(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0018027
(43) 공개일자 2012년02월29일

(51) Int. Cl.
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0081090
(22) 출원일자 2010년08월20일
심사청구일자 2010년08월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김범석
서울특별시 용산구 회나무로32길 45, SOD10차 303호 (이태원동)
한재우
서울특별시 중랑구 신내로19길 42, 609동 402호 (신내동, 신내아파트)
이동호
서울특별시 성북구 정릉1동 1020번지 우성아파트 105-802
(74) 대리인
김선애

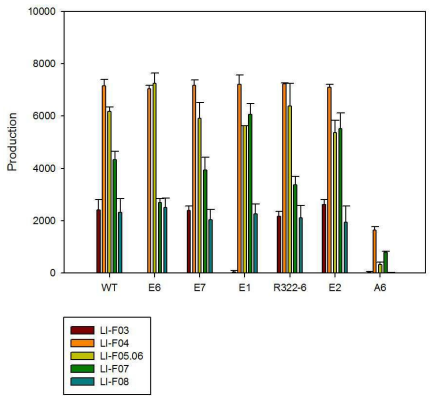
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 푸자리시딘 유도체 ＬＩ－Ｆ０７의 생산량이 증가된 패니바실러스 폴리믹사 디비비１７０９의 변이균주와 이의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709의 변이균주와 이의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 푸자리시딘 생합성 효소 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓을 구성하는 239번, 299번, 322번, 339번 아미노산 잔기가 변경되어, 푸자리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 우수한 항균활성을 보이는 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량을 증가시킨 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 변이균주, 이의 제조방법 및 이를 이용한 푸자리시딘과 이의 유도체의 생산경향 변화방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면 푸자리시딘 생합성 효소의 개량을 통해서 항균활성이 우수한 푸자리시딘 유도체의 생산량을 증가시킬 수 있고, 식물병 방제용 생물농약으로서 푸자리시딘 생산균주의 부가가치를 높일 수 있다.

대 표 도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 푸자리시딘 생합성 효소 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 분리된 유전자 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자는 기질 바인딩 포켓의 235번, 236번, 239번, 278번, 299번, 301번, 322번 및 330번 아미노산 잔기를 코딩하고 있는 것을 특징으로 하는 유전자 단편.

청구항 3

제1항 기재의 유전자 단편에서 아미노산 잔기의 서열 가운데 239번, 299번, 322번 및 330번로 이루어진 그룹의 아미노산 서열 중 하나 이상을 L-페닐알라닌에 대한 선택성이 증가되도록 유전자 코돈을 포인트 뮤테이션을 통해 치환시킨 분리된 유전자 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 322번째 위치의 글라이신(G) GGC 코돈의 두 번째 G를 C로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 알라닌(A)으로 치환되어 G322A의 아미노산 잔기가 치환된 유전자 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 330번째 위치의 발린(V) GTA 코돈의 첫 번째 G를 A로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 아이소류신(I)으로 치환되어 G322A와 V330I의 아미노산 잔기 2개가 치환된 변이가 누적된 유전자 단편.

청구항 6

제5항에 있어서, 299번째 위치의 류신(L) CTA 코돈의 첫 번째 C를 A로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 아이소류신(I)으로 치환되어 G322A와 V330I와 L299I의 아미노산 잔기 3개가 치환된 변이가 누적된 유전자 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, 239번째 위치의 세린(S) TCC 코돈의 두 번째, 세 번째 CC를 GG로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 트립토판(W)으로 치환되어 G322A와 V330I와 L299I와 S239W의 아미노산 잔기 4개가 치환된 변이가 누적된 유전자 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 유전자 단편을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 9

제8항의 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 10

패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 야생균주에서 G322A와 V330I의 아미노산 잔기 2개가 치환된 변이균주 E1 (기탁번호 KACC91575P).

청구항 11

패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 야생균주에서 G322A와 V330I와 L299I의 아미노산 잔기 3개가 치환된 변이균주 E2 (기탁번호 KACC91576P).

청구항 12

1) 푸자리시딘 합성에 관여하는 폴리펩타이드 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓 (substrate binding porket)을 코딩하는 유전자를 클로닝하는 단계;

2) 단계 1)의 유전자를 클로닝 벡터 상에서 포인트 뮤테이션 (point mutation) 시키는 단계; 및

3) 단계 2)의 변이된 유전자를 숙주 세포에 도입하여 형질 전환시키는 단계를 포함하는 푸자리시딘 또는 그 유도체의 생산량이 변화된 유전자 변이균주의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 단계 2)에서 상기 유전자 중 기질 선택성을 결정하는데 중요한 역할을 하는 아미노산 잔기의 서열 가운데 239번, 299번, 322번 및 330번로 이루어진 그룹에서 선택되는 1이상의 아미노산의 염기서열을 L-페닐알라닌에 대한 기질 선택성이 증가되도록 유전자 코돈(codon)을 포인트 뮤테이션을 통해 치환시키는 것을 특징으로 하는 유전자 변이균주의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 변이균주는 G322A와 V330I의 아미노산 잔기 2개가 치환되어 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주인 것을 특징으로 하는 유전자 변이균주의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 변이균주는 G322A와 V330I와 L299I의 아미노산 잔기 3개가 치환된 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주인 것을 특징으로 하는 유전자 변이균주의 제조방법.

청구항 16

1) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 유전자 단편을 발현 벡터에 도입하는 단계;

2) 단계 1)의 유전자가 도입된 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환시키는 단계;

3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하는 단계; 및

4) 단계 3)의 배양물로부터 푸자리시딘 또는 그의 유도체를 분리 정제하는 단계를 포함하는 푸자리시딘 또는 그의 유도체 제조 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709의 변이균주와 이의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 푸자리시딘 생합성 효소 중 세번째 아데닐레이션 도메인의 기질특이성 변동으로, 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 우수한 항균활성을 보이는 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량을 증가시킨 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 변이균주, 이의 제조방법 및 이를 이용한 푸자리시딘과 이의 유도체의 생산경향 변화방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 라이보좀을 사용하지 않고, 펩타이드를 합성하는 효소인 NRPS (Non-ribosomal peptide synthetase)라고 부르는 커다란 멀티모듈(다기능) 효소는 넓은 활성 스펙트럼을 가진 다양한 구조의 2차 대사산물을 생산한다. 선형 펩타이드인 펩타이볼 (Peptaibol), 환형 펩타이드인 사이클로펩타이드 (cyclopeptide), 그리고 슈도펩타이드 (pseudopeptide)가 NRPS를 통해 생합성 된 2차 대사산물로, 주로 미생물에서 생산된다 (R. Finking and MA. Marahiel, 2004. Annual Review of Microbiology. 58: 453-488).

[0003] NRPS는 모듈의 배열로 구성된다. NRPS에서 하나의 모듈은 펩타이드 사슬을 구성하는 아미노산 잔기 하나를 담당한다. 그러므로 NRPS는 펩타이드의 주형이자 생합성 장치로 작용한다. NRPS 내의 모듈의 숫자와 순서는 일반적으로 생합성된 펩타이드의 아미노산 잔기의 수와 순서에 상응한다. 각각의 모듈은 구조적으로 독립된 도메인으

로 나누어지며, 각각의 도메인은 특이적인 기능을 담당한다. Elongation 모듈은 일반적으로 3가지 코어 도메인을 포함한다: 아데닐레이션 (A) 도메인 (Adenylation domain), 펩타이드 운반 단백질 (T) 도메인 (Transfer doamin, PCP (Peptidyl Carrier Protein) 도메인과 동일), 중합 (C) 도메인 (Condensation domain). C-도메인은 때때로 Cy 도메인 (heterocyclization domain)으로 교체된다. MT 도메인 (Methyltransferase domain)과 E 도메인(Epimerization domain)은 연장되는 펩타이드 사슬을 변이 시키는 부가적인 도메인이다. 모듈의 시작 부분은 보통 C-도메인이 결여되어 있고, 모듈의 말단을 보통 Te 도메인 (thioesterase domain)을 가진다 (Lautru and Challis, 2004. Microbiology. 150: 1629-1636). 동일한 기능의 도메인은 매우 보존된 아미노산 서열을 가진 모티프(motif)를 공유하며, 이러한 "코어-모티프"는 단백질 수준에서 개개의 도메인을 동정할 수 있게 한다 (R. Finking and MA. Marahiel, 2004. Annual Review of Microbiology. 58: 453-488).

