

신규미생물효소계를 이용한 L-DOPA의 합성 및
생산기술의 개발에 관한 연구

Studies on Synthesis and Production of L-3,4-dihydroxy-
phenylalanine by the Microbial Enzyme

연구기관
한국과학기술연구원
유전공학연구소

과 학 기 술 처

이 페이지는

비밀입니다

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “신규 미생물 효소계를 이용한 L-DOPA의 합성 및 생산 기술의 개발에 관한 연구” 사업의 1992년도 년차 보고서로 제출합니다.

1993. 8.

주 관 연 구 기 관 명 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

총괄연구 책임자 : 성문희 (유전공학연구소 선임연구원)

참여기업연구책임자 : 김영준 (주식회사 유공 수석연구원)

연 구 원 : 오태광 (유전공학연구소 책임연구원)

윤기홍 (유전공학연구소 선임연구원)

이징기 (유전공학연구소 선임연구원)

태동년 (유전공학연구소 연구원)

김형권 (유전공학연구소 연구원)

최윤호 (유전공학연구소 연구원)

이규종 (유전공학연구소 연구원)

왕지원 (유전공학연구소 연구원)

이규남 (유전공학연구소 연구원)

참여기업연구원 : 엄기남 (주식회사 유공 연구원)

이광혁 (주식회사 유공 연구원)

홍의극 (주식회사 유공 연구원)

이 페이지는

이름 입력란

요 약 문

I. 제 목

신규미생물 효소계를 이용한 L-DOPA의 합성 및 생산기술의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

파킨슨병 (parkinson's disease) 등의 노인성 신경장애에 대하여 탁월한 치료효과를 나타내는 의약품 아미노산인 L-DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine) 의 상업적 생산기술에는 화학합성법과 식물에서의 추출법이 있으나, 화학합성법은 광학이성체분리 등으로 인하여 생산공정이 복잡하며, 추출법은 원료물질의 공급이 비교적 안정적이지 못한 단점을 가지고 있다. 최근 일본의 Ajinomoto사는 L-DOPA 합성효소인 β -tyrosinase 를 가지고 있는 미생물을 사용하여 L-DOPA의 합성 및 생산연구를 이전부터 지속적으로 수행하여 현재는 산업화연구를 수행하고 있다. 미생물효소인 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 합성 및 생산법은 화학합성의 단점과 추출법의 단점을 보완할 수 있기 때문에 L-DOPA의 합성 및 생산에는 매우 중요한 방법으로 대두되고 있다.

따라서, 본연구에서는 L-DOPA 합성효소인 β -tyrosinase의 활성을 가지고 있는 미생물을 탐색하여, 탐색된 미생물로부터 β -tyrosinase의 gene cloning을 수행하여 β -tyrosinase를 유전공학적 기법에 의해 대량생산방법을 확립하고자 하며, 최종적으로 대량생산된 재조합 β -tyrosinase를 사용하여 L-DOPA의 합성 및 생산기술의 개발에 관한 연구를 수행하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

L-DOPA의 합성 및 생산기술의 개발을 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. 상온균과 고온균에서의 β -tyrosinase의 활성을 가진 미생물의 탐색
2. β -tyrosinase의 활성을 가진 *Citrobacter freundii* KCTC 2006의 genomic DNA로부터 β -tyrosinase의 gene cloning 수행과 sequence 분석
3. β -tyrosinase 유전자를 발현 vector pHT12 , pHT12, pKK233-2에 cloning하며 재조합 β -tyrosinase의 대량생산 수행
4. 대량생산된 재조합 β -tyrosinase를 사용하여 L-DOPA의 합성 최적 조건의 검토와 생산기술개발 수행

Ⅳ. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 상온균과 고온균에서의 β -tyrosinase 활성을 가진 미생물의 탐색
Citrobacter freundii KCTC2006, KCTC2195, KCTC2209, KCTC2359, KCTC 2509 및 *Erwinia herbicola* KCTC2104, KCTC2479에서 β -tyrosinase 활성을 확인하였다.

2. β -tyrosinase의 gene cloning과 sequence 분석

β -tyrosinase 활성을 보유하고 있는 *Citrobacter freundii* KCTC2006의 genomic DNA로부터 β -tyrosinase gene을 direct activity staining 방법으로 cloning하였고, DNA 크기를 줄인 sub clone을 template로 하여 β -tyrosinase DNA 염기배열을 결정하였다. 그결과 β -tyrosinase를 coding하고 있는 gene의 크기는 1368 bp이었으며

456 amino acid residue를 code하고 있었다. Amino acid residue로부터 계산된 β -tyrosinase의 분자량은 51499 Da 이었다.

3. β -tyrosinase의 유전공학적 기법에 의한 대량생산 PCR 기술로 β -tyrosinase의 open reading frame만을 증폭시킨후, 고발현 vector인 pHT12I, pHT12, pKK233-2 plasmid에 insert하여 재조합 β -tyrosinase의 대량생산을 수행한 결과, 각 재조합균주 모두로부터 모 균주인 *Citrobacter freundii* KCTC2006보다 30배 이상으로 β -tyrosinase의 대량생산이 가능하였고, SDS-PAGE를 통하여 β -tyrosinase의 생산량은 재조합 *E.coli*의 총가용성 단백질의 30% 이상이었음을 확인하였다.

4. 재조합 β -tyrosinase에 의한 L-DOPA의 합성 및 생산

기질로 pyruvic acid, ammonia, pyrocatechol를 사용하여 L-DOPA의 합성 연구를 수행한 결과 40 mM pyruvic acid, 40 mM pyrocatechol 650 mM ammonia를 사용한 경우가 최적의 L-DOPA 합성을 나타내었다.

상기의 조건으로부터 2시간 간격으로 초기의 농도를 유지하기 위하여 기질인 pyruvic acid와 pyrocatechol을 공급하면서 L-DOPA 생산연구를 수행한 결과, 반응 8시간에 60 mM L-DOPA가 생산되었다. L-DOPA의 productivity는 7.5 mM/hr 즉, 1.48 g/l/hr를 나타내었다.

이 페이지는

이름 없음

S U M M A R Y

Studies on Synthesis and Production of L-3,4-dihydroxy phenylalanine by the Microbial Enzyme

3, 4-Dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) was first isolated by Guggenheim in 1913 from peels and buds of *Vicia faba*. This amino acid is contained in large amounts in brain organs, and has attracted much attention as a specific drug for treatment of Parkinson's disease. There are many reports concerning its production. L-DOPA has been obtained so far by extraction from vegetable organs or prepared by a synthetic method. However, the extraction method is not applied to large scale production and the synthetic method contains a step for optical resolution. The microbial production of this amino acid has been extensively studied. The yields in these microbial methods, however, are not high enough to be applied to industrial production. β -tyrosinase (tyrosine phenol-lyase, E.C.4.1.99.2) was found by Yamada and his group to catalyze the synthesis of L-DOPA from pyruvic acid, ammonia, and pyrocatechol in significantly high yields. This enzymatic method is simple and is one of the most economical processes to date for the preparation of L-DOPA.

In this study, we described the screening of β -tyrosinase activity in mesophiles and thermophiles, gene cloning, and sequence determination of β -tyrosinase. We also established the method for the production of recombinant β -tyrosinase. Finally we studied the enzymatic synthesis and production method of L-DOPA by the recombinant β -tyrosinase. The results are as follows:

1. We have studied the occurrence of β -tyrosinase in mesophiles and thermophiles, and found that most enteric bacteria including *Citrobacter freundii* (KCTC2006, KCTC 2195, KCTC2209, KCTC 2359, KCTC2509), and *Erwinia hebicola* (KCTC 2104, KCTC2479) had activity of β -tyrosinase.
2. Using direct phenol detection method, We isolated the gene encoding β -tyrosinase from Sau3AI partial digested fragments of *Citrobacter freundii* KCTC2006 genomic DNA. A plasmid, pGY1000 (8.7 kb) carrying a 6.0 kb Sau3AI partial fragment thus obtained was subcloned into pGY1100 (5.7 kb) carrying a 3.0 kb EcoRI-PvuII fragment, which was found to contain the complete β -tyrosinase gene by restriction mapping and assay of β -tyrosinase.

As the result of DNA sequence analysis of this 3.0 kb EcoRI-PvuII fragment, a single open reading frame of 1,368 bp nucleotides starting with initiation codon

ATG and ending with termination codon TAA at position 1,369 was found. On the basis of the predicted amino acid (456 residues), the molecular mass of the enzyme subunit is calculated to be 51,499 daltons.

