(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월02일
(11) 등록번호 10-1617126
(24) 등록일자 2016년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *C12P 17/06* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) *C12P 7/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/746 (2013.01)
C12P 17/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0068271
(22) 출원일자 2015년05월15일
심사청구일자 2015년05월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR10-2010-0053741A
GenBank Accession Number CP010407 (2015.01.29.)

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
윤여준
서울 강남구 압구정로 151, 126동 202호 (압구정동, 현대아파트)
노정혜
서울 강남구 언주로 406, 34동 1207호 (역삼동, 개나리아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

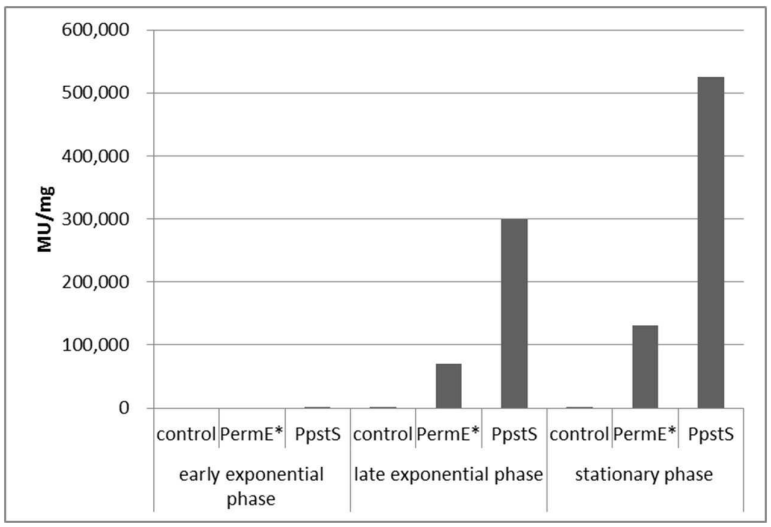
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **신규 pstS 프로모터 및 이를 이용한 페닐프로파노이드의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 스트렙토마이세스 베네주엘래(*Streptomyces venezuelae*) 균주에서 유래된 신규한 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터를 포함하는 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 목적 단백질을 생산하는 방법 및 페닐프로파노이드의 생합성 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터를 이용하면, 목적 단백질을 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일련의 페닐프로파노이드 화합물 생합성 효소를 발현시켜서, 페닐프로파노이드 화합물의 생합성 수율을 증대시킬 수 있으므로, 페닐프로파노이드 화합물을 포함하는 제품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12P 21/00 (2013.01)
C12P 7/22 (2013.01)
C12Y 114/11022 (2013.01)
C12Y 203/01074 (2013.01)
C12Y 602/01012 (2013.01)

(72) 발명자
김지은
서울 관악구 서림길 122, 206호 (신림동)
최준선
광주 북구 서강로 99, 4동 1004호 (운암동, 금호아파트)
전수연
서울특별시 서초구 잠원로 4길 34-11, 101동 1406호
강상현
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 잠실엘스아파트 140동 1602호
최하경
서울 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관 D-207호 (대현동, 이화여자대학교)
김은지
서울 마포구 마포대로 195, 407동 802호 (아현동, 마포래미안푸르지오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545008101
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발사업
연구과제명 식품바이오 소재 Pterostilbene 및 플라본 메틸 유도체 미생물 생산 시스템 구축
기 여 율 1/2
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2014.08.01 ~ 2019.07.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0031960
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌프론티어사업
연구과제명 고부가 이차대사산물 및 화학의약품 생산 방선균 세포공장기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 서울대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드로 구성된 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터.

청구항 3

제2항의 발현벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 숙주세포는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 미생물인 것인 형질전환체.

청구항 5

(a) 제3항 또는 제4항의 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 배양물로부터 목적 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 생산방법.

청구항 6

(a) 제1항의 프로모터, 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase)를 코딩하는 *ScCCL* 유전자, 찰콘 합성효소(chalcone synthase)를 코딩하는 *atCHSop* 유전자, 찰콘 아이소머라제(chalcone isomerase)를 코딩하는 *atCHIop* 유전자 및 플라본 합성효소(flavone synthase)를 코딩하는 *pcFNSIop* 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하는 단계;

(b) 상기 제작된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및

(c) 상기 수득한 형질전환체를 배양하여 플라본 화합물을 생합성하는 단계를 포함하는, 플라본 화합물의 생합성 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 *ScCCL* 유전자는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드로 구성되고, *atCHSop* 유전자는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드로 구성되며, *atCHIop* 유전자는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드로 구성되고, *pcFNSIop* 유전자는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드로 구성되는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 숙주세포는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 미생물인 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 플라본 화합물은 크리신 또는 아피제닌인 것인 방법.

청구항 10

(a) 제1항의 프로모터, 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase)를 코딩하는 *ScCCL* 유전자 및 스틸벤 합성효소(stilbene synthase)를 코딩하는 *ahSTSop* 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하는 단계;

(b) 상기 제작된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및

(c) 상기 수득한 형질전환체를 배양하여 스틸벤 화합물을 생합성하는 단계를 포함하는 스틸벤 화합물의 생합성 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 *ScCCL* 유전자는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드로 구성되고, *ahSTSop* 유전자는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드로 구성되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자는 융합유전자의 형태로 발현벡터에 포함되는 것인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 숙주세포는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 미생물인 것인 방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 스틸벤 화합물은 피노실빈 또는 레스베라트롤인 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 프로모터 및 이를 이용한 페닐프로파노이드의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 스트렙토마이세스 베네주엘래(*Streptomyces venezuelae*) 균주에서 유래된 신규한 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터를 포함하는 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 목적 단백질을 생산하는 방법 및 페닐프로파노이드의 생합성 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 플라보노이드와 스틸벤은 페닐프로파노이드 경로에서 생성되는 페닐프로파노이드 화합물의 일종으로서, 꽃의 색소를 생산하거나 병원균의 공격으로부터 방어작용을 하는 등 여러 가지 기능을 나타내며, 최근에는 항암, 항산화, 항균, 항염 등의 다양한 약리활성 효과를 나타내어, 상기 화합물을 이용하여 의약품을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 이러한 플라보노이드와 스틸벤은 페닐프로파노이드 경로를 사용하여 생합성될 수 있는데, 4-쿠마릭산(4-coumaric acid) 또는 신남산(cinnamic acid)에 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase, 4CL)가 작용하여 4-쿠마로일-CoA(4-coumaroyl-CoA) 또는 시나모일-CoA(cinnamoyl-CoA)가 생성되고, 상기 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA에 스틸벤 합성효소(stilbene synthase, STS)가 작용하여 피노실빈(pinosylvin) 또는 레스베라트롤(resveratrol)과 같은 스틸벤 화합물이 생합성 될 수 있다. 또한, 상기 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA에 찰콘 합성효소(chalcone synthase, CHS)가 작용하여 피노셈빈 찰콘(pinocembin chalcone) 또는 나린제닌 찰콘(naringenin chalcone)이 생성되고, 상기 피노셈빈 찰콘 또는 나린제닌 찰콘에 찰콘 아이소머라제(chalcone isomerase, CHI)가 작용하여 피노셈빈(pinocembin) 또는 나린제닌(naringenin)이 생성되며, 상기 피노셈빈 또는 나린제닌에 플라본 합성효소(flavone synthase, FNSI)가 작용하여 크리신(chrysin) 또는 아피제닌(apigenin)과 같은 플라본 화합물이 생합성 될 수 있다.

