(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월10일
(11) 등록번호 10-1263597
(24) 등록일자 2013년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 17/18* (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0114170
(22) 출원일자 2011년11월03일
심사청구일자 2011년11월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR100800233 B1
EP2272963 A1
논문 1 : J AM CHEM SOC

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤여준
서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호
모상준
경기도 군포시 산본동 설악아파트 857동 1004호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

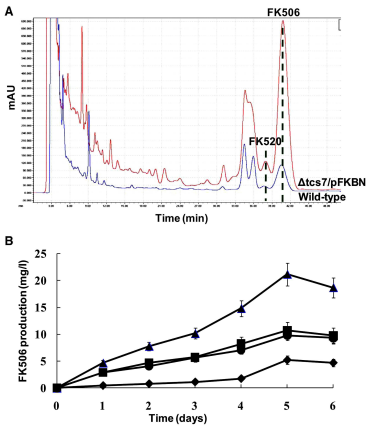
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **F K506 또는 F K520의 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용한 F K506 또는 F K520의 대량 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin) 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용하여 FK506 또는 FK520을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 Tcs7 단백질의 활성이 야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 약화되어 FK506 또는 FK520 생산능이 향상된 미생물 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, FK506 또는 FK520을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

유영지

서울특별시 서대문구 영천동 삼호아파트 105동 306호

반연희

서울특별시 강동구 암사동 489-83

이성권

서울특별시 중랑구 묵2동 233-49 1층

김은지

서울특별시 서대문구 북아현동 238-12

서주원

경기도 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84, 에버힐스1단지-1

김재종

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 309동 202호

임시규

대구광역시 동구 신암동 신암뜨란채아파트 109동 1901호

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 속 (*streptomyces sp.*) 미생물인 KCTC 11604BP에서 Tcs7 단백질의 활성이 야생형의 내재적 활성에 비하여 약화된, FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin) 생산 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 Tcs 7 단백질을 코딩하는 *tcs7* 유전자의 결실 또는 돌연변이에 의하여 상기 단백질의 활성이 약화된 것인 미생물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 Tcs 7 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖고, *tcs7* 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것인 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 추가로 FkbN 단백질의 활성이 야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 강화된 것인 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 FkbN 단백질의 활성은 FkbN을 코딩하는 유전자인 *fkbN*을 도입하여 과발현시킴으로써 상기 단백질의 활성이 강화된 것인, 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 FkbN 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖고, *fkbN* 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 갖는 것인 미생물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin)의 생산 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, FK506 또는 FK520을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin) 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용하여 FK506 또는 FK520을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 Tcs7 단백질의 활성이 야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 약화되어 FK506 또는 FK520 생산능이 향상된 미생물 및 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, FK506 또는 FK520을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] FK506 (타크로리무스, tacrolimus)은 이식된 기관의 거부를 저해하고 자가 면역 질환을 치료하는데 사용되는 임상학적으로 중요한 약물이다. FK506은 또한 신경보호 및 신경재생 제제와 같은 치료제적 잠재력이 있음이 보고된 바 있다 (Sierra-Paredes, G. et al,Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectabts. CNS Neurosci. Ther. **14**:36-46. (2008)., Gold, B. G. Neuroimmunophilin ligands: evaluation of their therapeutic potential for the treatment of neurological disorders. Expert Opin. Investig. Drugs. **9**:2331-2342. (2000)). FK506 및 FK506의 21번 탄소의 알릴 측쇄가 에틸 측쇄로 대체된 구조적으로 연관되어 있는 폴리케티드 매크로리드 (polyketide macrolide)인 FK520 (아스코마이신, ascomycin)은 다양한 스트렙토마이세스 속에 의해 생성되는 23개 탄소의 폴리케티드 매크로리드이다 (도 1). 상기 물질들은 일반적으로 독성이 매우 약하고 약리 활성이 매우 높아 면역억제제, 항암제 등으로 개발되어 고가의 의약품으로 판매되고 있다. 종래의 화학적 방법론에 의해 FK506 및 FK520 화합물을 생산하는데 어려움이 있었고, 통상적으로 야생형 세포에서 그 생산율이 낮기 때문에, 이들 화합물을 생산하기 위한 보다 향상된 선택적인 방법에 대하여 상당한 관심이 있어 왔다. 이에 유전자 조작을 통한 접근 방법이 제시되었고, 생합성 유전자를 밝히기 위한 노력이 계속되고 있다. 본 발명자들은 선행 특허인 대한민국 특허 제10-0800233호에서 *fkbN*을 과발현시켜서 FK506을 대량 생산시키는 방법을 보고한 바 있다. 그러나, 여전히 FK506 및 FK520을 대량 생산하는 방법의 필요성이 요구되고 있다.

[0003] 한편, FK506은 스트렙토마이세스 쯔꾸바엔시스(*Streptomyces tsukubaensis*)로부터 분리되었기 때문에, 이의 생합성 유전자 클러스터는 부분적으로 스트렙토마이세스 속 ATCC 55098 (MA6858), 스트렙토마이세스 속 ATCC 53770 (MA6548), 및 스트렙토마이세스 쯔꾸바엔시스 NRRL 18488에서 서열이 결정되었다. 최근, 스트렙토마이세스 속 ATCC 55098, 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP, 및 스트렙토마이세스 카나미세티쿠스로부터 전체 FK506 생합성 유전자 클러스터의 서열이 보고된 바 있다. FK520의 완전한 생합성 유전자 클러스터도 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스 ATCC 14891로부터 분리되었다. FK506 및 FK520 간의 유일한 차이는 C21 측쇄이기 때문에, 알릴말로닐-CoA 확장 단위가 FK506 PKS의 모듈 4에 로딩되고 에틸말로닐-CoA 확장 단위가 FK520 PKS의 해당 모듈에 로딩되는 것을 제외하고 그들은 하이브리드 폴리케티드 신타제(PKS)/비-리보좀 펩티드 신테타제(NRPS) 시스템을 사용하여 유사한 방식으로 생성된다. 따라서, FK506 및 FK520의 공통적인 구조 요소에 기여하는 14개의 *fkb* 유전자 및 1개의 잠정적인 조절 유전자 (*fkbN*)는 FK506 및 FK520 클러스터에서 잘 보존되고 동일하게 조직되어 있다. 알릴말로닐-CoA 합성을 위해 필요한 4개의 유전자 (*tcsA*, *tcsB*, *tcsC*, 및 *tcsD*)는 FK506 클러스터에 존재하는 반면, FK520 클러스터에서 에틸말로닐-CoA 합성을 위해 필요한 유전자 (*fkbE*, *fkbS*, 및 *fkbU*)는 임의의 FK506 클러스터에서도 발견되지 않는다. 흥미롭게도, 잠정적인 조절 유전자들 중 하나인 *fkbN*은 FK506- 및 FK520-생산 균주에서 모두 관찰되었지만, *tcs2* 및 *tcs7*은 오직 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP 균주에서만 존재하였다 (도 2). *tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN* 유전자는 각각 AsnC 패밀리 전사 조절자, LysR-타입 전사 조절자, 및 LAL (Large ATP-binding regulators of the LuxR) 패밀리 조절자를 코딩하였다. 이에 반해서, FK506 및 FK520 생합성 유전자 클러스터에서 발견되는 *fkbN*을 포함하는 상기 잠정적인 조절 유전자의 역할은 보고된 바 없다.

[0004] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 FK506 및 FK520의 생산을 증가시키기 위한 방법을 찾기 위해 예의 노력한 결과, *tcs7* 유전자를 결손시킨 균주가 FK506 및 FK520을 야생형에 비해서 대량 생산하는 것을 확인하고, 상기 균주에서 *fkbN*을 과발현시킬 경우, FK506을 야생형에 비해 4배 증가된 생산량을 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 Tcs7 단백질의 활성이 야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 약화된, FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin) 생산 미생물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin)의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 Tcs7 단백질의 활성이 야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 약화된, FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin) 생산 미생물을 제공한다.

[0008] 본 발명에서 용어, "FK506 (타크로리무스, tacrolimus)"는 스트렙토마이세스 쯔꾸바엔시스 (Streptomyces tsukubaensis)로 부터 최초로 분리된 면역억제제로서, 면역억제작용은 사이클로스포린보다도 강하고, 장기이식 시 특히 간을 이식할 때 거부반응을 억제시키기 위해 사용하는 것으로 알려진 물질이다. 그 구조는 도 1에 나타낸 바와 같다. "FK520 (아스코마이신, ascomycin)" 역시 면역억제제로서, 23개의 탄소로 형성되는 매크로리드 구조의 화합물이며, FK506의 에틸 유사체이다. 그 구조는 도 1에 나타낸 바와 같다. 상기 FK506 및 FK520은 도 1에 나타낸 바와 같이, 21번 탄소의 알릴 측쇄가 에틸 측쇄로 대체된 구조적으로 연관되어 있는 구조로 생합성 유전자 클러스터가 유사하다. 상기 물질의 생산에 있어서, 음성 및 양성 조절자 유전자는 아직 명확히 보고된 바 없으며, 본 발명자들에 의해 최초로 규명되었다.

[0009] 본 발명에서 용어, "Tcs 7 단백질"은 FK506 또는 FK520 생합성의 음성 조절 유전자로서, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖고 있으며, Tcs 7 단백질을 코딩하는 *tcs7* 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가질 수 있다. 상기 Tcs 7 단백질과 동일한 활성을 나타내는 한, 상기 서열과 70%, 바람직하게는 80%, 더 바람직하게는 90%, 더더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열도 모두 포함될 수 있다.

[0010] 본 발명에서 용어, "내재적 활성"이란 야생형 미생물이 천연의 상태로 가지고 있는 단백질의 활성 상태를 의미할 수 있다.

[0011] 본 발명에서 "야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 Tcs7 단백질의 활성이 약화" 되었다는 것은, Tcs7를 코딩하는 염색체상의 유전자의 결손 또는 돌연변이에 의해 Tcs7가 정상적으로 작용하지 않아 야생형 미생물이 천연의 상태로 가지고 있는 Tcs7 활성이 약해지거나 불활성화된 상태를 의미한다. 바람직하게는 Tcs7를 코딩하는 유전자가 결실, 치환 또는 삽입에 의하여 돌연변이 되거나 이의 발현 조절 서열이 돌연변이 되어, Tcs7가 정상적으로 작용하지 않는 상태를 의미한다.

[0012] 본 발명에서는 *tcs7* 유전자의 전부 또는 일부를 포함하는 셔틀 벡터를 미생물에 도입하여 교차 돌연변이에 의해 내재적 *tcs7* 유전자를 결손 또는 돌연변이시킴으로써 Tcs7 단백질의 내재적 활성이 약화된 미생물을 제조할 수 있다.

[0013] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, *tcs7* 유전자를 결실시킨 스트렙토마이세스 KCTC 11604BP에서 FK506은 야생형의 5.22±0.65 ㎎/ℓ 생산량에 비해, 9.89±0.98 ㎎/ℓ를 생산하는 등 약 1.9배 증가하고 (표 5), FK520은 야생형의 0.65 ±0.06 ㎎/ℓ 생산량에 비해, 0.97±0.82 ㎎/ℓ를 생산하는 등 약 1.5배 증가하는 것을 확인하여 (표 5), *tcs7* 유전자가 FK506 및 FK520 생산에서 음성적인 조절자임을 확인하였다.

[0014] 본 발명에서, "벡터"란 적당한 숙주세포 염색체 상의 유전자 염기서열과 유전자 삽입물의 교차 돌연변이 또는 상동 재조합이 가능하도록 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미할 수 있다.

[0015] 상기 벡터를 도입하는 모균주로는 FK506 또는 FK520을 생산할 수 있는 미생물이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에서, "야생형 미생물"이란, 천연의 상태로 FK506 또는 FK520을 생물체로부터 생산할 수 있는 미생물 균

주로서, 본 발명에 따른 조작에 의해 FK506 또는 FK520을 축적할 수 있는 균주를 말한다. 예를 들어, 스트렙토마이세스 속 미생물일 수 있으며, 바람직하게는 *tcs7* 유전자의 결실 미생물의 경우에는 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP일 수 있으며, *fkbN* 유전자의 경우에는 스트렙토마이세스 속 ATCC 55098, 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나미세티쿠스, 그리고 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스 ATCC 14891일 수 있다.

[0016] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 스트렙토마이세스 KCTC 11604BP로부터 유래된 포스미드 DNA (fos1004F01 및 fos1006D05)의 왼쪽측면 및 오른쪽측면 절편을 PCR로 증폭하여 대장균-스트렙토마이세스 셔틀 벡터인 pKC1139 벡터 내로 클로닝하여 *tcs7* 결실 플라스미드인 pΔTCS7을 제작하여 스트렙토마이세스 KCTC 11604BP로 전달하여 *tcs7* 결실 균주를 제작하였다.

[0017] 또한 본 발명에서는 FK506 또는 FK520 생산을 더욱 증가시키기 위해, 추가적으로 FkbN 단백질 활성이 야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 강화된 미생물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 "야생형 미생물의 내재적 활성에 비하여 강화" 되었다는 것은, 해당 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자가 과발현되어 미생물이 천연의 상태로 가지고 있는 단백질 활성이 증가된 상태를 의미한다. 목적 유전자의 과발현은 상기 유전자의 프로모터 부위 및/또는 5'-UTR 지역의 염기서열을 변형시킴으로써 단백질 발현을 증진시킬 수 있고, 목적 유전자를 염색체상에 추가 도입함으로써 발현을 강화시킬 수 있으며, 목적 유전자를 벡터 상에 자가 프로모터 또는 강화된 별개의 프로모터와 함께 도입하여 균주에 형질도입함으로써 단백질의 발현량을 강화시킬 수 있고, 목적 유전자의 ORF(open reading frame) 지역에 돌연변이를 도입함으로써 목적 유전자의 과발현을 유도할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어, "FkbN 단백질"은 FK506 또는 FK520 생합성의 양성 조절 유전자로서, 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖고 있으며, FkbN 단백질을 코딩하는 *fkbN* 유전자는 서열번호 4의 염기서열을 가질 수 있다. 상기 FkbN 단백질과 동일한 활성을 나타내는 한, 상기 서열과 70%, 바람직하게는 80%, 더 바람직하게는 90%, 더더욱 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열도 모두 포함될 수 있다.

