신 농도와 측정 데이터는 양호한 정(正)의 상관 관계를 나타냈다(도 7 참조).

[0206] (11) 슈도모나스·에스피(Pseudomonas sp.) H8-1-3 주 유래 L-아미노산 옥시다제의 유전자에의 변이 도입

[0207] 이하의 순서에 따라, 상기 L-아미노산 옥시다제의 아미노산 서열에 있어서 제254번째 시스테인의 포화 변이를

행함으로써 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 갖는 변이형 L-아미노산 옥시다제를 작제하였다.

- [0208] 상기 (8) (ii)에서 구축된 L-아미노산 옥시다제 유전자가 도입된 발현용 플라스미드를 주형으로 하여, 변이 도입을 위한 PCR을 행하였다. PCR 반응에는 QuikChange^(R) Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)를 사용하였다. PCR 반응액의 조성은, 멸균수(MilliQ) 16.5 μ L, 10 \times QuikChange Lightning Multi reaction buffer 2.5 μ L, 100ng/ μ L 주형 DNA 1.0 μ L, 100ng/ μ L 프라이머 7 (5'-GTGGTGATGACCAATNNSGACGACCACCAACAC-3')(서열번호 23) 1.0 μ L, 100ng/ μ L 프라이머 8 (5'-GCGGTGCTGACGACCNNSCAGAGTTGCTGCTG-3')(서열번호 24) 1.0 μ L 및 100ng/ μ L 프라이머 9 (5'-AAGCCAGGGGTGATCNSCTGTCTACGCGTGG-3')(서열번호 25) 1.0 μ L, dNTP mix 1.0 μ L, QuikChange Lightning Multi enzyme blend 1.0 μ L로 했다. PCR 반응 조건은 (i) 95 $^{\circ}$ C에서 2분간, (ii) 95 $^{\circ}$ C에서 20초간, (iii) 55 $^{\circ}$ C에서 30초간, (iv) 65 $^{\circ}$ C에서 4분간, (v) (ii) ~ (iv) 65 $^{\circ}$ C에서 5분간으로 했다. PCR 산물에, 1.0 μ L의 DpnI를 추가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하였다(샘플 1). 마찬가지로 해서, 프라이머 10 (5'-CATGTGCCAGAGCGTNNSGCGACTGGCCGAA-3')(서열번호 26) 1.0 μ L, 및 100ng/ μ L 프라이머 11 (5'-ACCACCCAGATCGACNNSGAAGAGTCGTTGTC-3')(서열번호 27) 1.0 μ L를 사용하여 상기의 처리를 행하였다(샘플 2).
- [0209] 샘플 1, 샘플 2를 각각 Escherichia coli JM109에 형질전환을 행하고, 암피실린 500 μ g가 들어간 LB 액체 배지 5ml에서 37 $^{\circ}$ C 12시간 배양하였다. 배양 종료 후, 각각의 샘플을 원심 분리기(13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분)에서 집균을 행하였다. 얻어진 집균 균체를 알칼리-mini prep법에 의해 플라스미드의 추출을 행하였다. 또한, 알칼리-mini prep법은 이하의 순서에 따라 행하였다. (1) 플라스미드 DNA를 유지하는 대장균 배양액을 1.5mL 튜브에 이동시켜 원심 조작을 행하여, 균체를 펠렛으로서 회수한다. (2) 균체 펠렛에 100 μ L의 solution I[25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 0.9% 글루코스]를 첨가하여 현탁시킨다. (3) 200 μ L의 solution II[0.2M NaOH, 1% SDS]를 추가하여 균체를 용해시키고, 단백질을 변성 상태로 한다. (4) 150 μ L의 solution III[3M 아세트산 칼륨, 11.5% 아세트산]을 첨가하여 용액의 중화와 SDS의 제거를 행한다. 이의 조작에 의해, 염색체 DNA, 단백질은 응집 침전물로 되지만, 플라스미드 DNA는 용액 부분에 잔류한다. (5) 응집 침전물을 원심 분리에 의해 용액으로부터 제거하고, 플라스미드 DNA를 포함하는 용액을 회수한다. (6) 얻어진 플라스미드 DNA를 포함하는 용액에 대하여 페놀·클로로포름 추출을 행하여 단백질을 제거한다. (7) 플라스미드 용액의 2배량의 에탄올을 첨가하여 드라이아이스 상에 5분간 정치시킨다. (8) 원심 조작에 의해 플라스미드 DNA의 침전을 얻는다. (9) 얻어진 플라스미드 DNA의 침전을 TE[10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA]에 용해시켜 시료로 한다.
- [0210] 얻어진 플라스미드에 있어서, PCR1에서 얻어진 산물을 plasmid1, PCR2에서 얻어진 산물을 plasmid2로 하고, 각각을 E. coli BL21(DE3)에 히트 쇼크법에 의해, 형질전환을 행하였다. 히트 쇼크법의 순서는 이하와 같다. E.coli BL21(DE3) 50 μ L에 대하여 각각의 플라스미드 5 μ L를 혼합하고, 60분간 빙상 정치했다. 그 후, 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 히트 쇼크를 행한 후, LB 액체 배지를 1ml 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 인큐베이트하였다. 암피실린이 들어간 플레이트에 도포하고, 37 $^{\circ}$ C 16시간 배양을 행하였다.
- [0211] 96공(穴) 딥 웰에 100 μ L/ml의 암피실린이 들어간 LB 액체 배지를 300 μ L씩 분주하고, 콜로니-피커(colony-picker)를 사용하여 얻어진 콜로니를 각 웰의 배지에 접종했다. 접종 후, 진탕기를 이용하여 700rpm, 37 $^{\circ}$ C 12시간 배양 후, IPTG 7.5mM을 20 μ L 첨가하여, 다시 30 $^{\circ}$ C 12시간 진탕 배양을 행하였다. 배양 후, 원심 분리(2,500rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20분)에 의해 집균을 행하였다. 각각의 집균 균체에 대하여 10mM KPB(pH 7.0)를 200 μ L를 첨가, 현탁하고, 96공 환저 플레이트에 이동시켜, 8런 초음파 분쇄기에 의해 균체 파쇄(output 3, 30초간)를 행하였다. 상기와 동일한 조건에서 원심 분리 후, 얻어진 상청을 무세포 추출액으로 했다. 무세포 추출액 50 μ L를 이용하여, 상기 활성 측정법을 이용하여 L-라이신을 기질로 하여 비활성을 측정했다.
- [0212] 이러한 형질전환체 중에서 활성이 현저하게 높은 것의 스크리닝을 행한 결과, PCR 1에서 얻어진 4,000 콜로니 중 175 콜로니, PCR 2에서 얻어진 500 콜로니 중 50 콜로니가 얻어졌다.
- [0213] 얻어진 콜로니 상청을 이용하여 다시 p-chloromercuribenzoate(PCMB)를 이용한 활성 측정을 행하였다. 단백질 중의 SH 기는 금속 이온과 반응하여 메르캡티드를 형성한다. 본 반응은 가역적이지만, 일반적으로 평형은 크게 메르캡티드에 치우치고 있다. Hg²⁺는 SH 기에 대해 높은 친수성을 가지고 있다. 옥시다제 활성, 또는 모노옥시게나제에 활성을 갖는 효소에 있어서는 PCMB 시약을 첨가함으로써 옥시다제 활성에 치우친다는 것이 당업자에게 알려져 있다.
- [0214] 상기의 경우로부터, PCMB를 첨가한 무세포 추출액과 첨가하지 않은 무세포 추출액의 활성에 차이가 없지만 스크리닝을 행한 결과, PCR1에서 175 콜로니 중 4 콜로니, PCR2에서 50 콜로니 중 4 콜로니가 얻어졌다. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(어플라이드 바이오시스템즈사 제조) 및 DNA 시퀀서 310 Genetic

Analyzer(어플라이드 바이오시스템즈사 제조)를 이용하여, 얻어진 콜로니에 포함된 플라스미드의 시퀀싱을 행하였다. 그 결과, 코딩 영역 중의 제760 ~ 762번째의 염기 서열 TGC가 ATC로 변이하고 있으며, 이 변이에 의해 아미노산 서열 중 제254번째의 시스테인이 이소류신으로 치환된 것이 확인되었다. 이 변이체 효소를 변이형 효소 C254I라고 칭한다.