[0004] 의약적으로 중요한 많은 식물유래 이차 대사산물의 확보 방법은 계절이나 지역적 요소에 의해 제한되며 추출과정의 복잡성으로 인해 순수분리 또한 어렵다. 또한 이 물질들의 유기 합성시에는 극한 반응조건이나 독성 화학물질이 이용되기 때문에 미생물을 이용한 생합성 방법이 대량생산에 있어 현실적인 접근방법이 될 수 있다. 상술한 페닐프로파노이드 화합물의 생합성 경로에 관여하는 효소를 형질전환 미생물에서 발현시킬 경우, 상기 형질전환 미생물에 원료물질인 4-쿠마릭산 또는 신남산을 투여함으로써, 목적하는 스틸벤 화합물 또는 플라본 화합물을 생산할 수 있을 것으로 기대됨에 따라, 이러한 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2010-0053741호에는 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 효소를 스트렙토마이세스 베네주엘래(*Streptomyces venezuelae*) 균주에서 발현시켜 플라바논 화합물 또는 스틸벤 화합물을 생산하는 기술이 개시되어 있다. 그러나, 상기 방법으로 제조된 플라바논 화합물 또는 스틸벤 화합물의 생산수율은 기대한 것보다 낮은 수준을 나타낸다는 단점이 있었다. 상기 단점은 다수의 효소를 발현시키는 형질전환 미생물이 상기 다수의 효소들을 동등하게 높은 수준으로 발현시키지 못하였기 때문인 것으로 분석되었다. 이러한 단점을 극복하기 위하여, 형질전환 미생물에서 상기 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 유래된 신규한 프로모터를 사용할 경우, 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시켜서 결과적으로는 페닐프로파노이드 화합물의 생산수율을 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 신규한 프로모터를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 프로모터를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 페닐프로파노이드 화합물을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 프로모터에 주목하게 되었다. 통상적으로, 유전자의 발현 수준은 이의 발현을 시작하게 하는 프로모터에 따라 달라지는데, 유전자에 따라 적합한 프로모터가 서로 상이하다고 알려져 있으므로, 공지된 종래의 방법(한국공개특허 제2010-0053741호)에서 사용된 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 코딩하는 유전자의 발현에 있어서, 기존의 ermE* 프로모터보다 더욱 효과적으로 상기 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터를 사용할 경우, 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 것으로 가정하였다. 이에, 종래의 방법에서 숙주세포로 사용된 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 발현되는 전사체를 분석하여, 성장단계에 따라 세기가 증가하는 특성을 갖는 신규한 프로모터를 발굴하였다. 상기 프로모터는 pstS(phosphate ABC transporter periplasmic binding protein)를 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 확인되었다. 본 발명자들은 상기 프로모터의 염기서열을 분석한 결과, 220bp의 크기를 갖고, 종래에 알려지지 않은 새로운 염기서열로 구성되어 있음을 확인하였다. 이에, 상기 신규한 프로모터와 종래의 ermE* 프로모터의 유전자 발현능을 비교한 결과, 상기 신규한 프로모터는 후기 지수 성장기와 정체성장기에서 종래에 사용된 ermE* 프로모터에 비하여, 약 4 내지 5배 우수한 발현활성을 나타냄을 확인하였다. 이에, 상기 신규한 프로모터를 사용하면, 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 것으로 예측하였다.

[0012] 이를 확인하기 위하여, 상기 프로모터를 사용하여 페닐프로파노이드 화합물을 생산하고, 이의 생산수율을 종래의 ermE* 프로모터를 사용하여 생산된 페닐프로파노이드 화합물의 생산수율과 비교하였다. 먼저, 페닐프로파노이드 화합물에 속하는 플라본 화합물의 일종인 아피제닌의 생산에 사용되는 4종의 유전자(*ScCCL*, *atCHSop*, *atCHIop* 및 *pcFNSIop*)와 상기 pstS 프로모터를 포함하는 발현벡터를 제작하고, 상기 발현벡터를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에 도입하여 형질전환체를 수득하였다. 이어, 상기 형질전환체에 4-쿠마릭산을 가하여 아피제닌을 생산하고, 이의 생산수율을 비교한 결과, 종래의 ermE* 프로모터를 사용하여 생산된 아피제닌의 생산수율보다도 약 6배가 증가함을 확인하였다. 또한, 페닐프로파노이드 화합물에 속하는 스틸벤 화합물의 일종인 레스베라트롤의 생산에 사용되는 2종의 유전자(*ScCCL* 및 *ahSTSop*)와 상기 pstS 프로모터를 포함하는 발현벡터를 제작하고, 상기 발현벡터를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에 도입하여 형질전환체를 수득하였다. 이어, 상기 형질전환체에 4-쿠마릭산을 가하여 레스베라트롤을 생산하고, 이의 생산수율을 비교한 결과, 종래의 ermE* 프로모터를 사용하여 생산된 레스베라트롤의 생산수율보다도 약 50배가 증가함을 확인하였다. 뿐만 아니라, 상기 신규한 프로모터를 사용하여 레스베라트롤 생산에 사용되는 2종의 유전자가 융합된 형태의 유전자를 발현시킬 경우에는 이들 2종의 유전자를 각각 발현시킬 경우보다도, 레스베라트롤의 생산수율이 약 2배 증가됨을 확인하였다.

[0013] 따라서, 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터는 페닐프로파노이드의 생합성 경로에 관여하는 다수의 효소를 동등하게 높은 수준으로 발현시키고, 이에 의하여 페닐프로파노이드의 생산수율을 현저히 증가시키는 효과를 나타냄을 확인하였다. 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터 및 그의 효과는 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[0014] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드로 구성된 신규한 프로모터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 용어 "프로모터"란, 전사조절인자들이 결합할수 있는 DNA 염기서열을 의미하는데, 상기 프로모터는

전사조절인자를 매개로 하여 RNA 중합효소와 결합함으로써, 그의 하류에 위치한 개방해독틀(ORF)의 전사를 유도할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주로부터 유래되고 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 pstS(phosphate ABC transporter periplasmic binding protein) 프로모터인 것으로 해석될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 스트렙토마이세스 베네주엘래(*Streptomyces venezuelae*) 균주로부터 유래된 전사체를 분석하여, 성장단계에 따라 세기가 증가하는 특성을 갖는 220bp의 pstS 프로모터(서열번호 1)를 발굴하고, 이의 유전자 발현활성을 ermE* 프로모터와 비교한 결과, ermE* 프로모터에 비하여, 약 4 내지 5배 우수한 발현활성을 나타냄을 확인하였다(도 2).

[0018] 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터는 페닐프로파노이드 화합물의 생합성 경로에 관여하는 효소인 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase, 4CL), 스틸벤 합성효소(stilbene synthase, STS), 찰콘 합성효소(chalcone synthase, CHS), 찰콘 아이소머라제(chalcone isomerase, CHI), 플라본 합성효소(flavone synthase, FNSI) 등을 코딩하는 유전자의 발현수준을 모두 동등하게 높은 수준으로 발현시켜서, 상기 각 효소를 사용하여 생산되는 페닐프로파노이드 화합물의 생성수율을 증가시킬 수 있다.

[0019] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0020] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터는 종래의 프로모터에 비하여 유전자의 발현수준을 향상시킬 수 있으므로, 상기 프로모터를 포함하는 발현벡터 또는 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 이용하면, 목적 단백질을 높은 수율로 생산할 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어 "목적 단백질"이란, 상기 신규한 프로모터에 작동가능하게 연결된 형태로 발현벡터에 도입된 유전자로부터 발현되는 단백질을 의미한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질은 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터에 의해 발현될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 페닐프로파노이드 화합물의 생합성 경로에 관여하는 4CL, STS, CHS, CHI, FNSI 등의 효소 단백질이 될 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0024] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할

수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 본 발명에서 제공하는 신규한 pstS 프로모터를 포함할 수 있는데, 상기 발현벡터에 포함된 pstS 프로모터는 발현시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 높은 수준으로 발현시킬 수 있다. 이때, 사용되는 벡터는 pstS 프로모터가 작동할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등) 이 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[0027] 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환체를 생성할 수 있는 숙주세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 스트렙토마이세스 속 미생물(*Streptomyces* sp.)이 될 수 있고, 다른 예로서, 스트렙토마이세스 속 미생물에 속하는 스트렙토마이세스 베네주엘래(*Streptomyces venezuelae*) 균주, 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 균주, 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) 균주, 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*) 균주, 스트렙토마이세스 프라디아에(*Streptomyces fradiae*) 균주, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 균주 등이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주가 될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주에 도입하여 형질전환시켜서 제작되고, 상기 발현벡터에 포함된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시키는데 사용될 수 있다. 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 예를 들어, $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 형질전환제의 제작에 사용되는 숙주세포는 본 발명의 pstS 프로모터가 작동할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균(E. coli), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지애, 스키조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주를 숙주로서 사용하였다.

[0029] 상기 형질전환체는 본 발명에서 제공하는 pstS 프로모터를 이용하여 상기 발현벡터에 포함된 유전자를 발현시켜서 목적 단백질을 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 목적 단백질을 생산하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 배양물로부터 목적 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.

[0030] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 융합단백질을 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

[0032] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토

즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0033] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0034] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27℃ 내지 37℃, 바람직하게는 30℃ 내지 35℃이다. 배양은 D형 젖산의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다. 대체로 D형 젖산은 배양 배지 중으로 배출되지만, 경우에 따라서는 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.

[0035] 아울러, 배양물로부터 상기 목적 단백질을 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 상기 목적 단백질을 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증방, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또 다른 양태로서, 상기 프로모터를 이용하여 페닐프로파노이드 화합물의 일종인 스틸벤 화합물 또는 플라본 화합물을 생합성하는 방법을 제공한다.