[0020] *fkbN* 유전자를 갖는 유전자 발현 벡터를 미생물에 형질도입함에 의하여 상기 단백질의 활성을 강화시킨다. 본 발명에서, "유전자 발현 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0021] 본 발명의 구체예에 따르면, 스트렙토마이세스 KCTC 11604BP로부터 유래된 포스미드 DNA (fos1004F01 및 fos1006D05)로부터 유전자 절편을 *ermE** 프로모터를 포함하는 pSET152 유도체 벡터에 클로닝하여 과발현 벡터인 pFKBN을 제조하여 상기 미생물에 도입하였다. 그 결과, 상기 FkbN이 과발현된 스트렙토마이세스 KCTC 11604BP에서 FK506은 야생형의 5.22±0.65 ㎎/ℓ 생산량에 비해, 11.1±0.48 ㎎/ℓ를 생산하는 등 약 2.1배 증가하고 (표 5), FK520은 야생형의 0.65 ±0.06 ㎎/ℓ 생산량에 비해, 1.39±0.04 ㎎/ℓ를 생산하는 등 약 2.14배 증가하는 것을 확인하여 (표 5), *fkbN* 유전자가 FK506 및 FK520 생산에서 양성적인 조절자임을 확인하였다. 또한, *tcs7* 유전자가 결실된 균주에서 fkbN 유전자를 과발현시킨 경우, FK506의 농도가 4.0 배 증가하는 것을 확인하였으며 (도 7의 A 및 B), FK520도 증가하는 것을 확인하였다 (도 7의 A).

[0022]

[0023] 또 하나의 양태로서 본 발명은 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, FK506 (타크로리무스, tacrolimus) 또는 FK520 (아스코마이신, ascomycin)의 생산 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명에서 FK506 또는 FK520 생산 미생물을 이용하여 FK506 또는 FK520을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 잔토모나스 속 균주에 대한 배양 배지는 공지되어 있다 (예를 들면, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). 사용될 수 있는 당원으로는 글루코스, 사카로스, 락토스, 프락

토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 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 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유해야 한다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.

[0026] 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 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 20℃ 내지 37℃, 바람직하게는 26℃ 내지 30℃이다. 배양은 FK506 또는 FK520의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 90 내지 150 시간에서 달성된다. FK506 또는 FK520은 배양 배지 중으로 배출되거나, 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.

[0027] 본 발명의 FK506 또는 FK520을 생산하는 방법은, 세포 또는 배양 배지로부터 FK506 또는 FK520을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 세포 또는 배양 배지로부터 FK506 또는 FK520을 회수하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다. 상기 FK506 또는 FK520 회수 방법에는, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 FK506 또는 FK520의 생합성의 음성 조절자인 *tcs7* 유전자 및 양성 조절자인 *fkbN* 유전자를 규명하여, FK506 또는 FK520의 대량 생산 균주에 적용할 수 있다. 또한, 본 발명의 균주를 이용하여 FK506 또는 FK520의 대량생산을 할 수 있어서, 다양한 면역억제제에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 FK506 및 FK520의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 FK506 생합성 유전자 클러스터의 유전적 구성을 나타낸 도이다. (A) 스트렙토마이세스 속 KCTC11604BP의 FK506 생합성 유전자 클러스터; (B) 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 KCTC9225의 FK506 생합성 유전자 클러스터; (C) 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 변종 아스코마이세티쿠스 ATCC14891의 FK520 생합성 유전자 클러스터. 잠정적인 조절 유전자 (tcs2, fkbN, tcs7, fkbR1, 및 fkbR2)는 밝은 갈색으로 나타냈다. 알릴말로닐-CoA 생합성 유전자 (tcsA, tcsB, tcsC, 및 tcsD)는 밝은 적색으로 나타냈다. 잠정적인 메톡시말로닐-ACP 생합성 유전자 (fkbG, fkbH, fkbI, fkbJ, 및 fkbK)는 밝은 녹색으로 나타냈다. 타입 II 티오에스터아제 유전자 (fkbQ)는 밝은 보라색으로 나타냈다. 포스트-PKS 유전자 (fkbD 및 fkbM)는 갈색을 띤 노란색으로 나타냈다. PKS 유전자 (fkbA, fkbB, 및 fkbC)는 회색으로 나타냈다. 디하이드록시사이클로헥산카르복실 산 (DHCHC) 생합성 유전자 (fkbO)는 흰색으로 나타냈다. 피페콜레이트 생합성 및 PKS 응축 관련 유전자 (fkbL 및 fkbP)는 노란색으로 나타냈다. 에틸말로닐-CoA 생합성 유전자 (fkbE, fkbS 및 fkbU)는 밝은 청색으로 나타냈다. FK506 생합성에 관여하지 않는 유전자는 검정색으로 나타냈다.

도 3은 스트렙토마이세스 항생제 유전자 클러스터로부터 다른 상동 단백질과의 FkbN 서열 비교를 나타낸다. (A) LAL-패밀리 조절자를 가진 N-말단 Walker A 및 B NTP-결합 모티프는 청색 박스로 표기하였다. (B) C-말단 LuxR-타입 HTH DNA-결합 모티프는 적색 박스로 표기하였다.

도 4는 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP에서 *tcs2* 결실의 구축 및 증명을 나타낸 도이다. (A) 상동 재조합에 의한 *tcs2* 결실의 모식도; (B) 서던 블롯 분석. 야생형(레인 2), 단일 교차 돌연변이체 (레인 5), Δtcs2 돌연변이체 (레인1) 및 야생형 복귀 돌연변이체 (레인 3, 4, 7, 8) 균주의 BamHI로 절단된 게놈 DNA. 분자량 마커

(레인 6). 표기된 1041 bp의 HindIII-BamHI 절편은 프로브로 사용되었다(채워진 사각형).

도 5는 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP에서 *tcs7* 결실의 구축 및 증명을 나타낸 도이다. (A) 상동 재조합에 의한 *tcs7* 결실의 모식도; (B) 서던 블롯 분석. 야생형(레인 2), 단일 교차 돌연변이체 (레인 4), Δtcs7 돌연변이체 (레인1, 7) 및 야생형 복귀 돌연변이체 (레인 3, 6, 8) 균주의 EcoRI으로 절단된 게놈 DNA. 분자량 마커 (레인 5). 표기된 1052 bp의 BamHI-EcoRV 절편은 프로브로 사용되었다 (채워진 사각형).

도 6은 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP에서 *fkbN* 결실의 구축 및 증명을 나타낸 도이다. (A) 상동 재조합에 의한 fkbN 결실의 모식도; (B) 서던 블롯 분석. 야생형(레인 1), 단일 교차 돌연변이체 (레인 3), ΔfkbN 돌연변이체 (레인 6, 7) 및 야생형 복귀 돌연변이체 (레인 2, 5) 균주의 BglII 및EcoRI으로 절단된 게놈 DNA. 분자량 마커 (레인 4). 표기된 1245 bp의 XbaI-EcoRI 절편은 프로브로 사용되었다(채워진 사각형).

도 7의 (A)는 Δtcs7/pFKBN 균주 및 야생형 균주로부터 에틸 아세테이트로 추출된 액체의 HPLC 분석을 나타낸 도이다. 수직의 녹색 점선은 FK506 및 FK520의 존재를 나타낸다. (B)는 R2YE 배지에서 FK506 생산의 타임 코스를 나타낸다. 채워진 삼각형은 Δtcs7/pFKBN 균주의 FK506 농도; 채워진 원은 Δtcs7 균주의 FK506 농도; 채워진 사각형은 WT/pFKBN 균주의 FK506 농도; 및 채워진 마름모는 야생형 균주의 FK506 농도.

도 8은 야생형 스트렙토마이세스 속 KCTC 1116BP, ΔfkbN, Δtcs7, 및 (Δtcs7/pFKBN) 균주에서 FK506 생합성 유전자의 전사를 나타낸다. 전체 RNA를 72시간 배양 후 균사체로부터 추출하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0031] **방법**

[0032] **실시예 1: 균주, 플라스미드 및 배양 조건**

[0033] 본 발명의 실시예들에 사용된 모든 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 기재하였다. 스트렙토마이세스 KCTC 11604BP 균주는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures) 유전자 은행(대한민국, 대전)으로부터 얻었다.

표 1

[0034]

균주/플라스미드	**특징**[§]
박테리아 균주	
Escherichia coli	
DH5α	Plasmids construction and general subcloning, F^- *recA lacZ*ΔM15
ET12567/pUZ8002	Non-methylating ET12567 containing non-transmissible RP4 derivative plasmid pUZ8002, Cml^r, Tet^r, Kan^r
Streptomyces	
KCTC11604BP	Wild-type FK506 producing strain
WT/pSET152(P_{ermE*})	Wild-type stain with integrative plasmid pSET152(P_{ermE*})
WT/pTCS2	Wild-type with integrative plasmid pTCS2, $Apra^r$
WT/pTCS7	Wild-type with integrative plasmid pTCS7, $Apra^r$
WT/pFKBN	Wild-type with integrative plasmid pFKBN, $Apra^r$
Δtcs2	Mutant of KCTC11604BP with an in-frame deletion of internal tcs2
Δtcs7	Mutant of KCTC11604BP with an in-frame deletion of internal tcs7
ΔfkbN	Mutant of KCTC11604BP with an in-frame deletion of fkbN
Δtcs7/pFKBN	Δtcs7 with integrative plasmid pFKBN, $Apra^r$
ΔfkbN/pTCS2	ΔfkbN with integrative plasmid pTCS2, $Apra^r$

ΔfkbN/pTCS7	ΔfkbN with integrative plasmid pTCS7, Apra^r
ΔfkbN/pFKBN	ΔfkbN with integrative plasmid pFKBN, Apra^r
플라스미드	
pCCFOS1(fosmid)	Vector for genomic library construction, F$^-$, *oriV*, Cml^r
pGEM-Teasy	*E. coli* vector for cloning PCR products, Amp^r
pSET152(P_{ermE*})	Integrating plasmid containing P_{ermE*}, *oriT*, *attP*, *ϕC31 int* and *aac(3)IV*
pKC1139	Temperature-sensitive *E. coli-Streptomyces* shuttle vector containing *oriT* and *aac(3)IV* for gene disruption
pTCS2	§pSET152(P_{ermE*}) based integrate plasmid containing single copy of *tcs2*, Apar^r
pTCS7	pSET152(P_{ermE*}) based integrate plasmid containing single copy of *tcs7*, Apar^r
pFKBN	pSET152(P_{ermE*}) based integrate plasmid containing single copy of *fkbN*, Apar^r
pΔTCS2	pKC1139 based deletion plasmid with in-frame deletion of 171-bp internal *tsc2* fragment
pΔTCS7	pKC1139 based deletion plasmid with in-frame deletion of 888-bp internal *tsc7* fragment
pΔFKBN	pKC1139 based deletion plasmid with in-frame deletion of 2,772-bp internal *fkbN* fragment
포스미드(fosmid)	
fos1004F01	Fosmid clone, contains bases 1-0,366 of FK506 biosynthetic gene cluster
fos1006D05	Fosmid clone, contains bases 58,172-7,743 of FK506 biosynthetic gene cluster

[0035] §F$^-$는 F 플라스미드를 갖고 있지 않음; *recA1*는 DNA 클론 내에서 원하지 않는 재조합의 발생을 감소시킴; *lacZ* ΔM15는 β-갈락토시다제 유전자의 α-상보성(α-complementation)을 허용하는 *lacZ* 유전자를 일부 결실시킴; Cml^{r}은 클로람페니콜 저항성임; Tet^{r}은 테트라사이클린 저항성임; Kan^{r}은 카마마이신 저항성임; Apr^{r}은 아프라마이신 저항성임; Amp^{r}은 앰피실린 저항성임; *oriV*는 복제 원점임; *oriT*는 이동(transfer) 원점임; *attP*는 플라스미드 *Φ31* 부착 부위임; *Φ31 int*는 인테그레이즈 유전자임; *aac(3) IV*는 아프라마이신 저항성 유전자임; P_{ermE*}는 돌연변이된 구성성 프로모터 (constitutive promoter)임.

[0036] 배지 및 배양 조건은 Kieser, T. et al.(Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich, UK (2000)) 및 Sambrook, J. et al. (Molecular cloning. a laboratory manual, 3rd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2000))에 기재된 표준 배지 및 배양 조건을 사용하였다. 앰피실린 (100 ㎍/㎖), 아프라마이신 (50 ㎍/㎖) 및 날리딕스산 (25 ㎍/㎖)을 필요할 때 선택적으로 성장배지에 첨가하였다. 모든 균주의 포자는 ISP4 배지 (수용성 전분 10g, 이인산 칼륨 (Dipotassium phophate) 1g, 황산 마그네슘 USP 1g, 염화 나트륨 1g, 황산 암모늄 2g, 탄산 칼슘 2g, 아가 20g, 황산제일철 0.001g, 염화 망간 0.001g, 황산 아연 0.001g)에서 실시하였고, 생산 배양을 위한 종자 배양은 Mo, S. et al (Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **36**:1473-1482 (2009))에 기술된 바와 같이, 아프라마이신의 존재 또는 부재하의 R2YE 배지 (슈크로스 103g, 황산 칼륨 0.25g, 염화 마그네슘, 헥사히드레이트 10.12g, 글루코스 10g, 디프코 카사미노산 (Difco Casaminoacids) 0.1g 을 증류수 800 ㎖에 넣고 고온 멸균 후에 0.5%의 인산 칼륨 1 ㎖, 3.68%의 염화 칼슘, 디히드레이트 8 ㎖, 20%의 L-프롤린 1.5 ㎖, 5.73%의 TES (pH7.2) 10 ㎖, 미량 원소 용액 (trace element solution) 0.2 ㎖, 1N의 수산화 나트륨 0.5 ㎖, 10%의 효모 추출액 50 ㎖)에서 수행하였다. FK506 및 FK520의 생산을 위해, 모든 균주를 pH 7.2에서 아프라마이신 존재 또는 부재하의 50 ㎖ R2YE 배지를 포함하는 막힌 250-㎖ 플라스크에 500 ㎕ 종자 배양 현탁액을 접종하였고, 28℃에서 6일간 궤도형 쉐이커 (180 rpm)에서 성장시켰다.

