



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0101150
(43) 공개일자 2009년09월24일

(51) Int. Cl.

C12P 19/56 (2006.01) C07H 15/20 (2006.01)
C07H 15/24 (2006.01) C12P 19/44 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0085281(분할)

(22) 출원일자 2009년09월10일

심사청구일자 2009년09월10일

(62) 원출원 특허 10-2008-0017742

원출원일자 2008년02월27일

심사청구일자 2008년02월27일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

윤여준

서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호

한아름

강원도 춘천시 후평동 809 후평4단지 아파트 417동 407호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김재천

전체 청구항 수 : 총 2 항

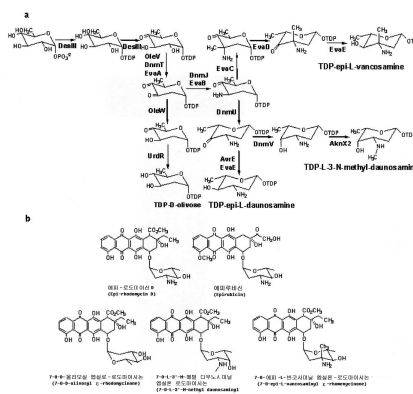
(54) 안트라사이클린 계열 항암제 에피루비신의 생합성 방법, 안트라사이클린 계열 신규 당치환체 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 기존의 안트라사이클린(anthracycline) 계열 항암제 독소루비신(doxorubicin)과 비교하여 강력한 항암 작용을 보이면서 부작용이 적은 반합성 개량 안트라사이클린 계열 항암제 에피루비신(epirubicin)의 생산을 위한 생물 시스템의 개발 및 신규한 안트라사이클린 당치환체의 제조 방법과 그 제조 방법에 따라 생산된 신규한 안트라사이클린 당치환체에 관한 것이다. 뉴클레오타이드 활성화 당의 생합성 단백질, 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)-보조적 단백질, 글리코실화 엽실론 로도마이시논(glycosylate ϵ -rhodomycinone)에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질들을 발현하는 스트렙토미세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)의 돌연변이체를 제조하여 엽실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 에피루비신을 비롯한 그 생합성 중간체와 그 중간체의 유도체를 제조할 수 있는 방법을 제공한다.

또한 다양한 뉴클레오타이드-활성화당의 생합성 유전자 및 그 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질들을 발현하는 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여 엽실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 안트라사이클린을 제조할 수 있는 방법과 이를 통해 제조된 신규한 글리코실화 안트라사이클린을 제공함으로써 기존의 항암제보다 효과적인 항암물질 후보군을 합성할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박제원

경기도 고양시 일산서구 대화동 대화마을 일신건영
602동 1405호

김은지

서울특별시 송파구 잠실동 27 아파트 508동 305호

박성렬

전라남도 광양시 금호동 725 장미연립 13동 302호

정원석

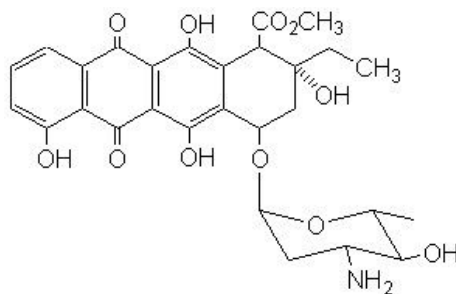
서울특별시 서초구 방배4동 현대2차 홈타운 203동
1301호

특허청구의 범위

청구항 1

에피 로도마이신 D의 생합성 방법에 있어서,

- 1) 첫째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 13과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ371)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하거나,
- 2) 둘째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *stfPII-stfG*(GeneBank 서열번호 AM156932), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 18과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ630)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하거나,
- 3) 셋째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *snogE*(GeneBank 서열번호 AF187532), *snogN*(GeneBank 서열번호 AF187532), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 19와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ631)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하거나,
- 4) 넷째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 20과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ627)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양한 다음,
- 5) 상기 방법에 따라 제조된 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ371, YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631, YJ183/pYJ627과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함을 특징으로 하는 하기 구조식 1로 표시되는 에피 로도마이신 D의 제조방법.

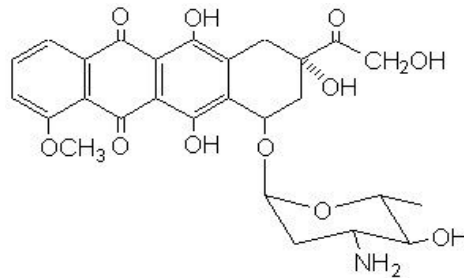


구조식 1

청구항 2

피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drdA-drdB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drdC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237), *dnrV-doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrK-dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425)을 포함하는 하기 도 14와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ546)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양한 다음,

상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ546과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함을 특징으로 하는 하기 구조식 2로 표시되는 에피루비신의 제조방법.