[0004] A-도메인 서열에 대한 정보가 풍부해짐에 따라 이들 중 일부가 기질 특이적이라는 것이 알려지게 되면서부터 효소의 형태를 유지하고 기질 특이적인 일종의 "signature sequence"에 상응하는 보존된 아미노산 잔기의 서열이 알려졌다. 또한 그라미시딘(gramicidin)의 페닐알라닌(phenylalanine)에 특이적인 A (PheA) 도메인의 크리스탈 구조는 단백질 구조상에 보존된 아미노산 잔기의 위치를 알려주었다 (E. Conti et al., 1997. The EMBO Journal. 16: 4174-4183). 그 이후에 실험은 signature sequence를 사용하여 site-directed mutagenesis를 통해 A-도메인의 기질특이성을 바꿔주었다. Eppelmann과 그의 동료들이 signature sequence code를 사용해서 합리적으로 전체 NRPS module의 기질특이성을 *in vitro*와 *in vivo*에서 바꿔주었다. 그들은 2개의 변이된 A-도메인을 만들었다: 하나는 surfactin synthase의 GluA 도메인이 GlnA로 전환된 것이고, 두번째는 AspA 도메인이 AsnA로 전환된 것이다. 그 결과 *B. subtilis*의 변이균주로부터 야생균주가 생산한 양에 상응하는 만큼의 대체 산물을 얻었다 (K. Eppelmann et al., 2002. Biochemistry. 41: 9718-9726).

[0005] 푸자리시딘은 1987년 Kurusu 등에 의해서 바실러스 폴리믹사 (*Bacillus polymyxa)*의 배양액으로부터 처음 분리된 항생물질로 6개의 아미노산이 고리를 만들고, 여기에 구아니디노-3-하이드록시펜타데카노익산(15-guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid)이 꼬리처럼 연결되어 있는 화학구조를 가지고 있는 사이클릭 리포펩타이드 (cyclic lipopeptide)이다.

[0006] LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08로 명명되었던 푸자리시딘은 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum*)에 대한 최소억제농도 (MIC, Minimum Inhibitory Concentrartion)가 LI-F03이 >100ug/ml, LI-F04가 100ug/ml이었고, LI-F05, LI-F07, LI-F08에서 각각 6.25ug/ml 이었으며, 여러 가지 병원성 진균과 그람양성세균에 강한 활성을 보였다. (K. Kurusu et al., 1987. The Journal of Antibiotics. 11: 1506-1514). LI-F03은 947, 961의 [M+H]+ 값을 가지는 혼합물이었고, LI-F04는 883, 897의 혼합물로 이러한 차이는 푸자리시딘 구조를 구성하는 5번째 아미노산 자리에 아스파라긴(Asn)이나 글루타민(Gln)이 위치하기 때문이다.

[0007] 바실러스 폴리믹사 (Bacillus polymyxa) 균주 KT-8에서 분리된 푸자리시딘 중 [M+H]+ 값이 883인 LI-F03a는 푸자리시딘A로, 897인 LI-F03b는 푸자리시딘B로, 947인 LI-F04a는 푸자리시딘C로, 961인 LI-F04b는 푸자리시딘D로 명명되었고, 그 구조가 밝혀졌으며 (Y. Kajimura and M. Kaneda. 1996. The Journal of Antibiotics. 49: 129-135; Y. Kajimura and M.Kaneda. 1997. The Journal of Antibiotics. 50: 220-228), 이후에 Bacillus polymyxa L-1129로 부터 분리된 나머지 푸자리시딘 유도체 LI-F05a/b, LI-F06a/b, LI-F07a/b, LI-F08a/b의 화학구조도 밝혀졌다 (J. Kuroda et al. 2000. Heterocycles 53: 1533-1549).

[0008] 국내에서는 한국생명공학연구원에서 패니바실러스 폴리믹사 E681 대상으로 푸자리시딘 생합성 유전자 클러스터(군집)를 분리하였고, 도메인 분석을 완료하여, 특허출원 되었고(공개특허 10-2007-0077628) 2007.09.20.자로 특허등록되었으며 (KR 10-0762315), 2008년 보고하였다 (Choi et al. Biochemical and Biophysical Research Communications. 365: 89-95). 국외에서는 카놀라의 검은뿌리썩음병을 일으키는 렙토스페라 마큘란스 (Leptosphaeria maculans)에 대해 항진균활성을 나타내는 패니바실러스 폴리믹사 PKB1을 대상으로 푸자리시딘 생합성에 대한 연구가 Jensen 그룹을 중심으로 진행되어 있다 (PH. Beatty and SE. Jensen. 2002. Canadian Journal of Microbiology 48: 159-169; J. Li, PK. Beatty, S. Shah, SE. Jensen. 2007. Applied and Environmental Microbiology. 73: 3480-3489; J. Li and SE. Jensen. 2008. Chemistry & Biology. 15: 118-127).

[0009] 펩타이드 항생제의 작용기작은 주로 세포막에 결합하여 물질의 투과성을 변동시키는데 있다고 알려져 있다 (Z. Oren, Y. Shai. 1998. Biopolymers (Peptide Science). 47: 451-463; REW. Hancock, DS. Chapple. 1999. Am. Soc. Microbio. 43: 1317-1323; H Huang. 2000. Biochemistry(Washington) 39: 8347-8352) KA. Brogden. 2005. Nature Reviews Microbiology 3: 238-250). 푸자리시딘은 그람 음성균에 대해서는 항균활성이 대체로

약하게 나타나는 경향을 보이는데, 이는 그람 양성균 보다 음성균의 세포벽에 있는 EPS층과 LPS 층이 두터워서 약물이 세포막까지 쉽게 전달되지 못하기 때문인 것으로 여겨지며, 푸자리시딘의 작용기작이 세포막에 있다고 간접적으로 추론할 수 있다. 이 같은 활성은 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산의 총 전하량 (Net charge)과 밀접한 관련이 있다고 여겨지고 있기 때문에, 푸자리시딘을 구성하는 아미노산 잔기의 조성이 중요하다할 것이다.

[0010] 한편, 푸자리시딘 및 그의 유도체가 병원성 그람양성세균과 식물병원성 곰팡이들에 대해 우수한 살균활성이 보고됨에 따라 상업적 활용 가능성이 큰 것으로 여겨지며 푸자리시딘의 생산성 증대가 요구되고 있다. 특히 강한 항균활성을 나타내는 푸자리시딘 유도체의 생산량이 증가된 변이균주와 이의 제작방법은 식물병 방제용 생물농약으로서의 푸자리시딘 생산균주의 부가가치를 높일 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 상기된 연구활동과는 독립적으로 푸자리시딘을 생합성하는 균주 디비비1709를 대상으로 실험을 수행하였으며, 푸자리시딘을 구성하는 아미노산 잔기의 조성이 푸자리시딘 항균활성과 밀접한 관련이 있다는 관점에서 푸자리시딘 유도체 LI-F07은 푸자리시딘 A, B, C, D 보다 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*)에 대하여 보다 강한 항균활성을 나타내는 것으로 추론하였다 (도 1).

[0012] 따라서 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주와 이의 제작방법은 식물병 방제용 생물농약으로서의 푸자리시딘 생산균주의 부가 가치를 높이는데 일조할 것이다.

[0013] 이에 본 발명자들은 패니바실러스 균주 디비비1709에서 푸자리시딘과 이의 유도체를 생산함을 확인했으며, 푸자리시딘의 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓을 구성하는 아미노산 잔기를 코딩하고 있는 유전자 단편과 이를 포인트 뮤테이션시킨 단편을 재조합벡터에 클로닝했으며, 재조합벡터를 이용하여 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주를 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서 본 발명은 패니바실러스 폴리믹사 균주인 디비비1709에 있는 라이보좀에서 유래하지 않은 펩타이드 합성효소의 한 종류인 푸자리시딘(fusaricidin) 생합성 효소의 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 특이성을 변경시킴으로써, 야생형의 균주가 생산하던 LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08 푸자리시딘 타입 항생제의 생산 경향을 LI-F07 타입의 항생제가 더 많이 생산되도록 하는데 그 목적이 있으며, 이 과정에서 생산된 변이 균주 또는 변이 균주의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 (*Paenibacillus polymyxa* DBB1709)의 푸자리시딘 생합성 유전자 가운데 푸자리시딘의 구조를 구성하는 세 번째 아미노산의 선택성을 결정하는 유전자를 확인, 확보하였고, 이 유전자를 조작함으로서 푸자리시딘 유도체의 생산량이 변경된 변이균주를 개발하고, 변이균주가 생산하는 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 함량이 증가함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0017] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는, 푸자리시딘 생합성 효소 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 분리된 유전자 단편 및 상기 유전자 단편에서 아미노산 잔기의 서열 가운데 239번, 299번, 322번 및 330번로 이루어진 그룹의 아미노산 서열 중 하나 이상을 L-페닐알라닌에 대한 선택성이 증가되도록 유전자 코돈을 포인트 뮤테이션을 통해 치환시킨 염기서열을 갖는 분리된 유전자 단편을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 유전자 단편을 포함하는 재조합 벡터 및 이로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0019] 본 발명의 푸자리시딘 및 그의 유도체를 합성효소를 코딩하는 유전자는 플라스미드 등의 적절한 벡터에 클로닝할 수 있으며, 본 발명의 실시예에서는 pBKJ236 벡터를 이용하였다.