[0037] **실시예 2: DNA 조작 및 박테리아 형질전환**

[0038] DNA 추출 및 조작 뿐만 아니라 대장균 및 스트렙토마이세스의 형질 전환은 Kieser, T. et al.(Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich, UK (2000)) 및 Sambrook, J. et al. (Molecular cloning. a laboratory manual, 3rd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2000))에 기재된 표준 프로토콜에 의해 실시하였다. 제한 효소 및 분자생물학 시약은 New England Biolabs 및 Roche Diagnostics로부터 구입하였다. PCR 산물은 QIAquick PCR Purification kit (Qiagen)를 사용하여 정제하였고, 제한 절편은 QIAquick Gel Purification kit (Qiagen)를 사용하여 아가로스 겔로부터 정제하였다. 서던 블롯팅은 Hybond-N 나일론 맴브레인 (Amersham-Pharmacia) 및 캐필러리 전달 시스템을 사용하여 실시하였다. 혼성화는 Roche등에 기술된 바와 같이, Digoxigenin High Prime DNA Labeling 및 Detection Starter Kit II (Boehringer)를 가지고 라벨링된 프로브를 사용하여 높은 엄격한 조건 (0.5×SSC (saline-sodium citrate) 완충액, 68℃)하에서 실시하였다. 발색 방법으로 블롯의 프로브를 감지하였다.

[0039] **실시예 3: DNA 서열결정 및 분석**

[0040] 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP의 FK506 유전자 클러스터의 서열은 Genbank accession no. HM116536에 기재되어 있다. 상기 서열 데이터의 주석 분석은 NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 이용해 비교 분석을 실시하였다.

[0041] **실시예 4: 유전자 과발현, 파괴 및 상보성 분석**

[0042] *ermE** 프로모터(P_{ermE*})를 포함하는 통합적인 대장균-스트렙토마이세스 벡터 pSET152 (Bierman, M., et al. Plasmids cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene **116**:43-49. (1992)) 유도체 벡터를 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP에서의 유전자 발현을 위해 사용하였다.

[0043] 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP에서 3개의 잠정적인 조절 유전자 (*tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN*)의 과발현을 위하여, 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP 유래의 포스미드 DNA (fos1004F01 및 fos1006D05; GenBank accession no. HM116536)로부터 3개의 유전자 절편을 PCR로 증폭하여 과발현 플라스미드를 구축하였다.

[0044] 본 PCR에 사용된 프라이머를 하기 표 2에 나타냈다.

표 2

[0045]

PCR 프라이머	5'→3'서열 (제한효소 부위는 밑줄로 표시함)	제한효소	서열번호
Tcs2_OF	GGACCAGATCTATCTCGCACTACATTCGG	BglII	5
Tcs2_OR	GAATCTCTAGACTAGCCCGGAGTCAG	XbaI	6
Tcs7_OF	GGACCAGATCTCGTCCGGTGATGGAATTCTG	BglII	7
Tcs7_OR	GAATCTCTAGAGGATTCTCAGTCCTGTGGGGCG	XbaI	8
FkbN_OF	AAATTAGATCTCATGGAGACGACGGCCGCGA	BglII	9
FkbN_OR	GTTATTCTAGACTACCCGCACCGGTCG	XbaI	10
Tcs7_LF	GGTCTCTAGAAGTTCGAACGCGAGCGT	XbaI	11
Tcs7_LR	GTTGGATCCGACGAAGTACTCCAGGGT	BamHI	12
Tcs7_RF	GTTAGATCTGACCCTCAACCCGCCC	BglII	13
Tcs7_RR	GCTGATATCATCTCTAGAGTCCCCGCC	EcoRV	14
FkbN_LF	GTTAAGCTTTGCACAACCCGATCTGAT	HindIII	15
FkbN_LR	ATTATATCTAGACCGCCCCCGGCG	XbaI	16
FkbN_RF	ATTTATTCTAGACTCGCGGCCGTCGTC	XbaI	17
FkbN_RR	GCCGAATTCGTGCCGTCATTTGGTCG	EcoRI	18

[0046] Tcs2_OF/Tcs2_OR (서열번호 5 및 6), Tcs7_OF/Tcs7_OR (서열번호 7 및 8), 및 FkbN_OF/FkbN_OR (서열번호 9 및 10) 프라이머 쌍을 디자인하여 *tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN*의 PCR 절편을 각각 증폭하였다. *tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN*의 PCR 증폭을 위한 모든 프라이머는 그들의 RBS (ribosomal binding site)를 포함하도록 디자인하였다. 3개의 PCR 절편 (*tcs2*은 489 bp, *tcs7*은 1,452 bp, 및 *fkbN*는 2,793 bp) 전체는 pGEM-T Easy vector (Promega)를 사용하여 독립적으로 클로닝하여 서열을 결정하였다. 적합한 제한 효소로 절단한 후, 상기 절편을 *ermE** 프로모터를 포함하는 pSET152 유도체 벡터의 BglII-XbaI 부위에 클로닝하여, pTCS2, pTCS7, 및 pFKBN를 제조하였다 (표 1). 그 후 상기 플라스미드를 *E. coli* ET12567/pUZ8002로부터 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP로 컨쥬게이션에 의하여 전달하였다. 플라스미드의 *attB* 염색체 부위로의 부위-특이적 통합은 아프라마이신-저항 접합완료체 (exconjugant)의 선택을 가능하게 하였다.

[0047] 대장균-스트렙토마이세스 셔틀 벡터인 pKC1139는 유전자 결실을 위해 사용하였다. *tcs2*-결실 돌연변이 (Δtcs2)는 Mo S, et al의 방법 (Biosynthesis of the Allylmalonyl-CoA Extender Unit for the FK506 Polyketide Synthase Proceeds through a Dedicated Polyketide Synthase and Facilitates the Mutasynthesis of Analogues. J. Am. Chem. Soc. **133**:976-985. (2011))으로 수행하였다. *tcs7* 및 *fkbN*을 결실시키기 위하여, 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP로부터 유래된 포스미드 DNA (fos1004F01 및 fos1006D05)의 왼쪽측면 및 오른쪽측면 절편을 PCR 증폭하여 결실 플라스미드를 구축하였다. Tcs7_LF/Tcs7_LR (서열번호 11 및 12) 및 FkbN_LF/FkbN_LR (서열번호 15 및 16) 프라이머쌍을 디자인하여 타겟 유전자의 왼쪽 측면 절편을 증폭하였고, Tcs7_RF/Tcs7_RR (서열번호 13 및 14) 및 FkbN_RF/FkbN_RR (서열번호 17 및 18) 프라이머쌍을 디자인하여 타겟 유전자의 오른쪽 측면 절편을 증폭하였다. 전체 4개의 PCR 절편을 pGEM-T Easy vector에 독립적으로 클로닝하여 서열을 분석하였다. 적합한 제한효소로 절단한 후, 절편을 HindIII-EcoRI 또는 XbaI-EcoRV로 절단된 pKC1139 벡터 내로 클로닝하여 3개의 다른 인-프레임 (in-frame) 결실 플라스미드인 pΔTCS7 및 pΔFKBN를 제조하였다 (표 1). 상기에 언급된 바와 같이, 이들 플라스미드는 그 후 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP로 전달시켰다. 원하는 이중 교차 돌연변이체 (double crossover mutant)인 Δtcs7 및 ΔfkbN은 그들의 아프라마이신-민감 형질에 따라 선택되었고, PCR로 확인 후, 서던 블롯 분석에 의해 선택적으로 확정되었다.

[0048]

[0049] 상보성을 위해, pTCS2, pTCS7 및 pFKBN 플라스미드를 유전자간 컨쥬게이션에 의해 ΔfkbN 균주내로 도입시켰다. pFKBN 플라스미드 또한 Δtcs7 균주 내로 도입시켰다. 플라스미드의 *attB* 염색체 부위로의 부위-특이적 통합은 아프로마이신-저항 접합완료체의 선택을 가능하게 하였고, 이들 각각의 FK506 및 FK520 생산 수준을 상기에 기술된 바와 같이 측정하였다.

[0050] **실시예 5: 세포 성장 및 FK506 생산 분석**

[0051] 세포 성장을 측정하기 위해, 발효 용액의 시료 (50 ㎖)를 접종 24시간 후를 시작으로 24시간 간격으로 수거하였다. Mo, S. et al.(Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **36**:1473-1482 (2009))에 기술된 바와 같이, 균사체를 수거하여 중량을 재었다. 야생형, Δtcs2, Δtcs7 및 ΔfkbN 균주를 28℃에서 6일 동안 궤도형 쉐이커 (180 rpm)의 50 ㎖ 액체 R2YE 배지에서 성장시켰다. 상기에 기술된 바와 같이, 50 ㎍/㎖의 아프라마이신을 포함하는 50 ㎖ 액체 R2YE 배지에서 WT/pSET152(P_{ermE*}), WT/pTCS2, WT/pTCS7, WT/pFKBN, ΔfkbN/pTCS2, ΔfkbN/pTCS7, ΔfkbN/pFKBN, 및 Δtcs7/pFKBN을 성장시켰다. FK506 및 FK520 생산 수준은 고성능액체크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 결정하였다. 신뢰성있는 FK506 (Sigma-Aldrich) 및 FK520 (Santa Cruz Biotechnology) 표준물을 사용하여 HPLC 분석에 의한 FK506 및 FK520의 보정 곡선을 각각 작성하였다. 표시된 FK506 및 FK520 생산 수준은 4개의 독립적인 배양과 추출물의 평균 값이다.

[0052] **실시예 6: mRNA 분리 및 RT- PCR에 의한 유전자 발현 분석**

[0053] 아프라마이신 존재 또는 부재하에서 액체 R2YE 배지에서 성장된 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP의 야생형 및 돌연변이 균주로부터 전체 RNA를 분리하였다. mRNA 분해를 막기 위해, 2 부피의 RNA 보호 시약(Qiagen)을 1 부피의 인산완충식염수(PBS)와 혼합하였다. 수득된 용액을 1.5 ㎖ 원심분리 튜브의 수거된 균사체에 첨가하여 균사체를 PBS 용액 처리-RNA 보호 시약을 사용하여 세척하였다. 상기 균사체를 원심분리 (4℃에서 10분간 5,000

× *g*)에 의해 수확하여, RNeasy Mini kit (Qiagen)를 사용하여 RNA 분리를 수행하였다. 전체 RNA를 NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, USA)를 사용하여 정량화하였다. RNA의 순도는 2.2 M 포름알데히드를 포함하는 아가로스에서 전기영동 후 rRNA의 시각화를 통해 확인하였다. 상기 수득한 RNA를 DNase I (Qiagen)으로 처리하여 가능한 염색체 DNA 오염을 제거하였다. 주형으로 전체 RNA 100 ng을 사용하여 Qiagen OneStep RT-PCR kit으로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 조건은 하기와 같다: 30분간 50° C에서 cDNA 합성, 15분간 95° C; 1분간 94° C에서 35 사이클, 증폭, 1분간 54° C 및 40초간 72° C. RT-PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 3에 나타냈다.

표 3

[0054]

프라이머	5'→3'서열	서열번호	프라이머	5'→3'서열	서열번호
TcsA_RTF	GGGAGCGCTTCTTCTACTCC	19	FkbK_RTF	CACTTCATGAACCCGTCGTA	43
TcsA_RTR	AGGGAGTCGACACCGAGAT	20	FkbK_RTR	CACCGGAACACCTCTTCGTA	44
TcsB_RTF	GGACTGTTACCCGACGACTG	21	FkbL_RTF	GTCATCGAGTTCATGCCGTA	45
TcsB_RTR	CGATGACCCAGTCGACATC	22	FkbL_RTR	GATGTGACGGTGCTCAGGA	46
TcsC_RTF	CTACCGTCAGCTGGTGTCC	23	FkbO_RTF	GGTATCACCTGCGTGTTCCT	47
TcsC_RTR	CATATGTGACCCGATGATGC	24	FkbO_RTR	ACTCCTTCGATCTCCACGAG	48
TcsD_RTF	AGAGAGTGTGCGGATCGTCT	25	FkbP_RTF	GCCTACGCGATCTACACCTC	49
TcsD_RTR	GTCGGAGAACGACACCTGAT	26	FkbP_RTR	GGACCGTAGTGGTTGTGGAC	50
Tcs1_RTF	ACACTGACGGAGACCGACAT	27	FkbD_RTF	ACAGCAGATGGTCGGCTACT	51
Tcs1_RTR	GACCTCGAAGGACACGATTG	28	FkbD_RTR	GAGACCCTCGTTCATCGGTA	52
Tcs2_RTF	AAAAGGTTGTCCTGGATTCG	29	FkbM_RTF	GACGGTCTCGCACATCAAC	53
Tcs2_RTR	GAATACGAGGTGGGTCTCCA	30	FkbM_RTR	GTCTCGATCTCTTCGCTCGT	54
Tcs3_RTF	AACATGTTCACCGCCTATGG	31	FkbN_RTF	GAGCAGCCCCTTATGAACTG	55
Tcs3_RTR	AGCAGGGTGTCGACGAGTT	32	FkbN_RTR	GAGGTGCAGCAGACAGAGC	56
Tcs4_RTF	GGTCACCTTCCATCTCTCCA	33	FkbQ_RTF	GCTGTTCGGACACAGTATGG	57
Tcs4_RTR	GGCCGTATATCTCCTTGCTG	34	FkbQ_RTR	ACTTGTTCCTGGTGCTCGAC	58
Tcs5_RTF	CTCGGTATGGGACATCGAAC	35	FkbR_RTF	TCAAGACCCTTCACCATCCT	59
Tcs5_RTR	GTGACGTATCCGCCCTCTT	36	FkbR_RTR	GTACCTGCACTCCCGGATAG	60
FkbG_RTF	TACGTCCGGAAGGTGTCACT	37	FkbA_RTF	GGTGAGAAGGTCCTGATCCA	61
FkbG_RTR	TAGTAGGCCGGATAGCGTTC	38	FkbA_RTR	CTGCTCATCCAGCCGAAC	62
FkbH_RTF	CTGGGATCTGGACAACACCT	39	FkbB_RTF	CATGGGCCTGAAACTGATG	63
FkbH_RTR	ATCCGGCCTGGTACATGAG	40	FkbB_RTR	AGACGTTGTCGACCTGTGC	64
FkbI_RTF	CGCGAGACCTATCTGAAGGA	41	FkbC_RTF	GGAGGGATGGACGTTTCC	65
FkbI_RTR	GAACTGTTGCCGGCTCTTC	42	FkbC_RTR	AGGAGTCGGGTGATGATCTG	66

[0055] 상기 표 3에 기재된 프라이머를 디자인하여 약 500bp의 PCR 산물을 생성하였다. 프라이머 각 쌍을 이용해 증폭된 산물이 염색체 DNA로부터 유래된 것이 아님을 확인하기 위해서 역전사 효소 부재 하에서 *Taq* DNA 폴리머라제 (Stratagene)를 가지고 음성 대조군을 실시하였다.