구조식 2

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 강력한 항암작용을 보이면서 부작용이 적은 반합성 개량 안트라사이클린(anthracycline) 계열 항암제 에피루비신(epirubicin)의 생합성 방법 및 신규 당치환체의 제조 방법에 관한 것이다. 뉴클레오타이드-활성화당, 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)-보조적 단백질, 글리코실화 엡실론 로도마이시논(glycosylate ϵ -rhodomycinone)에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여, 엡실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 에피루비신 및 에피루비신의 중간체를 제조할 수 있는 방법과 다양한 뉴클레오타이드-활성화당(nucleotide activating sugar)의 생합성 유전자 및 그 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)-보조적 단백질의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여 엡실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 안트라사이클린 유도체를 제조할 수 있는 방법과, 이를 통해 제조된 신규한 글리코실화 안트라사이클린 유도체에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 안트라사이클린 계열 항암물질은 네 개의 환으로 이루어진 아글리콘(aglycon)에 하나 또는 그 이상의 데옥시당(deoxy sugar)을 갖는 구조적 특징이 있다. 대표적인 안트라사이클린 계열 항암물질인 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin)은 1960년대에 발견된 후로 전통적인 항암화학요법제로 사용되어 왔다(Hutchinson C.R. (1997) *Chem. Rev.* 97:2525-2535). 생물학적 활성을 지닌 천연물질은 하나 또는 그 이상의 데옥시당(deoxy sugar)을 갖는다. 특히, 데옥시당(deoxy sugar)은 안트라사이클린 계열 항암물질이 체 내 목표 분자인 DNA를 인식하는데 직접적으로 작용하는 등 생물학적 활성에 매우 중요한 역할을 한다(Chen K.X. et al. (1985) *Nucleic acids Res.* 14:2251-2267).

<3> 스트렙토미세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) 균주는 최근 조합 생합성의 호스트(host)로서, 그리고 다른 종의 스트렙토미세스(*Streptomyces*)속 균주 유래 마크로라이드(macrolide) 계열 항생제의 이중 발현 균주으로써 발전되어져 왔다(Yoon Y.J. et al. (2002) *Chem. Biol.* 9:203-214; Hong J.S.J. et al. (2004) *FEMS. Microbiol. Lett.* 238:291-399; Jung W.S. et al. (2006) *Appl. Microbiol Biotechnol* 72: 763-769; 윤여준, 정원석, 한아름 "신규한 올리보실 틸락톤 및 그 제조 방법" 한국 특허출원 제 10-2007-0063678호 (2007.06.29);

김재중, 임시규, 윤여준, 박제원, 이미옥, 이보미, 김동환, 유정현, 이금순 "겐타마이신 A2와 그 전구체를 생산하는 방법 및 제조합 균주" 특허출원 제10-2007-68464호 (2007.07.09); 김재중, 임시규, 윤여준, 테비 바스넷, 박제원, 정원석, 박성렬 "케토라이드류 항생물질의 전구체인 5-O-데소사미닐 에리스노라이드 A의 조합생합성방법 및 제조합 균주개발" 특허출원 제10-2007-94101호 (2007.09.17); 윤여준, 정원석, 정순정, 박성렬, 박제원 "pikD 조절유전자의 발현백터를 이용한 스트렙토미세스 베네주엘라에 (*Streptomyces venezuelae*) 에서 폴리케타이드 (polyketide) 의 생산성 증가방법" 한국 특허출원 제 10-2007-0107787호 (2007.10.25)). 또한 유전적 조작이 용이함과 함께, 다른 방선균(*Streptomyces species*)과 비교하여 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 균주의 빠른 성장속도로 인해 대사산물의 생산에 단기간(3-4일)의 배양이 가능하게 되었다(Xue Y. et al. (2001) *Metab. Eng.* 3:15-26; Jung W.S. et al. (2006) *Appl. Microbiol Biotechnol* 72: 763-769).

<4> 이에 본 발명자는 상기와 같은 점을 고려하여 뉴클레오타이드-활성화 당, 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질, 엡실론 로도마이시논의 글리코실화 후 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여 엡실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 에피루비신 및 에피루비신의 중간체를 제조할 수 있는 방법과 이 방법을 통해 신규한 글리코실화 안트라사이클린의 생산을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

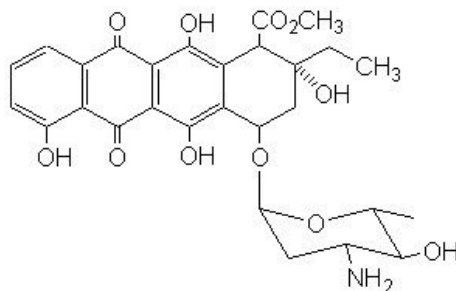
발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<5> 본 발명은 기존의 에피루비신 반합성 생산 공정이 갖는 고가의 출발물질, 분리정제 공정 단계에서의 저수율, 분리정제시 고비용 부담과 같은 단점들을 극복하기 위한 생물 시스템을 이용한 에피루비신 생산 방법을 다음과 같이 제공한다. 뉴클레오타이드-활성화 당, 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질, 글리코실화 엡실론 로도마이시논에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여 엡실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 에피루비신 및 에피루비신의 중간체를 제조할 수 있는 방법과 다양한 뉴클레오타이드-활성화 당의 생합성 유전자 및 그 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여 엡실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 안트라사이클린을 제조함을 그 목적으로 한다.