- [0215] 이러한 스크리닝의 결과에서 얻어진 변이형 효소를, 상기 (8) (iii)에 기재된 방법에 의해 정제하였다. 도 1에 도시한 바와 같이, 야생형 효소로는 옥시다제 반응과 비교하여 모노옥시게나제 반응의 비율이 대부분을 차지하지만, 정제된 변이형 효소 C254I 대해서 PCMB에 의한 영향은 보이지 않고, HPLC에 의한 모노옥시게나제의 생성물의 검출도 발견되지 않았다.
- [0216] 변이형 효소 C254I에 대해 반응시의 pH의 영향을 조사하기 위해, 시약 조성물의 pH를 변화시켜 L-라이신, L-오르니틴, 또는 L-아르기닌을 기질로 해서 각 pH에 있어서의 옥시다제 활성을 측정했다. 야생형 효소와 변이형 효소 각각에 대해 pH의 영향을 도 8에 도시한다.
- [0217] 도 8A에 도시된 바와 같이, 야생형 효소는, pH 7.0에서, L-라이신뿐만 아니라, L-아르기닌과 L-오르니틴을 촉매하므로, 야생형 효소로 L-라이신을 정확하게 정량하기 위해서는 pH 6.5 이하에서, 반응시켜야 한다고 하는 제약이 있다. 한편, 도 8B에 도시된 바와 같이, 변이형 효소 C254I는 pH 7.0 부근에서도 L-라이신에 대해 높은 기질 특이성을 갖고 있기 때문에 반응계의 pH에 의존하지 않고 L-라이신을 특이적으로 검출하는 것이 가능하다. 또한, 도 8에 도시된 바와 같이, pH 6.5에서의 야생형 효소의 비활성은 0.56U/mg인 것에 대하여, pH 7.5에서의 변이형 효소 C254I의 비활성은 2.5U/mg이었다. 변이형 효소 C254I는, 야생형 효소와 비교하여 옥시다제 활성이 높았다.
- [0218] 또한, 변이형 효소 C254I 대해서, L-라이신, L-아르기닌 및 L-오르니틴 이외의 아미노산을 기질로 하여 옥시다제 활성을 측정했다. 활성 측정 시약 및 활성 측정법은 상기 (1) 및 (2)에 나타낸 바와 같다. 반응 조건은 pH 7.0 및 30℃로 했다. 그 결과를 도 9B에 나타내었다. 도 9A는 야생형 효소의 결과를 나타낸다.
- [0219] 도 9에 도시된 바와 같이, 변이형 효소 C254I는 L-아르기닌 및 L-오르니틴에 대하여 활성을 나타내지 않는데다가, 다른 아미노산에 대해서도 활성을 나타내지 않고, L-라이신에 대해서만 옥시다제 활성을 나타내었다. 본 발명의 변이형 효소가, L-라이신에 대해서 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성을 나타내고, L-라이신을 특이적으로 검출 수 있음이 나타났다.
- [0220] 또한, 상기 (8) (iii)에서 정제된 야생형 효소, 및 상기 변이형 효소 C254I를 이용하여 상술의 L-라이신 측정용 시약 조성물을 조제하였다. 본 시약 조성물을 이용하여 L-라이신 측정을 실시했다. 검체로서는 1 ~ 10mM의 L-라이신 수용액을 조제하였다.
- [0221] 결과로서, L-라이신 수용액을 검체로 한 경우에는 반응성이 확인되고, L-라이신 농도와 측정 데이터는 양호한 정(正)의 상관 관계를 나타냈다(도 10 참조).
- [0222] 또한, 상기 포화 변이에 의해 얻어진 변이체에 있어서 제254번째 시스테인이 이소류신 이외의 아미노산으로 치환된 것에 대해서도, L-라이신, L-아르기닌, 및 L-오르니틴 각각에 대한 옥시다제 활성을 측정했다. 활성 측정 시약 및 활성 측정법은 상기 (1) 및 (2)에 나타낸 바와 같다. 반응 조건은 pH 7.0 및 30℃로 했다. 그 결과를 표 6 및 표 7, 및 도 11 및 도 12에 나타낸다.

표 6

각 변이체의 효소 활성 (U/mg)

		기질		
		L-라이신	L-아르기닌	L-오르니틴
C254의 포화 변이에 의해 치환된 아미노산	Cys	0.580	0.121	0.481
	Met	1.80	0.000	0.080
	Phe	1.84	0.180	0.000
	Tyr	1.93	0.000	0.000
	Trp	1.33	0.332	0.151
	Ala	0.350	0.031	0.190
	Gly	0.360	0.251	0.184
	Val	1.24	0.113	0.121
	Ile	2.80	0.010	0.000
	Leu	2.21	0.111	0.092
	Lys	1.00	0.260	0.000
	Arg	0.890	0.563	0.000
	His	0.410	0.210	0.110
	Asp	1.77	0.000	0.461
	Glu	1.60	0.000	0.240
	Ser	0.530	0.020	0.114
	Thr	0.300	0.051	0.250
	Asn	1.20	0.620	0.141
	Gln	1.10	0.282	0.111
	Pro	1.15	0.430	0.811

[0223]

표 7

각 변이체의 효소 활성 (상대 활성%)

		기질		
		L-라이신	L-아르기닌	L-오르니틴
C254의 포화 변이에 의해 치환된 아미노산	Cys	100	20.9	82.9
	Met	100	0.000	4.44
	Phe	100	9.78	0.000
	Tyr	100	0.000	0.000
	Trp	100	25.0	11.4
	Ala	100	8.86	54.3
	Gly	100	69.7	51.1
	Val	100	9.11	9.76
	Ile	100	0.357	0.000
	Leu	100	5.02	4.16
	Lys	100	26.0	0.000
	Arg	100	63.3	0.000
	His	100	51.2	26.8
	Asp	100	0.000	26.0
	Glu	100	0.000	15.0
	Ser	100	3.77	21.5
	Thr	100	17.0	83.3
	Asn	100	51.7	11.8
	Gln	100	25.6	10.1
	Pro	100	37.4	70.5

[0224]

[0225]

표 6 및 도 11에 나타낸 바와 같이, 상기 변이형 효소 C254I 이외에도, 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr), 트립토판(Trp), 발린(Val), 류신(Leu), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 아스파라긴산(Asp), 글루타민산(Glu), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln) 및 프롤린(Pro) 각각으로 치환된 변이형 효소도, 야생형 효소와 비교하여, L-라이신에 대한 옥시다제 활성이 상승하는 경향이 확인되었다. 또한, 표 7 및 도 12에 나타낸 바와 같이, 상기 변이형 효소 C254I 이외에도, 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr), 트립토판(Trp), 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 발린(Val), 류신(Leu), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파라긴산(Asp), 글루타민산(Glu), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln) 및 프롤린(Pro) 각각으로 치환된 변이형 효소도, 야생형 효소와 비교하여, L-라이신에 대한 옥시다제 활성을 100%로 한 경우에 있어서의 L-오르니틴 및 L-아르기닌 각각에 대한 상대 활성이 낮은 점에서는, 이러한 변이형 옥시다제에 대해서도 L-라이신에 대한 기질 특이성이 높은 옥시다제 활성이 나타났다. 또한, 추가로, 이러한 아미노산 치환 중, 메티

오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr), 알라닌(Ala), 발린(Val), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 아스파라긴산(Asp), 글루타민산(Glu) 또는 세린(Ser)으로 치환된 변이형 효소에서는, 야생형 효소와 비교하여, L-아르기닌 옥시다제 활성 및 L-오르니틴 옥시다제 활성의 상기 상대 활성의 양방이 낮기 때문에, 이들 변이형 효소는 L-라이신에 대해 특히 높은 기질 특이성을 가지고 있었다(표 7 및 도 12 참조). 또한, 티로신 또는 이소류신으로 치환된 변이형 효소에서는, 상기 L-오르니틴 및 L-아르기닌 각각에 대한 옥시다제 활성은 어느 것도 검출되지 않고, 이들 효소는 L-라이신에 대해 매우 높은 기질 특이성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(표 6 및 표 7, 및 도 11 및 도 12).

[0226]

또한, 상기 포화 변이에 의해 얻어진 변이체에 있어서 제254번째의 시스테인이 이소류신 이외의 아미노산으로 치환된 것에 대해서도, 단백질을 구성하는 아미노산인 L-티로신, L-알라닌, L-시스테인, L-아스파라긴산, L-글루타민산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-메티오닌, L-아스파라긴, L-프롤린, L-글루타민, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-페닐알라닌 및 L-트립토판 각각을 기질로 하여 L-아미노산 옥시다제 활성의 측정을 행하였다. 그 결과, 모든 변이형 효소에 있어서, 이들 아미노산을 기질로 한 경우에는 L-아미노산 옥시다제 활성은 검출되지 않았다. 또한, D-라이신, D-아르기닌, 또는 D-오르니틴을 기질로 한 경우에도, 모든 변이형 효소에 있어서 L-아미노산 옥시다제 활성은 검출되지 않았다.

[0227]

(12) 혈장 샘플 측정

[0228]

상기 변이형 효소 C254I 대해서, L-라이신, L-오르니틴, 또는 L-아르기닌을 첨가한 인간 혈장 샘플을 이용하여 옥시다제 활성의 측정을 행하였다. 인간 혈장으로서, 아미콘 울트라-0.5(UFC501096, Millipore)를 이용하여, 16,100 xg, 4℃, 30분간의 원심 분리에 의해 제단백액을 조제했다. 조제한 인간 혈장에, 최종 농도 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 μM로 되도록 L-라이신, L-오르니틴, 또는 L-아르기닌을 첨가하여, 혈장 샘플로 했다. 측정 시약의 조성 및 측정 방법은 상기 (1) 및 (2)에 나타낸 바와 같고, 반응 조건은 pH 7.0 및 30℃로 했다. 결과를 도 14에 도시한다. 또한, 비교 대상으로서의 야생형 효소에 대해서도 마찬가지로 인간 혈장 샘플을 이용하여 옥시다제 활성의 측정을 행하였다. 그 결과를 도 13에 도시한다.

[0229]

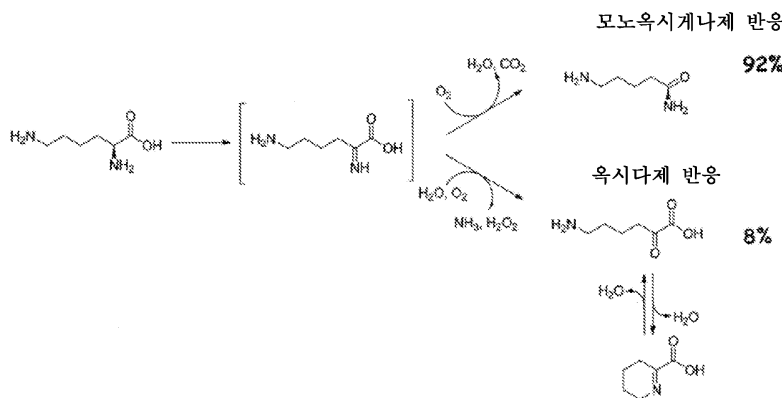
도 13에 도시한 바와 같이, 야생형 효소에 있어서는, 라이신의 정량은 가능한 하였으나, 오르니틴과 아르기닌에 있어서는 옥시다제 활성이 검출되었다. 한편, 변이형 효소 C254I에 있어서는, 도 14에 도시한 바와 같이 L-라이신 대해서만 옥시다제 활성이 검출되고, 직선적인 검량선을 그리는 것이 가능하였다.

