(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0021106
(43) 공개일자 2011년03월04일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 17/18* (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0078708
(22) 출원일자 2009년08월25일
심사청구일자 2009년08월25일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
윤여준
서울특별시 서초구 잠원동 동아아파트 101-1806
모상준
경기도 군포시 산본동 설악아파트 857동 1004호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인명인

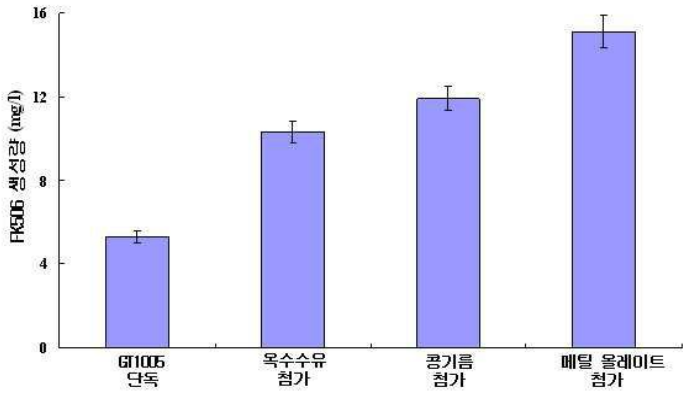
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 스트렙토미세스 균주로부터 에프케이506을 제조하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 스트렙토미세스 균주로부터 FK506을 제조하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 스트렙토미세스 균주를 배양할 때 배지에 MCM 전구체를 첨가함으로써, 균주로부터 FK506을 효율적으로 합성할 수 있도록 한다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

박제원

경기도 고양시 일산서구 대화동 일신건영휴먼빌 602-1405

반연희

서울특별시 서대문구 대현동 이화여자대학교

유영지

서울특별시 서대문구 영천동 삼호아파트 105동 306호

임시규

대구광역시 동구 신암동 신암뜨란채 아파트 109-1901

김동환

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 106-904

유정현

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 두진아파트 102-908

이금순

대전광역시 대덕구 법2동 선비마을1단지아파트 102-1901

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0A-2008-000-20030-0

부처명 교육과학기술부(구 한국과학재단)

연구관리전문기관

연구사업명 기초과학연구지원사업(국가지정연구실사업)

연구과제명 생합성경로 재설계를 통한 당포함 항생제 및 항암제(glycosylated antibiotic and anticancer)의 유도체 개발

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2008년 06월 01일 ~ 2013년 05월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

배지에서 스트렙토미세스 균주를 배양하고 얻은 배양물로부터 FK506을 얻는 단계를 포함하는, FK506를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스트렙토미세스 균주는 스트렙토미세스 클라불리게루스(*Streptomyces clavuligerus*) 균주(KCTC 10561BP)인 것인 방법

청구항 3

MCM 전구체를 포함하는 배지에서 스트렙토미세스 균주를 배양하고 얻은 배양물로부터 FK506을 얻는 단계를 포함하는, FK506를 제조하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 MCM 전구체는 메틸 올레이트를 포함하는 것인, FK506를 제조하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 스트렙토미세스 균주는 스트렙토미세스 클라불리게루스(*Streptomyces clavuligerus*) 균주(KCTC 10561BP)를 포함하는 것인, FK506를 제조하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스트렙토미세스(*Streptomyces*) 균주로부터 FK506을 제조하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] FK506(타크롤리무스, tacrolimus)은 다양한 스트렙토미세스(Streptomyces) 균주에 의해 생성되고 면역억제 활성을 갖는 23-원(23-membered) 폴리케티드(polyketide) 매크롤리드이다. 미국 식품 의약품 안전청(FDA)이 1994년에 간 이식에서 FK506을 면역억제제로 사용하는 것에 대해 허가한 이래, FK506은 고형의 기관 이식 후에 면역억제제 약물로서 인증을 받았다.

[0003] 이러한 FK506의 수 개의 치료적 가능성, 광범위한 적용 가능성 및 약리학적인 중요성으로 인하여, FK506의 생합성 경로를 연구하고, FK506의 합성 수율을 높이고자 하는 연구가 계속되고 있다.

[0004] 도 1은 FK506의 생합성 경로를 나타낸 것이다. FkbA, B, C는 출발 유닛으로서 디히드로시클로헥산 카르복시산(DHCHC)을 사용하고, 확장 유닛으로서 말로닐-CoA, 메틸말로닐-CoA, 프로피오닐말로닐-CoA, 및 메톡시말로닐-ACP를 사용한다. 그런 다음, FkbP는 L-파이프콜릭산 유닛을 결합하고, 매크롤리드 고리를 폐환하게 된다. 그런 다음 FkbD, O 및 M은 FK506을 생성하게 된다.

[0005] 도 2는 상기 메틸말로닐-CoA의 생합성에 관련되는 수 개의 경로를 나타낸 것이다. 상기 경로에는 프로피오닐-CoA 카르복실라제(propionyl-CoA carboxylase, PCC)가 관여하는 경로, 메틸말로닐-CoA 뮤타제(methylmalonyl-CoA mutase, MCM)가 관여하는 경로, 메틸말로닐-CoA 라세마제(methylmalonyl-CoA racemase, MCR)가 관여하는 경로, 말로닐/메틸말로닐-CoA 리가제(malonyl/methylmalonyl-CoA ligase, MatB)가 관여하는 경로, 메틸말로닐-CoA 에피머라제(methylmalonyl-CoA epimerase)가 관여하는 경로가 있다. 그러나, 이러한 수 개의 경로에서 FK506의 생성을 제한하는 경로는 아직 밝혀지지 않았다.

[0006] 이에, 본 발명자는 스트렙토미세스 균주 특히 스트렙토미세스 클라불리게루스(*Streptomyces clavuligerus*) 균주에 MCM을 코딩하는 유전자를 도입한 균주에서 FK506의 생성 효율이 높을 뿐만 아니라, 스트렙토미세스 균주를 배양하는 배지에 MCM 전구체를 포함시켰을 때 FK506의 생성 효율이 높아짐을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 스트렙토미세스 균주로부터 FK506을 효율적으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 스트렙토미세스 균주로부터 FK506을 제조하는 방법을 제공한다.

[0009] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0010] 본 발명은 배지에서 스트렙토미세스 균주를 배양하고 얻은 배양물로부터 FK506을 얻는 단계를 포함하는, FK506를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 스트렙토미세스 균주는 스트렙토미세스 클라불리게루스(*Streptomyces clavuligerus*) 균주(KCTC 10561BP)일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명에서 스트렙토미세스 균주는 메틸말로닐-CoA 뮤타제(MCM)를 코딩하는 *mutA* 유전자와 *mutB* 유전자가 외래로부터 도입되어 게놈에 삽입된 것인 스트렙토미세스 균주를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 MCM을 코딩하는 *mutA* 유전자는 서열번호 1의 유전자 서열을 포함할 수 있고, *mutB* 유전자는 서열번호 2의 유전자 서열을 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 *mutA* 유전자와 *mutB* 유전자는 MCM을 코딩하는 유전자를 포함하는 균주로부터 추출할 수 있다. 예를 들면, *mutA* 유전자와 *mutB* 유전자는 사카로폴리스포라 에리스라에아(*Saccharopolyspora erythraea, S. erythraea*)를 포함하는 사카로폴리스포라 균주로부터 유래될 수 있다.