과제 해결수단

<6> 본 발명의 하기 구조식 1로 표시되는 에피 로도마이신 D는 하기 네 가지 경로를 통해 생합성이 가능하다.



구조식 1

<7>
<8>
<9> 첫째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 13과 같은 개열지도를 가지는 제조합 벡터(pYJ371)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<10> 둘째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에

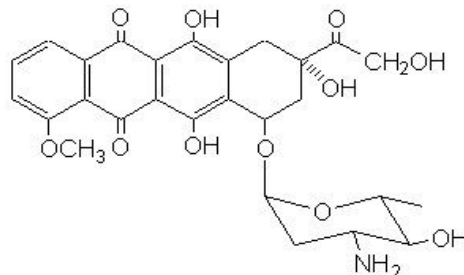
stfPII-stfG(GeneBank 서열번호 AM156932), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 18과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ630)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<11> 넷째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *rrrA-rrrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *rrrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *snogE*(GeneBank 서열번호 AF187532), *snogW*(GeneBank 서열번호 AF187532), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 19와 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ631)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<12> 넷째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *rrrA-rrrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *rrrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 20와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ627)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<13> 본 발명에서 얻고자 하는 에피 로도마이신 D(epi-rhodomyacin D)는 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ371, YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631, YJ183/pYJ627과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축하여 분리정제한다.

<14> 본 발명의 하기 구조식 2로 표시되는 에피루비신(epirubicin)은 하기의 경로를 통해 생합성 가능하다.

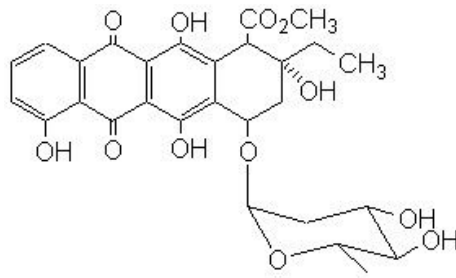


<15> 구조식 2

<16> 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *rrrA-rrrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *rrrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237), *dnrV-doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrK-dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425)을 포함하는 하기 도 14와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ546)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<18> 본 발명에서 얻고자 하는 에피루비신은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ546과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축하여 분리정제한다.

<19> 본 발명의 하기 구조식 3로 표시되는 신규한 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논(7-O-D-oliviosyl ε-rhodomyacinone)은 하기의 경로를 통해 생합성 가능하다.

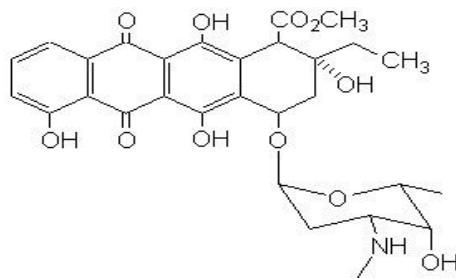


구조식 3

피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터(cluster) PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *draA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *oleV*(GeneBank 서열번호 AF055579), *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579), *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)을 포함하는 하기 도 15와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ613)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

본 발명에서 얻고자 하는 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ613과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축하여 분리정제한다.

본 발명의 하기 구조식 4로 표시되는 신규한 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논(7-O-L-3'-N-methyl daunosaminyl ϵ -rhodomycinone)은 하기의 경로를 통해 생합성 가능하다.

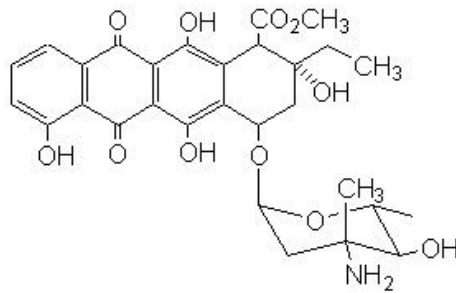


구조식 4

피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *draA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*, *dnmV*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237) *aknX2*(GeneBank 서열번호 AF264025)을 포함하는 하기 도 16과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ656)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

본 발명에서 얻고자 하는 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ656과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축하여 분리정제한다.

본 발명의 하기 구조식 5로 표시되는 신규한 7-O-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논(7-O-epi-L-vancosaminyl ϵ -rhodomycinone)은 하기의 경로를 통해 생합성 가능하다.



구조식 5

<30>

<31>

<32>

피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmIII*(GeneBank 서열번호 U77891), *evaA*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaB*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaC*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaD*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998)을 포함하는 하기 도 17과 같은 개열지도도를 가지는 재조합 벡터(pYJ714)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<33>

본 발명에서 얻고자 하는 7-*O*-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ714 과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축하여 분리정제한다.