3. In order to increase the expression level of β -tyrosinase, plasmids (pGY2000, pGY3000, and pGY4000) containing the coding sequence of β -tyrosinase under the control of trc promoter was constructed. The expression of β -tyrosinase in *E. coli*/pGY2000, *E. coli*/pGY3000, and *E. coli*/pGY4000 were confirmed by the β -tyrosinase assay, and the production level of recombinant β -tyrosinase was more than 30 fold of *Citrobacter freundii* KCTC 2006. A band corresponding with recombinant β -tyrosinase (approximately M.W.50,000) was observed on 12% SDS-polyacryl amide gel (PAGE), and the recombinant β -tyrosinase has been expressed more than 30% of total soluble proteins in recombinant *E. coli*

4. The synthesis of L-DOPA from pyruvic acid, ammonia, and pyrocatechol was studied with overproduced recombinant β -tyrosinase. The optimum pH for this reaction was around 8.0, and optimum temperature was 20 C. As the high concentration of substrates (pyrocatechol and pyruvic acid) denatured the enzyme, we studied the

optimum concentration of pyrocatechol and pyruvic acid. For L-DOPA synthesis, the optimum concentration of pyrocatechol and pyruvic acid was 40mM. Finally, we tried production of L-DOPA from pyruvic acid, ammonia, and pyrocatechol. The production of L-DOPA was carried out at 20°C for 8 hrs. At 2hrs intervals, pyrocatechol and pyruvate were added to maintain the initial substrate concentration(40 mM). The production level of L-DOPA in this reaction reached 60mM in 8 hrs (productivity 1.48 g/l/hr).

목 차

제 1장	서 론	15
제 2장	실험재료 및 방법	17
제 1절	L-DOPA 합성효소 (β -tyrosinase)의 탐색	17
1.	미생물균주 및 배양조건	17
2.	β -tyrosinase 활성측정	17
제 2절	β -tyrosinase의 gene cloning 및 sequence	
	결정과 유전공학적 기법에 의한 대량생산	18
1.	사용균주와 plasmid 및 배지	18
2.	Chromosomal DNA 제조와 genomic library 제조	18
3.	Clone의 screening 방법	18
4.	DNA sequence 분석	19
5.	β -tyrosinase의 expression 및 대량생산	19
6.	β -tyrosinase의 활성측정	19
제 3절	재조합 β -tyrosinase에 의한 L-DOPA의 합성 및	
	생산	20
1.	사용균주 및 배양조건	20
2.	재조합 β -tyrosinase 효소원 제조 및 활성측정	20
3.	재조합 β -tyrosinase에 의한 L-DOPA의 합성 및	
	생산	20

제 3 장	결과 및 고찰	23
제 1 절	L-DOPA 합성효소 (β -tyrosinase)의 탐색	23
1.	상온균에서의 β -tyrosinase 탐색	23
2.	고온균에서의 β -tyrosinase 탐색	23
제 2 절	β -tyrosinase의 gene cloning 및 sequence 결정과 유전공학 기법에 의한 대량생산	24
1.	β -tyrosinase의 gene cloning 및 DNA sequence 분석	24
2.	재조합 β -tyrosinase의 유전공학적 기법에 의한 대량 생산	25
제 3 절	재조합 β -tyrosinase에 의한 L-DOPA의 합성 및 생산	34
1.	L-DOPA 합성 및 생산을 위한 반응조건의 최적화	34
2.	재조합 β -tyrosinase에 의한 L-DOPA 합성 및 생산	36
제 4 장	결 론	39
참 고 문 헌	41

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Materials and Methods	17
Section 1. Screening of β -tyrosinase	17
1. Bacterial Strains and culture conditions	17
2. Determination of β -tyrosinase activity	18
Section 2. Gene cloning, sequence determination, and overproduction of β -tyrosinase	18
1. Bacterial strains, plasmids, and media	18
2. preparation of chromosomal DNA and genomic library	18
3. Screening of the genomic library	18
4. DNA sequence analysis	19
5. Expression of β -tyrosinase and overproduction of recombinant β -tyrosinase	19
Section 3. Synthesis and production of L-DOPA by recombinant β -tyrosinase	20
1. Bacterial strains and culture condition	20
2. Preparation of cell-free extract and β -tyrosinase assay	20
3. Synthesis and production of L-DOPA	20

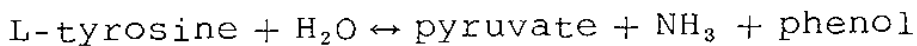
Chapter 3. Results and Discussion	23
Section 1. Screening of β -tyrosinase	23
1. Screening of β -tyrosinase in mesophiles	23
2. Screening of β -tyrosinase in thermophiles	23
Section 2. Gene cloning, sequence determination, and overproduction of recombinant β -tyrosinase	24
1. Gene cloning and DNA sequence analysis of β -tyrosinase	24
2. Expression and overproduction of recombinant β -tyrosinase	25
section 3. Synthesis and production of L-DOPA by recombinant β -tyrosinase	34
1. Optimization of the L-DOPA synthetic reaction by recombinant β -tyrosinase	34
2. Synthesis and production of L-DOPA by recombinant β -tyrosinase	36
Chapter 4. Conclusion	39
References	41

제 1 장 서 론

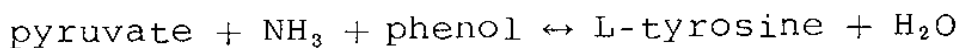
파킨슨병 (parkinson's disease) 등의 노인성 신경장애에 대하여 탁월한 치료효과를 나타내는 의약품 아미노산인 L-DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine)¹⁾의 상업적 생산기술에는 화학합성법²⁻⁴⁾과 식물에서의 추출법이 있으나, 화학합성법은 광학이성체분리 등으로 인하여 생산공정이 복잡하며, 추출법은 원료물질의 공급이 비교적 안정적이지 못한 단점을 가지고 있다. 최근 일본의 Ajinomoto사는 L-DOPA 합성효소인 β -tyrosinase를 가지고 있는 미생물을 사용하여 L-DOPA의 합성 및 생산연구를 이전부터 지속적으로 수행하여 현재는 산업화연구를 수행하고 있다.⁵⁻¹²⁾ 미생물 효소인 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 합성 및 생산법은 화학합성의 단점과 추출법의 단점을 보완할 수 있기 때문에 L-DOPA의 합성 및 생산에는 매우 중요한 방법으로 대두되고 있다.¹³⁻¹⁷⁾

β -tyrosinase (tyrosine phenol-lyase, E.C.4.1.99.2)는 매우 다양한 효소반응을 가지고 있다. β -tyrosinase는 다음과 같은 반응을 촉매하는 효소이다.¹⁸⁻²³⁾

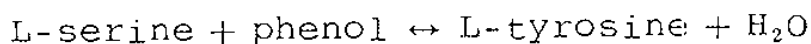
(I) α, β -elimination 반응



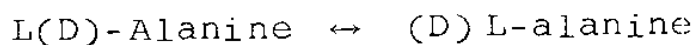
(II) L-tyrosine 합성반응



(III) β -replacement 반응

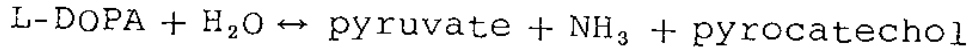


(IV) racemization 반응

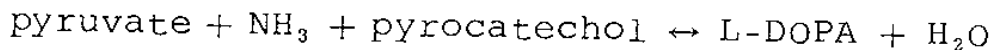


β -tyrosinase의 기질특이성을 이용하여 기질인 phenol 대신에 pyrocatechol을 사용하게 되면 다음과 같이 L-DOPA를 합성하는 반응을 촉매하게 된다.^{7,24,25)}

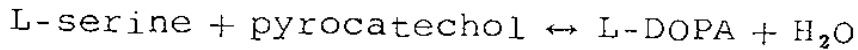
(I) α, β -elimination 반응



(II) L-DOPA 합성반응



(III) β -replacement 반응



따라서, β -tyrosinase는 L-DOPA를 합성할 수가 있어서 β -tyrosinase를 L-DOPA 합성효소라 본 연구에서는 명명하고자 하며 L-DOPA의 합성 및 생산기술에 적용하고자 한다.

이와같은 연구를 수행하기 위하여서는 β -tyrosinase 활성을 가지고 있는 미생물의 탐색이 우선적으로 수행되어야 하며, 탐색된 미생물로부터 미생물자체를 이용한 L-DOPA의 합성 및 생산법과 β -tyrosinase를 이용한 효소적 L-DOPA의 합성 및 생산법을 연구개발하여야 한다. 그리고 β -tyrosinase를 유전공학적으로 대량생산할 수 있는 방법도 L-DOPA의 합성 및 생산기술에는 매우 중요하므로 β -tyrosinase의 gene cloning을 통하여 β -tyrosinase의 대량생산기술도 확립하고자 한다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 L-DOPA 합성효소 (β -tyrosinase)의 탐색

1. 미생물균주 및 배양조건

미생물 보존기관인 KCTC(Korean collection for type cultures, GERI, KIST, Korea)로부터 분양받은 미생물균주와 유전공학연구소 응용미생물연구실 연구팀이 토양 및 폐수로부터 분리한 55℃ 이상의 온도에서 생육하는 고온성미생물을 사용하여 β -tyrosinase의 활성을 가지고 있는 미생물을 탐색하였다.

