



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0060147  
(43) 공개일자 2009년06월11일

(51) Int. Cl.

*C12N 9/12* (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0116102

(22) 출원일자 2008년11월21일

심사청구일자 2008년11월21일

(30) 우선권주장

1020070127255 2007년12월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

이정현

경기 성남시 분당구 정자동 한솔청구아파트  
116-101

강성균

경기도 안산시 상록구 사동 1346번지 월드아파트  
702-1502

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

오대웅

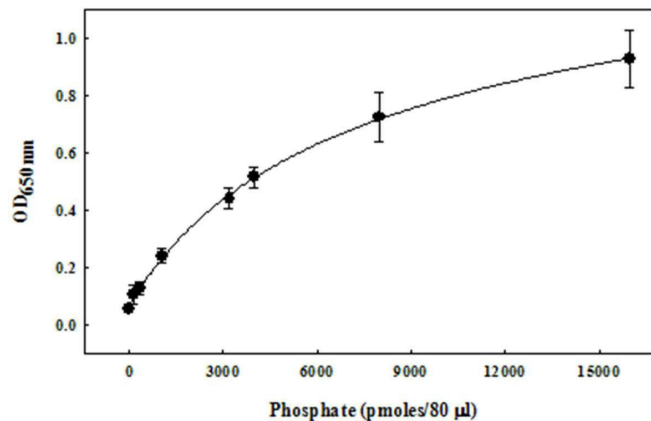
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 신규한 5종의 포스파타제들 및 이를 암호화하는 유전자들

(57) 요약

본 발명은 *Thermococcus* 속에 속하는 고호열성 신균주로부터 분리한 신규한 포스파타제(Phosphatase) 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 포스파타제는 고온에서도 열안정성을 갖기 때문에 특정 단백질이나 DNA 대상체를 검출하기 위한 마커 등으로 널리 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

**이현숙**

경기 안산시 상록구 사동 1346번지 월드아파트  
702-1502

**김상진**

경기 안산시 상록구 사2동 월드아파트 707-904

**권개경**

경기 안산시 상록구 일동 579-3 2층

**차전신**

경기 안산시 단원구 고잔동 5차푸르지오 507-506

**전정호**

경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

**조요나**

경기 용인시 구성읍 보정리 동아아파트 121-201

**김윤재**

경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호

**배승섭**

경기 안산시 상록구 사동 1519-12 402호

**임재규**

경기 시흥시 정왕동 1575-9 203호

**정인순**

경남 창원시 사파동 56-16

**노태욱**

경기도 부천시 원미구 중2동 연화마을아파트  
1411-1201

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 6 내지 서열번호 10으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 포스파타제(Phosphatase).

### 청구항 2

제 1 항의 포스파타제를 암호화하는 유전자.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 포스파타제를 암호화하는 유전자.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

<1> 포스파타제(Phosphatase)는 모노포스페이트 에스테르(monophosphate ester)들로부터 유기 인산(organic phosphate)을 떼어내어 알칼기를 갖는 물질로 분해하는 효소이다. 포스파타제는 핵산 분자의 끝에서 인산기를 제거하는 생화학적 과정에서 일반적으로 사용되며, 특정 단백질이나 DNA 대상체를 검출하기 위하여 항체 컨주게이트(conjugate) 형태로 비방사성(non-radioactive) 마커로 활용되고 있다. 이러한 과정에 열안정성을 가진 포스파타제가 필요하다. 열안정성(thermostability)을 갖는 포스파타제는 60°C 이상의 온도에서 단시간 가열했을 때 비가역적으로 불활성화되지 않는다. 이들 열에 안정한 포스파타제들은 고온성 생물, 즉, *Ammonifex*, *Aquifex*, *Archaeoglobus*, *Methanococcus*, *Pyrolobus* (a Crenarchaeota), *Pyrococcus*, *Thermococcus* 와 같이 진정세균류(Eubacteria)와 유리아케오타(Euryarchaeota)로부터 유래한다. 이들 생물 중에는 103 °C까지 성장이 가능한 것도 있으며 대체로 70 °C 이하에서는 성장할 수 없다. 그리고 이들은 극한 환경에서 분리한 혐기성 미생물들이다. 이러한 고온성 미생물로부터 유래한 포스파타제들은 그들의 상업적 응용성 때문에 큰 관심을 받고 있다.

#### 배경기술

<2> 열안정성을 갖는 새로운 포스파타제를 찾기 위하여는 고온의 극한 환경에서 성장하는 생물로부터 유전자를 발견하고 이를 클로닝하여 재조합 단백질을 얻는 방법으로 대량 확보할 수 있다. 본 발명자들은 이미 이스트 마누스 바신(East Manus Basin) PACMANUS 필드의 심해 열수 분출구 지역으로부터 새로운 초고온성 아키아 균주를 분리하고 16S rDNA 서열을 분석하여 씨모코커스 속 (*Thermococcus* sp.) 균주, *Thermococcus onnurineus* NA1으로 동정하였다 (Bae et al., 2006). 이 균주는 70-90°C의 고온에서 성장하며 이 균주로부터 아미노펩티다제(Aminopeptidase) P (Lee et al., 2006a), DNA 리가아제(ligase) (Kim et al., 2006), 메티오닐 아미노펩티다제(methionyl aminopeptidase) (Lee et al., 2006b), 카복시펩티다제(carboxypeptidase) (Lee et al., 2006c), 프롤릴 올리고펩티다제(prolyl oligopeptidase) (Lee et al., 2007b), DNA 중합효소(polymerase) (Kim et al., 2007), α-아밀라제(α-amylase) (Lim et al., 2007), dUTPase (Cho et al., 2007), 차단해소 아미노펩티다제(deblocking aminopeptidase) (Lee et al., 2007a) 등 다양한 호열성 단백질들이 보고되었다. 최근에 이 균주의 전체 게놈(genome) 서열의 분석이 완료되었다 (Lee et al., 2008). 상기 게놈 정보를 분석한 결과 HAD(Haloacid dehalogenase) 슈퍼패밀리(superfamily)에 속하는 것으로 어노테이션(annotation)된 유전자들이 17종이 확인되었다. HAD superfamily는 거의 대부분의 생물체에서 발견되는데 포스파타제, P-형(type) ATPases, 탈수소화효소(dehalogenases), 베타-포스포글루코뮤타제(β-phosphoglucomutases) 등 다양한 효소활성을 가진 가장 큰 효소 패밀리 중의 하나이다. 이 유전자들의 도메인(domain) 분석 및 서열상 유사 유전자들의 기능 등을 기초로 하여 포스파타제 활성을 가질 것으로 유추되는 유전자들을 선별하였다.