효과

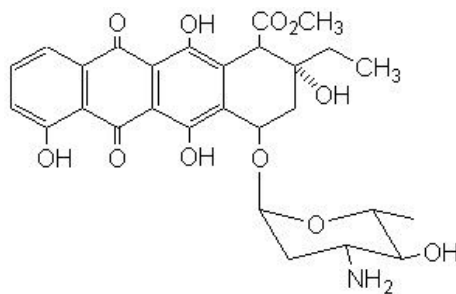
<34>

이상 상기 과제 해결 수단을 통하여 설명한 바와 같이, 뉴클레오타이드-활성화 당, 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질, 글리코실화 엡실론 로도마이시논에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체를 제조하여 엡실론 로도마이시논과 함께 배양함으로써 에피루비신 및 에피루비신의 중간체를 제조할 수 있는 방법과 이 방법을 통해 신규한 글리코실화 안트라사이클린을 제공함으로써 기존의 에피루비신 생산을 위한 반합성 방법에 비해 부산물의 분리정제가 쉽고 기존의 항암제보다 높은 항암활성, 낮은 부작용을 갖는 효과적인 항암물질을 합성할 수 있어 본 발명은 생물의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<35>

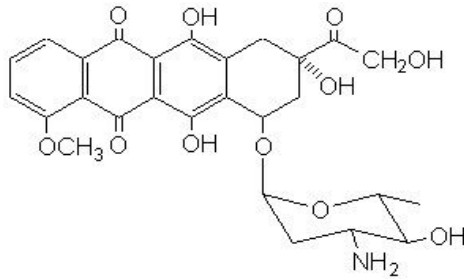
본 발명은 하기 구조식 1, 구조식 2, 구조식 3, 구조식 4 및 구조식 5으로 표시되는 에피 로도마이신 D(epi-rhodomyacin D), 에피루비신, 7-*O*-D-올리보실 엡실론 로도마이시논(7-*O*-D-oliviosyl ϵ -rhodomyacinone), 7-*O*-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논(7-*O*-L-3'-N-methyl daunosaminyll ϵ -rhodomyacinone), 7-*O*-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논(7-*O*-epi-L-vancosaminyll ϵ -rhodomyacinone) 및 이의 제조방법을 제공한다:



<36>

<37>

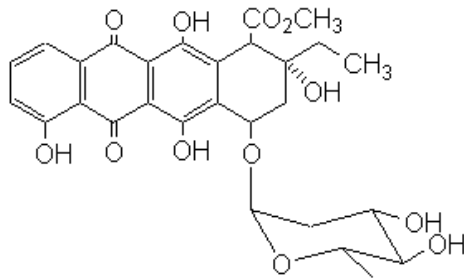
구조식 1



<38>

<39>

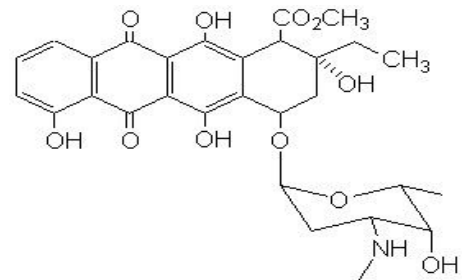
구조식 2



<40>

<41>

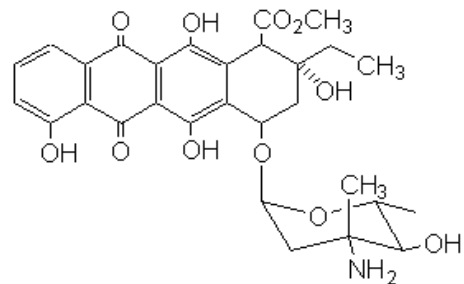
구조식 3



<42>

<43>

구조식 4



<44>

<45>

구조식 5

<46> 본 발명의 에피 로도마이신 D는 하기의 네 가지 경로를 통해 생합성 가능하다.

<47> 1) 첫째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmI*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 13과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ371)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이신과 함께 배양하는 것이다.

<48> 2) 둘째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민

(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *rrrA-rrrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *rrrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *stfPII-stfG*(GeneBank 서열번호 AM156932), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmM*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 18과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ630)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<49> 3) 셋째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *rrrA-rrrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *rrrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *snogE*(GeneBank 서열번호 AF187532), *snogM*(GeneBank 서열번호 AF187532), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmM*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 19와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ631)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<50> 4) 넷째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *rrrA-rrrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *rrrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmM*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)을 포함하는 하기 도 20과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ627)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

<51> 본 발명에서 얻고자 하는 에피 로도마이신 D는 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ371, YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631, YJ183/pYJ627과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함으로써 분리정제할 수 있다.

<52> 본 발명에서는 뉴클레오타이드 활성화 당, 에피-L-다우노사민(epi-L-daunosamine)의 생합성 시 필요한 4-케토환원효소의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 발현 효소의 유전적으로 조작된 돌연변이체를 제공하며 이로써 안트라사이클린의 외인성 원료(exogenous source)를 주입했을 때 에피 로도마이신 D를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 에피 로도마이신 D를 제공한다.