[0020] 상기 벡터는 푸자리시딘 항생제를 생산할 수 있는 적당한 숙주세포에 도입될 수 있다. 이에 한정되는 것을 아니

나, 바람직한 숙주세포에는 패니바실러스 폴리믹사균, 대장균 (E. coli), 고초균 (Bacillus substilis) 등이 있으며, 재조합 벡터의 도입방법은 공지의 기술, 즉 열 충격법, 전기충격법 등을 통해 도입할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 변경된 유전자 단편을 사용해서 형질전환되어 푸자리시딘과 푸자리시딘 유도체 생산량이 변경된 6종의 변이균주를 제공한다. 바람직하게는 본 발명은 상기 변이균주 6종 가운데 푸자리시딘 유도체 LI-F07 (푸자리시딘을 구성하는 세 번째 아미노산이 L-페닐알라닌)의 생산량이 야생균주 보다 증가되는 경향을 보이는 E1 (기탁번호 KACC91575P)과 E2 (기탁번호 KACC91576P) 2종을 제공한다.

[0022] 나아가 본 발명은 1) 푸자리시딘 합성에 관여하는 폴리펩타이드 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓 (substrate binding porket)을 코딩하는 유전자를 클로닝하는 단계; 2) 단계 1)의 유전자를 클로닝 벡터 상에서 포인트 뮤테이션 (point mutation) 시키는 단계; 및 3) 단계 2)의 변이된 유전자를 숙주 세포에 도입하여 형질 전환시키는 단계를 포함하는 푸자리시딘 또는 그 유도체의 생산량이 변화된 유전자 변이균주의 제조방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 1) 푸자리시딘 생합성 유전자 가운데 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓이 L형의 페닐알라닌에 대한 기질 선택성이 증가되도록 변이된 유전자 단편을 발현 벡터에 도입하는 단계; 2) 단계 1)의 유전자가 도입된 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환시키는 단계; 3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하는 단계; 및 4) 단계 3)의 배양물로부터 푸자리시딘 또는 그의 유도체를 분리 정제하는 단계를 포함하는 푸자리시딘 또는 그의 유도체 제조방법을 제공한다.

[0024] 이하, 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0025] 본 발명은 푸자리시딘 구조에서 세 번째 아미노산의 서열을 결정하는 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 유전자 단편 및 상기 푸자리시딘 바인딩 포켓의 L-페닐알라닌에 대한 기질 선택성이 증가되도록 변경된 유전자 단편을 제공한다.

[0026] 상기에서 푸자리시딘의 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 보존적인 아미노산 염기서열을 바탕으로 디제너레이티드 (degenerated)된 PCR primer를 제작하여 상기 유전자를 포함하는 유전자 단편을 분리하고 클로닝하였다. 상기 유전자 중 기질 선택성을 결정하는데 중요한 역할을 하는 235번, 236번, 239번, 278번, 299번, 301번, 322번, 330번, 517번 (크리스탈로그래피를 통해서 단백질의 3차원 구조가 결정된 그라미사이딘 생합성 효소 GrsA의 아미노산 잔기의 염기 순번을 기초로 넘버링되었음) 아미노산 잔기의 서열 가운데 239번, 299번, 322번, 330번의 아미노산의 염기 서열을 L-페닐알라닌에 대한 선택성이 높은 그라미사이딘 생합성 효소 GrsA의 서열을 따르도록 유전자 코돈(codon)을 포인트 뮤테이션을 통해 치환시켰다 (서열번호 2-5).

[0027] 보다 구체적으로 본 발명은 322번째 위치의 글라이신(G) GGC 코돈의 두 번째 G를 C로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 알라닌(A)으로 치환된 유전자 단편 (G322A; 서열번호 2)을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 치환된 유전자 단편 (G322A)에 있어서, 330번째 위치의 발린(V) GTA 코돈의 첫 번째 G를 A로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 아이소류신(I)으로 치환된 변이가 누적된 유전자 단편 (G322A와 V330I; 서열번호 3)을 제공한다. 본 발명은 상기 치환된 유전자 단편 (G322A와 V330I5)에 있어서, 299번째 위치의 류신(L) CTA 코돈의 첫 번째 C를 A로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 아이소류신(I)으로 치환된 변이가 누적된 유전자 단편 (G322A와 V330I와 L299I; 서열번호 4)을 제공한다. 본 발명은 상기 치환된 유전자 단편 (G322A와 V330I와 L299I)에 있어서, 239번째 위치의 세린(S) TCC 코돈의 두 번째, 세 번째 CC를 GG로 포인트 뮤테이션 시킨 결과, 트립토판(W)으로 치환된 유전자 단편 (G322A와 V330I와 L299I와 S239W; 서열번호 5)을 제공한다.

[0028] 변경된 유전자 단편은 다시 재조합 벡터에 클로닝 되었다. 이를 위하여 PCR 기반의 포인트 뮤테이션 기법이 사용되었으나, 다양한 기술이 적용될 수 있다 (Kunkel, T. A. 1985. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(2):488-9; Sugimoto, M., Esaki, N., Tanaka, H. and Soda, K. 1989. *Anal Biochem* 179(2):309-11; Taylor, J. W., Ott, J. and Eckstein, F. 1985. *Nucleic Acids Res* 13(24):8765-85; Vandeyar, M. A., Weiner, M. P., Hutton, C. J. and Batt, C. A. 1988. *Gene* 65(1):129-133; Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A. 1996. *Strategies* 9(3):3-4; Nelson, M. and McClelland, M. 1992. *Methods Enzymol* 216:279-303)

[0029] 본 발명은 푸자리시딘 생합성 유전자 가운데 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓이 L-페닐알라닌에 대한 선택성이 증가되도록 변경된 변이균주를 제공한다. 본 발명자들은 상기에서 제조된 재조합 벡터를 푸자리시딘 생산 균주인 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709에 형질전환시켜 푸자리시딘 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 기질 특이성을 변경시켜 푸자리시딘 유도체인 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주를

제조하여 E1과 E2로 명명하였고, 그 외 4개의 변이균주가 제조되었다. 본 발명은 상기된 재조합벡터를 이용하여 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709를 형질전환시키면 재조합벡터 내 클로닝 된 포인트 뮤테이션시킨 바인딩 포켓의 유전자 염기서열과 염색체내 바인딩 포켓의 유전자 염기서열이 동일하기 때문에 염기서열간의 상동 재조합 현상이 유도된다. 상기 상동 재조합 현상으로 L-페닐알라닌에 대한 기질 선택성이 증가된 변이균주가 제조된다. 이를 위하여 I-SceI mediated allelic exchange 기술을 사용하였으나, 다양한 기술이 적용될 수 있다 (Janes, B. and S. Stibitz (2006). "Routine markerless gene replacement in Bacillus anthracis." Infection and immunity 74(3): 1949-1953.).

[0030] 본 발명에 의해 제조된 변이균주의 특성은 다음과 같다.

[0031] 본 발명은 상기 유전자 단편을 이용하여 제조된 G322A의 아미노산 잔기 1개가 치환된 변이균주 E6를 제공한다. 상기 E6는 LI-F07의 생산이 야생균주에 비해 37% 감소되는 경향을 보이며, 푸자리시딘 유도체의 생산 총량과 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균활성이 각각 야생균주의 87.1%와 98.1% 수준으로 감소되는 경향을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명은 상기 유전자 단편을 이용하여 제조된 V330I의 아미노산 잔기 1개가 치환된 변이균주 E7를 제공한다. 상기 E7는 LI-F07의 생산이 야생균주에 비해 9% 감소되는 경향을 보이며, 푸자리시딘 유도체의 생산 총량과 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균활성이 각각 야생균주의 95.8%와 94.3% 수준으로 감소되는 경향을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0033] 본 발명은 상기 유전자 단편을 이용하여 제조된 G322A와 V330I의 아미노산 잔기 2개가 치환된 변이균주 E1를 제공한다. 상기 E1은 LI-F07의 생산이 야생균주 보다 40% 증가하며, 생합성된 푸자리시딘 유도체 중 LI-F07이 차지하는 비중이 28.6%로 19.3%인 야생균주보다 높으며, 푸자리시딘 유도체의 생산 총량과 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균활성이 각각 야생균주의 94.8%와 78.3% 수준으로 감소되는 경향을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 발명은 상기 유전자 단편을 이용하여 제조된 L299I와 S239W의 아미노산 잔기 2개가 치환된 변이균주 R322-6를 제공한다. 상기 R322-6은 LI-F07의 생산이 야생균주에 비해 22% 감소되는 경향을 보이며, 푸자리시딘 유도체의 생산 총량과 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균활성이 각각 야생균주의 95%와 91.5% 수준으로 감소되는 경향을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명은 상기 유전자 단편을 이용하여 제조된 G322A와 V330I와 L299I의 아미노산 잔기 3개가 치환된 변이균주 E2를 제공한다. 상기 E2는 LI-F07의 생산이 야생균주 보다 27.4% 증가하며, 생합성된 푸자리시딘 유도체 중 LI-F07이 차지하는 비중이 24.8%로 19.3%인 야생균주보다 높으며, 푸자리시딘 유도체의 총 생산량과 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균활성이 다른 변이균주에 비해 높으며, 야생균주와 같은 경향을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명은 상기 유전자 단편을 이용하여 제조된 G322A와 V330I와 L299I와 S239W가 치환된 변이균주 A6를 제공한다. 상기 A6는 균주의 생장이 야생균주에 비해 떨어지며, 동시에 푸자리시딘의 생산총량이 야생균주 대비 12.5%로 크게 감소하고, 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균활성 역시 급격하게 떨어지지만, 야생균주(푸자리시딘 유도체 중 LI-F07이 차지하는 비율이 19.3%)에 비해서 LI-F07 (생합성된 푸자리시딘 유도체 중 28.4%)에 편중된 생산 경향을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명자들은 LC/MS 시스템을 이용하여 상기 변이균주가 생산하는 푸자리시딘과 푸자리시딘 유도체의 함량 변화의 유동성을 확인하였고, 종이 디스크-한천 배지 확산법을 사용하여 변이균주의 항균 활성도 *in vitro* 수준에서 확인하였다.