[0037] 통상적으로, 효소를 이용하여 페닐프로파노이드에 속하는 플라본 화합물과 스틸벤 화합물을 생합성하는 경로가 알려져 있다(도 1). 도 1은 효소를 이용하여 페닐프로파노이드에 속하는 플라본 화합물과 스틸벤 화합물을 생합성하는 경로를 나타내는 개략도이다. 도 1에서 보듯이, 4-쿠마릭산 또는 신남산에 *ScCCL* 유전자로부터 발현되는 4CL가 작용하여 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA가 생성되고, 상기 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA에 STS가 작용하여 피노실빈 또는 레스베라트롤과 같은 스틸벤 화합물이 생합성 될 수 있다. 또한, 상기 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA에 *atCHSop* 유전자로부터 발현되는 CHS가 작용하여 피노셈빈 찰콘 또는 나린제닌 찰콘이 생성되고, 상기 피노셈빈 찰콘 또는 나린제닌 찰콘에 *atCHIop* 유전자로부터 발현되는 CHI가 작용하여 피노셈빈 또는 나린제닌이 생성되며, 상기 피노셈빈 또는 나린제닌에 *pcFNSIop* 유전자로부터 발현되는 FNSI가 작용하여 크리신 또는 아피제닌과 같은 플라본 화합물이 생합성 될 수 있다.

[0038] 본 발명의 용어 "4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제(4-coumarate/cinnamate:coenzyme A ligase, 4CL)"란, ATP를 사용하여 4-쿠마릭산/시나믹산에 CoA를 결합시켜서 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA를 생성하는 효소를 의미한다. 상기 4CL을 코딩하는 *ScCCL* 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: CAB95894.1 등). 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 신규한 프로모터를 이용하여 스트렙토마이세스 코엘리콜라(*Streptomyces coelicolor*) 균주로부터 유래된 서열번호 2의 염기서열로 구성된 *ScCCL* 유전자로부터 발현되는 4CL을 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 발현시켰다.

[0039] 본 발명의 용어 "스틸벤 합성효소(stilbene synthase, STS)"란, 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA로부터 피노

실빈(pinosylvin) 또는 레스베라트롤(resveratrol)과 같은 스틸벤 화합물을 생합성하는 효소를 의미한다. 상기 STS를 코딩하는 *ahSTSop* 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: BAA78617.1 등). 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 신규한 프로모터를 이용하여 아라키스 하이포게아(*Arachia hypogaea*) 균주로부터 유래된 서열번호 3의 염기서열로 구성된 *ahSTSop* 유전자로부터 발현되는 STS를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 발현시켰다.

[0040] 본 발명의 용어 "찰콘 합성효소(chalcone synthase, CHS)"란, 4-쿠마로일-CoA 또는 시나모일-CoA로부터 피노셈빈 찰콘(pinocembin chalcone) 또는 나린제닌 찰콘(naringenin chalcone)을 생합성하는 효소를 의미한다. 상기 CHS를 코딩하는 *atCHSop* 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: AED91961.1 등). 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 신규한 프로모터를 이용하여 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 균주로부터 유래된 서열번호 4의 염기서열로 구성된 *atCHSop* 유전자로부터 발현되는 CHS를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 발현시켰다.

[0041] 본 발명의 용어 "찰콘 아이소머라제(chalcone isomerase, CHI)"란, 피노셈빈 찰콘 또는 나린제닌 찰콘으로부터 피노셈빈(pinocembin) 또는 나린제닌(naringenin)을 생합성하는 효소를 의미한다. 상기 CHI를 코딩하는 *atCHIop* 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: ABM66533.1 등). 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 신규한 프로모터를 이용하여 아라비돕시스 탈리아나 균주로부터 유래된 서열번호 5의 염기서열로 구성된 *atCHIop* 유전자로부터 발현되는 CHI를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 발현시켰다.

[0042] 본 발명의 용어 "플라본 합성효소(flavone synthase, FNSI)"란, 피노셈빈 또는 나린제닌으로부터 크리신(chrysin) 또는 아피제닌(apigenin)과 같은 플라본 화합물을 생합성하는 효소를 의미한다. 상기 FNSI를 코딩하는 *pcFNSIop* 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: AGV40781.1 등). 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 신규한 프로모터를 이용하여 페트로셀리넘 크리스품(*Petroselium crispum*) 균주로부터 유래된 서열번호 6의 염기서열로 구성된 *pcFNSIop* 유전자로부터 발현되는 FNSI를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에서 발현시켰다.

[0043] 일 예로서, 본 발명에서 제공하는 플라본 화합물의 생합성 방법은 (a) 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드로 구성된 프로모터, 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제를 코딩하는 *ScCCL* 유전자, 찰콘 합성효소를 코딩하는 *atCHSop* 유전자, 찰콘 아이소머라제를 코딩하는 *atCHIop* 유전자 및 플라본 합성효소를 코딩하는 *pcFNSIop* 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하는 단계; (b) 상기 제작된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 수득한 형질전환체를 배양하여 플라본 화합물을 생합성하는 단계를 포함한다.

[0044] 상기 방법에 있어서, 상기 *ScCCL* 유전자로는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있고, *atCHSop* 유전자는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있으며, *atCHIop* 유전자로는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있고, *pcFNSIop* 유전자로는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 또한, 숙주세포로는 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주를 사용할 수 있고, 4-쿠마릭산 또는 신남산을 상기 형질전환체에 가하여 플라본 화합물인 크리신 또는 아피제닌을 생합성 할 수 있다. 또한, 상기 프로모터는 *ScCCL* 유전자, *atCHSop* 유전자, *atCHIop* 유전자 및 *pcFNSIop* 유전자의 상류에 각각 도입되어, 상기 각 유전자를 독립적으로 발현시키도록 발현벡터를 구성하거나 또는 상기 프로모터, *ScCCL* 유전자, *atCHSop* 유전자, *atCHIop* 유전자 및 *pcFNSIop* 유전자의 순서로 도입되어, 상기 각 유전자를 통합적으로 발현시키도록 발현벡터를 구성할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터(PpstS), *ScCCL* 유전자, *atCHSop* 유전자, *atCHIop* 유전자 및 *pcFNSIop* 유전자의 순서로 도입된 형태의 발현벡터(도 3a) 및 상기 PpstS가 4*ScCCL* 유전자, *atCHSop* 유전자, *atCHIop* 유전자 및 *pcFNSIop* 유전자의 상류에 각각 도입된 형태의 발현벡터(도 3b)를 각각 제작하였다. 이어, 상기 제작된 각 발현벡터를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에 도입하여 각각의 형질전환체를 제작하고, 상기 형질전환체에 4-쿠마릭산을 가하여 반응시킴으로써, 플라본 화합물을 수득하였다. 상기 수득

한 플라본 화합물을 표준물질인 아피제닌과 비교한 결과, 상기 표준물질과 동일한 플라본 화합물인 아피제닌이 상기 형질전환체로부터 생합성되었음을 확인하였다(도 4).

[0046] 한편, 프로모터의 위치와는 상관없이 *ScCCL* 유전자, *atCHSop* 유전자, *atCHIop* 유전자 및 *pcFNSIop* 유전자가 각각 발현되는 형질전환체를 사용할 경우, 상기 아피제닌의 수율은 8.8 mg/L로서 ermE* 프로모터를 이용하여 제조된 종래의 방법(Yoon YJ, et al., J. Microbiol. Biotechnol., 2011 Sep;20(9):1295-1299)에서 얻어진 수율보다 약 6배 증가된 것임을 알 수 있었다.

[0047] 다른 예로서, 본 발명에서 제공하는 스틸벤 화합물의 생합성 방법은 (a) 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드로 구성된 프로모터, 4-쿠마릭산/시나믹산: CoA 리가아제를 코딩하는 *ScCCL* 유전자 및 스틸벤 합성효소를 코딩하는 *ahSTSop* 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하는 단계; (b) 상기 제작된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 수득한 형질전환체를 배양하여 스틸벤 화합물을 생합성하는 단계를 포함한다.

[0048] 상기 방법에 있어서, *ScCCL* 유전자로는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있고, *ahSTSop* 유전자로는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 또한, 숙주세포로는 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주를 사용할 수 있고, 4-쿠마릭산 또는 신남산을 상기 형질전환체에 가하여 스틸벤 화합물인 피노실빈 또는 레스베라트롤을 생합성 할 수 있다. 또한, 상기 프로모터는 *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자의 상류에 각각 도입되어, 상기 각 유전자를 독립적으로 발현시키도록 발현벡터를 구성하거나 또는 상기 프로모터, *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자의 순서로 도입되어, 상기 각 유전자를 통합적으로 발현시키도록 발현벡터를 구성할 수 있다. 아울러, 상기 *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자는 상기 발현벡터에 개별적으로 도입되어 각각 개별적인 단백질로 발현될 수도 있고, 융합유전자의 형태로 도입되어 융합단백질의 형태로 발현될 수도 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터, *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자의 순서로 도입된 형태의 발현벡터(도 5a), 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터가 *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자의 상류에 각각 도입된 형태의 발현벡터(도 5b) 및 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터 및 *ScCCL* 유전자와 *ahSTSop* 유전자의 융합유전자가 순서대로 도입된 형태의 발현벡터(도 5c)를 각각 제작하였다. 이어, 상기 제작된 각 발현벡터를 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에 도입하여 각각의 형질전환체를 제작하고, 상기 형질전환체에 4-쿠마릭산을 가하여 반응시킴으로써, 스틸벤 화합물을 수득하였다. 상기 수득한 스틸벤 화합물을 표준물질인 레스베라트롤과 비교한 결과, 상기 표준물질과 동일한 스틸벤 화합물인 레스베라트롤이 상기 형질전환체로부터 생합성되었음을 확인하였다(도 6).

