



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0131041
(43) 공개일자 2020년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/36 (2006.01) C07K 7/64 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/36 (2013.01)
C07K 7/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0055745
(22) 출원일자 2019년05월13일
심사청구일자 2019년05월13일

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
오동찬
서울특별시 강남구 개포로110길 15, 112동 703호 (일원동, 우성7차 아파트)
두영은
서울특별시 관악구 신림로 76, 씨에치1 502호 (뿔면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

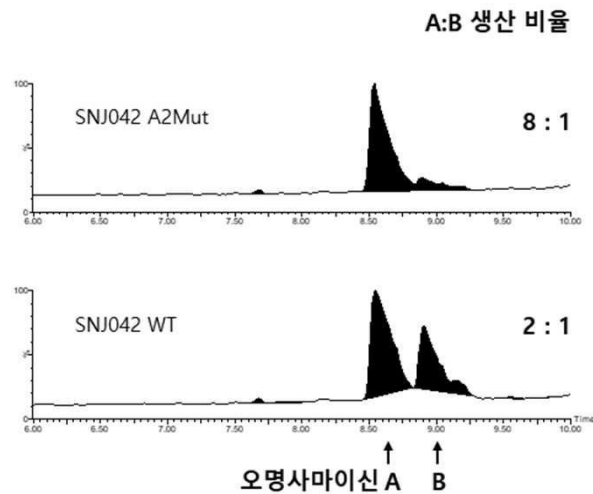
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주 및 이를 이용한 오명사마이신 A의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주 및 이를 이용한 오명사마이신 A의 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 수율이 향상된 오명사마이신 A를 대량 생산함으로써 산업상 이용 또는 신약 개발을 위한 연구 등에 널리 활용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 15/76 (2013.01)

(72) 발명자

신연혁

서울특별시 관악구 신림로 3가길 40-30, 405호

신중현

서울특별시 서초구 방배천로18길 11, 103동 407호
(방배동, 롯데캐슬아르떼아파트)

윤여준

서울특별시 강남구 압구정로 113 (압구정동, 미성아파트) 25동 506호

김은지

서울특별시 서대문구 신촌로 215-2 803호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525008272
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	포스트게놈 다부처 유전체 사업
연구과제명	유용 해양미생물 유전체정보 분석 및 활용기반 구축
기 여 율	40/100
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2018.09.01 ~ 2019.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525007649
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	미래해양산업기술개발사업
연구과제명	생명공학적 방법을 활용한 해양 미생물 유래 생리활성 천연물의 대량생산 및 신약

소재 개발 연구

기 여 율	30/100
과제수행기관명	(주)인트론바이오테크놀로지
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711087511
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구실지원사업
연구과제명	특이 환경 미생물 유래 생리활성물질 기초연구실
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환 또는 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환되어, 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 스트렙토마이세스 속 SNJ042 균주인 것을 특징으로 하는, 스트렙토마이세스 속 변이 균주.

청구항 3

- (a) i) 50 내지 100%의 해수 농도를 나타내고,
 - ii) 류신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린 또는 트레오닌으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산을 포함하는 배지를 제조하는 단계;
 - (b) 스트렙토마이세스 속 균주를 상기 배지에서 배양하는 단계; 및
 - (c) 상기 배양된 균주 및 배양 배지에서 오명사마이신 A를 회수하는 단계;
- 를 포함하는, 오명사마이신 A의 생산 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 상기 아미노산은 배지 전체 중량에 대하여 0.1 내지 1 중량%로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 오명사마이신 A의 생산 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 상기 스트렙토마이세스 속 균주 1.0×10^8 내지 5.0×10^8 CFU/ml를 상기 배지 1L당 10 내지 20ml로 접종하는 것을 특징으로 하는, 오명사마이신 A의 생산 방법.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 제 1항에 따른 변이 균주인 것을 특징으로 하는, 오명사마이신 A의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주 및 이를 이용한 오명사마이신 A의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 균주로부터 유래한 생리활성물질은 수십 년 동안 광범위하게 임상에서 약으로 사용되거나 신약 개발의 원천이 되어 왔다(비특허문헌 1). 1980년대 중반에 들어서면서 다수의 유기 물질을 동시에 합성할 수 있는 유기합성 기법인 combinatorial chemistry의 출현과 함께 천연물 공급원으로부터 신규 물질 발견 속도가 둔화되고 기지 물질의 재발견 문제가 심각해지자 대다수의 제약회사들이 천연물 연구를 떠나 합성 물질 위주의 신약 개발 전략을 추진하게 되었다.
- [0004] 그러나 합성 의약품의 다양한 부작용에 대한 문제와 더불어 기존에 알려진 물질을 기반으로 개발한 신약은 그 작용기전이 본래 물질과 차별화되기는 어렵기 때문에, 약물에 대한 내성을 극복하기 위해서는 기존의 약물과는 구조적으로 다른 물질이 반드시 필요했고 이로 인하여 균주 유래 생리활성물질 등 천연물에 기반한 신약 개발이 다시 주목을 받게 되었다(비특허문헌 2).
- [0005] 토양 서식 균주나 육상 식물이 생산하는 생리활성 물질의 경우에는, 쉽게 접근할 수 있는 대상이기 때문에 오랜 기간에 걸쳐서 깊게 연구되어 왔다. 그렇기 때문에 이러한 종류의 생물로부터 새로운 구조나 뛰어난 활성을 갖는 물질을 찾아낼 확률은 극히 낮다. 따라서 기존에 연구되어지지 않은 해양과 같은 독특한 환경에서 새로운 활성 물질을 발견하는 것이 효과적이라고 할 수 있다. 또한, 균주 유래 생리활성물질을 기반으로 한 신약개발의 가장 큰 특징 중 하나인 대량배양이 용이한 장점을 살리기 위하여 표적물질을 가장 잘 생산하는 배지의 조성을 탐색하는 연구까지 더해진다면 효과적인 균주 유래 신약 개발에 큰 도움이 될 것이다.
- [0006] 한편, 해양 균주로부터 발견된 오명사마이신 A 및 B는 마이코박테리움을 포함한 항박테리아, 항암 활성 물질로 보고되었으며, 항결핵균 활성이 우수하다. 항결핵균 억제에 관한 기전 연구에서 특히, 오명사마이신 A는 AMPK-dependent signaling의 활성화를 통한 과고슴 성숙을 유도한다는 점, 이를 통하여 결핵균에 대한 면역 반응으로써 antibacterial autophagy의 활성화를 유도할 수 있고, 또한 Mtb 감염으로 인하여 야기되는 추가적인 염증 반응을 억제하는 효과를 나타낸다는 점에서 새로운 항결핵 치료제로서의 가능성을 확인한 바 있다(비특허문헌 3). 오명사마이신 A은 오명사마이신 B보다 마이코박테리움을 포함한 항박테리아, 항암 활성이 우수한 물질로 알려져 있다.
- [0007] 이에, 오명사마이신 A 및 B의 전합성 방법이 존재하나, 20 단계의 반응으로 이루어지고 전체 수율이 4%로 매우 낮다(비특허문헌 4). 이와 같이 오명사마이신 A를 전합성하여 확보하는 것은 경제성이 없다.
- [0008] 따라서, 배양을 통한 오명사마이신 생산 방법이 고려되고 있으며 그 수율을 증대시켜야만 향후 항결핵제 등 개발을 위한 추가 연구가 가능한 실정이다.
- [0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 오명사마이신 A의 대량 생산을 위한 최적 배양 배지 조건을 설정하고, 오명사마이신 A 생산 유전자 조작을 통해 오명사마이신 A를 보다 선택적으로 생산하는 균주를 제작함으로써 오명사마이신 A의 대량 생산이 가능하고 수율이 현저히 증가함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Clardy, J., Walsh, C. Lessons from Natural Molecules. Nature, 2004, 432, 829-837.
- (비특허문헌 0002) Ortholand JY, Ganesan A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. Curr Opin Chem Biol. 2004 Jun; 8(3):271-80. Review.
- (비특허문헌 0003) Kim, T. S. et al., Ohmyungsamycins promote antimicrobial responses through autophagy activation via AMP-activated protein kinase pathway. Sci. Rep. 2017, 7, 3431.
- (비특허문헌 0004) Hur J. et al., Conformation-Enabled Total Syntheses of Ohmyungsamycins A and B and Structural Revision of Ohmyungsamycin B. Angew. Chem. Int. Ed. 2018, 57, 3069-3073.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 하나의 목적은 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 하나의 목적은
- [0014] (a) 배지를 제조하는 단계;
- [0015] (b) 스트렙토마이세스 속 균주를 상기 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0016] (c) 상기 배양된 균주 및 배양 배지에서 오명사마이신 A를 회수하는 단계;
- [0017] 를 포함하는, 오명사마이신 A의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0021] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주를 제공하는 것이다. 상기 아미노산 치환은 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환, 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환 및 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환되는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산을 트립토판으로 치환 및 254번째 아미노산을 글라이신으로 치환한 A2 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시된다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "비리보솜 펩타이드 신세타제(Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)"는 비리보솜 펩타이드를 생산하는데 관여하는 단백질을 의미한다. 상기 단백질은 12개의 모듈로 구성되어 있으며, 모듈 하나당 하나의 아미노산의 사슬이 연장된다. 각 모듈은 최소한 C (Condensation), A (Adenylation), T (Thiolation) 도메인으로 구성되어 있으며, A 도메인이 기질이 되는 아미노산을 선택하고 활성화시켜 T 도메인 (또는 펩티딜 운반 단백질, PCP)에 결합시키며, C 도메인에 의해 펩타이드 결합 형성이 촉매 된다. A 도메인에서 기질을 인식하는 데는 8개의 아미노산 잔기로 이루어진 바인딩 포켓 (Binding pocket)이 관여하며, 기질에 따라 서로 다른 보존된 아미노산 서열을 가지고 있다 (Challis et al. Chem. Biol. 2000, 7, 211-224).
- [0025] 본 발명에서 용어 "모듈(module)"은 단백질을 구성하는 단위로 하나의 모듈은 아미노산 사슬 하나를 연장하는 기능을 가진다. 일례로, 12개의 모듈로 구성된 비리보솜 펩타이드 신세타제는 12개의 아미노산 사슬을 연장하여 비리보솜 펩타이드를 합성한다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "도메인(domain)"은 단백질의 2차 구조가 모여 형성되는 구조적, 기능적으로 통괄된 영역으로, 단백질이 특정 작업을 수행하는 데 필요한 부분 혹은 부위를 의미한다. 일례로, 비리보솜 펩타이드 신세타제 내 모듈의 A 도메인은 기질이 되는 아미노산을 선택하고 활성화하는 역할을 하고, T 도메인은 기질 아미노산과 결합하는 역할을 하며, C 도메인은 상기 T 도메인과 기질 아미노산이 결합할 때 형성되는 펩타이드 결합을 촉매하는 역할을 한다.

