



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0090528
(43) 공개일자 2009년08월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/66 (2006.01) C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0015793

(22) 출원일자 2008년02월21일

심사청구일자 2008년02월21일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

윤여준

서울 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호

박재원

경기 고양시 일산서구 대화동 대화마을 일신건영
602동 1405호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

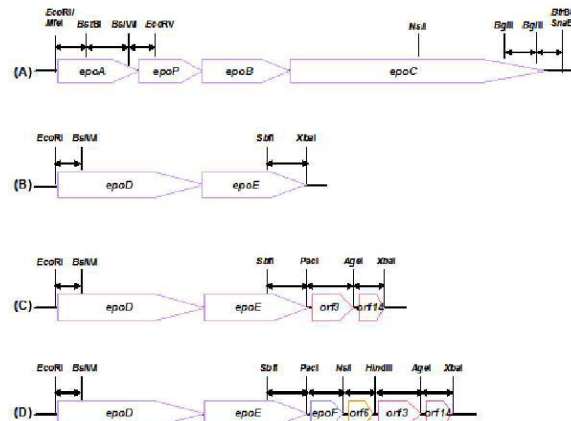
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 에포틸론 발현용 재조합벡터 및 이를 이용한스트렙토마이세스 베네주엘라에에서의 에포틸론 생산방법

(57) 요약

본 발명은 소란지움 셀룰로섬(*Sorangium cellulosum*) 유래의 에포틸론 생합성 유전자를 부분적으로 함유한 에포틸론 발현용 재조합벡터 및 이를 이용한 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)에서의 에포틸론 B 또는 D의 생산방법에 관한 것으로, 유용한 항암물질인 에포틸론을 생산속도가 빠르고, 유전자조작이 간편한 이중 숙주인 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서 생산할 수 있게 하는 효과가 있다. 또한 에포틸론 B 또는 D만을 단독으로 생산하게 하는 바, 균주 배양액으로부터 에포틸론의 분리 및 정제 과정의 효율을 높이는 효과가 있어, 발효산업 및 의약산업 분야에서 매우 뛰어난 발명이라 할 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박성렬

전남 광양시 마동 송보파인빌류 아파트 102동 701호

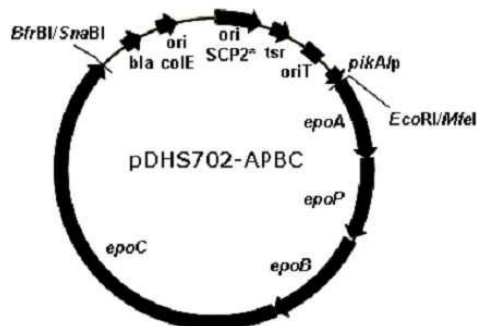
정원석

서울 서초구 방배4동 현대2차 홈타운 203동 1301호

특허청구의 범위

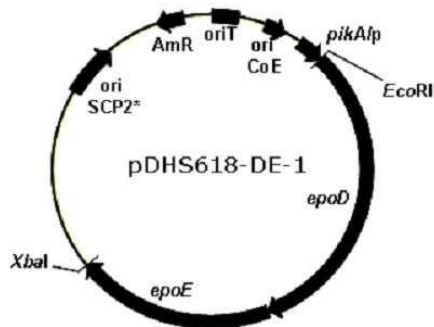
청구항 1

pDHS702 벡터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoA*, *epoP*, *epoB* 및 *epoC*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합벡터 pDHS702-APBC.



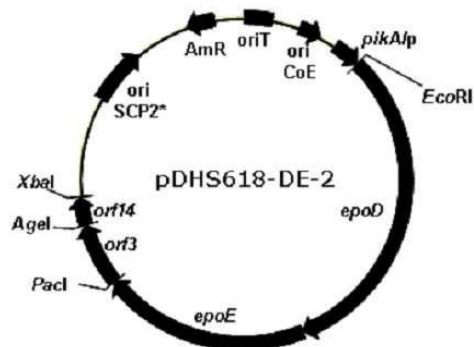
청구항 2

pDHS618 벡터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoD*와 *epoE*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합벡터 pDHS618-DE-1.



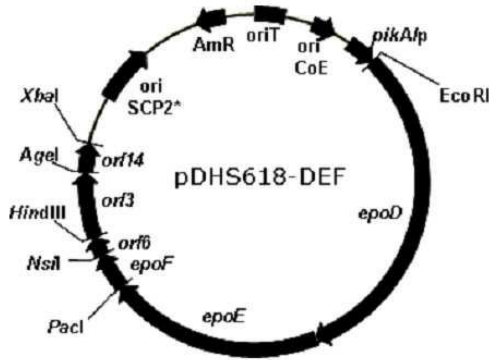
청구항 3

pDHS618 벡터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoD*, *epoE*, *orf3* 및 *orf14*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합벡터 pDHS618-DE-2.



청구항 4

pDHS618 벡터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoD*, *epoE*, *epoF*, *orf6*, *orf3* 및 *orf14*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합벡터 pDHS618-DEF.



청구항 5

제 1항 기재의 재조합백터 pDHS702-APBC와 제 2항 기재의 재조합백터 pDHS618-DE-1를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론 D를 생산하는 방법.

청구항 6

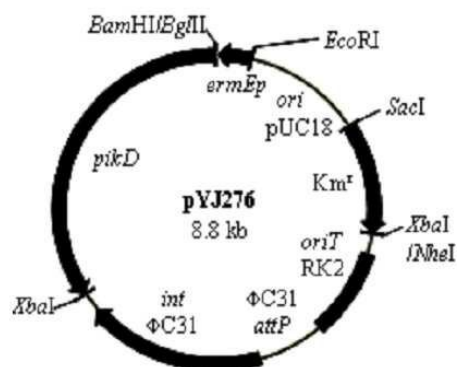
제 1항 기재의 재조합백터 pDHS702-APBC와 3항 기재의 재조합백터 pDHS618-DE-2를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론 D를 생산하는 방법.

청구항 7

제 1항 기재의 재조합백터 pDHS702-APBC와 제 4항 기재의 재조합백터 pDHS618-DEF를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론 B를 생산하는 방법.

청구항 8

제 5항 내지 제 7항에 있어서, 상기 재조합백터 외에 *pikD* 유전자를 함유한 하기 구조를 갖는 pYJ276 재조합백터를 추가로 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론을 생산하는 방법.