[0230]

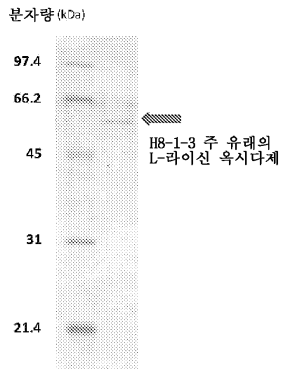
상기 시험예에 의해, 본 발명에 의한 변이형 효소를 이용하면, L-라이신 이외의 아미노산이 혼입된 임상 샘플일 지라도, L-라이신을 정확하게 검출 또는 정량할 수 있는 것으로 나타났다.

도면

도면1



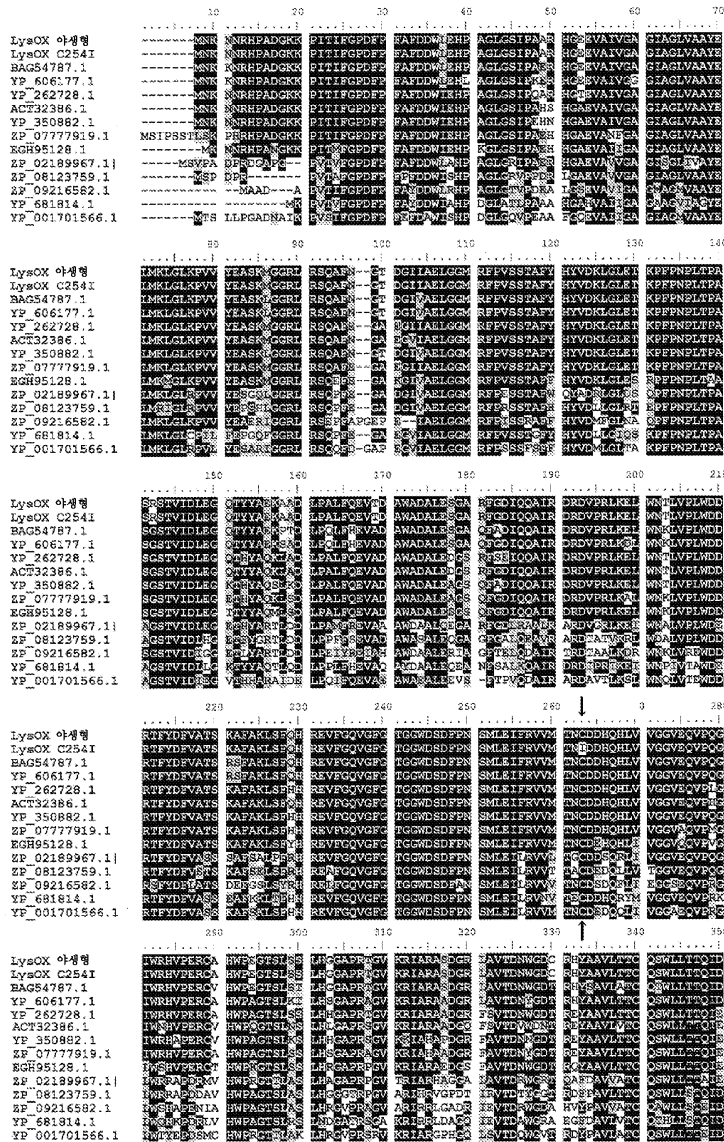
도면2



도면3

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MNNNNRHPAD	GKKPITIFGP	DFPFAFDDWL	EHPAGLGSIP	AARHGEEVA	VGAGIAGLVA	AYELMKLGLK	PVVEASKMG	GRLRSQAFNG
100	110	120	130	140	150	160	170	180
TDGI	IAELGG	MRFVSSSTAF	YHYVDKLGLE	TKPPFNPLTP	ASRSTVIDLE	GGTYAEKAA	DLPALFQEV	DAWADALESG
190	200	210	220	230	240	250	260	270
RDRDVPRLKE	LWNTLVPLWD	DRTFYDFVAT	SKAFAKLSFQ	HREVFQGVGF	GTGGWDSDFP	NSMLEIFRVV	MTNCDHQHL	VVGGVEQVPQ
280	290	300	310	320	330	340	350	360
GIVRHVPERC	AHNPEGTSL	SLJGGAPRTG	VKR IARASDG	RLAVTDNWGD	CRHYAAVLT	TSQSMLLTTQI	DCEESLFSCK	MWMLDRTRY
370	380	390	400	410	420	430	440	450
MQSSKTFVMV	DRPFWKDKDP	ETGRDLMSMT	LTDRLTRGT	Y LFDNGDDKPG	VICLSYAWMS	DALKMLPHPV	EKRVOLALDA	LKKI YPKTDI
460	470	480	490	500	510	520	530	540
AGHI	IGDPIT	ISWEADPHFL	GASKGALPGH	YRYNORMYAH	FMQAGMPVEQ	RGIF IAGDDV	SWTPAWVEGA	VOTSLNAVWG
550	560							
ADNPGPGDVF	DEIGI	IALAD	*					

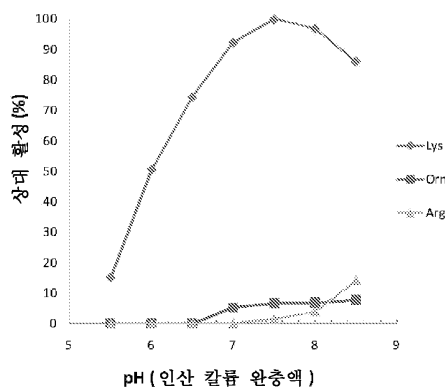
도면4



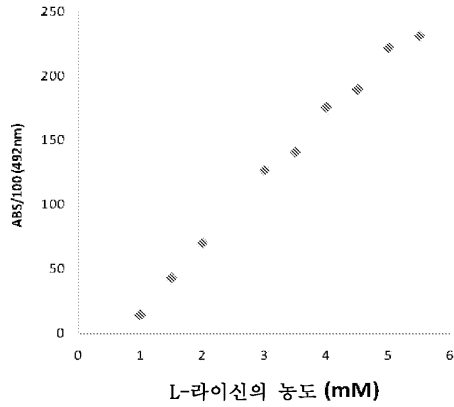
도면5

	360	370	380	390	400	410	420
LysOX 아세트형	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
LysOX C254I	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
BAG54787.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
YP_606177.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
YP_262728.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
ACT32386.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
YP_350882.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
ZF_07777919.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
EGH95128.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
ZF_02189967.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
ZF_08123759.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
ZF_09216582.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
YP_681814.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
YP_001701566.1	CEESLFSQGM	WMALDRTRYM	QSSKTFVMVD	RPFWKDKDEE	TCGRILMSMTL	IDRLTRGIVY	FDNGDDKPGV
	430	440	450	460	470	480	490
LysOX 아세트형	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
LysOX C254I	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
BAG54787.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
YP_606177.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
YP_262728.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
ACT32386.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
YP_350882.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
ZF_07777919.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
EGH95128.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
ZF_02189967.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
ZF_08123759.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
ZF_09216582.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
YP_681814.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
YP_001701566.1	ICLSYRWMSD	ALRMLHFHVE	KRVGLALDAL	KKIYPRVDIA	CHITGDPITV	SWEADPHFLG	AFKCALPGHY
	500	510	520	530	540	550	560
LysOX 아세트형	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
LysOX C254I	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
BAG54787.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
YP_606177.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
YP_262728.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
ACT32386.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
YP_350882.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
ZF_07777919.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
EGH95128.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
ZF_02189967.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
ZF_08123759.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
ZF_09216582.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
YP_681814.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
YP_001701566.1	RYNQRMVAHS	WLDQMPAEG	RGIFLAGDDV	SWTPAWVEGA	VQTSLNVAWG	IMSHFGGQTH	AEINPGGQDV
	570						
LysOX 아세트형	DEITGEPDPE						
LysOX C254I	DEITGEPDPE						
BAG54787.1	DEITGEPDPE						
YP_606177.1	DEITGEPDPE						
YP_262728.1	DEITGEPDPE						
ACT32386.1	DEITGEPDPE						
YP_350882.1	DEITGEPDPE						
ZF_07777919.1	DEITGEPDPE						
EGH95128.1	DEITGEPDPE						
ZF_02189967.1	DEITGEPDPE						
ZF_08123759.1	DEITGEPDPE						
ZF_09216582.1	DEITGEPDPE						
YP_681814.1	DEITGEPDPE						
YP_001701566.1	DEITGEPDPE						