[0038] 본 발명에 의한 푸자리시딘과 그 유도체의 생산량이 변경된 변이균주의 제조방법 및 그 변이균주로부터 생산된 푸자리시딘과 그 유도체의 생산량을 정량분석하는 방법은,

[0039] 1) 푸자리시딘 합성에 관여하는 폴리펩타이드 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓 (substrate binding porket)을 코딩하는 유전자를 클로닝하는 단계; 2) 단계 1)의 유전자를 클로닝 벡터 상에서 포인트 뮤테이션 (point mutation) 시키는 단계; 3) 단계 2)의 변이된 유전자를 숙주 세포에 도입하여 형질 전환시키는 단계; 4) 단계 3)의 변이균주를 배양하는 단계; 및 5) 변이균주의 배양물로부터 생성된 푸자리시딘과 이의 유도체를 분리정제하여 생산량을 야생균주와 비교해서 정량 분석하는 단계로 구성된다.

[0040] 바람직하게, 상기 단계 2)에서 상기 유전자 중 기질 선택성을 결정하는데 중요한 역할을 하는 235번, 236번,

239번, 278번, 299번, 301번, 322번, 330번, 517번 (크리스탈로그래피를 통해서 단백질의 3차원 구조가 결정된 그라미사이딘 생합성 효소 GrsA의 아미노산 잔기의 염기 순번을 기초로 넘버링 되었음) 아미노산 잔기의 서열 가운데 239번, 299번, 322번, 330번의 아미노산의 염기 서열을 L-페닐알라닌에 대한 선택성이 높은 그라미사이딘 생합성 효소 GrsA의 서열을 따르도록 유전자 코돈(codon)을 포인트 뮤테이션을 통해 치환시키는 것을 특징으로 한다.

[0041] 바람직하게, 상기 변이균주는 푸자리시딘 유도체인 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주인 것을 특징으로 한다.

[0042] 본 발명은 G322A와 V330I의 아미노산 잔기 2개가 치환되어 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주 E1 (기탁번호 KACC91575P)을 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 G322A와 V330I와 L299I의 아미노산 잔기 3개가 치환된 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 변이균주 E2 (기탁번호 KACC91576P)을 제공한다.

발명의 효과

[0044] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709의 푸자리시딘 생합성 효소의 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 특이성을 페닐알라닌에 대한 선택성을 높이는 방향으로 변동시켰을 때, 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 변이 균주를 얻을 수 있었다.

[0045] 따라서 본 발명은 푸자리시딘 생합성 효소의 개량을 통해서 항균활성이 우수한 푸자리시딘 유도체의 생산량을 증가시킬 수 있고, 식물병 방제용 생물농약으로서 푸자리시딘 생산균주의 부가가치를 높일 수 있다.

[0046] 또한, 여기에 사용된 방법은 새로운 펩타이드 항생제를 제조하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명에 의한 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 균주가 생산한 푸자리시딘과 그 유도체를 LC/MS로 분석한 데이터와 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 항균활성을 종이 디스크-한천 배지 확산법을 사용해서 억제환의 크기를 측정한 결과를 나타낸다. 보다 상세하게는 LI-F07(▲)의 생산량은 주요 산물인 LI-F03 (★, 푸자리시딘 C, D)와 LI-F04 (◆, 푸자리시딘 A, B)보다 적었지만, 이에 준하는 항균활성을 보였다.

도 2는 그라미시딘(gramicidin) 생합성 효소 GrsA와 타이로시딘(tyrocidin) 생합성 효소 TycA와 푸자리시딘 생합성 효소의 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 235번, 236번, 239번, 278번, 299번, 301번, 322번, 330번, 517번 아미노산 염기서열을 비교한 도면이다.

도 3은 푸자리시딘 생합성 효소 가운데 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 3차 구조의 예측 모델과 이의 모식도를 나타낸다. 노란색 아미노산 잔기가 야생균주의 아미노산 염기서열, 빨간색으로 표시된 아미노산 잔기가 변이균주의 아미노산 염기서열을 나타낸다.

도 4는 본 발명에 의한 I-SceI 사이트를 이용한 상동 재조합 방법의 모식도를 나타낸다.

도 5는 본 발명에 의한 균주 E6, E7, E1, R322-6, E2, A6의 변이된 유전자의 염기서열 (서열번호 8 - 13) 분석 결과를 나타낸다.

도 6은 야생균주와 변이균주가 생산한 푸자리시딘 A/B, C/D (LI-F04, LI-F03) 및 이의 유도체(LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08)의 합성 경향 비교한 결과를 나타낸다. WT는 야생균주, E6는 G322A가, E7는 V330I가, E1은 G322A와 V330I가, R322-6은 L299I와 S239W가, E2는 G322A와 V330I와 L299I가, A6는 G322A와 V330I와 L299I와 S239W가 치환된 변이균주를 나타낸다.

도 7은 야생균주와 변이균주의 푸자리시딘 및 이의 유도체 총량을 비교한 결과를 나타낸다.

도 8은 야생균주와 변이균주의 추출물 간의 항균활성을 비교한 결과를 나타낸다.

도 9는 야생균주(WT)와 변이균주 A6의 생장곡선을 비교한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] **<실시예 1> 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709의 배양액으로부터 푸자리시딘 확인**

[0050] 브레인 하트 인퓨전 (이하 BHI, Bacto™Brain Heart Infusion) 배지에서 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709를 호기적 조건에서 28℃, 200rpm에서 오버나잇으로 전 배양한 다음, Yeast extract 10g, Malt extract 10g, Soybean meal 5g, Glucose 5g을 주성분으로 하는 생산 배지 100ml에 전배양액을 2ml씩 접종해서 30시간 동안 상기 조건으로 진탕 배양하여, 원심분리 (8,000 rpm, 30 min) 후 상등액과 셀(cell)을 나눴다.

[0051] 배양 상등액의 부탄올 추출물과 셀 에탄올 추출물을 감압 농축한 다음에 소량의 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹인 산물을 LC/MS (Liquid Chromatography/Mass spectroscopy) 시스템을 사용해서 분석했을 때, 푸자리시딘과 이의 유도체의 생산을 확인할 수 있었고(도 1), 종이 디스크-한천 배지 확산법으로 푸사리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 항균활성이 푸자리시딘 유도체 LI-F07가 주요산물인 푸자리시딘 A, B, C, D 보다 강하다는 것을 확인할 수 있었다 (도 1).

[0052] UPLC/ESI-ToF-MS (Ultra Performence Liquid Chromatography/Electro Spray Ionization-Quardropole-Time of Flight-Mass spectroscopy; Waters, USA) 시스템을 상에서 0.1% 포름산 (formic acid)이 첨가되어 있는 아세토나이트릴(acetonitril)과 물을 용매로 하여 0.3ml/min의 조건으로 분석하였다. 20-40%까지 아세토나이트릴 그레디언트(gradient)를 3분간 사용했으며, 이후에는 2분간 40% 아세토나이트릴을 아이소크라틱으로 사용했을 때, [M+H]+ 이온 피크가 947, 961, 883, 897, 911, 931, 945, 925.5를 나타내는 푸자리시딘 A, B, C, D와 LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08이 생산됨을 확인할 수 있었다 (도 1). LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08 화합물은 푸자리시딘 유도체를 말하며, 푸자리시딘 A, B, C, D는 각각 LI-F04a, LI-F04b, LI-F03a, LI-F03b와 동일한 화합물이다. 표 1은 푸자리시딘 A, B, C, D와 이의 유도체 LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08 각각의 아미노산 조성과 이온값 [M+H]+을 나타낸다.