명세서

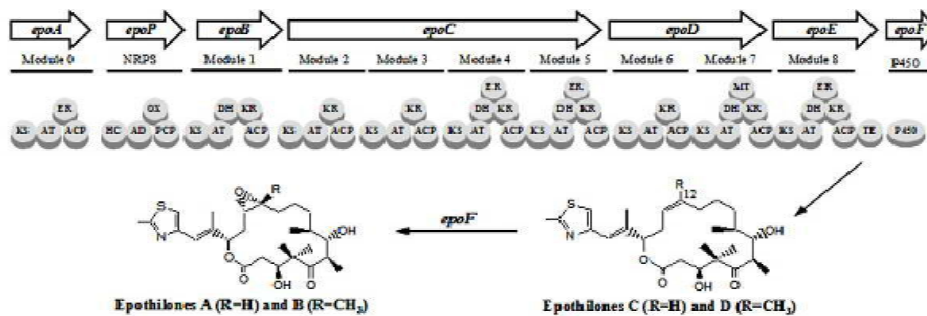
발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 에포틸론 발현용 재조합백터 및 이를 이용한 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulosum*)으로부터 밝혀진 에포틸론 생합성 관련 유전자 클러스터를 부분적으로 함유한 재조합백터 및 이를 이용하여 에포틸론 B 및 D를 단독으로 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 변이주에서 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 에포틸론(epothilone)은 메틸티아졸(methylthiazole)기가 올레핀 결합(olefinic bond)에 의하여 결합된 16원계(16-membered) 폴리케타이드 매크로락톤(polyketide macrolactone)의 일종이다. 에포틸론은 텍솔(Taxol)이라 불리는 파클리탁셀(paclitaxel)과 비슷한 방식으로 튜불린(tubulin)에 결합하여 미세소관(microtubule)의 분해를 억제하는 강력한 항암제이다. 암환자를 대상으로 한 종래 연구를 통하여 에포틸론은 통상적인 화학적 치료법(chemotherapy)에 저항성을 갖는 종양을 효과적으로 억제하며 또한 수용성(water solubility)에 있어 텍솔보다 우수한 장점이 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 장점으로 인하여 에포틸론은 암치료에 있어 차세대 화학치료를 위한 화합물로 인식되고 있다. 에포틸론은 저성장(low-growing) 미소박테리움(myxobacterium)인 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulorum*)에 의해 생산되는 이차 대사산물로써 최초 분리되었다. 상기 균주의 주요 대사산물은 에포틸론 A와 B이며, 한편 에포틸론 C와 D는 에포틸론 A와 B의 생합성 초기단계의 중간물질이다. 하기에 에포틸론 생합성 경로를 도식화하였다. 하기 그림 중 KS는 β -케토아실-ACP 합성효소(β -ketoacyl-ACP synthase)를, AT는 아실트랜스퍼라제(Acyltransferase)를, ACP는 아실전달단백질(acyl carrier protein)을, ER은 에노일 환원효소(enoyl reductase)를, HC는 헤테로사이클리제이션(heterocyclization)을, AD는 아데닐레이션(adenylation)을, PCP는 펩티딜 전달 단백질(peptidyl carrier protein)을, OX는 산화효소(oxidase)를, DH는 β -하이드록시아실-티오에스테르 탈수효소(β -hydroxyacyl-thioester dehydratase)를, KR은 β -케토아실-ACP 환원효소(β -ketoacyl-ACP reductase)를, MT는 메틸 트랜스퍼라제(methyl transferase)를, TE는 티오에스테라제(thioesterase)를, P450은 시토크롬 P450을 나타낸다.



- <3>
- <4> 상기 4종류의 동질체(congener) 중에서 에포틸론 D가 가장 각광받는 치료물질이지만 소란지움 셀룰로섬에 의해 생산되는 양은 전체 에포틸론 중 5% 이하로 매우 극소량이다. 에포틸론의 유기합성방법이 보고된바 있지만, 합성방법이 복잡하다는 단점이 있다. 에포틸론의 대량발효 및 생합성 과정의 유전자 조작을 통한 신규한 유사물질을 개발하기 위하여는 미생물을 이용한 생산방법이 보다 유용한 것으로 판단된다. 하지만, 소란지움 셀룰로섬을 이용한 에포틸론의 생산은 산업적으로 두 가지 이유 즉, (1) 상당히 긴 생장시간(더블링타임(doubling time) 16 시간) (2) 유전자 조작의 곤란으로 인하여 유용성이 떨어진다.
- <5> 최근, 에포틸론 생합성 유전자 클러스터의 규명으로 인하여 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor*), 미소코커스 크산터스(*Myxococcus xanthus*) 및 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*; 대장균)에서의 에포틸론의 이종생산이 가능하게 되었다. 하지만, 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*S. coelicolor*)는 생장속도(doubling time; 2시간)가 느린 단점이 있으며, 에포틸론 생산 수율이 50 내지 100 $\mu\text{g/L}$ 였다. 미소코커스 크산터스(*M. xanthus*)는 그 특성이 매우 잘 규명되어 있고 유전자 조작이 쉬운 미소박테리움으로 알려져 있지만, 상기 다른 두 균주에 비하여 발현 플라스미드 시스템이 잘 개발되어 있지 않은 단점이 있었다. 대장균(*E. coli*)은 폴리케타이드 생산에 있어 효율적인 숙주이지만 생산되는 에포틸론의 양이 채 1 $\mu\text{g/L}$ 도 되지 않으며, 낮은 온도에서(15 $^{\circ}\text{C}$) 장기간 배양(6일)이 요구되는 단점이 있었다. 따라서, 상기 균주들의 단점을 극복하기 위한 대체가 능한 이종 숙주의 개발이 요구된다.
- <6> 하지만 상기 균주 외에 보다 효율적인 이종숙주에서의 에포틸론의 발현방법에 대하여는 전혀 개시된 바 없다. 이에 본 발명자들은 이종숙주로서 방선균의 일종인 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에 초점을 맞추게 되었다.
- <7> 상기 균주는 피크로마이신(pikromycin)을 생산하며, 빠른 성장 특성, 상대적인 유전자 조작의 용이, 폴리케타이드(polyketide) 생합성을 위한 이용가능한 기질의 풍부함 등으로 인하여 최근들어 폴리케타이드 생산을 위한 적합한 균주로 개발되고 있다.

<8> 상기 균주에 관하여 본 발명자들은 이미 *pikD* 조절유전자의 발현백터를 이용한 스트렙토마이세스 베네주엘라에 (*S. venezuelae*)에서 폴리케타이드의 생산성 증가방법(특허출원 제10-2007-107787호)에 관하여 출원한 바 있다. 이의 연장선상에서 각고의 노력을 거듭한 결과, 본 발명자들은 유용한 항암물질인 에포틸론의 생산을 이중숙주인 폴리케타이드 합성효소(pikromycin polyketide biosynthase; PKS)가 결여된 균주인 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001에서 선별적으로 생산하는 방법인 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

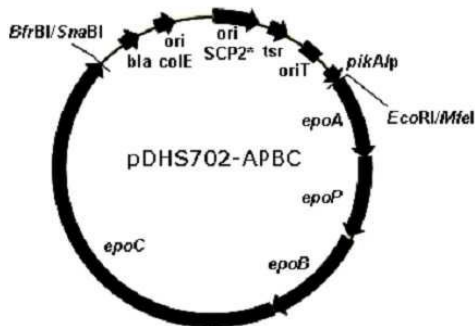
<9> 따라서, 본 발명의 목적은 항암물질인 에포틸론을 성장속도가 빠르고 유전자 조작이 간편한 이중숙주인 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 변이주에서 생산하고자 하는데 있다. 본 발명의 또 다른 목적은 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주에서의 에포틸론 생산을 위한 재조합백터를 제공하고자 하는 데 있다.

과제 해결수단

<10> 본 발명의 상기 목적은 에포틸론 생산균주인 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulosum*)을 통하여 밝혀진 에포틸론 생합성 관련 유전자를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주에서 발현시키기 위한 발현용 재조합백터를 제조하고, 상기 재조합백터를 도입하여 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 변이주에서의 에포틸론 생산여부를 확인하고, 이의 유용성을 증명함으로써 달성하였다. 또한 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 변이주에서의 에포틸론 생산량을 높이기 위하여 *pikD* 조절 유전자를 함유한 백터를 제조하고 이를 도입한 후 상기 재조합백터에 의한 효과를 확인함으로써 달성하였다.

