(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월12일
(11) 등록번호 10-1756769
(24) 등록일자 2017년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/50 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0054757
(22) 출원일자 2008년06월11일
심사청구일자 2013년03월13일
(65) 공개번호 10-2008-0108921
(43) 공개일자 2008년12월16일
(30) 우선권주장
1020070056918 2007년06월11일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Appl Environ Microbiol., Vol. 66, No. 10, pages 4334-4339 (2000.10.)*
KR1020040095563 A
Int. J. Syst. Evol Microbiol., Vol. 54, pages 675-680 (2004.05.)
NCBI, GenBank Accession No. EDP97848 (2007.12.12.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
김상진
서울특별시 서초구 남부순환로 2183, 201동 1903호 (방배동, 방배래미안타워)
강성균
경기도 안산시 상록구 감골로 59 702동 1502호 (사동,월드아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤여강

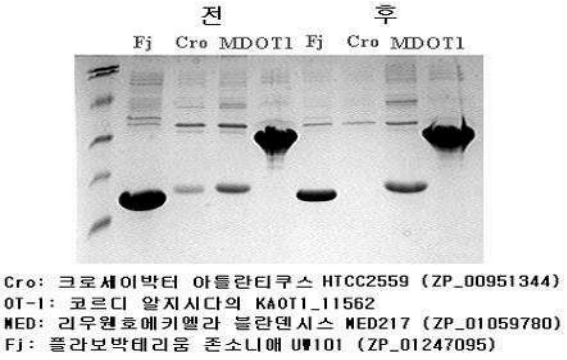
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **서열번호 1의 살조활성 단백질분해효소, 이를 코딩하는 유전자 및 이를 포함하는 살조제제**

(57) 요 약

본 발명은 살조활성 단백질분해효소, 이를 코딩하는 유전자 및 이를 포함하는 살조제제에 관한 것으로, 본 발명의 단백질분해효소는 살조활성이 우수하므로, 적조발생 지역에서 적조의 방제에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도16



(72) 발명자

권개경

경기도 안산시 상록구 성호로5길 7, 2층 (일동)

이정현

경기도 성남시 분당구 불정로 219, 한솔청구아파트 116동 101호 (정자동)

이현숙

경기도 안산시 상록구 감골로 59 702동 1502호 (사동,월드아파트)

강지현

경기도 안산시 상록구 천문3길 2 402호 (사동)

손재학

부산광역시 북구 금곡대로 268, 대림타운 208동 703호 (화명동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 26 및 27 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 살조활성 단백질분해효소.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 살조활성 단백질분해효소가 서열번호 26의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 살조활성 단백질분해효소.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 살조활성 단백질분해효소가 서열번호 27의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 살조활성 단백질분해효소.

청구항 4

제 1 항의 단백질분해효소를 코딩하는 유전자.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

서열번호: 2, 28 및 29 중 어느 하나의 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 유전자가 서열번호 28의 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 유전자가 서열번호 29의 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 8

제 1 항의 단백질분해효소를 활성성분으로 함유하는 살조제제.

청구항 9

제 8 항의 제제를 적조현상이 발생한 지역에 처리하는 단계를 포함하는 적조의 방제방법.

청구항 10

코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT1 균주(KCTC 11320BP)를 이용하여, 서열번호 1, 26 및 27로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질분해효소를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 단백질분해효소를 활성성분으로 포함하는 살조제제를 바다에 투입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 적조 방제 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 살조제제를 상기 생산균주 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT1 균주(KCTC 11320BP)와 동시에 투입하는 것을 특징으로 하는 적조 방제 방법.

발명의 설명

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 적조생물의 생장을 억제하는 단백질분해효소 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 해양에서 적조를 유발하는 원인 종은 돌말류 (Bacillariophyceae), 침편모조류 (Raphidophyceae) 및 와편모조류 (Dinophyceae) 등의 편모조류로 구성되어 있으며, 특히 편모조류가 대부분을 차지하고 있다. 돌말류는 한천이 포함된 배지에서 생장이 가능한 반면 편모조류는 생장이 불가능하므로 소프트-아가 오버레이 (soft-agar overlay) 방법을 이용한 살조세균의 연구는 제한을 받아왔다.

[0003] 해양 및 연안 환경에서 분리된 살조세균은 알테로모나스 (*Alteromonas*), 바실러스 (*Bacillus*), 카울로박터 (*Caulobacter*), 사이토파가 (*Cytophaga*), 플라보박테리움 (*Flavobacterium*), 슈도알테로모나스 (*Pseudoalteromonas*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 사포로스피라 (*Saporospira*), 비브리오 (*Vibrio*) 속이 주종을 이루고 있다. 해양으로부터 분리된 살조세균은 분류학상 플라보박테리움-사이토파가 복합체 (complex)와 프로테오박테리아류 (*Proteobacteria* branch), 예를 들어 알테로모나스, 슈도모나스, 슈도알테로모나스, 사포로스피라 및 비브리오로 구분할 수 있다. 일반적으로, 여러 가지 생체 거대분자들 (biomacromolecules)의 분해능력을 가지고 있는 플라보박테리움-사이토파가 복합체의 종들은 조류의 세포벽과 이들로부터 방출되는 배설물 (exudates)을 영양원으로 이용할 수 있기 때문에 식물 플랑크톤과 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 사료된다.

[0004] 현재까지 연구된 결과에 따르면 살조세균의 살조기작은 크게 두 가지로 구분하여 정의할 수 있다. 첫 번째 기작으로는, 살조세균이 적조생물의 표면에 부착하여 적조생물을 용조하는 접촉에 의한 기작으로, 사이토파가 종과 알테로모나스 종이 그 대표적인 예로 알려져 있다. 두 번째 기작으로는, 살조세균들이 살조물질을 세포 외로 분비하여 적조생물의 성장을 억제 또는 용조하는 기작으로, 대부분의 살조세균들이 이에 포함된다. 해양으로부터 분리된 대부분의 살조세균은 세포외 물질을 생성하는 기작을 가지고 있으나 이러한 물질의 분리, 동정 및 기작에 대한 보고는 거의 없다.

[0005] 본 발명자들은 적조생물인 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*)을 죽이는 살조세균인 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT-1 균주를 분리하였으며, 이를 2008년 4월 24일자로 한국생명공학연구원내 생물자원센터 (KCTC, Korean Collection for Type Cultures)에 기탁한 바 있다 (기탁번호 KCTC 11320BP; 기탁일 2008.4.8).

[0006] 또한, NCBI (national center for biotechnology information)에 등록된 균주들과 16S rRNA의 유사성을 조사하고, 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과, 상기 균주는 플라보박테리아 (*Flavobacteria*)에 속하는 신규한 균주임이 확인되었다 (Sohn 등, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:675-680, 2004).

[0007]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 적조생물의 생장을 억제할 수 있는 신규한 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 활성성분으로 함유하는 살조제제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제제를 이용하여 적조발생 지역을 처리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명은 서열번호: 1, 4 내지 7, 26 및 27 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 살조활성 단백질분해효소 및 상기 단백질분해효소를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 단백질분해효소를 활성성분으로 함유하는 살조제제를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 살조제제를 적조현상이 발생한 지역에 처리하는 단계를 포함하는, 적조의 방제방법을 제공한다. 보다 상세하게는 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT1 균주(KCTC 11320BP)를 이용하여, 서열번호 1, 7 및 27로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질분해효소를 생산하는 단계; 및 상기 생산된 단백질분해효소를 활성성분으로 포함하는 살조제제를 바다에 투입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 적조 방제 방법을 제공한다. 상기 살조제제는 상기 단백질분해효소를 생산하는 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT1 균주(KCTC 11320BP)와 동시에 투입하거나, 상기 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT1 균주(KCTC 11320BP)의 배양물로부터 순수 또는 부분 분리한 단백질분해효소를 유효성분으로 하여 투입할 수도 있다. 상기 배양시 해수상태와 적합하게 하기 위하여 NaCl 0.5~6%, Mg^{2+} 0.05g-1.2g/l 및 Ca^{2+} 0.05-1.0g/l를 포함하는 배지를 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 살조세균인 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT-1 균주 (KCTC 11320BP)로부터 분리한 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 살조활성 단백질분해효소를 제공한다.

[0015] 서열번호: 1의 아미노산 서열에서, 1 내지 27번째 아미노산은 신호 펩타이드 (signal peptide)에 해당하고, 28 내지 98번째 아미노산은 프로세싱 펩타이드 (processing peptide)에 해당하고, 99 내지 278번째 아미노산은 성숙 단백질 (mature protein)에 해당하며, 상기 성숙 단백질은 금속 결합 (metal binding) 부위 (200 내지 217번째 아미노산)를 포함하고 있다 (**도 3**).

[0016] 상기 단백질의 아미노산 서열은 단백질분해효소의 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 아미노산의 치환, 부가 또는 결실이 이루어질 수 있으며, 목적에 따라 단백질의 일부만이 사용될 수도 있으며 이와 같이 변형된 아미노산 서열 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 및 그의 단편을 포함한다.

[0017] 따라서, 본 발명은, 상기 단백질에서 신호 펩타이드를 포함하지 않는, 서열번호: 26의 아미노산 서열을 갖는 살조활성 단백질 분해효소, 및 신호펩타이드 및 프로세싱 펩타이드를 포함하지 않는, 서열번호: 27의 아미노산 서열을 갖는 살조활성 단백질 분해효소도 포함한다.

[0018] 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 상기 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고 코딩 영역을 제외한 부분에서도 단백질의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 서열번호: 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드 및 이의 단편을 포함하며, 바람직하게는 서열번호: 2의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0019] 또한, 상기 서열번호: 26 및 27의 아미노산 서열을 갖는 살조활성 단백질분해효소를 코딩하는, 서열번호: 28 및 29의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드도 포함한다.

[0020] 상기 서열번호: 1의 단백질분해효소는 성숙 단백질 부분 외에 프로세싱 펩타이드를 추가로 포함하는 경우에 단백질 분해활성이 보다 우수하며, 프로세싱 펩타이드 및 성숙 단백질을 포함하는 단백질은 시간이 지남에 따라 자가절단 (autocleavage)되어 성숙 단백질로 변환되고 (**도 7 및 8**), 성숙 단백질의 C-말단이 단백질의 프로세싱에 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 단백질분해효소는 pH 6.5 내지 8, 바람직하게는, pH 7 내지 8, 및 온도 18 내지 28℃, 바람직하게는 20 내지 23℃, 가장 바람직하게는 20℃에서; 및 80 내지 100 mM의 칼슘이온의 존재 하에 최적 활성을 나타내며 (**도 9, 10 및 12**), 아연이온은 단백질분해효소의 활성을 저해함을 확인하였다(**도 11**).

[0022] 또한, 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 본 발명의 단백질분해효소는 코크로디니움 폴리크리코이데스 (*Cochlodinium polykrikoides*), 딸라씨오시라 종 (*Thalassiosira* sp.), 헤테로시그마 아카시오 (*Heterosigma akashiwo*), 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*), 알렉산드리움 (*Alexandrium* sp), 캐토시로스 (*Chaetoceros cuvisetus*), 짐노디늄 (*Gymnodium* sp) 등의 조류에 대해 우수한 살조활성을 나타낸다.

[0023] 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질분해효소는 플라보박테리움 존소니애 (*Flavobacterium johnsoniae*)

UW101 (ZP_01247095, 서열번호: 4), 크로세이박터 아틀란티쿠스(*Croceibacter atlanticus*) HTCC2559 (ZP_00951344, 서열번호: 5) 및 리우웬호에키엘라 블란덴시스 (*Leeuwenhoekiella blandensis*) MED217 (ZP_01059780, 서열번호: 6)과 80% 이상의 유전자 덮힘률 (gene coverage)에서 40% 이상의 동일성을 보이며, 특히 프로세싱 펩타이드 이후의 성숙한 프로테아제 부분은 50% 이상의 높은 상동성을 나타낸다 (**도 13**). 또한, 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*)의 KAOT1_11562 유전자 (서열번호: 7)와도 높은 상동성을 나타낸다 (**도 14**).

[0024] 또한, 이러한 단백질들의 발현 형태 및 활성은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 거의 유사하다 (**도 16**).

[0025] 상기에서 언급한 바와 같이, 각 단백질을 코딩하는 유전자는 상기 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으므로, 본 발명은 상기 서열번호: 4 내지 7의 아미노산 서열을 코딩하는 각 염기서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드 및 이의 단편을 포함하며, 이들은 바람직하게는 서열번호: 8 내지 11의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드이다.

[0026] 본 발명의 살조활성 단백질분해효소는 우수한 살조활성을 나타내므로, 상기 단백질 및 이를 코딩하는 유전자는 적조 방제에 유용하게 사용될 수 있다.

[0027] 따라서, 본 발명은 또한 상기 서열번호: 1 및 4 내지 7의 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 단백질을 활성성분으로 함유하는 살조제제를 제공한다. 상기 활성성분은 전체 조성물의 중량을 기준으로 약 1 내지 99 중량%로 포함될 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한 상기 살조제제를 적조가 발생한 해수에 처리하여 적조를 방제하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 살조제제의 사용량은 유기물의 축적 정도, 적조발생 정도 등에 따라 가변적이다.