#### 발명의 내용

**해결 하고자하는 과제**

<3> 본 발명의 목적은 고온의 환경에서도 활성을 갖는 고호열성 *Thermococcus* spp.의 포스파타제 및 이를 암호화하는 유전자를 제공하는 것에 있다.

**과제 해결수단**

<4> 제 1 양태로, 본 발명은 혐기성 조건에서 수소를 발생시키는 고호열성 신균주 *Thermococcus onnurineus* NA1 (기탁번호: KCTC 10859BP) 및 그것이 생산하는 포스파타제를 제공한다.

<5> 상기 균주는 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)에 있는 파크마누스 지역의 심해 열수 분출구로부터 분리한 것으로, 대한민국 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2005년 10월 7일 기탁하여, 2005년 10월 20일에 KCTC 10859BP의 기탁번호를 부여받았다. 상기 균주의 특징 및 배양방법 등에 대해서는 본 출원의 기초출원인 대한민국 특허출원 제10-2007-0127255호에 기재되어 있다.

<6> 상기 포스파타제는 보다 상세하게는 서열번호 6 내지 서열번호 10으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 이의 기능적 동등물을 제공한다. "기능적 동등물"에는 상기 단백질들에 있어 그 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 포스파타제의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

<7> 제 2 양태로 본 발명은 상기 포스파타제를 암호화하는 유전자를 제공한다. 보다 상세하게 상기 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 5로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나의 염기 서열 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 포스파타제를 암호화하는 유전자이다. 서열번호 1 내지 5의 염기서열은 각각 상기 서열번호 6 내지 10의 아미노산을 암호화하는 서열이다.

<8> 상기 유전자를 포함하는 분리된 DNA 분절은 재조합 벡터의 형태로 이용될 수 있다. "벡터"는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. "발현벡터"란 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다.

<9> 상기 재조합 벡터는 원핵생물, 곰팡이, 식물, 동물세포 등의 세포를 형질전환시켜 높은 효율로 포스파타제를 생산시킬 수 있는 형질전환 세포를 만드는데 이용될 수 있다. '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.

<10> 제 3 양태로 본 발명은 *Thermococcus* spp. 를 배양하여 포스파타제를 생산하는 방법을 제공한다. 상기 *Thermococcus* spp.는 바람직하게는 *Thermococcus onnurineus* NA1(기탁번호: KCTC 10859BP)이다.

<11> 상기 배양은 80℃의 고온에서도 가능하며, 포름산염(formate)이나 녹말(starch)이 첨가된 배지를 사용할 경우 효율을 증가시킬 수 있다. 또한 혐기적 조건에서 만든 배지와 일산화탄소를 공급하여 배양할 경우 효율을 증가시킬 수 있다.

**효과**

<12> 본 발명의 포스파타제는 고온에서도 열안정성을 나타내며, 항체 등에 붙여져 ELISA나 IHC, Western blot 등 각종 검출실험에 이용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

<13> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

**실시예 1. 균주 및 성장 조건**

<15> *Thermococcus onnurineus* NA1(TNA1로 명명)은 이스트 마누스 바신(East Manus Basin)의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. TNA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. TNA1으로부터 DNA를 얻기 위

하여 YPS 배지에서 배양하였다. 25ml 혈청 병에 YPS 배지를 넣고 파타겔 플레이트(phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니를 접종하여 20시간 동안 90°C에서 배양하여 시드(seed) 배양액을 준비하였다. 혐기적 단지(jar)에 YPS 배지 700ml을 넣고 시드 배양을 접종한 후 20시간동안 90°C에서 배양하였다. *Escherichia coli* DH5α가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었고, *E. coli* B21-Codonplus(DE3)-RIL 세포, *E. coli* BL21 Rosetta pLysS (스트라타진, 라졸라, 캘리포니아)가 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)를 이용한 유전자 발현에 사용되었다. *E. coli* 균주는 37°C에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도 50µg/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

<16> **실시예 2. DNA 조작 및 서열분석**

<17> DNA 조작은 샘브룩 및 러셀(2001)에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하여졌다. TNA1의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)으로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아젠, 힐덴, 독일)을 이용하여 행하여졌다. DNA 서열분석은 빅다이 터미네이터 키트(PE Applied Biosystems, 포스터 시, 캘리포니아)를 이용하여 자동 서열분석기(AB3100)로 행하여졌다.

<18> **실시예 3. 포스파타제 암호화 유전자들의 클로닝 및 발현**

<19> *NdeI* 및 *SaI*I 또는 *XhoI*에 의해 플랭크(flank)된 TNA1 포스파타제(phosphatase) 유전자들의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머를 이용하여 증폭되었다. 사용된 프라이머들은 다음과 같다:

<20> TON\_0817F(서열번호 11), 5'- CG ACC CGG CAT ATG ATA AGA GTC GTG TTC TTT GAC -3'

<21> TON\_0817R(서열번호 12), 5'- CT CCA CAT GTC GAC ATC AGC ATG AAC TTC CTT ATC TG -3'

<22> TON\_0347F(서열번호 13), 5'- CG ACC CGG CAT ATG ATT AAA GCC ATA TCC CTA GAC -3'

<23> TON\_0347R(서열번호 14), 5'- CT CCA CAT GTC GAC ATC ACC TAG ATA TCC GAA CTT CC -3'

<24> TON\_0338F(서열번호 15), 5'- CG ACC CGG CAT ATG AAG GCT GTT CTC TTC GAT ATC -3'