- [0028] 본 발명에서 상기 서열번호 1은 비리보솜 펩타이드 신세타제(Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)를 구성하는 두 번째 모듈 중 A(Adenylation) 도메인(A2 도메인)의 아미노산 서열을 의미한다. 구체적으로, 상기 서열번호 1은 비리보솜 펩타이드 신세타제를 암호화하는 유전자에 의해 암호화되는 비리보솜 펩타이드 신세타제 활성을 갖는 아미노산 서열이다.
- [0029] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 antiSMASH (Blin et al. Nucleic Acids Res. 2017, 45(W1), W36-W41)와 PKS/NRPS Analysis Web-site (Bachmann and Ravel. Methods Enzymol. 2009, 458, 181-217)를 이용하여 얻을 수 있다.
- [0030] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 스트렙토마이세스 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로는 *Streptomyces* sp. SNJ042로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 단백질과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0031] 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노산은 서열번호 1 및 상기 서열번호 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 범주 중 100% 동일성을 갖는 서열은 제외되거나, 100% 미만의 동일성을 갖는 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "변이형 A2 도메인"은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 이들의 조합으로 이루어진 균주로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있으며, 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환, 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환 및 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환되는 것을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이형 A2 도메인은 전술한 서열번호 1 및 상기 서열번호 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산에서 228번째 위치 및/또는 254번째 위치의 아미노산이 변이된 것일 수 있다.
- [0034] 상기 변이형 A2 도메인의 아미노산 서열은 스트렙토마이세스 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있고, 구체적으로는 *Streptomyces* sp. SNJ042로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 목적상 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 치환은 상기 비리보솜 펩타이드 신세타제의 A2 도메인에서 기질 아미노산을 인식하는 바인딩 포켓 부분의 아미노산 잔기가 치환된 것일 수 있다. 상기 비리보솜 펩타이드 신세타제의 A2 도메인에서 기질 아미노산을 인식하는 바인딩 포켓 부분은 8개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 상기 바인딩 포켓에서 기질 아미노산으로 L-Val(발린)이 선별되어 생합성에 사용되면 오명사마이신 A가 생산되고, L-Ile(이소루신)이 선별되면 오명사마이신 B가 생산된다. 따라서, 본 발명에서는 상기 바인딩 포켓 내 아미노산을 치환시켜 이의 기질 특이성을 L-Ile에서 L-Val으로 변형시킨 변이형 A2 도메인을 제작하고, 이를 균주에 도입함으로써 오명사마이신 A의 생산성을 증대시켰다.
- [0037] 즉, 본 발명은 상기 비리보솜 펩타이드 신세타제의 A2 도메인의 아미노산 서열인 서열번호 1의 아미노산 서열에서 바인딩 포켓 부분에 해당하는 228번째 아미노산을 트립토판으로 치환 및 254번째 아미노산을 글라이신으로 치환시켜, 바인딩 포켓의 기질 특이성이 L-Ile에서 L-Val으로 변형된 변이형 A2 도메인을 제작하고, 이를 균주에 도입시킴으로써 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주를 제공할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 목적상 상기 변이형 A2 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 스트렙토마이세스 속 균주의 경우, 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 것을 특징으로 한다. 이는 스트렙토마이세스 속 균주가 오명사마이신 A를 생산하더라도 그 수율이 매우 낮은 것에 반해, 본 발명의 변이형 A2 도메인의 아미노산 서열을 포함함으로써 오명사마이신 A 생산량을 증대시킬 수 있다는 것에 의의가 있다.
- [0040] 구체적으로는, 상기 변이형 A2 도메인은 서열번호 2로 표시되는, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미

노산을 트립토판으로 치환 및 254번째 아미노산을 글라이신으로 치환한 A2 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 변이형 A2 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 상기 변이형 A2 도메인은 서열번호 2 및 상기 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 228번째 또는 254번째 위치의 아미노산 서열 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0041] 즉, 본 발명에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 변이형 A2 도메인과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 아미노산 서열 앞뒤에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본 발명의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[0042] 상기 “보존적 치환(conservative substitution)”은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 알지닌, 리신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다.

[0043] 따라서, 본 발명에서 “변이형 (variant)”은 ‘특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드’에 추가적으로 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 일부 변이형은 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이형을 포함할 수 있다. 다른 변이형은 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이형을 포함할 수 있다. 또한, 상기 변이형은 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함하는 다른 변형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더)서열과 컨쥬게이트할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트될 수 있다. 상기 용어 “변이형”은 변이체, 변형, 변이된 단백질, 변이형 폴리펩티드, 변이, 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.