[0015] 본 발명에서 스트렙토미세스 균주는 스트렙토미세스 클라불리게루스(*Streptomyces clavuligerus*) 균주에 *mutA* 유전자와 *mutB* 유전자가 삽입된 것일 수 있다.

[0016] 본 발명에서 *mutA* 유전자와 *mutB* 유전자를 스트렙토미세스 균주에 삽입하는 방법은 당업계에 통상적으로 알려져 있는 방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0017] 상기 스트렙토미세스 균주의 배양은 스트렙토미세스 균주를 배양하는데 적절하다고 알려진 통상의 배지를 사용할 수 있고, 예를 들면 R2YE 배지를 사용할 수 있다. 스트렙토미세스 균주의 배양은 배양 온도와 배양 시간 등을 적절한 방법으로 조절할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 FK506은 스트렙토미세스 균주를 배양한 후 얻은 배양물로부터 통상적인 방법 예를 들면 배양물로부터 유기 용매 추출 방법을 사용하여 추출할 수 있다. 상기 유기 용매는 에틸 아세테이트를 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 MCM 전구체를 포함하는 배지에서 스트렙토미세스 균주를 배양하고 얻은 배양물로부터 FK506을 얻는 단계를 포함하는, FK506를 제조하는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명에서 MCM 전구체는 메틸 올레이트(methyl oleate)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0021] 본 발명에서 배지는 스트렙토미세스 균주를 배양하는데 적절하다고 알려진 통상의 배지를 사용할 수 있고, 예를 들면 R2YE 배지를 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 배지는 MCM 전구체를 배지 중량에 대하여 0.005g/g 중량부의 농도로 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서 스트렙토미세스 균주는 야생형(wild-type) 스트렙토미세스 균주, 또는 메틸말로닐-CoA 뮤타제를 코

딩하는 *mutA* 유전자와 *mutB* 유전자가 외래로부터 도입되어 게놈에 삽입된 것인 스트렙토미세스 균주를 포함할 수 있다. 상기 야생형 스트렙토미세스 균주는 기탁번호 KCTC 10561BP를 가질 수 있다.

[0024] 본 발명에서 스트렙토미세스 균주의 배양은 배양 온도와 배양 시간 등을 적절한 방법으로 조절할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 FK506은 스트렙토미세스 균주를 배양한 후 얻은 배양물로부터 통상적인 방법 예를 들면 배양물로부터 유기 용매 추출 방법을 사용하여 추출할 수 있다. 상기 유기 용매는 에틸 아세테이트를 포함할 수 있다.

효 과

[0026] 본 발명은 균주로부터 FK506를 효율적으로 합성할 수 있도록 한다.

[0027] 또한, 본 발명은 스트렙토미세스 균주를 배양할 때 배지에 MCM 전구체를 첨가함으로써, 균주로부터 FK506를 효율적으로 합성할 수 있도록 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명을 실시예에 의해 더 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0029] **<박테리아 균주와 플라스미드>**

[0030] FK506을 생성하는 *S. clavuligerus* GT1005 균주(KCTC 10561BP)는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures) 유전자 은행(대한민국, 대전)으로부터 얻었다. 클로닝 숙주로는 대장균 균주 DH10B를 사용하였다. *S. clavuligerus* GT1005 균주와의 유전자 간 교잡(conjugation)을 위한 메틸화되지 않은 플라스미드 도너(donor) 균주는 대장균 ET12567/pUS8002를 사용하였다. 서브클로닝(subcloning)을 위해서는 Litmus 28(New England Biolabs, Bevery, MA, USA)를 사용하였다. *S. clavuligerus* GT1005 균주의 유전자 발현을 위해서는 *ermE** 프로모터(P_{ermE*})를 포함하는 대장균-스트렙토미세스 벡터 pSET152 유도체를 사용하였다.

[0031] *S. clavuligerus* GT1005 균주(KCTC 10561BP)의 포자를 ISP(International Streptomyces Project) 아가 플레이트(10g 용해성 전분, 1g 디포타슘 포스페이트, 1g 황산 마그네슘, 1g 염화 나트륨, 2g 황산 암모늄, 2g 탄산칼슘, 20g 아가, 0.001g 황산 제2철, 0.001g 염화 망간, 0.001g 황산 아연, 1000ml 증류수)에서 생성하였고, R2YE 브로쓰(broth)(103g 수크로스, 0.25g 황산 칼륨, 10.12g 염화망간 육수화물(hexahydrate), 10g 글루코스, 0.1g casaminoacid, 800ml 증류수, 10 ml 제1인산 칼륨(0.5%), 80 ml 염화칼슘 탈수화물(3.68%), 15 ml L-프릴린(praline)(20%), 100ml TES 완충액(5.37%, pH7.2), 2 ml 미량 원소 용액, 5 ml NaOH (1N), 50 ml 효모 추출물 (10%))에서 시드 배양물(seed culture)을 제조하였다. pH 7.2의 R2YE 50 ml를 포함하는 250 ml 플라스크에 상기 제조한 시드 배양물 500 ㎕를 접종하고, 6일 동안 28℃에서 오르비탈 교반기(orbital shaker)(180 rpm)에서 배양시킴으로써 FK506을 생성하였다.

[0032] **실시예 1: 메틸 올레이트 첨가에 의한 FK506 생성 촉진**

[0033] *S. clavuligerus* GT1005 균주(KCTC 10561BP)의 포자를 ISP(International Streptomyces Project) 아가 플레이트(효모 추출물(Difco), 4.0, g. 맥아 추출물 (Difco), 10.0, g 덱스트로스(Difco), 4.0, g. 아가, 20.0, g. 증류수, 1000.0, ml)에서 생성하였고, R2YE 브로쓰(broth)(103g 수크로스, 0.25g 황산 칼륨, 10.12g 염화망간 육수화물, 10g 포도당, 0.1g casaminoacid, 800ml 증류수, 10 ml 제1인산 칼륨(0.5%), 80 ml 염화칼슘 탈수화물(3.68%), 15 ml L-프릴린(20%), 100ml TES 완충액(5.37%, pH7.2), 2 ml 미량 원소 용액, 5 ml NaOH (1N), 50 ml 효모 추출물(10%))에서 시드 배양물(seed culture)을 제조하였다. pH 7.2의 R2YE 배지 50 ml를 포함하는 250 ml 플라스크에 상기 제조한 시드 배양물 500 ㎕를 접종하였다. 그런 다음 6일 동안 28℃에서 배양시켰다. 이때, 균주의 배양 초기에, 옥수수유, 콩기름 또는 메틸 올레이트(시그마 알드리치로부터 구입함)를 5 g/L의 농도로 상기 R2YE 배지에 첨가한 후 균주를 배양시켰고, 생성된 FK506을 측정하였다.