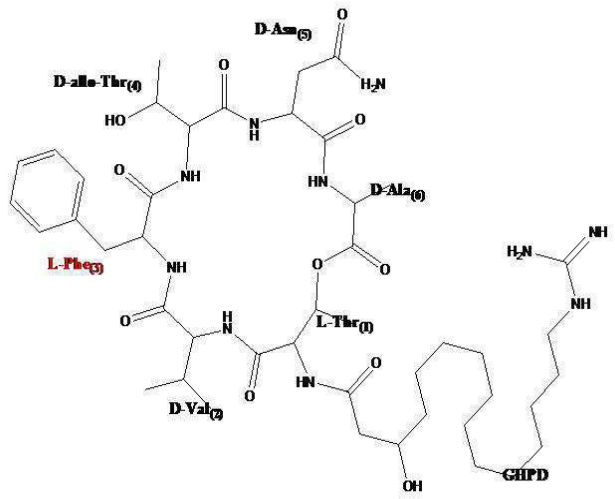
표 1

[0053]

Fusaricidins	(2)	(3)	(5)	$(M+H)^+$
LI-F03a (Fusaricidin C)	D-Val	L-Tyr	D-Asn	947
LI-F03b (Fusaricidin D)	D-Val	L-Tyr	D-Gln	961
LI-F04a (Fusaricidin A)	D-Val	L-Val	D-Asn	883
LI-F04b (Fusaricidin B)	D-Val	L-Val	D-Gln	897
LI-F05a	D-Val	L-Ile	D-Asn	897
LI-F05b	D-Val	L-Ile	D-Gln	911
LI-F06a	D-allo-Ile	L-Val	D-Asn	897
LI-F06b	D-allo-Ile	L-Val	D-Gln	911
LI-F07a	D-Val	L-Phe	D-Asn	931
LI-F07b	D-Val	L-Phe	D-Gln	945
LI-F08a	D-Ile	D-allo-Ile	D-Asn	911
LI-F08b	D-Ile	D-allo-Ile	D-Gln	925

[0054] 푸자리시딘 유도체 LI-F07은 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 활성이 다른 푸자리시딘에 비해서 좀 더 강한 편이므로 LI-F07 화합물의 생산량을 증가시키는데 본 발명의 목적을 두었다. 화학식 1은 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 화학식이다.

화학식 1



[0055]

[0056] **<실시예 2> 푸자리시딘 유도체 LI-F07의 생산량이 증가된 변이체의 제조**

[0057] [화학식 1]에서처럼 푸자리시딘은 6개의 아미노산으로 구성된 고리구조와 여기에 연결된 1개의 지방산 사슬을 가진 사이클릭 리포펩타이드 (cyclic lipopeptide)로써 푸자리시딘 유도체 LI-F07을 구성하는 세 번째 아미노산이 페닐알라닌을 가지고 있었기 때문에 본 발명자들은 푸자리시딘을 생합성하는 단백질의 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 특이성을 페닐알라닌에 특이적으로 만드는 실험을 수행하였다.

[0058] **<실시예 2-1> 푸자리시딘 생합성 유전자 중 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓을 클로닝**

[0059] 패니바실러스 폴리믹사 디비비1709 (동부하이텍)로 부터 A. Mehling, UF Wehmeier, W. Piepersberg. FEMS Microbiology Letters. 128, 119-126. 1995의 방법으로 추출한 DNA를 주형 (templete)으로 사용하고, 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓에 보존적인 아미노산 염기서열을 기반으로 제작된 한 쌍의 디제너레이티드 프라이머 (degenerated primer) fusA-F (5'-GAT CTK GCY TAY GTB AT-3'; 서열번호 6)와 fusA-R (5'-AAC GGR TTR TCH ACG AA-3'; 서열번호 7)을 사용해서 PCR (Polymerase Chain Reaction) 한 산물을 TOPO TA Cloning Kit (invitrogen)로 클로닝하였다. 이 가운데 푸자리시딘 생합성 단백질의 세 번째 아데닐레이션 도메인의 바인딩 포켓 부분을 코딩(coding)하고 있는 클론을 DNA 염기서열을 분석해서 탐색하였다.

[0060] **<실시예 2-2> 클로닝된 아데닐레이션 도메인의 기질 바인딩 포켓의 포인트 뮤테이션 (point mutation)**

[0061] 푸자리시딘 유도체 중 LI-F07 유도체의 세 번째 아미노산이 페닐알라닌을 가지고 있기 때문에 본 발명자들은 세 번째 아데닐레이션 도메인의 기질 특이성을 페닐알라닌에 대한 선택성을 높이는 방향으로 실험을 수행하였다. 디비비1709 균주의 푸자리시딘 세 번째 아데닐레이션 도메인의 바인딩 포켓 부분의 아미노산 염기서열을 L폼의 페닐알라닌 (L-Phenylalanine)에 특이적으로 결합하는 그라미시딘 (gramicidin) 생합성 단백질 GrsA의 기질 바인딩 포켓과 비교하였다 (도 2).

[0062] 분석 결과 GrsA의 기질 특이성에 관계하는 바인딩 포켓의 시그니쳐 (signiture) 아미노산 잔기서열이 D235, A236, **W239**, T278, **I299**, A301, **A322**, **I330**, K517 이였으며, 푸자리시딘의 3번째 아데닐레이션 도메인은 D235, A236, **S239**, T278, **L299**, A301, **G322**, **V330**, K517의 아미노산 서열을 가지고 있었다.

[0063] 본 발명자들은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)을 사용해서 푸자리시딘 세 번째 아데닐레이션 도메인의 바인딩 포켓 부분의 아미노산 잔기를 S239W (239번 아미노산 잔기가 세린(S)에서 트립토판(W)으로 치환), L299I (299번 아미노산 잔기가 류신(L)에서 아이소류신(I)으로 치환), G322A (322번 아미노산 잔기가 글라이신(G)에서 알라닌(A)으로 치환), V330I (330번 아미노산 잔기가 발린(V)에서 아이소류신(I)으로

치환)로 [도 3]과 같이 치환하는 실험을 수행하였다. 돌연변이를 누적시켜서 치환하는 방법을 수행하였으며, 결과적으로 아미노산 잔기를 코딩하는 유전자가 G322A, G322A+V330I, G322A+V330I+L299I, G322A+V330I+L299I+S239W로 치환된 4종류의 클론을 얻었다.

[0064] **<실시예 2-3> 변이된 유전자를 숙주 세포에 도입하여 형질전환**

[0065] I-*Sce*I mediated allelic exchange in B. anthracis 방법 (Janes, B. and S. Stibitz (2006). "Routine markerless gene replacement in Bacillus anthracis." Infection and immunity 74(3): 1949-1953)을 사용해서 변이된 유전자를 [도 4]와 같은 방법으로 숙주 세포에 도입하였다.

[0066] 클로닝 벡터로 부터 제한효소 BamHI과 HindIII로 더블 커팅해서 잘라낸 변이된 유전자를 pBKJ236 재조합벡터 (Janes and Stibitz)에 다시 클로닝 한 다음, 대장균 균주 SCS110 (Janes and Stibitz)에 전기천공법을 사용해서 도입하였다. SCS110 균주를 도너 (donor) 균주로 SS1827 균주 (Janes and Stibitz)를 헬퍼 (helper) 균주로 사용해서 디비비1709 (recipient)에 3-컴포넌트 (component) 접합 (conjugation) 법을 사용해서 변이된 유전자를 디비비1709 균주에 도입하였다.

[0067] 도입된 유전자는 싱글크로스오버 (single crossover)를 통해서 표적 부위의 유전자 옆에 삽입되게 되며, 도입된 pBKJ236 벡터는 템퍼리처 센서티브 유전자 (temperature sensitive) 유전자를 가지고 있기 때문에, 37도씨에서 큐어링(curing) 되게 된다. 또한 pBKJ236은 에리스로마이신 (erythromycin)에 저항성 유전자를 가지고 있음으로 여기에 저항성인 균주만을 선택배지에서 선발하였다. 제한효소 SceI을 생합성하는 유전자를 가지고 있는 벡터 pSS4337를 가지고 있는 SCS110 균주 (doner)와 SS1827 균주 (helper)를 변이된 유전자가 도입된 디비비1709 (recipient)에 다시 3-컴포넌트 접합법을 수행하면 pSS4337 벡터가 도입되게 된다. 변이 균주 내부에서 생합성된 SceI은 디비비1709에 삽입된 벡터 pBKJ236에 있는 I-SceI 지역을 잘라버리면서, 도입된 유전자와 원래 디비비1709 균주가 가지고 있던 유전자 사이에 알레릭 익스체인지 (allelic exchange)가 일어나게 되며, 본 발명자들은 에리스로마이신에 감수성인 (sensitive) 균주를 선발한 후 염기서열 분석을 통해서 원하는 변이결과를 확인하였다 (도 5).