<25> TON\_0338R(서열번호 16), 5'- CT CCA CAT GTC GAC TCT TTC ACC ACC CAA AAT CTT TC -3'

<26> TON\_1713F(서열번호 17), 5'- CG ACC CGG CAT ATG CTT GTG CTC GTT GAT CTC GAC -3'

<27> TON\_1713R(서열번호 18), 5'- CT CCA CAT GTC GAC CGC TTT AGC TCG CTT TTC ATG CTC -3'

<28> TON\_0002F(서열번호 19), 5'- CG ACC CGG CAT ATG AAG CTC GCC TCA TTC GAT GTC -3'

<29> TON\_0002R(서열번호 20), 5'- CT CCA CAT CTC GAG ACC TTC TAA CTC CCC CAG CAC CTC -3'

<30> 증폭되어진 서열을 *NdeI* 및 *SaI*I 또는 *XhoI*로 절단시켰고, *NdeI/SaI*I(또는 *XhoI*)로 절단된 pET-24a(+)에 연결시켰다. 연결물(ligate)은 *E. coli* DH5α에 형질전환되었고, 결과적으로 나온 플라스미드는 서열분석 및 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 및 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS로 각각 형질전환되었다. 유전자의 과량 발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도되었다. 세포는 원심분리(6,000 x g, 4°C에서 20분간)를 통하여 얻어졌고, 0.1M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포는 초음파에 의해서 분쇄되어지고, 원심분리(20,000 x g, 4°C에서 30분간)에 의해서 분리되었다. 얻어진 상등액은 TALON™ 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.5 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세인트 루이스, 미주리)로 세척되었고, 완충용액내의 300mM으로 용출되었다. 모아진 분획은, Superdex 200 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare Bio-Sciences, 서울, 한국)으로 겔여과 크로마토그래피에 적용되어 분자량에 따라 분획되었다. 활성분획만을 모아 Centricon YM-10(밀리포어, 베드포드, 메사추세츠)을 이용하여 10% 글리세롤이 포함되어 있는 50mM 트리스-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 완충용액교환이 되어졌다.

<31> 단백질 농도는 브래드포드(Bradford, 1976)의 방법으로 측정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소디움 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다.

<32> **실시예 4. TNA1 포스파타제 암호화 유전자들의 일차 구조 및 재조합 효소들의 발현**

<33> TNA1의 게놈 염기서열 분석에서, TON\_0817, TON\_0347, TON\_0338, TON\_1713, TON\_0002는 729, 708, 645, 699,

696 bp 로 구성된 오픈 리딩 프레임(ORF)으로 확인되었다. NCBI 단백질 데이터베이스에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램으로 유사한 단백질 서열을 가진 유전자를 조사한 결과, 각각 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1의 TK0686 (hydrolase, HAD superfamily, TON\_0817과 79.3% 서열상 동일), *T. kodakaraensis* KOD1의 TK2301 (phosphoglycolate phosphatase, TON\_0347과 83.2% 서열상 동일), *T. kodakaraensis* KOD1의 TK0477 (hydrolase, HAD superfamily, TON\_0338과 74.9% 서열상 동일), *T. kodakaraensis* KOD1의 TK1811 (hydrolase, HAD superfamily, TON\_1713과 62.1% 서열상 동일), *T. kodakaraensis* KOD1의 TK0110 (hydrolase, HAD superfamily, TON\_0002과 71.9% 서열상 동일)인 것으로 밝혀졌다. 모든 단백질의 아미노산 서열은, 일차구조가 가장 유사한 단백질의 이름으로부터 예상할 수 있듯이 Haloacid dehalogenase(HAD) superfamily에서 활성화에 필요한 것으로 알려진 3개의 모티브(Motif I, II, III) 및 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 것이 확인되었다 (도 1).

<34> TNA1 포스파타제 유전자들(TON\_0817, TON\_0347, TON\_0338, TON\_1713, TON\_0002)은 PCR에 의하여 pET-24a(+) 벡터에 클론되었고 대장균에 형질전환 되어서 발현되었고, 발현된 단백질들은 SDS-PAGE에서 아미노산 서열로부터 추정된 단백질 크기로 확인되었다 (도 2).

<35> **실시예 5. 포스파타제 활성 측정방법**

<36> 포스파타제의 활성도는 다양한 포스파타제 기질들로부터 떨어져 나오는 무기 인산기(free phosphate)를 말라카이트 그린(Malachite Green, BioAssay Systems, CA, USA)으로 발색되게 하여 스펙트로미터를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다 (Baykov et al., 1988; Proudfoot et al., 2004). 포스페이트 표준(Phosphate standard)을 이용하여 OD<sub>650nm</sub>-포스페이트(phosphate) 농도 간의 표준곡선(standard curve)을 작성하였다 (도 3).

<37> **실시예 6. TNA1 포스파타제들의 생화학적 특성 분석**

<38> 발현된 재조합단백질들이 포스파타제 활성을 가지는지를 조사하기 위하여 200mM HEPES 버퍼 pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub> 을 첨가한 반응액에 글루코스-6-포스페이트 (0.5mM), 포스포티로신(phosphotyrosine) (0.5mM), pNPP (5mM), ATP (1mM), AMP (1mM), 피로포스페이트(pyrophosphate) (1mM) 를 각각 첨가하고 10 µg의 분리된 단백질을 넣어 80°C에서 1시간 반응한 후 발색정도를 측정하였다. 그 결과 단백질마다 기질에 대한 활성도가 다르게 측정되었다 (표 1).