[0034] 생성된 FK506의 함량은 HPLC로 결정하였다. 균주 배양 후에 배양 브로쓰 50 ml를 동일한 양의 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 얻은 유기 추출액을 감압 하에서 용매를 제거하였고, 메탄올 0.2ml에 용해시켜 HPLC 분석을 실시하였다. 얻은 용액의 일 부분으로 HPLC 분석을 실시하였다. HPLC 분석은 Supelco Discovery HS C_{18} 컬럼 (Bellefonte, PA, USA)을 이용한 Waters(Milford, MA, USA) 모델 2690 분리 모듈로 수행하였다. 컬럼은 50℃ 온도를 유지하였다. 용리는 1 ml/분의 유속 및 아세토니트릴(0.1% 인산 포함) 20%부터 100%로 선형 농도 구배로 실시하였다. FK506 검출은 250 nm에서 측정하였다. FK506 표준 물질(시그마 알드리치, St Louis, MO, USA)을

사용하여 HPLC 분석에 의한 FK506 측정의 보정 곡선을 만들어 사용하였다. 측정된 FK506 수준은 2번의 측정 실험의 평균이다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0035] 도 3에서 나타난 바와 같이, 콩기름 또는 옥수수유를 포함하는 배지에서 기른 균주에 비하여, 메틸 올레이트를 포함하는 배지에서 기른 균주가 FK506의 생성이 약 11 mg/L로 최대가 되었다. 따라서, 배지에 첨가된 메틸 올레이트가 FK506의 생성을 촉진시켰음을 알 수 있다.

[0036] **실시예 2: 메틸 올레이트 첨가에 의한 균주 생성 정도 및 FK506 생성 촉진**

[0037] 메틸 올레이트를 10mM 농도로 첨가한 배지에서 *S. clavuligerus* GT1005 균주(KCTC 10561BP)를 배양한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 균주를 배양시켰다. 그런 다음, 균주의 생장 정도와 생성된 FK506을 측정하였다. 비교를 위하여, 대조군으로서 메틸 올레이트 10 mM을 첨가하지 않고 *S. clavuligerus* GT1005 균주(KCTC 10561BP)를 배양하면서 균주의 성장 정도와 FK506의 생성량을 측정하였다.

[0038] 균주의 생장 정도는 시드 배양물을 접종한 때로부터 24시간 후에, 24시간 마다 배양 브로쓰 50ml를 수집하여 측정하였다. 배양 브로쓰를 진공 여과하고, 미리 무게를 단 여과 종이(Whatman filter paper No. 1) 위에서 균사체를 수집하였다. 시료를 증류수로 2회 세척하였고, 균사체를 포함하는 여과 고체를 65℃에서 건조시켰고, 무게를 재었다. 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0039] 생성된 FK506의 함량은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0040] 도 4a에서 나타난 바와 같이, 메틸 올레이트를 첨가한 경우가 메틸 올레이트를 첨가하지 않은 경우에 비하여 균주의 생성과 FK506의 생성이 각각 1.7배, 2.5배 더 높았다. 따라서, 배지에 메틸 올레이트를 첨가하는 것은 균주의 성장과 FK506의 생성을 촉진시킴을 알 수 있다.

[0041] **실시예 3: 첨가되는 메틸 올레이트 농도에 따른 FK506 생성 촉진**

[0042] 메틸 올레이트를 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM 및 50 mM의 농도로 첨가한 배지에서 균주를 배양한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 균주를 배양시켰다. 그로부터 생성된 FK506의 함량을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과를 도 4b에 나타내었다.

[0043] 도 4b에서 나타난 바와 같이, 메틸 올레이트를 10 mM을 첨가하였을 때 FK506의 생성이 최대가 되었다. 따라서, 배지에 0.005g/g의 농도로 첨가된 메틸 올레이트는 균주로부터 FK506의 생성을 촉진시켰음을 알 수 있다.

[0044] **실시예 4: 돌연변이 균주 제조 및 이로부터 생성된 FK506**

[0045] (1) 시료 준비

[0046] 플라스미드 추출과 조작은 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)와 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)를 사용하여 실시하였다. PCR 생성물의 정제는 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)를 사용하여 실시하였다. 게놈 DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분리하였다.

[0047] 게놈 DNA 분리를 위하여, 사카로폴리스포라 에리스라에아(*Saccharopolyspora erythraea, S. erythraea*), 스트렙토미세스 코엘리칼라 A3(2)(*Streptomyces coelicolor, S. coelicolor* A3(2)), 및 살모넬라 티피무리움 LT2 STCC 29631(*Salmonella typhimurium* LT2 ATCC 29631, *S. typhumurium* LT2 ATCC 29631)을 각각 SCM(15g 용해성 전분, 20g 소이톤(soytone), 15g 효모 추출물(yeast extract), 10.5g MOPs, 0.1g 염화 칼슘, 1000 ml 증류수), YEME(Yeast extract-malt extract medium, 3g 효모 추출물, 5g 펩톤, 3g 맥아 추출물, 10g 포도당, 340g 수크로스, 1000ml 증류수, 2ml 염화망간 육수화물(2.5M), 25ml 글리신 (20%)) 및 영양 브로쓰(nutrient broth)(3g 쇠고기 엑스(beef extract), 5g 펩톤, 1000ml 증류수)에서 배양하였다. 세포들을 원심분리로 수확하였고 증류수로 2회 세척하였고, 그런 다음 게놈 DNA를 추출하였다. PCR 반응은 GC-Rich PCR system(Roche, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 실시하였다.

[0048] 대장균을 기르기 위해서, Luria-Bertani(LB)(10g 트립톤, 5g 효모 추출물, 10g 염화나트륨, 1000 ml 증류수), SOB(Super Optimal Broth 5g 효모 추출물, 20g 트립톤, 10.5g 염화나트륨, 10 ml 염화칼륨(0.25M), 5ml 염화망

간(2M), 1000ml 증류수) 및 SOC(Super Optimal Broth with Catabolite repression, 5g 효모 추출물, 20g 트립톤, 10.5g 염화나트륨, 10 ml 염화칼륨 (0.25M), 5ml 염화망간(2M), 20 ml 포도당 (1M), 1000ml 증류수) 액체 배지를 사용하였다. 앰피실린(100㎍/ml), 아프라마이신(50㎍/ml), 클로람페니콜(25㎍/ml), 카나마이신(50㎍/ml) 및 날리딕산(25㎍/ml)은 시그마 알드리치(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 성장 배지에 첨가하여 사용하였다.

[0049] (2) 돌연변이 균주 GT1005/pYJ1122, GT1005/pYJ270 및 GT1005/pYJ269 제조

[0050] ① GT1005/pYJ1122 균주 제조

[0051] MCM 경로에 관련된 효소를 코딩하는 유전자(*mutA*, *mutB*)를 *ermE** 프로모터를 포함하는 플라스미드 발현 플라스미드 pSET152 유도체에 클로닝하여, pYJ1122를 생성하였다.