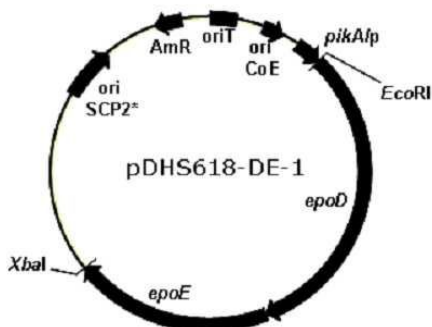
<11> 본 발명은 하기와 같은 4종의 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주에서의 에포틸론 발현을 위한 재조합백터를 제공함을 특징으로 한다.

<12> 1) 첫째로 본 발명은 pDHS702 백터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoA*, *epoP*, *epoB* 및 *epoC*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합백터 pDHS702-APBC를 제공한다.



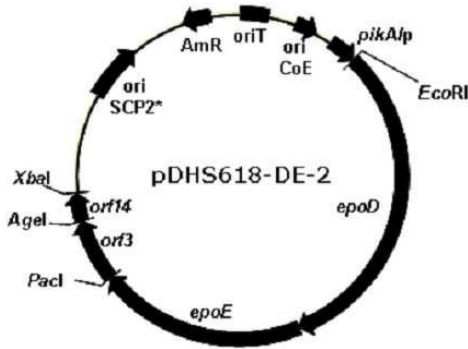
<13>

<14> 2) 둘째로, 본 발명은 pDHS618 백터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoD*와 *epoE*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합백터 pDHS618-DE-1을 제공한다.

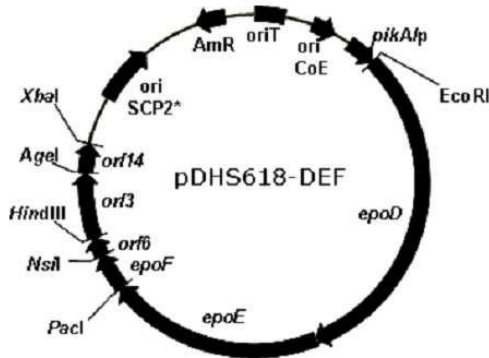


<15>

<16> 3) 셋째로, 본 발명은 pDHS618 벡터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoD*, *epoE*, *orf3* 및 *orf14*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합벡터 pDHS618-DE-2를 제공한다.



<17>
<18> 4) 넷째로, 본 발명은 pDHS618 벡터에 에포틸론 생합성 유전자 *epoD*, *epoE*, *epoF*, *orf6*, *orf3* 및 *orf14*가 삽입되어 하기 구조를 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 발현용 재조합벡터 pDHS618-DEF를 제공한다.



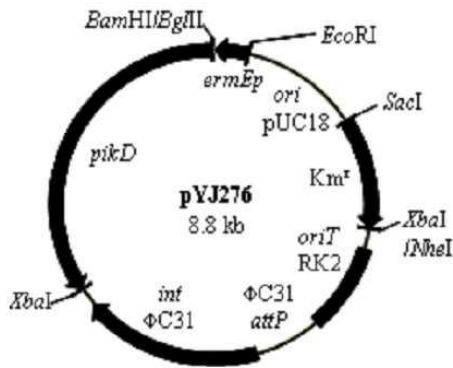
<19>
<20> 본 발명은 상기 재조합벡터들을 조합하여 하기와 같은 방법으로, 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주로의 도입에 의한 에포틸론을 생산하는 방법을 제공함을 특징으로 한다.

<21> 1) 본 발명은 재조합벡터 pDHS702-APBC와 재조합벡터 pDHS618-DE-1를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론 D를 생산하는 방법을 제공한다.

<22> 2) 본 발명은 재조합벡터 pDHS702-APBC와 재조합벡터 pDHS618-DE-2를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론 D를 생산하는 방법을 제공한다.

<23> 3) 본 발명은 재조합벡터 pDHS702-APBC와 재조합벡터 pDHS618-DEF를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론 B를 생산하는 방법을 제공한다.

<24> 또한, 본 발명은 상기 에포틸론 B 또는 D의 생산량을 늘리기 위한 방안을 제공하며, 이는 상기 재조합벡터 외에 *pikD* 유전자를 함유한 하기 구조를 갖는 pYJ276 재조합벡터를 추가로 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001에 도입하여 형질전환시켜 에포틸론의 생산량을 보다 높일 수 있다.



<25>

효과

<26>

본 발명은 에포틸론 발현용 재조합백터 및 이를 이용한 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 생산방법에 관한 것으로, 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulosum*)이 생산하는 유용한 항암물질인 에포틸론을 생산속도가 빠르고, 유전자조작이 간편한 이중 숙주인 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서 생산할 수 있게 하는 효과가 있다. 또한 에포틸론 B 또는 D만을 단독으로 생산하게 하는 바, 균주 배양액으로부터 에포틸론의 분리 및 정제 과정의 효율을 높이게 하는 효과가 있어, 발효산업 및 의약산업 분야에서 매우 뛰어난 발명이라 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27>

이하 본 발명이 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<28>

본 발명은 소란지움 셀룰로섬에서 에포틸론 생합성 관련 유전자 클러스터를 얻는 실시예 1, 상기 에포틸론 생합성 관련 유전자를 대장균-스트렙토마이세스 셔틀백터에 도입하여 스트렙토마이세스에서의 에포틸론 발현 백터를 제조하는 실시예 2, 상기 발현백터를 스트렙토마이세스 베네주엘라에 DHS2001 균주에 도입하여 에포틸론을 발현시키는 실시예 3 및 에포틸론 생산량을 높이기 위하여 *pikD* 유전자를 포함한 백터와 함께 도입하여 에포틸론을 발현시키는 실시예 4로 이루어져 있다.

<29>

이하 본 발명에 대하여 상세하게 설명하기로 한다.

<30>

<31>

균주, 플라스미드, 배양조건

<32>

본 발명에서 서브-클로닝(subcloning)을 위하여 대장균 DH5α(Invitrogen), 플라스미드 pLitmus 28(New England Biolabs)를 사용하였다. 본 발명에 사용된 대장균 DH5α는 서브클로닝에 널리 이용되는 가장 잘 알려진 균주 중에 하나이다. 이 균주는 *redAI* 과 *endAI* 유전자의 변이로 인하여 클로닝된 내부 유전자(insert)의 안정성과 플라스미드의 획득 수율을 높여주는 장점이 있다. 한편, 플라스미드 pLitmus28은 3kb 이하의 크기를 가지며, 암피실린(ampicillin)에 저항성을 가지고 다양한 개열지도(cleavage map)를 가지고 있어서 서브클로닝에 널리 이용되는 플라스미드이다.

<33>

에포틸론을 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주에서 발현시키기 위한 대장균-스트렙토마이세스 셔틀백터로는 pDHS702, pDHS618을 사용하였다. 상기 pDHS702와 pDHS618은 *pikAI* 프로모터와 각각 티오스트렙톤(thiostrepton) 및 아프라마이신(apramycin) 내성 유전자를 포함하고 있다. 상기 셔틀백터 pDHS702와 pDHS618은 미국 미시간 대학교 미생물학과 데이비드 셔먼(David H. Sherman) 교수로부터 확보하였다.