[0045] 상동성(homology) 및 동일성(identity)은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

[0046] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0047] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

[0048] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지된 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키

지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[0049] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나누는 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.

[0050] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 서열번호 1로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열로 구성된 것일 수 있다. 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브 (Probe), 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건(Stringent condition) 하에 하이브리드화 (Hybridization)하여, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환되거나 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는, 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0052] 본 발명의 목적상 본 발명은 상기 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.

[0054] 본 발명의 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는, 본 발명의 A2 도메인 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 본 발명에서 A2 도메인의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자는 구체적으로 스트랩토마이세스 속 균주로부터 유래하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 구체적으로 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현 시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 암호화 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 서열번호 2의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 A2 도메인의 활성을 가지는 단백질을 암호화하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의

특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성(homology) 또는 동일성(identity)이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60℃, 1 X SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60℃, 0.1 X SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68℃, 0.1 X SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0057] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오타이드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[0058] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 55 ℃의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 ℃, 63 ℃ 또는 65 ℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[0059] 폴리뉴클레오타이드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오타이드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다 (Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).

[0060] 본 발명에서 변이형 A2 도메인의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 대해 설명은 앞서 설명한 바와 같다.

[0061] 본 발명에서 변이형 A2 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또한 앞서 설명한 바와 같다.

[0063] 본 발명에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 암호화하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[0064] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pKC계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pKC1139, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[0065] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동 재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[0067] 본 발명의 하나의 양태로 제공되는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주는, 상기 변이형 A2 도메인을 포함하거나, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하여, 오명사마이신 A를 생산하는 균주일 수 있다. 구체적으로 상기 변이형

A2 도메인 및/또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 균주는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질전환에 의해 제조되는 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0069] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0071] 본 발명에서 용어 "변이형 폴리펩티드를 포함하는 균주" 또는 "변이형 A2도메인을 포함하는 균주"란, 자연적으로 약한 오명사마이신 A 생산능을 가지고 있는 균주 또는 오명사마이신 A의 생산능이 없는 모균주에 오명사마이신 A의 생산능이 부여된 균주를 의미한다. 구체적으로 상기 균주는 서열번호 1의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩티드를 갖는 변이형 A2 도메인을 발현하는 균주로서, 상기 아미노산 치환은 228번째 아미노산이 트립토판으로 치환 또는 254번째 아미노산이 글라이신으로 치환되는 균으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 균주는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 228번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 254번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되어, 변이형 A2 도메인 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 균주일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0072] 상기 균주는, 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나, 또는 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질전환되어 변이형 A2 도메인을 발현할 수 있는 균주로서, 본 발명의 목적상 상기 숙주세포 또는 균주는 상기 변이형 A2 도메인을 포함하여 오명사마이신 A를 생산할 수 있는 균주라면 모두 가능하다.

[0073] 본 발명에서 용어 "오명사마이신 A를 생산하는 균주"는 "오명사마이신 A 생산능을 갖는 균주"와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명에서 용어 "오명사마이신 A를 생산하는 균주"는 야생형 균주나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 균주를 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 변형된 균주로서, 목적하는 오명사마이신 A생산을 위하여 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화 또는 약화시킨 균주일 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 오명사마이신 A를 생산하는 균주는 상기 변이형 A2 도메인을 포함하여, 목적하는 오명사마이신 A의 생산능이 증가된 것을 특징으로 하며, 구체적으로 스트렙토마이세스 속 균주일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 오명사마이신 A를 생산하는 균주 또는 오명사마이신 A생산능을 갖는 균주는, 오명사마이신 A생합성 경로 내 비리보솜 펩타이드 신세타제의 A2 도메인에서 기질 아미노산을 인식하는 바인딩 포켓 부분의 아미노산 잔기가 치환된 균주일 수 있다. 예를 들면, 상기 균주는, A2 도메인의 바인딩 포켓 내 아미노산이 치환되어 이의 기질 특이성이 L-Ile에서 L-Val로 변형된 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 발명에서 용어 "오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 균주"이란, 천연형 또는 변이를 통하여 오명사마이신 A생산능을 가지고 있는 스트렙토마이세스 속 균주를 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서 오명사마이신 A 생산능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주란 A2 도메인의 바인딩 포켓 내 아미노산이 치환되어 이의 기질 특이성이 L-Ile에서 L-Val로 변형됨으로써 향상된 오명사마이신 A 생산능을 가지게 된 스트렙토마

이세스 속 균주일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에서 오명사마이신 A 생산능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주는 본 발명의 변이형 A2도메인 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 상기 변이형 A2도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어, 향상된 오명사마이신 A 생산능을 가지게 된 스트렙토마이세스 속 균주일 수 있다. 상기 '향상된 오명사마이신 A 생산능을 가지게 된 스트렙토마이세스 속 균주'는 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 균주보다 오명사마이신 A 생산능이 향상된 균주를 의미한다. 상기 '비변형 균주'는 천연형 균주 자체이거나, 상기 오명사마이신 A를 생산하는 단백질 변이체를 포함하지 않는 균주, 또는 상기 변이형 A2 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 균주를 의미한다.

[0076] 본 발명에서 "스트렙토마이세스 속 균주"는 구체적으로는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 (*Streptomyces kanamyceticus*), 스트렙토마이세스 테네브라리우스 (*Streptomyces tenebrarius*), 스트렙토마이세스 프라디아에 (*Streptomyces fradiae*), 스트렙토마이세스 푸세티우스 (*Streptomyces peucetius*) 등이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명은 또 하나의 양태로서,

[0079] (a) i) 50 내지 100%의 해수 농도를 나타내고,

[0080] ii) 류신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린 또는 트레오닌으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산을 포함하는 배지를 제조하는 단계;

[0081] (b) 스트렙토마이세스 속 균주를 상기 배지에서 배양하는 단계; 및

[0082] (c) 상기 배양된 균주 및 배양 배지에서 오명사마이신 A를 회수하는 단계;

[0083] 를 포함하는, 오명사마이신 A의 생산 방법을 제공한다.

[0085] 상기 단계 (a)의 i)에 있어서, 상기 배지는 50 내지 100%의 해수 농도를 나타내는 것일 수 있으며, 구체적으로는 55 내지 95%, 57 내지 93%, 60 내지 90%, 62 내지 82%, 65 내지 85%, 67 내지 83%, 70 내지 80%, 72 내지 78%, 74 내지 76%일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

[0086] 상기 단계 (a)의 ii)에 있어서, 상기 배지는 류신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린 또는 트레오닌으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 아미노산은 배지 전체 중량에 대하여 0.1 내지 1 중량%로 첨가되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 0.2 내지 1 중량%, 0.3 내지 1 중량%, 0.4 내지 1 중량%, 0.5 내지 1 중량%, 0.6 내지 1 중량%, 0.7 내지 1 중량%, 0.8 내지 1 중량%, 0.9 내지 1 중량%일 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

[0087] 또한, 상기 배지는 추가로 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물 (예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방 (예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산 (예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올 (예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산 (예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물 (예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 배지에는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철) 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

[0088] 상기 단계 (b)에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주 1.0×10^8 내지 5.0×10^8 CFU/ml를 상기 배지 1L당 10 내지 20ml로 접종하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 11 내지 19ml, 12 내지 18ml, 13 내지 17ml, 14 내지 16ml로 접종하는 것일 수 있다.

[0089] 본 발명의 목적상 상기 단계 (b)의 스트렙토마이세스 속 균주는 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주일 수 있다. 상기 용어 "오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 균주"는

전술한 바와 같다.

[0090] 또한, 상기 균주를 배양하는 단계는, 특별히 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45 °C, 구체적으로는 25 내지 40 °C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 오명사마이신 A는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[0091] 상기 단계 (c)에 있어서, 상기 배양 단계에서 생산된 오명사마이신 A를 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 오명사마이신 A를 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 균주로부터 목적하는 오명사마이신 A를 회수할 수 있다.