상온균(37℃ 배양)은 0.5% Meat extract, 0.5% Yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.2% NaCl, 2.0% Agar가 포함된 배지에서 배양하였으며, β -tyrosinase의 inducer인 L-tyrosine(0.2%)을 배지에 첨가하여 β -tyrosinase를 induce 하였다.⁸⁾

그리고 고온성미생물(55℃ - 65℃ 배양)은 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.3% NaCl, 0.2% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 2.0% Agar가 포함된 배지에서 배양하였으며,²⁶⁾ 상온균과 같이 β -tyrosinase의 inducer인 L-tyrosine을 0.2% 정도 첨가하여 β -tyrosinase를 induce 하였다.

2. β -tyrosinase 활성측정

β -tyrosinase 활성의 측정은 plate에 증식된 colony로부터 red halo의 생성을 직접 확인하는 direct 측정법¹⁶⁾과 미생물무세포 추출액(cell-free crude extract)을 제조하여 효소반응 후 생성된 pyruvate를 정량하는 enzyme 측정법²⁷⁾을 사용하였다.

제 2 절 β -tyrosinase의 gene cloning 및 sequence 결정 과 유전공학적 기법에 의한 대량생산

1. 사용균주와 plasmid 및 배지

β -tyrosinase 활성을 가지고 있는 *Citrobacter freundii* KCTC 2006 를 DNA doner로 사용하였고, host인 균주는 *E. coli* HB101, *E. coli* JM109를 사용하였다.^{28,29)} plasmid vector로는 pUC19 (cloning vector), pHT12 (expression vector), pHT121 (expression vector), pKK 233-2 (expression vector)를 사용하였다.

Citrobacter freundii KCTC 2006 과 *E. coli* 균주는 LB medium (1% Bacto-peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에서 배양하였다.

2. Chromosomal DNA 제조와 genomic library 제조

Citrobacter freundii KCTC2006 으로부터 chromosomal DNA 를 Saito 와 Miura법으로 제조하였다.³⁰⁾ 제조된 chromosomal DNA를 제한효소 *Sau* 3AI으로 partial digestion 한후, sucrose gradient 로 3-10kb DNA 단편을 회수하여 cloning vector인 pUC19의 *Bam*HI site에 ligation하였다. ligation 한후 *E. coli* JM109에 transformation 하였다.

3. Clone의 screening 방법

β -tyrosinase의 activity를 가진 clone을 Screening하기 위하여 제 1 절 2 항의 β -tyrosinase assay법 중에서 direct method

를 사용하여 red halo가 나오는 colony들을 선발하였다.

4. DNA sequence 분석

Clone 된 gene의 DNA 염기배열은 modified T7 DNA polymerase(Sequenase)를 사용한 dideoxy chain termination method로 분석하였다.³¹⁾

5. β -tyrosinase의 expression 및 대량생산

clone된 gene의 DNA 염기배열을 분석확인한 결과를 통하여 β -tyrosinase gene의 open reading frame이 각 expression vector에 정확하게 맞게끔 N-terminal oligonucleotide primer와 C-terminal oligonucleotide primer를 제조하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하여 β -tyrosinase gene을 amplify 하였다.³²⁾ PCR을 통하여 amplify된 β -tyrosinase gene을 expression vector pHT12I, pHT12, pKK233-2의 각각의 제한효소 site에 ligation 한후 *E. coli*에 transformation 하였다.

6. β -tyrosinase의 활성측정

각각의 expression vector로부터 생산된 β -tyrosinase의 활성을 보기 위하여 재조합 *E. coli* 무세포추출액으로부터 β -tyrosinase의 enzyme assay 하였다.

제 3 절 재조합 β -tyrosinase 에 의한 L-DOPA의 합성 및 생산

1. 사용균주 및 배양조건

재조합균주 *E. coli* HB101/PGY 2000, *E. coli* JM109/PGY 3000, *E. coli* HB101/PGY 4000 를 100 μ g/ml 의 농도로 ampicillin을 포함하는 LB medium에 배양하여 사용하였다.

2. β -tyrosinase 효소원 제조 및 활성측정

β -tyrosinase 생산균주인 재조합 *E. coli*를 배양한 후, 원심분리하여 cell을 회수한다. 회수된 cell을 cell suspension buffer에 suspend 한 후, sonication하여 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 cell-free crude extract를 제조하여 L-DOPA 합성 및 생산을 위한 효소원으로 사용하였다. 사용하기전에 제 1절 2항에 기재한 β -tyrosinase assay 방법에 준하여 cell-free crude extract의 효소활성을 측정하였다.

3. 재조합 β -tyrosinase 에 의한 L-DOPA의 합성 및 생산

L-DOPA의 합성 및 생산법은 다음과 같은 방법에 의하여 수행하였다. 650 mM ammonium acetate (pH 8.02), 40 mM pyrocatechol, 40 mM pyruvate, 0.15% sodium sulfite, 2.5 mM EDTA가 포함된 30 ml 반응액내에 6unit의 효소원을 넣고 18 °C에서 L-DOPA의 합성 및 생산을 수행하였다. 반응 2시간 간격으로 소모된 pyrocatechol과 pyruvate량을 측정하여 초기농도를 유지하도록 pyrocatechol과 pyruvate

를 연속적으로 첨가하여 L-DOPA의 생산량을 증대시켰다. pyrocatechol, pyruvate, L-DOPA의 측정은 HPLC를 사용하여 수행하였다. column은 μ -bondapack C₁₈ column (3.9 × 300 mm)을 사용하였고, 0.1 M / Na₂HPO₄ / 1% Methanol (pH 3.3)을 전개용매로 하여 1 ml / min 의 속도로 용출시켜 측정하였다.

이 페이지는

여백입니다

제 3 장 결 과 및 고 찰

제 1 절 L-DOPA 합성효소 (β -tyrosinase) 의 탐색

1. 상온균 (37℃ 배양) 에서의 β -tyrosinase 의 탐색

미생물기탁 및 보존기관인 KCTC로부터 분양받은 *Citrobacter freundii* KCTC2006, KCTC2195, KCTC2209, KCTC 2359, KCTC2509 및 *Erwinia herbicola* KCTC2104, KCTC2479에서 β -tyrosinase의 enzyme assay를 통하여 β -tyrosinase 활성을 확인하였다. β -tyrosinase의 inducer인 tyrosine을 LB 배지에 0.2% 첨가하여 β -tyrosinase 활성을 점토한 결과 β -tyrosinase의 활성이 그다지 증가하지 않았다. 따라서, β -tyrosinase 활성이 확인된 *Citrobacter freundii* KCTC2006, KCTC2195, KCTC2209, KCTC2359, KCTC2509 및 *Erwinia herbicola* KCTC2104, KCTC2479를 L-DOPA 합성 및 생산균으로 사용하기에는 β -tyrosinase의 생산량이 적어 부적합하다고 판단되며, β -tyrosinase의 증대를 위한 β -tyrosinase의 gene cloning이 수행되어 유전공학적 으로 재조합 β -tyrosinase의 대량생산이 이루어지면 L-DOPA의 합성 및 생산은 높은 생산성으로 수행될 수 있다고 본다.

2. 고온균 (55-60℃ 배양) 에서의 β -tyrosinase 의 탐색

국내 각 지역의 토양, 하수, 폐수, 온천, 목욕탕으로부터 분리한 고온성미생물 1,500 균주로부터 열에 안정한 β -tyrosinase를 탐색한 결과 유전공학연구소 응용미생물연구팀이 분리한 고온성미생물 1,500 균주에서는 β -tyrosinase의 활성을 발견할 수 없었다. 그러나 보존된 토양 및 초기 분리시료에서는

β -tyrosinase의 활성이 검출되었으므로 β -tyrosinase 활성이 검출된 시료로부터 고온성미생물을 분리하여 direct method와 enzyme assay를 수행하였으나, β -tyrosinase의 활성을 가진 고온성미생물을 분리할 수 없었다.

현재 이와같은 현상을 규명하기 위하여 집중적이며 심도있는 탐색연구를 수행하고 있다. 내열성 β -tyrosinase의 활성을 나타내는 혼합배양액에서 β -tyrosinase 활성을 가진 고온성세균을 enrich 하기 위하여 여러 항생제를 사용하여 탐색연구를 수행하고 있으며, β -tyrosinase의 활성을 가진 고온성미생물이 isolation되면 고온성미생물로부터 열에 안정하고 효소 안정성이 높은 thermostable β -tyrosinase를 획득할 수 있으므로 새로운 L-DOPA 합성 및 생산법을 개발할 수 있으리라 판단된다.