**표 1**

TNA1 유래 재조합단백질의 포스파타제 활성도 조사

Enzyme Substrate	TON_0817	TON_0347	TON_0338	TON_1713	TON_0002
Glucose-6-P <sub>i</sub>	+	+	-	+	-
Phosphotyrosine	+	+	+	-	-
pNPP	-	-	-	-	-
ATP	-	-	-	+	-
AMP	+	+	+	+	-
Pyrophosphate	+	+	-	+	+

Glucose-6-P<sub>i</sub>: Glucose-6-phosphate, pNPP: *p*-nitrophenyl phosphate,

ATP: Adenosine-5'-triphosphate, AMP: Adenosine-5'-monophosphate

<39> <40> TNA1으로부터 유래한 단백질들이 고온에서 활성을 보이는 것을 확인하기 위하여 단백질들, TON\_0817과 TON\_0347 을 대상으로 AMP에 대한 분해활성을 조사하였다. TON\_0817의 경우 온도가 증가함에 따라 AMP 분해활성이 증가하였고 TON\_0347의 경우 80°C까지는 온도증가와 활성증가가 비례관계에 있으나 90°C이상에서 활성이 감소하였다. 모두 고호열성 단백질로 확인되었다 (도 4). TNA1 포스파타제들은 모두 HAD 슈퍼패밀리에 속하므로 금속이온의 존재가 활성화에 필수적으로 요구된다. 따라서 포스파타제 활성화에 미치는 금속이온의 효과를 조사하기 위하여

BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> 등 금속이온을 반응액에 첨가하여 활성도를 측정하여 활성 증가에 효과를 보이는 금속이온을 확인하였다 (도 5). 효소에 따라 활성의 증가 또는 저해에 관여하는 금속이온의 종류가 상이하였다. 금속이온 킬레이터인 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를 첨가한 결과 대조군보다 활성이 감소하여 금속이온의 필수성을 확인시켜 주었다.

### 도면의 간단한 설명

- <41> **도 1**은 TNA1 포스파타제 유전자들의 시퀀스 얼라인먼트(sequence alignment)를 나타낸다. HAD 슈퍼패밀리(superfamily)에 보존된 3개의 모티프들을 점선으로 표시하였다.
- <42> **도 2**는 재조합 His<sub>6</sub>-tagged TNA1 포스파타제의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다. 레인(Lane) M 은 저분자량의 표준 마커(Bio-Rad Laboratories, Seoul, Korea)이다. (A) TON\_0817 단백질. (B) TON\_0347 단백질. (C) TON\_0338 단백질. (D) TON\_1713 단백질. (E) TON\_0002 단백질.
- <43> **도 3**은 OD<sub>650nm</sub>-포스페이트(phosphate) 농도 간의 표준곡선(standard curve)이다.
- <44> **도 4**는 온도가 TNA1 포스파타제의 효소 활성에 미치는 영향을 나타낸다. TNA1 포스파타제의 최적 온도를 결정하기 위해, 정제된 TON\_0817 (A) 또는 TON\_0347 (B) 를 다양한 온도에서 인큐베이션시켰다.
- <45> **도 5**는 금속 이온들이 TNA1 포스파타제의 효소 활성에 미치는 영향을 나타낸다. TNA1 포스파타제의 활성을 증가시키는 최적의 금속 이온을 결정하기 위해, 정제된 TON\_0817 (A), TON\_0347 (B), TON\_0338 (C), TON\_1713 (D), 또는 TON\_0002 (E) 를 80°C, pH 6.5에서 다양한 금속이온들로 인큐베이션시켰다. 흰색 막대는 금속이온을 첨가하지 않은 대조군이다.