[0030] 상기 제제의 사용방법은 해수면 위에 살포하거나 또는 파이프로 해저 뻘 등에 살포하는 등 다양한 방법이 적용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 이때, 상기 방법은 살조제제의 상태 및 살조제제가 적용되는 해수 또는 호수의 상태를 고려하여 적절히 사용할 수 있다.

[0031] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] **실시예 1: 살조세균의 배양**

[0033] 살조세균인 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT-1 균주(KCTC 11320BP)를 조벨 (ZoBell) 2216e 고형배지 (문헌 [Oppenheimer, C. H., et al., J. Mar. Res., 11:10-18, 1952] 참조)에서 생장시킨 다음, 100 ㎖의 조벨 2216e 액체배지 (상기 문헌 [Oppenheimer, C. H., et al., 1952] 참조)에 3% (v/v)의 양을 접종하여 25℃에서 150 rpm으로 1일 동안 진탕배양하여 전배양액을 준비하였다. 3ℓ의 조벨 2216e 액체배지가 포함된 5ℓ의 단지 발효기 (한국발효기사)에 상기 배양액을 3% (v/v)로 첨가한 다음, 25℃, 300 rpm 및 0.5 vvm의 조건으로 배양하였다.

[0034] **실시예 2: 적조생물의 준비**

[0035] 살조세균의 탐색을 위한 숙주생물은 코크로디니움 포리크리코이데스 (*Cochlodinium polykrikoides*), 딸라씨오시라 종 (*Thalassiosira* sp.), 헤테로시그마 아카시오 (*Heterosigma akashiwo*), 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*), 알렉산드리움 (*Alexandrium* sp), 캐토시로스 (*Chaetoceros cuvisetus*), 짐노디늄 (*Gymnodium* sp)를 이용하였으며, 각 조류를 F/2 액체배지 ($NaNO_3$ 0.075 g, $NaH_2PO_4?H_2O$ 0.005 g, $Na_2SiO_3?9H_2O$ 0.030 g, F/2 미량 금속 용액 1 ㎖, F/2 비타민 용액 1 ㎖ 및 묵힌 바닷물 1,000 ㎖; Stein, Handbook of

phycological methods, Cambridge Univ. Press, 1973)를 이용하여 대수성장기까지 배양한 후, 탐색을 위해 다음과 같이 준비하였다.

[0036] 적조생물은 형광광도계 (Hitachi, 일본)를 이용하여 최종 밀도가 0.05의 형광강도 (여기 파장; 434 ㎚, 방출파장; 670 ㎚)가 되도록 F/2 액체배지로 희석한 후, 시험관 (110 ㎜×10 ㎜)에 2.7 ㎖씩 분주하여 MPN (most probable number)법을 위한 시험관을 준비하였다.

[0037] **실시예 3: 살조활성 단백질의 선별**

[0038] **<3-1> 살조세균 단백질의 정제 및 분리**

[0039] 상기 실시예 1에서 배양된 살조세균의 살조활성 단백질을 분리하기 위하여, 상기 실시예 1에서 배양된 살조세균을 5 ℓ의 단지 발효기를 이용하여 30시간 동안 배양한 후, 초여과막 농축장치 (Ultrafiltration kit)를 이용하여 10 kDa 이상의 물질을 농축한 다음, 비변성 (native)-PAGE (12%)를 수행하여 단백질을 분리하였으며, 그 결과를 **도 1**에 나타내었다. **도 1**에서 레인 1은 사이즈 마커이고, 레인 2는 살조세균 단백질이다.

[0040] **<3-2> 분리된 단백질의 살조활성 측정**

[0041] 상기 <3-1>과 같이 분리된 단백질을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 20 mA의 정전류 (constant current)로 100분 동안 비변성 전기영동시킨 후 겔의 일부를 쿠마시 브릴리언트 블루 (Coomassive brilliant blue) R-250로 염색하여 밴드의 위치를 확인하였다. 나머지 겔로부터 밴드의 패턴에 따라 13개의 밴드로 구분하여 작은 크기로 절편한 다음, 1.5 ㎖의 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)을 넣고 4℃ 냉장고에서 2시간 동안 방치하였다. 상기 용액을 원심분리하여 겔을 침전시킨 후 상층액은 울트라콘 (Ultracon, cut-off size, 10 kDa)을 이용하여 농축하였으며, 농축된 시료는 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*)을 이용한 론 (lawn) 분석방법에 따라 살조활성을 측정하였다. 이때, 양성 대조군으로는 살조세균의 배양액을 사용하였으며, 음성 대조군으로는 시료의 조건에 따라 조벨 2216e 액체배지, F/2배지 및 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액을 사용하였다.

[0042] 구체적으로, 스켈레토네마 코스타튬을 20℃, 광주기 14L (5000 룩스 (lux))/10D의 조건 하에서 1 내지 2주 동안 배양하였다. 활성능은 스켈레토네마 코스타튬의 론 (lawn)에 생긴 투명 영역 (clear zone)의 지름 (㎜)을 측정하여 활성정도를 비교하였으며, 투명 영역이 없으면 "-", 투명 영역의 크기가 1 ㎜이면 "+", 2 ㎜이면 "++", 3 ㎜이면 "+++", 5 ㎜이면 "++++"로 하여, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0043]

도 1의 밴드 번호	살조활성
13	-
12	-
11	+
10	+++
9	+
8	-
7	-
6	-
5	-
4	-
3	++
2	+
1	-
음성 대조군	-
양성 대조군	++++

[0044] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 밴드 번호 3 및 10의 단백질의 살조활성이 우수함을 알 수 있다.

[0045] 또한, 상기에서 선별된 밴드 번호 3 및 10의 단백질을 변성조건 (문헌 [Laemmli, Nature, 227:680-685, 1970] 참조) 하에서 SDS-PAGE를 수행하여 밴드 번호 10의 단백질의 발현을 확인한 다음 (**도 2**; 레인 1: 사이즈 마커, 레인 2: 살조세균 단백질, 레인 3: 밴드 번호 3의 단백질 및 레인 4: 밴드 번호 10의 단백질), 상기 단백질의 N-말단의 아미노산 서열을 분석한 결과, 20개의 아미노산을 갖는 서열번호: 3의 아미노산 서열을 얻었다.

[0046] 이후, 상기 아미노산 서열을 NCBI Blast, PDF 및 SWISSPROT 등의 단백질 서열 데이터 베이스를 이용하여 유사성을 검색한 결과, 기존에 보고된 단백질 서열과는 유사성이 없는 것으로 나타났다.

[0047] **실시예 4: 살조활성 단백질의 ORF (open reading frame) 규명**

[0048] 살조세균인 코르디아 알지시다 OT-1 균주(KCTC 11320BP)의 유전체 서열을 분석한 다음, 서열번호: 3의 N-말단 아미노산 서열을 이용하여 데이터 마이닝 (data mining)을 수행한 결과, 서열번호: 3의 20개 아미노산 중 18개가 일치하는 KAOT1_10476 단백질 (서열번호: 1)을 확인하였다.

[0049] **실시예 5: 살조활성 단백질 발현벡터의 구축**

[0050] 상기 서열번호: 1의 KAOT1_10476 단백질은 **도 3**에 나타난 바와 같이, 신호 펩타이드 (1 내지 27번째 아미노산), 프로세싱 (processing) 펩타이드 (28 내지 98번째 아미노산) 및 성숙 영역 (99 내지 278번째 아미노산)으로 구성된 메탈로 프로테아제 (metallo protease)인 것으로 예측되었으며, 야생형 균주로부터 분리된 N-말단 서열은 세포외로 분비되어 프로세싱 펩타이드가 제거된 성숙된 단백질분해효소일 것으로 예상되었다.

[0051] 따라서, 상기 단백질의 살조활성을 확인하기 위하여, **도 4**에 나타난 바와 같은 다양한 단백질이 발현되도록 하기와 같이 각각의 발현벡터를 구축하였다.

[0052] 먼저, *Nde*I 및 *Xho*I 제한효소 부위를 갖도록 디자인된 하기 표 2의 프라이머 조합, 주형으로서 서열번호: 2의 유전자 및 TLA1 폴리머라제 (Bioneer 사, 한국)를 사용하여 서열번호: 1의 KAOT1_10476 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 다양한 DNA를 PCR로 증폭하였다. 상기 PCR은 95℃에서 2분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분의 반응을 30회 반복하였다.

표 2

[0053]

PCR 산물	프라이머	서열번호
10476_1	OT1m_t	12
	OT1m_bc	13
10476_2	OT1p_t	17
	OT1m_bc	13
10476_3	OT1m_t	12
	OT1delta5_bc	15
10476_4	OT1m_t	12
	OT1delta26_bc	16
10476_5	OT1m_t	12
	OT1m_bH	14
10476_6	OT1p_t	17
	OT1m_bH	14
10476_7	OT1m_t	12
	OT1m_bc	13
10476_8	OT1p_t	17
	OT1m_bc	13
10476_9	OT1p_t	17

OT1delta5_bc	15

[0054] 이후, pET24a 발현벡터를 제한효소 *Nde*I 및 *Sal*I로 처리하여 절단한 다음, 플라스미드 정제 키트 (Qiagen 사)를 이용하여 정제하고, 상기에서 얻은 각 PCR 산물과 결찰시킨 후, 대장균 DH5α에 형질전환시켰다. 플라스미드 정제 키트를 이용하여 상기에서 얻은 형질전환체로부터 DNA를 정제한 다음, 이를 서열 분석하여 돌연변이나 프레임 이동 (frame shift)이 일어나지 않은 완전한 DNA가 클로닝되었음을 확인한 후, 상기 DNA를 BL21(DE3) (Novagen 사)에 형질전환시켰다.

[0055] **실시예 6: 살조활성 단백질분해효소의 발현 및 리폴딩**

[0056] 상기 실시예 5에서 얻은 형질전환체를 카나마이신 (kanamycin, 50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 배지 (Difco 사)에 접종하여 37℃에서 12시간 동안 배양한 다음, 상기 배양물을 상기와 동일한 배지에 1% (v/v)로 접종하여 3시간 동안 배양한 후, IPTG (Sigma 사)를 최종 1 mM의 농도로 첨가하여 단백질분해효소를 과발현시켰다. 각 단백질분해효소의 발현 정도 및 시기를 분석하기 위하여 1시간 마다 샘플링하여 SDS-PAGE로 분석하였으며, 배양 3시간 후의 단백질분해효소 발현 정도를 도 5에 나타내었다.

[0057] 도 5에 나타난 바와 같이, PCR 산물 10476_3이 삽입된 플라스미드를 제외하고는 모두 단백질분해효소가 발현됨을 확인하였다.

[0058] 또한, pET 시스템의 프로토콜에 따라 발현된 단백질분해효소가 용해성 분획, 불용해성 분획 및 주변세포질 (periplasmic) 영역 중 어느 곳으로 생산되는지를 확인한 결과, 대부분의 단백질분해효소가 불용성 단백질임을 확인하였다.

[0059] 또한, 상기에서 얻은 10476_1, 10476_6, 10476_7 (서열번호: 27), 10476_8 (서열번호: 26) 및 10476_9 단백질분해효소의 불용해성 분획에 8M 우레아를 처리하여 단백질분해효소를 가용화시킨 다음, 이를 다시 완충용액 (50 mM Tris (pH 8.0), 1 mM $CaCl_2$)으로 치환시켜 리폴딩을 수행함으로써 단백질분해효소를 얻었다 (**도 6** 참조).

[0060] 그 결과, 모든 단백질분해효소가 리폴딩됨을 확인하였다.

[0061] **실시예 7: 살조활성 단백질분해효소의 분해활성 측정**

[0062] 상기 실시예 6에서 얻은 단백질분해효소들을 각각 젤라틴 기질 겔 (gelatin substrate gel)에 전개시켜 단백질분해활성을 측정 (문헌 [Park, H. I., J. Biol. Chem., 275:20540-20544, 2000] 참조)하였으며, 그 결과를 **도 7**에 나타내었다.

[0063] **도 7**에 나타난 바와 같이, 10476_9 단백질을 제외한 10476_1 및 10476_6 내지 10476_8 단백질은 단백질 분해활성을 나타내었다.

[0064] 또한, 프로세싱 펩타이드를 포함하고 있는 10476_8 단백질 (서열번호: 26)의 활성을 나타내는 밴드는 시간이 지남에 따라 점차 내려가다가, 성숙된 영역을 발현시킨 10476_7 단백질 (서열번호: 27)과 유사한 크기를 나타내었다.

[0065] 따라서, 10476_8 단백질의 프로세싱 펩타이드가 시간이 지남에 따라 자가절단 (autocleavage)되어 성숙 단백질로 변환됨을 예상할 수 있다.

[0066] 또한, 10476_1 단백질의 결과로부터 N-말단의 His 태그의 존재가 단백질 분해활성을 방해하고 있으며, 10476_9 단백질의 결과로부터 C-말단의 결실 돌연변이는 프로세싱이 되지 않음으로써 활성을 나타내지 않음을 예상할 수 있다.