[0056] **결과**

[0057] **실험예 1: FK506 생합성 유전자 클러스터에 존재하는 잠정적인 조절 유전자의 서열 분석**

[0058] 약 83kb 거리에 걸친 26개 ORF를 포함하는 KCTC 11604BP 균주에서의 FK506 유전자 클러스터 서열 분석을 통해 3개의 잠정적인 조절 유전자인 *tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN*를 밝혔다 (도 2).

[0059] *tcs2* (155개의 아미노산 잔기) 및 *tcs7* (474개의 아미노산 잔기)로부터 추론된 산물은 각각 전사 조절인자의 AsnC 패밀리 멤버 및 LysR-타입 전사 조절인자와 높은 서열 유사성을 나타냈다. *fkbN* (923개의 아미노산 잔기)로부터 추론된 산물은 스트렙토마이세스의 폴리케티드 (polyketide) 생합성 유전자 클러스터에서 종종 발견되는 전사 조절인자의 LAL 패밀리 멤버와 높은 서열 유사성을 나타냈다. 대장균 말토오스 레귤론의 조절자인 MalT로 대표되는 이들 패밀리 멤버는 N-말단 ATP-결합 도메인 및 C-말단 LuxR-type HTH DNA 결합 도메인인 2 개의 독특한 도메인으로 특징지어 진다 (도 3의 A 및 B). ClustalX (버전 2) 및 GeneDoc 소프트웨어로 추론된 FkbN 아미노산 서열 분석 결과, N-말단 ATP 결합 도메인 또는 전형적인 Walker A 및 B 모티프 (도 3의 A) 및 LuxR 패밀리에 속하는 C-말단 HTH DNA 결합 도메인(아미노산, 869-896) (도 3의 B)인 2 개의 기능적 도메인이

존재함을 확인하였다.

[0060] 뿐만 아니라, FkbN의 BLAST 분석 결과, 알려진 스트렙토마이세스 LAL-타입 조절 단백질에 높은 동일성/유사성을 보여주었다: FK520 클러스터의 FkbN와 72/83%, RapH와 59/72%, PikD와 34/47%, GdmRII와 37/50%, TmcN과 34/43%, AveR과 32/44%. 이와 같은 FkbN 전사 조절자를 스트렙토마이세스 항생제 클러스터의 다른 LAL-패밀리 전사 조절자와 동일성/유사성을 비교하여 하기 표 4에 나타냈다.

표 4

[0061]

LAL 패밀리 멤버	아미노산 수	균주	항생제 클러스터	FkbN에 대한 아미노산 동일성/유사성 %
FkbN	913	*S. hygroscopicus* var *ascomycetecus*	FK520	72/83 (acc. no.AAF86399)
RapH	882	*S. hygroscopicus* NRRL 5491	rapamycin	59/72 (acc. no.X86780)
MonH	980	*S. cinnamonensis*	monensin	42/54 (acc. no. AF440781)
PikD	928	*S. venezuelae*	pikromycin	34/47 (acc. no.AF079139)
GdmRII	926	*S. hygroscopicus* NRRL 3602	geldanamycin	37/50 (acc. no. AY179507)
HbmRII	926	*S. hygroscopicus* AM-3672	herbimycin	36/50 (acc. no. AAY28234)
TmcN	1029	*Streptomyces* sp. *CK4412*	tautomycetin	34/43 (acc. no. ABI94385)
AveR	949	*S. avermitilis*	avermectin	32/44 (acc. no. NC_003155)

[0062] *fkbN* 유전자의 주목할 만한 하나의 특징은 몇몇 알려진 조절 유전자와 같이, 높은 GC 양을 갖는 스트렙토마이세스 게놈에서 극히 드문 코돈인 TTA 코돈을 포함하고 있다는 것이다. 다른 악티노마이세테스에서 2차 대사 및 세포 분화를 조절하는데 있어서 TTA 코돈이 관여된다는 것이 알려져 있으므로, FkbN은 FK506 생합성에 있어서 조절 역할을 할 것임을 알 수 있다.

[0063] **실험예 2: *tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN*의 과발현**

[0064] 3 개의 잠정적인 조절 유전자인 *tcs2*, *tcs7*, 및 *fkbN*의 기능을 조사하기 위해, 상기 유전자를 야생형 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP 균주에 도입한 후 과발현시켰다. 플라스미드 그 자체의 복수 카피의 존재에 의한 예상되지 않은 효과를 피하기 위해, 통합 발현 플라스미드 pSET152 기초로 과발현을 위한 pTCS2, pTCS7 및 pFKBN 벡터를 제작하였다 (표 1). 대조군으로 pSET152 (P_{ermE*}) 벡터를 야생형 균주에 도입시켰다. R2YE 배지에서 배양시 접합완료체 및 야생형 균주간의 FK506 생산 및 성장 또는 형태에서 차이가 없었다.

[0065] 스트렙토마이세스 속 KCTC11640BP 및 돌연변이 균주의 FK506 및 FK520 타이터를 하기 표 5에 나타냈다.

표 5

[0066]

항생제 타이터 (mg/ℓ)[a]	야생형 (WT)	WT/ pTCS2	WT/ pTCS2	WT/ pFKBN	Δtcs2	Δtcs7	ΔfkbN	ΔfkbN/ pTCS2	ΔfkbN/ pTCS7	ΔfkbN/ pFKBN
FK506	5.22±0.65	5.18±0.27	4.51±0.98	11.1±0.48	5.12±0.51	9.89±0.98	ND	ND	ND	5.24±0.71

FK520	0.65±0.06	0.61±0.03	0.59±0.08	1.39±0.04	0.61±0.08	0.97±0.82	ND	ND	ND	0.79±0.09

[0067] [a]표준 오차 값은 두번 반복 실험 결과이다; ND는 검출되지 않음.

[0068] 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, WT/pFKBN 균주의 FK506 생산량은 배양 5일 후 야생형 균주에서의 FK506 농도보다 약 2.1 배 높은 현저한 수준 (11.1 mg/ℓ)으로 증가하였다. 더욱이, FK506 생합성의 부산물로서 FK506 PKS의 모듈 4에 알릴말로닐-CoA (allymalonyl-CoA) 대신에 에틸말로닐-CoA (ethylmalonyl-CoA)를 잘못 병합시켜 생산된 FK520의 생산 수준도 야생형 균주와 비교하여 WT/pFKBN에서 약 2배 증가하였다. 이에 반해서, WT/pTCS7에서의 FK506 및 FK520의 농도는 야생형 균주에서 관찰된 것보다 약간 낮았다. *tcs2* 과발현은 FK506 또는 FK520 생산 수준에 어떠한 효과도 나타내지 않았다. 이것은 *tcs2* 결실이 FK506 또는 FK520의 생합성에 영향을 주지 않는다는 것은 시사한다.

[0069] 이와 같은 결과는, 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP에서의 FK506 및 FK520 생합성에서 FkbN은 양성적인 조절자로 중요한 역할을 하며, Tcs7은 음성적인 조절자로 역할을 하고, Tcs2는 아무런 역할을 하지 않는다는 것을 시사한다. 보다 구체적으로, 스트렙토마이세스 속 KCTC 11604BP의 FK506 생합성 클러스터에서 LAL 패밀리 조절자인 FkbN은 다른 LAL 패밀리 조절자에 대해서 보고된 바와 같이 FK506 생합성 유전자의 발현을 증가시켰다.

[0070] **실험예 3: 인-프레임 결실에 의한 *tcs7* 및 *fkbN*의 불활성화 및 결실 돌연변이의 상보성**

[0071] FK506 생합성에서 *tcs7* 및 *fkbN*의 조절 역할을 확인하고자, 이들 유전자를 임의의 극성 효과를 피하려고 인-프레임 결실로 불활성화시켰다. pKC1139을 사용하여 생성된 모든 인-프레임 결실 돌연변이는 서던 블롯팅으로 확인하였다 (도 4 내지 6). 돌연변이 균주 Δtcs2, Δtcs7, 및 ΔfkbN은 고체 ISP4 및 R2YE 플레이트에서 성장할 때 야생형 균주와 비교하여 형태학적 성질에서 어떠한 변화도 보여주지 않았다. 이에 반해서, Δtcs2 균주는 이전에 보고된 바와 같이 FK506 또는 FK520 생산에서 어떠한 변화도 보여주지 않음에도 불구하고, Δtcs7 균주는 야생형 균주와 비교하여 FK506 생산 수준이 약 1.9배 증가되었다 (표 5). 뿐만 아니라, Δtcs7 균주는 FK520 생산에서도 유사한 정도의 증가를 보여주었다. 이들 결과는 *tcs7*이 FK506 또는 FK520 생합성에 있어서 음성적인 조절자임을 나타내는 강한 증거를 제공한다. 특히, ΔfkbN 균주는 FK506 및 FK520를 생산할 수 없어서 (표 5), *fkbN*는 FK506 생합성 경로의 양성적 조절자로서 중요한 역할을 함을 제시한다.

[0072] *fkbN*의 불활성화가 FK506 및 FK520의 생산 제거에 직접적으로 책임이 있는지 여부를 확인하기 위해, ΔfkbN 균주에서 플라스미드-기반 상보성 실험을 pSET152(P_{ermE*})를 사용한 그들의 잠정적인 RBS 부위와 함께 *fkbN* 뿐만 아니라 *tcs2* 및 *tcs7*을 재도입하여 실시하였다. 3개의 상보성 플라스미드인 pTCS2, pTCS7, 및 pFKBN은 대장균 ET12567/pUZ8002로부터 ΔfkbN 균주로 옮겨졌다. HPLC 분석을 통해 FK506 및 FK520 생산성이 pFKBN를 포함하는 ΔfkbN 균주에서 야생형 균주에서 관찰되는 것과 비교할 만큼의 수준으로 복구됨을 확인하였다 (표 5). 이와 같은 결과는 *fkbN*의 부재가 ΔfkbN 균주에서 FK506 또는 FK520 생산성 상실의 유일한 원인임과 FkbN이 양성적인 조절자임을 증명한다. 예상되는 바와 같이, *tcs2* 및 *tcs7*의 과발현은 ΔfkbN 균주의 형질을 변형시키지 않았다.

[0073] FK506 생합성을 증가시키는 *fkbN*의 양성적인 역할 및 *tcs7*의 음성적인 역할을 보다 더 구체적으로 탐구하기 위해서, Δtcs7 균주에서 *fkbN* 유전자를 과발현시켰다 (Δtcs7/pFKBN). Δtcs7/pFKBN 균주의 배양액 추출물을 HPLC로 분석하였더니 야생형 균주에 존재하는 수준보다 더 높은 FK506 농도인, 약 4.0배 (21 mg/ℓ)의 현저한 증가를 나타냈다 (도 7의 A 및 B). R2YE 배지에서 야생형, Δtcs7, WT/pFKBN, 및 Δtcs7/pFKBN 균주의 FK506 생산 시간 코스는 약 5일째에 FK506의 최대 수준을 나타냈다 (도 7의 B). 더욱이, 균주 간의 세포 질량 또는 성장 속도에 있어서 차이점이 관찰되지 않았다. 이것은 *fkbN* 및 *tcs7*은 1차 대사 또는 세포 분화에 연관되지 않음을 시사하는 것이다. 결론적으로, 유전자 결실 및 자가 또는 교차 상보성 결과는 FK506 생합성에 있어서 *fkbN*가 양성적인 조절 유전자이고 *tcs7*은 음성적인 조절 유전자임을 나타냈다.

[0074] **실험예 4: 야생형, ΔfkbN, Δtcs7, 및 Δtcs7/pFKBN 균주에서 FK506 생합성 유전자 클러스터의 전사 분석**

[0075] 야생형, ΔfkbN, Δtcs7 및 Δtcs7/pFKBN 균주에서 *tcs1-tcs5*, *fkbJ* 및 *tcs6*를 제외하고 FK506 생합성 유전자 클러스터의 전사 분석을 반-정량 RT-PCR로 수행하였다. *fkbJ* 및 *tcs6*의 뉴클레오티드 서열은 너무 짧아 RT-PCR을 수행할 수 없었고, *tcs1-tcs5* 유전자는 FK506의 생합성에 관여하지 않음이 알려져 있기 때문에 제외하였다. FK506 생산 수준이 야생형 균주에서 현저하게 증가되기 시작할 때인 72시간 배양 후, 전체 RNA를 야생형 및 돌연변이 균주로부터 추출하여 RT-PCR에 의한 유전자 발현 분석을 위한 주형으로 사용하였다. RT-PCR의 프라이머는 FK506 생합성 유전자 내의 서열에 특이적이고 약 500bp의 cDNA를 생성하도록 디자인하였다 (표 3). RT-PCR 결과를 도 8에 나타냈다.