[0068] 결과적으로 아데닐레이션 도메인의 기질 선택성을 결정하는 아미노산 염기 서열이 치환된 변이 균주 E6, E7, E1, R322-6, E2, A6 (서열번호 8 - 13 참조)를 얻을 수 있었다. E6는 G322A가, E7는 V330I가, E1은 G322A와 V330I가, R322-6은 L299I와 S239W가, E2는 G322A와 V330I와 L299I가, A6는 G322A와 V330I와 L299I와 S239W가 치환된 변이균주이다. 표 2에 야생균주와 변이균주 E6, E7, E1, R322-6, E2, A6의 기질 바인딩 포켓에 있는 235번, 236번, 239번, 278번, 299번, 301번, 322번, 330번, 517번 아미노산 잔기 비교하여 나타내었다.

표 2

Strain	Amino acid residues related to substrate recognition of adenylation domain										Activated Substrate
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	
WT	D	A	S	T	L	A	G	V	C	K	Val/Ile/Tyr/Phe/allo-Ile
E6	D	A	W	T	L	A	G	V	C	K	Val/Ile/Phe/allo-Ile
E7	D	A	S	T	I	A	G	V	C	K	Val/Ile/Tyr/Phe/allo-Ile
E1	D	A	W	T	I	A	G	V	C	K	Val/Ile/Phe/allo-Ile
R322-6	D	A	S	T	L	A	A	I	C	K	Val/Ile/Tyr/Phe/allo-Ile
E2	D	A	S	T	I	A	A	I	C	K	Val/Ile/Tyr/Phe/allo-Ile
A6	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K	Val/Ile/Phe

GrsA and TycA contain amino acid residues, DAWTIAAICK, at the positions of 235, 236, 239, 278, 299, 301, 322, 330, 331, 517 for phenylalanine recognition.

[0069]

[0070] WT: 야생균주 (Wild-type), Peanibacillus sp. strain DBB1709

[0071] E6: G322A가 치환된 변이균주

[0072] E7: V330I가 치환된 변이균주

[0073] E1: G322A와 V330I가 치환된 변이균주

[0074] R322-6: L299I와 S239W가 치환된 변이균주

[0075] E2: G322A와 V330I와 L299I가 치환된 변이균주

[0076] A6: G322A와 V330I와 L299I와 S239W가 치환된 변이균주

[0077] **<실시예 3> 야생균주와 변이균주간의 푸자리시딘 생합성 경향 확인**

[0078] 브레인 하트 인퓨전 (이하 BHI, Bacto™Brain Heart Infusion) 배지에서 패니바실러스 폴리믹사 DBB1709와 변이균주를 호기적 조건에서 28℃, 200rpm으로 오버나잇으로 전 배양한 다음, Yeast extract 10g, Malt extract 10g, Soybean meal 5g, Glucose 5g을 주성분으로 하는 생산 배지 100ml에 전배양액을 2ml씩 접종해서 30시간 동안 상기 조건으로 진탕 배양하여, 원심분리 (8,000 rpm, 30 min) 후 상등액과 셀(cell)을 얻었다.

[0079] 배양 상등액은 동량의 부탄올과 1:1 비율로 섞어서 분별깔때기에 넣고 3분간 충분히 흔들어준 다음, 분리된 유기용매 층을 수집했다. 셀은 배양액과 동량의 에탄올에 현탁시킨 후에 90분간 초음파분해기(sonicator)에 넣은 다음, 원심분리 (8,000 rpm, 30min)한 여과액을 얻었다.

[0080] 배양 상등액의 부탄올 추출물과 셀 에탄올 추출물을 합쳐서 감압 농축한 다음에 소량의 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹인 산물을 LC/MS 시스템을 사용해서 분석했을 때, 야생균주와 변이균주 간의 푸자리시딘의 생합성 경향의 차이를 확인할 수 있었다.

[0081] UPLC/ESI-Q-ToF-MS (Waters, USA) 시스템 상에서 0.1% 포름산 (formic acid)이 첨가되어 있는 아세토나이트릴 (acetonitril)과 물을 용매로 하여 0.3ml/min의 조건으로 분석하였다. 20-40%까지 아세토나이트릴 그라디언트 (gradient)를 3분간 사용했으며, 이후에는 2분간 40% 아세토나이트릴을 아이소크라틱으로 사용해서, [M+H]+ 이온 피크가 947, 961, 883, 897, 911, 931, 945, 925.5를 나타내는 푸자리시딘 A, B, C, D와 LI-F05, LI-F06, LI-F07, LI-F08이 생산량의 변화를 SIM (Selective Ion Mode)에서 비교 분석하였다. 배양부터 분석에 이르기까지의 과정을 3회 반복해서 데이터를 얻었다.

[0082] 분석 결과 [도 6]에서처럼 목적했던 푸자리시딘 유도체 LI-F07 산물의 생산량이 야생균주보다 변이균주 E1 (아미노산 2개 치환)과 E2 (아미노산 3개 치환)에서 각각 40%와 27.4% 증가되었음을 확인할 수 있었다. 전체 생합성 된 푸자리시딘 유도체 중 LI-F07 함량을 살펴보면 야생균주(19.4%) 보다 E1(28.6%)과 E2(24.5%)가 높았다. 변이균주 A6 (아미노산 4개 치환)의 경우 푸자리시딘 유도체 중 LI-F07이 차지하는 비중이 28.4%로 LI-F07이 생합성되는 비율이 야생균주 보다 높았지만 전체 합성된 푸자리시딘 유도체의 총량이 야생균주 대비 12.5%에 불과했다. [도 7] 처럼 야생균주와 변이균주 사이에 생산된 푸자리시딘과 푸자리시딘 유도체의 총량 증감이 있었고, 변이균주 E2의 경우 푸자리시딘 유도체의 총생산량이 다른 변이균주보다 많았고, 야생균주 수준의 생산량을 보였다.

[0083] 푸자리움 옥시스포룸 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 푸자리시딘 조추출물의 항균 활성을 *in vitro*에서 종이 디스크-한천배지 확산 (paper disk-agar diffusion) 법으로 평가했을 때, [도 8]과 같이 E2의 활성이 다른 변이균주에 비해 높았으며, 야생균주에 준함을 확인할 수 있었다. G322A와 V330I와 L299I와 S239W가 모두 치환된 변이균주 A6의 경우 푸자리시딘 유도체의 총량이 야생균주의 12.5%에 불과했는데, 이는 변이균주 A6의 생육상이 같은 배양 조건에서 야생균주에 비해 좋지 않았기 때문이다 [도 9].

[0084] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0085]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91575

수탁일자 : 20100804

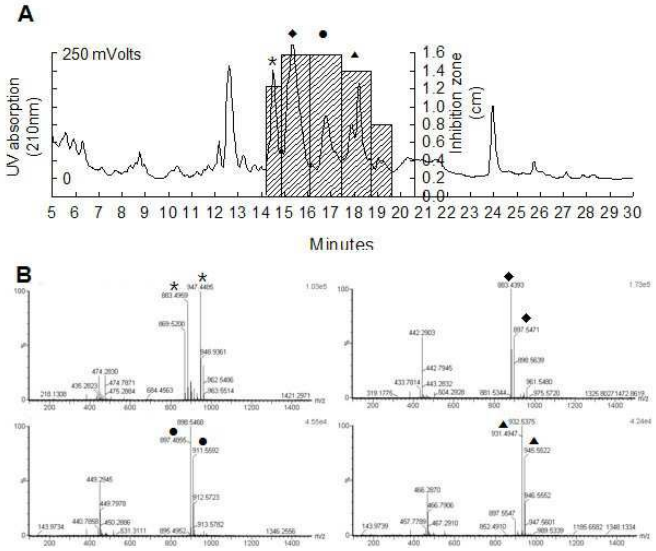
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91576