<53> 스트렙토미세스 아버미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 유래의 AvrE 4-케토환원효소를 발현하는 돌연변이체 YJ183/pYJ371을 엡실론 로도마이시논을 첨가한 성장배지에서 배양시킴으로써 에피 로도마이신 D를 생산할 수 있다. AvrE 4-케토환원효소를 이용하여 에피 다우노사민을 이미 합성한 바 있다(Madduri K. et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 16:69-74).

<54> 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*Amycolaptosis orientalis*) 유래의 에피-L-반코사민 생합성 유전자 중 하나인 EvaE 4-케토환원효소를 발현하는 돌연변이체 YJ183/pYJ627를 엡실론 로도마이시논을 첨가한 성장배지에서 배양시킴으로써 에피 로도마이신 D를 생산할 수 있다. 에피-L-반코사민 뿐만 아니라 에피-L-다우노사민을 생산할 수 있는 상기의 결과를 통해 EvaE의 기질 유연성을 확인할 수 있었고 에피-L-다우노사민의 생합성에 있어 유용한 단백질을 선별하였다고 할 수 있다.

<55> 본 발명에서는 뉴클레오타이드 활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 발현 효소의 유전적으로 조작된 돌연변이체를 제공하며, 이로써 안트라사이클린의 외인성 원료(exogenous source)를 주입했을 때 에피 로도마이신 D를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 에피 로도마이신 D를 제공한다.

<56> 본 발명에서는 스트렙토미세스 갈릴라에우스(*Streptomyces galilaeus*) 유래의 AknS 글리코실트랜스퍼라제의 데옥시당(deoxy sugar)과 아글리콘(aglycon)에 대한 유연성을 확인한다. 엡실론 로도마이시논을 AknS/AknT 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍을 발현하는 돌연변이체 YJ183/pYJ371(TDP-에피-L-다우노사민)에 첨가함에 따라 에피 로도마이신 D를 생산하는데 성공하였다. 기존의 연구 결과를 통해 AknS는 본래의 기질인 TDP-L-로도사민(rhodamine)과 TDP-L-다우노사민(daunosamine), TDP-2-데옥시-L-푸코스(2-deoxy-L-fucose)을 붙일 수 있다고 알려져 있다(Leimkuhler C. et al. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129:10546-10550). 본 발명의 결과를 통해

AknS가 TDP-에피-L-다우노사민도 받아들일 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

- <57> 본 발명에서는 스트렙토미세스 스테피스벌젠시스(*Streptomyces steffisburgensis*) 유래의 StfG 글리코실트랜스퍼라제의 테옥시당(deoxy sugar)과 아글리콘(aglycon)에 대한 유연성을 확인한다. 엡실론 로도마이시논을 StfG/StfPII 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍을 발현하는 돌연변이체 YJ183/pYJ630(TDP-에피-L-다우노사민)에 첨가함에 따라 에피 로도마이신 D를 생산하는데 성공하였다. 기존의 연구 결과를 통해 StfG는 본래의 기질인 NDP-L-람노스(rhamnose), NDP-L-올리보스(olivose), NDP-L-디지토속스(digitoxose), NDP-L-올랜드로스(oleandrose), NDP-L-미카로스(mycarose), NDP-L-아미세토스(amicetose), NDP-D-보이비노스(boivinose), NDP-D-올리보스(olivose), NDP-D-디지토속스(digitoxose)을 붙일 수 있다고 알려졌다(Olano C. et al. (2008) *Chem. Bio. Chem.* 9:1-11). 본 발명의 결과를 통해 StfG가 기존의 알려진 테옥시당(deoxy sugar) 외에도 TDP-에피-L-다우노사민도 받아들일 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.
- <58> 본 발명에서는 스트렙토미세스 노갈라터(*Streptomyces nogalater*) 유래의 SongE 글리코실트랜스퍼라제의 테옥시당(deoxy sugar)과 아글리콘(aglycon)에 대한 유연성을 확인한다. 엡실론 로도마이시논을 SnogE/SnogN 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍을 발현하는 돌연변이체 YJ183/pYJ631(TDP-에피-L-다우노사민)에 첨가함에 따라 에피 로도마이신 D를 생산하는데 성공하였다. 기존의 연구 결과를 통해 SnogE는 본래의 기질인 NDP-L-노갈로스(nogalose)을 붙일 수 있다고 예측되었다(Torkkell S. et al. (2001) *Mol. Genet. Genomics* 266:276-288). 본 발명의 결과를 통해 SnogE가 기질로 TDP-에피-L-다우노사민을 받아들일 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.
- <59> 본 발명에서는 에피루비신을 하기와 같은 경로를 통해 생합성 가능하다.
- <60> 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 테소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *draA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237), *dnrV-doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrK-dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425)을 포함하는 하기도 14와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ546)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.
- <61> 본 발명에서 얻고자 하는 에피루비신은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ546과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함으로써 분리정제할 수 있다.
- <62> 본 발명의 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논은 하기와 같은 경로를 통해 생합성 가능하다.
- <63> 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 테소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *draA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *oleV*(GeneBank 서열번호 AF055579), *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579), *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)을 포함하는 하기도 15와 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ613)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.
- <64> 본 발명에서 얻고자 하는 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ613과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함으로써 분리정제할 수 있다.
- <65> 본 발명의 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사민일 엡실론 로도마이시논은 하기와 같은 경로를 통해 생합성 가능하다.
- <66> 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 테소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *draA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ-dnmU*, *dnmV*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237) *aknX2*(GeneBank 서열번호 AF264025)을 포함하는 하기도 16과 같은 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ656)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.