[0076] 그 결과, 야생형 균주에서, FK506 클러스터는 *tcs7*을 제외한 모든 유전자의 전사체가 72 시간째에 관찰되었고, 이는 *tcs7*의 사이렌싱 (silencing)이 FK506 생합성 시작보다 앞선다는 것을 시사한다. 이 때, ΔfkbN 균주에서, 매우 흐릿한 밴드로 관찰되는 *fkbQ* (타입 II 티오에스터라제)를 제외하고 조사되는 모든 유전자가 발현되지 않았다. 이것은 FK506 유전자 클러스터의 대다수의 유전자가 *fkbN*이 존재하지 않을 때 전사되지 않음을 시사하는 것이다. 이에 반해서, *fkbN*의 상류에 위치한 *fkbQ* 유전자는 FK506 유전자 클러스터 내에 존재함에도 불구하고 FkbN에 의해 조절되지 않았다. *tcs7* 전사체는 야생형 균주에서 관찰되는 바와 같이 ΔfkbN 균주에서 감지되지 않았고, 이것은 음성 조절 유전자인 *tcs7*의 발현은 양성 조절 유전자인 *fkbN*에 의존하지 않음을 시사하는 것이다. Δtcs7 균주에서는 양성 조절 유전자인 *fkbN*을 포함한 FK506 클러스터의 모든 유전자 발현 수준에서 현저한 증가가 있었다. 이것은 *tcs7*의 산물이 *fkbN*의 전사를 억제하며, Tcs7의 FK506 생합성에 대한 음성 효과가 경로-특이적 양성 조절자인 FkbN에 의해 매개됨을 시사한다. *fkbN*와 함께 FK506 생합성 유전자의 전사 레벨에서의 추가적인 증가는 Δtcs7/pFKBN 균주에서 일어났으며, 이것은 이 돌연변이 균주에서 FK506 생성의 현저한 증가와 일치한다.

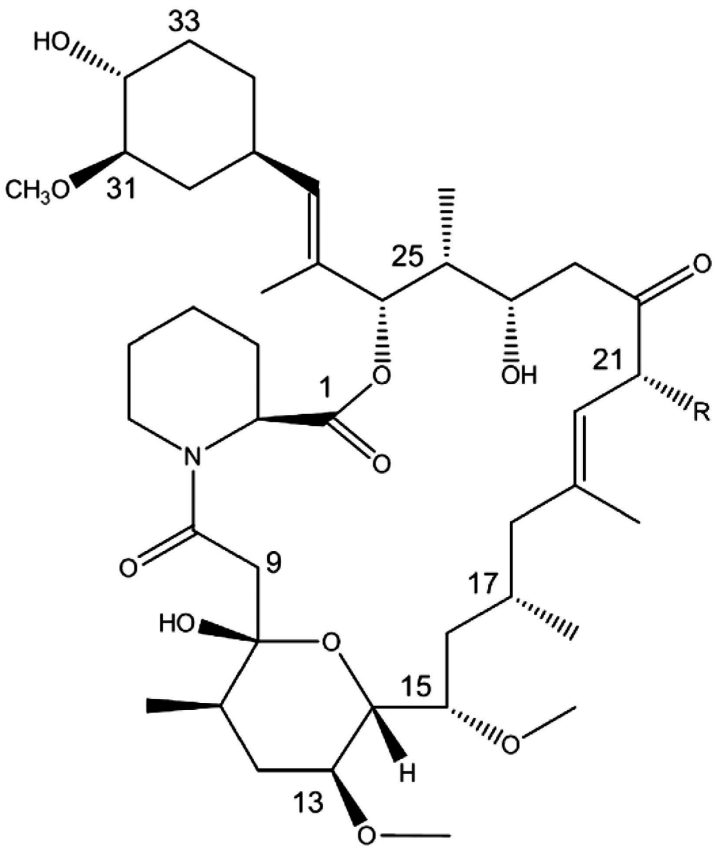
[0077] 결론적으로, 상기 전사 분석의 결과는 *fkbN*이 스트렙토마이세스 속 KCTC 111604BP에서 FK506 생합성에 대한 LAL 패밀리 경로-특이적 양성 전사 조절자를 코딩하며 Tcs7은 FkbN의 전사를 음성적으로 조절할 수 있음을 증명한다.

[0078] FkbN을 포함하는 다수의 LAL 패밀리 경로-특이적 양성 조절자는 2차 대사 산물의 생산에 있어서 중요한 역할을 하지만, 다른 모드의 조절을 가지고 있다. 상기 결과는 LAL 패밀리 조절자가 관여하는 새로운 모드의 조절을 제시한다. 즉, LysR-타입 음성적 조절자인 Tcs7은 LAL-타입 양성적 조절자인 FkbN을 조절할 수 있으며 이것은 그 다음 FK506 생합성 유전자를 활성화한다.

[0079] 본 발명은 정량적인 실시간 RT-PCR 또는 겔 지연 분석법과 같은 부가적인 실험에 의해 보다 상세한 조절 기작이 조사될 필요가 있음에도 불구하고, FK506 생합성을 다루는 조절 인자에 대한 이해를 제공한다. 뿐만 아니라, 음성적으로 조절하는 유전자가 결실된 조건에서 양성적으로 조절하는 유전자를 과발현하여 유전적으로 가공된 Δtcs7/pFKBN 균주에서 FK506의 현저한 생성증가(4.0 배까지)는 균주 개발에 대한 이들 연구의 잠재력을 증명하였다. 이들 결과가 야생형 균주를 사용하여 얻어졌음에도 불구하고, 이러한 전략을 상위의 산업적 균주에 적용한다면 보다 향상된 균주 개발을 가능하게 할 수 있다.

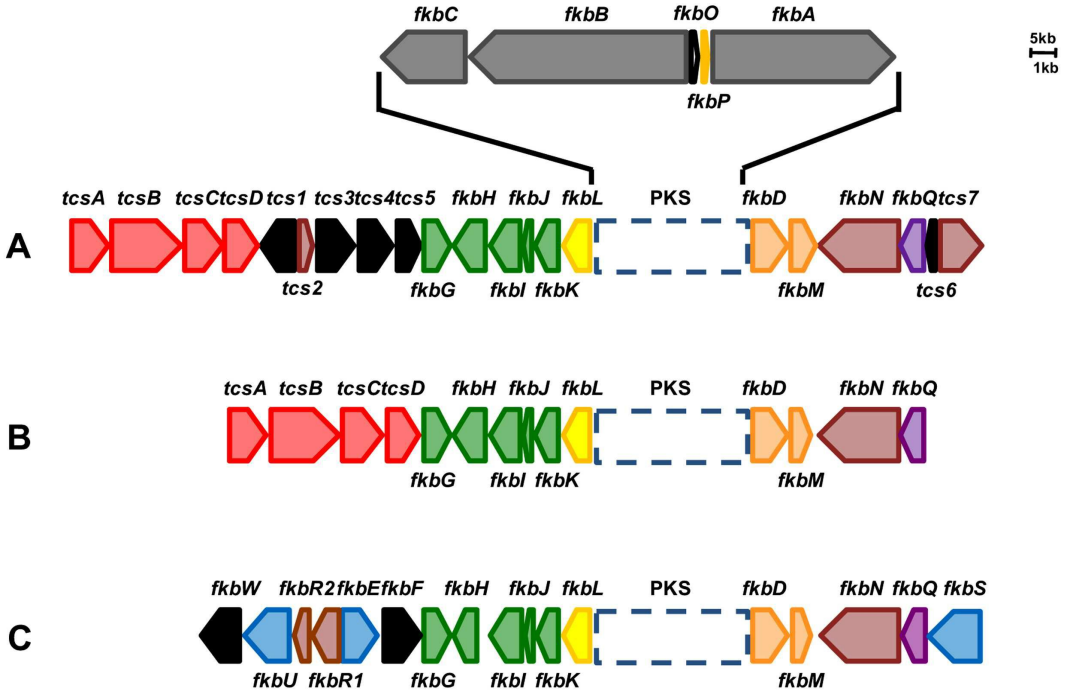
도면

도면1



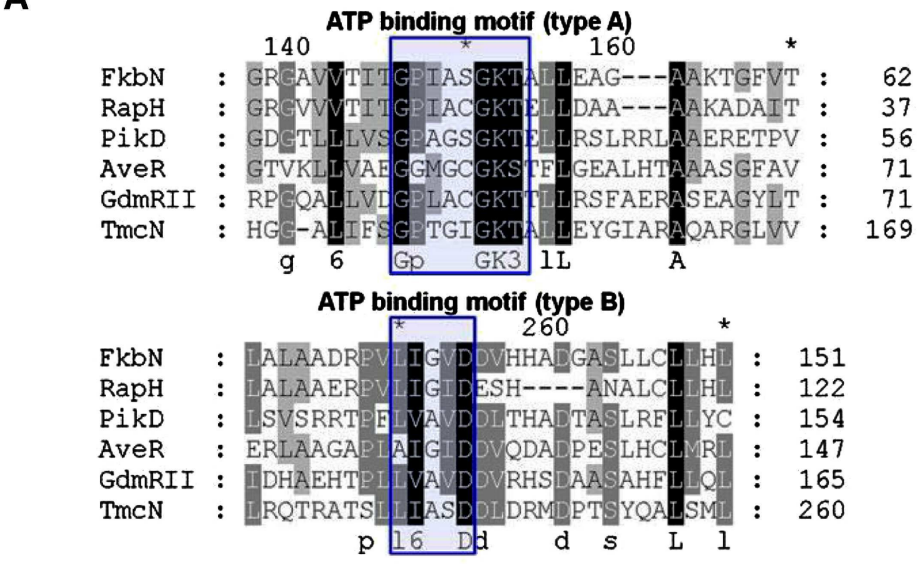
	R
FK506	$CH(CH_2)_2$
FK520	CH_2CH_3

도면2

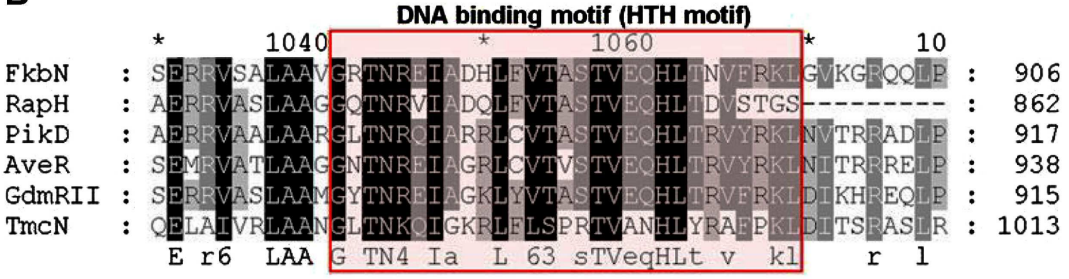

fkbC
fkbB
fkbO
fkbA
fkbP
5kb
1kb
A
tcsA tcsB tcsCtcsD tcs1 tcs3tcs4tcs5 fkbH fkbJ fkbL PKS fkbD fkbN fkbQtcs7
tcs2
fkbG fkbI fkbK
fkbM
tcs6
B
tcsA tcsB tcsCtcsD fkbH fkbJ fkbL PKS fkbD fkbN fkbQ
fkbG fkbI fkbK
fkbM
C
fkbW fkbR2fkbEfkbF fkbH fkbJ fkbL PKS fkbD fkbN fkbQ fkbS
fkbU fkbR1
fkbG fkbI fkbK
fkbM