[0067] **실시예 8: 살조활성 단백질분해효소의 프로세싱 현상 관찰**

[0068] 본 발명의 살조활성 단백질분해효소의 프로세싱 현상을 관찰하기 위하여, 10476_8 단백질 (서열번호: 26)을 4℃

에서 1주일 동안 반응시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 단백질 분해활성 분석을 수행한 후, SDS-PAGE로 확인하였으며, 그 결과를 **도 8**에 나타내었다.

[0069] **도 8**에 나타난 바와 같이, 10476_8 단백질은 반응 3일 후에 프로세싱 펩타이드가 분해되어 성숙한 단백질분해효소로 변환되는 현상이 확인되었으며, 7일 후에는 2개의 주요 밴드로 나타났다. 또한 주요 단백질의 양과 시간에 따라 증가한 저분자성 펩타이드의 양을 고려할 때, 성숙 과정 중, 자가절단이 수반되는 것을 확인하였다.

[0070] 또한, 상기와 동일한 방법으로 10476_9 단백질을 분석한 결과, 프로세싱 펩타이드를 포함하고 C-말단에 5개의 아미노산이 결실된 돌연변이인 10476_9 단백질은 잘 분리되었지만, 10476_8 단백질과 같이 밴드의 크기가 줄어드는 현상은 관찰되지 않았다. 따라서, 10476_9 단백질은 프로세싱이 되지 않음으로써 활성을 나타내지 않는 것이므로, C-말단 아미노산이 프로세싱에 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

[0071] **시험예 1: 살조활성 단백질분해효소의 생화학적 특성 규명**

[0072] 성숙된 단백질만을 포함하는 10476_7 단백질 (서열번호: 27)을 프로테아제의 세제 (detergent)에 대한 저항성과 EDTA를 이용한 안정성을 결합하여 SDS를 이용하여 단백질들을 용해시킨 후 이를 SDS를 포함하지 않는 50mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100을 포함하는 완충용액으로 희석하여 리폴딩시킨 다음, 온도 및 pH에 따른 단백질 분해활성을 상기 문헌 [Park, H. I., 2000]에 기재된 방법에 따라 측정하였으며, 그 결과를 각각 도 9 및 10에 나타내었다.

[0073] **도 9 및 10**에 나타난 바와 같이, 10476_7 단백질은 pH 7-8 및 약 20℃에서 최적 활성을 나타내었다.

[0074] 또한, 리폴딩된 단백질 5 ㎍을 0.1% 젤라틴, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl에 1 mM의 아연 또는 칼슘이온이 포함된 완충용액에 넣고, 2시간 동안 20℃에서 반응시킨 후, 5% TCA 용액 (w/v)을 넣은 후 10분 동안 얼음에 방치하고, 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 이를 금속이 포함되지 않은 대조군과 비교하여 금속이온에 의한 활성 저해를 측정하였으며, 그 결과를 **도 11 및 12**에 나타내었다.

[0075] **도 11**에 나타난 바와 같이, 10476_7 단백질에 대한 아연이온의 저해활성을 확인하였다.

[0076] 또한, **도 12**에 나타난 바와 같이, 단백질분해효소의 활성에 칼슘이온이 필수적이며, 80 내지 100 mM의 칼슘이온에 의해 단백질분해효소의 최대 활성이 나타났다.

[0077] **시험예 2: 살조활성 단백질분해효소의 살조활성 분석**

[0078] 10476_7 단백질분해효소 (서열번호: 27)의 살조활성을 확인하기 위하여, 실시예 2에서 준비된 코크로디니움 포리크리코이데스 (*Cochlodinium polykrikoides*), 딸라씨오시라 종 (*Thalassiosira* sp.), 헤테로시그마 아카시오 (*Heterosigma akashiwo*), 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*), 알렉산드리움 (*Alexandrium* sp), 캐토시로스 (*Chaetoceros cuvisetus*), 짐노디늄 (*Gymnodniium* sp) 배양액에 상기 단백질 (100 μg/㎖) 50 ㎕를 첨가하였다. 24시간 후에 일괄적으로 루골 요오드 용액 (Lugol's iodine solution, 1%)을 이용하여 상기 배양액을 염색한 다음, 세포의 수를 측정하여, 단백질분해효소가 첨가되지 않은 대조군과 단백질분해효소가 첨가된 실험군 (실험군 1 및 2)의 세포수 및 억제정도를 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0079] 코크로디니움 포리크리코이데스에 대한 살상검증

	대조군	실험군 1	실험군 2
세포수 (세포/㎖)	1,360(130)	960(30)	1040(90)
(세포/㎖)	1,330(120)	940(60)	900(110)
억제정도 (%)	-	40.7	30.0
억제정도 (%) = ((대조군-실험군)/실험군)×100 ( ): 표준편차			

[0080] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 코크로디니움 포리크리코이데스 균주에 서열번호: 1의 단백질분해효소를 처리하면 균주의 성장이 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 또한 딸라씨오시라 종 (*Thalassiosira* sp.), 헤테로시그마 아카시오 (*Heterosigma akashiwo*), 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*), 알렉산드리움 (*Alexandrium* sp), 캐토시로스 (*Chaetoceros cuvisetus*), 짐노디늄 (*Gymnodinium* sp) 에 대해서도 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0081] **실시예 9: 상동성을 갖는 유전자의 검색**

[0082] 살조효과가 확인된 본 발명의 단백질분해효소의 아미노산 서열 (서열번호: 1)을 바탕으로 다양한 해양 미생물의 아미노산 서열을 NCBI Blast를 이용하여 분석한 결과, **도 13**에 나타난 바와 같이 플라보박테리움 존소니애 (*Flavobacterium johnsoniae*) UW101 (ZP_01247095, 서열번호: 4), 크로세이박터 아틀란티쿠스(*Croceibacter atlanticus*) HTCC2559 (ZP_00951344, 서열번호: 5) 및 리우웬호에키엘라 블란덴시스 (*Leeuwenhoekiella blandensis*) MED217 (ZP_01059780, 서열번호: 6)과 80% 이상의 유전자 덮힘률 (coverage)에서 40% 이상의 동일성을 보였고, 특히 프로세싱 펩타이드 이후의 성숙한 프로테아제 부분은 50% 이상의 높은 상동성을 나타내었다. 또한, **도 14**에 나타난 바와 같이, 코르디 알지시다의 KAOT1_11562 유전자 (서열번호: 7)와도 높은 상동성을 나타내었다.

[0083] **실시예 10: 상동성을 갖는 살조활성 단백질의 발현**

[0084] 서열번호: 1의 살조활성 단백질분해효소와 상동성을 보이는 살조활성 단백질을 발현시키기 위해, 하기 표 4의 프라이머 조합, 및 주형으로서 각각 서열번호: 4 내지 7의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자 (서열번호: 8 내지 11)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 PCR을 수행하였으며, 그 결과를 **도 15**에 나타내었다.

표 4

[0085]

PCR 산물	프라이머	서열번호
ZP_00951344	HTCC2559m_t	18
	HTCC2559m_bc	19
11562	OT11562m_t	20
	OT11562m_bc	21
ZP_01059780	MED217m_t	22
	MED217m_bc	23
ZP_01247095	fjohnm_t	24
	fjohnm_bc	25

[0086] 이후, 상기 각 PCR 산물을 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 pET24 발현벡터에 클로닝하고, 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 단백질을 과발현시켜 SDS-PAGE로 분석한 결과, 4종의 단백질이 모두 잘 발현되었지만, 모두 불용해성 분획에서 검출되었다. 이에, 활성을 측정하고자 상기 시험예 1과 동일한 방법으로 단백질들을 용해시킨 후 (전), 이를 SDS를 포함하지 않는 50mM Tris-HCl, 1 mM EDTA 및 1% 트리톤 X-100을 포함하는 완충용액으로 희석하여 리폴딩 (후)을 시도하였으며, 그 결과를 **도 16**에 나타내었다.

[0087] **도 16**에 나타난 바와 같이, 크로세이박터 아틀란티쿠스 HTCC2559의 단백질 (서열번호: 5)을 제외한 다른 단백질의 경우 다량의 성숙된 단백질을 얻을 수 있었다.

[0088] **시험예 11: 상동성을 갖는 살조활성 단백질의 살조활성 분석**

[0089] 플라보박테리움 존소니애 (*Flavobacterium johnsoniae*) UW101 (ZP_01247095, 서열번호: 4), 크로세이박터 아틀란티쿠스(*Croceibacter atlanticus*) HTCC2559 (ZP_00951344, 서열번호: 5), 리우웬호에키엘라 블란덴시스 (*Leeuwenhoekiella blandensis*) MED217 (ZP_01059780, 서열번호: 6), 코르디 알지시다의 KAOT1_11562 유전자 (서열번호: 7)에서 제조된 단백질의 살조활성을 확인하기 위하여, 실시예 2에서 준비된 코크로디니움 포리크리코이데스 (*Cochlodinium polykrikoides*), 딸라씨오시라 종 (*Thalassiosira* sp.), 헤테로시그마 아카시오 (*Heterosigma akashiwo*), 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*), 알렉산드리움 (*Alexandrium* sp), 캐토시로스 (*Chaetoceros cuvisetus*), 짐노디늄 (*Gymnodium* sp) 배양액에 상기 단백질 (100 μg/mℓ) 50 μℓ를 첨가하였다. 24시간 후에 일괄적으로 루골 요오드 용액 (Lugol's iodine solution, 1%)을 이용하여 상기 배양액을 염색한 다음, 세포의 수를 측정하여, 단백질분해효소가 첨가되지 않은 대조군과 단백질분해효소가 첨가된 실험군 (실험군 1 및 2)의 세포수 및 억제정도를 비교하였으며, 그 결과 코크로디니움 포리크리코이데스, 딸라씨오시라 종 (*Thalassiosira* sp.), 헤테로시그마 아카시오 (*Heterosigma akashiwo*), 스켈레토네마 코스타튬 (*Skeletonema costatum*), 알렉산드리움 (*Alexandrium* sp), 캐토시로스 (*Chaetoceros cuvisetus*), 짐노디늄 (*Gymnodinium* sp) 에 대해서도 효과가 있는 것을 확인하였다.

표 5

[0090] 적조살상단백질의 살상검증

	FJ (ZP_01247095) (서열번호 4)	CRO (ZP_00951344) (서열번호 5)	MED (ZP_01059780) (서열번호 6)	KAOT1_10476 (서열번호 1)	KAOT1_11562 (서열번호 7)
Cochlodinium polykrikoides	*++++*	*++++*	*++++*	*++++*	*++++*
Thalassiosira sp.	++++	++++	++++	++++	++++
Heterosigma akashiwo	*++++*	*++++*	*++++*	*++++*	*++++*
Skeletonema costatum	*++*	*+++*	*++++*	*+*	*+*
Alexandrium sp.	++++	++++	++++	++++	++++
Chaetoceros cuvisetus	*++++*	*++++*	*++++*	*++++*	*++++*
Gymnodinium sp.	++++	++++	++++	++++	++++

억제정도 = ((대조군-실험군)/실험군)×100
+ means <25%
++ means 25-50%
++ means 50-75%
++++ means >75% 억제정도

산업이용 가능성

[0091] 이와 같이, 본 발명의 살조활성 단백질은 적조생물의 생장을 효과적으로 억제하므로, 적조발생 지역에서 적조의 방제에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0092] **도 1**은 살조세균인 코르디아 알지시다 (*Kordia algicida*) OT-1 균주(KCTC 11320BP)의 단백질을 비변성(native)-PAGE (12%)에서 분리한 결과이다.

[0093] **도 2**는 코르디아 알지시다 OT-1 균주(KCTC 11320BP)로부터 분리된 단백질 중, 살조활성을 나타내는 밴드 번호 3 및 10의 단백질을 변성 조건 하에서 SDS-PAGE로 분리한 결과이다.

[0094] **도 3**은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 KAOT1_10476 단백질의 구조를 나타낸 것이다.

[0095] **도 4**는 KAOT1_10476 단백질의 특성을 규명하기 위한 다양한 유전자 구조물 (construct)의 모식도이다.

[0096] **도 5**는 10476_1 내지 10476_9 단백질을 발현시킨 후, 발현 정도를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.

[0097] **도 6**은 10476_1, 및 10476_6 내지 10476_9 단백질을 가용화시키기 위해 리폴딩 (refolding)시킨 결과를 확인한 것이다.

[0098] **도 7**은 10476_1, 및 10476_6 내지 10476_9 단백질의 단백질 분해활성을 확인한 결과이다.

[0099] **도 8**은 10476_8 단백질의 프로세싱 (processing)을 1주일 동안 관찰한 결과이다.

[0100] **도 9** 및 **10**은 온도 및 pH에 따른 10476_7 단백질의 단백질 분해활성을 확인한 결과이다.

[0101] **도 11** 및 **12**는 금속이온 (아연이온 또는 칼슘이온)에 따른 10476_7 단백질의 단백질 분해활성을 확인한 결과이다.