도면

도면1

```

...Motif I...
TON_0817 MIRVVFFDLDDTLVDTSKLAEMARKNAIENMVR-HGLP-----VD---FE 41
TON_0347 MIKAIISLDIDGTITYPDRRLHEDALKAI-RLAESLGVVPV-----MLV--T----- 42
TON_0338 M-KAVLFDIDGTLTTEEPLIMLFLPQVYDKLSRKLGIK-----D----E----- 40
TON_1713 ML--VLVDLDDTLCNTWDAGKYTLRLIPFLLR-RRKF-----KSFFYII 42
TON_0002 M-KLASFDVWNTLLDINIMLD--AM-AV-ELSKLMGACIIDVVEGMMFTRERIKRMAET 55

TON_0817 TAY-HELLEL-----INE-----YGSNFGRHFDYLLRRLDLPNNP 75
TON_0347 -GN-SVPFAEAMAIMIGITGPVVAEDGGALS-----VKDGRRLRKRIYLTTMD 87
TON_0338 -AR-ERFLSEI-----LGRDSYDWHDWNFFFKLFDLCLKYBELLERYPH---- 83
TON_1713 TAR-YRELEQ-----SRE-----FHMMDLDKIVEKLLGKVYAKITP 77
TON_0002 AGDPTQALEESQKMLAEL---LGTE-----IEV-VRRAAARAVLKVS- 93

...Motif II..
TON_0817 K-WIAAGVIAYHNTKFAYL-KSVKGARKVLE-LKKDGFGLGVITDG---DPIKQWEKIL 129
TON_0347 EEWI-----LWSEIKRRYPEAVLSFSMPERKAG--LVILRTI---PVEAVRALIE 132
TON_0338 -----KL-QVYPDTIPTLEW-LRDTGYKLGIVTSG---P-KYQRLKIK 120
TON_1713 E-EFEEIMDLVDRVFFSNL-KLYPDALPFLQG-LKEMGAKIVLITDS---SSHWQRKKLE 131
TON_0002 -----DE-IVLPGAREALES-VKRKGLKVTVTGNVMFWPGSYTRLLLE 134

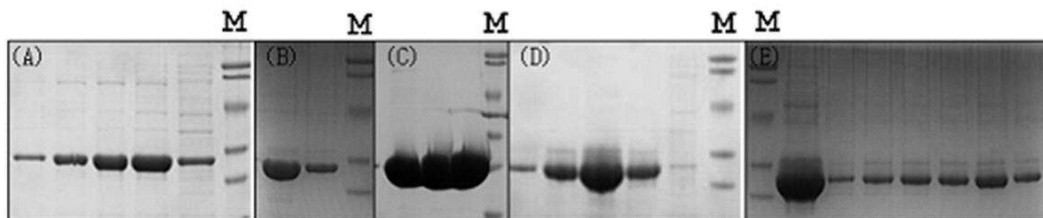
.....Motif III.....
TON_0817 RLELDEY-FDEVFI SNDLGVKKP---HRKIFEKALRKFNVEPHEALMVGDRLYSDIYGAK 185
TON_0347 ELGLNLIADVSGF---AIHIKKPWINKGAGIEKACEILGISPKVAHVGDG-ENDLDAFR 188
TON_0338 LTGLLDY-FDVVITRDDVNAIKP---EPKIFLYTIERLGVPEGEAVMVGDSLSQDVYGAK 176
TON_1713 YLGIKDY-FDALIISGETGHSKL---DPHNFRLATSMFPHE-EEIYVMGDRDDTDMRGK 186
TON_0002 REGLMEF-VDRTFFADEVFAYKP---MPEMFEKPLKAFGVEPGEAIIHGDTYAEDFEGAL 190

TON_0817 QVGMRTVWFKYGKYANRELDYLEYAD-----FAIKSLGEVLEI---VRGLNLEEKERAD 236
TON_0347 VVGYRVAV-GQAPETLK-----AEADYVTQATYGGKGAEAVMHILRKFGY----- 232
TON_0338 SVGMTAVWINRNGDRGY-----NMAD-----YEIRTLYELRKI---LG----- 211
TON_1713 DIGATTILVKGYFKGR---RPKHAD-----YIVNDLLEALEV---IKNEH---EK---- 228
TON_0002 KMGMAVWINPEAEVVK---RIHERG-----FEVPSVEGILEV---LGE----- 228

TON_0817 KEVHAD 242
TON_0347 ---LGD 235
TON_0338 ---GER 214
TON_1713 --RAKA 232
TON_0002 ---LEG 231

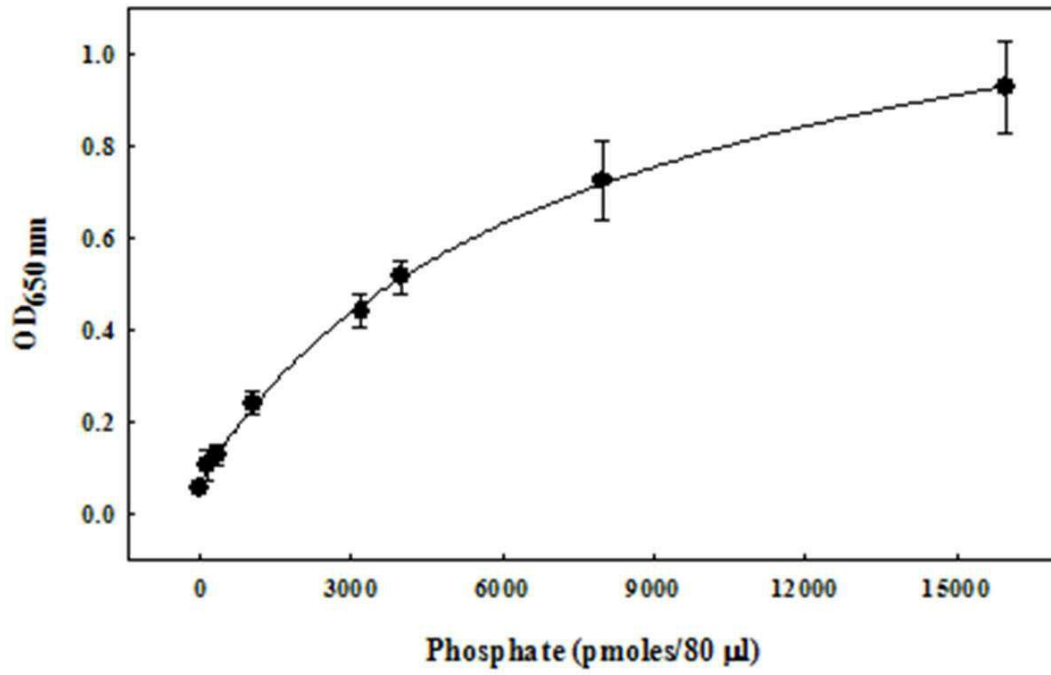
```