도면3

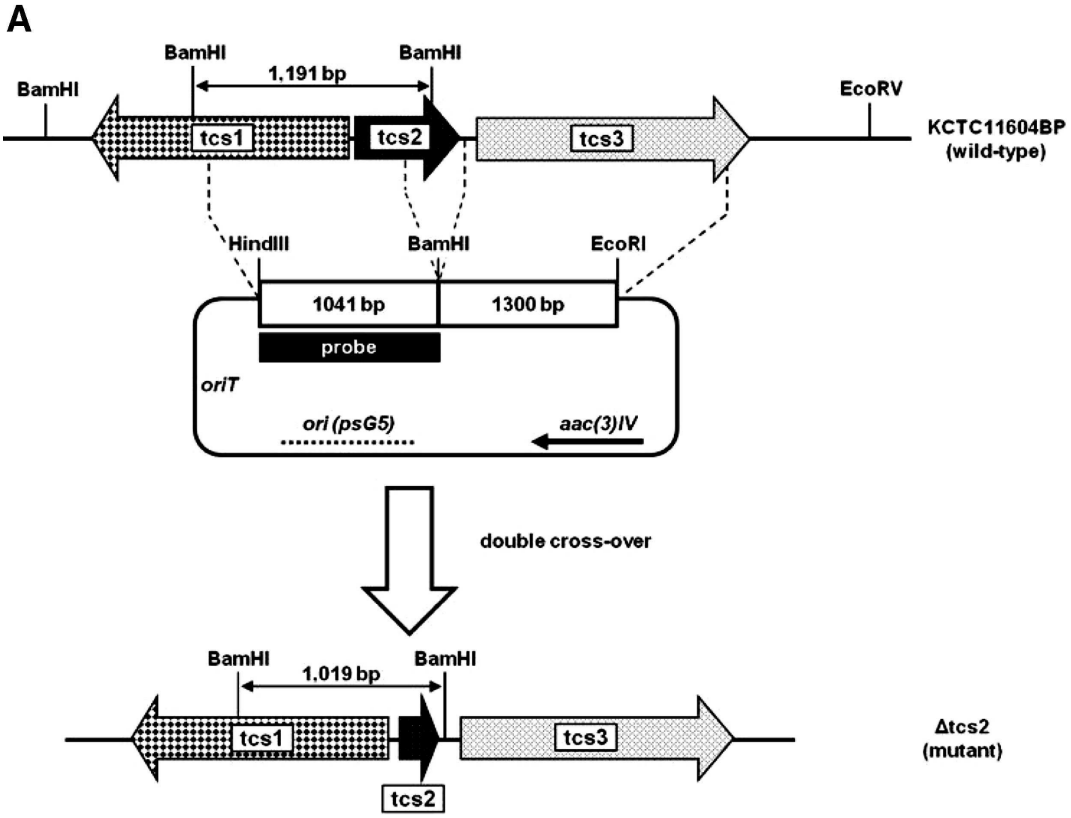
A

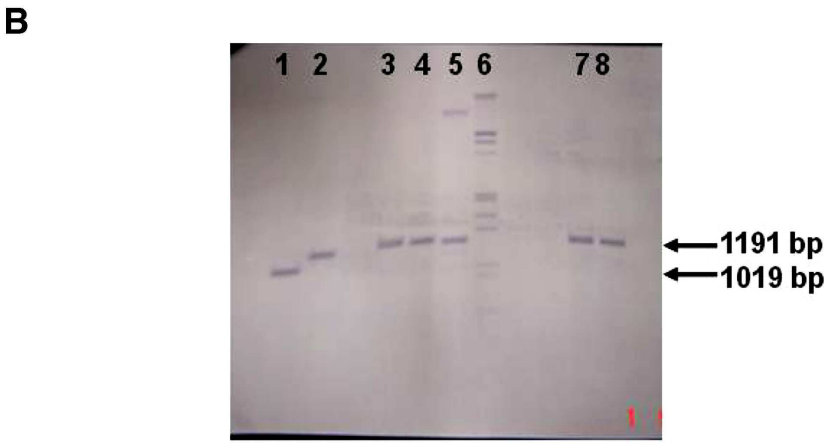

ATP binding motif (type A)
140 160
FkbN : GRGAVVTITGPIASGKTALLEAG---AAKTGFVT : 62
RapH : GRGVVVTITGPIACGKTELLDAA---AAKADAIT : 37
PikD : GDGTLLLVSGPAGSGKTELLRSLRRLAAERETPV : 56
AveR : GTVKLLVAEGGMGCGKSTFLGEALHTAAASGFAV : 71
GdmRII : RPGQALLVDGPLACGKTTLLRSFAERASEAGYLT : 71
TmcN : HGG-ALIFSGPTGIGKTALLEYGIARAQARGLVV : 169
g 6 Gp GK3 lL A
ATP binding motif (type B)
260
FkbN : LALAADRPVLIGVDDVHHADGASLLCLLHL : 151
RapH : LALAAERPVLIGIDESH----ANALCLLHL : 122
PikD : LSVSRRTPFLVAVDDLTHADTASLRFLLYC : 154
AveR : ERLAAGAPLAIGIDDVQDADPESLHCLMRL : 147
GdmRII : IDHAEHTPLLVAVDDVRHSDAASAHFLLQL : 165
TmcN : LRQTRATSLLIASDDLDRMDPTSYQALSML : 260
p l6 Dd d s L l

B

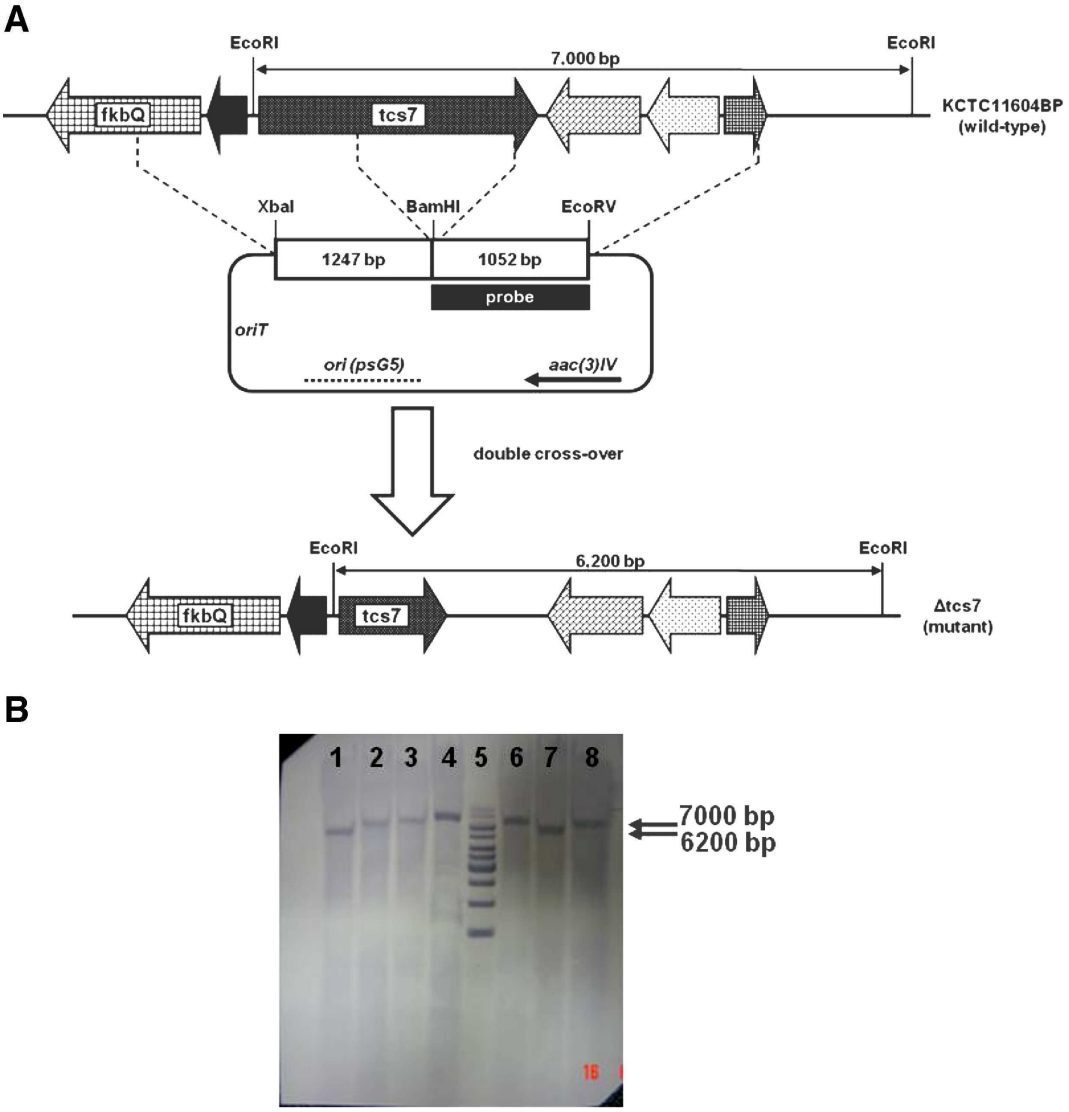

DNA binding motif (HTH motif)
1040 1060 10
FkbN : SERRVSALAAVGRTNREIADHLFVTASTVEQHLTNVFRKLGVKGRQQLP : 906
RapH : AERRVASLAAGGQTNRVIADQLFVTASTVEQHLTDVSTGS--------- : 862
PikD : AERRVAALAARGLTNRQIARRLCVTASTVEQHLTRVYRKLNVTRRADLP : 917
AveR : SEMRVATLAAGGNTNREIAGRLCVTVSTVEQHLTRVYRKLNITRRRELP : 938
GdmRII : SERRVASLAAMGYTNREIAGKLYVTASTVEQHLTRVFRKLDIKHREQLP : 915
TmcN : QELAIVRLAANGLTNKQIGKRLFLSPRTVANHLYRAFPKLDITSRASLR : 1013
E r6 LAA G TN4 Ia L 63 sTVeqHLt v kl r l

도면4

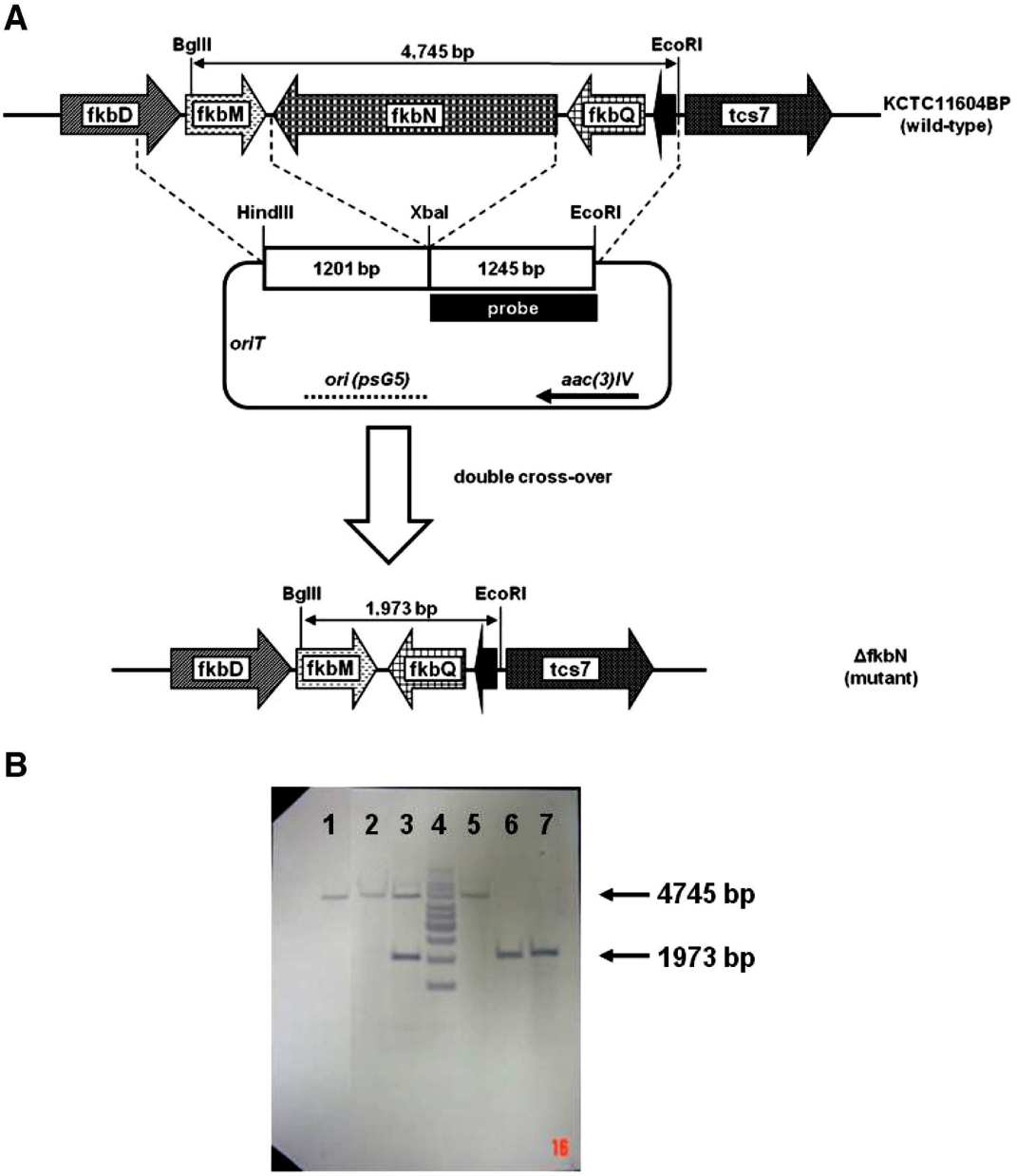

A
BamHI
BamHI
1,191 bp
BamHI
EcoRV
tcs1
tcs2
tcs3
KCTC11604BP
(wild-type)
HindIII
BamHI
EcoRI
1041 bp
1300 bp
probe
oriT
ori (psG5)
aac(3)IV
double cross-over
BamHI
1,019 bp
BamHI
tcs1
tcs3
tcs2
Δtcs2
(mutant)


B
1 2 3 4 5 6 7 8
1191 bp
1019 bp

도면5


A
EcoRI
7,000 bp
EcoRI
fkbQ
tcs7
KCTC11604BP
(wild-type)
XbaI
BamHI
EcoRV
1247 bp
1052 bp
probe
oriT
ori (psG5)
aac(3)IV
double cross-over
EcoRI
6,200 bp
EcoRI
fkbQ
tcs7
Δtcs7
(mutant)
B
1 2 3 4 5 6 7 8
7000 bp
6200 bp