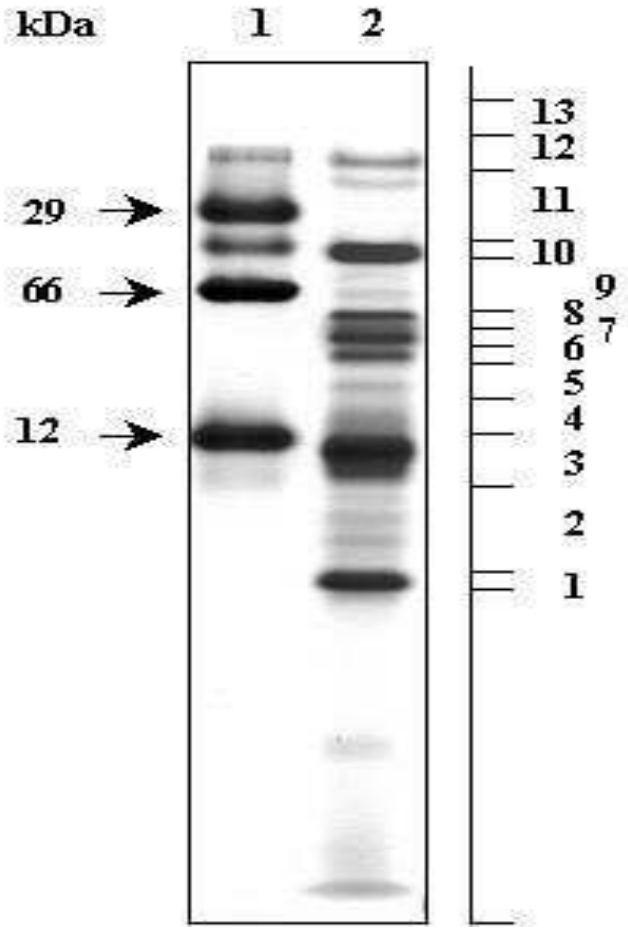
[0102] **도 13** 및 **14**는 KAOT1_10476 단백질과 다양한 해양 미생물 (플라보박테리움 존소니애 (*Flavobacterium johnsoniae*) UW101, 크로세이박터 아틀란티쿠스(*Croceibacter atlanticus*) HTCC2559, 리우웬호에키엘라 블란덴시스 (*Leeuwenhoekiella blandensis*) MED217 및 코르디 알지시다)의 상동성을 비교한 결과이다.

[0103] **도 15**는 KAOT1_10476 단백질과 상동성을 갖는 해양 미생물들의 살조활성 단백질을 발현시키기 위한 유전자를 PCR로 증폭한 결과이다.

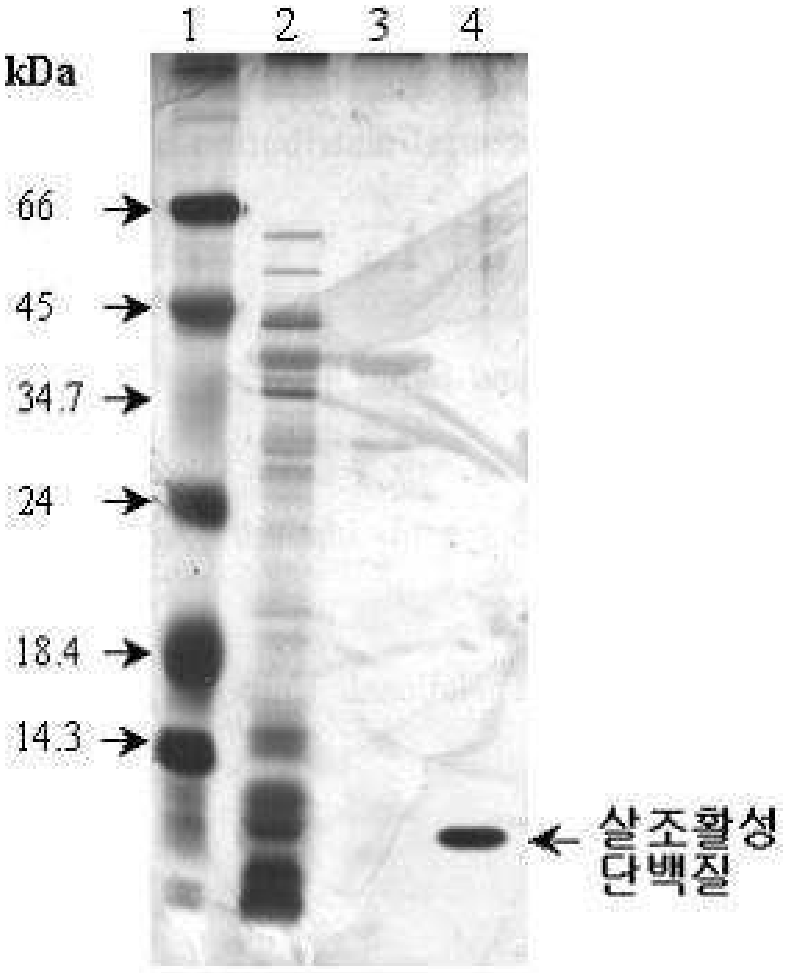
[0104] **도 16**은 KAOT1_10476 단백질과 상동성을 갖는 해양 미생물들의 살조활성 단백질의 발현을 확인한 결과이다.

도면

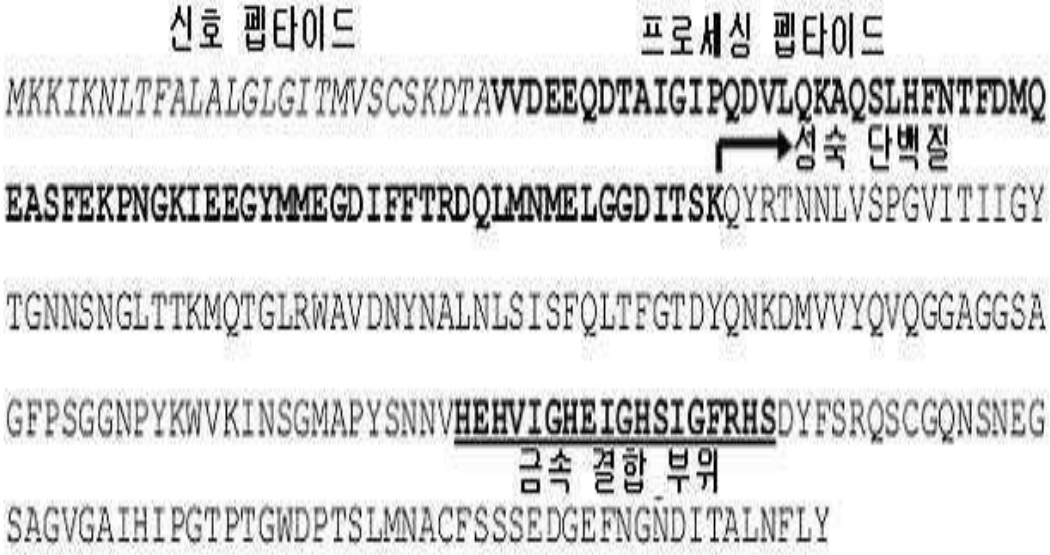
도면1



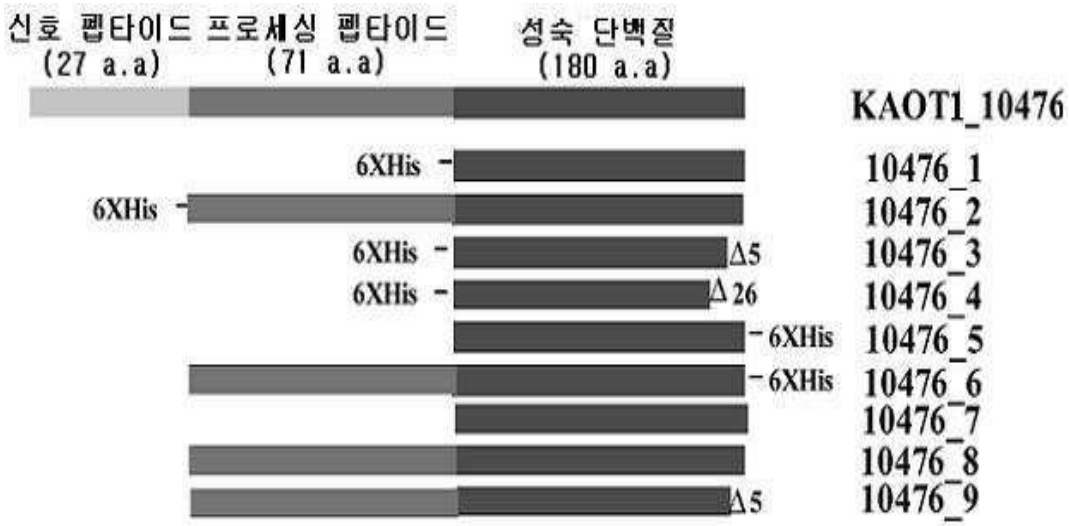
도면2


1
2
3
4
kDa
66
45
34.7
24
18.4
14.3
살조활성
단백질

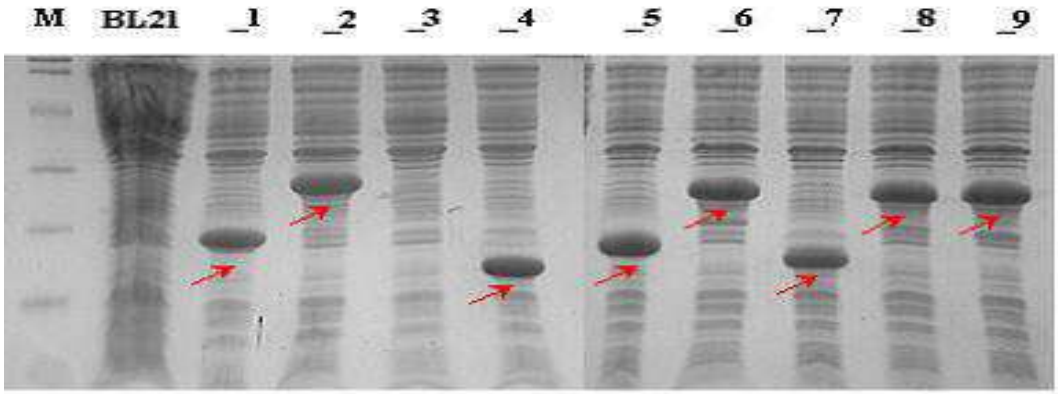
도면3


신호 펩타이드
프로세싱 펩타이드
MKKIKNLTFALALGLGITMVSCSKDTAVVDEEQDTAIGIPQDVLQKAQSLHFNTFDMQ
성숙 단백질
EASFEKPNGKIEEGYMMEGDIFFTRDQLMNMELGGDITSKQYRTNNLVSPGVITIIGY
TGNNSNGLTTKMQTGLRWAVDNYNALNLSISFQLTFGTDYQNKDMVVYQVQGGAGGSA
GFPSGGNPYKWVKINSGMAPYSNNVHEHVIGHEIGHSIGFRHSDYFSRQSCGQNSNEG
금속 결합 부위
SAGVGAIHIPGTPTGWDPTSLMNACFSSSEDGEFNGNDITALNFLY

도면4

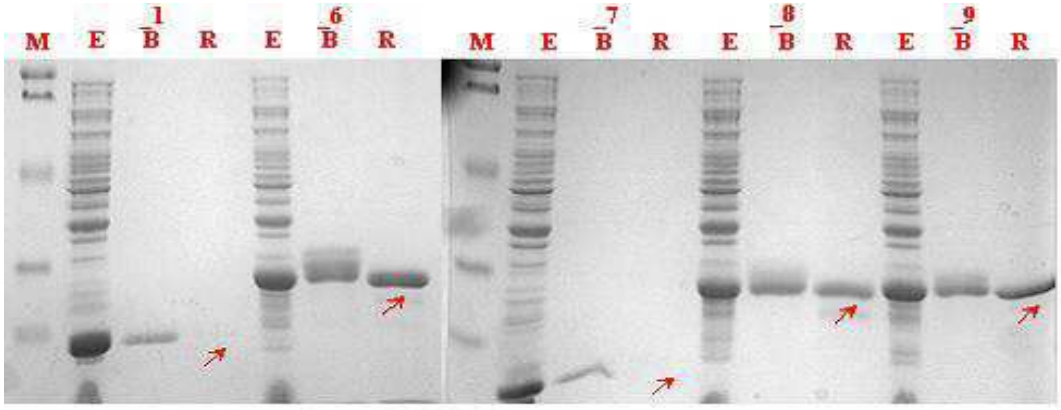


도면5



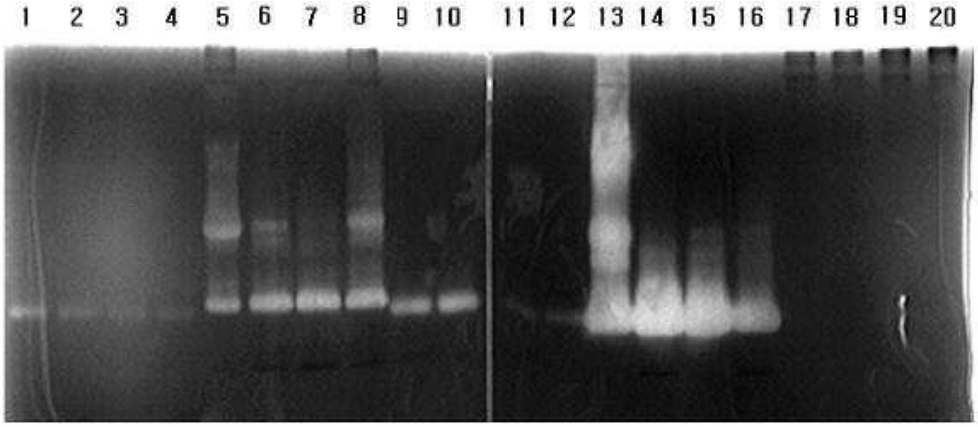
1: 10476_1
2: 10476_2
3: 10476_3
4: 10476_4
5: 10476_5
6: 10476_6
7: 10476_7
8: 10476_8
9: 10476_9