[0052] MCM의 작은 서브유닛을 코딩하는 *mutA* 유전자는 *S. erythrae* NRRL2338 게놈 DNA의 PacI-XbaI PCR 단편으로 얻었고 이를 Litmus 28에 삽입하였다. *mutA*를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 각각 PacI, SpeI, XbaI, XhoI 부위(밑줄 그은 부분)를 포함하는 정방향 프라이머 5'-TTAATTAAACTAGTCTGTCCGGCGCGACAAGCGTC-3'(서열번호 3)와, 역방향 프라이머 5'-TCTAGACACCTCGAGCGAGCCGGCCAG-3'(서열번호 4)를 사용하였다. MCM의 큰 서브유닛을 코딩하는 *mutB* 유전자는 *S. erythrae* NRRL2338 게놈 DNA의 XhoI-XbaI PCR 단편으로 얻었고 이를 *mutA* 유전자를 포함하는 Litmus 28의 동일한 부위에 삽입하였다. *mutB*를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 각각 XhoI와 XbaI 부위(밑줄 그은 부분)를 포함하는 정방향 프라이머 5'-CTGGCCGGCTCGCTCGAGGTG-3'(서열번호 5)와, 역방향 프라이머 5'-TCTAGAGGTCAGCCCGCGCTCGACG-3'(서열번호 6)를 사용하였다. 그 결과 얻은 Litmus 28로부터 *mutA*와 *mutB* 유전자의 PacI-XbaI 단편을 얻었고, *ermE** 프로모터를 포함하는 pSET152 유도체의 PacI-XbaI 부위와 라이게이션(ligation)시켜 돌연변이 균주 pYJ1122를 얻었다.

[0053] ② GT1005/pYJ270 균주 제조

[0054] 말로닐/메틸말로닐-CoA 리가제(*matB*)와 메틸말로닐-CoA 에피머라제 경로에 관련된 효소를 코딩하는 유전자를 *ermE** 프로모터를 포함하는 플라스미드 발현 플라스미드 pSET152 유도체에 클로닝하여, pYJ270을 생성하였다.

[0055] *matB* 유전자와 에피머라제 유전자를 *S. coelicolor* A3(2) 게놈 DNA의 BglII-PstI 및 PstI-XbaI PCR 단편으로 얻었고, Litmus 28에 삽입하였다. *matB* 유전자를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로, 각각 BglII과 PstI 부위를 포함하는 정방향 프라이머 5'-TCTCGCGGATCCGGCGCGATCCGGCAGCCT-3'(서열번호 7)와 역방향 프라이머 5'-ACTCCCCTGCAGTCAGGCGCTCAGTCACGG-3'(서열번호 8)를 사용하였다. 얻은 PCR 생성물을 BglII-PstI으로 소화(digestion)시켰고, Litmus 28의 동일한 부위에 라이게이션(ligation)시켰다. 에피머라제 유전자를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 각각 PstI와 XbaI 부위(밑줄 그은 부분)을 포함하는 정방향 프라이머 5'-GAGGGTCTGCAGGAATGTACTGAGCGGTATCCC-3'(서열번호 9)와, 역방향 프라이머 5'-ACTCCCCTGCAGTCAGGCGCTCAGTCACGG-3'(서열번호 10)를 사용하였다. 얻은 PCR 생성물을 PstI-XbaI로 절개(excision)하였고, *matB* 유전자를 포함하는 Litmus 28의 동일한 부위에 삽입하였다. 그 결과 얻은 Litmus 28로부터 *matB* 유전자와 에피머라제 유전자의 BglII-XbaI 단편을 얻었고, 이를 *ermE** 프로모터를 포함하는 pSET152 유도체의 BamHI-XbaI 부위와 라이게이션(ligation)시켜, pYJ270을 얻었다.

[0056] ③ GT1005/pYJ269 균주 제조

[0057] 프로피오닐-CoA 카르복실라제(PCC) 경로에 포함되는 효소를 코딩하는 유전자(*accAI*, *pccB*)와 프로피오닐-CoA 신세타제(synthetase) 유전자(*prpE*)를 *ermE** 프로모터를 포함하는 플라스미드 발현 플라스미드 pSET152 유도체에 클로닝하여, pYJ269를 생성하였다.

[0058] *accAI*와 *pccB* 유전자는 *S. coelicolor* A3(2) 게놈 DNA의 BglII-NsiI 및 NsiI-HindIII PCR 단편으로 얻었고, *prpE* 유전자는 *S. typhumurium* LT2 ATCC 29631 게놈 DNA의 HindIII-XbaI PCR 단편으로부터 얻었다. *accAI*를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 각각 BglII와 NsiI 부위(밑줄 그은 부분)를 포함하는 정방향 프라이머 5'-ACGTTCAGATCTTGACTGTTCCGAACAGGG-3'(서열번호 11)와, 역방향 프라이머 5'-ATCGTGATGCATGTCGTCATCGTTCAGTCC-3'(서열번호 12)을 사용하였다. 얻은 PCR 생성물을 BglII-NsiI으로 소화시켰고, Litmus 28의 동일한 부위에 라이게이션 시켰다. *pccB*를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, NsiI와 HindIII 부위(밑줄 그은 부분)를 포함하는 정방향 프라이머로 5'-ATCTCGATGCATCATGCAACCCACCCTAGG-3'(서열번호 13)와 역방향 프라이머 5'-TGGTCAAAGCTTCTCCTTACAGGGGGATGT-3'(서열번호 14)를 사용하였다. 얻은 PCR 생성물을 NsiI-HindIII으로 소화시켰고, *accAI* 유전자를 포함하는

Litmnus 28의 동일한 부위에 라이게이션 시켰다. *prpE* 유전자를 증폭하기 위하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 각각 HindIII와 XbaI 부위(밑줄 그은 부분)를 포함하는 정방향 프라이머 5'-CCAGCAAAGCTTCATTCTGGATGTCTCCCTGGA-3'(서열번호 15)와, 역방향 프라이머 5'-CCACTATCTAGACGCTGAGTCTAACCCGTT-3'(서열번호 16)를 사용하였다. 얻은 PCR 생성물을 HindIII-XbaI로 소화시켰고, *accAI*와 *pccB* 유전자를 포함하는 Litmus 28의 동일한 부위에 라이게이션 시켰다. 그 결과 얻은 Litmus 28로부터 *accAI*, *pccB*, 및 *prpE* 유전자를 포함하는 BglII-XbaI 단편을 얻었고, 이를 *ermE** 프로모터를 포함하는 pSET152 유도체의 BamHI-XbaI 부위와 라이게이션(ligation)시켜, pYJ269를 얻었다.

[0059] 상기 얻은 pYJ1122, pYJ270 및 pYJ269를 대장균 ET12567/pUZ8002의 칸쥬게이션에 의하여 *S. clavuligerus* GT1005에 주입하였고, 얻은 균주를 배양시킨 다음, 표준 프로토콜을 사용하여 배지 1 ml 당 아파마이신 50 mg 존재 하에서 칸쥬게이션된 균주(GT1005/pYJ1122, GT1005/pYJ270, GT1005/pYJ269)를 선택하였다.

[0060] (3) 각각의 돌연변이 균주로부터 생성된 FK506 측정

[0061] 상기 실시예 1에서 기술된 방법과 동일한 방법을 사용하여, 상기 돌연변이 균주를 배양하였고, 이로부터 생성된 FK506을 측정하였다. 비교를 위하여, 돌연변이 시키지 않은 *S. clavuligerus* GT1005에 의해서도 동일한 방법을 실시하였다.