[0050] 한편, 프로모터의 위치와는 상관없이 *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자가 각각 발현되는 형질전환체를 사용할 경우, 상기 레스베라트롤의 수율은 20 mg/L로서 ermE* 프로모터를 이용하여 제조된 종래의 방법(한국공개특허 제2010-0053741호)에서 얻어진 수율보다 약 50배 증가된 것임을 알 수 있었다. 또한, 상기 *ScCCL* 유전자와 *ahSTSop* 유전자로 구성된 융합유전자가 발현되는 형질전환체를 사용할 경우, 상기 레스베라트롤의 수율은 38 mg/L로서 *ScCCL* 유전자 및 *ahSTSop* 유전자가 각각 발현되는 형질전환체를 사용한 경우보다도 생산성이 약 2배 증가됨을 알 수 있었다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터를 이용하면, 목적 단백질을 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일련의 페닐프로파노이드 화합물 생합성 효소를 발현시켜서, 페닐프로파노이드 화합물의 생합성 수율을 증대시킬 수 있으므로, 페닐프로파노이드 화합물을 포함하는 제품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 효소를 이용하여 페닐프로파노이드에 속하는 플라본 화합물과 스틸벤 화합물을 생합성하는 경로를 나타

내는 개략도이다.

도 2는 gusA의 발현수준을 대상으로 ermE* 프로모터의 발현활성과 pstS 프로모터의 발현활성을 성장 단계별로 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 단일 프로모터를 이용한 플라본 생산용 발현벡터 pYJ1757의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 3b는 멀티 프로모터를 이용한 플라본 생산용 발현벡터 pYJ1760의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 4는 아피제닌 표준물질과 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 아피제닌을 LC-ESI-MS/MS를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프로서 (1)은 아피제닌 표준물질을 나타내고, (2)는 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 아피제닌을 나타낸다.

도 5a는 단일 프로모터를 이용한 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1774의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 5b는 멀티 프로모터를 이용한 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1775의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 5c는 융합유전자를 포함하는 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1763의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 6은 레스베라트롤 표준물질과 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 레스베라트롤을 LC-ESI-MS/MS를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프로서 (1)은 레스베라트롤 표준물질을 나타내고, (2)는 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 레스베라트롤을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1: 신규 프로모터 발굴**

[0055] 스트렙토마이세스 베네주엘래(*Streptomyces venezuelae*) 균주로부터 유래된 전사체를 분석하여, 성장단계에 따라 세기가 증가하는 특성을 갖는 220bp의 프로모터 pstS(서열번호 1)를 발굴하고, 이의 염기서열을 분석한 결과, 종래에 알려지지 않은 신규한 서열로 구성된 프로모터임을 확인하였다.

[0056] 상기 발굴된 신규한 프로모터를 Xba I/Kpn I 제한효소로 절단하여 절단된 단편을 수득하고, 이를 pGUS 벡터에 삽입하여 pstS-gusA의 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pstS-gusA의 벡터를 원형질체를 통하여 스트렙토마이세스 베네주엘래 균주에 도입하여 형질전환체를 수득하였다. 상기 수득한 형질전환체를 50㎖의 MYM 액체배지에 접종한 다음, 30℃ 및 180rpm의 조건으로 배양하면서, 성장 단계별로 균체를 수득하였다. 이때, 성장단계는 성장곡선에 근거하여 초기지수성장기(early exponential), 후기 지수 성장기(late exponential) 및 정체 성장기(stationary phase)로 구분하였다. 상기 수득한 각 균체에 라이소자임을 처리하여 각각의 세포파쇄물을 수득하고, 상기 수득한 각 세포파쇄물에 1 mM의 합성기질(p-nitrophenyl-r-D-glucuronide)을 가한 다음, 37℃에서 반응시켜서, 각각의 반응산물을 수득하였다. 상기 수득한 반응산물을 대상으로 420nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 상기 pstS 프로모터의 발현활성을 비교하였다(도 2). 이때, 대조군으로는 프로모터가 삽입되지 않은 pGUS 벡터와 ermE* 프로모터가 삽입되어있는 pMF23벡터가 도입된 형질전환체를 사용하였다.

[0057] 도 2는 gusA의 발현수준을 대상으로 ermE* 프로모터의 발현활성과 pstS 프로모터의 발현활성을 성장 단계별로 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 상기 pstS 프로모터는 후기 지수 성장기와 정체성장기에서 종래에 사용된 ermE* 프로모터에 비하여, 약 4 내지 5배 우수한 발현활성을 나타냄을 확인하였다.

[0058] **실시예 2: 신규 프로모터를 사용한 페닐프로파노이드의 생산**

[0059] 상기 실시예 1에서 확인된 신규 프로모터를 사용하는 것을 제외하고는, 공지된 방법(한국공개특허 제2010-0053741호)에 따라 이종숙주 방선균 내에서 페닐프로파노이드 화합물(플라본 및 스틸벤)을 생산하였다.

[0060] **실시예 2-1: 플라본의 생산**

[0061] 먼저, 단일 프로모터를 이용한 플라본 생산용 발현벡터를 제작하기 위하여, 대장균 DH5α(*Escherichia coli* DH5α)와 플라스미드 리트머스28(Litmus 28, New England Biolabs 제품)을 사용하여 공지된 방법(한국공개특허 제2010-0053741호)을 수행하였다.

[0062] 즉, 공지된 방법(한국공개특허 제2010-0053741호)에서 사용한 벡터 PermE*-ScCCL-PermE*-atCHSop-PermE*-atCHIop-PermE*-pcFNSIop를 대상으로 PCR을 수행하여 플라본 생합성 경로에 관여하는 스트렙토마이세스 코엘리콜라(*Streptomyces coelicolor*) 유래 4-쿠마릭산/CoA 리가아제를 코딩하는 *ScCCL* 유전자, 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 유래 찰콘 합성효소를 코딩하는 *atCHSop* 유전자, 아라비돕시스 탈리아나 유래 찰콘 아이소머라제 코딩하는 *atCHIop* 유전자 및 페트로셀리넘 크리스품(*Petroselium crispum*) 유래 플라본 생합성 효소를 코딩하는 *pcFNSIop* 유전자를 각각 수득하였다. 이어, 상기 수득한 각 유전자를 리트머스28 벡터에 클로닝하여 발현벡터인 pLitmus28-ScCCL-atCHSop-atCHIop-pcFNSIop를 수득하고, 상기 수득한 발현벡터를 제한효소로 1차 절단하였다. 상기 1차 절단된 단편을 본 발명에서 제공하는 신규한 프로모터(pstS 프로모터, PpstS)가 포함된 pLitmus28-PpstS-Tdes 카세트에 삽입한 다음, 다시 MfeI 과 XbaI 제한효소를 처리하여 2차 절단하였다. 상기 2차 절단된 단편을 티오스트렙톤(thiostrepton) 저항성 마커를 가지는 pSE34 벡터에 도입하여 발현벡터 pYJ1757(pSE34-PpstS-ScCCL-atCHSop-atCHIop-pcFNSIop-Tdes)를 제작하였다(도 3a). 도 3a는 단일 프로모터를 이용한 플라본 생산용 발현벡터 pYJ1757의 구성을 나타내는 개략도이다.

[0063] 또한, 멀티 프로모터를 이용한 플라본 생산용 발현벡터를 제작하기 위하여, 상기 수득한 *ScCCL*, *atCHSop*, *atCHIop* 및 *pcFNSIop* 유전자를 각각 pLitmus28-PpstS-Tdes 카세트에 삽입하고, MfeI 과 XbaI 제한효소를 처리하여 절단함으로써, PpstS에 각 유전자가 연결된 형태를 갖는 각각의 유전자 단편을 수득하였다. 상기 수득한 각 유전자 단편을 상기 pSE34 벡터에 도입하여 발현벡터 pYJ1760(pSE34-PpstS-ScCCL-Tdes-PpstS-atCHSop-Tdes-PpstS-atCHIop-Tdes-PpstS-pcFNSIop-Tdes)을 제작하였다(도 3b). 도 3b는 멀티 프로모터를 이용한 플라본 생산용 발현벡터 pYJ1760의 구성을 나타내는 개략도이다.