도면6



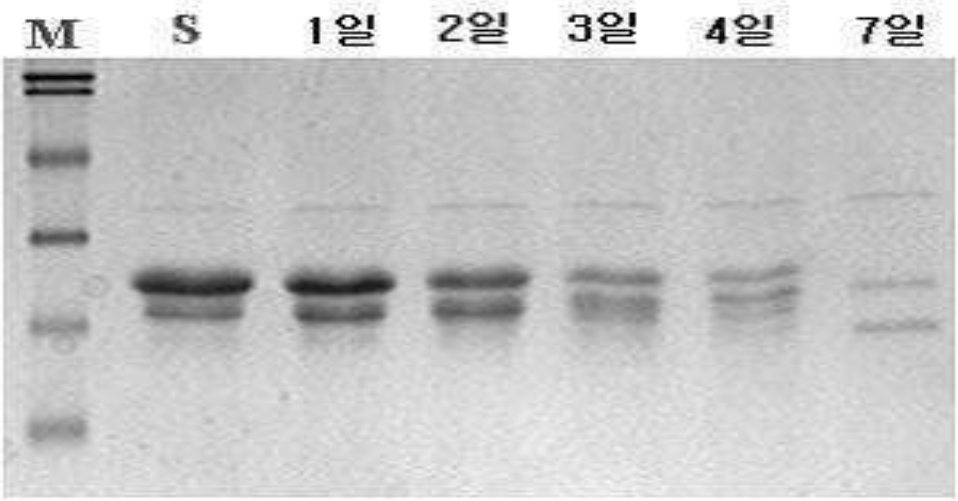
1: 10476_1
6: 10476_6
7: 10476_7
8: 10476_8
9: 10476_9

도면7

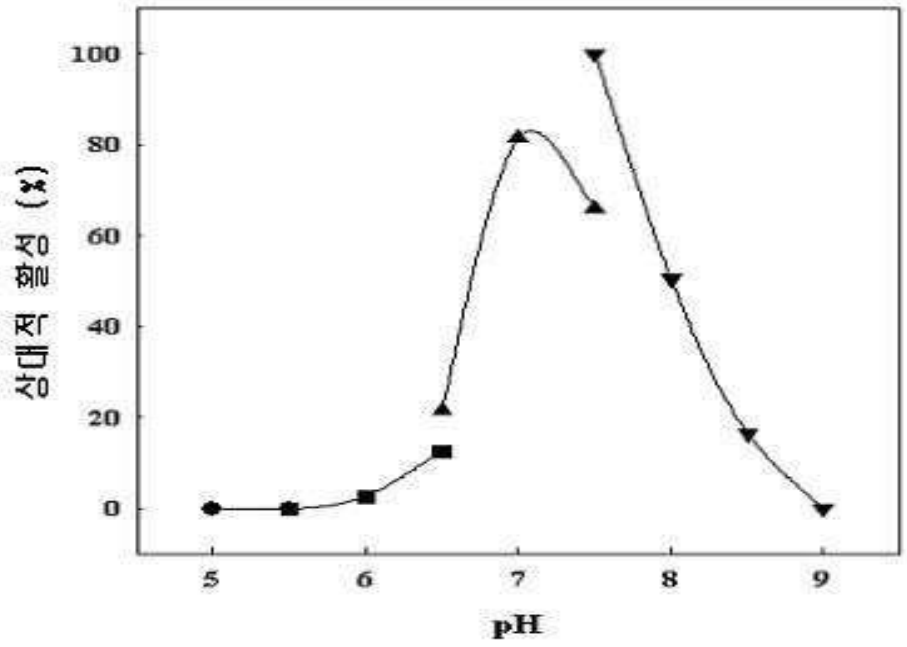


1: 10476_1
2: 10476_1, 20℃에서 12시간 동안 배양
3: 10476_1, 30℃에서 12시간 동안 배양
4: 10476_1, 37℃에서 12시간 동안 배양
5: 10476_6
6: 10476_6, 20℃에서 12시간 동안 배양
7: 10476_6, 30℃에서 12시간 동안 배양
8: 10476_6, 37℃에서 12시간 동안 배양
9: 10476_7
10: 10476_7, 20℃에서 12시간 동안 배양
11: 10476_7, 30℃에서 12시간 동안 배양
12: 10476_7, 37℃에서 12시간 동안 배양
13: 10476_8
14: 10476_8, 20℃에서 12시간 동안 배양
15: 10476_8, 30℃에서 12시간 동안 배양
16: 10476_8, 37℃에서 12시간 동안 배양
17: 10476_9
18: 10476_9, 20℃에서 12시간 동안 배양
19: 10476_9, 30℃에서 12시간 동안 배양
20: 10476_9, 37℃에서 12시간 동안 배양

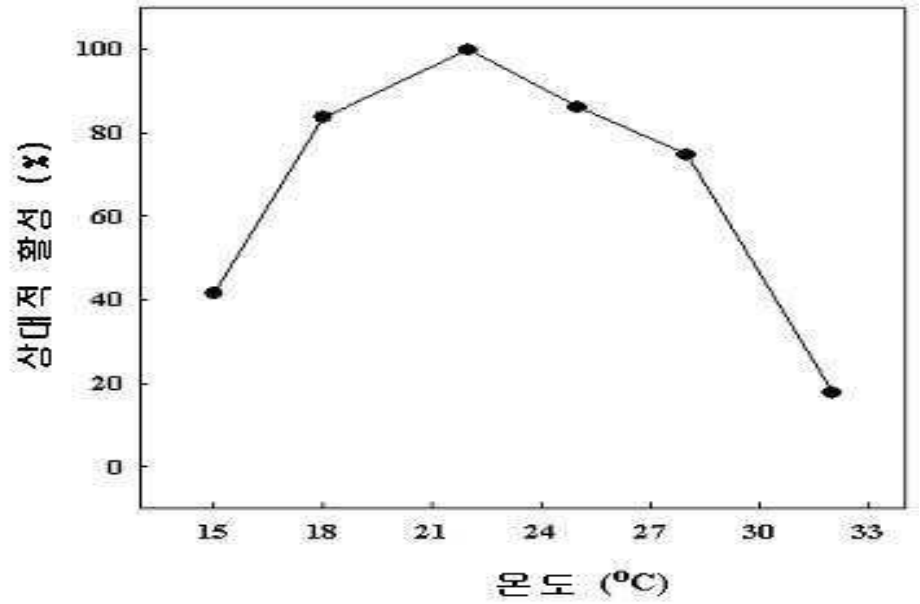
도면8



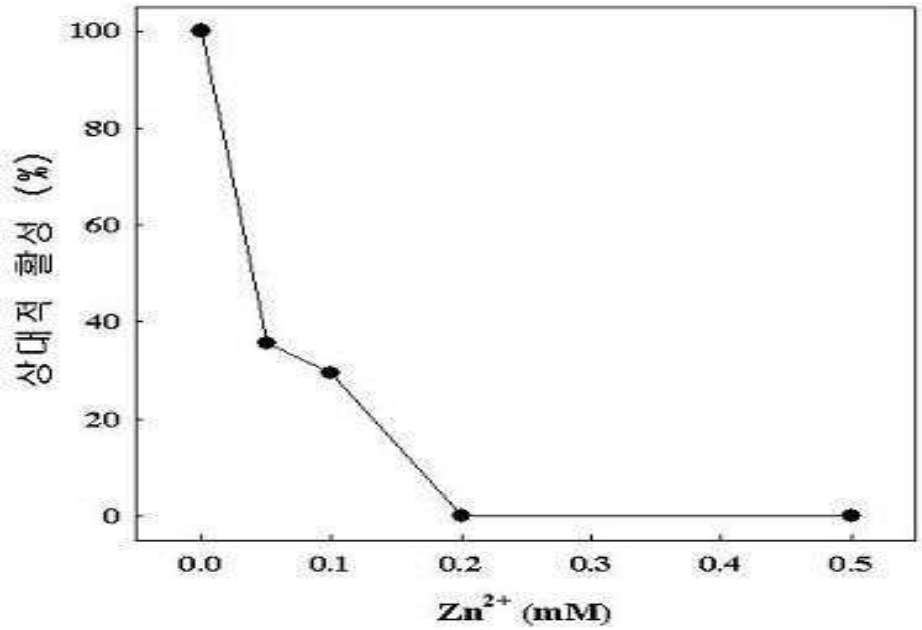
도면9



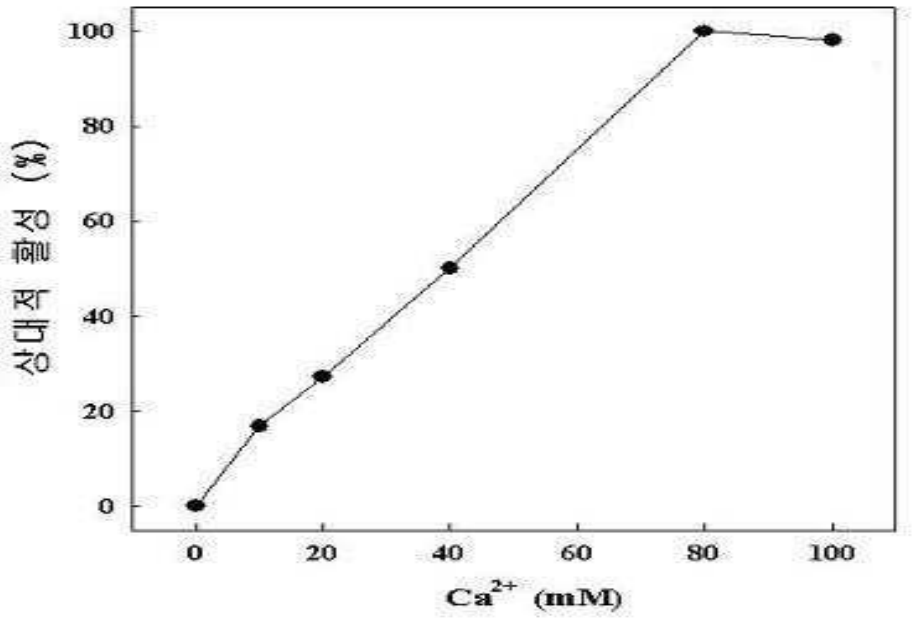
도면10


100
80
60
40
20
0
상대적 활성 (%)
15
18
21
24
27
30
33
온도 (°C)

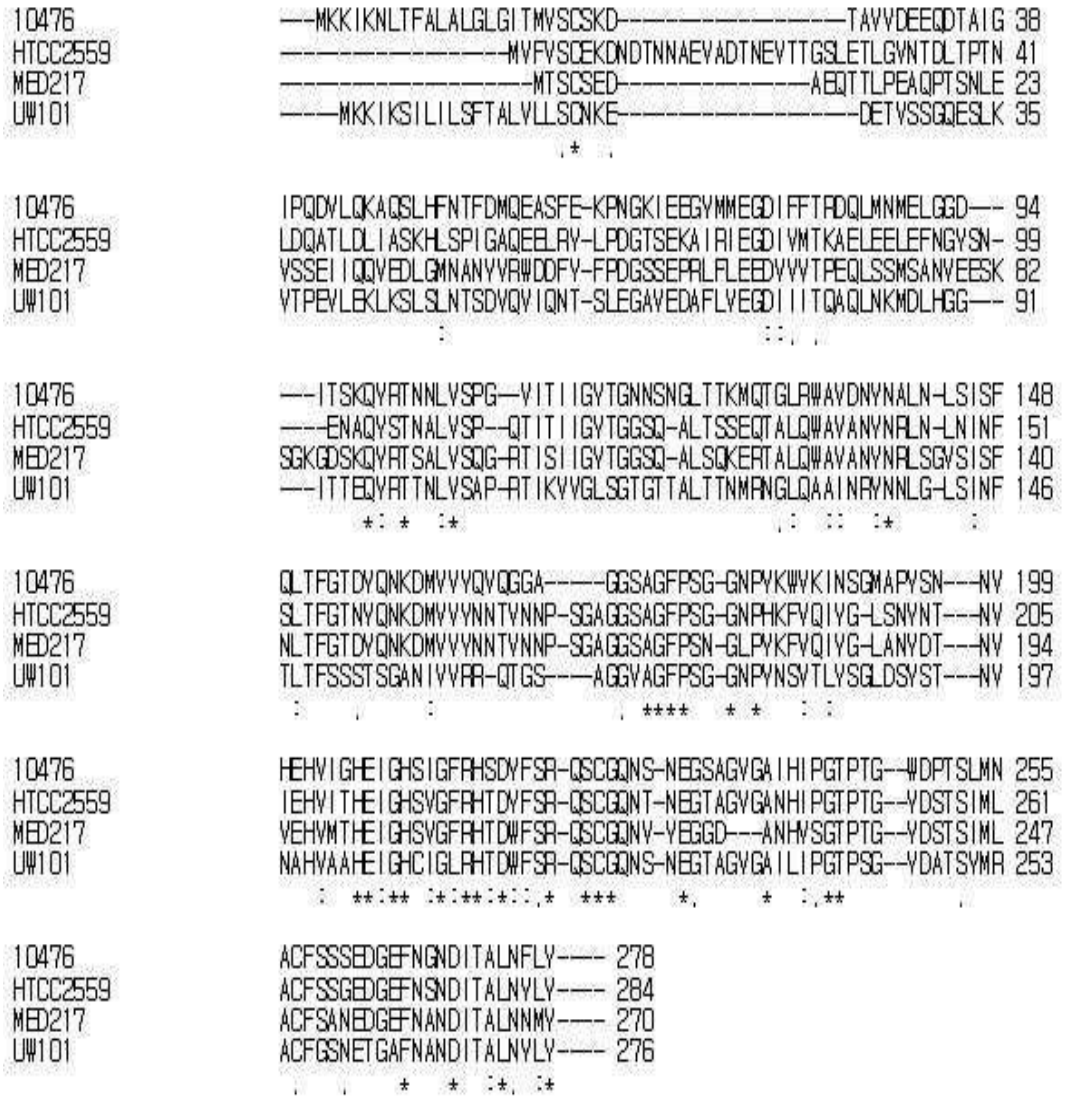
도면11


100
80
60
40
20
0
상대적 활성 (%)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Zn2+ (mM)