[0092] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 오명사마이신 A는 정제된 형태 또는 오명사마이신 A를 함유한 균주 발효액일 수 있다(Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

발명의 효과

[0094] 본 발명에 따른 오명사마이신 A의 생산능이 증대된 스트렙토마이세스 속 변이 균주는 오명사마이신 A의 생산 수율이 향상되어 산업상 이용 또는 신약 개발을 위한 연구 등에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0096] 도 1은 해수 농도에 따른 오명사마이신 A의 생산량 변화이다.

도 2는 전구체 아미노산의 배지 첨가에 따른 오명사마이신A의 생산량 변화이다.

도 3은 종합 배지의 아미노산 양에 따른 오명사마이신A의 생산량 변화이다.

도 4는 1 L 당 접종하는 SNJ042 균주 배양액의 부피에 따른 Ohmyungsamycin A 생산량의 변화이다.

도 5는 바인딩 포켓부분의 아미노산 잔기가 치환된 A2 도메인의 아미노산 서열(서열번호 2)이다.

도 6은 *Streptomyces* sp. SNJ042 A2Mut에서 생산된 오명사마이신 A와 B의 생산 비율이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0099] 실시예 1. *Streptomyces* sp. SNJ042의 오명사마이신A 물질 생산을 위한 배양 조건

[0100] 배양은 하기 4단계를 통해 수행하였다.

[0101] -1단계 배양: SNJ042 균주를 YEME 고체 배지 (증류수 1 L 당 맥아 추출물 10 g, 효모 추출물 4 g, 글루코스 4 g, 바다 소금 (sea salt) 23 g, 한천 18 g)에 접종하여 수 일간 30° C에서 배양하였다.

[0102] - 2단계 배양: 100mL 플라스크에 50mL의 A1+C 액체배지 (증류수 1 L 당 녹말 10 g, 효모 추출물 4 g, 펩톤 2 g, 탄산칼슘 1 g, 바다 소금 23g)에 1단계에서 배양한 포자를 접종한 뒤 200rpm으로 30° C 조건에서 3일간 배양하였다.

[0103] - 3단계 배양: 500 mL 플라스크에 A1+C 액체 배지 200ml (증류수 1L당 녹말 10 g, 효모 추출물 4 g, 펩톤 2 g,

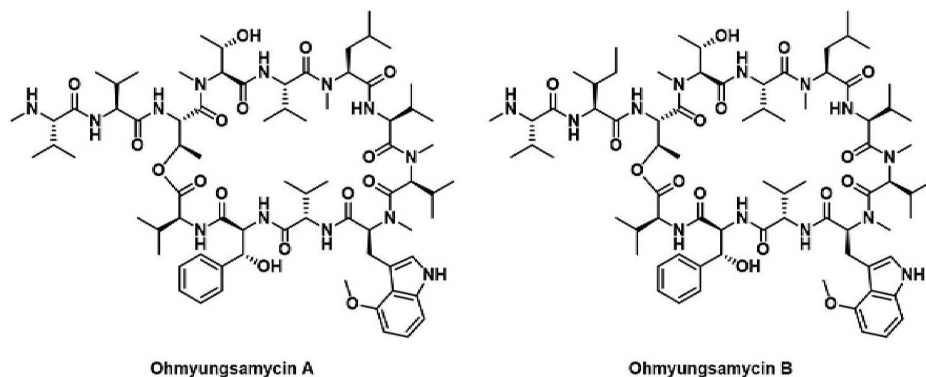
탄산칼슘 1 g, 바다 소금 23 g)를 준비하여, 앞서 2단계에서 배양한 균주를 5mL 접종한 뒤, 진탕 배양기에서 160rpm으로 30° C 조건에서 2일간 배양하였다.

- 4단계 배양: 3단계 배양액의 일부인 14 mL을 1 L 부피의 A1+C 배지에 접종하여 6일 동안 배양하였다.

실시예 2. 오명사마이신 A 물질을 포함하는 *Streptomyces* sp. SNJ042 균주 배양액의 추출 및 분리 방법

스탠드에 거치 고리를 장착하여 분별깔때기 (separatory funnel, 용량 3 L)를 고정시킨 후, SNJ042 배양액 1 L 와 에틸아세테이트 1.5 L를 주입하였다. 마개로 입구를 닫고, 1분간 상하좌우로 뒤섞은 후 에틸아세테이트 층과 물 층으로 구분되도록 3분간 방치하였다. 해당 과정을 총 2회 반복하여 실행한 후, 분별깔때기를 이용하여 물 층을 제거하고 에틸아세테이트층만을 따로 빈 2.3 L 플라스크에 옮겨 담았다. 옮겨 담은 에틸아세테이트 층에 무수소듐설페이트 100 g을 첨가하여 남아있는 물을 제거하였다. 최종적으로 추출된 에틸아세테이트 층을 거름종이로 거르면서 둥근 플라스크 (round bottom flask, 용량 3 L)에 옮긴 후 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 남은 물 층은 다시 1.5 L 에틸아세테이트로 추출을 진행하였고, 이와 같은 과정을 반복하여 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 역상 크로마토그래피 (C18 resin 20g, reversed-phase)를 이용하여 4개의 분획으로 나누었다. 분획에는 물과 메탄올 (methanol) 용매가 사용되었으며, 20%, 40%, 60%, 100% 메탄올/물 용액 각 200 mL을 사용하였다. 20% 메탄올/물 용액을 사용하여 분획을 시작하였으며, 이후 메탄올의 농도를 높이며 분획을 진행하였다. LC/MS를 이용하여 100% 메탄올 분획물에 표적 물질인 오명사마이신 A, B가 포함되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 감압농축기로 농축한 100% 메탄올 분획물을 2 mL에 녹인 후 이 용액을 기율기 용매 조건 (0 - 20분, 40 - 56% 아세토나이트릴/물, 0.1% trifluoroacetic acid)을 이용하여 역상 HPLC 컬럼 (C18 reversed-phase preparative HPLC column, 입자 직경 10 μm, 250 x 21.20 mm (길이 x 내경), 용출속도 10 mL/min, UV 검출기 280 nm)으로 분리하였다. 오명사마이신 A의 경우 위 분리조건에서 약 26분 후에 용출되었다. 오명사마이신 B의 경우에는, 위에 명시된 조건으로 분리를 진행 할 경우 27분 후에 용출되는 것이 확인되었다.

[화학식 1] *Streptomyces* sp. SNJ042 균주배양액으로부터 분리된 오명사마이신 A, B (1, 2) 의 구조



분리된 오명사마이신 A 및 B의 물리화학적 특성은 하기와 같았다.

오명사마이신 A (Ohmyungsamycin A, 1)

(1) 분자식 : $C_{75}H_{119}N_{13}O_{16}$

(2) 분자량 : 1457

(3) 색 : 흰색

오명사마이신 B (Ohmyungsamycin B, 2)

(1) 분자식 : $C_{76}H_{121}N_{13}O_{16}$

(2) 분자량 : 1471

[0120] (3) 색 : 흰색

[0122] **실시예 3. 배지 최적화 과정 중 배지의 해수 농도에 따른 오명사마이신 A의 생산량 증가**

[0123] *Streptomyces* sp. SNJ042 균주는 제주도 해양에서 얻어진 균주로, 해수와 동일한 조건을 충족시키기 위해 배양 시 배지에 바다 소금을 첨가하였다. 이 균주가 생산하는 오명사마이신A의 생산량을 늘리기 위하여 배지를 최적화하였다. 이를 위해 배지에 첨가되는 바다 소금의 양을 변화시켜 해수 농도 0%, 25% 50%, 75%, 100%에 해당하는 A1+C 액체배지 125 mL를 준비하였고, 각각의 배지에 동량의 SNJ042 균주를 접종하여 배양하였다. 160 rpm, 30 °C 조건에서 6-7일간 배양한 후 동량의 에틸아세테이트(EtOAc)를 이용하여 유기 추출을 진행하였으며 추출물을 LC-MS로 0-20분, 10-100% 아세토나이트릴 조건에서 비교 분석하여 오명사마이신A의 생산량을 해당 물질의 UV mAU (absorption unit) 값으로 확인하여 비교하였다.