[0064] 한편, 공지된 방법(Jung et al. 2006)에 따라, 피크로마이신 생합성 관련 유전자가 제거된 변이주인 스트렙토마이세스 베네주엘래 DHS2001 균주를 SGGP 액체배지에 배양하여, 원형질체(protoplast)를 수득하였다. 상기 수득한 원형질체에 상기 제작한 각 발현벡터 pYJ1757 또는 pYJ1760를 가하고, 티오스트렙톤(50㎍/ml)이 함유된 ISP4 고체배지에서 배양하여 각각의 형질전환체(DHS2001/pYJ1757 또는 DHS2001/pYJ1760)를 수득하였다. 상기 수득한 각 형질전환체를 50 ㎍/㎖의 티오스트렙톤과 250 g/ℓ의 수크로스가 포함된 변형 R2YE 액체 배지에서 접종하고, 30℃ 및 240 RPM의 조건으로 36시간 동안 배양하여 각각의 배양물을 수득하였다. 상기 수득한 각 배양물을 5㎖의 변형 R2YE 배지에 재접종하고, 30℃ 및 240 RPM의 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 이어, 상기 배양물에 1.2 mM 4-쿠마릭산을 첨가하고, 다시 18시간 동안 추가로 배양하여, 각각의 최종 배양물을 수득하였다.

[0065] 상기 수득한 최종 배양물을 원심분리하여 각각의 균체를 수득하고, 상기 각 균체에 5 ㎖의 에틸아세테이트를 처리하여 각각의 에틸아세테이트 추출물을 수득한 다음, 상기 수득한 추출물을 대상으로 플라본의 일종인 아피제닌의 생산여부를 분석하였다. 상기 분석은 30 ㎕의 메탄올에 용해시켜 ES positive (+) 모드에서 Phenomenex Synergi Polar-RP 컬럼(150 × 4.6mm, 4㎛)으로 LC-ESI-MS/MS(liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, Waters/Micromass Quattro micro/MS)를 수행하였다.

[0066] 구체적으로, 상기 추출물을 250 ㎕/min의 속도로 흘려주면서, 0.1%(v/v) 포름산(formic acid) 수용액을 A로 설정하고, 0.1%(v/v) 포름산을 포함하는 80%(v/v) 아세토나이트릴(acetonitrile) 용액을 B로 설정하였다. 상기 설정된 B를 40% ~65%로 12분, 75% B까지 13분, 80% B까지 5분, 80% B 농도를 유지하며 5 분, 그 후 40% B로 15분간 용출하였다. 정량은 MS/MS에서 MRM(multiple reactions monitoring) 모드로 수행하였다. 또한, 양이온화된 분자 이온이 선택된 분석물질에 특이적인 해당조각(산물) 이온으로 전환되는 것을 탐지하기 위하여 두 개의 질량이온(massions)을 선택하여 수행하였다(도 4). 이때, 표준물질로서 상업적으로 입수한 아피제닌 271>153을 사용하였다.

[0067] 도 4는 아피제닌 표준물질과 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 아피제닌을 LC-ESI-

MS/MS를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프로서 (1)은 아피제닌 표준물질을 나타내고, (2)는 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 아피제닌을 나타낸다. 도 4에서 보듯이, 상기 각 형질전환체에서 생합성된 아피제닌은 19.6분에 용출되고, 분자이온 [M+H]+이 m/z 271를 나타내며 이로부터 절단된 이온은 m/z 153의 값을 나타냄을 확인하였다. 상기 측정된 값을 표준물질인 아피제닌의 측정값과 비교한 결과, 동일함을 확인하였으므로, 본 발명에서 제공하는 PpstS를 이용하여 생산된 아피제닌은 표준물질인 아피제닌과 동일한 물질임을 알 수 있었다.

[0068] 한편, 상기 형질전환체(DHS2001/pYJ1757 또는 DHS2001/pYJ1760)를 통해 생산된 아피제닌의 수율은 8.8 mg/L로서 ermE* 프로모터를 이용하여 제조된 종래의 방법(Yoon YJ, et al., J. Microbiol. Biotechnol., 2011 Sep;20(9):1295-1299)에서 얻어진 수율보다 약 6배 증가된 것임을 알 수 있었다.

[0069] **실시예 2-2: 스틸벤의 생산**

[0070] 플라본 생합성 경로에 관여하는 *ScCCL* 유전자, *atCHSop* 유전자, *atCHIop* 유전자 및 *pcFNSIop* 유전자 대신에 스틸벤 생합성 경로에 관여하는 *ScCCL* 유전자 및 아라키스 하이포게아(*Arachia hypogaea*) 균주 유래 스틸벤 합성 효소를 코딩하는 *ahSTSop* 유전자를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2-1과 동일한 방법을 수행하였다. 그 결과, 단일 프로모터를 이용한 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1774(PpstS-ScCCL-ahSTSop-Tdes)(도 5a)와 멀티 프로모터를 이용한 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1775(PpstS-ScCCL-Tdes-PpstS-ahSTSop-Tdes)(도 5b)를 제작하였다. 도 5a는 단일 프로모터를 이용한 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1774의 구성을 나타내는 개략도이고, 도 5b는 멀티 프로모터를 이용한 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1775의 구성을 나타내는 개략도이다.

[0071] 또한, 스틸벤의 생산성을 증가시키기 위해 융합단백질 시스템(fusion protein system)에 상기 PpstS를 위치시켰다. 상기 융합단백질 시스템을 통해 상기 PpstS를 통한 레스베라트롤의 생산을 확인하고자 하였다. 즉, PCR을 통하여 *ScCCL* 유전자의 스탑 코돈(stop codon)을 제거하고 GGA TCT GGC 아홉개 아미노산을 넣어준 다음, overlap PCR을 통해 *ahSTSop* 유전자와 연결하여 융합유전자를 수득하였다. 상기 수득한 융합 유전자를 PpstS-Tdes 카세트에 클로닝하고, pSE34 발현 벡터에 도입하여 최종적으로 발현벡터 pYJ1763(PpstS-ScCCL::STS-Tdes)를 제작하였다(도 5c). 도 5c는 융합유전자를 포함하는 스틸벤 생산용 발현벡터 pYJ1763의 구성을 나타내는 개략도이다.

[0072] 상기 제작한 각 발현벡터 pYJ1774, pYJ1775 또는 pYJ1763을 실시예 2-1의 방법으로 피크로마이신 생합성 관련 유전자가 제거된 변이주인 스트렙토마이세스 베네주엘래 DHS2001에 도입하여, 각각의 형질전환체(DHS2001/pYJ1774, DHS2001/pYJ1775 또는 DHS2001/pYJ1763)를 수득하였다. 상기 수득한 각 형질전환체를 50 ㎍/㎖의 티오스트렙톤과 250 g/ℓ의 수크로스가 포함된 변형 R2YE 액체 배지에서 접종하고, 30℃ 및 240 RPM의 조건으로 36시간 동안 배양하여 각각의 배양물을 수득하였다. 상기 수득한 각 배양물을 5㎖의 변형 R2YE 배지에 재접종하고, 30℃ 및 240 RPM의 조건으로 48시간 동안 배양하였으며, 1.2 mM 4-쿠마릭산을 첨가하고, 다시 18시간 동안 추가로 배양하여, 각각의 배양물을 수득하였다.

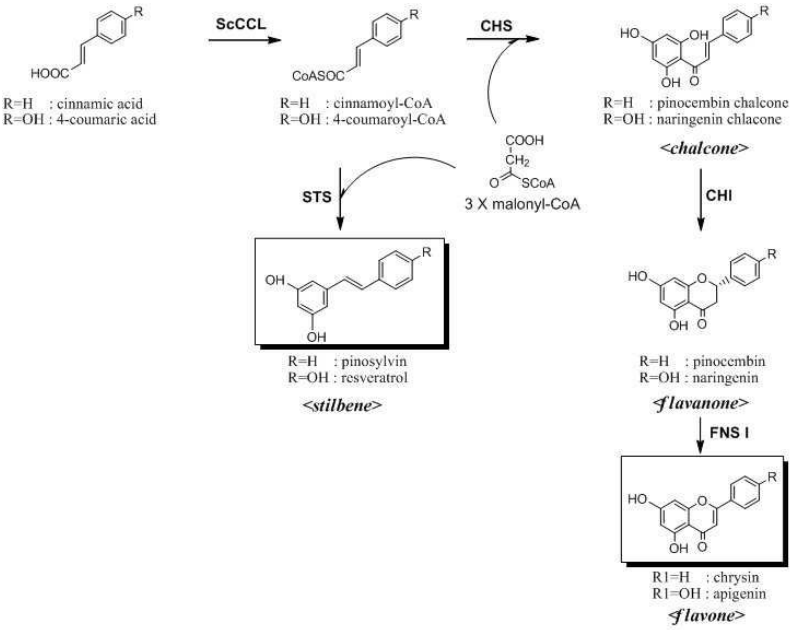
[0073] 상기 수득한 각 배양물에서 생산된 스틸벤의 일종인 레스베타트롤을 검출하기 위하여, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 LC-ESI-MS/MS에 적용하였다(도 6). 이때, 표준물질로서 상업적으로 입수한 레스베라트롤 229>135를 사용하였다.