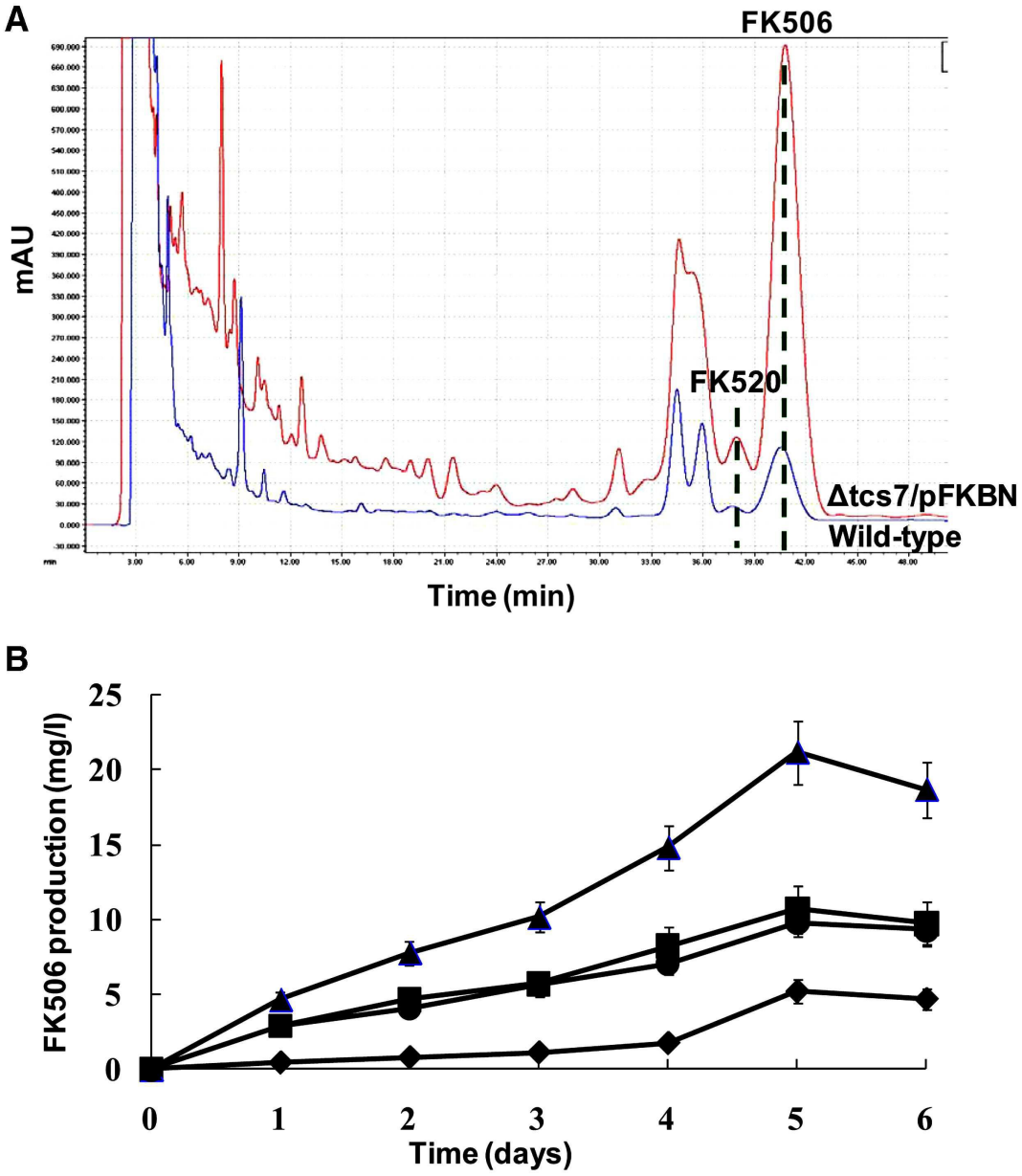
도면6


A
BglII
4,745 bp
EcoRI
fkbD
fkbM
fkbN
fkbQ
tcs7
KCTC11604BP
(wild-type)
HindIII
XbaI
EcoRI
1201 bp
1245 bp
probe
oriT
ori (psG5)
aac(3)IV
double cross-over
BglII
1,973 bp
EcoRI
fkbD
fkbM
fkbQ
tcs7
ΔfkbN
(mutant)

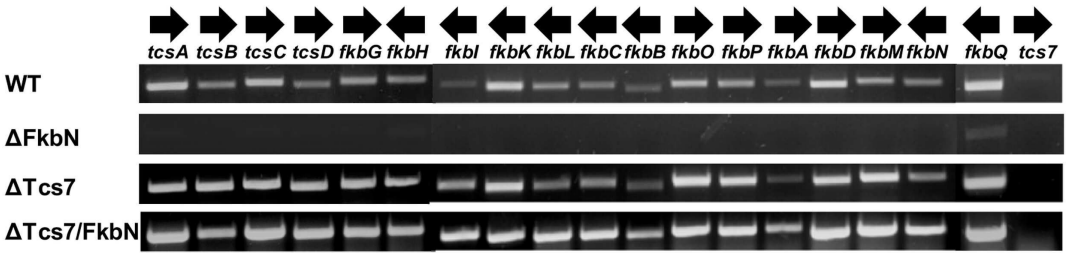
B

1 2 3 4 5 6 7
4745 bp
1973 bp

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation

<120> Microorganism having enhanced FK506 or FK520 productivity and method of producing FK506 or FK520 using the same

<130> PA110714/KR

<160> 66

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs 7

<400> 1

Met Phe Arg Arg Phe Ser Ala Val Thr Arg Gly Asn Pro Ile Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ala Gly Gly Gly His Glu Gly Gly Ala Pro Gly Arg Leu Arg Pro
20 25 30

His Pro Gly Arg Arg Pro Pro Glu Arg Arg Ala Gly Cys Arg Arg Ala
35 40 45

His Arg His Leu Arg Phe Leu Ile Arg Pro Ala Thr Leu Thr Ser Phe
50 55 60

Pro Ala Gly Arg Arg Arg Gly Gln Tyr Ile Met Leu Met Val Pro Ile
65 70 75 80

Ser Arg Gly Asp Ala Gly Pro Val Ile Leu Gly Asn Val Leu Pro Ser

85 90 95

Pro Val Glu Arg Arg Ala Thr Ala Arg Ala Ala Ala Asp Asn Val His
100 105 110

Ala Ala Leu Gln Arg Gln Asp Pro Ser Pro Ser Cys Pro Val Pro Ala
115 120 125

Pro Val Arg Arg Gly Gly Arg Arg Pro Pro Pro Gly Ser Val Pro Tyr
130 135 140

Arg Arg Arg Ala Pro Val Arg Thr Trp Pro Val Ala Ser Leu Pro Ala
145 150 155 160

Met Glu Leu Arg Thr Leu Glu Tyr Phe Val Ala Val Ala Glu Glu Arg

165 170 175

Ser Phe Thr Arg Ala Ala Ala Arg Cys His Val Val Gln Pro Ala Ile

180 185 190

Ser Gln Arg Ile Arg Ala Leu Glu Lys Glu Leu Gly Glu Pro Leu Phe

195 200 205

Glu Arg Leu Pro Arg Gln Val Val Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ala Leu

210 215 220

Leu Pro His Ala Arg Ala Cys Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Leu

225 230 235 240

Glu Phe Ala Asp Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Thr Leu Val Leu Gly

245 250 255

Thr Ala Gly Gly Leu Glu Gly Thr Ser Val Pro Arg Leu Leu Gly Glu

260 265 270

Tyr His Arg Arg Tyr Pro Gly Val Gln Val Arg Leu Thr Gly Ala Pro

275 280 285

Ser Pro Val Leu Met Ala Gln Ala Arg Ser Gly Glu Ile Asp Ala Ala

290 295 300

Val Ile Ala Glu Pro Pro Gly Gly Leu Pro His Gly Leu Gly Ser Arg

305 310 315 320

Cys Leu Leu Glu Asp Arg Phe Val Ala Val Leu Pro Ala Gly Thr Arg

325 330 335

Asp Pro Asp His Pro Met Thr Leu Ala Glu Ala Ala Arg Cys Pro Leu

340 345 350

Ile Gly Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Ala His Ala Phe Val Arg Asp Ala

355 360 365

Phe Ala Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asp Ile Ala Tyr Ala Thr Ala Asp

370 375 380

Ile Ala Leu Gln Val Thr Leu Val Ala Glu Gly Ile Gly Ile Ala Leu

385 390 395 400

Thr Ser Tyr Thr Asn Pro Leu Leu Arg Leu Asp Gln Arg Ile Val Val

405 410 415

Val Pro Leu Glu Pro Ala Ile Arg Leu Arg Lys Val Leu Ala Trp Arg

420 425 430

Leu Gly Asn Arg Pro Gly Pro Pro Leu Arg Ala Phe Leu Asp Leu Leu

435 440 445

Thr Glu Leu Pro His Thr Thr His Pro Thr Ser Ala Thr Ala Glu Ala

450 455 460

Pro Gln Asp Pro Gln Pro Ala Pro Gln Asp

465 470

<210> 2

<211> 1425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tcs7

<400> 2

atgtttcgac gtttttctgc ggtcacccgg ggcaacccaa ttcagctgcc ggccggcgga 60

gggcatgagg gcggggcacc cggacgtctc cggccgcatc cgggccgacg gccaccggag 120

cggcgcgccg gctgtcgacg ggcgcatcgg catctgcgtt tcctgatccg tccggccacg 180

ttgacgagtt ttcccgccgg gcggcggcga ggccaataca tcatgctgat ggtgcccatc 240

agcaggggtg atgcgggtcc ggtgatcctt gggaacgtcc tgccttcccc ggtggaacgc 300

cgcgcgacgg cgcgtgccgc cgccgacaat gtccacgcgg cacttcaacg tcaagaccct 360

tcaccatcct gcccggtacc cgccccggtg cgccggggag ggcgtcgtcc gcccccggga 420

agcgtcccgt accggcggcg ggccccggtc cggacctggc cggttgctag cctcccggcc 480

atggagttac gcaccctgga gtacttcgtc gccgttgccg aggaacggtc cttcaccagg 540

gcggccgcgc gctgccatgt cgtccagccc gcgatcagcc agcggatccg ggccctggag 600

aaggagctgg gcgagcccct cttcgaacgg ctgccccggc aggtggtgct cacctccggc 660

ggcgccgcgc tgctgccgca cgcgcgggcc tgtctggcgg cggcagccgc ggcctccctg 720

gagttcgccg accggtccgg cctcctcagc ggcacgctgg tgctggggac cgccggcggc 780

ctggagggca cctccgtacc ccggctgctc ggtgagtacc accgccgcta tccgggagtg 840

caggtacgtc tcaccggggc gcccagcccc gtgctgatgg cgcaggcccg cagcggggag 900

atcgacgccg cggtgatcgc ggaacctccg gggggcctgc cgcacggcct cggttcacgg 960

tgcctcctgg aggaccgctt cgtcgcggtg ctgcccgccg gaacccggga cccggaccat 1020

cccatgaccc tcgccgaggc ggcccgctgc cccctcatcg gctacggctc cggcagcgga 1080

gcgcacgcct tcgtccggga cgccttcgcg gcacagggcc tgcaactgga catcgcctat 1140

gcgaccgccg acatcgccct ccaggtgacg ctggtggccg aggggatcgg catcgccctg 1200

acctcgtaca cgaacccgct gctccggctg gaccaacgga tcgtcgtggt accgctggag 1260

cccgcgatcc ggctgcggaa ggtgctcgcc tggcggctcg ggaaccgtcc ggggccaccg 1320

ttacgggcct tcctcgacct gctgacggag ctgccccaca ccacgcatcc gaccagcgcg 1380

accgcagagg ccccgcagga ccctcaaccc gccccacagg actga 1425

<210> 3

<211> 923

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN

<400> 3

Met Val Pro Glu Val Arg Ala Ala Pro Tyr Glu Leu Ile Ala Arg Asp
1 5 10 15

Asp Glu Leu Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Ser Gly Ala Glu Ser Gly
20 25 30

Arg Gly Ala Val Val Thr Ile Thr Gly Pro Ile Ala Ser Gly Lys Thr
35 40 45

Ala Leu Leu Glu Ala Gly Ala Ala Lys Thr Gly Phe Val Thr Leu Arg

50 55 60

Ala Val Cys Ser Met Glu Glu Arg Ala Leu Pro Tyr Gly Met Leu Gly
65 70 75 80

Gln Leu Phe Asp His Pro Glu Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gly Leu Ala
85 90 95

Arg Leu Thr Ala Ser Cys Glu Gly Pro Pro Ile Gly Thr Asp Asn Arg
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Phe Thr Arg Thr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Asp Arg
115 120 125

Pro Val Leu Ile Gly Val Asp Asp Val His His Ala Asp Gly Ala Ser
130 135 140

Leu Leu Cys Leu Leu His Leu Ala Arg Arg Ile Gly Pro Ala Arg Ile
145 150 155 160

Ser Ile Val Leu Thr Glu Leu Arg Arg Pro Thr Pro Ala Asp Ser Arg
165 170 175
Phe Gln Ala Glu Leu Leu Ser Leu Arg Ser Tyr Gln Glu Ile Ala Leu
180 185 190
Arg Pro Leu Asn Glu Thr Glu Ser Ala Glu Leu Val Arg Arg His Leu

195 200 205
Gly Arg Asp Thr His Asp Asp Val Leu Ala Glu Thr Phe Arg Ala Thr
210 215 220
Gly Gly Asn Leu Leu Leu Gly His Gly Leu Ile Asn Asp Ile Arg Glu
225 230 235 240
Ala Arg Ala Thr Gly Arg Pro Glu Ala Val Ala Gly Arg Ala Tyr Arg
245 250 255
Leu Ala Tyr Leu Gly Ser Leu Tyr Arg Cys Gly Pro Thr Ala Leu His
260 265 270

Ile Ala Arg Ala Ala Ala Val Leu Gly Ala Ser Ala Glu Pro Val Leu
275 280 285
Val Gln Arg Met Thr Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Glu Gln Val Cys
290 295 300
Glu Gln Leu Gln Asp Gly Arg Leu Leu Gln Asp Gly Arg Phe Pro His
305 310 315 320
Pro Glu Ala Arg Ser Ile Val Leu Asp Asp Leu Ser Ala Leu Asp Arg
325 330 335
Arg Asn Leu His Glu Ser Ala Leu Glu Leu Leu Arg Asp His Gly Val

340 345 350
Ala Gly Asn Val Leu Ala Arg His Gln Ile Gly Thr Gly Arg Val His
355 360 365
Gly Ala Asp Ala Val Glu Leu Phe Thr Glu Ala Ala Arg Glu His Leu
370 375 380
Leu Arg Gly Glu Leu Glu Asp Ala Val Gly Tyr Leu Glu Leu Ala His
385 390 395 400
Arg Ala Cys Asp Asp Pro Val Ile Arg Ala Ala Leu Arg Ile Gly Ala

405 410 415

Ala Glu Val Glu Arg Ile Cys Asp Pro Met Arg Ala Gly Arg His Leu
420 425 430
Pro Glu Leu Leu Thr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Ser Gly Glu His
435 440 445
Ala Val Ser Leu Ala Asp Trp Leu Ala Met Gly Gly Arg Pro Gly Glu
450 455 460
Ala Ala Glu Val Leu Ala Thr Gln His Pro Ala Ala Gly Asp Asp Gln
465 470 475 480
Ser Arg Ala Leu Leu Leu Val Gly Glu Leu Ser Leu Ala Leu Val His