도면12



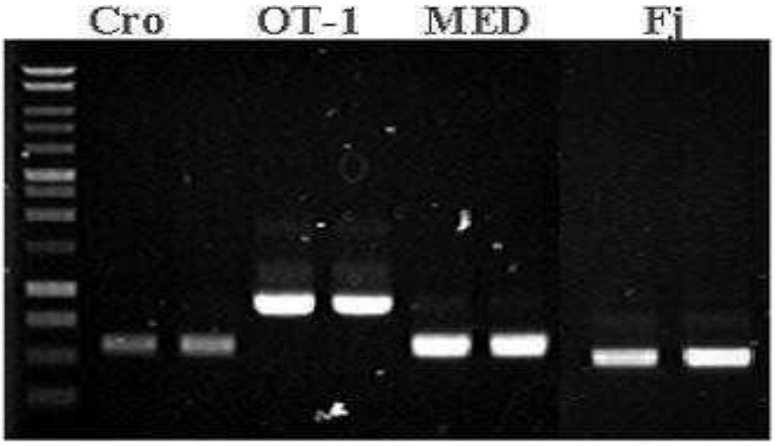
도면13


10476 ---MKKIKNLTFALALGLGITMVSCSKD----------TAVVDEEQDTAIG 38
HTCC2559 ----------MVFVSCEKDNDTNNAEVADTNEVTTGSLETLGVNTDLTPTN 41
MED217 ----------MTSCSED----------AEQTTLPEAQPTSNLE 23
UW101 ----MKKIKSILILSFTALVLLSCNKE----------DETVSSGQESLK 35
10476 IPQDVLQKAQSLHFNTFDMQEASFE-KPNGKIEEGYMMEGDIFFTPDQLMNMELGGD--- 94
HTCC2559 LDQATLDLIASKHLSPIGAQEELRY-LPDGTSEKAIRIEGDIVMTKAELEELEFNGYSN- 99
MED217 VSSEIIQQVEDLGMNANYVRWDDFY-FPDGSSEPRLFLEEDVVVTPEQLSSMSANVEESK 82
UW101 VTPEVLEKLKSLSLNTSDVQVIQNT-SLEGAVEDAFLVEGDIIITQAQLNKMDLHGG--- 91
10476 ---ITSKQYRTNNLVSPG--VITIIGVTGNNSNGLTTKMQTGLRWAVDNYNALN-LSISF 148
HTCC2559 ----ENAQYSTNALVSP--QTITIIGVTGGSQ-ALTSSEQTALQWAVANYNRLN-LNINF 151
MED217 SGKGDSKQYRTSALVSQG-RTISIIGVTGGSQ-ALSQKERTALQWAVANYNRLSGVSISF 140
UW101 ---ITTEQYRTTNLVSAP-RTIKVVGLSGTGTTALTTNMRNGLQAAINRYNNLG-LSINF 146
10476 QLTFGTDYQNKDMVVYQVQGGA-----GGSAGFPSG-GNPYKWVKINSGMAPYSN---NV 199
HTCC2559 SLTFGTNYQNKDMVVYNNTVNNP-SGAGGSAGFPSG-GNPHKFVQIYG-LSNYNT---NV 205
MED217 NLTFGTDYQNKDMVVYNNTVNNP-SGAGGSAGFPSN-GLPYKFVQIYG-LANYDT---NV 194
UW101 TLTFSSSTSGANIVYRR-QTGS----AGGVAGFPSG-GNPYNSVTLYSGLDSYST---NV 197
10476 HEHVIGHEIGHSIGFRHSDYFSR-QSCGQNS-NEGSAGVGAIHIPGTPTG--WDPTSLMN 255
HTCC2559 IEHVITHEIGHSVGFRHTDYFSR-QSCGQNT-NEGTAGVGANHIPGTPTG--YDSTSIML 261
MED217 VEHVMTHEIGHSVGFRHTDWFSR-QSCGQNV-YEGGD---ANHVSGTPTG--YDSTSIML 247
UW101 NAHVAAHEIGHCIGLRHTDWFSR-QSCGQNS-NEGTAGVGAILIPGTPSG--YDATSVMR 253
10476 ACFSSSEDGEFNGNDITALNFLY---- 278
HTCC2559 ACFSSGEDGEFNSNDITALNYLY---- 284
MED217 ACFSANEDGEFNANDITALNNMY---- 270
UW101 ACFGSNETGAFNANDITALNYLY---- 276

도면14

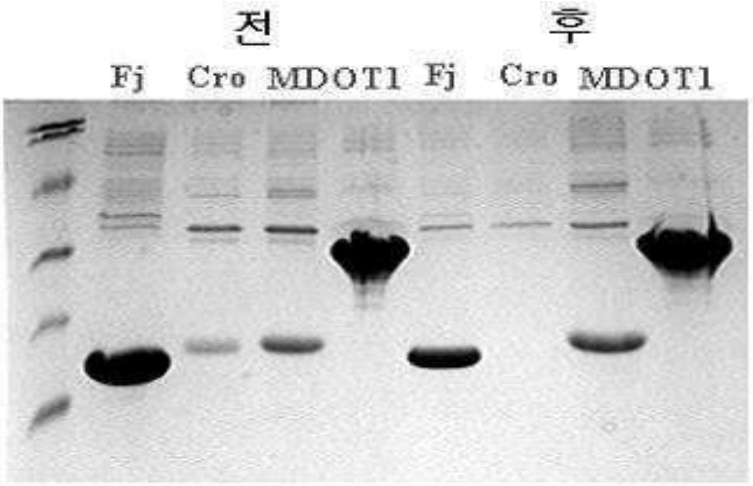
10476 MKKIKNLTFALALGLGITMVSCSKDTAVVDEEQDTAIGIPQDVLQKAQSLHFNTFDMQEA 60
11562 MKRNFKIQMLYVLLTMLLLAGCQNDTEEELVEEATTAVERVDVKWLAPDDHPVVQLLYSR 60
10476 SFEK-PNGKIEEGYMMEGDIFFTRDQ-LMNMELGGDITSKQVRTNNLVSPGVITIIGVTG 118
11562 GVERGTIVETDEHFLAPPDLLYSKDINDYDLSDNGSNAEQAYNTGKLVSLNRMRINVFLD 120
10476 NNSNGLTTKMQTGLRWAVDNYNALNLSISFQLTFGTDYQNKDMVYYQVQGGAG---GSAG 175
11562 N---SIGTDLQTQSVNAMNELNGINNCALFFVRVFNANQAQITIRSDFGAESNNVLGRAG 177
10476 FPSGQNPVKWVKINSG-MAPVSNNVHEHVIGHEIGHSIGFRHSDVFSRQSCGQNSNEGSA 234
11562 FPSNGRPFDTVTLNVDRLDDFGADIRRNTIIHELGHCVGLRHTDWQANRERSAVNIPGTS 237
10476 G--VGAIHIP---GTPTGWDPTSLMNACFS-------SSEDGEFNGNDITALNFLY- 278
11562 ANDTGSIMWHTINGGTPFTNGDLTAFRALFPRALRIDVYNEIDDVDYSG-EIYVLDNVFV 296
10476 ----------
11562 DVFTDGSVSTQTTLNRNVNVSVRINVQEVNHTSGTVYVSRNRTLTAGNNRMYIDDEEEEC 356
10476 ----------
11562 SPVQGETCTRQDLEIRLATSIL 378

도면15



Cro: 크로세이박터 아틀란티쿠스 HTCC2559 (ZP_00951344)
OT-1: 코르디 알지시다의 KAOT1_11562
MED: 리우웬호에키엘라 블란덴시스 MED217 (ZP_01059780)
Fj: 플라보박테리움 존소니애 UW101 (ZP_01247095)

도면16



Cro: 크로세이박터 아틀란티쿠스 HTCC2559 (ZP_00951344)
OT-1: 코르디 알지시다의 KAOT1_11562
MED: 리우웬호에키엘라 블란덴시스 MED217 (ZP_01059780)
Fj: 플라보박테리움 존소니애 UW101 (ZP_01247095)

서 열 목 록

<110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

<120> PROTEASE HAVING ALGICIDAL ACTIVITY, GENE ENCODING THE SAME AND ALGICIDAL FORMULATION COMPRISING THE SAME

<130> F

<160> 29

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 278
<212> PRT
<213> KAOT1_10476 of Kordia algicida OT-1

<400> 1

```
Met Lys Lys Ile Lys Asn Leu Thr Phe Ala Leu Ala Leu Gly Leu Gly
  1               5                  10                  15

Ile Thr Met Val Ser Cys Ser Lys Asp Thr Ala Val Val Asp Glu Glu
             20                  25                  30

Gln Asp Thr Ala Ile Gly Ile Pro Gln Asp Val Leu Gln Lys Ala Gln
         35                  40                  45

Ser Leu His Phe Asn Thr Phe Asp Met Gln Glu Ala Ser Phe Glu Lys
     50                  55                  60

Pro Asn Gly Lys Ile Glu Glu Gly Tyr Met Met Glu Gly Asp Ile Phe
 65                  70                  75                  80

Phe Thr Arg Asp Gln Leu Met Asn Met Glu Leu Gly Gly Asp Ile Thr
                 85                  90                  95

Ser Lys Gln Tyr Arg Thr Asn Asn Leu Val Ser Pro Gly Val Ile Thr
            100                 105                 110

Ile Ile Gly Tyr Thr Gly Asn Asn Ser Asn Gly Leu Thr Thr Lys Met
        115                 120                 125

Gln Thr Gly Leu Arg Trp Ala Val Asp Asn Tyr Asn Ala Leu Asn Leu
    130                 135                 140

Ser Ile Ser Phe Gln Leu Thr Phe Gly Thr Asp Tyr Gln Asn Lys Asp
145                 150                 155                 160
```

Met Val Val Tyr Gln Val Gln Gly Gly Ala Gly Gly Ser Ala Gly Phe
165 170 175

Pro Ser Gly Gly Asn Pro Tyr Lys Trp Val Lys Ile Asn Ser Gly Met
180 185 190

Ala Pro Tyr Ser Asn Asn Val His Glu His Val Ile Gly His Glu Ile
195 200 205

Gly His Ser Ile Gly Phe Arg His Ser Asp Tyr Phe Ser Arg Gln Ser
210 215 220

Cys Gly Gln Asn Ser Asn Glu Gly Ser Ala Gly Val Gly Ala Ile His
225 230 235 240

Ile Pro Gly Thr Pro Thr Gly Trp Asp Pro Thr Ser Leu Met Asn Ala
245 250 255

Cys Phe Ser Ser Ser Glu Asp Gly Glu Phe Asn Gly Asn Asp Ile Thr
260 265 270

Ala Leu Asn Phe Leu Tyr
275

<210> 2
<211> 834
<212> DNA
<213> KAOT1_10476 of Kordia algicida OT-1

<400> 2
atgaaaaaaa ttaaaaactt aacctttgcg ttggcattag ggttagggat cactatggta 60

tcttgtagta aagacactgc cgtagtagac gaggagcaag acacagctat cggaatccca 120

caagacgtac ttcaaaaagc acaatcactt cacttcaaca cattcgatat gcaagaagca 180

tctttcgaaa agccaaatgg taaaatcgaa gaaggatata tgatggaagg tgatatcttc 240

tttacacgtg accaattaat gaacatggaa ctcggtggag atattacaag caaacaatat 300

cgtacaaaca atttagtttc tccaggagta attacaatca ttggatatac aggaaataac 360

tctaatggat taacaactaa aatgcaaact ggacttagat gggcagtaga taactataat 420

gcattaaacc taagtattag tttccaatta acatttggta ctgactatca aaataaagat 480

atggtagtat atcaagtaca aggtggagca ggtggatctg caggtttccc ttcaggagga 540

aatccataca agtgggttaa aattaactca ggtatggctc cttacagtaa caatgtacat 600

gaacatgtaa ttggacatga aataggacac tcgattggat tccgtcattc agactacttc 660

agcagacaaa gttgtggaca aaattcaaat gaaggtagtg caggagttgg agcaatccat 720

attccaggaa cacctacagg ttgggatcca acatctttaa tgaatgcttg tttcagttct 780

tcagaagatg gagaatttaa cggaaacgac attactgctt taaacttctt atac 834

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> N-terminus of KAOT_1 10476