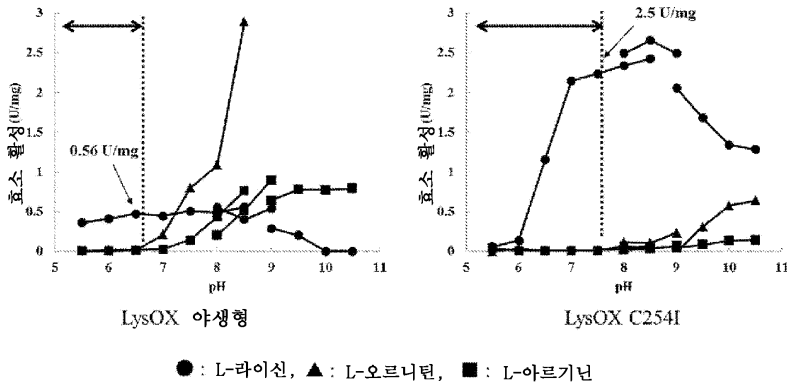
도면6



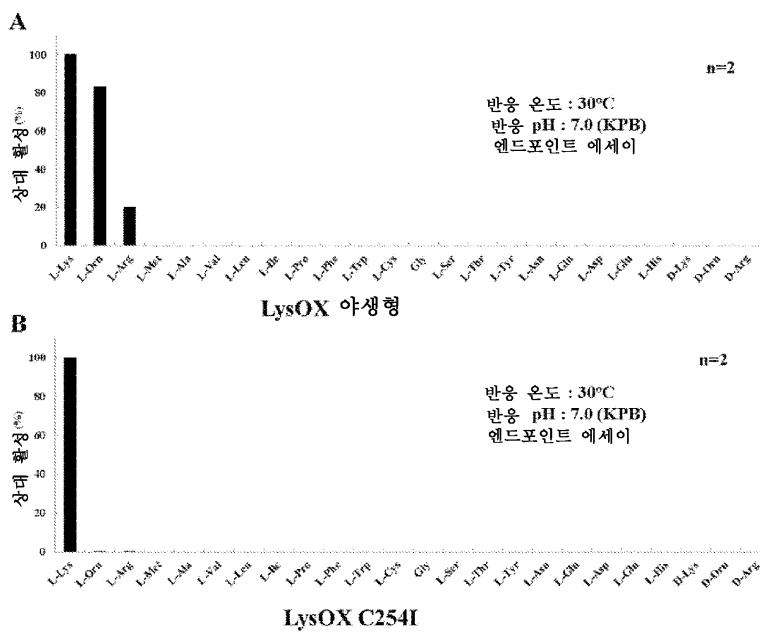
도면7



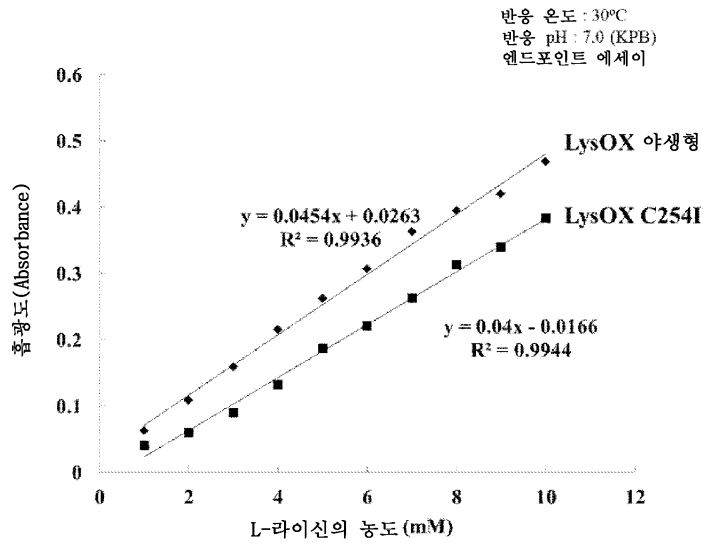
도면8



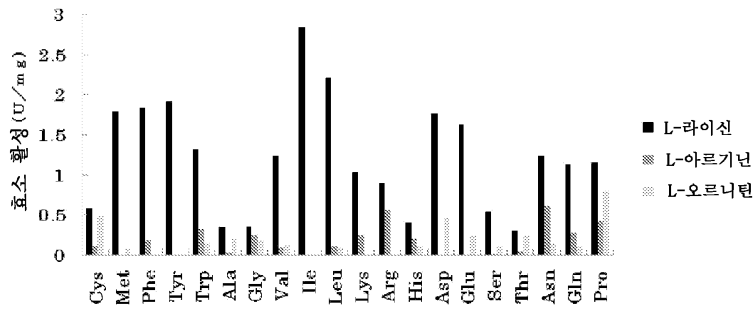
도면9



도면10



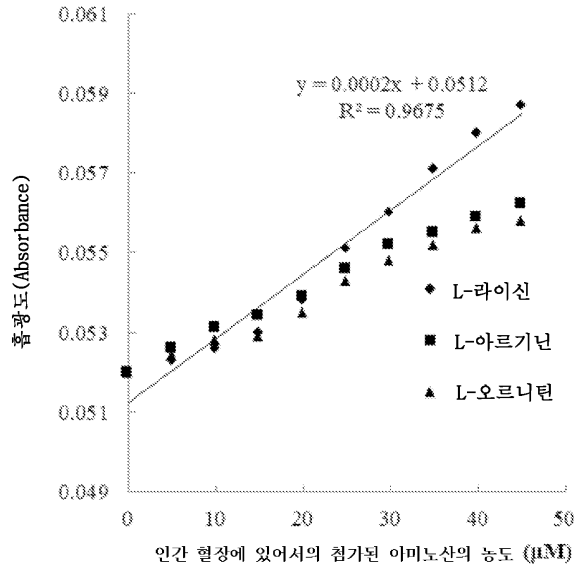
도면11



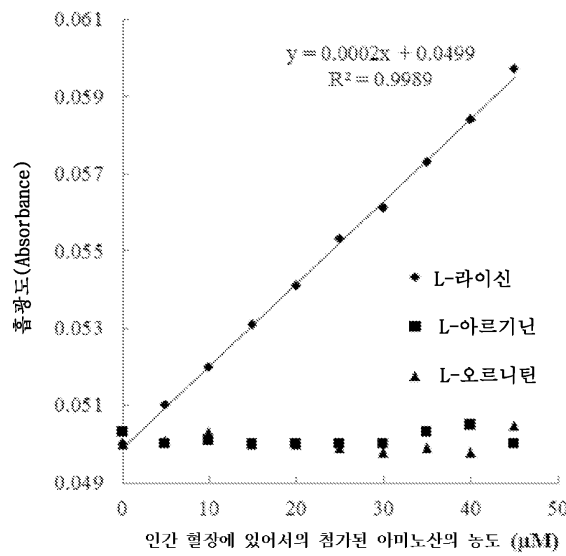
도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> TOYAMA PREFECTURE;
AJINOMOTO CO., INC.
- <120> NOVEL L-AMINO ACID OXIDASE, METHOD FOR MEASURING L-LYSINE, KIT, AND ENZYME SENSOR
- <130> 125258H
- <150> JP 2012-016165
- <151> 2012-01-30

<160> 27
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 1683
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas sp.
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(1680)
 <223>
 <400> 1
 atg aac aag aac aac cgc cac ccg gcc gac ggt aaa aaa ccg atc acc 48
 Met Asn Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
 1 5 10 15
 atc ttc ggc ccg gac ttc cct ttt gcc ttc gat gat tgg ctg gaa cac 96
 Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His
 20 25 30
 ccg gct ggc ctg ggt agc atc cca gcc gcg cgt cat ggt gaa gaa gtg 144
 Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Ala Arg His Gly Glu Glu Val
 35 40 45
 gcg atc gtg ggc gcc ggc atc gcc ggg ctg gtg gcg gcc tac gag ctg 192
 Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60
 atg aag ctg ggc ctc aaa ccg gtg gtc tac gag gcg tcg aag atg ggt 240
 Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Met Gly
 65 70 75 80
 ggg cgg ctg cgc tcg cag gcc ttc aac ggc acc gac ggt atc atc gcc 288
 Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Ile Ala
 85 90 95
 gag ctg ggc gga atg cgc ttt ccg gtg tcg tcc acg gcg ttc tac cac 336
 Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Tyr His
 100 105 110
 tac gtc gac aag ctg ggc ctg gaa acc aag cct ttc ccc aac ccg ctc 384

Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu

115 120 125

acc cct gcc tca cgc agc acg gta atc gat ctg gaa ggc cag acc tac 432

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

130 135 140

tac gcg gaa aaa gcc gcc gac ttg ccg gcc ctg ttc cag gaa gtt acc 480

Tyr Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Pro Ala Leu Phe Gln Glu Val Thr

145 150 155 160

gat gcc tgg gcc gac gcc ctg gaa agc ggt gcg cgc ttt ggt gac atc 528

Asp Ala Trp Ala Asp Ala Leu Glu Ser Gly Ala Arg Phe Gly Asp Ile

165 170 175

cag caa gca att cgt gac cgt gac gtg cct cgc ttg aaa gaa ctg tgg 576

Gln Gln Ala Ile Arg Asp Arg Asp Val Pro Arg Leu Lys Glu Leu Trp

180 185 190

aac acc ctg gtg ccg ctg tgg gac gac cgc act ttc tac gac ttc gtc 624

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

195 200 205

gcc acc tcc aaa gcc ttc gcc aaa ctg agt ttc cag cac cgc gaa gtg 672

Ala Thr Ser Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ser Phe Gln His Arg Glu Val

210 215 220

ttc ggc cag gtg ggc ttc ggc acc ggt ggt tgg gat tcg gac ttc ccc 720

Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro

225 230 235 240

aac tcg atg ctg gaa atc ttc cgt gtg gtg atg acc aat tgc gac gac 768

Asn Ser Met Leu Glu Ile Phe Arg Val Val Met Thr Asn Cys Asp Asp

245 250 255

cac caa cac ctg gtg gtc ggc ggc gtc gag caa gtg ccg cag ggc atc 816

His Gln His Leu Val Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Ile

260 265 270

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

Arg Val Gln Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Thr
 435 440 445
 gat atc gcc ggg cat atc atc ggc gac cct att acc att tcc tgg gaa 1392
 Asp Ile Ala Gly His Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Ile Ser Trp Glu
 450 455 460
 gcc gac ccg cac ttc ctc ggt gca tcc aaa ggc gcg ctg ccg ggc cac 1440
 Ala Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Ser Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480
 tat cgc tac aac cag cgg atg tac gcg cac ttc atg cag gcg cag atg 1488
 Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Ala Gln Met
 485 490 495
 cca gtc gag cag cgt ggc att ttc att gcc ggc gac gac gtg tcg tgg 1536
 Pro Val Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp
 500 505 510
 acc ccg gcc tgg gtg gaa ggc gcg gtg cag acc tcg ctc aat gcc gtg 1584
 Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val
 515 520 525
 tgg ggt atc atg aat cac ttt ggt ggc aag acc cac gcg gac aac ccc 1632
 Trp Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly Lys Thr His Ala Asp Asn Pro
 530 535 540
 ggc cct ggc gac gtg ttc gat gag atc ggc caa atc gcc ctg gcg gac 1680
 Gly Pro Gly Asp Val Phe Asp Glu Ile Gly Gln Ile Ala Leu Ala Asp
 545 550 555 560
 tga 1683
 <210> 2
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas sp.
 <
 400> 2
 Met Asn Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
 1 5 10 15