<34>

조작된 돌연변이 균주인 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001을 에포틸론 생합성 유전자의 이중 발현을 위해 사용하였다. 상기 DHS2001 균주는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) ATCC15439 균주를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 제놈 DNA 상의 피크로마이신 PKS 유전자 클러스터(*pikA*)를 제거하여 제조하였다. 즉 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자와 동위재조합(homologous recombination)에 필요한 약 1kb 정도의 DNA 조각을 포함하는 백터를 제작하여 *pikA*와 이중교차(double crossover)하여 그 결과 하이그로마이신 저항성 유전자가 *pikA*에 치환되어 *pikA*가 제거된 DHS2001 균주를 얻을

수 있었다. 상기 DHS2001 균주는 하이그로마이신에는 내성을 보이고, 아프라마이신(apramycin)에는 민감한 성질을 이용하여 선별하였다. 상기 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001 균주는 SPA 아가 배지에 보관하면서 원형질체(protoplast)의 제조를 위하여 SGGP 액체 배지에 배양하였다.

<35> 대장균은 플라스미드의 선별을 위하여 암피실린(ampicillin, 50 µg/mL) 또는 아프라마이신(apramycin, 25 µg/mL)이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다.

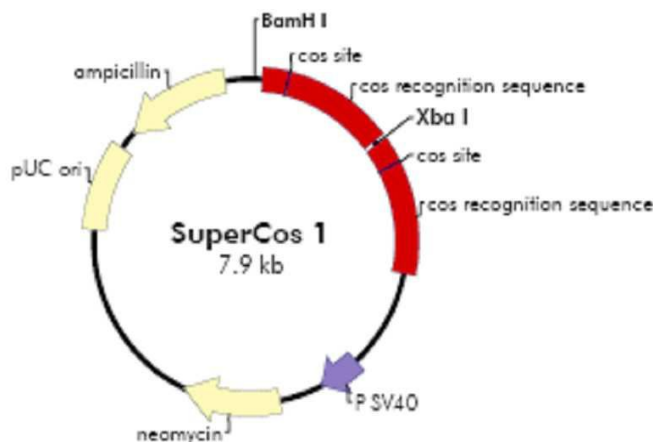
<36>

<37> **실시예 1: 에포틸론 생합성 유전자 획득을 위한 코스미드(cosmid) 라이브러리의 제조**

<38> 제놈 코스미드(cosmid) 라이브러리 제작을 위해 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulorum*) So ce90의 DNA를 사용하였다. 상기 균주는 DSM6773 균주로써 DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)에서 분양받았으며, 에포틸론 A,B,C 및 D를 생산하는 것으로 밝혀진 최초의 균주이다.

<39> 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulorum*) So ce90의 DNA를 하기의 방법으로 분리하였다. 균주의 배양시기가 평형기일 때의 배양액을 10,000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 세포를 수확한 후 STE buffer에 재현탁하였다. 이 재현탁 용액 450 µL에 200 µL RLM 버퍼와 2 µL의 디에틸피로카보네이트(diethylpyrocarbonate)를 혼합하고 교반하여 70℃에서 30분간 배양하고 반응이 끝난 혼합액에 5 M 아세트산칼륨(potassium acetate) 100 µL를 첨가하여 얼음에 15분간 방치한 뒤 15분간 최고속으로 원심 분리하였다. 상등액을 취한 뒤 페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜(phenol : chloroform : isoamyl alcohol)의 비율이 25 : 24 : 1로 섞인 용액을 동일부피만큼 첨가한 뒤 15분간 원심 분리하고 분리된 맨위의 액층에 200% 에탄올을 첨가하여 -70℃에서 30분간 방치한 뒤 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 얻어진 DNA는 건조시킨 뒤 TER 버퍼에 녹였다.

<40> 분리된 DNA를 *Sau3AI*로 처리하여 pSupercos(stratagene)의 *BamHI* 부위로 결합시켰다. pSupercos는 코스미드 라이브러리(cosmid library)를 제작하는데 사용되는 벡터(vector)로써 30~42kb까지 클로닝이 가능하다. 상기 벡터는 하기에 나타내었다.



<41>

<42> 상기 결합된 mixture를 제조사의 프로토콜에 따라 Gigapack Gold III(stratagene)를 이용하여 패키징시켰다. 숙주세포를 준비하기 위해, 고형배지 상의 XL-1 Blue MRF의 콜로니를 3 mL LB액상배지에 접종하여 12시간 배양하였다. 잘 자란 배양액 500 µL를 50 mL LB액상배지(10 mM MgSO₄, 0.2% maltose)에 옮겨 4시간가량 키우고 이를 4000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 상층액을 버리고, 10 mM 황산마그네슘(MgSO₄) 25 mL로 다시 부유시켰다. 다시 한번 원심분리 하여 상층액을 제거하고 10 mM 황산마그네슘으로 OD₆₀₀ 값이 0.5가 되도록 희석하였다. Gigapack III Gold Packaging Extract(Stratagene)를 이용해서 약 40 kb에 달하는 DNA를 packaging하였다. 먼저 packaging extracts를 -80℃에서 빼내 손으로 녹이고 재조합한 DNA(DNA 0.1~1.0ug)을 packaging extract에 첨가하였다. 튜브를 잘 짓고 3~5초간 빠르게 침전시켰다. 상온(22℃)에서 2시간 동안 배양하였으며 500 µL SM 버퍼를 첨가하고, 클로포름 20 µL를 더하여 잘 섞어주었다.

<43> 코스미드 라이브러리를 탐색하기 위하여, 모듈(module) 1 (*epoB*) 및 모듈 5(*epoC*)의 β-케토아실-ACP 합성효소(β-ketoacyl-ACP synthase)의 도메인(domain)으로부터 증폭된 PCR 산물(KS probe)을 이용하여 콜로니 하이브리다이제이션(colony hybridization)을 수행하였다. 앞서 제작된 코스미드 라이브러리(cosmid library)와 프로

브를 이용하여 콜로니 하이브리다이제이션(colony hybridization)을 수행하였다. 코스미드 라이브러리(cosmid library) 숙주를 용해(lysis)시킨 뒤 노출된 세포내 유전자들을 변성 중화하여 막(membrane)에 고정시키고 KS (β -케토아실-ACP 합성효소) 유전자를 프로브로 사용하여 목적하는 에포틸론 유전자 군을 선별하였다. 실험결과 는 도 1에 나타내었다.

<44> 콜로니 하이브리다이제이션(colony hybridization) 방법을 통하여 얻어진 양성 코스미드 클론은 southern hybridization이나 terminal sequencing 방법을 통하여 epothilone 유전자군의 클로닝 여부를 확인하였다. 그 결과, 코스미드 pEPOKS1은 *epoP-B-C-D* 유전자를 함유하고 있었고, 코스미드 pEPOK2는 *epoC-D-E-F*와 하위(downstream) 유전자를 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 확인된 2개의 코스미드 클론 중 하나는 pEPOKS1으로, 다른 하나는 pEPOKS2로 명명하였다.

<45> 실시예 2 : 에포틸론 발현 플라스미드의 제조

<46> 에포틸론 생합성 유전자 및 추정 전달 유전자(Genbank accession number AF210843)를 각각 두 개의 벡터 pDHS702와 pDHS618에 클로닝하였다. 본 발명에 사용한 데옥시올리고뉴클레오티드(deoxyoligonucleotide) 프라이머(primer) 쌍 및 제조된 플라스미드는 표 1 및 표2에 나타내었다.