제 2 절 β -tyrosinase의 gene cloning 및 sequence 결정과 유전공학기법에 의한 대량 생산

1. β -tyrosinase의 gene cloning 및 DNA spquence 분석

제 1 절의 결과로부터 KCTC로부터 분양받은 *Citrobacter freundii* 및 *Erwinia herbicola*에서 β -tyrosinase의 활성이 확인되었으나, β -tyrosinase의 생산량이 적어 L-DOPA의 합성 및 생산균주로는 부적합하다고 판단되나, 재조합유전자기술을 사용하여 β -tyrosinase를 대량으로 생산할 수가 있다면 재조합균주를 사용하여 L-DOPA의 합성 및 생산을 수행할 수가 있다고 판단되어 β -tyrosinase의 gene cloning을 수행하였다.

β -tyrosinase 활성을 가지고 있는 균주중에서 *Citrobacter freundii* KCTC2006 을 대상으로 chromosomal DNA를 분리하여 제 2 장 제 2 절의 실

염재료 및 방법에 서술한 방법으로 β -tyrosinase gene을 cloning 하였다. pUC19의 *Bam*HI site에 insert된 DNA의 size는 약 6.0 kb 이었으며, 이 plasmid를 PGY1000으로 명명하였으며, 여러종류의 제한효소를 사용하여 조사한 제한효소 site와 함께 그림 1에 나타내었다. 여러종류의 제한효소를 사용하여 insert DNA 크기를 줄인 DNA 단편들의 β -tyrosinase 활성을 조사하여 처음에 insert된 DNA 크기를 3.0 kb (multi-cloning Site인 *Bam*HI 제한효소 site로부터 *Pvu* II 제한효소 site까지의 거리)로 줄인 subclone을 획득하였다. 이 plasmid를 PGY1100으로 명명하였고 그림 2에 나타내었다. Subclone된 PGY1100을 template로 하여 β -tyrosinase의 DNA Sequencing을 수행하였다. Sequencing 결과 β -tyrosinase를 coding하고 있는 gene의 크기는 1368bp이었으며 456 amino acid residue를 code하고 있었다. amino acid residue로부터 계산된 β -tyrosinase의 분자량은 51499Da이었다. β -tyrosinase의 DNA 배열과 DNA 배열로부터 유추된 아미노산 배열을 그림 3에 나타내었다.

2. 재조합 β -tyrosinase의 유전공학적 기법에 의한 대량생산

β -tyrosinase를 overproduction하는 것이 L-DOPA의 합성 및 생산에 있어서 가장 중요한 기법이므로, 우리들은 β -tyrosinase를 강력한 promoter로 알려져 있는 *trc* promoter를 가진 pHT12I plasmid, 그리고 PKK233-2 plasmid와 같은 high expression vector에 insert하기로 하였다. Expression vector에 open reading frame이 맞게끔 insert하기 위하여 PCR 기술을 이용하였다. β -tyrosinase의 N-terminal부분의 oligonucleotide primer

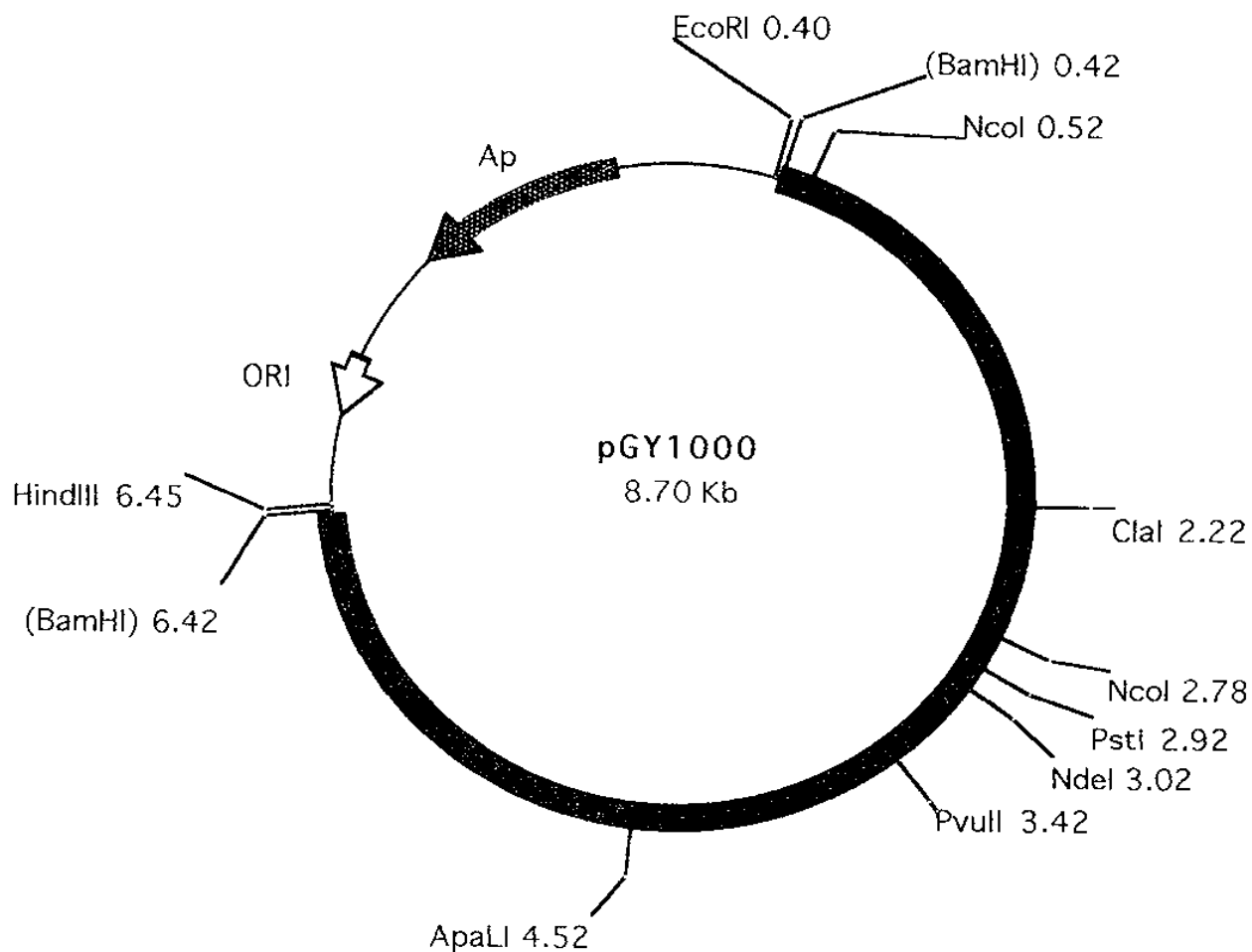


Fig.1. Construction of plasmid pGY1000. We isolated the gene encoding β -tyrosinase from *Sau*3AI partial digested fragments of *Citrobacter freundii* KCTC 2006 genomic DNA by direct activity staining method. A plasmid, pGY1000(8.7 kb) carried a 6.0-kb *Sau*3AI partial digested fragment.