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His
 20 25 30
 Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Ala Arg His Gly Glu Glu Val
 35 40 45
 Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60

 Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Met Gly
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Ile Ala
 85 90 95
 Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Tyr His
 100 105 110
 Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu
 115 120 125

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

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

 His Gln His Leu Val Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Ile

	260		265		270										
Trp	Arg	His	Val	Pro	Glu	Arg	Cys	Ala	His	Trp	Pro	Glu	Gly	Thr	Ser
	275		280		285										
Leu	Ser	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Ala	Pro	Arg	Thr	Gly	Val	Lys	Arg	Ile
	290		295		300										
Ala	Arg	Ala	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Ala	Val	Thr	Asp	Asn	Trp	Gly	Asp
305			310		315										320
Cys	Arg	His	Tyr	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Thr	Cys	Gln	Ser	Trp	Leu	Leu
			325		330										335
Thr	Thr	Gln	Ile	Asp	Cys	Glu	Glu	Ser	Leu	Phe	Ser	Gln	Lys	Met	Trp
			340		345										350
Met	Ala	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Tyr	Met	Gln	Ser	Ser	Lys	Thr	Phe	Val
			355		360										365
Met	Val	Asp	Arg	Pro	Phe	Trp	Lys	Asp	Lys	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Arg
			370		375										380
Asp	Leu	Met	Ser	Met	Thr	Leu	Thr	Asp	Arg	Leu	Thr	Arg	Gly	Thr	Tyr
385			390		395										400
Leu	Phe	Asp	Asn	Gly	Asp	Asp	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Cys	Leu	Ser	Tyr
			405		410										415
Ala	Trp	Met	Ser	Asp	Ala	Leu	Lys	Met	Leu	Pro	His	Pro	Val	Glu	Lys
			420		425										430
Arg	Val	Gln	Leu	Ala	Leu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ile	Tyr	Pro	Lys	Thr
			435		440										445
Asp	Ile	Ala	Gly	His	Ile	Ile	Gly	Asp	Pro	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	Glu
			450		455										460
Ala	Asp	Pro	His	Phe	Leu	Gly	Ala	Ser	Lys	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	His
465			470		475										480
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Gln	Arg	Met	Tyr	Ala	His	Phe	Met	Gln	Ala	Gln	Met
			485		490										495
Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Gly	Ile	Phe	Ile	Ala	Gly	Asp	Asp	Val	Ser	Trp
			500		505										510

Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val
 515 520 525

Trp Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly Lys Thr His Ala Asp Asn Pro
 530 535 540

Gly Pro Gly Asp Val Phe Asp Glu Ile Gly Gln Ile Ala Leu Ala Asp
 545 550 555 560

<210> 3

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Mutated L-amino acid Oxydase

<220><221> CDS

<222> (1)..(1680)

<223>

<400> 3

atg aac aag aac aac cgc cac ccg gcc gac ggt aaa aaa ccg atc acc 48

Met Asn Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
 1 5 10 15

atc ttc ggc ccg gac ttc cct ttt gcc ttc gat gat tgg ctg gaa cac 96

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His
 20 25 30

ccg gct ggc ctg ggt agc atc cca gcc gcg cgt cat ggt gaa gaa gtg 144

Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Ala Arg His Gly Glu Glu Val
 35 40 45

gcg atc gtg ggc gcc ggc atc gcc ggg ctg gtg gcg gcc tac gag ctg 192

Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60

atg aag ctg ggc ctc aaa ccg gtg gtc tac gag gcg tcg aag atg ggt 240

Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Met Gly

65 70 75 80

ggg cgg ctg cgc tcg cag gcc ttc aac ggc acc gac ggt atc atc gcc 288

Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Ile Ala

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

cac caa cac ctg gtg gtc ggc ggc gtc gag caa gtg ccg cag ggc atc 816

His Gln His Leu Val Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Ile
260 265 270
tgg cgc cat gtg cca gag cgt tgt gcg cac tgg ccc gaa ggt acc agc 864
Trp Arg His Val Pro Glu Arg Cys Ala His Trp Pro Glu Gly Thr Ser
275 280 285
ctg agc tcg ctg cac ggc ggt gca ccg cgc acc ggc gtc aag cgc att 912
Leu Ser Ser Leu His Gly Gly Ala Pro Arg Thr Gly Val Lys Arg Ile
290 295 300
gcc cgc gcc agc gac ggc cgc ctg gca gtc acc gac aac tgg ggc gac 960
Ala Arg Ala Ser Asp Gly Arg Leu Ala Val Thr Asp Asn Trp Gly Asp
305 310 315 320
tgc cgc cat tac gcg gcg gtg ctg acg acc tgc cag agt tgg ctg ctg 1008
Cys Arg His Tyr Ala Ala Val Leu Thr Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu
325 330 335

acc acc cag atc gac tgt gaa gag tcg ttg ttc tcg cag aag atg tgg 1056
Thr Thr Gln Ile Asp Cys Glu Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp
340 345 350
atg gcc ctg gac cgc acc cgc tac atg caa tcg tcg aaa acc ttc gtc 1104
Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val
355 360 365
atg gtc gac cgg ccg ttc tgg aaa gac aaa gac cca gaa acc ggt cgc 1152

Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg
370 375 380
gac ctg atg agc atg acc ctc acc gac cgg ctg acc cgt ggc acc tac 1200
Asp Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr
385 390 395 400
ctg ttc gat aac ggc gac gac aag cca ggg gtg atc tgc ctg tcc tac 1248
Leu Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr

405	410	415	
gcg tgg atg agc gat gcc ctg aag atg ctc ccg cac ccg gtg gaa aaa			1296
Ala Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro His Pro Val Glu Lys			
420	425	430	
cgc gtg caa ctg gca ctc gat gca ttg aaa aag atc tac ccg aaa acc			1344
Arg Val Gln Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Thr			
435	440	445	
gat atc gcc ggg cat atc atc ggc gac cct att acc att tcc tgg gaa			1392
Asp Ile Ala Gly His Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Ile Ser Trp Glu			
450	455	460	
gcc gac ccg cac ttc ctc ggt gca tcc aaa ggc gcg ctg ccg ggc cac			1440
Ala Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Ser Lys Gly Ala Leu Pro Gly His			
465	470	475	480
tat cgc tac aac cag cgg atg tac gcg cac ttc atg cag gcg cag atg			1488
Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Ala Gln Met			
485	490	495	
cca gtc gag cag cgt ggc att ttc att gcc ggc gac gac gtg tcg tgg			1536
Pro Val Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp			
500	505	510	
acc ccg gcc tgg gtg gaa ggc gcg gtg cag acc tcg ctc aat gcc gtg			1584
Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val			
515	520	525	
tgg ggt atc atg aat cac ttt ggt ggc aag acc cac gcg gac aac ccc			1632
Trp Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly Lys Thr His Ala Asp Asn Pro			
530	535	540	
ggc cct ggc gac gtg ttc gat gag atc ggc caa atc gcc ctg gcg gac			1680
Gly Pro Gly Asp Val Phe Asp Glu Ile Gly Gln Ile Ala Leu Ala Asp			
545	550	555	560
tga			1683
<210> 4			
<211> 560			

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Mutated L-amino acid Oxydase

<400> 4

Met Asn Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr

1 5 10 15

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His

 20 25 30

Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Ala Arg His Gly Glu Glu Val

 35 40 45

Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu

50 55 60

Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Met Gly

65 70 75 80

Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Ile Ala

 85 90 95

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

 100 105 110

Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Ala Glu Lys Ala Ala Asp Leu Pro Ala Leu Phe Gln Glu Val Thr

145 150 155 160

Asp Ala Trp Ala Asp Ala Leu Glu Ser Gly Ala Arg Phe Gly Asp Ile

 165 170 175

Gln Gln Ala Ile Arg Asp Arg Asp Val Pro Arg Leu Lys Glu Leu Trp

180 185 190

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

195 200 205

Ala Thr Ser Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ser Phe Gln His Arg Glu Val

210 215 220

465 470 475 480
 Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Ala Gln Met

 485 490 495
 Pro Val Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp

 500 505 510
 Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val

 515 520 525
 Trp Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly Lys Thr His Ala Asp Asn Pro

 530 535 540
 Gly Pro Gly Asp Val Phe Asp Glu Ile Gly Gln Ile Ala Leu Ala Asp

545 550 555 560

<210> 5

<211> 560

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 5

Met Asn Lys Lys Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
 1 5 10 15

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His
 20 25 30

Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Glu Arg His Gly Glu Glu Val
 35 40 45

Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60

Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Val Ala
 85 90 95

Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Tyr His
 100 105 110

Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu

Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg
 370 375 380

Asp Leu Leu Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr
 385 390 395 400

Leu Phe Asp Asn Gly Asn Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr
 405 410 415

Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro His Pro Val Glu Lys
 420 425 430

Arg Val Gln Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Thr
 435 440 445

Asp Ile Ala Gly His Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu
 450 455 460