표 1

<47> 본 실시예에 사용한 데옥시올리고 뉴클레오티드 프라이머쌍

명칭	방향	염기서열 (5'-3') ^[a]	제한효소 부위
A1	정방향	CTTTACGTAGGTACCCAATTGGCTTGGTCTCTGGTTCTCTCAG	<i>Sna</i> BI/ <i>Kpn</i> I/ <i>Mfe</i> I
	역방향	GAGCGCATATTCGAAGGTGAACAGCGCCGG	<i>Bst</i> BI
A2	정방향	CCGGCGCTGTTACCTTCGAATATGCGCTC	<i>Bst</i> BI
	역방향	CAGCACCTGCGAGACCTGCGTACGGAGGAA	<i>Bsi</i> WI
A3P	정방향	TTCTCCGTACGCAGGTCTCGCAGGTGCTG	<i>Bsi</i> WI
	역방향	CGTGAAGTCCCCGGTGATATCGTTCACGCG	<i>Eco</i> RV
C1	정방향	CGGTAGAGATCTTCCCCCTCTCGCGGGCCG	<i>Bgl</i> II
	역방향	CCTTACGTAACGCAATCACCTCTTTCC	<i>Sna</i> BI
C2	정방향	TCGTCGCCGAGATCTCCGGGCTCGTGCGC	<i>Bgl</i> II
	역방향	CGGCCCGCGAGAGGGGAAGATCTTACCG	<i>Bgl</i> II
D1	정방향	GCATACGTAGAATTCCATCTGGCTTCTCATGTC	<i>Sna</i> BI/ <i>Eco</i> RI
	역방향	CCGCGGATTGAGCGTACGAAAGTTGAGGTT	<i>Bsi</i> WI
E2	정방향	CGCCACCTGCAGGCGGGGAGCGGGTGCT	<i>Sbf</i> I
	역방향	CATTTAATTAATCTAGATGCCGCCGCCGACGCG	<i>Pac</i> I/ <i>Xba</i> I
F1	정방향	GCAAGATCTTTAATTAAATGAGCCTTCTGGACGT	<i>Bgl</i> II/ <i>Pac</i> I
	역방향	GAGGTTATGCATGCGATACCCCCGCGAGCT	<i>Nsi</i> I
ORF3	정방향	CCGAGATCTTTAATTAAGCTTATGTCCGGCCTGCACCCA	<i>Bgl</i> II/ <i>Pac</i> I/ <i>Hind</i> III
	역방향	GCAGAGACCGGTGCTCGCTTCTCACGGGC	<i>Age</i> I
ORF6	정방향	GCGTTAATTAATGCATCGGGTGCCATTCGATCCA	<i>Pac</i> I/ <i>Nsi</i> I
	역방향	CGGAGCAAGCTTCGGCGAGGTGTACGAGCA	<i>Hind</i> III
ORF14	정방향	CAGTTAATTAACCGGTAAGCAACCGCGTGCCGG	<i>Pac</i> I/ <i>Age</i> I
	역방향	ATGGCGTCTAGAGCGCGGCTCTCTCCACG	<i>Xba</i> I

<48> ^[a] 밑줄친 서열은 제한효소 부위를 나타낸다.

표 2

<49> 본 실시예에 사용한 플라스미드

플라스미드	특징	Reference
pDHS702	<i>pikAI</i> 프로모터와 티오스트렙톤(thiostrepton) 내성 마커를 함유하고 있는 대장균-스트렙토마이세스 셔틀 벡터	Y. Xue, D. H. Sherman, <i>Metab. Eng.</i> 2001, 3, 15-26

pDHS618	<i>pikAI</i> 프로모터와 아프라마이신(apramycin) 내성 마커를 함유하고 있는 대장균-스트렙토마이세스 서플렉터	Y. Xue, D. H. Sherman, <i>Metab. Eng.</i> 2001, 3, 15-26
pSET152	<i>ermE*</i> 프로모터와 아프라마이신 내성 마커를 함유하고 있는 대장균-스트렙토마이세스 서플렉터	M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, B. E. Schoner, <i>Gene</i> 1992, 116, 43-49
pDHS702-APBC	pDHS702 유도체; <i>epoA-epoP-epoB-epoC</i>	본 발명
pDHS618-DE-1	pDHS618 유도체; <i>epoD-epoE</i>	본 발명
pDHS618-DE-2	pDHS618 유도체; <i>epoD-epoE-orf3-orf14</i>	본 발명
pDHS618-DEF	pDHS618 유도체; <i>epoD-epoE-epoF-orf3-orf6-orf14</i>	본 발명
pYJ276	pSET152 유도체; <i>pikD</i> 와 카나마이신(kanamycin) 내성 마커	W. S. Jung, S. J. Jeong, S. R. Park, C. Y. Choi, B. C. Park, J. W. Park, Y. J. Yoon, <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2008, in press

<50> pDHS702-APBC, pDHS618-DE-1, pDHS618-DE-2 및 pDHS618-DEF를 하기의 방법에 따라 제조하였고, 최종 제조된 플라스미드는 도 2에 도식화하였다.

<51> pDHS702-APBC 플라스미드의 제조

<52> *epoA-P-B-C* 유전자를 함유한 pDHS702-APBC 플라스미드는 *MfeI-EcoRV* 조각(뉴클레오티드 no.7425에서 12918), *EcoRV-NsiI* 조각(뉴클레오티드 no.12919에서 29394), *NsiI-SnaBI* 조각(뉴클레오티드 no. 29395에서 43525)를 여러 서브클로닝 단계를 거쳐 결합시켜 제조하였다.

<53> 첫째로, *epoA*와 *epoP*의 5' 부분을 포함한 5.5kb의 *MfeI-EcoRV* 조각을 다음과 같이 제조하였다. *MfeI-EcoRV* 조각(*epoP*의 5' 부위), *BstBI-BsiWI* 조각(*epoA*의 내부부위), *BsiWI-EcoRV* 조각(*epoA*의 3' 부위 및 *epoP*의 5' 부위)을 각각 A1, A2 및 A3P 프라이머 쌍을 이용하여 소란지움 셀룰로솜(*S. cellulosum*) So ce90의 제놈 DNA로부터 PCR로 증폭하였다. 상기 3개의 증폭 산물을 여러번의 서브 클로닝 단계를 거쳐 Litmus 28로 결합시켰다.

<54> 둘째로, *epoP*와 *epoB*의 내부 부위 및 *epoC*의 5' 부위를 포함하고 있는 16.5kb의 *EcoRV-NsiI* 조각을 코스미드 pEPOKS1으로부터 분리하여 Litmus 28상의 상응하는 부위로 옮겨 pEpoPBC를 얻었다.

<55> 셋째로, *epoC*의 내부부위와 3' 부위를 포함하고 있는 14.1kb의 *NsiI-SnaBI* 조각을 다음과 같이 제조하였다. C1, C2 프라이머 쌍을 이용하여 소란지움 셀룰로솜 So ce90의 제놈 DNA로부터 *BgiII-SnaBI* 조각(*epoC*의 3' 부위) 및 *BgIII* 조각(*epoC*의 내부 부위)을 PCR로 증폭하였다. 상기 2조각과 코스미드 pEPOKS1으로부터 분리한 12.5kb의 *NsiI-BgIII* 조각을 여러 단계의 서브클로닝을 거쳐 Litmus 28로 결합시켜 pEpoC를 얻었다.