수탁일자 : 20100804

도면

도면1

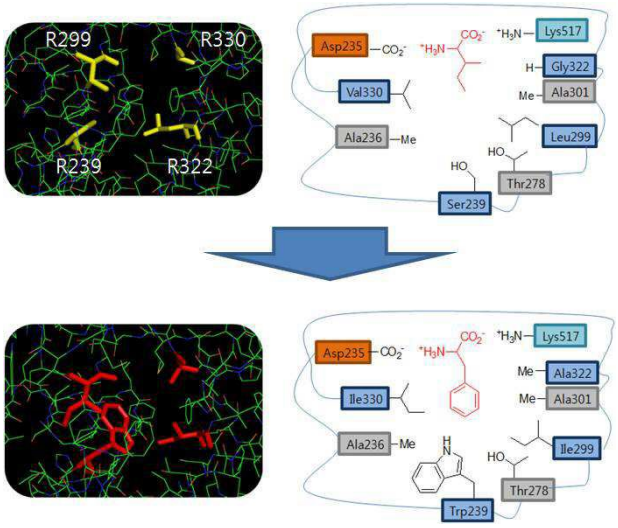


도면2

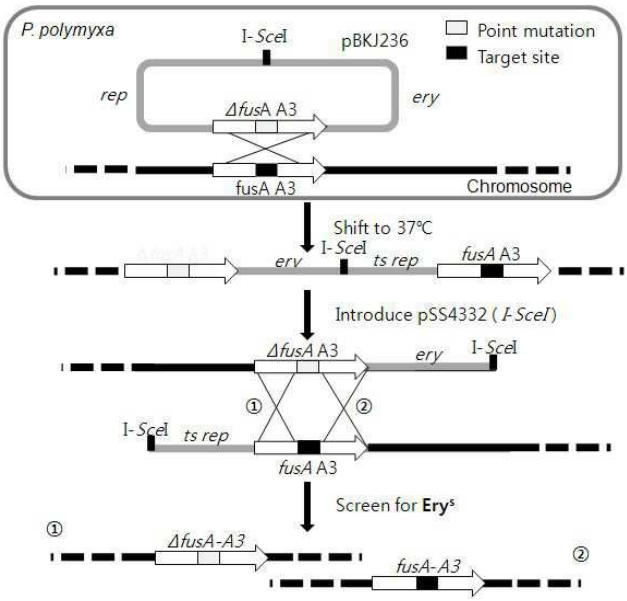
```
                    *
                R236 R239                                  R278
TycA            FDASVWEMFMALLSGASLYILSKQTIHDFAAFEHYLSENELTIITLPPTY 50aa
GrsA            FDASVWEMFMALLTGASLYIILKDTINDFVKFEQYINQKEITVITLPPTY 50aa
FusA-A3(PKB1)   FDASVSEILTALSHGGVLCIPSTQDILDHALFEQFMNDKGITVATLPPAY 50aa
FusA-A3(DBB1709) FDASVSEIITALSHGATLCIPSTQDILDHALFEQFMNSKAITIATLPPAY 50aa

                          *                  *          *
                          R299 R301          R322       R330 R331
                                                                  %Identity
TycA            LTHLTPERITSLRIMITAGSASSAPLVNKWKDKLRYINAYGPTETSICA 99aa   54
GrsA            VVHLDPERILSIQTLITAGSATSPSLVNKWKEKVTYINAYGPTETTICA 99aa   54
FusA-A3(PKB1)   AIHLDPERLPTLRCLLTAGSAASVELIEEWRKHVRYSNGYGPTEDSVCT 99aa   86
FusA-A3(DBB1709) IIHLEPERLPALRCLLTAGSATSVELIEKWRKHVQYFNGYGPTEDSVCT 99aa  100
```

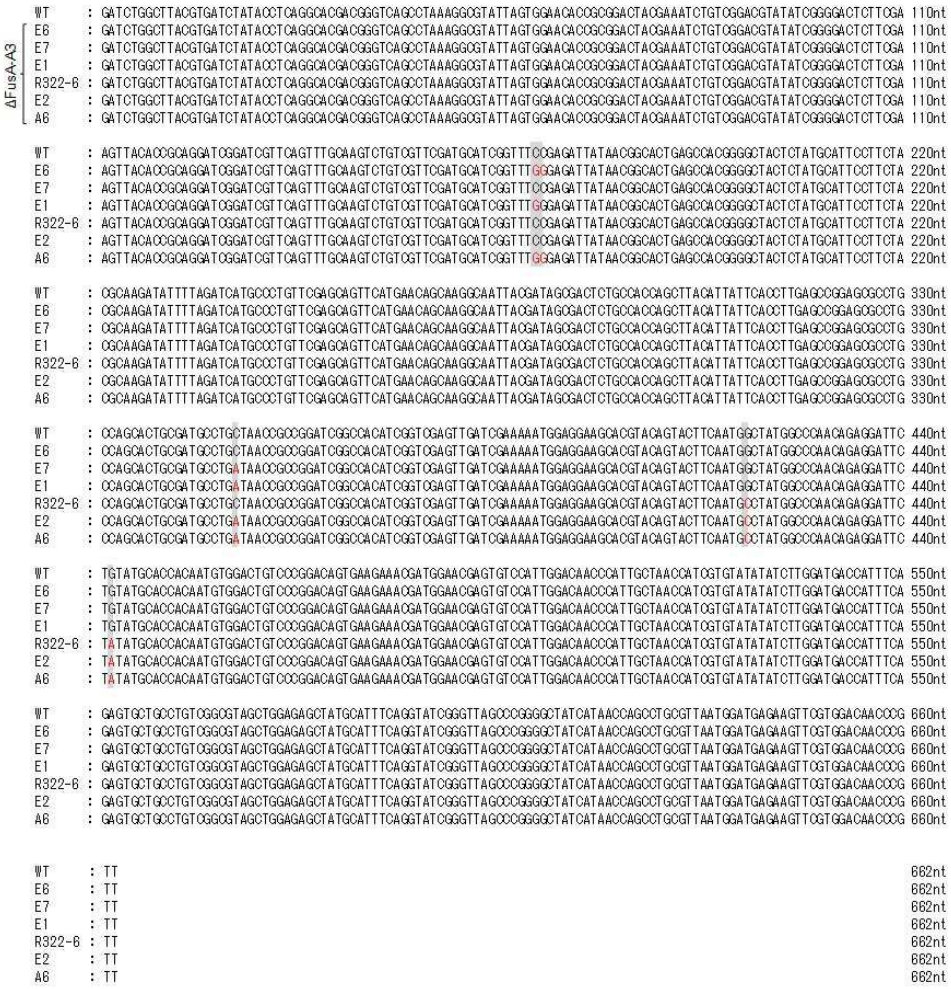
도면3


R299
R330
R239
R322
Asp235
Lys517
Gly322
Val330
Ala301
Ala236
Leu299
Thr278
Ser239
Asp235
Lys517
Ala322
Ile330
Ala301
Ala236
Ile299
Thr278
Trp239

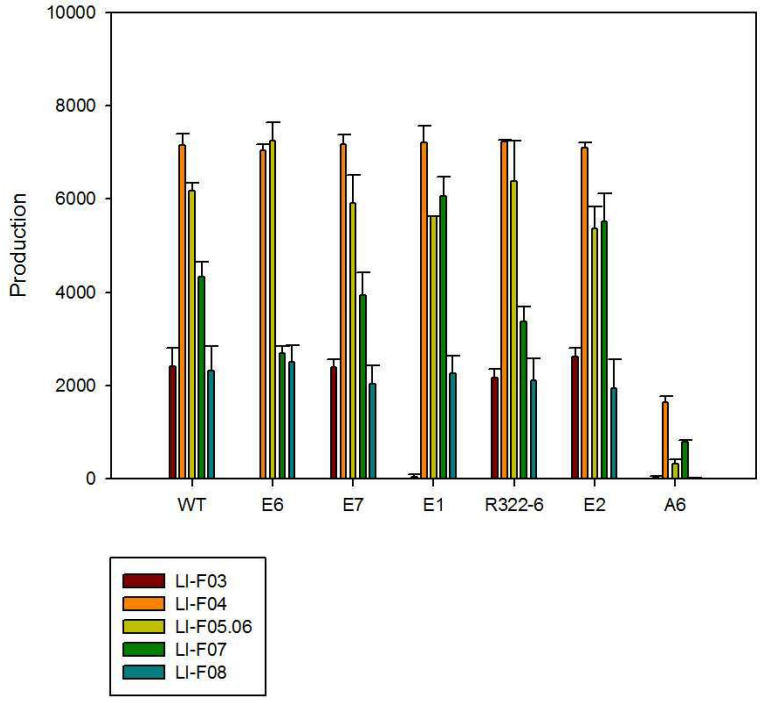
도면4


P. polymyxa
I-SceI
pBKJ236
Point mutation
Target site
rep
ery
ΔfusA A3
fusA A3
Chromosome
Shift to 37℃
I-SceI
ery
ts rep
fusA A3
Introduce pSS4332 (I-SceI)
ΔfusA A3
ery
I-SceI
①
②
I-SceI
ts rep
fusA A3
Screen for Ery^S
①
ΔfusA-A3
fusA-A3
②