[0124] 그 결과, 도 1과 같이 75% 해수 농도 (1 L 당 약 23 g의 바다 소금)로 준비된 배지에서 오명사마이신 A의 양이 가장 많이 생산되는 것을 확인할 수 있었다.

[0126] **실시예 4. 배지 최적화 과정 중 각각의 전구체 아미노산 첨가에 따른 오명사마이신 A물질의 생산량 증가**

[0127] 오명사마이신 A는 7개의 발린 (5개의 발린과 2개의 N-메틸 발린), 1개의 페닐알라닌 (β -하이드록시-페닐알라닌), 1개의 트립토판 (N-메틸-4-메톡시-트립토판), 1개의 류신 (N-메틸-류신), 2개의 트레오닌 (1개의 트레오닌과 1개의 N-메틸-트레오닌)으로 구성되어 있다. 이를 바탕으로, 오명사마이신A의 생산량을 늘리기 위해 오명사마이신 A를 구성하는 각각의 아미노산을 배지 조성에 첨가하여 배지를 최적화하였다.

[0128] SNJ042 균주의 배양에 사용되는 A1+C 액체 배지 (증류수 1 L 당 효모 추출물 4 g, 펩톤 2 g, 녹말 10 g, 탄산칼슘 1 g, sea salt 23 g) 1 L 를 준비한 뒤 500 mL 부피의 삼각플라스크에 100 mL 씩 나누어 담아 총 7개의 플라스크를 준비하였고 이때, 탄산칼슘, 녹말 등 물에 잘 녹지 않는 배지 성분은 가라앉을 수 있기 때문에, 옮겨 담는 순서에 따라 배지 조성이 변화하지 않도록 준비하였던 배지를 지속적으로 혼합하며 옮기는 과정을 진행하였다. 준비된 7개의 100 mL 부피 A1+C 배지 중 5개의 배지에 각각 류신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 트레오닌을 100 mg 씩 추가로 첨가하였고 (A1+C 배지 1 L 당 1 g 비율로 아미노산 첨가), 1개의 배지에는 위 5가지 종류의 아미노산 (류신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 트레오닌)을 모두 100 mg 씩, 총 500 mg을 첨가하여 종합 배지로 제조하였다. 나머지 하나의 배지는 아미노산을 첨가하지 않고 생산량 변화를 관찰하기 위한 대조군으로 사용하였다. 125 mL 부피의 A1+C 액체배지에 SNJ042 균주의 포자를 접종한 뒤 2일간 30 °C, 160 rpm 환경에서 배양을 진행하여 배양을 진행하였다. 이후 배양액의 일부인 5 mL를 앞서 준비해 둔 7가지 종류의 A1+C 액체배지에 분주하였다. 이때, 각 배지에 분주되는 균주의 양이 최대한 일정하도록 플라스크를 주기적으로 흔들어주며 분주 과정을 진행하였고 분주가 끝난 7개의 배지는 30 °C, 160 rpm 조건에서 5일간 배양 진행하였다. 배양 5일 후 각 배지에서 5 mL를 동량의 에틸아세테이트로 추출, 감압 건조 후 100% 메탄올에 녹여 분석용 HPLC로 분석을 진행하였다. 마찬가지로, 변인을 통제하기 위하여 추출에 사용된 배양액과 에틸아세테이트의 부피는 일정하게 유지하였고 HPLC 분석 결과로 얻게 된 자외선 크로마토그램을 기준으로 아미노산이 첨가된 각 배지의 오명사마이신 A의 생산량을 UV mAU (absorption unit) 값으로 비교하였다.

[0129] 그 결과, 도 2와 같이 아미노산을 첨가한 모든 배지에서 오명사마이신 A 생산량이 대조군보다 확연하게 높아진 것을 확인할 수 있었다. 단일 아미노산을 첨가한 배지 중에서는 트레오닌을 추가한 배지에서 오명사마이신 A 생산량이 가장 많이 늘어난 것을 확인할 수 있었으며, 5가지 종류의 아미노산을 모두 넣어준 종합 배지에서의 생산량이 기존 배지 대비 약 4배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0131] **실시예 5. 배지 최적화 과정 중 종합배지의 아미노산 양에 따른 오명사마이신A의 생산량 증가**

[0132] 실시예 4를 통해 5종의 아미노산을 모두 첨가한 종합 배지에서 오명사마이신A의 생산량이 기존 배지 대비 약 4배 이상으로 증가하는 것을 확인한 바, 대량 배양 시 경제성을 확인하기 위해 아미노산을 고루 첨가한 종합 배지에서 아미노산의 양과 오명사마이신 A가 어느 정도 비례하여 생산되는지 확인하였다. A1+C 액체 배지(증류수 1 L 당 효모 추출물 4 g, 펩톤 2 g, 녹말 10 g, 탄산칼슘 1 g, 바다 소금23 g) 1 L에 오명사마이신 A의 전구체 아미노산인 L-트립토판, L-페닐알라닌, L-류신, L-발린, L-트레오닌을 각각 0g, 1g, 2g씩 첨가하였다 (총 아미노산 1g, 5g, 10g). Frozen stock 형태로 보관중인 SNJ042 균주를 상온에서 녹인 뒤 500mL 부피의 삼각플라스

크에 담긴 200mL의 A1+C 액체배지에 접종하여 160rpm으로 30° C 조건에서 2일간 배양한 후 준비해둔 아미노산의 양이 다르게 첨가된 종합배지에 각 14mL씩 접종하였다. 160 rpm, 30 °C 조건에서 6-7일간 배양한 후 동량의 에틸아세테이트를 이용하여 유기 추출을 진행하였으며 추출물을 LC-MS로 0-20분, 10-100% 아세토나이트릴 조건에서 비교 분석하여 오명사마이신의 생산량을 해당 물질의 피크 면적으로 확인하였다.

[0133] 그 결과, 도 3과 같이 전구체 아미노산을 첨가하지 않았을 때 (266.3 mAU)보다 각 1g씩 첨가했을 때 (1049.1mAU), 그리고 1g을 첨가했을 때 보다는 각 2g씩 첨가하였을 때 (1264.4 mAU) 오명사마이신A의 생산량이 증가하는 것을 확인하였으나, 생산량의 증가 폭은 아미노산을 첨가하지 않았을 때보다 1g 첨가하였을 때 가장 큰 폭으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0135] 실시예 6. 1 L 당 접종하는 SNJ042 균주 배양액의 부피에 따른 오명사마이신 A의 생산량 증가

[0136] 균주를 배양시 세포의 밀도에 따라서 물질을 생산하는 양에 차이가 있으며, 따라서 대량 배양시 1 L 단위의 배지에 처음 접종하는 균주의 양에 따라 활성물질의 생산량이 변화하기도 한다. 이러한 원리를 바탕으로 가장 많은 오명사마이신A를 생산하는 조건을 찾기 위해 접종하는 SNJ042 균주의 양 변화에 대한 오명사마이신 A의 생산량 변화를 측정하였다. 50 ml A1+C 액체배지에서 약 2일간 배양한 SNJ042 균주 약 5 ml를 125 ml의 A1+C 배지에 접종하고 이후 2일간 추가로 배양하였다. 이후 해당 배양액을 1 L 부피의 A1+C 배지에 접종하는 단계에서 접종하는 배양액의 부피를 10 ml, 15 ml, 20 ml로 변화를 주어 접종하였다. 이때, SNJ042 균주는 5.0×10^8 CFU/ml였다. 한 뒤 동량의 에틸아세테이트를 이용하여 유기 추출을 진행하였으며 추출물을 LC-MS로 0-20분, 10-100% 아세토나이트릴 조건에서 비교 분석하여 오명사마이신의 생산량을 측정하였다.