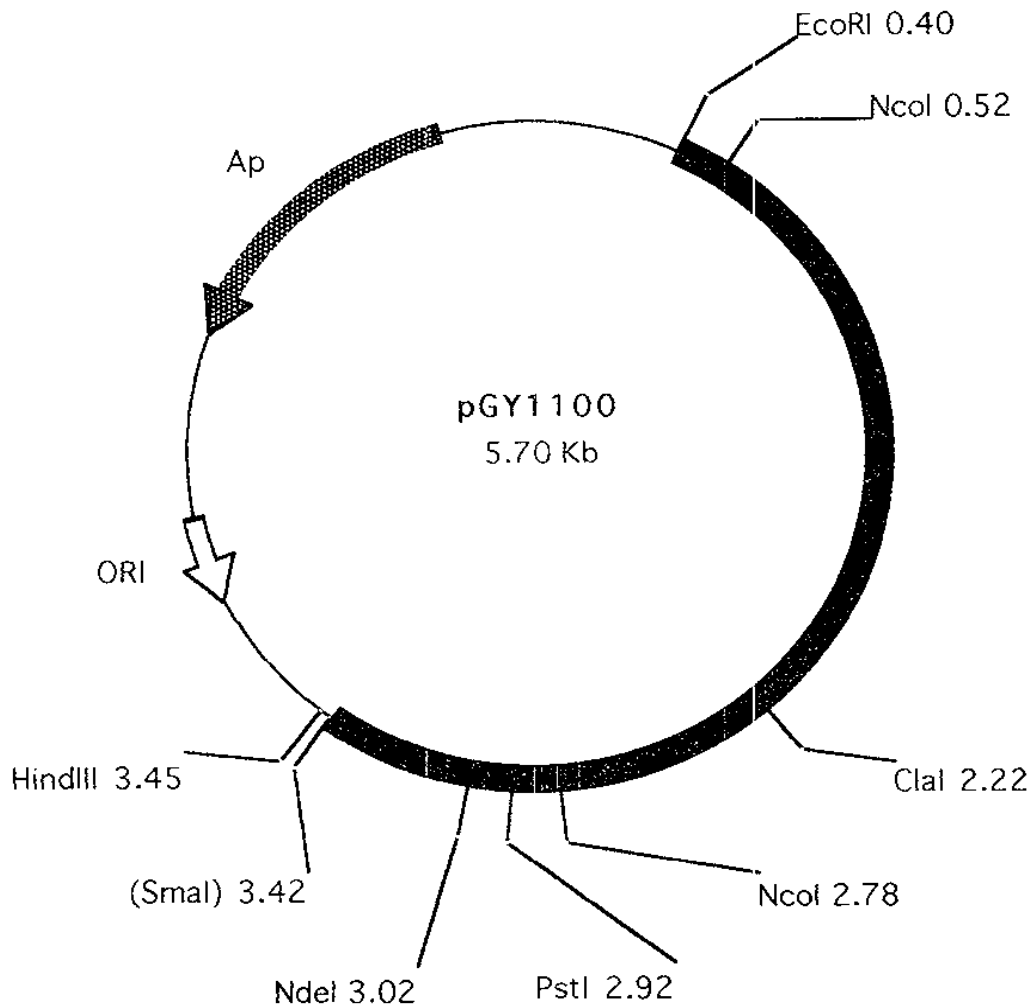


Fig.2. Construction of plasmid pGY1100. A plasmid, pGY 1000 (8.70 kb) was digested with restriction enzyme *EcoRI* and *Pvu II*. The *EcoRI-Pvu II* fragment (3.0 kb) was recovered from the gel after separation on a agarose gel. This was ligated to the vector DNA (pUC19) digested with *EcoRI* and *Sma I*. The resulting plasmid was named pGY1100.

1

ATG AAT TAT CCG GCA GAA CCC TTC CGT ATT AAA AGC GTT GAA ACT GTA TCT
MET Asn Tyr Pro Ala Glu Pro Phe Arg Ile Lys Ser Val Glu Thr Val Ser

ATG ATC CCG CGT GAT GAA CGC CTC AAG AAA ATG CAG GAA GCG GGT TAC AAT
Met Ile Pro Arg Asp Glu Arg Leu Lys Lys Met Gln Glu Ala Gly Tyr Asn

ACT TTC CTG TTA AAT TCG AAA GAT ATT TAT ATT GAC CTG CTG ACA GAC AGT
Thr Phe Leu Leu Asn Ser Lys Asp Ile Tyr Ile Asp Leu Leu Thr Asp Ser

GGC ACT AAC GCA ATG AGC GAC AAG CAG TGG GCC GGA ATG ATG ATG GGT GAT
Gly Thr Asn Ala Met Ser Asp Lys Gln Trp Ala Gly Met Met Met Gly Asp

GAA GCG TAC GCG GGC AGC GAA AAC TTC TAT CAT CTG AA AGA ACC GTG CAG
Glu Ala Tyr Ala Gly Ser Glu Asn Phe Tyr His Leu Glu Arg Thr Val Gln

GAA CTG TTC GGC TTT AAA CAT ATT GTT CCG ACT CAC CAG GGG CGT GGC GCA
Glu Leu Phe Gly Phe Lys His Ile Val Pro Thr His Gln Gly Arg Gly Ala

GAA AAC CTG TTA TCG CAG TTG GCT ATT AAA CCT GGG CAA TAT GTT GCC GGG
Glu Asn Leu Leu Ser Gln Leu Ala Ile Lys Pro Gly Gln Tyr Val Ala Gly

AAT ATG TAT TTC ACC ACC ACC CGT TAT CAC CAG GAA AAA AAT GGT GCG GTG
Asn Met Tyr Phe Thr Thr Thr Arg Tyr His Gln Glu Lys Asn Gly Ala Val

TTT GTC GAT ATC GTT CGT GAC GAA GCG CAC GAT GCC GGT CTG AAT ATT GCG
Phe Val Asp Ile Val Arg Asp Glu Ala His Asp Ala Gly Leu Asn Ile Ala

TTT AAA GGT GAT ATC GAT CTT AAA AAA TTA CAA AAG CTG ATT GAT GAA AAA
Phe Lys Gly Asp Ile Asp Leu Lys Lys Leu Gln Lys Leu Ile Asp Glu Lys

GGC GCA GAA AAT ATT GCG TAT ATC TGC CTG GCG GTG ACG GTT AAC CTC GCA
Gly Ala Glu Asn Ile Ala Tyr Ile Cys Leu Ala Val Thr Val Asn Leu Ala

GGT GGG CAG CCG GTC TCG ATG GCC AAC ATG CGT GCG GTG CGT GAA CTG ACA
Gly Gly Gln Pro Val Ser Met Ala Asn Met Arg Ala Val Arg Glu Leu Thr

GAA GCG CAC GGC ATT AAA GTG TTC TAC GAC GCC ACC CGT TGC GTG GAA AAC
Glu Ala His Gly Ile Lys Val Phe Tyr Asp Ala Thr Arg Cys Val Glu Asn

GCC TAC TTT ATC AAA GAG CAA GAG CAG GGC TTT GAG AAC AAG AGC ATC GCC
Ala Tyr Phe Ile Lys Glu Gln Glu Gln Gly Phe Glu Asn Lys Ser Ile Ala

GAG ATC GTG CAT GAG ATG TTC AGC TAC GCC GAC GGT TGT ACC ATG AGT GGT
Glu Ile Val His Glu Met Phe Ser Tyr Ala Asp Gly Cys Thr Met Ser Gly

AAA AAA GAC TGT CTG GTG AAC ATC GGC GGT TTC CTG TGC ATG AAC GAT GAC
Lys Lys Asp Cys Leu Val Asn Ile Gly Gly Phe Leu Cys Met Asn Asp Asp

GAA ATG TTC TCT TCT GCC AAA GAG TTA GTC GTG GTC TAC GAA GGG ATG CCA
Glu Met Phe Ser Ser Ala Lys Glu Leu Val Val Val Tyr Glu Gly Met Pro

TCT TAC GGC GGC CTG GCC GGA CGT GAT ATG GAA GCC ATG GCA ATT GGC CTG
Ser Tyr Gly Gly Leu Ala Gly Arg Asp Met Glu Ala Met Ala Ile Gly Leu

CGC GAA GCC ATG CAA TAC GAA TAT ATT GAG CAC CGC GTG AAG CAG GTT CGC
Arg Glu Ala Met Gln Tyr Glu Tyr Ile Glu His Arg Val Lys Gln Val Arg

TAC CTG GGC GAT AAG CTG AAA GCC GCT GGC GTA CCG ATT GTT GAA CCG GTA
Tyr Leu Gly Asp Lys Leu Lys Ala Ala Gly Val Pro Ile Val Glu Pro Val

GGC GGT CAC GCG GTA TTC CTC GAT GCG CGT CGC TTC TGC GAG CAT CTG ACG
Gly Gly His Ala Val Phe Leu Asp Ala Arg Arg Phe Cys Glu His Leu Thr

CAG GAC GAG TTC CCG GCG CAA AGC CTG GCG GCG AGC ATT TAT GTG GAA ACT
Gln Asp Glu Phe Pro Ala Gln Ser Leu Ala Ala Ser Ile Tyr Val Glu Thr

GGT GTG CGC AGT ATG GAA CGC GGA ATA ATC TCT GCA GGC CGT AAT AAC GTG
Gly Val Arg Ser Met Glu Arg Gly Ile Ile Ser Ala Gly Arg Asn Asn Val

ACC GGT GAA CAC CAC AGA CCG AAA CTG GAA ACC GTG CGT CTG ACT ATT CCA
Thr Gly Glu His His Arg Pro Lys Leu Glu Thr Val Arg Leu Thr Ile Pro

CGC CGC GTT TAT ACC TAC GCG CAT ATG GAT GTC GTA GCT GAC GGT ATT ATT
Arg Arg Val Tyr Thr Tyr Ala His Met Asp Val Val Ala Asp Gly Ile Ile

AAA CTT TAC CAG CAC AAA GAA GAT ATT CGC GGG CTG AAG TTT ATT TAC GAG
Lys Leu Tyr Gln His Lys Glu Asp Ile Arg Gly Leu Lys Phe Ile Tyr Glu

CCG AAG CAG TTG CGT TTC TTT ACT GCA CGC TTT GAC TAT ATC TAA 1371
Pro Lys Gln Leu Arg Phe Phe Thr Ala Arg Phe Asp Tyr Ile *** 456

Fig.3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the β -tyrosinase.

(N-primer)와 C-terminal 부분의 상보적배열과 제한효소 *Hind* III와 *Bam*HI 배열을 넣은 oligonucleotide primer(c-primer)를 제조하여 25 cycle의 polymerase chain reaction을 수행하였다.