485 490 495
Pro Gly Arg Ser Asp Pro Ser Arg Arg Ala Asp Phe Phe Ala Ala Gly
500 505 510
Gly Leu Ala Ala Leu Arg Gly Pro Ala Arg Gln Arg Ala Val Ala Asp
515 520 525
Lys Ala Val Val Ala Ala Leu Arg Gly Arg Pro Glu Leu Ala Asp Ala
530 535 540
His Ala Glu Arg Val Leu Gln Tyr Thr Asp Ala Thr Ala Asp Arg Thr
545 550 555 560

Thr Ala Met Met Ala Leu Leu Ala Val Leu Tyr Ala Glu Asn Thr Glu
565 570 575
Ala Val Gln Phe Trp Val Asp Arg Leu Ala Gly Asp Lys Glu Thr Arg
580 585 590
Thr Pro Ala Asp Glu Ala Ile Tyr Ala Gly Phe Gly Ala Glu Thr Ala
595 600 605
Leu Arg Arg Gly Asp Leu Thr Thr Ala Val Ala Tyr Gly Glu Ala Ala
610 615 620
Leu Gly Gln Gly Leu Val Pro Thr Trp Gly Met Ala Ala Thr Leu Pro

625 630 635 640
Leu Ser Ser Thr Val Val Ala Ala Ile Arg Leu Gly Asp Ile Glu Arg
645 650 655

Ala Asp Arg Trp Leu Ser Glu Pro Leu Pro Gln Glu Thr Ser Glu Ser
660 665 670
Leu Phe Gly Leu His Leu Leu Trp Ala Arg Gly Arg Tyr His Leu Ala
675 680 685
Thr Gly Arg His Arg Ala Ala Tyr Ala Leu Phe Arg Glu Cys Gly Asp
690 695 700

Arg Met Arg Gln Trp Ala Val Asp Val Pro Gly Leu Val Leu Trp Arg
705 710 715 720
Val Asp Ala Ala Glu Ala Leu Leu Met Leu Gly Thr Asp Arg Ala Glu
725 730 735
Gly Leu Arg Leu Ile Ser Asp Gln Met Ser Arg Pro Met Arg Ser Arg
740 745 750
Ser Arg Ala Leu Thr Leu Arg Val Gln Ala Ala Tyr Ser Pro Leu Pro
755 760 765
Lys Arg Ile Asp Leu Leu Glu Glu Ala Ala Asp Leu Leu Val Thr Cys

770 775 780
Asn Asp Gln Tyr Glu Leu Ala His Val Leu Ser Asp Leu Gly Glu Ala
785 790 795 800
Leu Asn Leu Val Arg Gln His Asn Arg Ala Arg Gly Leu Ile Arg Arg
805 810 815
Ala Arg Tyr Leu Ala Thr Gln Cys Gly Ala Ala Pro Leu Leu Leu Arg
820 825 830
Leu Gly Ala Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Ala Trp Asp Ala Thr Leu
835 840 845

Gly Gln Arg Ile Thr Ser Leu Thr Glu Ser Glu Arg Arg Val Ser Ala
850 855 860
Leu Ala Ala Val Gly Arg Thr Asn Arg Glu Ile Ala Asp His Leu Phe
865 870 875 880
Val Thr Ala Ser Thr Val Glu Gln His Leu Thr Asn Val Phe Arg Lys
885 890 895
Leu Gly Val Lys Gly Arg Gln Gln Leu Pro Arg Glu Leu Ala Asp Val
900 905 910

Ser Glu Pro Ala Gly Arg Gly Asp Arg Cys Gly

915 920

<210> 4

<211> 2771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fkbN

<400> 4

ctacccgcac cggtcgcccc ggcccgccgg ctcgctgacg tcggccagtt ccctcggaag 60

ctgctggcgg cccttcactc ccagcttgcg gaacacgttc gtgaggtgct gctccacggt 120

actggccgtg acgaacagat ggtcggctat ctccctgttc gtacgcccca cggcggcgag 180

tgcggacacc cgccgctccg actccgtcag tgaggtgatg cgctgtccca gcgttgcgtc 240

ccaggcaccg ccgaggtccg acggttcgcg ccgagcctca gcagcagcgg cgccgcaccg 300

cactgggtcg ccaggtaccg tgccctgcgg atcaggcccc gtgcccggtt gtgctgtctg 360

accaggttga gcgcctcgcc caggtcactg aggacatggg ccagttcgta ctggtcattg 420

caggtgacga ggaggtcggc tgcttcttcg agcaggtcga tccgcttggg cagtggactg 480

taggccgcct gcacccgcag ggtcagggcg cgtgaccggg accgcatcgg ccgggacatc 540

tggtcggata tgagccggag tccttcggcg cggtcggtgc cgagcatcag cagcgcctcg 600

gcggcgtcga cccgccagag caccaggccc ggcacgtcga cggcccactg ccgcatccgg 660

tccccgcact ccctgaacag tgcgtacgcc gcccggtgcc gcccggtcgc gaggtggtac 720

cgcccccggg cccagagcag atgcagcccg aagaggctct ccgaggtctc ctgcggcaac 780

ggctcggaga gccaccggtc ggcccgttcg atatcgccga gtcggatcgc cgcaaccacg 840

gtgctgctca gcggcagcgt ggccgccatt ccccaggtgg gcaccagccc ctggccgagg 900

gccgcctcgc cgtaggcgac ggcggtggtc aggtcgccgc ggcgcagggc ggtctcggcg 960

ccgaacccgg cgtagatcgc ctcgtcggcc ggggtgcgag tctccttgtc accggccagt 1020

ctgtcgaccc agaactggac ggcctcggtg ttctcggcgt agagcacggc cagcagcgcc 1080

atcatggccg tggtccggtc cgccgtggcg tctgtgtact ggaggacccg ctcggcatgg 1140

gcgtccgcca gctccggccg gcctcgcagc gcggcgacga cggccttgtc tgcgaccgcg 1200

cgctgccggg ccgggccacg gagggcggcg agcccgcccg cggcgaagaa gtcggccctg 1260

cgcgaaggat ccgatctgcc gggatggacc agcgcgaggg ataactcccc tacgagcagc 1320

agcgcacggc tctggtcgtc ccctgccgcg gggtgctggg tcgccagcac ttcggccgcc 1380

tcccccggcc gcccgcccat cgccagccag tcggcgaggg acacggcatg ctcgccggag 1440

agcagtcccg cgcgcgccgc ggtgagcagc tccggcagat gtcggccggc cctcatcgga 1500

tcgcagatgc gttcgacctc ggcggccccg atgcgcagcg cggcccgtat gacggggtcg 1560

tcgcaggcgc ggtgggcgag ctccagatat ccgaccgcat cctccagttc gccgcgcaga 1620

agatgctccc gcgcggcctc ggtgaacagt tcgaccgcgt ccgcgccgtg cacccggccg 1680

gtgcctatct ggtgacgggc gagcacattg ccggccacgc cgtggtcccg cagcagttcc 1740

agtgcggact cgtgcaggtt ccggcggtcg agggccgaca ggtcgtcgag gacgatggac 1800

cgggcctccg ggtgcggaaa ccgtccgtcc tgcagcagcc gtccgtcctg cagctgttcg 1860

cagacctgct cgaaggcttc cgtgttgagg ccggtcatcc gctggacgag tacgggttcg 1920

gcgctcgcgc cgagtaccgc ggccgcccgg gcgatgtgca atgccgtcgg gccgcaccgg 1980

tagagggagc ccaggtaggc gagccggtac gccctgcccg ccacggcctc cgggcgcccc 2040

gtggcccgcg cctcccggat gtcgttgatc aggccgtgcc cgaggagcag gttgcctccg 2100

gtcgcccgga acgtctcggc aaggacgtcg tcgtgggtgt cccggccgag gtggcggcgg 2160

acgagttcgg cgctctccgt ctcgttgagg ggccgcagcg ctatctcctg gtaggagcgg 2220

aggctcagca gttccgcctg gaatcgggag tcggccggtg tcgggcggcg gagctcggtc 2280

agcacgatgg agatacgggc cgggccgatc cggcgcgcga ggtgcagcag acagagcagc 2340

gatgcgccgt cggcatggtg cacgtcgtcg acgcctatca gaacgggccg gtccgcggcg 2400

agcgccagca gggtccgggt gaactcggcc cgcagccggt tgtcggtgcc gatcggcggg 2460

ccctcgcacg aggccgtgag ccgggcgaga cccggcgccc gggcggccgg ctcgggatgg 2520

tcgaagagct ggccgagcat cccgtagggc agggcacgct cctccatgga gcacacggcg 2580

cgaagggtga cgaagccggt cttggccgct ccggcctcca gcagtgccgt cttgccgctg 2640

gcgatcggcc cggtgatggt gacgacggca ccccgtccgc tttccgcgcc ggagagtgcc 2700

cggtggagac ggctcagctc gtcgtcacga gcgatcagtt cataaggggc tgctcgcact 2760

tccggaacca c 2771

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs2_OF primer

<400> 5

ggaccagatc tatctcgcac tacattcgg 29

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs2_OR primer

<400> 6

gaatctctag actagcccgg agtcag 26

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs7_OF primer

<400> 7

ggaccagatc tcgtccggtg atggaattct g 31

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs7_OR primer

<400> 8

gaatctctag aggattctca gtcctgtggg gcg 33

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_OF primer

<400> 9

aaattagatc tcatggagac gacggccgcg a 31

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_OR primer

<400> 10

gttattctag actacccgca ccggtcg 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs7_LF primer

<400> 11

ggtctctaga agttcgaacg cgagcgt 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs7_LR primer

<400> 12

gttggatccg acgaagtact ccagggt 27

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs7_RF primer

<400> 13

gttagatctg accctcaacc cgccc 25

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs7_RR primer

<400> 14

gctgatatca tctctagagt ccccgcc 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_LF primer

<400> 15

gttaagcttt gcacaacccg atctgat 27

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_LR primer

<400> 16

attatatcta gaccgccccc ggcg 24

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_RF primer

<400> 17

atttattcta gactcgcggc cgtcgtc 27

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_RR primer

<400> 18

gccgaattcg tgccgtcatt tggtcg 26

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsA_RTF primer

<400> 19

gggagcgctt cttctactcc 20

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsA_RTR primer

<400> 20

agggagtcga caccgagat 19

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsB_RTF primer

<400> 21

ggactgttac ccgacgactg 20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsB_RTR primer

<400> 22

cgatgaccca gtcgacatc 19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsC_RTF primer

<400> 23

ctaccgtcag ctggtgtcc 19

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsC_RTR primer

<400> 24

catatgtgac ccgatgatgc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsD_RTF primer

<400> 25

agagagtgtg cggatcgtct 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TcsD_RTR primer

<400> 26

gtcggagaac gacacctgat 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs1_RTF primer

<400> 27

acactgacgg agaccgacat 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs1_RTR primer

<400> 28

gacctcgaag gacacgattg 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs2_RTF primer

<400> 29

aaaaggttgt cctggattcg 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs2_RTR primer

<400> 30

gaatacgagg tgggtctcca 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs3_RTF primer

<400> 31

aacatgttca ccgcctatgg 20

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs3_RTR primer

<400> 32

agcagggtgt cgacgagtt 19

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs4_RTF primer

<400> 33

ggtcaccttc catctctcca 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs4_RTR primer

<400> 34

ggccgtatat ctccttgctg 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs5_RTF primer

<400> 35

ctcggtatgg gacatcgaac 20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tcs5_RTR primer

<400> 36

gtgacgtatc cgccctctt 19

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbG_RTF primer

<400> 37

tacgtccgga aggtgtcact 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbG_RTR primer

<400> 38

tagtaggccg gatagcgttc 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbH_RTF primer

<400> 39

ctgggatctg gacaacacct 20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbH_RTR primer

<400> 40

atccggcctg gtacatgag 19

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbI_RTF primer

<400> 41

cgcgagacct atctgaagga 20

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbI_RTR primer

<400> 42

gaactgttgc cggctcttc 19

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbK_RTF primer

<400> 43

cacttcatga acccgtcgta 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbK_RTR primer

<400> 44

caccggaaca cctcttcgta 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbL_RTF primer

<400> 45

gtcatcgagt tcatgccgta 20

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbL_RTR primer

<400> 46

gatgtgacgg tgctcagga 19

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbO_RTF primer

<400> 47

ggtatcacct gcgtgttcct 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbO_RTR primer

<400> 48

actccttcga tctccacgag 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbP_RTF primer

<400> 49

gcctacgcga tctacacctc 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbP_RTR primer

<400> 50

ggaccgtagt ggttgtggac 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbD_RTF primer

<400> 51

acagcagatg gtcggctact 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbD_RTR primer

<400> 52

gagaccctcg ttcatcggta 20

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbM_RTF primer

<400> 53

gacggtctcg cacatcaac 19

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbM_RTR primer

<400> 54

gtctcgatct cttcgctcgt 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_RTF primer

<400> 55

gagcagcccc ttatgaactg 20

<210> 56

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbN_RTR primer

<400> 56

gaggtgcagc agacagagc 19

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbQ_RTF primer

<400> 57

gctgttcgga cacagtatgg 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbQ_RTR primer

<400> 58

acttgttcct ggtgctcgac 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbR_RTF primer

<400> 59

tcaagaccct tcaccatcct 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbR_RTR primer

<400> 60

gtacctgcac tcccggatag 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbA_RTF primer

<400> 61

ggtgagaagg tcctgatcca 20

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbA_RTR primer

<400> 62

ctgctcatcc agccgaac 18

<210> 63

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbB_RTF primer

<400> 63

catgggcctg aaactgatg 19

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbB_RTR primer

<400> 64

agacgttgtc gacctgtgc 19

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbC_RTF primer

<400> 65

ggagggatgg acgtttcc 18

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FkbC_RTR primer

<400> 66

aggagtcggg tgatgatctg 20