- <67> 본 발명에서 얻고자 하는 7-*O*-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ656과 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함으로써 분리정제할 수 있다.
- <68> 본 발명의 7-*O*-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논은 하기와 같은 경로를 통해 생합성 가능하다.
- <69> 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 독소루비신 내성 유전자 *drrA-drrB*(GeneBank 서열번호 M73758) 및 *drrC*(GeneBank 서열번호 L76359)를 삽입한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) YJ183에 *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *evaA*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaB*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaC*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaD*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998)을 포함하는 하기도 17과 같은 개열지도도를 가지는 재조합 벡터(pYJ714)로 형질전환하여 얻은 미생물을 엡실론 로도마이시논과 함께 배양하는 것이다.
- <70> 본 발명에서 얻고자 하는 7-*O*-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논은 상기 형질전환된 미생물 YJ183/pYJ714와 엡실론 로도마이시논의 배양물을 메탄올과 물의 동량 혼합용매로 추출하고 메탄올로 농축함으로써 분리정제할 수 있다.
- <71> 본 발명을 통해 AknS 글리코실트랜스퍼라제의 데옥시당(deoxy sugar)에 대한 유연성을 확인한다. 엡실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ613(TDP-D-올리보스), YJ183/pYJ656(TDP-L-3-N-메틸 다우노사민), YJ183/pYJ714(TDP-에피-L-반코사민)에 첨가함에 따라 신규한 글리코실화 안트라사이클린을 각각 생산하였다. 이러한 결과를 통해 AknS가 데옥시당(deoxy sugar)에 대해 넓은 기질 유연성을 갖는다는 사실을 알 수 있었다.
- <72> 신규 항생물질의 개발을 위한 조합 생합성 기법의 단점 중 하나는 하이브리드(hybrid) 화합물의 현저하게 낮은 수율이다(Tang L. et al. (2001) *Chem. Biol.* 8:547-555; Yoon Y.J. et al. (2002) *Chem. Biol.* 9:203-214). 엡실론 로도마이시논을 주입한 YJ183/pYJ371(TDP-에피-L-다우노사민)으로부터 제조한 에피 로도마이신 D와 YJ183/pYJ613(TDP-D-올리보스), YJ183/pYJ656(TDP-L-3-N-메틸 다우노사민), YJ183/pYJ714(TDP-에피-L-반코사민)로부터 제조한 신규한 안트라사이클린 7-*O*-D-올리보실 엡실론 로도마이시논, 7-*O*-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논, 7-*O*-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논은 AknS, StfG 및 SnogE의 촉매적 특이성에 의하여 데옥시당(deoxy sugar)이 엡실론 로도마이시논의 C-7 위치의 산소에 도입된 것으로 판단되었다.
- <73> 새롭게 얻은 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체는 아글리콘(aglycon)의 다양한 구조의 글리코실화 안트라사이클린의 생합성을 위한 단순한 시스템을 제공한다. 더 나아가 본 발명은 아글리콘(aglycon) 및 데옥시당(deoxy sugar)에 대한 글리코실트랜스퍼라제의 유연성을 조사하였다. 또한 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)는 다른 스트렙토미세스 속(*Streptomyces* genus) 균주에 비하여 더 빠르게 성장하는 이점을 가져 신규한 글리코실화 안트라사이클린의 생합성에 유리하다.
- <74> 이하, 본 발명을 실시예에 대해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <75> **실시예 1: 박테리아 계통, 배양 조건 및 유전적 조작**
- <76> 스트렙토미세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*) ATCC 15439를 돌연변이체 제조를 위해 사용하였다. 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 돌연변이체는 적절한 항생제, 타이오스트렙톤(Thiostrepton, 0.025mg/mL)가 포함된 R2YE배지에서 배양하였다. ISP2 배지에서 배양시킨 스트렙토미세스 페우세티우스(*Streptomyces peucetius*) ATCC 29050, 스트렙토미세스 갈릴라에우스(*S. galilaeus*) ATCC 31615, 스트렙토미세스 노갈라터(*S. nogalater*) ATCC 27451, 스트렙토미세스 스테피스버그렌시스(*S. steffisburgensis*) NRRL 3193, 스트렙토미세스 아버미틸리스(*S. avermitilis*) ATCC 31267, 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*A. orientalis*) NRRL 18098를 계놈 DNA 제조를 위해 사용하였다. 유전적 조작은 공인된 과정에 따라서 *E. coli* DH5 α 내에서 수행되었다(Sambrook J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). 리트머스 28(Litmus 28, New England Biolabs), T-이지 벡터(T-easy vector, Promega)가 서브클로닝을 위해 사용되었다.
- <77> **실시예 2: 에피루비신을 비롯한 신규한 글리코실화 안트라사이클린 제조를 위한 독소루비신에 대해 내성을 갖는 미생물 제조**