N-primer(21mer) : 5'-AAT TAT CCG GCA GAA CCC TTC-3'

C-primer(35mer) : 5'-CGG ATC CAA GCT TAG ATA TAG TCA
AAG CGT GCA GCA GT-3'

amplify된 DNA fragment의 size는 1.38 kb로서 원하는 DNA fragment임을 확인하였다. 이와같은 DNA fragment를 pHT12I에 insert한 plasmid를 PGY2000으로 명명하였고, 그림 4에 나타내었다. 그리고, expression vector pHT12에 insert하여 제조한 재조합 plasmid를 PGY3000이라 명명하였고, 그림 5에 나타내었으며, pkk233-2에 insert하여 제조한 재조합 plasmid를 PGY4000이라고 명명하였다. (그림 6)

재조합 plasmid PGY2000은 *E. coli* HB101에, PGY3000은 *E. coli* JM109에, PGY4000은 *E. coli* HB101에 transformation한 후, 각각의 재조합균체를 100 µg/ml의 ampicillin이 함유된 LB medium에 배양한 후, 배양된 재조합균체를 모아서 sonication한 후, 얻어진 부세포추출액의 enzyme assay를 한 결과 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 유전공학적 기법에 의해 대량생산된 β-tyrosinase의 역가비교

	units/ml	protein양 (mg/ml)	specific activity (units / mg)
<i>C. freundii</i> KCTC2006	0.93	15.0	0.062
<i>E. coli</i> JM109/PGY2000	15.23	9.806	1.55
<i>E. coli</i> HB101/PGY3000	7.65	5.32	1.44
<i>E. coli</i> HB101/PGY4000	9.33	4.425	2.10

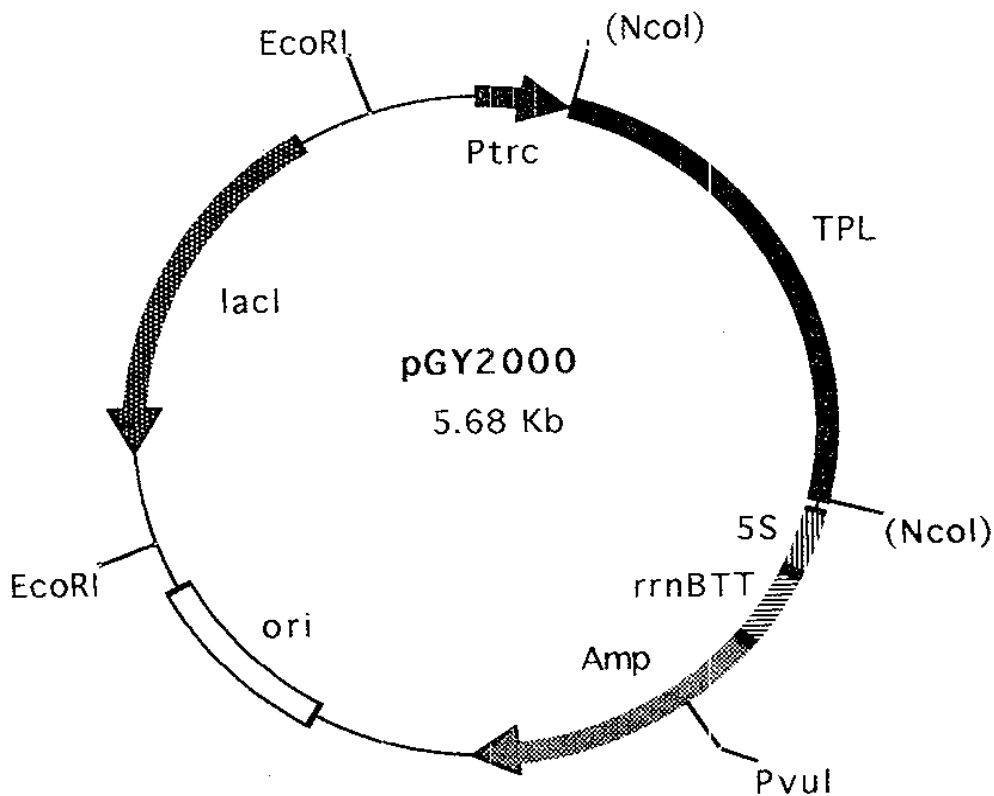


Fig.4. Construction of plasmid pGY2000. The β -tyrosinase gene was amplified from pGY1100 as the template for the polymerase chain reaction (PCR) and was treated with klenow fragment of DNA polymerase. The blunt end fragment (1.38 kb) was recovered from the gel after separation on an agarose gel. This was ligated to the vector DNA (pHT12I) treated with *Nco* I and klenow fragment of DNA polymerase serially. The resulting plasmid was named pGY2000.

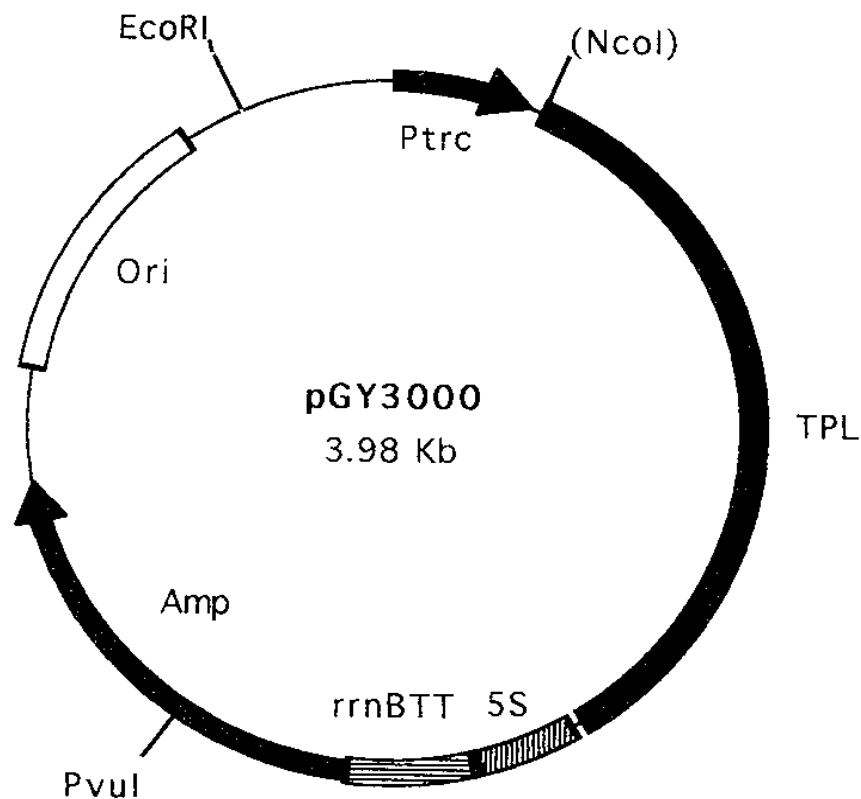


Fig.5. Construction of plasmid pGY3000. The β -tyrosinase gene was amplified from pGY1100 as the template for the polymerase chain reaction (PCR) and was treated with klenow fragment of DNA polymerase. The blunt end fragment(1.38 kb) was recovered from the gel after separation on a agarose gel. This was ligated to the vector DNA(pHT12) treated with *Nco*I and klenow fragment of DNA polymerase serially. The resulting plasmid was named pGY3000.