[0137] 그 결과, 도 4와 같이 1 L 당 15 ml를 접종하여 배양한 경우의 오명사마이신 A 생산량이 가장 많은 것을 확인할 수 있었다.

[0139] 실시예 7. 오명사마이신 생합성 유전자 분석

[0140] 오명사마이신은 12개의 아미노산이 결합한 형태의 펩타이드 계열의 물질로 비리보솜 펩타이드 신세타제 (Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)라는 효소에 의해 생합성 된다. 이 효소는 12개의 모듈로 구성되어 있으며, 모듈 하나당 하나의 아미노산의 사슬이 연장된다. 각 모듈은 최소한 C (Condensation), A (Adenylation), T (Thiolation) 도메인으로 구성되어 있으며, A 도메인이 기질로서 아미노산을 선택하고 활성화시켜 T 도메인 (또는 펩티딜 운반 단백질, PCP)에 결합시키며, C 도메인에 의해 펩타이드 결합 형성이 촉매 된다. A 도메인에서 기질을 인식하는 데는 8개의 아미노산 잔기로 이루어진 바인딩 포켓 (Binding pocket)이 관여하며, 기질에 따라 서로 다른 보존된 아미노산 서열을 가지고 있다 (Challis et al. Chem. Biol. 2000, 7, 211-224).

[0141] NRPS 내 두 번째 모듈의 A 도메인 (A2 도메인)에 의해 L-Val이 선별되어 생합성에 사용되면 오명사마이신 A가 생산되며, A2 도메인에 의해 L-Ile이 선별되면 오명사마이신 B가 생산된다. 이를 바탕으로, 오명사마이신 A를 선택적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해 A2 도메인의 바인딩 포켓 내 보존된 아미노산 서열을 교체시킴으로써 도메인의 기질 특이성을 변형시켰다.

[0142] 우선적으로, antiSMASH (Blin et al. Nucleic Acids Res. 2017, 45(W1), W36-W41)와 PKS/NRPS Analysis Website (Bachmann and Ravel. Methods Enzymol. 2009, 458, 181-217)를 이용하여 오명사마이신 NRPS 유전자를 분석하였으며, 각 모듈의 구성 및 각 A 도메인의 기질 인식 바인딩 포켓 내 8개 아미노산 잔기를 확인하였다. 이 중 L-Val을 기질로 사용하는 모듈 1, 5, 7, 8, 10, 12를 선별하였으며, 각 이들의 A 도메인 바인딩 포켓의 아미노산을 확인하고 A2 도메인과 비교하였다(표 1). 이를 통해 A2 도메인의 8개 아미노산 잔기 중 2개가 다름을 확인하고, 이를 L-Val을 기질로 사용하는 A 도메인들의 (A1, A5, A7, A8, A10, A12 도메인) 8개 아미노산 잔기와 같게 변형시킨 균주를 제작하였다.

표 1

A 도메인	바인딩 포켓의 8개 아미노산	기질 아미노산
A1	D A Y W W G G T	L-Val

A2	D A Y W G G A T	L-Val/L-Ile
A5	D A Y W W G G T	L-Val
A7	D A Y W W G G T	L-Val
A8	D A Y W W G G T	L-Val
A10	D A Y W W G G T	L-Val
A12	D A Y W W G G T	L-Val

[0146] **실시예 8. 오명사마이신 생합성 유전자 조작을 통한 오명사마이신 A의 선택적 생산 균주 제작**

[0147] A2 도메인의 바인딩 포켓 내 아미노산 서열을 변형시키기 위해 우선 서열 치환용 벡터를 제작하였다. *S. sp.* SNJ042 균주의 genomic DNA로부터 A2 도메인 영역을 포함 총 3.3 kb 정도의 유전자를 증폭시켰으며, 변형된 서열을 포함하는 프라이머를 사용 한 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 염기서열이 치환된 유전자 조작을 확보하였다. 이를 EcoRI, HindIII 제한효소를 처리한 다음, 라이게이션 (ligation)을 통해 temperature sensitive *E.coli-Streptomyces* 서플 벡터 pKC1139에 삽입하여, 유전자 치환용 벡터 pKC1139-A2Mut를 완성하였다.

[0148] 제작한 벡터 pKC1139-A2Mut는 메틸화 기능이 결손된 대장균 ET12567/pUZ8002를 공여체로 하는 conjugation 방법을 통해 *S. sp.* SNJ042에 도입되었고, 생성된 콜로니는 여러 차례의 generation을 통해 double crossover 과정을 거쳤다. 염기서열이 치환된 돌연변이 균주는 apramycin 저항성 유무로 후보 균주를 선별하고, 이들의 genomic DNA를 추출하고 A2 도메인 영역을 포함하는 DNA 조각을 증폭 및 시퀀스 확인을 통해 최종균주를 선별하고 *S. sp.* SNJ042 A2Mut로 명명하였다. 바인딩 포켓부분의 아미노산 잔기가 치환된 A2 도메인의 아미노산 서열은 도 5와 같다.

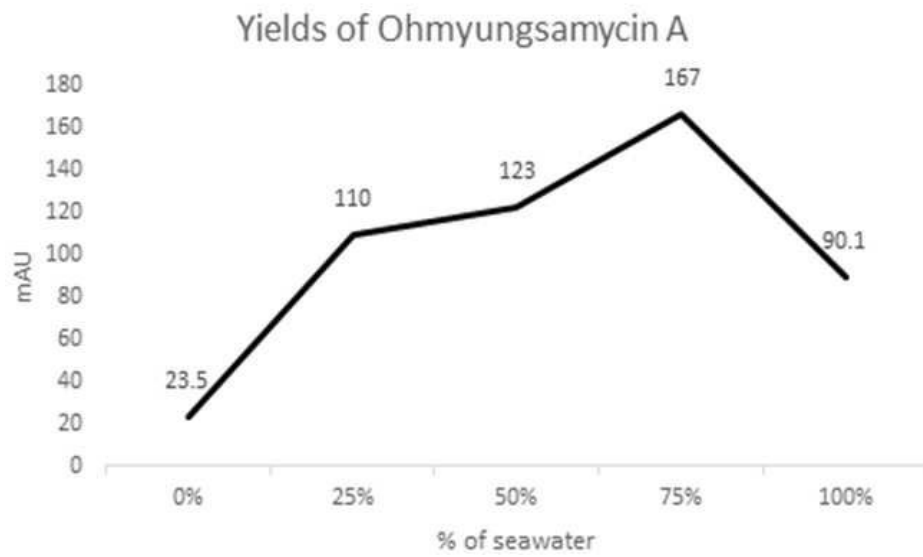
[0149] *Streptomyces sp.* SNJ042 A2Mut 균주는 실시예 1의 배양 조건으로 배양하였으며, 6일 동안의 배양액 2 ml을 취하여 동량의 ethyl acetate로 추출하여 농축하고, 얻어진 추출액은 100 μ l의 acetonitrile에 녹이고 이를 분석에 사용하였다. 오명사마이신에 대한 분석을 수행하기 위해, 분석시료의 분리능은 ultra performance liquid chromatography를 이용하였으며, Waters[®] Acquity UPLC[®] 기기시스템으로는 Acquity UPLC[®] Peptide BEG C18 컬럼 (2.1X100 mm, 1.7 μ m)이 장착된 Acquity I-class 시스템을 사용하였다. 분석용매로는 trifluoroacetic acid (TFA)를 0.1% 함유한 수용액을 분석용매 A로 하며, 분석용매 B는 0.1% TFA 수용액이 포함된 80% acetonitrile 수용액을 제조하여 사용할 수 있다. 분석용매 A/B의 비율은 초기 60:40으로 시작하여, 10:90의 비율까지 기울기를 주어 분석 조건을 변화시킬 수 있으며, 총 분석 시간은 13 분으로 하고, 샘플투입량은 2 μ l로 한다. 질량분석 방법으로는 quadrupole time-of-flight (qTOF) 방법을 사용하여 분석할 수 있다. 이에 대한 분석 예로써, positive ESI 모드를 이용하였으며, 분석 질량의 범위는 m/z 50~35,000으로 설정하여 분석하였다. 분석 중 lockspray로는 leucine enkephalin을 사용하였다.