<78>

에피루비신을 비롯하여 신규한 글리코실화 안트라사이클린 제조를 위하여 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)의 *Pik PKS* 및 *des* 유전자 클러스터-결실 돌연변이체 YJ028(Jung W.S. et al. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1373-81)에 독소루비신에 대한 자가 내성을 부여하여 글리코실화 안트라사이클린의 안정한 생산이 이루어져야 한다. 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*) 유래의 *drdA-drdB*(GeneBank 서열번호 M73758), *drdC*(GeneBank 서열번호 L76359) 독소루비신 내성 유전자가 포함된 발현벡터 pSABC를 제작하기 위해 하기와 같은 방법을 수행하였다. *drdA-drdB*(GeneBank 서열번호 M73758) 유전자는 서열 1 및 2의 프라이머(primer)를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-CCCAGATCTCCATGTGACTACTGGGGCGTTAG-3' 및 5'-GGGAAGCTTTCCGGTACCTGTGTGTCAGTGGGCGT-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *drdC*(GeneBank 서열번호 L76359) 유전자는 서열 3 및 4의 프라이머를 사용하여 폴리머라제 체인 반응(Polymerase chain reaction, PCR)에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-CCCAAGCTTCCGTCATGTGAGGATGCTCATGC-3' 및 5'-GGGTCTAGAGGGTTAATTAAGTACACCCGGGTCAAGGATCA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *drdA-drdB*의 PCR 산물은 *Bgl*II와 *Hind*III로 잘려져서 리트머스(Litmus)28의 같은 부위에 클로닝되었다. *drdC*(GeneBank 서열번호 L76359)의 PCR 산물은 *Hind*III와 *Xba*I으로 잘려져서 *drdA-drdB*(GeneBank 서열번호 M73758)가 클로닝(cloning)된 Litmus28의 같은 부위에 클로닝되었다. 이렇게 생성된 *drdA-drdB*(GeneBank 서열번호 M73758)와 *drdC*(GeneBank 서열번호 L76359)가 클로닝된 Litmus28을 *Bgl*II와 *Xba*I으로 잘려져서 *Bam*HI과 *Xba*I으로 잘려진 pSET152에 클로닝되었다. 상기와 같이 제작된 pSABC는 YJ183을 생성하기 위하여 돌연변이체 YJ028의 염색체 DNA 안으로 통합되었다. 상기와 같이 제작된 돌연변이체 YJ183은 독소루비신(doxorubicin) 15 μ g/ml의 SGGP에 배양 시 매우 잘 자라는 반면 pSABC가 통합되지 않은 돌연변이체 YJ028은 독소루비신(doxorubicin) 15 μ g/ml의 SGGP에 배양 시 자라지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해 YJ183의 염색체 DNA에 통합된 독소루비신(doxorubicin) 내성 유전자 *drdA-drdB*(GeneBank 서열번호 M73758), *drdC*(GeneBank 서열번호 L76359)가 발현되어 그 내성기능을 수행하고 있음을 확인하였다.