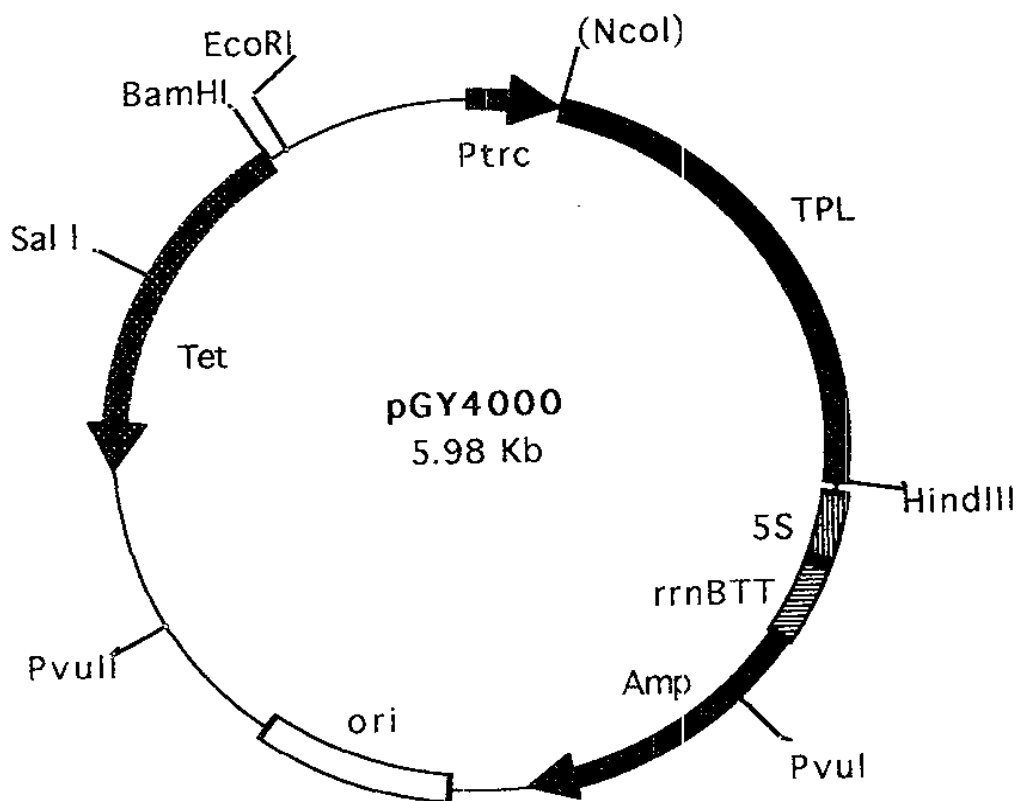


Fig.6. Construction of plasmid pGY4000. The β -tyrosinase gene was amplified from pGY1100 as the template for the polymerase chain reaction (PCR) and was treated with klenow fragment of DNA polymerase and *Hind* III. The blunt end-*Hind* III fragment was recovered from the gel after separation on a agarose gel. This was ligated to the vector DNA (pKK233-2) treated with *Nco* I, Klenow fragment of DNA polymerase, and *Hind* III serially. The resulting plasmid was named pGY4000.

각 재조합균주 모두 wild strain인 *Citrobacter freundii* KCTC 2006 보다 25-35 배 이상 β -tyrosinase의 overproduction을 확인할 수 있었으며 SDS-PAGE을 통하여 β -tyrosinase는 재조합 *E. coli*의 총 가용성 단백질의 30% 이상이었음을 확인하였다.

이와같은 β -tyrosinase 대량생산 재조합 *E. coli*로부터 β -tyrosinase를 대량 생산시킨 후, *E. coli*의 부세포추출액을 만들어 L-DOPA의 합성 및 생산연구를 수행하고자 하였다.

제 3 절 재조합 β -tyrosinase에 의한 L-DOPA의 합성 및 생산

1. L-DOPA 합성 및 생산을 위한 반응조건의 최적화

대량생산된 재조합 β -tyrosinase를 가지고 L-DOPA의 합성 및 생산을 하기 위해서는 substrate인 pyrocatechol과 pyruvate의 농도 영향을 조사하여 최적반응의 초기농도를 결정하여야만 한다. substrate 농도를 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM로 하였을때의 L-DOPA의 생산량을 그림 7에 나타내었다. 그림 7에서 보는 바와같이 20 ~ 40 mM의 기질 농도에서는 L-DOPA의 생산이 비례적으로 증가함을 알수가 있었고, 50 mM의 기질농도에서는 L-DOPA의 생산이 inhibition을 받음을 확인하였다.

따라서, L-DOPA의 생산성을 높이기 위하여서는 기질의 초기농도를 40 mM로 고정하고, 계속적으로 사용된 기질을 첨가하여 주는것이 중요하다고 판단되었다.

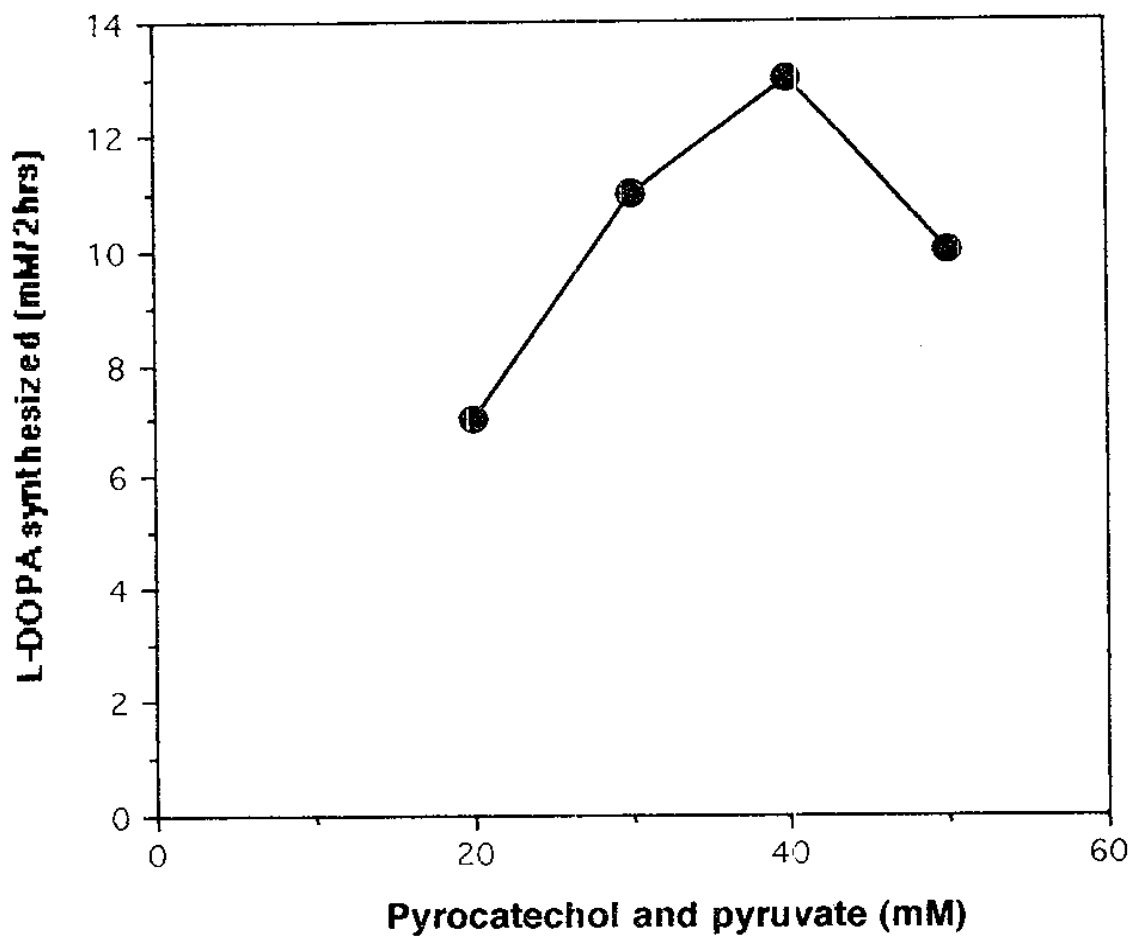


Fig.7. Effect of substrate concentrations on L-DOPA synthesis. The synthesis of L-DOPA(●-●) was carried out at 20°C for 2hrs in the same reaction mixture (pH8.0) described in the materials and methods.

2. 재조합 β -tyrosinase 에 의한 L-DOPA의 합성 및 생산

기질인 pyrocatechol과 pyruvate의 초기농도를 40 mM로 하고, 18 °C에서 18unit의 β -tyrosinase를 사용하여 (반응액 30 ml) L-DOPA의 합성 및 생산을 수행하였다. 2시간 간격으로 소모된 pyrocatechol과 pyruvate의 농도를 측정하여 소모된 량 만큼의 기질을 첨가하여 초기농도인 40 mM을 넘지 않도록 하여 L-DOPA의 생산을 조사하였다. 그 결과 그림 8에서 보는 바와같이 L-DOPA의 생산이 계속 증대됨을 확인할 수 있었다. L-DOPA의 productivity를 조사한 결과 반응 8시간째 60 mM의 L-DOPA가 생산되어 7.5 mM/hr, 즉 1.48 g/l/hr의 L-DOPA productivity를 나타내었다.