<400> 3
Gln Tyr Val Thr Asn Asn Leu Val Ser Pro Gly Val Ile Thr Ile Ile
1 5 10 15

Gly Tyr Thr Phe
20

<210> 4
<211> 276
<212> PRT
<213> Flavobacterium johnsoniae UW101 (ZP_01247095)

<400> 4
Met Lys Lys Ile Lys Ser Ile Leu Ile Leu Ser Phe Thr Ala Leu Val
1 5 10 15

Leu Leu Ser Cys Asn Lys Glu Asp Glu Thr Val Ser Ser Gly Gln Glu
20 25 30

Ser Leu Lys Val Thr Pro Glu Val Leu Glu Lys Leu Lys Ser Leu Ser

35 40 45

Leu Asn Thr Ser Asp Val Gln Val Ile Gln Asn Thr Ser Leu Glu Gly
50 55 60

Ala Val Glu Asp Ala Phe Leu Val Glu Gly Asp Ile Ile Ile Thr Gln
65 70 75 80

Ala Gln Leu Asn Lys Met Asp Leu His Gly Gly Ile Thr Thr Glu Gln
85 90 95

Tyr Arg Thr Thr Asn Leu Val Ser Ala Pro Arg Thr Ile Lys Val Val
100 105 110

Gly Leu Ser Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Thr Thr Asn Met Arg Asn
115 120 125

Gly Leu Gln Ala Ala Ile Asn Arg Tyr Asn Asn Leu Gly Leu Ser Ile
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Phe Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ala Asn Ile Val
145 150 155 160

Val Arg Arg Gln Thr Gly Ser Ala Gly Gly Val Ala Gly Phe Pro Ser
165 170 175

Gly Gly Asn Pro Tyr Asn Ser Val Thr Leu Tyr Ser Gly Leu Asp Ser
180 185 190

Tyr Ser Thr Asn Val Asn Ala His Val Ala Ala His Glu Ile Gly His
195 200 205

Cys Ile Gly Leu Arg His Thr Asp Trp Phe Ser Arg Gln Ser Cys Gly
210 215 220

Gln Asn Ser Asn Glu Gly Thr Ala Gly Val Gly Ala Ile Leu Ile Pro
225 230 235 240

Gly Thr Pro Ser Gly Tyr Asp Ala Thr Ser Tyr Met Arg Ala Cys Phe
245 250 255

Gly Ser Asn Glu Thr Gly Ala Phe Asn Ala Asn Asp Ile Thr Ala Leu
260 265 270

Asn Tyr Leu Tyr
275

<210> 5
<211> 284
<212> PRT
<213> Croceibacter atlanticus HTCC2559 (ZP_00951344)

<400> 5
Met Val Phe Val Ser Cys Glu Lys Asp Asn Asp Thr Asn Asn Ala Glu
1 5 10 15

Val Ala Asp Thr Asn Glu Val Thr Thr Gly Ser Leu Glu Thr Leu Gly
20 25 30

Val Asn Thr Asp Leu Thr Pro Thr Asn Leu Asp Gln Ala Thr Leu Asp
35 40 45

Leu Ile Ala Ser Lys His Leu Ser Pro Ile Gly Ala Gln Glu Glu Leu
50 55 60

Arg Tyr Leu Pro Asp Gly Thr Ser Glu Lys Ala Ile Arg Ile Glu Gly
65 70 75 80

Asp Ile Val Met Thr Lys Ala Glu Leu Glu Glu Leu Glu Phe Asn Gly
85 90 95

Tyr Ser Asn Glu Asn Ala Gln Tyr Ser Thr Asn Ala Leu Val Ser Pro
100 105 110

Gln Thr Ile Thr Ile Ile Gly Tyr Thr Gly Gly Ser Gln Ala Leu Thr
115 120 125

Ser Ser Glu Gln Thr Ala Leu Gln Trp Ala Val Ala Asn Tyr Asn Arg
130 135 140

Leu Asn Leu Asn Ile Asn Phe Ser Leu Thr Phe Gly Thr Asn Tyr Gln
145 150 155 160

Asn Lys Asp Met Val Val Tyr Asn Asn Thr Val Asn Asn Pro Ser Gly
165 170 175

Ala Gly Gly Ser Ala Gly Phe Pro Ser Gly Gly Asn Pro His Lys Phe

180 185 190

Val Gln Ile Tyr Gly Leu Ser Asn Tyr Asn Thr Asn Val Ile Glu His
195 200 205

Val Ile Thr His Glu Ile Gly His Ser Val Gly Phe Arg His Thr Asp
210 215 220

Tyr Phe Ser Arg Gln Ser Cys Gly Gln Asn Thr Asn Glu Gly Thr Ala
225 230 235 240

Gly Val Gly Ala Asn His Ile Pro Gly Thr Pro Thr Gly Tyr Asp Ser
245 250 255

Thr Ser Ile Met Leu Ala Cys Phe Ser Ser Gly Glu Asp Gly Glu Phe
260 265 270

Asn Ser Asn Asp Ile Thr Ala Leu Asn Tyr Leu Tyr
275 280

<210> 6
<211> 270
<212> PRT
<213> Leeuwenhoekiella blandensis MED217 (ZP_01059780)

<400> 6
Met Thr Ser Cys Ser Glu Asp Ala Glu Gln Thr Thr Leu Pro Glu Ala
1 5 10 15

Gln Pro Thr Ser Asn Leu Glu Val Ser Ser Glu Ile Ile Gln Gln Val
20 25 30

Glu Asp Leu Gly Met Asn Ala Asn Tyr Val Arg Trp Asp Asp Phe Tyr
35 40 45

Phe Pro Asp Gly Ser Ser Glu Pro Arg Leu Phe Leu Glu Glu Asp Val
50 55 60

Val Val Thr Pro Glu Gln Leu Ser Ser Met Ser Ala Asn Val Glu Glu
65 70 75 80

Ser Lys Ser Gly Lys Gly Asp Ser Lys Gln Tyr Arg Thr Ser Ala Leu
85 90 95

```
Val Ser Gln Gly Arg Thr Ile Ser Ile Ile Gly Tyr Thr Gly Gly Ser
            100                 105                 110

Gln Ala Leu Ser Gln Lys Glu Arg Thr Ala Leu Gln Trp Ala Val Ala
        115                 120                 125

Asn Tyr Asn Arg Leu Ser Gly Val Ser Ile Ser Phe Asn Leu Thr Phe
    130                 135                 140

Gly Thr Asp Tyr Gln Asn Lys Asp Met Val Val Tyr Asn Asn Thr Val
145                 150                 155                 160

Asn Asn Pro Ser Gly Ala Gly Gly Ser Ala Gly Phe Pro Ser Asn Gly
                165                 170                 175

Leu Pro Tyr Lys Phe Val Gln Ile Tyr Gly Leu Ala Asn Tyr Asp Thr
            180                 185                 190

Asn Val Val Glu His Val Met Thr His Glu Ile Gly His Ser Val Gly
        195                 200                 205

Phe Arg His Thr Asp Trp Phe Ser Arg Gln Ser Cys Gly Gln Asn Val
    210                 215                 220

Tyr Glu Gly Gly Asp Ala Asn His Val Ser Gly Thr Pro Thr Gly Tyr
225                 230                 235                 240

Asp Ser Thr Ser Ile Met Leu Ala Cys Phe Ser Ala Asn Glu Asp Gly
                245                 250                 255

Glu Phe Asn Ala Asn Asp Ile Thr Ala Leu Asn Asn Met Tyr
            260                 265                 270
```

<210> 7
<211> 378
<212> PRT
<213> Kordia algicida KAOT1_11562

<400> 7

```
Met Lys Arg Asn Phe Lys Ile Gln Met Leu Tyr Val Leu Leu Thr Met
  1               5                  10                  15
```

```
Leu Leu Leu Ala Gly Cys Gln Asn Asp Thr Glu Glu Glu Leu Val Glu
             20                  25                  30

Glu Ala Thr Thr Ala Val Glu Arg Val Asp Val Lys Trp Leu Ala Pro
         35                  40                  45

Asp Asp His Pro Val Val Gln Leu Leu Tyr Ser Arg Gly Tyr Glu Arg
     50                  55                  60

Gly Thr Ile Tyr Glu Thr Asp Glu His Phe Leu Ala Pro Pro Asp Leu
 65                  70                  75                  80

Leu Tyr Ser Lys Asp Ile Asn Asp Tyr Asp Leu Ser Asp Asn Gly Ser
                 85                  90                  95

Asn Ala Glu Gln Ala Tyr Asn Thr Gly Lys Leu Val Ser Leu Asn Arg
            100                 105                 110

Met Arg Ile Asn Val Phe Leu Asp Asn Ser Ile Gly Thr Asp Leu Gln
        115                 120                 125

Thr Gln Ser Val Asn Ala Met Asn Glu Leu Asn Gly Ile Asn Asn Cys
    130                 135                 140

Ala Leu Phe Phe Val Arg Val Phe Asn Ala Asn Gln Ala Gln Ile Thr
145                 150                 155                 160

Ile Arg Ser Asp Phe Gly Ala Glu Ser Asn Asn Val Leu Gly Arg Ala
                165                 170                 175

Gly Phe Pro Ser Asn Gly Arg Pro Phe Asp Thr Val Thr Leu Asn Val
            180                 185                 190

Asp Arg Leu Asp Asp Phe Gly Ala Asp Ile Arg Arg Asn Thr Ile Ile
        195                 200                 205

His Glu Leu Gly His Cys Val Gly Leu Arg His Thr Asp Trp Gln Ala
    210                 215                 220

Asn Arg Glu Arg Ser Ala Val Asn Ile Pro Gly Thr Ser Ala Asn Asp
225                 230                 235                 240

Thr Gly Ser Ile Met Trp His Thr Ile Asn Gly Gly Thr Pro Phe Thr
                245                 250                 255
```

Asn Gly Asp Leu Thr Ala Phe Arg Ala Leu Phe Pro Arg Ala Leu Arg
260 265 270

Ile Asp Val Val Asn Glu Ile Asp Asp Tyr Asp Tyr Ser Gly Glu Ile
275 280 285

Tyr Val Leu Asp Asn Val Phe Val Asp Val Phe Thr Asp Gly Ser Tyr
290 295 300

Ser Thr Gln Thr Thr Leu Asn Arg Asn Val Asn Val Ser Tyr Arg Ile
305 310 315 320

Asn Val Gln Glu Tyr Asn His Thr Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Ser Arg
325 330 335

Asn Arg Thr Leu Thr Ala Gly Asn Asn Arg Tyr Tyr Ile Asp Asp Glu
340 345 350

Glu Glu Glu Cys Ser Pro Tyr Gln Gly Glu Thr Cys Thr Arg Gln Asp
355 360 365

Leu Glu Ile Arg Leu Ala Thr Ser Ile Leu
370 375

<210> 8
<211> 828
<212> DNA
<213> Flavobacterium johnsoniae UW101 (ZP_01247095)

<400> 8
atgaaaaaaa ttaaatcaat cctgattctg tcatttacag cattagtact attgtcttgt 60

aacaaagaag atgagactgt atcatctggt caagagtctt taaaagtaac accagaggtg 120

ttggaaaaac ttaaatcact ttctttgaac acctcagatg tgcaggtgat ccaaaatact 180

agtttagaag gtgctgttga agacgcgttc cttgtagaag gggatattat catcacgcag 240

gcacaattaa acaaaatgga tcttcacgga ggtattacaa cagaacaata ccgtactact 300

aatttagtat ctgctccaag aacgatcaaa gttgttggtt tatcaggaac tggtacaaca 360

gccctgacta ccaatatgcg taacggactg caggctgcta taaacagata caataattta 420

ggattatcta taaactttac tttgactttt agttcaagta cttcaggcgc aaacattgta 480

gtgcggagac aaaccggatc tgccggcgga gtagctggtt tcccttcagg aggaaatcca 540

tataattcag ttaccttata ttcaggatta gattcttatt caacaaatgt aaacgcacac 600

gttgcggcac atgaaatagg acattgtatt ggtctgcgtc atacagactg gttcagccgt 660

caaagctgcg ggcagaattc aaatgaagga actgctggtg taggagcaat tcttattccg 720

ggaacacctt ctggatatga tgctacttct tacatgagag cgtgtttcgg ttcaaacgaa 780

accggtgctt tcaatgctaa tgatattaca gcattgaact atttatat 828

<210> 9
<211> 852
<212> DNA
<213> Croceibacter atlanticus HTCC2559 (ZP_00951344)