도면2

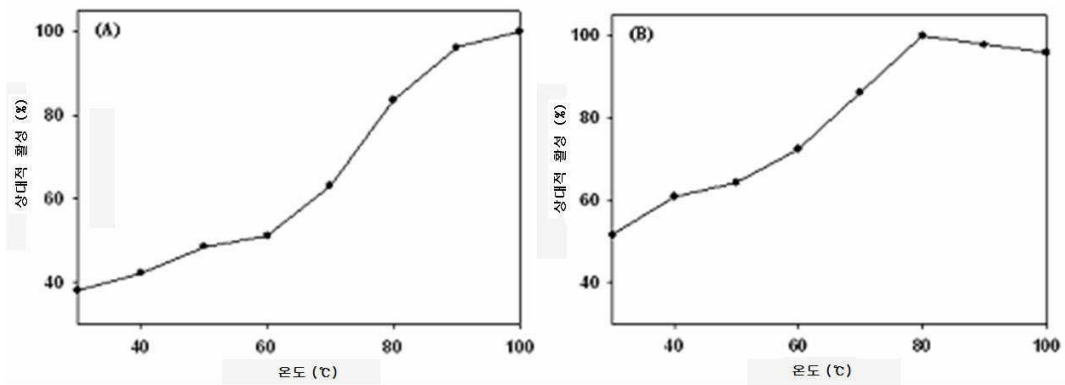




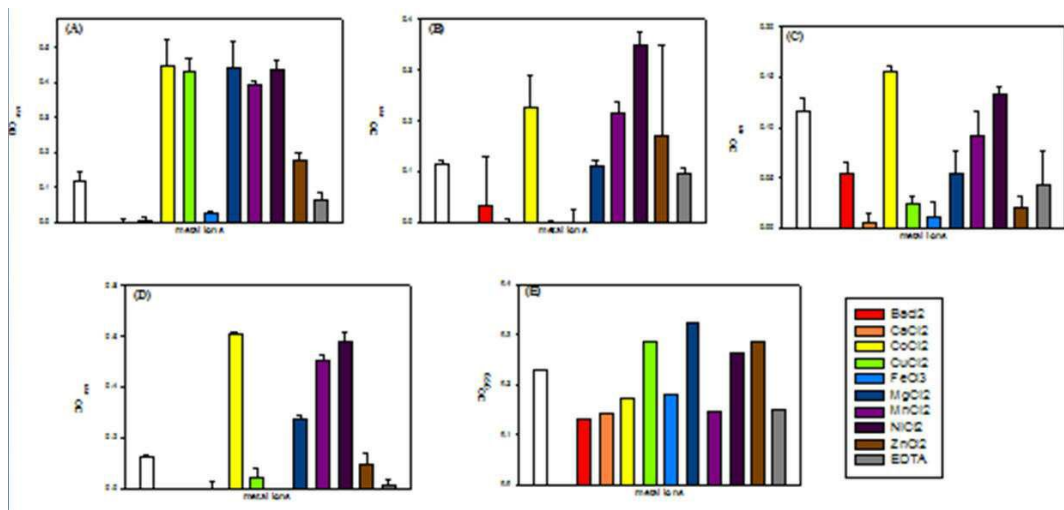
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE  
 <120> FIVE NOVEL PHOSPHATASES AND GENES ENCODING THEM

<150> KR10-2007-0127255  
 <151> 2007-12-08

<160> 20

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1  
 <211> 729  
 <212> DNA  
 <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 1  
 atgataagag tcgtgttctt tgacctcgac gacacgctcg ttgacacgag caaacctgcc 60  
 gagatggcca ggaaaaacgc tatagagaac atggtacgcc acgggcttcc cgttgatttt 120  
 gaaaccgctt accatgagct cctcgagctc ataaacgagt acggaagcaa ctttgggagg 180  
 cacttcgact acctcctgag gaggettgac ctaccgaaca accccaagtg gatagccgca 240  
 ggagttatag cgtatcaca caccaagttc gctacctca aaagcgtcaa gggcgctaga 300

aaagtcctcc tcgagctcaa gaaagatggc ttggcctcg gggtgattac cgacggcgac 360

cccataaaac agtgggaaaa gatactccgc ctcgagctcg atgaatattt tgatgaggtc 420

tttatatcca acgatctcgg cgттаагааg cctcacagaa agatatttga gaaggcctg 480

cggaagtcca acgtcgagcc ccacgaggcg ctgatggctg gtgacaggct gtactcggac 540

atctacgggg cgaagcaggt tggcatgagg acagtatggt ttaaataatgg gaagtacgcc 600

aaccgcgagc tggactatct ggagtatgcg gacttcgcga tcaagtcatt gggagaagtt 660

ctagagatcg tcagggggct gaaccttgaa gagaaagagc gtgcagataa ggaagttcat 720

gctgattga 729

<210> 2  
 <211> 708  
 <212> DNA  
 <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 2  
 atgattaaag ccatatccct agacattgat ggcacatca cctatcccga caggcggctt 60

cacgaggatg ctctaaaggc cataaggctc gccgagagcc tcggtgtccc agtcatgctt 120

gtcacgggca attccgtgcc gtttctgag gcaatggcaa taatgatagg aatcacagcc 180

ccggtcgtgg ccgaagatgg cggctctctc tcggtaaagg acggccgctt gagaaagagg 240

atatacctca caacgatgga cgaggagtgg atcctctgga gcgagataaa gaggcgctat 300

cccgaggcgg ttctcagctt ctcaatgcc gaaagaaagg cgggtctctg catactgcgt 360

acgattccag ttgaggetgt tagggcactc attgaggagc ttggactcaa cctcatagca 420

gtggattctg gcttcgcgat acacatcaag aagccctgga taaacaaggg ggcgggcata 480

gagaaggcct gcgagattct cggcataagt ccgaaagaag ttgctcacgt tggcgacggc 540

gagaacgacc tcgatgcgtt ccgcgtggtt ggttatcgcg tggccgtcgg gcaggcccca 600

gagacactga aagctgaagc cgactatgtg acgcaggcga cctatggcaa gggaggggcg 660

gaagcggatg tgcacatcct caggaagtgc ggatatctag gtgattga 708

<210> 3  
 <211> 645  
 <212> DNA  
 <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 3  
 atgaaggctg ttctcttcga tatcgatgga acgataactaa ctgaggagcc tctgataatg 60

ctcttccttc cgcaggctca cgataagctc tctagaaagc ttggaatcag caaggacgag 120

gcaagggaga gattcctctc agagatactc ggcaggaggg acagttacga ctggcacgat 180

tggaacttct tttcaaact gtttgaccic gatttgaat atgaggagct tctcgagagg 240

tatccccaca aacttcaggt ttatccggac actattccta ccctggaatg gctgagggat 300

accggctata agcttggtat tgtgacgagc ggaccgaaat atcagaggct caagcttaag 360

ctcaccggtc ttctggatta cttcgacgtc gtcattacac gggacgacgt caacgccata 420

aaaccggagc ctaaaatctt cctctacacc attgaaaggc tcggagtcga gcccgtgaa 480

gctgttatgg tcggcgactc cctcagccaa gacgtttatg gcgccaagag cgtcggtatg 540

accgccgtgt ggataaacgg taatggatgat aggggctaca acatggctga ttacagatt 600

agaacccttt acgagcttag aaagatcttg ggtggtgaaa gatga 645

<210> 4  
 <211> 719  
 <212> DNA

<213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 4

tcgccttcca atccgctaac atgcttgtgc tcgttgatct cgacgatacc ctctgcaaca 60  
 cctgggatgc cggaaagtac acgctcctcc gtcttatacc cttccttctc agaaggagga 120  
 agttcaagtc tttcttctac ataatcactg cccgctacag ggagctcgag cagtcgcggg 180  
 agttccacat gatggatctt gacaaaatcg ttgagaagct tctcggaaaa gtttaccca 240  
 agataacccc tgaggagttt gaggagataa tggacctagt tgatagagtc ttcttctcga 300  
 acctcaagct ctatctgac gcccttcctg ttcttcaggg actcaaagaa atgggggcaa 360  
 agatagtgct cataacggac tctctgagcc actggcagag gaagaagctc gagtatctcg 420  
 ggataaagga ctacttcgat gcgctcataa tcagcggcga gaccggccac agcaagcttg 480  
 atccccacaa cticcgcctg gcaacgagta tgtttcccca cgaagaggag atctatatgg 540  
 tcggtgacag ggacgacact gatatgaggg gtggcaaaga tattggggct acaaccatcc 600  
 tcgtgaagcg gggttatttc aaggaaggc gcccaaaaca cgccgattac attgtcaatg 660  
 atctgctgga ggccttggag gtgattaaaa atgagcatga aaagcgagct aaagcgtaa 719