[0150] 위의 분석조건에서 오명사마이신 A는 약 8.6분, B는 약 8.9분 후에 용출되어 나오는 것을 확인하였다. 분석 결과, 제작된 오명사마이신 A의 선택적 생산 균주 (*S. sp.* SNJ042 A2Mut)에서 오명사마이신 A와 B의 생산 비율이 약 8:1로 변화된 것을 확인할 수 있었다 (도 6). 야생 균주에서 오명사마이신 A와 B의 비율이 2:1로 생산되는 것과 비교하여, A2 도메인의 바인딩 포켓의 8개 아미노산 잔기 수정을 통해 오명사마이신 A의 생산수율 향상에 효과가 있음을 확인하였다.

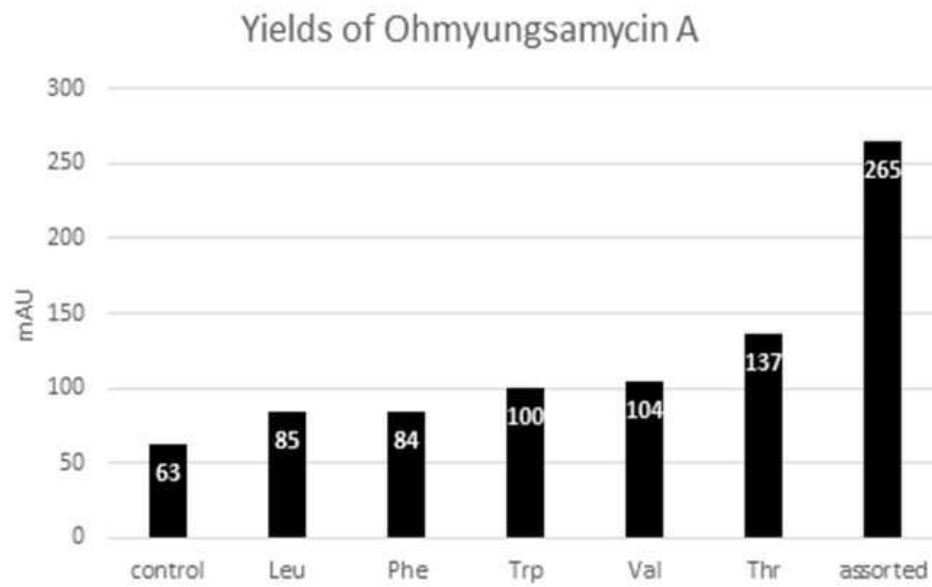
[0152] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