<56> 최종적으로, pEpoAP로부터 얻은 *MfeI-EcoRV* 조각, pEpoPBC로부터 얻은 *EcoRV* 조각 및 pEpoC로부터 얻은 *NsiI-SnaBI* 조각을 Litmus 28로 연속적으로 결합시켰고, pDHS702로 전달하여 pDHS702-APBC를 생성하였다.

<57> pDHS618-DE-1, -DE-2 및 -DEF 플라스미드의 제조

<58> 나머지 에포틸렌 생합성 유전자(*epoD-E-F*)와 추정 전달 유전자를 pDHS618에 도입하여 세 개의 pDHS618-DE-1(*epoD-E*), pDHS618-DE-2(*epoD-E-orf3-orf14*) 및 pDHS618-DEF(*epoD-E-F-orf6-orf3-orf14*)를 얻었다. 상기 플라스미드는 다음과 같이 제조되었다. D1, D2 프라이머 쌍을 이용하여 소란지움 셀룰로솜(*S. cellulosum*) So ce90의 제놈 DNA로부터 1.4kb의 *EcoRI-BsiWI* 조각(*epoD*의 5'부위) 및 2.6kb의 *SbfI-XbaI* 조각(*epoE*의 3' 부위) 각각을 PCR로 증폭하였고, 연속적으로 Litmus 28에 결합시켜 pEpoDE를 얻었다. 상기 pEpoDE 플라스미드를 *BsiWI/SbfI*로 자르고 코스미드 pEPOKS2로부터 분리한 15.0kb *BsiWI-SbfI* 조각(뉴클레오티드 no.44745에서 59697)과 결합시켜 pEpoDE-1을 생성하였다. 그리고 나서, *epoF*, *orf3*, *orf6* 및 *orf14* 각각을 포함하는 DNA 조각을 F1, ORF3, ORF6 및 ORF14 프라이머 쌍을 이용하여 소란지움 셀룰로솜(*S. cellulosum*) So ce90의 제놈 DNA로부터 각각 증폭하였다. 상기 4개의 유전자의 조합에 의한 발현을 살펴보기 위하여 *epoF*, *orf3*, *orf6* 및 *orf14*를 함유한 PCR 증폭 조각을 연속하여 Litmus 28로 결합시키고 pEpoDE-1으로 이동시켜 *orf3-orf14*와 *epoF-orf6-orf3-orf14*를 포함하는 플라스미드 세트를 생성하였다. 상기 플라스미드는 각각 pEpoDE-2와 pEpoDEF로 명명하였다. 최종적으로, pEpoDE-1, pEpoDE-2 및 pEpoDEF로부터 얻은 *EcoRI-XbaI* 조각을 pDHS618로 전달하여 각각 pDHS618-DE-1, pDHS618-DE-2 및 pDHS618-DEF를 얻었다. 모든 PCR 산물은 염기서열을 결정하여 확인하였다.

실시예 3 : 스트렙토마이세스 베네주엘라에에서의 에포틸론의 발현

스트렙토마이세스 베네주엘라에의 형질전환

실시예 2에서 제조한 (1) pDHS702-APBC와 pDHS618-DEF를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001로 도입하고, 재조합된 균주를 아프라마이신(25 µg/mL), 카나마이신(50 µg/mL) 및 티오스트렙톤(50 µg/mL)를 함유한 R2YE 배지를 이용하여 30℃에서 4일간 배양하였다. R2YE 조성은 103g sucrose(sigma), 0.25g K₂SO₄(sigma), 10.12g MgCl₂·6H₂O(sigma), 10g glucose(sigma), 0.1g casaminoacids(Difco), 5g yeast extract(Difco), 5.73g TES buffer(sigma), 2mL trace element solution, 22g agar (1L 기준)이며, 고온 멸균 (autoclave) 후에 10ml 0.5% KH₂PO₄(sigma), 4ml 5M CaCl₂·2H₂O(sigma), 15ml L-proline(sigma), 7ml 1N NaOH(sigma) (1L 기준)을 첨가하여 제조하였다.

또한 (2) pDHS702-APBC와 pDHS618-DE-1, (3) pDHS702-APBC와 pDHS618-DE-2를 각각 DHS2001 균주로 도입하여 동일한 방법으로 배양하여 비교하였다. 각각의 완성된 플라스미드를 DHS2001 균주에 도입하기 위하여 우선적으로 원형질체(protoplast)를 제조하였다. 25mL SGGP 배지에서 세포를 키운 현탁액을 10.3% 슈크로스 2번 세척하고, 1mg/mL농도의 이소자임 용액(lysozyme solution) 4mL을 처리하고 45분간 30℃에서 보관하였다. 5mL의 P 버퍼를 첨가하고 3번의 피펫팅(pipetting) 후에 솜을 이용해 여과하였다. 걸러진 원형질체(protoplast)를 200 µL 씩 나누어 담은(aliquot) 후, -70℃에 보관하였다. 이와 같이 제조된 원형질체(protoplast) 200 µL에 제작된 플라스미드를 5~10 µL를 넣고 재빠르게 PEG 용액 500 µL를 넣어 섞어주었다. 이어서 500 µL의 P 버퍼를 첨가하여 충분히 섞어준 후 항생제가 없는 R2YE 고체 배지에 도말하였다. 30℃에서 12시간 배양한 후 항생제를 배지 표면에 도포하여(overlay) 개개의 콜로니로 자랄 때까지 추가 배양하였다. 상기 도입방법은 도 3에 간략하게 도식화하였다.

에포틸론 생산여부 확인

상기 형질전환된 균주를 적당한 항생제를 섞은 RY2E 고체 배지에서 30℃의 온도에서 4일간 배양하였다. 배양한 배지를 작은 조각으로 자른 뒤 1부피의 메탄올로 미리 채워둔 엘렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크로 옮겼다. 상기 플라스크를 30℃에서 12시간동안 회전교반시켜 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 깔대기와 여과종이(Whatman)를 이용하여 라운드 바텀 플라스크로 여과시키고, 상기 여과물을 30℃에서 증발시켰다. 상기 증발된 여과물을 아세토니트릴(acetonitrile)에 녹이고 3mL의 아세토니트릴(acetonitrile) 및 3mL의 아세토니트릴/물(1:1, v/v) 용액으로 평형을 맞춘 Oasis HLB 카트리지(Waters)로 주입하였다. 상기 카트리지에 흡착한 에포틸론을 0.75mL의 아세토니트릴(acetonitrile)로 2번 용출시키고, 진공 원심분리기로 건조시켰다. 상기 건조된 용출물을 100 µL의 아세토니트릴로 다시 녹이고 상기 용액을 Phenomenex Synergi Polar-RP 컬럼(150×4.6mm, 4 µm)을 장착한 LC-ESI-MS/MS(액체크로마토그래피/전자스프레이 이온화-질량분석기; Waters/Micromass Quattro micro/MS)로 분석하였다.

분석조건은 250 µL/min의 유속으로 용출시켰고, 0.1%(v/v) 포름산이 첨가된 증류수 용액(A)과 0.1%(v/v)의 포름산이 첨가된 80%(v/v) 아세토니트릴 용액(B)를 이용하여 수행하였다. B를 30%에서 50%로 5분간, 50%에서 90%로 3분간 적용하고, 90%에서 4분간 유지시킨 후 30%로 15분간의 구배로 컬럼의 재평형을 위하여 용출시켰다.