[0074] 도 6은 레스베라트롤 표준물질과 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 레스베라트롤을 LC-ESI-MS/MS를 통해 분석한 결과를 나타내는 그래프로서 (1)은 레스베라트롤 표준물질을 나타내고, (2)는 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 레스베라트롤을 나타낸다. 도 6에서 보듯이, 상기 각 형질전환체에서 생합성된 레스베라트롤은 23.4분에 용출되고, 분자이온 $[M+H]^+$이 m/z 229을 나타내며 이로부터 절단된 이온은 m/z 135의 값을 나타냄을 확인하였다. 상기 측정된 값을 표준물질인 레스베라트롤의 측정값과 비교한 결과, 동일함을 확인하였으므로, 본 발명에서 제공하는 신규 프로모터를 이용하여 생산된 레스베라트롤은 표준물질인 레스베라트롤과 동일한 물질임을 알 수 있었다.

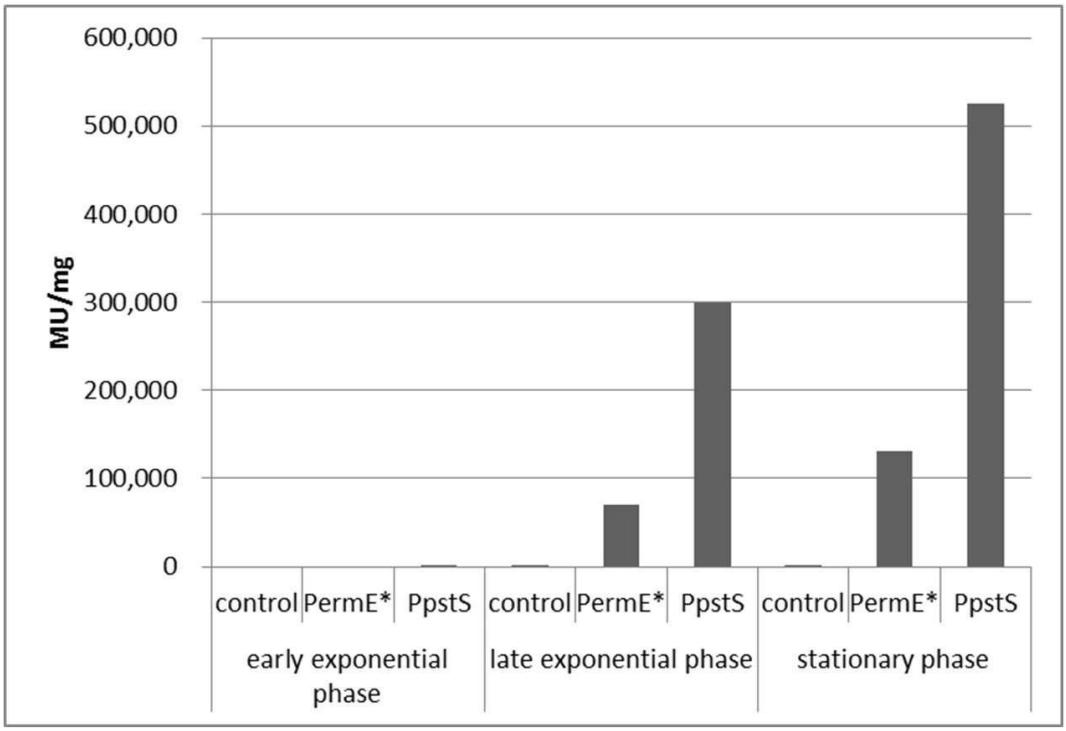
[0075] 한편, 상기 형질전환체(DHS2001/pYJ1774 또는 DHS2001/pYJ1775)를 통해 생산된 레스베라트롤의 수율은 20 mg/L로서 ermE* 프로모터를 이용하여 제조된 종래의 방법(한국공개특허 제2010-0053741호)에서 얻어진 수율보다 약 50배 증가된 것임을 알 수 있었다. 아울러, 상기 융합유전자가 도입된 형질전환체 DHS2001/pYJ1763을 통해 생산된 레스베라트롤의 수율은 38 mg/L로서 상기 형질전환체(DHS2001/pYJ1774 또는 DHS2001/pYJ1775)를 사용한 것보다도 생산성이 약 2배 증가됨을 알 수 있었다.