<210> 5

<211> 696

<212> DNA

<213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 5

atgaagctcg cctcattcga tgtctggaac acccttctag acattaacat tatgctcgac 60  
 gccatggcgg ttgagctgtc caagctcatg ggagcgtgca tcatagacgt cgtcgagggc 120  
 atgatgttca caagggagag gataaagcgc atgagggcag aaactgctgg agatcccacc 180

caggctctgg aggagatca gaagatgctc gcagagtgc tcggaactga gatcgagtc 240  
 gtaaggaggg ccgccgcgag ggctgttctt aaggtcagcg atgaaatcgt cctgccgggg 300  
 gcaagagagg cgcttgagag cgtcaagaga aaggcctga aggtcacctg tactggcaac 360  
 gtgatgttct ggccgggctc ttacacaagg ctctgcttg agcgcttcgg actgatggag 420  
 ttcgtggaca ggaccttctt tgcggacgag gtcttcgctt acaagccaat gcccgagatg 480  
 ttcgaaaagc cgcttaaagc gttcggcgtt gagccagtg aggccatcca cattggcgac 540  
 acctatgcag aagacttcga gggagcgtt aaaatgggga tgtgggcggt ctggattaat 600  
 cccgaggccg aggaagtga gagaatccac gagaggggct ttgaagtgcc gagcgttgag 660  
 ggaattctgg aggtgctggg ggagttagaa ggttaa 696

<210> 6  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 6  
 Met Ile Arg Val Val Phe Phe Asp Leu Asp Asp Thr Leu Val Asp Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Leu Ala Glu Met Ala Arg Lys Asn Ala Ile Glu Asn Met Val  
 20 25 30  
 Arg His Gly Leu Pro Val Asp Phe Glu Thr Ala Tyr His Glu Leu Leu  
 35 40 45  
 Glu Leu Ile Asn Glu Tyr Gly Ser Asn Phe Gly Arg His Phe Asp Tyr  
 50 55 60  
 Leu Leu Arg Arg Leu Asp Leu Pro Asn Asn Pro Lys Trp Ile Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ile Ala Tyr His Asn Thr Lys Phe Ala Tyr Leu Lys Ser Val  
 85 90 95



Lys Gly Ala Arg Lys Val Leu Leu Glu Leu Lys Lys Asp Gly Phe Gly  
 100 105 110

Leu Gly Val Ile Thr Asp Gly Asp Pro Ile Lys Gln Trp Glu Lys Ile  
 115 120 125

Leu Arg Leu Glu Leu Asp Glu Tyr Phe Asp Glu Val Phe Ile Ser Asn  
 130 135 140

Asp Leu Gly Val Lys Lys Pro His Arg Lys Ile Phe Glu Lys Ala Leu  
 145 150 155 160

Arg Lys Phe Asn Val Glu Pro His Glu Ala Leu Met Val Gly Asp Arg  
 165 170 175

Leu Tyr Ser Asp Ile Tyr Gly Ala Lys Gln Val Gly Met Arg Thr Val  
 180 185 190

Trp Phe Lys Tyr Gly Lys Tyr Ala Asn Arg Glu Leu Asp Tyr Leu Glu  
 195 200 205

Tyr Ala Asp Phe Ala Ile Lys Ser Leu Gly Glu Val Leu Glu Ile Val  
 210 215 220

Arg Gly Leu Asn Leu Glu Glu Lys Glu Arg Ala Asp Lys Glu Val His  
 225 230 235 240

Ala Asp

- <210> 7
- <211> 235
- <212> PRT
- <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 7  
 Met Ile Lys Ala Ile Ser Leu Asp Ile Asp Gly Thr Ile Thr Tyr Pro  
 1 5 10 15

Asp Arg Arg Leu His Glu Asp Ala Leu Lys Ala Ile Arg Leu Ala Glu  
 20 25 30

Ser Leu Gly Val Pro Val Met Leu Val Thr Gly Asn Ser Val Pro Phe  
 35 40 45

Ala Glu Ala Met Ala Ile Met Ile Gly Ile Thr Gly Pro Val Val Ala  
 50 55 60

Glu Asp Gly Gly Ala Leu Ser Val Lys Asp Gly Arg Leu Arg Lys Arg  
 65 70 75 80

Ile Tyr Leu Thr Thr Met Asp Glu Glu Trp Ile Leu Trp Ser Glu Ile  
 85 90 95

Lys Arg Arg Tyr Pro Glu Ala Val Leu Ser Phe Ser Met Pro Glu Arg  
 100 105 110

Lys Ala Gly Leu Val Ile Leu Arg Thr Ile Pro Val Glu Ala Val Arg  
 115 120 125

Ala Leu Ile Glu Glu Leu Gly Leu Asn Leu Ile Ala Val Asp Ser Gly  
 130 135 140

Phe Ala Ile His Ile Lys Lys Pro Trp Ile Asn Lys Gly Ala Gly Ile  
 145 150 155 160