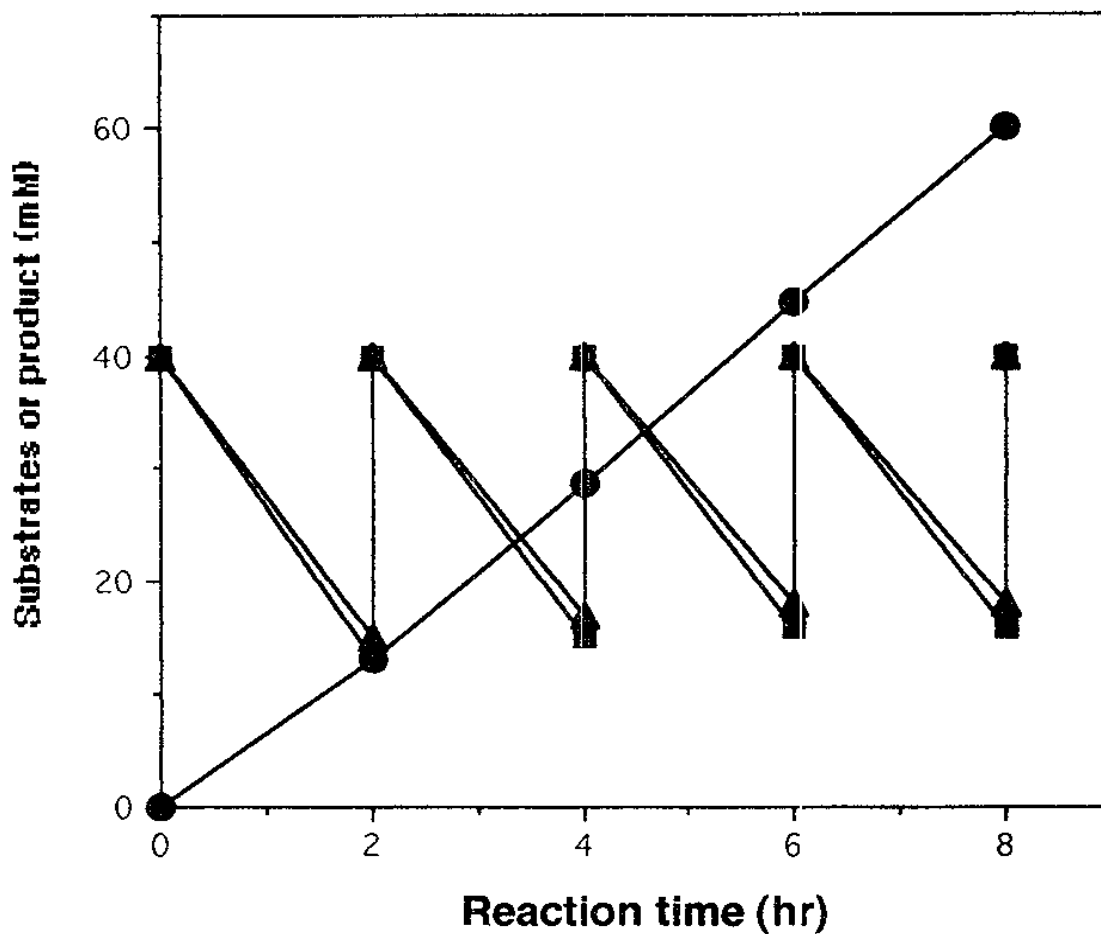


Fig.8. Production of L-DOPA from pyruvate, ammonia, and pyrocatechol. The production of L-DOPA was carried out at 20°C for 8 hrs in the same reaction mixture (pH8.0) described in the material and methods. At 2 hrs intervals, pyrocatechol and pyruvate was added to maintain the initial concentration. In the figure, the substrates are pyrocatechol(■), and pyruvate(▲); the product is L-DOPA(●).

이 페이지는
여러 용도로

제 4 장 결 론

파킨슨병 (parkinson's disease) 등의 노인성 신경장애에 대하여 탁월한 치료효과를 나타내는 의약품아미노산인 L-DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine) 의 합성 및 생산기술을 개발하기 위해서는 L-DOPA 합성이 가능한 다기능효소인 β -tyrosinase를 이용하는 것이 화학합성법보다 앞으로는 더욱 더 유리할 것이라고 판단된다. β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 합성법은 기존의 화학합성법의 제반 문제점의 해결 (D, L형의 racemic DOPA로부터 L-DOPA만을 제조하는 공정등이 필요없으므로 L-DOPA 생산공정의 단순화 가능) 과 환경오염의 문제점을 해결할 수 있으므로 무공해 합성 및 생산공정인 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA 생산방법이 일본에서는 활발히 연구되고 있는 추세이다. β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 합성 및 생산법 개발에 있어서 가장 중요한 key factor는 안정성이 높으며 반응성이 좋은 β -tyrosinase를 대량 생산하는 것에 달려있다. 이와같은 목적을 달성하기 위하여 안정성이 높으며 반응성이 좋은 β -tyrosinase는 집중적이며, 지속적으로 탐색되어야 할 것이라고 생각되며, 고온성 세균으로부터 열에 안정한 β -tyrosinase를 탐색하는 것이 이와같은 목적에 부합된다고 판단된다. 그리고, β -tyrosinase의 대량생산은 확립된 유전공학기술에 의해 소기의 목적을 달성할 수 있음을 확인하였다.

본 연구에서 수행한 재조합 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 생산법 개발도 의미가 있다고 생각되나 보다 높은 생산성의 증가는 원가절감

을 가져오게 하며 국제 경쟁력의 증대를 부여할 수 있다고 판단되어 계속적이고 심도있는 L-DOPA의 생산법의 개발과 보다 안정성이 높고 보다 반응성이 높은 β -tyrosinase의 탐색과 생산기술을 병행하여야 한다고 생각된다.

L-DOPA의 생산법 개발의 방향을 대량생산된 재조합 β -tyrosinase의 고정화 기술에 의한 L-DOPA의 연속생산 방법과 β -tyrosinase 고생산균인 재조합균체의 고정화에 의한 L-DOPA의 연속 생산방법으로 본 연구실에서 개발한 재조합 β -tyrosinase의 효소자체적 생산방법과 장단점을 비교하여 가장 최적의 L-DOPA 합성 및 생산법을 개발하여야 한다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Cotzias, G.C., papvasiliou, P.S., and Gellene, R.,
New Engl. J. Med., **280**, 337 (1969)
2. Jacques, J., Collet, A., Wilen, S.H., "Enantiomers,
Racemates and Resolutions," Wiley - Interscience, New
York (1981)
3. Knowles, W.S., *Acc. Chem. Res.*, **16**, 106 (1983)
4. Knowles, W.S., *J. Chem. Educ.*, **63**, 222 (1986)
5. Enei, H., Masui, H., Okumura, S., and Yamada, S.,
Biochem. Biophys. Res. Com., **43**, 1345 (1971)
6. Enei H., Masui, H., Yamashita, K., Okumura, S., and
Yamada, H., *Agr. Biol. Chem.* **36**, 1861 (1972)
7. Enei, H., Masui, H., Okumura, S., and Yamada, H., *Agr.*
Biol. Chem. **36**, 1869 (1972)
8. Enei, H., Yamashita, K., Okumara, S., and Yamada, H.,
Agr. Biol. Chem., **37**, 485 (1973)
9. Enei, H., Masui, H., Nakazawa, H., Okumura, S., and
Yamada, H., *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 493 (1973)
10. Enei, H., Nakazawa, H., Okumura, S., and Yamada, H.,
Agr. Biol. Chem., **37**, 725 (1973)
11. Suzuki, H., Nishihara, K., Usui, N., Masui, H., and
Kumagai, H., *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 145 (1993)

12. Ajinomoto, Japan Patent 62259589
13. Para, G., Rifai, S., and Baratti, J., *Biotech. Lett.*, **6**, 703 (1984)
14. Para, G. and Baratti, J., *Biocataluysis*, **2**, 39 (1988)
15. Polak, J. and Brzeski, H., *Biotech. Lett.*, **12**, 805 (1990)
16. Iwamori, S., Yoshino, S., Ishiwata, K., and Moriguchi, N., *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 147 (1991)
17. Suzuki, S., Hirahara, T., Shim, J., Horinouchi, S., and Beppu, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 84 (1992)
18. Kumagai, H., Yamada, H., Masui, H., Ohkishi, H., and Ogata, K., *J. Biol. Chem.*, **245**, 1767 (1970)
19. Kumagai, H., Yamada, H., Masui, H., Ohkishi, H., and Ogata, K., *J. Biol. Chem.*, **245**, 1773 (1970)
20. Kumagai, H., Utagawa, T., and Yamada, H., *J. Biol. Chem.*, **250**, 1661 (1975)
21. Carman, G.M. and Levin, R.E., *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 192 (1977)
22. Muro, T., Nakatani, H., Hiromi, K., Kumagai, H., and Yamada, H., *J. Biochem.*, **84**, 633 (1978)
23. Faleev, N.G., Martinkova, N.S., Sadovnikova, M. S., Saporovskaya, M.B., and Belikov, V.M., *Enzyme. Microb. Technol.*, **1**, 269 (1979)

24. Kumagai, H., Masui, H., Ohkishi, H., Ogata, K., Yamada, H., Ueno, T., and Fukami, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 266 (1969)
25. Faleev, N.G., Sadovnika, M.S., Martinkova, N. S., and Belikov, V.M., *Enzyme. Microb. Technol.*, **3**, 219 (1981)
26. Sung, M. H., Tanizawa, K., Masu, Y., Tanaka, H., and Soda, K., *Agr. Biol. Chem.*, **52**, 269 (1988)
27. Berntsson, S., *Anal. Chem.*, **27**, 1659 (1955)
28. Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D.J., *Mol. Biol.*, **41**, 459 (1969)
29. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J., *Gene*, **33**, 103 (1985)
30. Saito, H. and Miura, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619 (1963)
31. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463 (1977)
32. Vallette, F., Mege, E., Reiss, A., and Adesnik, M., *Nucl. Acids. Res.*, **17**, 723 (1989)

이 페이지는

여백입니다.