도면

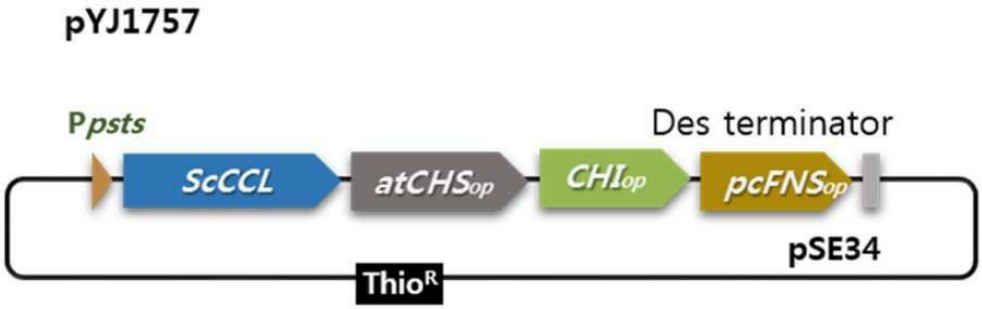
도면1



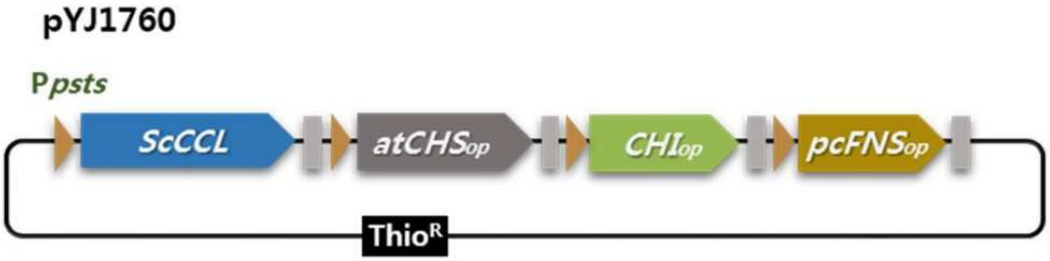
도면2



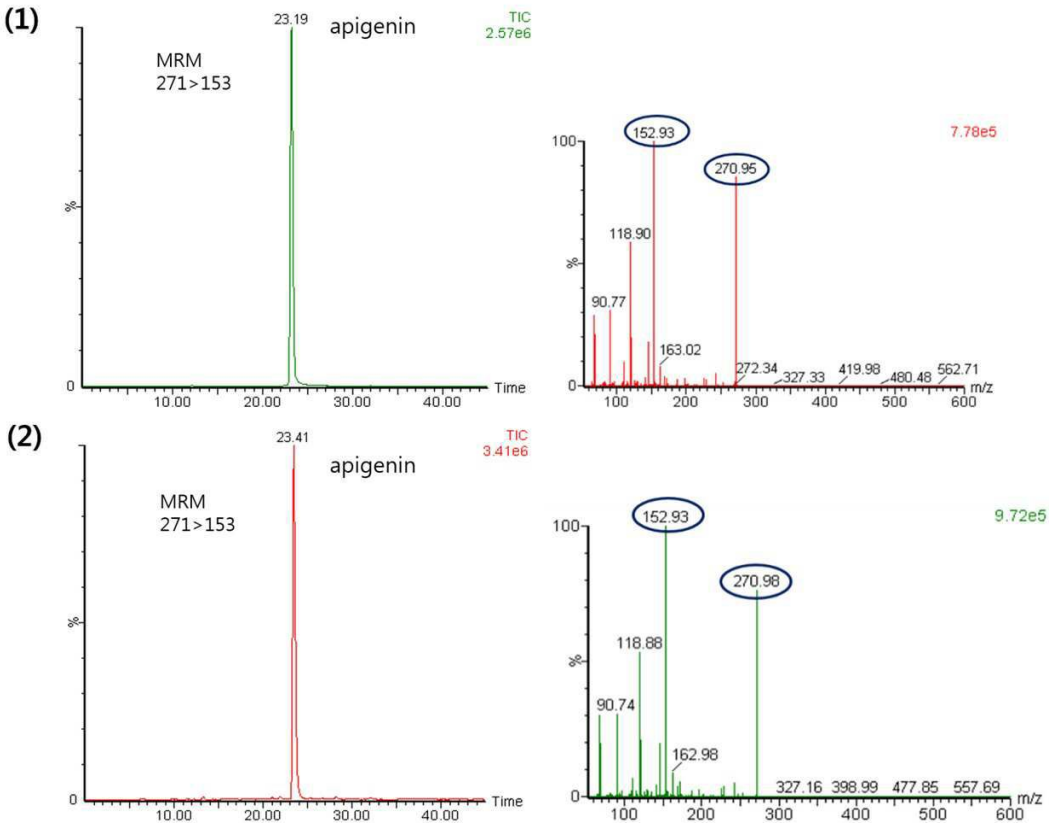
도면3a



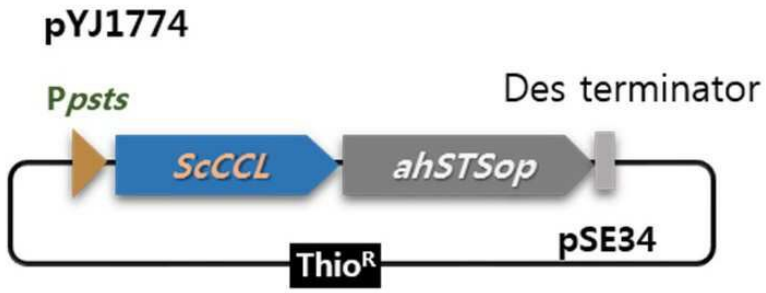
도면3b



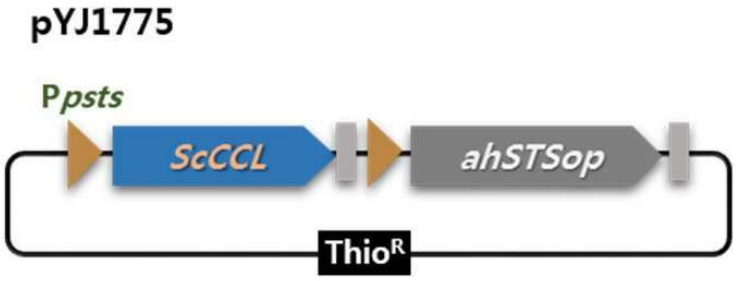
도면4



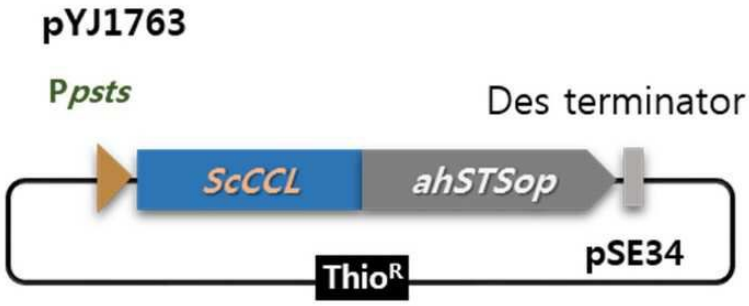
도면5a



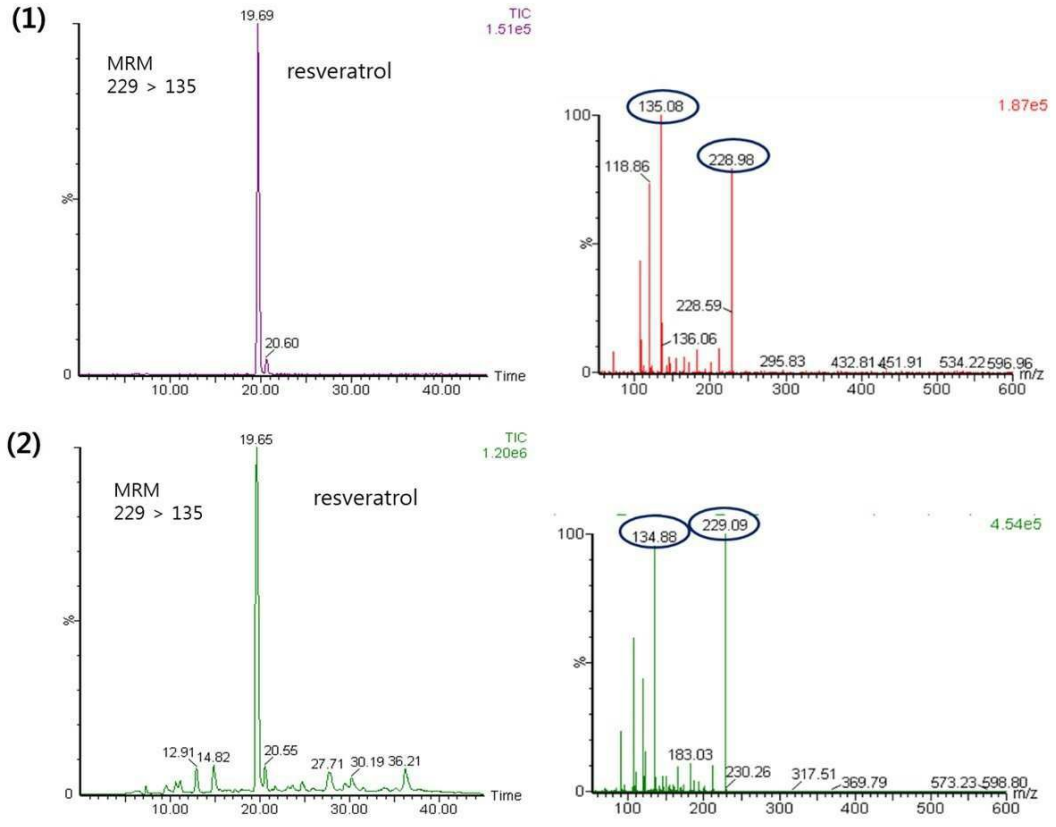
도면5b



도면5c



도면6



서 열 목 록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

SNU R&DB FOUNDATION

<120> Novel pstS promoter and process for prepring phenylprophanoid using the same