<400> 9
atggtattcg tttcttgtga gaaagataat gatacaaaca acgcagaggt tgcagacact 60

aatgaagtta caacaggttc tcttgaaact ttaggtgtta atacagacct taccccaaca 120

aatttagatc aagctacttt agatttaatt gcttctaaac atcttagtcc tatcggagct 180

caagaagagt taagatattt accagacggt acatcagaaa aagctatacg tatagaaggt 240

gatatcgtaa tgactaaagc tgaacttgaa gagttggagt ttaatggtta ttcaaatgaa 300

aatgctcaat atagtactaa cgcattagtt agtcctcaaa caattacaat tattggttat 360

actggtggaa gccaggcgtt aactagtagc gagcaaactg cattacaatg ggcagttgca 420

aactataata gattaaacct taacatcaat ttctctttaa cttttggtac aaactaccaa 480

aacaaagata tggttgttta caacaatact gtaaataacc caagtggtgc aggaggatct 540

gcaggtttcc caagtggagg aaacccacat aaatttgtac agatttatgg attaagtaac 600

tataacacaa atgtaattga gcacgttatt actcacgaaa taggacactc tgtaggattc 660

cgtcacacag attactttag ccgtcagagt tgtggtcaaa atacaaacga aggaactgca 720

ggagttggtg ctaaccacat cccaggaact ccaacaggat atgattctac gtctattatg 780

ttagcttgtt ttagcagtgg tgaagatgga gagtttaaca gtaatgatat tactgcttta 840

aactaccttt at 852

<210> 10
<211> 810
<212> DNA
<213> Leeuwenhoekiella blandensis MED217 (ZP_01059780)

<400> 10
atgacctctt gttcagaaga tgctgagcaa actacgttgc cagaagcaca acctacttcc 60

aaccttgagg tttcttcaga aattatccag caagttgaag atttaggcat gaacgctaat 120

tatgtgcgtt gggatgattt ttattttcct gatggttctt ctgaacctcg tctatttta 180

gaagaagatg ttgtcgtaac tcctgaacaa ttatcctcaa tgtccgctaa cgttgaagaa 240

tcaaaatcag gaaaaggtga ttctaaacaa tatcgcactt ctgctttggt aagtcaggga 300

agaacgattt ctatcatcgg ttataccggc ggtagtcagg cgctaagcca aaaagagcgt 360

accgccttac aatgggctgt tgcaaattac aatcggttaa gcggtgtaag catcagcttc 420

aatttgacat ttggtaccga ctatcaaaac aaagacatgg tagtttacaa caacacggta 480

aataacccaa gtggcgcagg tggtagtgcc ggtttcccga gtaatggact tccttataaa 540

tttgttcaga tctatgggct cgctaattac gacaccaatg ttgttgaaca cgtaatgacg 600

cacgagatag gtcattcggt tggatttaga cacacagatt ggtttagtag acaaagctgt 660

ggacagaacg tttatgaagg tggtgacgca aatcacgttt cgggaacccc aacaggttac 720

gactcgactt caattatgct agcttgcttt agtgccaatg aagatggcga atttaatgcc 780

aatgatatta ccgcattaaa caatatgtac 810

<210> 11
<211> 1134
<212> DNA
<213> Kordia algicida KAOT1_11562

<400> 11
atgaaaagaa attttaaaat ccaaatgctg tatgttttgt tgacaatgct cctgcttgca 60

ggttgtcaaa acgatacgga agaagaatta gtagaagaag caacaactgc tgtagaacgt 120

gttgatgtaa aatggcttgc accagacgat catcctgtgg tacaattatt atacagcaga 180

ggttatgaac gaggaacaat ctatgaaact gatgagcatt ttttagcgcc accagattta 240

ttgtacagta aagatatcaa cgattatgac ctatctgaca atggtagcaa tgccgaacaa 300

gcctacaaca cagggaaatt agtatctcta aacagaatgc gtatcaatgt gtttttagac 360

aactctattg ggacagattt gcaaacacaa tccgtaaatg caatgaatga acttaacgga 420

atcaacaatt gtgctttatt ctttgtacgt gttttcaatg ccaatcaggc acaaattacg 480

atacgaagtg actttggagc agaatccaat aatgttttag gtcgtgcagg ttttccatct 540

aacggacgtc catttgatac agtgacccta aacgttgatc gtttggatga cttcggagct 600

gacattcgta gaaacaccat tattcatgaa cttggtcatt gtgtcggatt gcgccataca 660

gattggcaag ccaacagaga acgtagtgct gtaaacattc ctggtacaag tgccaatgat 720

acaggatcaa tcatgtggca taccatcaat ggaggaacac cttttacaaa cggagattta 780

actgctttta gagccttatt tccacgagct ttgcgcatag atgttgtcaa tgaaattgac 840

gattatgatt acagtggtga aatttatgtt ttagacaatg tatttgtcga tgtctttacc 900

gatggaagct acagtacgca aacaacgctt aaccgaaatg taaacgtaag ttaccgtatt 960

aacgtacaag aatacaatca cacctcagga acttattatt acagtcgaaa tcgaacttta 1020

acggctggta ataatcgtta ttatattgat gatgaggaag aagaatgttc gccataccaa 1080

ggagaaacct gtacacgaca agaccttgaa atcagattgg caacttcaat acta 1134

<210> 12
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT1m_t

<400> 12
cgacccggca tatgcaatat cgtacaaaca atttagtttc 40

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT1m_bc

<400> 13
ctccacatct cgagctagta taagaagttt aaagcag 37

<210> 14
<211> 39

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT1m_bH

<400> 14
ctccacatct cgaggtataa gaagtttaaa gcagtaatg 39

<210> 15
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT1delta5_bc

<400> 15
ctccacatct cgagctaagc agtaatgtcg tttccgttaa a 41

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

<220>
<223> OT1delta26_bc

<400> 16
ctccacatct cgagctaaga tgttggatcc caacctg 37

<210> 17
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT1p_t

<400> 17
cgacccggca tatgagtaaa gacactgccg tagtagac 38

<210> 18
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HTCC2559m_t

<400> 18
cgacccggca tatgcaatat agtactaacg cattagttag 40

<210> 19
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HTCC2559m_bc

<400> 19
ctccacatct cgagttaata aaggtagttt aaagcag 37

<210> 20
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT11562m_t

<400> 20
cgacccggca tatgcaagcc tacaacacag ggaaattag 39

<210> 21
<211> 37
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OT11562m_bc

<400> 21
ctccacatct cgagttatag tattgaagtt gccaatc 37

<210> 22
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MED217m_t

<400> 22
cgacccggca tatgcaatat cgcacttctg ctttggtaag 40

<210> 23
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MED217m_bc

<400> 23
ctccacatct cgagctagta catattgttt aatgcgg 37

<210> 24
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fjohnm_t

<400> 24

cgacccggca tatgcaatac cgtactacta atttagtatc 40

<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fjohnm_bc

<400> 25
ctccacatct cgagttaata taaatagttc aatgctg 37

<210> 26
<211> 251
<212> PRT
<213> KAOT1_10476 of Kordia algicida OT-1 lacking singal peptide

<400> 26
Val Val Asp Glu Glu Gln Asp Thr Ala Ile Gly Ile Pro Gln Asp Val
1 5 10 15

Leu Gln Lys Ala Gln Ser Leu His Phe Asn Thr Phe Asp Met Gln Glu
20 25 30

Ala Ser Phe Glu Lys Pro Asn Gly Lys Ile Glu Glu Gly Tyr Met Met
35 40 45

Glu Gly Asp Ile Phe Phe Thr Arg Asp Gln Leu Met Asn Met Glu Leu
50 55 60

Gly Gly Asp Ile Thr Ser Lys Gln Tyr Arg Thr Asn Asn Leu Val Ser
65 70 75 80

Pro Gly Val Ile Thr Ile Ile Gly Tyr Thr Gly Asn Asn Ser Asn Gly
85 90 95

Leu Thr Thr Lys Met Gln Thr Gly Leu Arg Trp Ala Val Asp Asn Tyr
100 105 110

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

```
        115                 120                 125

Tyr Gln Asn Lys Asp Met Val Val Tyr Gln Val Gln Gly Gly Ala Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Ala Gly Phe Pro Ser Gly Gly Asn Pro Tyr Lys Trp Val Lys
145                 150                 155                 160

Ile Asn Ser Gly Met Ala Pro Tyr Ser Asn Asn Val His Glu His Val
                165                 170                 175

Ile Gly His Glu Ile Gly His Ser Ile Gly Phe Arg His Ser Asp Tyr
            180                 185                 190

Phe Ser Arg Gln Ser Cys Gly Gln Asn Ser Asn Glu Gly Ser Ala Gly
        195                 200                 205

Val Gly Ala Ile His Ile Pro Gly Thr Pro Thr Gly Trp Asp Pro Thr
    210                 215                 220

Ser Leu Met Asn Ala Cys Phe Ser Ser Ser Glu Asp Gly Glu Phe Asn
225                 230                 235                 240

Gly Asn Asp Ile Thr Ala Leu Asn Phe Leu Tyr
                245                 250
```

<210> 27
<211> 180
<212> PRT
<213> KAOT1_10476 of Kordia algicida OT-1 lacking signal and processing peptide

<400> 27

```
Gln Tyr Arg Thr Asn Asn Leu Val Ser Pro Gly Val Ile Thr Ile Ile
  1               5                  10                  15

Gly Tyr Thr Gly Asn Asn Ser Asn Gly Leu Thr Thr Lys Met Gln Thr
             20                  25                  30

Gly Leu Arg Trp Ala Val Asp Asn Tyr Asn Ala Leu Asn Leu Ser Ile
         35                  40                  45

Ser Phe Gln Leu Thr Phe Gly Thr Asp Tyr Gln Asn Lys Asp Met Val
     50                  55                  60
```

Val Tyr Gln Val Gln Gly Gly Ala Gly Gly Ser Ala Gly Phe Pro Ser
65 70 75 80

Gly Gly Asn Pro Tyr Lys Trp Val Lys Ile Asn Ser Gly Met Ala Pro
85 90 95

Tyr Ser Asn Asn Val His Glu His Val Ile Gly His Glu Ile Gly His
100 105 110

Ser Ile Gly Phe Arg His Ser Asp Tyr Phe Ser Arg Gln Ser Cys Gly
115 120 125

Gln Asn Ser Asn Glu Gly Ser Ala Gly Val Gly Ala Ile His Ile Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Thr Gly Trp Asp Pro Thr Ser Leu Met Asn Ala Cys Phe
145 150 155 160

Ser Ser Ser Glu Asp Gly Glu Phe Asn Gly Asn Asp Ile Thr Ala Leu
165 170 175

Asn Phe Leu Tyr
180

<210> 28
<211> 753
<212> DNA
<213> KAOT1_10476 of Kordia algicida OT-1 lacking signal peptide

<400> 28
gtagtagacg aggagcaaga cacagctatc ggaatcccac aagacgtact tcaaaaagca 60

caatcacttc acttcaacac attcgatatg caagaagcat ctttcgaaaa gccaaatggt 120

aaaatcgaag aaggatatat gatggaaggt gatatcttct ttacacgtga ccaattaatg 180

aacatggaac tcggtggaga tattacaagc aaacaatatc gtacaaacaa tttagtttct 240

ccaggagtaa ttacaatcat tggatataca ggaaataact ctaatggatt aacaactaaa 300

atgcaaactg gacttagatg ggcagtagat aactataatg cattaaacct aagtattagt 360

ttccaattaa catttggtac tgactatcaa aataaagata tggtagtata tcaagtacaa 420

ggtggagcag gtggatctgc aggtttccct tcaggaggaa atccatacaa gtgggttaaa 480

attaactcag gtatggctcc ttacagtaac aatgtacatg aacatgtaat tggacatgaa 540

ataggacact cgattggatt ccgtcattca gactacttca gcagacaaag ttgtggacaa 600

aattcaaatg aaggtagtgc aggagttgga gcaatccata ttccaggaac acctacaggt 660

tgggatccaa catctttaat gaatgcttgt ttcagttctt cagaagatgg agaatttaac 720

ggaaacgaca ttactgcttt aaacttctta tac 753

<210> 29
<211> 540
<212> DNA
<213> KAOT1_10476 of Kordia algicida OT-1 lacking signal and processing peptide

<400> 29
caatatcgta caaacaattt agtttctcca ggagtaatta caatcattgg atatacagga 60

aataactcta atggattaac aactaaaatg caaactggac ttagatgggc agtagataac 120

tataatgcat taaacctaag tattagtttc caattaacat ttggtactga ctatcaaaat 180

aaagatatgg tagtatatca agtacaaggt ggagcaggtg gatctgcagg tttcccttca 240

ggaggaaatc catacaagtg ggttaaaatt aactcaggta tggctcctta cagtaacaat 300

gtacatgaac atgtaattgg acatgaaata ggacactcga ttggattccg tcattcagac 360

tacttcagca gacaaagttg tggacaaaat tcaaatgaag gtagtgcagg agttggagca 420

atccatattc caggaacacc tacaggttgg gatccaacat ctttaatgaa tgcttgtttc 480

agttcttcag aagatggaga atttaacgga aacgacatta ctgctttaaa cttcttatac 540

540