[0062] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0063] 도 5에서 나타난 바와 같이, GT1005/pYJ1122에서 FK506의 생성과 메틸말로닐-CoA 생성이 현저하게 증가되었다. 또한, 도 6에서 나타난 바와 같이, GT1005/pYJ1122에서는 *S. clavuligerus* GT1005에 비하여 메틸말로닐-CoA 수준이 약 3배 증가하였고, 숙시닐-CoA 수준이 3.5배 감소하였다.

[0064] (4) GT1005/pYJ1122 균주에 메틸 올레이트를 추가한 경우

[0065] 상기 실시예 1에서 기술된 방법과 동일한 방법을 사용하여, (i) *S. clavuligerus* GT1005 균주, (ii) GT1005/pYJ1122 균주, 및 (iii) GT1005/pYJ1122 균주에 메틸 올레이트를 추가한 후, 균주를 배양하였고, 이로부터 생성된 FK506을 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0066] 도 7에서 나타난 바와 같이, GT1005/pYJ1122 균주는 *S. clavuligerus* GT1005 균주에 비하여 FK506의 생성이 1.5배 증가하였다. 또한, GT1005/pYJ1122 균주에 메틸 올레이트를 추가하였을 때에는, *S. clavuligerus* GT1005 균주에 비하여 FK506의 생성이 2배 증가하였다.

[0067]

[0068] **실시예 5: 세포내 아실-CoA 프로파일의 분석**

[0069] (1) 시료 준비

[0070] 세포내 아실-CoA를 분석하기 위해서, 트리클로로아세트산(TCA), CoA, 아세틸-CoA("Ac-"), 말로닐-CoA("Ma-"), 메틸말로닐-CoA("Me-"), 숙시닐-CoA("Su-"), 및 프로피오닐-CoA("Pr-")는 시그마-알드리치로부터 구입하였다. 실리콘 오일, AR200 및 DC200은 Fluka Chemie GmbH(Buchs, 스위스)로부터 구입하였다. SPE(Solide Phase Extraction) 카트리지(OASIS HLB 3cc/60 mg)과 진공 매니폴드(manifold)는 Waters로부터 구입하였다. 에틸말로닐-CoA("Et-")는 Taoka et al.(Taoka et al., J Biol Chem, Inhibition of the human methylmalonyl-CoA mutase by various CoA-esters, 1994, 269, 31630-31634)에서 개시된 방법을 변형시켜 합성하였다.

[0071] (2) 세포내 아실-CoA 프로파일의 분석

[0072] *S. clavuligerus* CKD 1119 또는 상기 제조한 S. clavuligerus CKD 1119/pYJ1122를 R2YE 배지에서 28℃에서 배양시켰다. 배양시키고 6일째 되는 날에, 균주 배양물을 진공 여과에 의해 여과시켜, 균사체를 여과지에 모았고, 증류수로 2회 세척하였고, 미리 무게를 잰 튜브에 옮겨 균주의 바이오매스(biomass)를 재었다. Park et al(J Mass Spectrom 42:1136-47)에 기재된 방법을 변형시켜, 균사체 추출물을 제조하였고 세포내 아실-CoA를 분석하였다.

[0073] 메틸 올레이트를 10mM 농도로 R2YE 배지에 첨가하고 상기와 동일한 방법으로 균주를 배양하였고, 배양하고 3일째 되는 날에 *S. clavuligerus* CKD 1119 균사체를 상기와 동일한 방법으로 모았고, 상기와 동일한 방법으로 균주의 바이오매스를 측정하였다. 각각의 측정에 있어서, 세포 중량을 측정하였고 이를 세포 함량으로 조절하였다. Park et al(J Mass Spectrom 42:1136-47)에 기재된 방법을 변형시켜, 균사체 추출물을 제조하였고 세포내 아실-CoA를 분석하였다.

[0074] 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0075] <표 1>(단위: pmol/세포 중량±표준 편차(n=2))

[0076]

배양 배지	CoA	Ac-	Ma-	Pr-	Su-	Me-	Et-	전체
R2YE배지	46±6	29±4	77±8	99±6	36±4	121±14	53±3	461±45
메틸 올레이트가 첨가된 R2YE 배지	955±37	782±38	45±5	85±6	125±12	1521±48	48±6	3561±152

[0077] 상기 표 1에서 살핀 바와 같이, FK506의 생성이 최대가 되었을 때, 메틸 말로닐-CoA는 메틸 올레이트가 없는 배지에 비하여 메틸 올레이트가 있는 배지에서 자란 *S. clavuligerus* CKD 1119 균주에서 12.5배 더 높았음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 FK506의 생합성 경로를 나타낸 것이다.

[0079] 도 2는 메틸말로닐-CoA의 생합성에 관련되는 경로(MCM, MatB/MCE, PCC 등)를 나타낸 것이다.

[0080] 도 3은 콩기름, 옥수수유 또는 메틸 올레이트를 포함하는 R2YE 배지에서 *S. clavuligerus* GT1005 균주를 길렀을 때 생성된 FK506의 함량을 나타낸 것이다.

[0081] 도 4a는 메틸 올레이트를 포함하는 R2YE 배지에서 *S. clavuligerus GT1005* 균주를 길렀을 때 균주의 성장 정도와 FK506의 생성량을 나타낸 것으로, (■)은 메틸 올레이트가 없는 R2YE 배지로부터 생성된 FK506의 생성량, (●)은 메틸 올레이트가 있는 R2YE 배지로부터 생성된 FK506의 생성량, (□)은 메틸 올레이트가 없는 R2YE 배지로부터 생성된 균주의 성장량, (○)은 메틸 올레이트가 있는 R2YE 배지로부터 생성된 균주의 성장량을 나타낸 것이고, 도 4b는 배지에 포함된 메틸 올레이트의 농도와, 이로부터 생성된 FK506의 생성량을 나타낸 것이다.

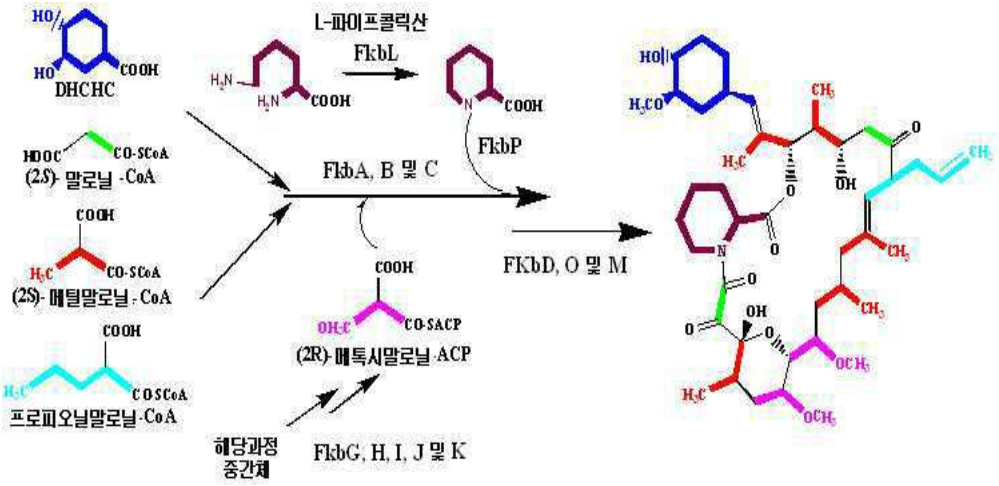
[0082] 도 5는 배지에서 GT1005/pYJ1122, GT1005/pYJ270 또는 GT1005/pYJ269를 배양하였을 때 생성된 FK506의 생성량을 나타낸 것이다.