Glu Lys Ala Cys Glu Ile Leu Gly Ile Ser Pro Lys Glu Val Ala His  
 165 170 175

Val Gly Asp Gly Glu Asn Asp Leu Asp Ala Phe Arg Val Val Gly Tyr  
 180 185 190

Arg Val Ala Val Gly Gln Ala Pro Glu Thr Leu Lys Ala Glu Ala Asp  
 195 200 205

Tyr Val Thr Gln Ala Thr Tyr Gly Lys Gly Gly Ala Glu Ala Val Met  
 210 215 220

His Ile Leu Arg Lys Phe Gly Tyr Leu Gly Asp  
 225 230 235

- <210> 8
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 8  
Met Lys Ala Val Leu Phe Asp Ile Asp Gly Thr Ile Leu Thr Glu Glu  
1 5 10 15  
Pro Leu Ile Met Leu Phe Leu Pro Gln Val Tyr Asp Lys Leu Ser Arg  
20 25 30  
Lys Leu Gly Ile Ser Lys Asp Glu Ala Arg Glu Arg Phe Leu Ser Glu  
35 40 45  
Ile Leu Gly Arg Arg Asp Ser Tyr Asp Trp His Asp Trp Asn Phe Phe  
50 55 60  
Phe Lys Leu Phe Asp Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Glu Leu Leu Glu Arg  
65 70 75 80  
Tyr Pro His Lys Leu Gln Val Tyr Pro Asp Thr Ile Pro Thr Leu Glu  
85 90 95  
Trp Leu Arg Asp Thr Gly Tyr Lys Leu Gly Ile Val Thr Ser Gly Pro  
100 105 110  
Lys Tyr Gln Arg Leu Lys Leu Lys Leu Thr Gly Leu Leu Asp Tyr Phe  
115 120 125  
Asp Val Val Ile Thr Arg Asp Asp Val Asn Ala Ile Lys Pro Glu Pro  
130 135 140  
Lys Ile Phe Leu Tyr Thr Ile Glu Arg Leu Gly Val Glu Pro Gly Glu  
145 150 155 160  
Ala Val Met Val Gly Asp Ser Leu Ser Gln Asp Val Tyr Gly Ala Lys  
165 170 175  
Ser Val Gly Met Thr Ala Val Trp Ile Asn Arg Asn Gly Asp Arg Gly  
180 185 190  
Tyr Asn Met Ala Asp Tyr Glu Ile Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Arg Lys  
195 200 205  
Ile Leu Gly Gly Glu Arg  
210

<210> 9  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 9  
 Met Leu Val Leu Val Asp Leu Asp Asp Thr Leu Cys Asn Thr Trp Asp  
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Tyr Thr Leu Leu Arg Leu Ile Pro Phe Leu Leu Arg Arg  
 20 25 30

Arg Lys Phe Lys Ser Phe Phe Tyr Ile Ile Thr Ala Arg Tyr Arg Glu  
 35 40 45

Leu Glu Gln Ser Arg Glu Phe His Met Met Asp Leu Asp Lys Ile Val  
 50 55 60

Glu Lys Leu Leu Gly Lys Val Tyr Ala Lys Ile Thr Pro Glu Glu Phe  
 65 70 75 80

Glu Glu Ile Met Asp Leu Val Asp Arg Val Phe Phe Ser Asn Leu Lys  
 85 90 95

Leu Tyr Pro Asp Ala Leu Pro Phe Leu Gln Gly Leu Lys Glu Met Gly  
 100 105 110

Ala Lys Ile Val Leu Ile Thr Asp Ser Ser Ser His Trp Gln Arg Lys  
 115 120 125

Lys Leu Glu Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Tyr Phe Asp Ala Leu Ile Ile  
 130 135 140

Ser Gly Glu Thr Gly His Ser Lys Leu Asp Pro His Asn Phe Arg Leu  
 145 150 155 160

Ala Thr Ser Met Phe Pro His Glu Glu Glu Ile Tyr Met Val Gly Asp  
 165 170 175

Arg Asp Asp Thr Asp Met Arg Gly Gly Lys Asp Ile Gly Ala Thr Thr  
 180 185 190

Ile Leu Val Lys Arg Gly Tyr Phe Lys Gly Arg Arg Pro Lys His Ala  
 195 200 205

Asp Tyr Ile Val Asn Asp Leu Leu Glu Ala Leu Glu Val Ile Lys Asn  
 210 215 220

Glu His Glu Lys Arg Ala Lys Ala  
 225 230

<210> 10  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Thermococcus onnurineus NA1

<400> 10  
 Met Lys Leu Ala Ser Phe Asp Val Trp Asn Thr Leu Leu Asp Ile Asn  
 1 5 10 15

Ile Met Leu Asp Ala Met Ala Val Glu Leu Ser Lys Leu Met Gly Ala  
 20 25 30

Cys Ile Ile Asp Val Val Glu Gly Met Met Phe Thr Arg Glu Arg Ile  
 35 40 45

Lys Arg Met Arg Ala Glu Thr Ala Gly Asp Pro Thr Gln Ala Leu Glu  
 50 55 60

Glu Ser Gln Lys Met Leu Ala Glu Leu Leu Gly Thr Glu Ile Glu Val  
 65 70 75 80

Val Arg Arg Ala Ala Ala Arg Ala Val Leu Lys Val Ser Asp Glu Ile  
 85 90 95

Val Leu Pro Gly Ala Arg Glu Ala Leu Glu Ser Val Lys Arg Lys Gly  
 100 105 110

Leu Lys Val Thr Val Thr Gly Asn Val Met Phe Trp Pro Gly Ser Tyr  
 115 120 125

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Arg Phe Gly Leu Met Glu Phe Val Asp Arg  
 130 135 140

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





<211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TON\_0347F primer

<400> 13  
 cgaccggca tatgattaaa gccatatccc tagac 35

<210> 14  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TON\_0347R primer

<400> 14  
 ctccacatgt cgacatcacc tagatatccg aacttcc 37

<210> 15  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TON\_0338F primer

<400> 15  
 cgaccggca tatgaaggct gttctcttcg atacc 35

<210> 16  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TON\_0338R primer

<400> 16  
ctccacatgt cgactctttc accacccaaa atctttc 37

<210> 17  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TON\_1713F primer

<400> 17  
cgaccggca tatgcttggt ctcgttgatc tcgac 35

<210> 18  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TON\_1713R primer

<400> 18  
ctccacatgt cgaccgcttt agctcgcttt tcatgctc 38

<210> 19  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TON\_0002F primer

<400> 19  
cgaccggca tatgaagctc gcctcattcg atgctc 35

<210> 20  
<211> 38

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TON\_0002R primer

<400> 20  
ctccacatct cgagaccttc taactcccc agcacctc

38