Ala Asp Pro Tyr Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480

Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Gln Asp Met
 485 490 495

Pro Ala Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp
 500 505 510

Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val
 515 520 525

Trp Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly His Thr His Pro Asp Asn Pro
 530 535 540

Gly Pro Gly Asp Val Phe Asn Glu Ile Gly Pro Ile Ala Leu Ala Asp
 545 550 555 560

<210> 6

<211> 560

<212> PRT

<213> *Pseudomonas entomophila* L48

<400> 6

Met Asn Lys Lys Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
 1 5 10 15

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Glu His

Trp Arg His Val Pro Glu Arg Cys Ala His Trp Pro Ala Gly Thr Ser
 275 280 285
 Leu Lys Thr Leu His Ser Gly Ala Pro Arg Ala Gly Val Lys Arg Ile
 290 295 300
 Ala Arg Ala Ala Asp Gly Arg Leu Ala Val Thr Asp Asn Tyr Gly Asp
 305 310 315 320
 Thr Arg His Tyr Ala Ala Val Leu Thr Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu
 325 330 335
 Thr Thr Gln Ile Asp Cys Glu Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp
 340 345 350
 Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val
 355 360 365
 Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg
 370 375 380
 Asp Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr
 385 390 395 400
 Leu Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr
 405 410 415
 Ala Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro His Pro Thr Glu Lys
 420 425 430
 Arg Val Gln Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Thr
 435 440 445
 Asp Ile Ala Gly His Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Ile Ser Trp Glu
 450 455 460
 Ala Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480
 Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Gln Asp Met
 485 490 495
 Pro Ala Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp
 500 505 510
 Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val

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

Asn Thr Leu Val Pro Leu Trp Asp Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val
 195 200 205

Ala Thr Ser Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ser Phe His His Arg Glu Val
 210 215 220

Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro
 225 230 235 240

Asn Ser Met Leu Glu Ile Phe Arg Val Val Met Thr Asn Cys Asp Asp
 245 250 255

His Gln His Leu Val Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Leu Gly Ile
 260 265 270

Trp Arg His Val Pro Glu Arg Cys Ala His Trp Pro Ala Gly Thr Ser
 275 280 285

Leu Ser Ser Leu His His Gly Ala Pro Arg Thr Gly Val Lys Arg Ile
 290 295 300

Ala Arg Ala Ala Asp Gly Arg Phe Ser Val Thr Asp Asn Trp Gly Asp
 305 310 315 320

Thr Arg Glu Tyr Ala Ala Val Leu Thr Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu
 325 330 335

Thr Thr Gln Ile Glu Cys Glu Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp
 340 345 350

Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val
 355 360 365

Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg
 370 375 380

Asp Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr
 385 390 395 400

Leu Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr
 405 410 415

Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro Gln Pro Val Glu Lys

420 425 430
 Arg Val Lys Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Val
 435 440 445

Asp Ile Ala Ser Arg Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu
 450 455 460

Ala Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480

Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Asp Asp Met
 485 490 495

Pro Ala Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp
 500 505 510

Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val
 515 520 525

Trp Gly Ile Met Lys His Phe Gly Gly Ala Thr His Ala Glu Asn Pro
 530 535 540

Gly Pro Gly Asp Val Phe His Glu Ile Gly Pro Ile Ala Leu Ala Asp
 545 550 555 560

<210> 8

<211> 560

<212> PRT

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 8

Met Asn Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr

1 5 10 15
 Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Ile Glu His

20 25 30
 Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala His Ser His Gly Ala Glu Val

35 40 45
 Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu

50 55 60
 Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Met Gly

Thr Arg Glu Tyr Ala Ala Val Leu Val Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu

325 330 335

Thr Thr Gln Ile Glu Cys Glu Glu Ala Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp

340 345 350

Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val

355 360 365

Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg

370 375 380

Asp Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr

385 390 395 400

Leu Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr

405 410 415

Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro His Pro Val Glu Lys

420 425 430

Arg Val Lys Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Val

435 440 445

Asp Ile Ala Ala Arg Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu

450 455 460

Ala Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His

465 470 475 480

Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Asp Asp Met

485 490 495

Pro Ala Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp

500 505 510

Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val

515 520 525

Trp Gly Ile Met Lys His Phe Gly Gly Glu Thr His Ala Glu Asn Pro

530 535 540

Gly Pro Gly Asp Val Phe His Glu Ile Gly Pro Ile Ala Leu Pro Glu

545 550 555 560

<210> 9

<211> 560

<212> PRT

<213> Pseudomonas fluorescens Pf0-1

<400> 9

Met Asn Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ile Thr
 1 5 10 15

Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Ile Glu His
 20 25 30

Pro Ala Gly Leu Gly Ser Ile Pro Glu His Asn His Gly Ala Glu Val
 35 40 45

Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60

Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Leu Arg Ser Gln Ala Phe Asn Gly Thr Asp Gly Ile Val Ala
 85 90 95

Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Tyr His
 100 105 110

Tyr Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Thr Lys Pro Phe Pro Asn Pro Leu
 115 120 125

Thr Pro Ala Ser Gly Ser Thr Val Ile Asp Leu Glu Gly Lys Thr His
 130 135 140

Tyr Ala Gln Ser Leu Lys Asp Leu Pro Ala Leu Phe Gln Glu Val Ala
 145 150 155 160

Asp Ala Trp Ala Asp Ala Leu Glu Ala Gly Ser Gln Phe Ala Asp Ile
 165 170 175

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

Asn Thr Leu Val Pro Leu Trp Asp Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val
 195 200 205

Ala Thr Ser Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ser Phe His His Arg Glu Val

210	215	220	
Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro			
225	230	235	240
Asn Ser Met Leu Glu Ile Phe Arg Val Val Met Thr Asn Cys Asp Asp			
	245	250	255
His Gln His Leu Val Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Ile			
	260	265	270
Trp Arg His Ala Pro Glu Arg Cys Val His Trp Pro Ala Gly Thr Ser			
	275	280	285
Leu Lys Ser Leu His His Gly Ala Pro Arg Ser Gly Val Lys Lys Ile			
	290	295	300
Ala His Ala Pro Asp Gly Arg Phe Ala Val Thr Asp Asn Asn Gly Asp			
305	310	315	320
Thr Arg Glu Tyr Ala Ala Val Leu Thr Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu			
	325	330	335
Thr Thr Gln Ile Glu Cys Asp Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp			
	340	345	350
Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val			
	355	360	365
Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg			
	370	375	380
Asp Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr			
385	390	395	400
Leu Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr			
	405	410	415
Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro His Pro Val Glu Lys			
	420	425	430
Arg Val Lys Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Val			
	435	440	445
Asp Ile Ala Ala Arg Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu			
	450	455	460

Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp
 370 375 380

Lys Asp Pro Glu Thr Gly Arg Asp Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp
 385 390 395 400

Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr Leu Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro
 405 410 415

Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met
 420 425 430

Leu Pro Gln Pro Ile Asp Lys Arg Val Lys Leu Ala Leu Asp Ala Leu
 435 440 445

Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Val Asp Ile Lys Ala Arg Ile Ile Gly Asp
 450 455 460

Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu Ala Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Phe
 465 470 475 480

Lys Gly Ala Leu Pro Gly His Tyr Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala
 485 490 495

His Phe Met Gln Lys Asp Met Pro Ala Glu Gln Arg Gly Ile Phe Ile
 500 505 510

Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val
 515 520 525

Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val Trp Gly Ile Met Thr His Phe Gly Gly
 530 535 540

Ser Thr His Ala Glu Asn Pro Gly Pro Gly Asp Val Phe Asp Glu Ile
 545 550 555 560

Gly Pro Ile Ser Leu Pro Glu
 565

<210> 11
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas syringae pv. lachrymans str. M302278PT
 <400> 11

Met Lys Asn Asn Arg His Pro Ala Asn Gly Lys Lys Pro Ile Thr Met

1 5 10 15
 Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Ile Glu His Pro

 20 25 30
 Lys Gly Leu Gly Ser Ile Pro Ala Glu His His Gly Ala Glu Val Ala
 35 40 45
 Ile Ile Gly Ala Gly Ile Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu Met
 50 55 60
 Lys Met Gly Leu Lys Pro Val Val Tyr Glu Ala Ser Lys Met Gly Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Arg Ser Gln Glu Phe Glu Gly Ala Lys Gly Ile Val Ala Glu

 85 90 95
 Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser Thr Ala Phe Phe His Tyr
 100 105 110
 Val Asp Lys Leu Gly Leu Glu Ser Arg Pro Phe Pro Asn Pro Leu Thr
 115 120 125
 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Val Ile Asp Leu Glu Gly Thr Thr Tyr Tyr
 130 135 140
 Ala Gln Met Leu Ser Asp Leu Pro Ala Leu Phe Gln Glu Val Ala Asp

 145 150 155 160
 Ala Trp Ala Asp Ala Leu Glu Ser Gly Ser Gln Phe Gly Asp Ile Gln
 165 170 175
 Gln Ala Ile Arg Asp Arg Asp Val Pro Arg Leu Lys Glu Leu Trp Asn
 180 185 190
 Lys Leu Val Pro Leu Trp Asp Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val Ala
 195 200 205
 Thr Ser Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ser Phe Tyr His Arg Glu Val Phe

 210 215 220
 Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro Asn
 225 230 235 240
 Ser Met Leu Glu Ile Phe Arg Val Val Met Thr Asn Cys Asp Glu His
 245 250 255

Gln His Leu Ile Val Gly Gly Val Gln Gln Val Pro Val Gly Leu Trp
 260 265 270

Ser His Val Pro Glu Arg Cys Thr His Trp Pro Lys Gly Thr Ser Leu
 275 280 285

Ser Ser Leu His Arg Gly Ala Pro Arg Pro Gly Val Lys Arg Ile Ala
 290 295 300

Arg Ala Glu Asp Gly Ser Phe Ala Val Thr Asp Asn Trp Gly Asp Thr
 305 310 315 320

Arg Gln Tyr Ala Ala Val Leu Thr Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu Thr
 325 330 335