분석 결과, 도 4A에 나타낸 바와 같이 대조균인 플라스미드가 도입되지 않은 스트렙토마이세스 베네주엘라에 균주(*S. venezuelae*)는 어떠한 에포틸론도 생산하지 않은 반면에 도 4C에 나타낸 pDHS702-APBC와 pDHS618-DEF으로 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주는 에포틸론 B만을 생산하였고, 에포틸론 A나 에포틸론 B의 중간체(intermediate)인 에포틸론 D는 생산하지 않았다.

다중 반응 모니터링 모드(multiple reactions monitoring mode)로 ESI-MS/MS(전자스프레이 이온화-질량분석기/질량분석기)로 정량분석하였다. 이는 양성자화된 분자 이온(parents)이 에포틸론 B, D에 특이적인 조각으로 전이되는 것을 탐지하기 위해 셋팅된 2개의 mass ion을 선별하는 방식으로 수행되었다. 에포틸론 표준물질 A, B는 칼바이오크(Calbiochem)에서 구입하였고, 에포틸론 D는 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulosum*)에서 분리하였다. 에포틸론의 생산량은 배양액 세 군데에서 채취하여 추출한 추출물의 평균으로 계산하였다.

ESI-MS/MS로 분석한 결과 도 4C에 나타난 28.60분의 용출물은 전형적인 조각부분인 *m/z* 420.2 및 320.1 외에도 *m/z* 508.1에서 분자이온[M+H]⁺를 보였으며, 이로써 에포틸론 B임을 확인할 수 있었다(도 4G). 에포틸론 표준물질로 동일하게 실험을 한 결과, 용출시간 및 분획 형태가 동일하였다. 에포틸론 B의 초기수율은 약 0.1 µg/L였다.

- <69> 에포틸론 A와 B의 생산비율은 세포내 메틸말로닐-CoA(methylmalonyl CoA)의 농도에 의해 영향을 받는 것으로 추정된다. 본 발명자의 스트렙토마이세스 베네주엘라에에서의 세포내 CoA 에스테르의 정량분석과 관련한 종래 연구(J. W. Park, W. S. Jung, S. R. Park, B. C. Park, Y. J. Yoon, *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 1136-1147.)에 의하면, 야생형 스트렙토마이세스 베네주엘라에와 DHS2001에서 메틸말로닐-CoA의 세포내 수치가 말로닐-CoA보다 대략 2배정도 높았다. pDHS702-APBC와 pDHS618-DEF으로 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주에서 에포틸론 B가 생산된 것은 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에 존재하는 메틸말로닐-CoA 수치가 높기 때문인 것으로 추정된다. 이로부터 에포틸론 D를 선별적으로 생산할 수 있는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)의 유전자 조작을 가능케 되었다. 12번 탄소와 13번 탄소위치에서 에폭사이드(epoxide)의 형성과 연관되어 있는 *epoF* 외에도 *orf6*를 결손시킨 결과, 즉 pDHS702-APBC와 pDHS618-DE-2를 DHS2001 균주에 도입하여 형질전환시킨 결과, 도 4E에 나타난 바와 같이 약 0.4 $\mu\text{g/L}$ 의 수율로 에포틸론 D만이 생산되었음을 확인할 수 있었다. 38.3분에서 분리된 용출물은 m/z 404.0 및 303.9의 전형적인 조각 외에 491.9에서 분자이온 $[M+H]^+$ 을 나타냈으며, 에포틸론 D로 확인되었다(도 4H). 또한 야생형 소란지움 셀룰로섬(*S. cellulosum*)이 생산한 에포틸론 D의 용출시간 및 MS/MS 스펙트럼 결과와 pDHS702-APBC와 pDHS618-DE-1을 갖는 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서 생산되는 화합물을 비교한 결과 에포틸론 D임을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 결과로부터 *orf6*는 에포틸론의 생합성에 있어 필수구성요소가 아님을 알 수 있었다.
- <70>
- <71> **실시예 4 : *pikD* 조절유전자 도입에 의한 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 생산 효율 확인**
- <72> 에포틸론의 생산량을 높이기 위하여, 양성 조절 유전자인 *pikD*를 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001에 도입하였다. 도입방법은 하기와 같이 수행하였다. 종래 연구(W. S. Jung, S. J. Jeong, S. R. Park, C. Y. Choi, B. C. Park, J. W. Park, Y. J. Yoon, *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, In press)에 *pikD* 유전자의 분리 및 증폭, 플라스미드 pYJ276의 제조에 관한 방법이 제시되어 있다.
- <73> pSET152 벡터의 처리
- <74> 박테리오파지 ϕ 31에 기초한 pSET152 벡터는 아프라마이신 내성 유전자(apramycin resistant gene; *aac(3)IV*)를 가지고 있으며, 미생물 염색체에 직접 삽입되는 특성을 가지는 벡터이다. 상기 pSET152 벡터는 미국 미시간 대학교 미생물학과 데이비드 셔먼(David H. Sherman) 교수로부터 확보하였다. 상기 벡터를 *SacI*과 *NheI* 제한효소로 처리하였다.
- <75> pACYC177벡터로부터 카나마이신 내성 유전자의 분리
- <76> 상기 pSET152 벡터의 아프라마이신 내성 유전자(*aac(3)IV*)를 카나마이신 저항 유전자(*aphII*)로 대체하고자 New England Biolab에서 상업적으로 시판중인 pACYC 벡터의 카나마이신 내성 유전자를 이용하였다. 상기 벡터의 카나마이신 내성 유전자(*aphII*)를 표 1에 나타난 KM 프라이머를 이용하여 pYJ100 플라스미드에서 PCR로 증폭시켰다.
- <77> 상기 증폭된 카나마이신 내성 유전자를 *SacI/XbaI* 제한효소로 처리하였다.
- <78> pSET152 벡터와 카나마이신 내성 유전자의 결합을 통한 pYJ205 제조
- <79> 상기 *SacI/XbaI*으로 처리하여 분리된 카나마이신 내성 유전자를 *SacI/NheI*으로 처리한 pSET152 벡터와 T4 리가아제(New England Biolabs)로 결합시켜 새로운 벡터를 완성하고 pYJ205라 명명하였다.
- <80> *pikD* 유전자의 분리 및 증폭
- <81> *pikD* 조절유전자(Genbank accession number AF079139)는 하기의 방법으로 분리하였다. 스트렙토마이세스 베네주엘라에 ATCC15439 균주에서 제놈 DNA를 분리하고 *PIKD* 프라이머쌍을 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 상기 증폭된 *pikD*는 pGEM-T easy 벡터로 도입하여 서열분석을 하고, NCBI 뉴클레오타이드 데이터베이스와 비교하여 정확한 서열이 얻어졌는지 여부를 확인하였다.
- <82>
- <83> pYJ276 벡터의 제조 : *pikD* 유전자와 pYJ205의 결합
- <84> 상기 *pikD* 증폭 산물을 *BglIII/XbaI*으로 처리한 후 pYJ205의 *BamHI/XbaI* 부위로 결합시켜 새로운 벡터를 제조하

고, 이를 pYJ276이라 명명하였다. 상기 pYJ276 벡터는 카나마이신 저항 유전자가 포함되어 있고, *pikD* 조절유전자를 인코딩하고 있어 *pikD*의 효용성을 검토하기에 적합하다.