[0083] 도 6은 *S. clavuligerus* GT1005 균주 또는 GT1005/pYJ1122를 배양하였을 때 메틸말로닐-CoA와 숙시닐 CoA의 함량 변화를 나타낸 것이다.

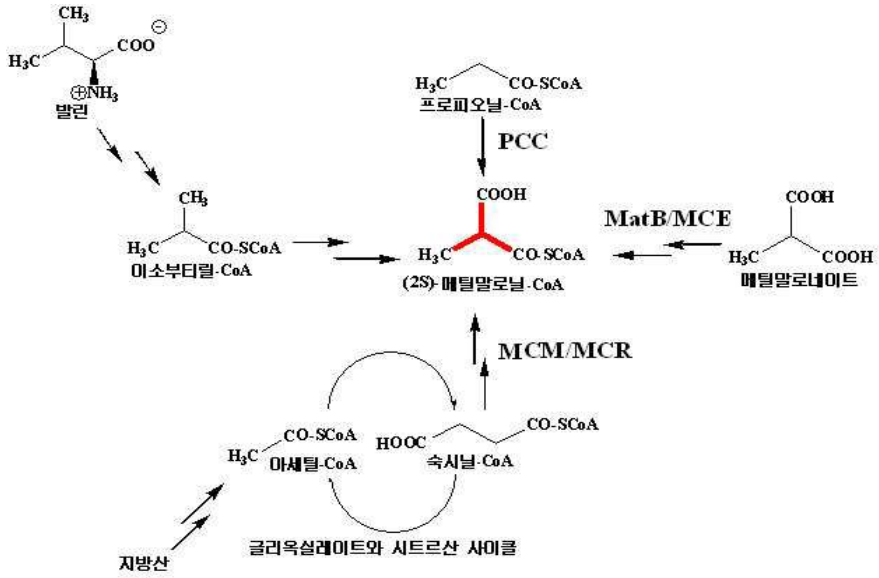
[0084] 도 7은 (i) *S. clavuligerus* GT1005 균주, (ii) GT1005/pYJ1122 균주, (iii)GT1005/pYJ1122에 메틸 올레이트를 추가한 경우에 생성되는 FK506의 생성량을 나타낸 것이다.

도면

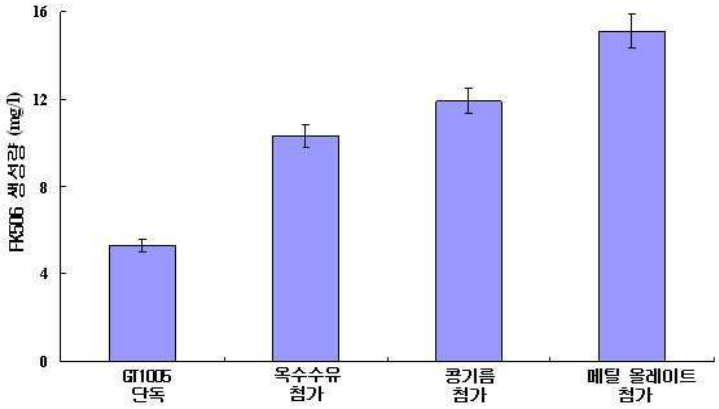
도면1


DHCHC
L-파이프콜릭산
FkbL
FkbP
(2S)-말로닐-CoA
FkbA, B 및 C
(2S)-메틸말로닐-CoA
(2R)-메톡시말로닐-ACP
FKbD, O 및 M
프로피오닐말로닐-CoA
해당과정 중간체
FkbG, H, I, J 및 K

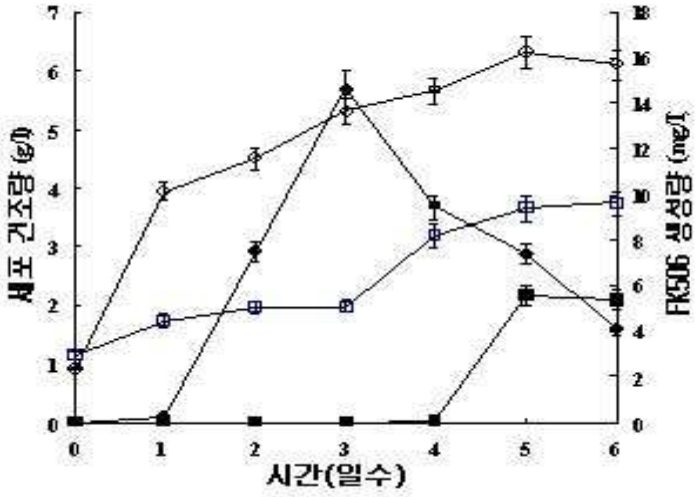
도면2


발린
이소부티릴-CoA
프로피오닐-CoA
PCC
(2S)-메틸말로닐-CoA
MatB/MCE
메틸말로네이트
MCM/MCR
아세틸-CoA
숙시닐-CoA
지방산
글리옥실레이트와 시트르산 사이클