Thr Gln Ile Glu Cys Glu Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp Met
 340 345 350

Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val Met
 355 360 365

Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys Asp Pro Gln Thr Gly Arg Asp
 370 375 380

Leu Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr Leu
 385 390 395 400

Phe Asp Asn Gly Asp Asp Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr Ser
 405 410 415

Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro Gln Pro Ile Glu Lys Arg
 420 425 430

Val Lys Leu Ala Leu Asp Ala Leu Lys Lys Ile Tyr Pro Lys Val Asp
 435 440 445

Ile Ala Ala Arg Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu Ala
 450 455 460

Asp Pro His Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His Tyr
 465 470 475 480

Arg Tyr Asn Gln Arg Met Tyr Ala His Phe Met Gln Gln Asp Met Pro
 485 490 495

Ser Glu Gln Arg Gly Met Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp Thr

500 505 510
 Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ser Leu Asn Ala Val Trp
 515 520 525

Gly Ile Met Asn His Phe Gly Gly Lys Thr His Ala Glu Asn Pro Gly

530 535 540
 Pro Gly Asp Val Phe His Glu Ile Gly Pro Ile Thr Leu Ala Asp
 545 550 555

<210> 12

<211> 560

<212> PRT

<213> alpha proteobacterium BAL199

<400> 12

Met Ser Val Pro Ala Asp Pro Arg Asp Gly Ala Pro Gly Pro Val Thr
 1 5 10 15

Val Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Phe Asp Asp Trp Leu Ala His
 20 25 30

Pro Ala Gly Leu Gly Arg Ile Pro Ala Glu Arg His Gly Ala Glu Val
 35 40 45

Ala Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Ile Val Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60

Met Lys Leu Gly Leu Arg Pro Val Val Tyr Glu Ser Gly Gln Leu Gly
 65 70 75 80

Gly Arg Leu Arg Ser Gln Pro Phe Glu Gly Ala Asp Gly Ile Val Ala
 85 90 95

Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Glu Ser Ser Thr Ala Phe Trp Gln
 100 105 110

Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Leu Asp Ser Gln Pro Phe Pro Asn Pro Leu
 115 120 125

Thr Pro Ala Ala Gly Ser Thr Val Ile Asp Leu Glu Gly Glu Thr His
 130 135 140

Tyr Ala Arg Thr Leu Asp Asp Leu Pro Ala Met Phe Arg Glu Val Ala

145 150 155 160
 Ala Ala Trp Asp Ala Ala Leu Gln Glu Gly Ala Arg Phe Gly Asp Leu
 165 170 175
 Arg Ala Ala Leu Arg Ala Arg Asp Val Gly Arg Leu Lys Glu Ile Trp
 180 185 190
 Asn Ala Leu Val Pro Leu Trp Asp Glu Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val
 195 200 205
 Ala Ser Ser Ser Ala Phe Ser Ala Leu Pro Phe Arg His Arg Glu Val
 210 215 220

 Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn Ser Met Leu Glu Ile Leu Arg Val Val Leu Thr Gly Cys Asp Asp
 245 250 255
 Ser Gln Arg Leu Ile Val Gly Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Leu
 260 265 270
 Trp Arg Arg Ala Pro Asp Arg Met Val His Trp Pro Arg Gly Thr Thr
 275 280 285

 Leu Ala Ser Leu His Ala Gly Ala Pro Arg Pro Gly Val Thr Arg Ile
 290 295 300
 Ala Arg His Ala Gly Gly Ala Leu Ala Val Thr Asp Arg Trp Gly Arg
 305 310 315 320
 Thr Gln Ala Phe Asp Ala Val Val Ala Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu
 325 330 335
 Thr Thr Ala Ile Glu Val Asp Glu Pro Leu Phe Ser His Arg Leu Trp
 340 345 350

 Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val
 355 360 365
 Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Val Asp Pro Ala Thr Gly Arg
 370 375 380
 Asp Arg Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Leu Thr Arg Gly Thr Tyr
 385 390 395 400

Leu Phe Asp Asn Gly Pro Gly Lys Pro Gly Val Ile Cys Leu Thr Tyr
 405 410 415

Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Lys Met Leu Pro Leu Pro Val Glu Lys
 420 425 430

Arg Val Asp Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Lys Ile Tyr Pro Asp Val
 435 440 445

Lys Leu Arg Glu His Ile Ile Gly Asp Pro Ile Thr Val Ser Trp Glu
 450 455 460

Ala Asp Pro Asn Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480

Tyr Arg Tyr Asn His Arg Met Tyr Gly His Phe Met Gln Ala Asp Leu
 485 490 495

Pro Pro Ala Glu Arg Gly Leu Phe Leu Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp
 500 505 510

Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr Ala Leu Asn Ala Val
 515 520 525

Trp Gly Val Met Thr His Phe Gly Gly His Thr Leu Pro Glu Asn Pro
 530 535 540

Gly Pro Gly Asp Leu Tyr Pro Ser Ile Gly Pro Val Thr Leu Pro Glu
 545 550 555 560

<210> 13

<211> 553

<212> PRT

<213> Pseudonocardia sp. P1

<400> 13

Met Ser Pro Asp Pro Arg Pro Val Thr Ala Phe Gly Pro Asp Phe Pro
 1 5 10 15

Phe Pro Phe Asp Asp Trp Ile Ser His Pro Ala Gly Leu Gly Arg Val
 20 25 30

Pro Pro Asp Arg Leu Gly Ala Glu Val Ala Val Val Gly Ala Gly Ile
 35 40 45

Ala Gly Leu Val Ala Ala Tyr Glu Leu Met Arg Ile Gly Leu Arg Pro
 50 55 60

Val Val Tyr Glu Pro Ser His Leu Gly Gly Arg Leu Arg Ser Gln Pro
 65 70 75 80

Phe Glu Gly Ala Asp Gly Ile Val Ala Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe
 85 90 95

Pro Arg Ser Ser Thr Ala Phe His His Tyr Val Asp Leu Leu Gly Leu
 100 105 110

Arg Thr Glu Pro Phe Pro Asn Pro Leu Thr Pro Ala Ala Gly Ser Thr
 115 120 125

Val Ile Asp Leu His Gly Glu Thr Phe Tyr Gly Arg Thr Leu Asp Asp
 130 135 140

Leu Pro Pro Phe Phe Ser Glu Val Ala Asp Ala Trp Ala Ser Ala Leu
 145 150 155 160

Glu Gln Gly Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gln Glu Ala Val Arg Ala Arg
 165 170 175

Asp Thr Ala Thr Val Lys Arg Leu Trp Asp Ala Leu Val Pro Leu Trp
 180 185 190

Asp Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val Ser Thr Ser Lys Ala Phe Ser
 195 200 205

Glu Leu Ser Phe Arg His Arg Glu Ala Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly
 210 215 220

Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro Asn Ser Met Leu Glu Ile Leu
 225 230 235 240

Arg Val Val Thr Thr Ala Cys Asp Glu Asp Gln Leu Leu Val Thr Gly
 245 250 255

Gly Val Glu Gln Val Pro Gln Gly Leu Trp Arg Arg Ala Pro Asp Asp
 260 265 270

Ala Val His Trp Pro Ala Gly Thr Ser Leu Ala Ser Leu His Gly Gly
 275 280 285

Gly Thr Arg Pro Gly Val Ala Arg Ile His Arg Val Gly Pro Asp Thr

290 295 300
 Ile Arg Val Thr Asp Thr Tyr Gly Gly Thr Arg Asp Phe Pro Ala Val
 305 310 315 320
 Leu Thr Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu Ser Thr Gln Ile Asp Thr Asp
 325 330 335
 Glu Ser Leu Phe Asp Gln Asp Val Trp Met Ala Leu Asp Arg Thr Arg
 340 345 350
 Tyr Met Gln Ser Thr Lys Thr Phe Val Met Val Asp Arg Pro Phe Trp

 355 360 365
 Arg Asp Thr Asp Pro Ala Thr Gly Arg Asp Arg Met Ser Met Thr Leu
 370 375 380
 Thr Asp Arg Leu Thr Arg Ser Thr Tyr Leu Phe Asp His Gly Pro Asp
 385 390 395 400
 Arg Pro Gly Val Ile Cys Leu Ser Tyr Ser Trp Met Ser Asp Ser Leu
 405 410 415
 Lys Met Leu Pro Tyr Pro Val Glu Lys Arg Val Gly Leu Ala Leu Ala

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

 485 490 495
 Phe Met Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp Thr Pro Ala Trp Ala Glu Gly
 500 505 510
 Ala Val Gln Thr Ala Leu Asn Ala Val Trp Gly Ile Val His His Leu
 515 520 525
 Gly Gly Ala Cys Asp Pro Ala Asn Pro Gly Pro Gly Asp Arg Phe Asp
 530 535 540
 Glu Leu Ala Pro Leu Ala Leu Pro Asp

545

550

<210> 14

<211> 553

<212> PRT

<213> *Gordonia amarae* NBRC 15530

<400> 14

Met Ala Ala Asp Ala Pro Val Thr Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe

1 5 10 15

Ala Tyr Asp Asp Trp Leu Arg His Pro Ala Gly Leu Gly Thr Val Pro

 20 25 30

Asp Glu Ala Leu Gly Ser Glu Val Ala Val Ile Gly Ala Gly Met Ala

 35 40 45

Gly Met Val Ala Ala Tyr Glu Leu Met Lys Leu Gly Leu Lys Pro Val

50

55

60

Val Tyr Glu Ala Glu Arg Ile Gly Gly Arg Leu Arg Ser Glu Pro Phe

65 70 75 80

Ala Pro Gly Glu Pro Glu Ile Ala Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro

 85 90 95

Ile Ser Ser Arg Ala Phe Phe His Tyr Val Asp Met Phe Gly Leu Asn

 100 105 110

Ala Gln Pro Phe Pro Asn Pro Leu Thr Pro Ala Ser Gly Ser Thr Val

115

120

125

Ile Asp Ile Gly Gly Glu Thr Leu Tyr Ala Arg Thr Leu Asp Asp Leu

130 135 140

Pro Glu Ile Tyr Arg Glu Ile Ala His Ala Trp Asp Ala Ala Leu Glu

145 150 155 160

Arg Ile Ala Gly Phe Thr Glu Leu Gln Asp Ala Ile Arg Thr Arg Asp

 165 170 175

Thr Ala Ala Leu Lys Asp Arg Trp Asn Lys Leu Val Arg Glu Trp Asp

180

185

190

Asp Arg Ser Phe Tyr Asp Phe Leu Ala Thr Ser Asp Glu Phe Gly Ser

Arg Pro Leu Thr Val Ser Trp Glu Asp Glu Pro His Phe Leu Gly Ala
 450 455 460

Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His Tyr Arg Tyr Asn Thr Arg Met Tyr
 465 470 475 480

Gly His Phe His Gly Gln Glu Arg Leu Pro Asp Ala Glu Arg Gly Ile
 485 490 495

Phe Ile Ala Gly Asp Asp Val Ser Phe Met Pro Ala Trp Val Glu Gly

500 505 510

Ala Val Gln Thr Gly Leu Asn Ala Val Trp Gly Val Leu Ser His Phe
 515 520 525

Gly Gly Arg Thr Ser Pro Asp Asn Pro Gly Pro Gly Asp Val Tyr Ala
 530 535 540

Arg Leu Gly Pro Ile Asp Ile Gly Glu

545 550

<210> 15

<211> 549

<212> PRT

<213> Roseobacter denitrificans OCh 114

<400> 15

Met Lys Pro Val Thr Val Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Ala Tyr Asp

1 5 10 15

Asp Trp Ile Ala His Pro Asp Gly Leu Ala Thr Leu Pro Ala Ala Ala
 20 25 30

His Gly Ala His Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Ala Ala Gly Val Ile
 35 40 45

Ala Gly Tyr Glu Leu Met Lys Leu Gly Leu Cys Pro Ile Leu Phe Glu
 50 55 60

Pro Gly Gln Phe Gly Gly Arg Leu Arg Ser Gln Pro Phe Glu Gly Ala

65 70 75 80

Glu Gly Val Ile Ala Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Val Ser Ser
 85 90 95

Thr Gly Phe Tyr His Tyr Val Asp Leu Leu Gly Ile Gln Ser Lys Pro

Ala Lys Thr Phe Val Met Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Lys His
 355 360 365

Pro Val Thr Gly Arg Asp Thr Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Met
 370 375 380

Thr Arg Gly Thr Tyr Leu Phe Asp Asn Gly Pro Asp Lys Pro Ser Val
 385 390 395 400

Ile Cys Leu Ser Tyr Ala Trp Met Thr Asp Ala Leu Lys Val Leu Pro
 405 410 415

Leu Pro Val Glu Gln Arg Val Glu Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys
 420 425 430

Ile Tyr Pro Asp Val Asp Ile Arg Ser His Ile Leu Gly Asp Pro Ile
 435 440 445

Thr Val Ser Trp Glu Ala Asp Gln Asn Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly

450 455 460

Ala Leu Pro Gly His Tyr Arg Tyr Asn His Arg Met Phe Gly His Phe
 465 470 475 480

Val Gln Ser Asp Met Pro Ala Arg Glu Arg Gly Ile Phe Leu Ala Gly
 485 490 495

Asp Gly Val Ser Trp Thr Pro Ala Trp Val Glu Gly Ala Val Gln Thr
 500 505 510

Ser Leu Asn Ala Val Ala Gly Ile Ile Ala His Phe Gly Gly Thr Pro

515 520 525

Ser Pro Ala Asn Pro Ser Pro Leu Glu Ala Tyr Glu Lys His Gly Pro
 530 535 540

Val Arg Leu Ser Ala

545

<210> 16

<211> 560

<212> PRT

<213> Mycobacterium abscessus ATCC 19977

<400> 16

Met Thr Ser Leu Leu Pro Gly Ala Asp Asn Ala Ile Lys Pro Val Ser

1 5 10 15
 Ile Phe Gly Pro Asp Phe Pro Phe Glu Phe Asp Ala Trp Ile Ser His

 20 25 30
 Pro Asp Gly Leu Gly Gln Val Pro Glu Ala Ala Phe Gly Gln Glu Val
 35 40 45
 Ala Ile Ile Gly Ala Gly Ile Ala Gly Met Val Ala Ala Tyr Glu Leu
 50 55 60
 Met Lys Leu Gly Leu Arg Pro Val Leu Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Gly
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Arg Ser Gln Gln Phe Asp Gly Ala Pro Glu Gly Val Ile

 85 90 95
 Ala Glu Leu Gly Gly Met Arg Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Phe Phe
 100 105 110
 His Tyr Val Asp Met Leu Gly Leu Thr Ala Lys Pro Phe Pro Asn Pro
 115 120 125
 Leu Thr Pro Ala Ala Gly Ser Thr Val Ile Asp Ile Glu Gly Val Thr
 130 135 140
 His His Ala Arg Ala Ile Asp Glu Leu Pro Gln Ile Phe Gln Glu Val

 145 150 155 160
 Ala Glu Ala Trp Ala Glu Ala Leu Glu Glu Val Ser Phe Thr Pro Val
 165 170 175
 Gln Asp Ala Ile Arg Ala Arg Asp Ala Val Thr Leu Lys Ser Leu Trp
 180 185 190
 Asn Gln Leu Val Thr Glu Trp Asp Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Phe Val
 195 200 205
 Ala Ser Ser Lys Ala Phe Ser Lys Leu Ser Phe His His Arg Glu Val

 210 215 220
 Phe Gly Gln Val Gly Phe Gly Thr Gly Gly Trp Asp Ser Asp Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn Ser Met Leu Glu Ile Leu Arg Val Val Met Thr Asn Cys Asp Glu
 245 250 255

Asp Gln Gln Leu Ile Val Gly Gly Ala Glu Gln Val Pro Arg Gly Leu
 260 265 270
 Trp Thr Tyr Glu Pro Asp Ser Met Cys His Trp Pro Arg Gly Thr Thr
 275 280 285
 Leu Ala Lys Leu His Arg Gly Val Pro Arg Ser Arg Val Lys Arg Ile
 290 295 300
 Ala Arg Gly Pro His Gly Gln Leu Ser Val Thr Asp Gln Trp Gly Val
 305 310 315 320
 Thr Arg Asp Tyr Pro Ala Val Leu Ala Thr Cys Gln Ser Trp Leu Leu
 325 330 335
 Thr Thr Glu Ile Asp Cys Asp Glu Ser Leu Phe Ser Gln Lys Met Trp
 340 345 350
 Thr Ala Leu Asp Arg Thr Arg Tyr Met Gln Ser Ser Lys Thr Phe Val
 355 360 365
 Leu Val Asp Arg Pro Phe Trp Lys Asp Val Asp Pro Val Thr Gly Arg
 370 375 380
 Asp Thr Met Ser Met Thr Leu Thr Asp Arg Met Thr Arg Gly Thr Tyr
 385 390 395 400
 Phe Phe Asp Asn Gly Asp Asp Ala Pro Ala Val Val Cys Leu Thr Tyr
 405 410 415
 Ser Trp Met Ser Asp Ala Met Lys Val Leu Pro Tyr Ser Ala Gln Asp
 420 425 430
 Arg Ala Asp Met Ala Leu Asn Ala Leu Lys Arg Ile Tyr Pro Gln Val
 435 440 445
 Asp Ile Asn Gln His Ile Val Gly Glu Pro Ile Ser Val Ser Trp Glu
 450 455 460
 Ala Asp Arg Asn Phe Leu Gly Ala Phe Lys Gly Ala Leu Pro Gly His
 465 470 475 480
 Tyr Arg Tyr Asn His Arg Met Tyr Ser His Phe Met Gln Asp Gln His
 485 490 495
 Glu Ala Gly His Arg Gly Ile Phe Leu Ala Gly Asp Asp Val Ser Trp

500 505 510
 Thr Pro Ala Trp Ala Glu Gly Ala Val Gln Thr Ala Leu Asn Ala Val
 515 520 525
 Trp Gly Ile Met Thr His Phe Gly Gly Gly Ser Ser Thr Arg Asn Pro

530 535 540
 Gly Pro Gly Asp Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Leu Lys Leu Pro Glu
 545 550 555 560

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n is a, c, g or t.

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g or t.

<400> 17

atgaacaana anaaccgcca cccsgccgac 30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

tcartcygcc agggcgatyg gscgatytc 30

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

agcacggtaa tcgatctgga 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20
 catcgagtgc cagttgcacg 20
 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21
 tataatcata tgaacaagaa caaccgcca 29
 <210> 22
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22
 tattactcga gtcagtccgc caggcgatt g 31
 <210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n is a, c, g or t.

<400> 23
 gtggtgatga ccaatnmsga cgaccaccaa cac 33
 <210> 24

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n is a, c, g or t.
 <400> 24
 gcggtgctga cgaccnnsca gaggctgctg ctg 33

<210> 25
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n is a, c, g or t.
 <400> 25
 aagccagggg tgatcnnset gtcctacgcg tgg 33

<210> 26
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n is a, c, g or t.
 <400> 26
 catgtgccag agcgtnnsgc gcaactggccc gaa 33

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g or t.

<400> 27

accaccaga tcgacnsga agagtcgtg ttc

33