<130> KPA150479-KR

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 220

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pstS promoter

<400> 1

cctcctcgtc tggctgccgc cgggcgaggc ccgcgcacgc ctcacccagc cgcgcgaccg 60

cgagctgctt gacgccgccg tggcgacctc acgccactga cgccttccgg agcgaccgca 120

cccgggcttc cggcacggtt cacttcccgt tcactctcct ccgtcgaccg cttcacctgt 180

tctgcctaat ttcggactca cacggtgcac ggagcactgc 220

<210> 2

<211> 1569

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScCCL gene

<400> 2

atgttccgca gcgagtacgc agacgtcccg cccgtcgacc tgcccatcca cgacgccgtg 60

ctcggcgggg ccgccgcctt cgggagcacc ccggcgctga tcgacggcac cgacggcacc 120

accctcacct acgagcaggt ggaccggttc caccggcgcg tcgccgccgc cctcgccgag 180

accggcgtgc gcaagggcga cgtcctcgcc ctgcacagcc ccaacaccgt cgccttcccc 240

ctggccttct acgccgccac ccgcgcgggc gcctccgtca ccacggtgca tccgctcgcg 300

acggcggagg agttcgccaa gcagctgaag gacagcgcgg cccgctggat cgtcaccgtc 360

tcaccgctcc tgtccaccgc ccgccgggcc gccgaactcg cgggcggcgt ccaggagatc 420

ctggtctgcg acagcgcgcc cggtcaccgc tccctcgtcg acatgctggc ctcgaccgcg 480

cccgaaccgt ccgtcgccat cgacccggcc gaggacgtcg ccgccctgcc gtactcctcg 540

ggcaccaccg gcacccccaa gggcgtcatg ctcacacacc ggcagatcgc caccaacctc 600

gcccagctcg aaccgtcgat gccgtccgcg cccggcgacc gcgtcctcgc cgtgctgccg 660

ttcttccaca tctacggcct gaccgccctg atgaacgccc cgctccggct cggcgccacc 720

gtcgtggtcc tgccccgctt cgacctggag cagttcctcg ccgccatcca gaaccaccgc 780

atcaccagcc tgtacgtcgc cccgccgatc gtcctggccc tcgccaaaca ccccctggtc 840

gccgactacg acctctcctc gctgaggtac atcgtcagcg ccgccgcccc gctcgacgcg 900

cgtctcgccg ccgcctgctc gcagcggctc ggcctgccgc ccgtcggcca ggcctacggc 960

atgaccgaac tgtccccggg cacccacgtc gtccccctgg acgcgatggc cgacgcgccg 1020

cccggcaccg tcggcaggct catcgcgggc accgagatgc gcatcgtctc cctcaccgac 1080

ccgggcacgg acctccccgc cggagagtcc ggggagatcc tcatccgcgg cccccagatc 1140

atgaagggct acctgggccg ccccgacgcc accgccgcca tgatcgacga ggagggctgg 1200

ctgcacaccg gggacgtcgg acacgtcgac gccgacggct ggctgttcgt cgtcgaccgc 1260

gtcaaggaac tgatcaagta caagggcttc caggtggccc ccgccgaact ggaggcccac 1320

ctgctcaccc accccggcgt cgccgacgcg gccgtcgtcg gcgcctacga cgacgacggc 1380

aacgaggtac cgcacgcctt cgtcgtccgc cagccggccg cacccggcct cgcggagagc 1440

gagatcatga tgtacgtcgc cgaacgcgtc gccccctaca aacgcgtccg ccgggtcacc 1500

ttcgtcgacg ccgtcccccg cgccgcctcc ggcaagatcc tccgccgaca gctcagggag 1560

ccgcgatga 1569

<210> 3

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ahSTSop gene

<400> 3

aggaggtctc gcatggtctc cgtctccggc atccgcaagg tccagcgcgc cgagggcccg 60

gccaccgtcc tcgccatcgg caccgccaac ccgccgaact gcgtcgacca gtccacctac 120

gccgactact acttccgcgt caccaactcc gagcacatga ccgacctcaa gaagaagttc 180

cagcgcatct gcgagcgcac ccagatcaag aaccgccaca tgtacctcac cgaggagatc 240

ctcaaggaga acccgaacat gtgcgcctac aaggccccgt ccctcgacgc ccgcgaggac 300

atgatgatcc gcgaggtccc gcgcgtcggc aaggaggccg ccaccaaggc catcaaggag 360

tggggccagc cgatgtccaa gatcacccac ctcatcttct gcaccacctc cggcgtcgcc 420

ctcccgggcg tcgactacga gctcatcgtc ctcctcggcc tcgacccgtc cgtcaagcgc 480

tacatgatgt accaccaggg ctgcttcgcc ggcggcaccg tcctccgcct cgccaaggac 540

ctcgccgaga acaacaagga cgcccgcgtc ctcatcgtct gctccgagaa cacctccgtc 600

accttccgcg gcccgtccga gaccgacatg gactccctcg tcggccaggc cctcttcgcc 660

gacggcgccg ccgccatcat catcggctcc gacccggtcc cggaggtcga gaacccgctc 720

ttcgagatcg tctccaccga ccagcagctc gtcccgaact cccacggcgc catcggcggc 780

ctcctccgcg aggtcggcct caccttctac ctcaacaagt ccgtcccgga catcatctcc 840

cagaacatca acgacgccct ctccaaggcc ttcgacccgc tcggcatctc cgactacaac 900

tccatcttct ggatcgccca cccgggcggc cgcgccatcc tcgaccaggt cgaggagaag 960

gtcaacctca agccggagaa gatgaaggcc acccgcgacg tcctctccaa ctacggcaac 1020

atgtcctccg cctgcgtctt cttcatcatg gacctcatgc gcaagaagtc cctcgaggcc 1080

ggcctcaaga ccaccggcga gggcctcgac tggggcgtcc tcttcggctt cggcccgggc 1140

ctcaccatcg agaccgtcgt cctccgctcc atggccatct ga 1182

<210> 4

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> atCHSop gene

<400> 4

aggaggtctc gcatggtcac cgtcgaggag taccgcaagg cccagcgcgc cgagggcccg 60

gccaccgtca tggccatcgg caccgccacc ccgaccaact gcgtcgacca gtccacctac 120

ccggactact acttccgcat caccaactcc gagcacaaga ccgacctcaa ggagaagttc 180

aagcgcatgt gcgagaagtc catgatcaag aagcgctaca tgcacctcac cgaggagatc 240

ctcaaggaga acccgtccat gtgcgagtac atggccccgt ccctcgacgc ccgccaggac 300

atcgtcgtcg tcgaggtccc gaagctcggc aaggaggccg cccagaaggc catcaaggag 360

tggggccagc cgaagtccaa gatcacccac ctcgtcttct gcaccacctc cggcgtcgac 420

atgccgggct gcgactacca gctcaccaag ctcctcggcc tccgcccgtc cgtcaagcgc 480

ctcatgatgt accagcaggg ctgcttcgcc ggcggcaccg tcctccgcct cgccaaggac 540

ctcgccgaga acaacaaggg cgcccgcgtc ctcgtcgtct gctccgagat caccgccgtc 600

accttccgcg gcccgaacga cacccacctc gactccctcg tcggccaggc cctcttcggc 660

gacggcgccg gcgccatcat catcggctcc gacccgatcc cgggcgtcga gcgcccgctc 720

ttcgagctcg tctccgccgc ccagaccctc ctcccggact cccacggcgc catcgacggc 780

cacctccgcg aggtcggcct caccttccac ctcctcaagg acgtcccggg cctcatctcc 840

aagaacatcg agaagtccct cgaggaggcc ttccgcccgc tctccatctc cgactggaac 900

tccctcttct ggatcgccca cccgggcggc ccggccatcc tcgaccaggt cgagatcaag 960

ctcggcctca agccggagaa gctcaaggcc acccgcaacg tcctctccaa ctacggcaac 1020

atgtcctccg cctgcgtcct cttcatcctc gacgagatgc gcaaggcctc cgccaaggag 1080

ggcctcggca ccaccggcga gggcctcgag tggggcgtcc tcttcggctt cggcccgggc 1140

ctcaccgtcg agaccgtcgt cctccactcc gtcgccacct ga 1182

<210> 5

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> atCHIop gene

<400> 5

aggaggtctc gcatggccgc ctccatcacc gccatcaccg tcgagaacct cgagtacccg 60

gccgtcgtca cctccccggt caccggcaag tcctacttcc tcggcggcgc cggcgagcgc 120

ggcctcacca tcgagggcaa cttcatcaag ttcaccgcca tcggcgtcta cctcgaggac 180

atcgccgtcg cctccctcgc cgccaagtgg aagggcaagt cctccgagga gctcctcgag 240

accctcgact tctaccgcga catcatctcc ggcccgttcg agaagctcat ccgcggctcc 300

aagatccgcg agctctccgg cccggagtac tcccgcaagg tcatggagaa ctgcgtcgcc 360

cacctcaagt ccgtcggcac ctacggcgac gccgaggccg aggccatgca gaagttcgcc 420

gaggccttca agccggtcaa cttcccgccg ggcgcctccg tcttctaccg ccagtccccg 480

gacggcatcc tcggcctctc cttctccccg gacacctcca tcccggagaa ggaggccgcc 540

ctcatcgaga acaaggccgt ctcctccgcc gtcctcgaga ccatgatcgg cgagcacgcc 600

gtctccccgg acctcaagcg ctgcctcgcc gcccgcctcc cggccctcct caacgagggc 660

gccttcaaga tcggcaactg a 681

<210> 6

<211> 1098

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pcFNSIop gene

<400> 6

atggccccga ccaccatcac cgccctcgcc aaggagaaga ccctcaacct cgacttcgtc 60

cgcgacgagg acgagcgccc gaaggtcgcc tacaaccagt tctccaacga gatcccgatc 120

atctccctcg ccggcctcga cgacgactcc gacggccgcc gcccggagat ctgccgcaag 180

atcgtcaagg cctgcgagga ctggggcatc ttccaggtcg tcgaccacgg catcgactcc 240

ggcctcatct ccgagatgac ccgcctctcc cgcgagttct tcgccctccc ggccgaggag 300

aagctcgagt acgacaccac cggcggcaag cgcggcggct tcaccatctc caccgtcctc 360

cagggcgacg acgccatgga ctggcgcgag ttcgtcacct acttctccta cccgatcaac 420

gcccgcgact actcccgctg gccgaagaag ccggagggct ggcgctccac caccgaggtc 480

tactccgaga agctcatggt cctcggcgcc aagctcctcg aggtcctctc cgaggccatg 540

ggcctcgaga agggcgacct caccaaggcc tgcgtcgaca tggagcagaa ggtcctcatc 600

aactactacc cgacctgccc gcagccggac ctcaccctcg gcgtccgccg ccacaccgac 660

ccgggcacca tcaccatcct cctccaggac atggtcggcg gcctccaggc cacccgcgac 720

ggcggcaaga cctggatcac cgtccagccg gtcgagggcg ccttcgtcgt caacctcggc 780

gaccacggcc actacctctc caacggccgc ttccgcaacg ccgaccacca ggccgtcgtc 840

aactccacct cctcccgcct ctccatcgcc accttccaga acccggccca gaacgccatc 900

gtctacccgc tcaagatccg cgagggcgag aaggccatcc tcgacgaggc catcacctac 960

gccgagatgt acaagaagtg catgaccaag cacatcgagg tcgccacccg caagaagctc 1020

gccaaggaga agcgcctcca ggacgagaag gccaagctcg agatgaagtc caagtccgcc 1080

gacgagaacc tcgcctga 1098