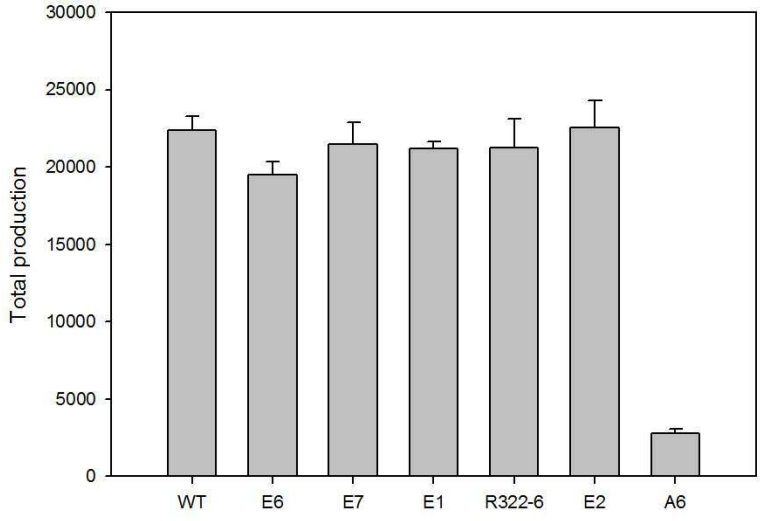
도면5


ΔFusA-A3
WT : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
E6 : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
E7 : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
E1 : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
R322-6 : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
E2 : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
A6 : GATCTGGCTTACGTGATCTATACCTCAGGCACGACGGGTCAGCCTAAAGGCGTATTAGTGGAACACCGCGGACTACGAAATCTGTCGGACGTATATCGGGGACTCTTCGA 110nt
WT : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTCCGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
E6 : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTGGGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
E7 : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTCCGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
E1 : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTGGGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
R322-6 : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTCCGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
E2 : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTCCGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
A6 : AGTTACACCGCAGGATCGGATCGTTCAGTTTGCAAGTCTGTCGTTCGATGCATCGGTTTGGGAGATTATAACGGCACTGAGCCACGGGGCTACTCTATGCATTCCTTCTA 220nt
WT : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
E6 : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
E7 : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
E1 : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
R322-6 : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
E2 : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
A6 : CGCAAGATATTTTAGATCATGCCCTGTTCGAGCAGTTCATGAACAGCAAGGCAATTACGATAGCGACTCTGCCACCAGCTTACATTATTCACCTTGAGCCGGAGCGCCTG 330nt
WT : CCAGCACTGCGATGCCTGCTAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGGCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
E6 : CCAGCACTGCGATGCCTGCTAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGGCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
E7 : CCAGCACTGCGATGCCTGATAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGGCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
E1 : CCAGCACTGCGATGCCTGATAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGGCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
R322-6 : CCAGCACTGCGATGCCTGCTAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGCCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
E2 : CCAGCACTGCGATGCCTGATAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGCCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
A6 : CCAGCACTGCGATGCCTGATAACCGCCGGATCGGCCACATCGGTCGAGTTGATCGAAAAATGGAGGAAGCACGTACAGTACTTCAATGCCTATGGCCCAACAGAGGATTC 440nt
WT : TGTATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
E6 : TGTATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
E7 : TGTATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
E1 : TGTATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
R322-6 : TATATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
E2 : TATATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
A6 : TATATGCACCACAATGTGGACTGTCCCGGACAGTGAAGAAACGATGGAACGAGTGTCCATTGGACAACCCATTGCTAACCATCGTGTATATATCTTGGATGACCATTTCA 550nt
WT : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
E6 : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
E7 : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
E1 : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
R322-6 : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
E2 : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
A6 : GAGTGCTGCCTGTCGGCGTAGCTGGAGAGCTATGCATTTCAGGTATCGGGTTAGCCCGGGGCTATCATAACCAGCCTGCGTTAATGGATGAGAAGTTCGTGGACAACCCG 660nt
WT : TT 662nt
E6 : TT 662nt
E7 : TT 662nt
E1 : TT 662nt
R322-6 : TT 662nt
E2 : TT 662nt
A6 : TT 662nt

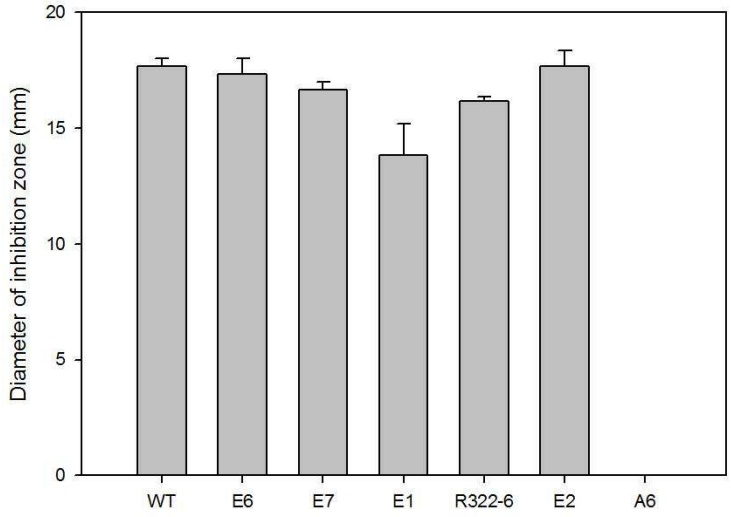
도면6


10000
8000
6000
4000
2000
0
Production
WT
E6
E7
E1
R322-6
E2
A6
LI-F03
LI-F04
LI-F05.06
LI-F07
LI-F08

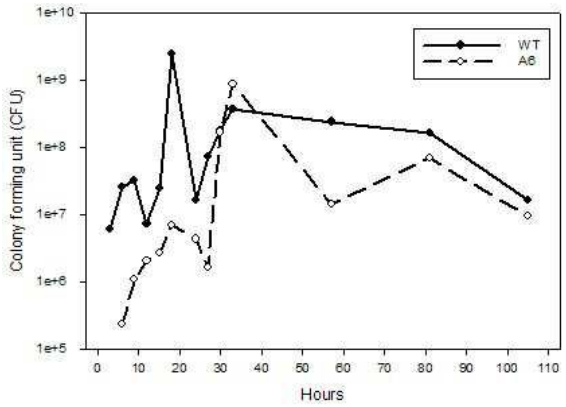
도면7


30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Total production
WT
E6
E7
E1
R322-6
E2
A6

도면8



도면9



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation

<120> Penibacillus polymyxa DBB1709 mutant strain for the increased production of fusaricidin derivative LI-F07 and preparation method thereof

<130> P11-100712-02

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 662

<212> DNA

<213> Paenibacillus polymyxa DBB1709

<400> 1

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgct aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatggc 420

tatggcccaa cagaggattc tgtatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 2

<211> 662

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> point mutation sequence

<400> 2

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgct aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tgtatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 3

<211> 662

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> point mutation sequence

<400> 3

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgct aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tatatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 4

<211> 662

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> point mutation sequence

<400> 4

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgat aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tatatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 5

<211> 662

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> point mutation sequence

<400> 5

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attggttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgat aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tatatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

gatctkgcyt aygtbat 17

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 7

aacggrttrt chacgaa 17

<210> 8

<211> 662

<212> DNA

<213> Penibacillus polymyxa E6

<400> 8

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attggttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgct aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatggc 420

tatggcccaa cagaggattc tgtatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 9

<211> 662

<212> DNA

<213> Penibacillus polymyxa E7

<400> 9

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgat aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatggc 420
tatggcccaa cagaggattc tgtatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480
acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540
gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600
ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660
tt 662

<210> 10
<211> 662
<212> DNA

<213> Penibacillus polymyxa E1
<400> 10

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60
gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120
caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180
acggcactga gccacggggc tactctatgc attggttcta cgcaagatat tttagatcat 240
gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300
tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgat aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatggc 420
tatggcccaa cagaggattc tgtatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480
acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540
gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600
ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660
tt 662

<210> 11
<211> 662
<212> DNA

<213> Penibacillus polymyxa R322-6
<400> 11

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60
gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgct aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tatatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 12

<211> 662

<212> DNA

<213> Penibacillus polymyxa E2

<400> 12

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attccttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgat aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tatatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662

<210> 13

<211> 662

<212> DNA

<213> Penibacillus polymyxa A6

<400> 13

gatctggctt acgtgatcta tacctcaggc acgacgggtc agcctaaagg cgtattagtg 60

gaacaccgcg gactacgaaa tctgtcggac gtatatcggg gactcttcga agttacaccg 120

caggatcgga tcgttcagtt tgcaagtctg tcgttcgatg catcggtttc cgagattata 180

acggcactga gccacggggc tactctatgc attggttcta cgcaagatat tttagatcat 240

gccctgttcg agcagttcat gaacagcaag gcaattacga tagcgactct gccaccagct 300

tacattattc accttgagcc ggagcgcctg ccagcactgc gatgcctgat aaccgccgga 360

tcggccacat cggtcgagtt gatcgaaaaa tggaggaagc acgtacagta cttcaatgcc 420

tatggcccaa cagaggattc tatatgcacc acaatgtgga ctgtcccgga cagtgaagaa 480

acgatggaac gagtgtccat tggacaaccc attgctaacc atcgtgtata tatcttggat 540

gaccatttca gagtgctgcc tgtcggcgta gctggagagc tatgcatttc aggtatcggg 600

ttagcccggg gctatcataa ccagcctgcg ttaatggatg agaagttcgt ggacaacccg 660

tt 662