<85> pYJ276 벡터 및 에포틸론 발현 벡터의 도입

<86> 1) pYJ276 벡터, pDHS702-APBC 및 pDHS618-DEF 벡터를 DHS2001에 도입하여 형질전환된 균주와 2) pYJ276 벡터, pDHS702-APBC 및 pDHS618-DE-1 벡터를 DHS2001에 도입하여 형질전환된 균주 3) pYJ276 벡터, pDHS702-APBC 및 pDHS618-DE-2 벡터를 DHS2001에 도입하여 형질전환된 균주에 대하여 에포틸론 생산 여부를 실시예 2에서와 동일한 방법으로 확인하였다.

<87> 분석결과, 도 4D 및 4F에서 볼 수 있듯이 에포틸론 B($0.2\mu\text{g/L}$)와 에포틸론 D($0.8\mu\text{g/L}$)가 대략 2배 이상 생산이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4E 및 도 4F에서 볼 수 있듯이, 에포틸론 D를 생산하는 형질전환된 균주는 43분에서 알려지지 않은 피크를 확인할 수 있었는데, 이는 에포틸론 D의 유사물질로 추정된다.

<88> 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)에서의 에포틸론 생산량은 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*S. coelicolor*)와 미소코커스 크산투스(*M. xanthus*)에서보다 낮았지만 본 발명은 에포틸론의 이중숙주에 있어서 다른 차별화된 장점을 갖는다. 첫째로, 상기 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주는 다른 균주들보다 성장속도가 빠르며(doubling time : 1시간), 이는 이중숙주에서의 생산에 있어 매우 유리한 특징이다. 빠른 성장 속도로 인하여 배양시간을 감축시킬 수 있으며, 이는 에포틸론의 대량생산에 있어 매우 유리하다. 둘째로, 세포내에 말로닐-CoA와 비교하여 볼 때 메틸말로닐-CoA의 농도가 높음으로 인하여 에포틸론 B 또는 D가 단독으로 생산되어 이는 종래의 회수, 정제 과정을 거치지 않아도 된다는 장점을 가진다. 마지막으로 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주는 유전자 조작이 비교적 간단하므로 이는 상기 균주의 개발에 있어 앞으로 보다 더 많은 유용물질을 생산할 수 있게 하는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

<89> 도 1은 KS 프로브를 이용한 콜로니 하이브리다이제이션(colony hybridization) 결과를 나타낸 것이다.

<90> 도 2A는 pDHS702-APBC의 도입된 에포틸론 생합성 유전자를 도식화한 것이다.

<91> 도 2B는 pDHS618-DE-1의 도입된 에포틸론 생합성 유전자를 도식화한 것이다.

<92> 도 2C는 pDHS618-DE-2의 도입된 에포틸론 생합성 유전자를 도식화한 것이다.

<93> 도 2D는 pDHS618-DEF의 도입된 에포틸론 생합성 유전자를 도식화한 것이다.

<94> 도 3는 에포틸론 생합성 유전자 클러스터의 모식도와 pDHS702-APBC 및 pDHS618-DE-2 도입에 의한 에포틸론 생산 방법을 간략하게 도식화한 것이다.

<95> 도 4A는 플라스미드가 도입되지 않은 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) 균주(대조군)에서의 LC-ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것이다.

<96> 도 4B는 야생형 소란지움 셀룰로섬(*Sorangium cellulosum*) So ce90 균주에서의 LC-ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것이다.

<97> 도 4C는 pDHS702-APBC 및 pDHS618-DEF 재조합벡터를 도입하여 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001 변이주에서의 LC-ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것이다.

<98> 도 4D는 도 43C의 재조합 벡터 외에 *pikD* 유전자를 함유한 pYJ276 벡터를 도입하여 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001 변이주에서의 LC-ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것이다.

<99> 도 4E는 pDHS702-APBC 및 pDHS618-DE-2 재조합벡터를 도입하여 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001 변이주에서의 LC-ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것이다.

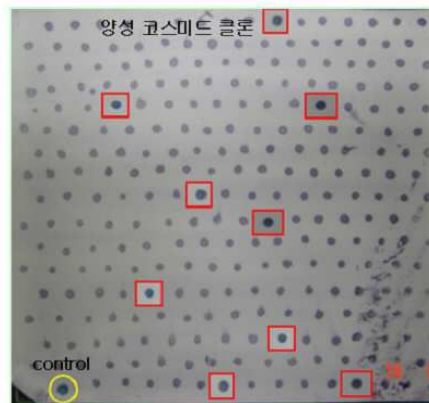
<100> 도 4F는 도 3E의 재조합 벡터 외에 *pikD* 유전자를 함유한 pYJ276 벡터를 도입하여 형질전환된 스트렙토마이세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) DHS2001 변이주에서의 LC-ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것이다.

<101> 도 4G는 에포틸론 B의 ESI-MS/MS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

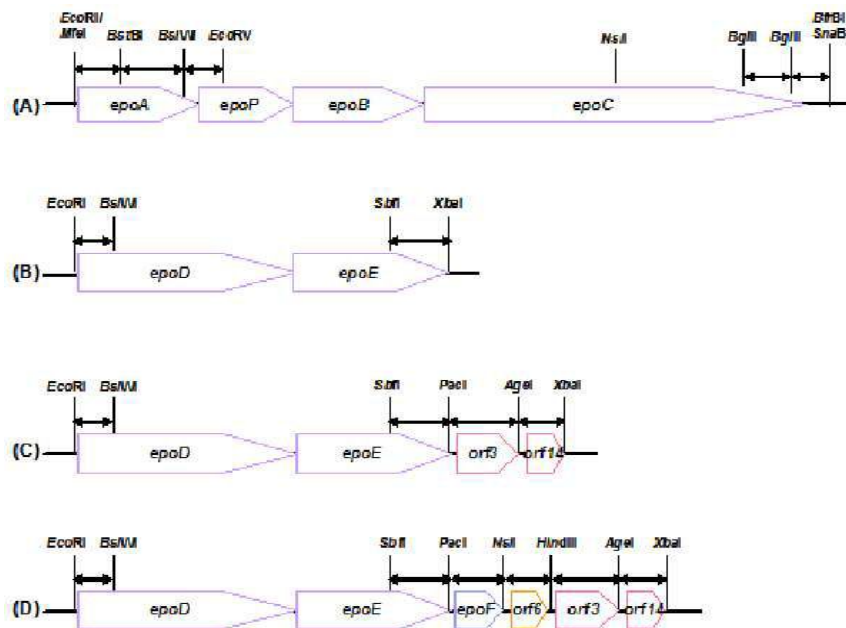
<102> 도 4H는 에포틸론 D의 ESI-MS/MS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도면

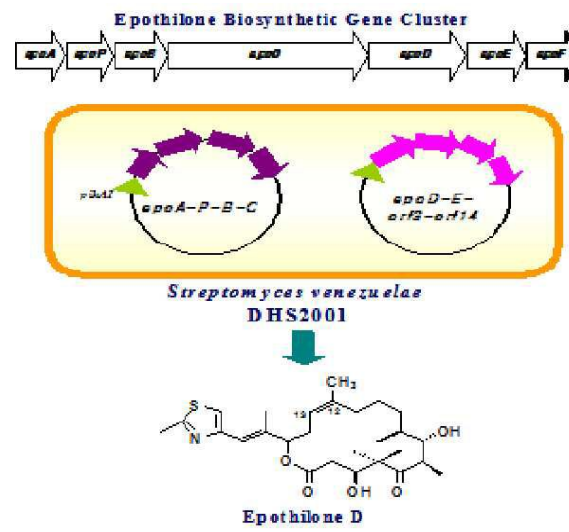
도면1



도면2



도면3



도면4