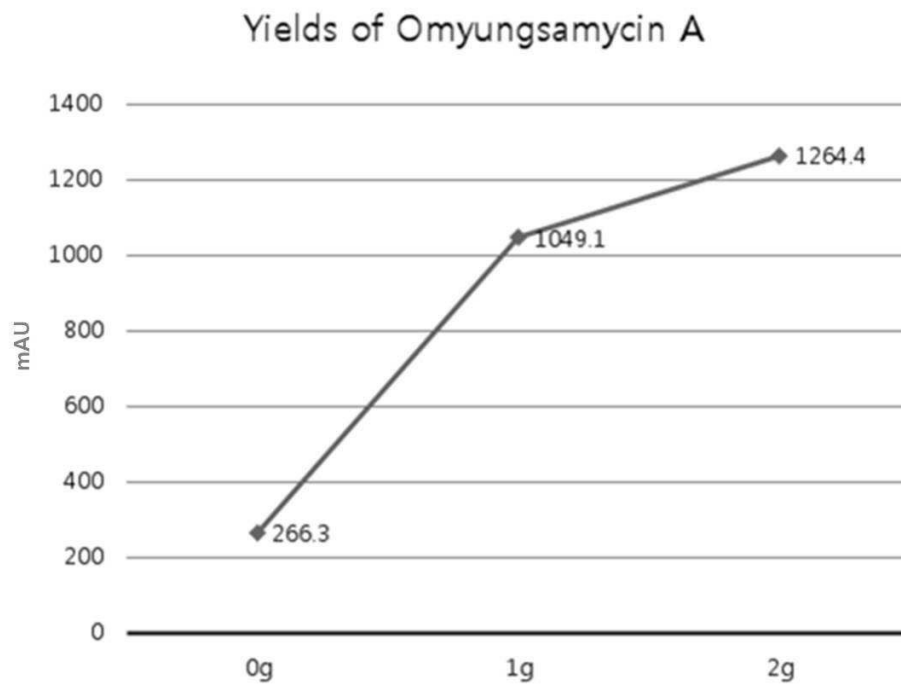
도면1



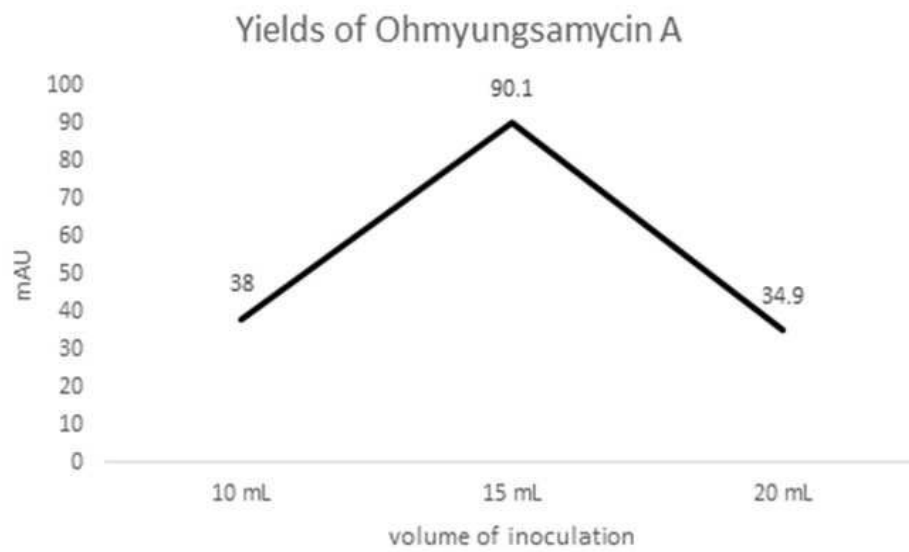
도면2



도면3



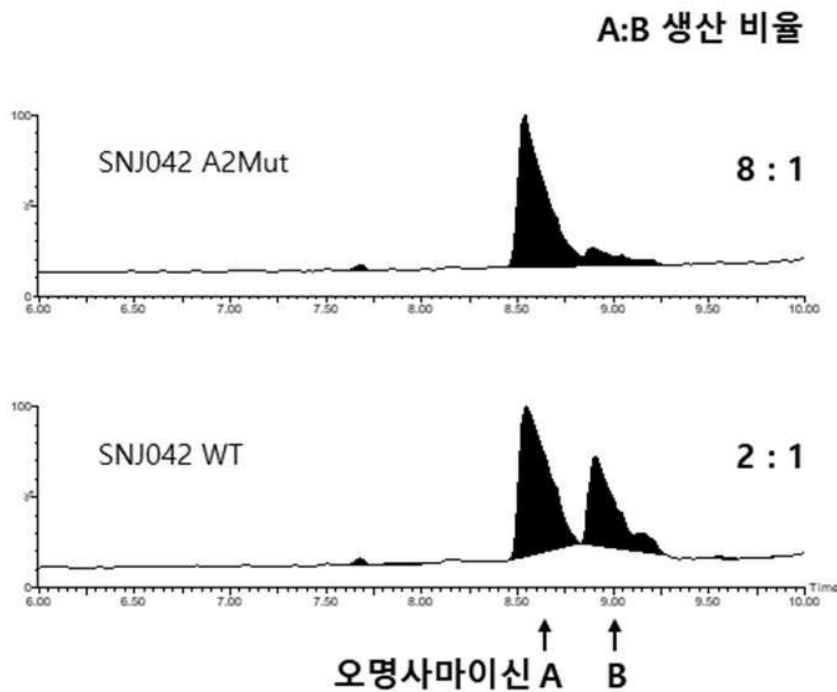
도면4



도면5

AQDPAATALI GGERISYGEL NRRANRLGHR LIARGVRPED LVAVVLPRSV
EFVVTVLAVL KAGAAAYPLD PAHPEAHRTR LLTEARPALV VDGPPVESADQ
PDTDPGVTVP AHTAAYVMYT SGSTGTPKGV QVTRADIVAL ATDPIFAQGH
ERVLFHSPPA FFASTYELWV PLLHGGTVVI GPDARAGTDA LAAAVRDHGI
TALWLTSGLF AVVAEHHPET FRGLRHLWTG GDIVSLQALR TARAADPDLT
LLHGYGPTET TTFATLHPVT GEPTGTVPIG RPTAGMRARV LDERLRRVPP
GVTGELYLSG AGVARGYLGR PGATAERFVA DPDGPGRMYR TGDIVRWAD
GDLEFRGRAD QQVKLR

도면6



서 열 목 록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Mutant strain of Streptomyces sp. having enhanced biosynthetic
ability to produce Ohmyungsamycin A, and method for preparing
Ohmyungsamycin A using the same
- <130> KPA190574-KR
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid of A2 domain
 <400> 1

Ala Gln Asp Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ile Gly Gly Glu Arg Ile Ser

1	5	10	15
Tyr Gly Glu Leu Asn Arg Arg Ala Asn Arg Leu Gly His Arg Leu Ile			
20	25	30	
Ala Arg Gly Val Arg Pro Glu Asp Leu Val Ala Val Val Leu Pro Arg			
35	40	45	
Ser Val Glu Phe Val Val Thr Val Leu Ala Val Leu Lys Ala Gly Ala			
50	55	60	
Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Pro Ala His Pro Glu Ala His Arg Thr Arg			
65	70	75	80

Leu Leu Thr Glu Ala Arg Pro Ala Leu Val Val Asp Gly Pro Val Glu			
85	90	95	
Ser Ala Asp Gln Pro Asp Thr Asp Pro Gly Val Thr Val Pro Ala His			
100	105	110	
Thr Ala Ala Tyr Val Met Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys			
115	120	125	
Gly Val Gln Val Thr Arg Ala Asp Ile Val Ala Leu Ala Thr Asp Pro			
130	135	140	
Ile Phe Ala Gln Gly His Glu Arg Val Leu Phe His Ser Pro Pro Ala			

145	150	155	160
Phe Asp Ala Ser Thr Tyr Glu Leu Trp Val Pro Leu Leu His Gly Gly			
165	170	175	
Thr Val Val Ile Gly Pro Asp Ala Arg Ala Gly Thr Asp Ala Leu Ala			
180	185	190	
Ala Ala Val Arg Asp His Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Thr Ser Gly			
195	200	205	

Leu Phe Ala Val Val Ala Glu His His Pro Glu Thr Phe Arg Gly Leu
210 215 220

Arg His Leu Gly Thr Gly Gly Asp Ile Val Ser Leu Gln Ala Leu Arg
225 230 235 240

Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asp Leu Thr Leu Leu His Ala Tyr Gly
245 250 255

Pro Thr Glu Thr Thr Thr Phe Ala Thr Leu His Pro Val Thr Gly Glu
260 265 270

Pro Thr Gly Thr Val Pro Ile Gly Arg Pro Thr Ala Gly Met Arg Ala
275 280 285

Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Arg Arg Val Pro Pro Gly Val Thr Gly
290 295 300

Glu Leu Tyr Leu Ser Gly Ala Gly Val Ala Arg Gly Tyr Leu Gly Arg
305 310 315 320

Pro Gly Ala Thr Ala Glu Arg Phe Val Ala Asp Pro Asp Gly Pro Gly
325 330 335

Arg Met Tyr Arg Thr Gly Asp Leu Val Arg Trp Asn Ala Asp Gly Asp
340 345 350

Leu Glu Phe Arg Gly Arg Ala Asp Gln Gln Val Lys Leu Arg
355 360 365

<210> 2
<211> 366
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid of mutant A2 domain
<400> 2

Ala Gln Asp Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ile Gly Gly Glu Arg Ile Ser
1 5 10 15

Tyr Gly Glu Leu Asn Arg Arg Ala Asn Arg Leu Gly His Arg Leu Ile
20 25 30

Ala Arg Gly Val Arg Pro Glu Asp Leu Val Ala Val Val Leu Pro Arg
35 40 45

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

50

55

60

Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Pro Ala His Pro Glu Ala His Arg Thr Arg

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Ala Asp Gln Pro Asp Thr Asp Pro Gly Val Thr Val Pro Ala His

100

105

110

Thr Ala Ala Tyr Val Met Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys

115

120

125

Gly Val Gln Val Thr Arg Ala Asp Ile Val Ala Leu Ala Thr Asp Pro

130

135

140

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

145

150

155

160

Phe Asp Ala Ser Thr Tyr Glu Leu Trp Val Pro Leu Leu His Gly Gly

165

170

175

Thr Val Val Ile Gly Pro Asp Ala Arg Ala Gly Thr Asp Ala Leu Ala

180

185

190

Ala Ala Val Arg Asp His Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Thr Ser Gly

195

200

205

Leu Phe Ala Val Val Ala Glu His His Pro Glu Thr Phe Arg Gly Leu

210

215

220

Arg His Leu Trp Thr Gly Gly Asp Ile Val Ser Leu Gln Ala Leu Arg

225

230

235

240

Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asp Leu Thr Leu Leu His Gly Tyr Gly

245

250

255

Pro Thr Glu Thr Thr Thr Phe Ala Thr Leu His Pro Val Thr Gly Glu

260

265

270

Pro Thr Gly Thr Val Pro Ile Gly Arg Pro Thr Ala Gly Met Arg Ala

275

280

285

Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Arg Arg Val Pro Pro Gly Val Thr Gly

290	295	300	
Glu Leu Tyr Leu Ser Gly Ala Gly Val Ala Arg Gly Tyr Leu Gly Arg			
305	310	315	320
Pro Gly Ala Thr Ala Glu Arg Phe Val Ala Asp Pro Asp Gly Pro Gly			
	325	330	335
Arg Met Tyr Arg Thr Gly Asp Leu Val Arg Trp Asn Ala Asp Gly Asp			
	340	345	350
Leu Glu Phe Arg Gly Arg Ala Asp Gln Gln Val Lys Leu Arg			
355	360	365	