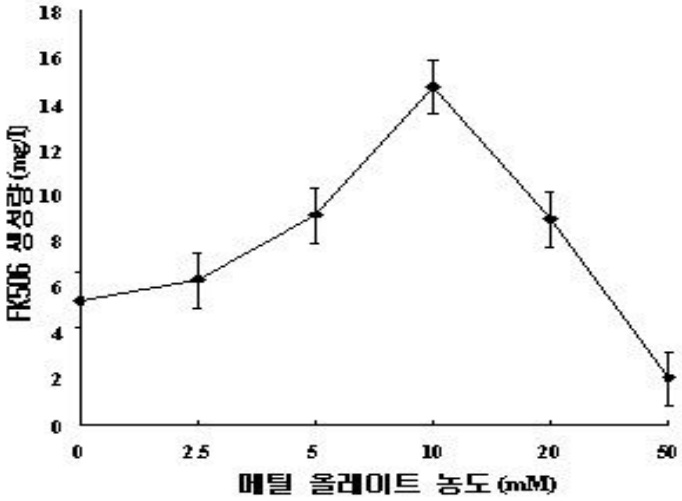
도면3


FK506 생성량 (mg/l)
16
12
8
4
0
GT1005
단독
옥수수유
첨가
콩기름
첨가
메틸 올레이트
첨가

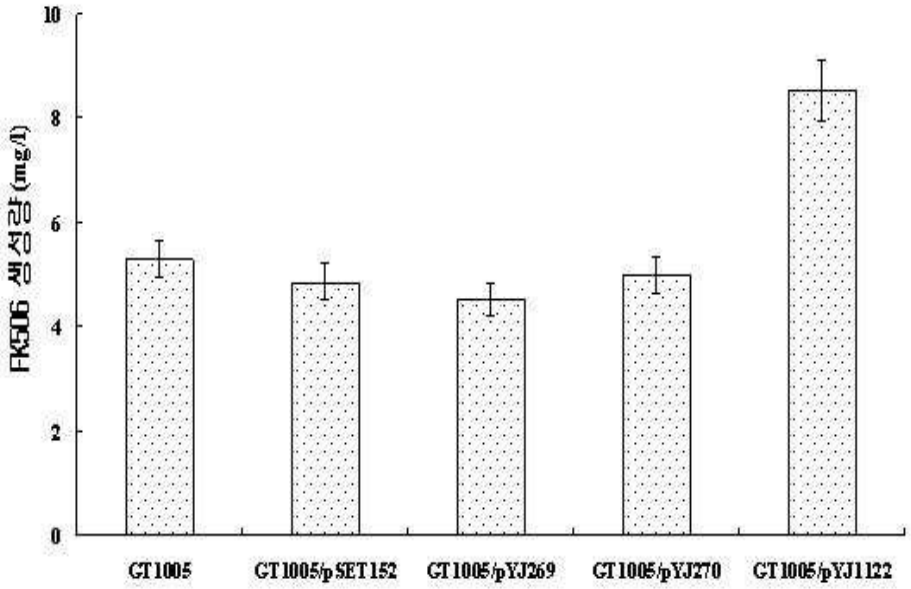
도면4a


세포 건조량 (g/l)
FK506 생성량 (mg/l)
시간(일수)
0
1
2
3
4
5
6

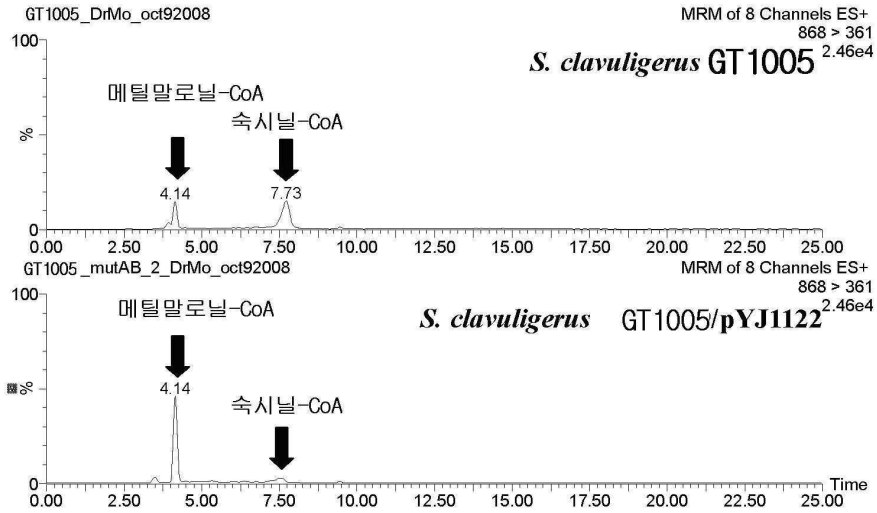
도면4b


FK506 생성량 (mg/l)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
2.5
5
10
20
50
메틸 올레이트 농도 (mM)

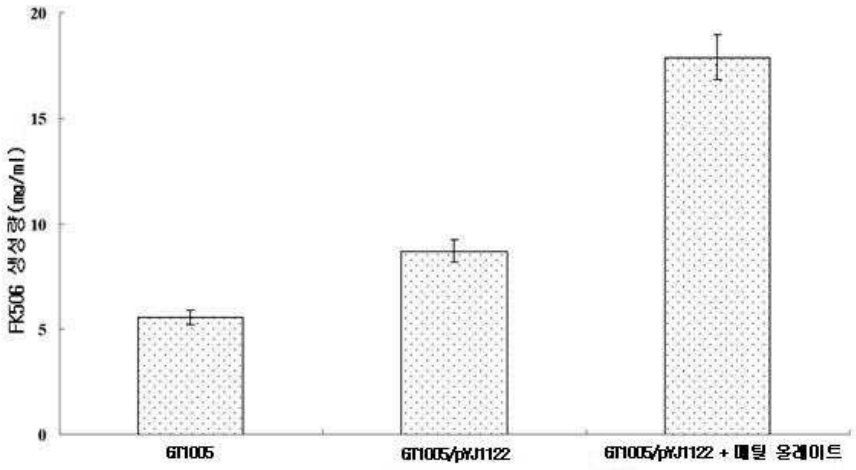
도면5


FK506 생성량 (mg/l)
10
8
6
4
2
0
GT1005
GT1005/pSET152
GT1005/pYJ269
GT1005/pYJ270
GT1005/pYJ1122

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> EWHA WOMANS UNIVERSITY

<120> Streptomyces species having an enhanced FK506 production and a method for producing FK506 from the Streptomyces species

<130> PN00000

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1857
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutA

<400> 1
gtggcgcact cgacgacgag cgacgggccg gagctgcccc tggcggccga gttccccgag 60

cccgcccggc agcagtggcg gcaacaggtg gagaaggtcc tgcgcaggtc gggtctgctg 120

cccgagggca ggcccgcgcc ggagccggtc gaggacgtgc tcgccagcgc cacctacgac 180

ggcatcaccg tgcacccgct ctacaccgag ggtcccgcat ccagcggcgt cccgggcctg 240

gcgccctacg tgcgcggcag ccgggcgcag ggctgcgtca gcgagggctg ggacgtccgc 300

cagcaccacg cccaccccga cgcctcggag accaaccgcg agatcctggc cgacctctac 360

aacggcacga cctcgctgtg gctggagctc gggccgaccg ggctgccggt ggactcgctg 420

gccgacgccc tcgaaggcgt ccacctggac atgatcggcg tcgtgctcga cgccggtgac 480

gaggcggcgc gggccgcgtc ggcgttgctg gagctcgcgc gggagcaggg ggtgcggccc 540

agcgcgctgc gcgccaacct gggcgccgac ccgctgagca cctgggctcg caccgggcag 600

gaacgcgacc tgggcctcgc cgccgaggtc gccgcgcact gcgcgtcgca cccgggcctg 660

cgcgcgatca ccgtcgacgg cctgccctac cacgaggcgg gcggctccga cgccgaggag 720

ctcggctgct cgatcgccgc gggcgtcacc tacctgcggg tgctggccgg tgagctcggt 780

gccgaggccg cgagcgggct gctggagttc cgctacgccg ccaccgccga ccagttcctg 840

accatcgcca agctgcgcgc ggcccgcagg ctgtgggagc gggtgacgcg ggagatcggc 900

gtcgccgagc gcgcgcagct ccagcacgcg gtcacctcct cggcgatgct gacgcgccgc 960

gacccgtggg tgaacatgct gcgcaccacg atcgccacgt tcgccgcagg cgtgggcggc 1020

gcgcggtcgg tcaccgtgcg cccgttcgac gccgcgatcg ggctgccgga ccccttctcc 1080

cggcgcatcg cccgcaacac ccagtcgctg ctgctggagg agtcgcacct ggcgcaggtg 1140

atcgacccgg cgggcggttc ctggtacgtc gagacgctga ccgacgaact ggcgcacaag 1200

gcgtgggagt ggttccggcg catcgaggcc gagggcgggc tgcccgccgc gctgcgctcg 1260

ggtctggtgg ccgaccggct cgccgagacc tggcagcggc gccgggacgc cgtcgcccac 1320

cgcaccgacc cgatcaccgg cgtcaccgag ttcccgaacc tcgaagaacc cgcgctgcga 1380

cgcgaccccg cgcccgagcc gctgtcgggc ggcctgcccc gccaccgcta cgccgaggac 1440

ttcgagcggc tgcgcgacgc ctccgacgcc cacctcgccg aaaccggtgc gcgcccgaag 1500

gtcttcctcg ccacgctcgg ttcgctcgcc gagcacaacg cccgcgcgtc gttcgcccgc 1560

aacctcttcg gcgcgggcgg gctggaaacc ccggacgccg ggcccacgga gtccacagag 1620

gacgtggtga aggcgttcgc cggctcgggc acgccggtgg cctgcctgtg ctcgggtgac 1680

cggatctacg gtgagcacgc ggaggaaacc gcccgcgcgc tccgggaggc gggggccgac 1740

caggtgctgc tggccggctc gctcgaggtg cccggcgtcg acggccgggt gttcggcggg 1800

tgcaacgccc tcgaagtctt gcaggacgtc caccgcaggt tgggagtgca gcagtga 1857

<210> 2
<211> 2295
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutB

<400> 2

gtgaccgccc acgagcacga accgatcccc agcttcgccg gcgtggagct gggcgagccc 60

gcccccgcgc ctgccgggcg gtggaacgac gcgctgctgg ccgagaccgg caaggaggcc 120

gacgccctgg tgtgggaggc gcccgagggc atcggcgtca agccgctcta caccgaggcc 180

gacacccgcg ggctggactt cctgcgcacc tacccgggaa tcgcgccgtt cctgcgcggc 240

ccgtacccga cgatgtatgt caaccagccg tggacggtgc gccagtacgc ggggttctcc 300

accgccgagc agtccaacgc cttctaccgc cgcaacctcg ccgccgggca gaagggcctg 360

tcggtggcct tcgacctggc cacccaccgc ggctacgact ccgaccaccc gcgcgtcggc 420

ggtgacgtcg gcatggcggg cgtggcgatc gactccatct atgacatgcg ccggctcttc 480

gacggcatcc cgctggacag gatgagcgtg tcgatgacga tgaacggcgc cgtgctgccg 540

gtgatggcgc tctacatcgt cgccgccgag gaacagggcg tggcgccgga gaagctggcc 600

gggaccatcc agaacgacat cctcaaggag ttcatggtcc gcaacaccta catctacccg 660

ccgcagccgt cgatgcggat catctccgac atcttcgcct acgcctcgcg gcggatgccg 720

aagttcaact cgatctccat ctccggctac cacatccagg aggccggggc gaccgccgac 780

ctggagctgg cctacaccct cgcggacggc gtggagtacc tgcgcgccgg gcggcaggcg 840

ggcctggaca tcgactcctt cgccccgcgg ctgtcgttct tctggggcat cgggatgaac 900

ttcgcgatgg aggtcgccaa gctgcgcgcg gcccggctgc tgtgggccaa gctggtcaag 960

cgcttcgagc cgtcggaccc gaagtcgctg tcgctgcgca cccactcgca gacctcgggc 1020

tggtcgctga ccgcccagga cgtctacaac aacgtcgtgc gcacgtgcgt ggaggcgatg 1080

gccgccaccc agggccacac ccagtcgctg cacaccaacg ccctggacga ggcgctggcg 1140

ctgccgaccg acttctccgc gcgcatcgcc cgcaacaccc agctggtgct ccagcaggag 1200

tccggcacca cccgcgtcat cgacccgtgg ggcggctcgc actacatcga gcggctgacc 1260

caggacctcg ccgaacgcgc gtgggcccac atcaccgagg tcgaggacgc cggcggcatg 1320

gcccaggcca tcgacgccgg tatcccgaag atgcgcatcg aggaggccgc cgcgcggacg 1380

caggcgcgca tcgactccgg ccgccagccg ctcatcggcg tcaacaagta ccgctacgac 1440

ggcgacgagc agatcgaggt cctcaaggtc gacaacgccg gcgtgcgggc ccagcagctg 1500

gacaagctgc ggcggctgcg cgaggaacgc gactccgagg cgtgcgagac cgcactgcgc 1560

aggctgaccg gcgccgccga ggccgcgctg gaggacaacc ggcccgacga cctcgcgcac 1620

aacctgctga cgctggccgt ggacgccgcg cggcacaagg ccaccgtcgg cgagatctcc 1680

gacgcgctgg agaaggtctt cggccgccac tccggccaga tccgtacgat ttccggcgtg 1740

taccgggagg agtcgggtac ctcggagtcg ctggagcgcg cccgccgcaa ggtcgaggag 1800

ttcgacgagg cagagggcag gcgcccgcgc atcctggtgg ccaagatggg ccaggacggc 1860

cacgaccgcg gccagaaggt catcgccacc gccttcgccg acatcggctt cgacgtcgac 1920

gtgggcccgc tgttccagac cccggccgag gtcgcccgcc aggcggtcga gtccgacgtg 1980

cacgtcgtcg gggtgtcgtc gctggccgcg ggccacctga cgctggtgcc cgcgctgcgc 2040

gacgagctgg ccgggctcgg ccgctccgac atcatgatcg ttgtcggcgg cgtgatcccg 2100

cccgccgact tcgacgcgct gcgccagggc ggagccagcg cgatcttccc gccgggaacc 2160

gtgatcgccg acgccgcgct cggactgctc gaccagctcc gcgcggtgct cgaccacccc 2220

gcgcccggcg agcctgccgg cgagtcggac ggcgcccgag gcggttcccc cggcgagacg 2280

tcgagcgcgg gctga 2295

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutA forward primer

<400> 3
ttaattaaac tagtctgtcc ggcgcgacaa gcgtc 35

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutA reverse primer

<400> 4
tctagacacc tcgagcgagc cggccag 27

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutB forward primer

<400> 5
ctggccggct cgctcgaggt g 21

<210> 6
<211> 25
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mutB reverse primer

<400> 6
tctagaggtc agcccgcgct cgacg 25

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> matB forward primer

<400> 7
tctcgcggat ccggcgcgat ccggcagcct 30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> matB reverse primer

<400> 8
actcccctgc agtcaggcgc tcagtcacgg 30

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> epimerase forward primer

<400> 9

gagggtctgc aggaatgtac tgagcggtat ccc 33

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> epimerase reverse primer

<400> 10
actcccctgc agtcaggcgc tcagtcacgg 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> accAI forward primer

<400> 11
acgttcagat cttgactgtt ccgaacaggg 30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> accAI reverse primer

<400> 12
atcgtgatgc atgtcgtcat cgttcagtcc 30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pccB forward primer

<400> 13
atctcgatgc atcatgcaac ccaccctagg 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pccB reverse primer

<400> 14
tggtcaaagc ttctccttac aggggatgt 30

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> prpE forward primer

<400> 15
ccagcaaagc ttcattctgg atgtctccct gga 33

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> prpE reverse primer

<400> 16
tggtcaaagc ttctccttac aggggatgt 30