<79>

실시예 3: 발현 플라스미드와 돌연변이체의 제조

<80>

TDP-에피-L-다우노사민의 생합성과 글리코실트랜스퍼라제에 의한 형질전환을 위한 기본 발현벡터가 하기와 같이 제작되었다. *dnmQ-dnmS*(GeneBank 서열번호 L47164) 유전자는 서열 5 및 6의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-AGATCTTTAATTAAGATATCACAGTGTGAGGAGCACGA-3' 및 5'-TCTAGACATATGGCTACGACAAGACAGCGA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762) 유전자는 서열 7 및 8의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTTAATCTCGCCACGCCGACCGTT-3' 및 5'-TCTAGAGAGCTCCTCGTAGGCGGCCTT-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891) 유전자는 서열 9 및 10의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTATCGATCTCGCAGCCTCTCGTTGACGAAGA-3' 및 5'-TCTAGAGTCAGTCCAGCCGTCGCCGGTGA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891) 유전자는 서열 11 및 12의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTGCTAGCTCAAACACCGCACCGTCACCCGGG-3' 및 5'-TCTAGAAACAGGACGCGCACGGGAAGTCA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633) 유전자는 서열 13 및 14의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTCTCCGATCCTTACGAGGAGTC-3' 및 5'-TCTAGAATGTCGCGCTCACCCGCTCC-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523) 유전자는 서열 15 및 16의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 아버미틸리스(*S. avermitilis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTTACGTAGCACCAGGAATTCGAGCGCCGCTA-3' 및 5'-TCTAGACCTAGGTCGACGAGAAGCTGTGACGCCGA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237) 유전자는 서열 17 및 18의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTCCGACAAGGAGTCACGTGTCC-3' 및 5'-TCTAGAGAATTCCCGCTAGCTCACAGGCTTC-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)의 PCR 산물은 *Pac*I 및 *Xba*I으로 잘려져서 Litmus28의 같은 부위에 클로닝되었다. *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523)의 PCR 산물은 *Pac*I 및 *Xba*I으로 잘려져서 *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 클로닝된 Litmus28이 *Pac*I 및 *Spe*I으로 잘려진 부위에 클로닝된다. 상기와 같은 전략으로 *dnmZ-dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *desIII-desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmQ-dnmS*(GeneBank 서열번호 L47164)가 차례대로 클로닝된다. 결과적으로 *dnmQ*(GeneBank 서열번호 L47164), *dnmS*(GeneBank 서열번호 L47164), *desIII*(GeneBank 서열번호

AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 Litmus28에 포함된 pYJ351이 생성된다. 먼저 TDP-에피-L-다우노사민의 생합성과 *AknS/AknT*에 의한 형질전환을 위하여 하기와 같이 제작되었다. *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025) 유전자는 서열 19 및 20의 프라이머(primer)를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 갈릴라우스(*S.galilaeus*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-GATATCCACGTCCCGAGGAGACTGCCGTG-3' 및 5'-AAGCTTTCACGCGGAGGTGTCAGGGGAA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *aknT-aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025)의 PCR 산물은 *EcoRV* 및 *NdeI*으로 잘려져 pYJ351의 같은 부위에 클로닝되어 pYJ355를 제작하였다. pYJ355를 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘라 얻은 *aknT*(GeneBank 서열번호 AF264025), *aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 포함된 프래그먼트(fragment)를 pSE34의 같은 부위에 클로닝하여 pYJ371을 제작하였다. 또한 TDP-에피-L-다우노사민의 생합성과 *StfG/StfPII*에 의한 형질전환을 위한 발현벡터가 하기와 같이 제작되었다. *stfPII-stfG*(GeneBank 서열번호 AM156932) 유전자는 서열 21 및 22의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 스테피스벌젠시스(*S.steffisburgensis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAGATATCGTCGACCGCCACGCTCTGTTCA-3' 및 5'-TCTAGACATATGCCCATGGATAGGTGCGGGGCTTAC-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *stfPII-stfG*(GeneBank 서열번호 AM156932)의 PCR 산물은 *EcoRV* 및 *NdeI*으로 잘려져 pYJ351의 같은 부위에 클로닝되어 pYJ628을 제작하였다. pYJ628을 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘라 얻은 *stfG*(GeneBank 서열번호 AM156932), *stfPII*(GeneBank 서열번호 AM156932), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 포함된 프래그먼트(fragment)를 pSE34의 같은 부위에 클로닝하여 pYJ630을 제작하였다. 또한 TDP-에피-L-다우노사민의 생합성과 *SnogE/SnogN*에 의한 형질전환을 위하여 하기와 같이 플라스미드가 제작되었다. *songE*(GeneBank 서열번호 AF187532) 유전자는 서열 23 및 24의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 노갈라터(*S.nogalater*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAGATATCCTGACGTCGCGGACTTCCGGTGAC-3' 및 5'-TCTAGACATATGTCCGGGCCCTCGGTGTGTCACGCG-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *songN*(GeneBank 서열번호 AF187532) 유전자는 서열 25 및 26의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트렙토미세스 노갈라터(*S.nogalater*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAGATATCCTGACGTCGCGCTGGAAGCTGGTT-3' 및 5'-TCTAGAGTCCATGGAGAGTCCCTTCCGTTG-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *snogE*(GeneBank 서열번호 AF187532) 유전자의 PCR 산물은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 Litmus28의 같은 부위에 클로닝되었다. *snogN*(GeneBank 서열번호 AF187532)의 PCR 산물은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 *songE*(GeneBank 서열번호 AF187532)가 포함된 Litmus28의 *PacI* 및 *SpeI*으로 잘려진 부위에 클로닝된 후 *EcoRV* 및 *NdeI*으로 잘려진 *snogN*(GeneBank 서열번호 AF187532)과 *snogE*(GeneBank 서열번호 AF187532)가 포함된 프래그먼트(fragment)는 pYJ351의 같은 부위에 클로닝되어 pYJ629를 제작하였다. pYJ629를 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘라 얻은 *snogN*(GeneBank 서열번호 AF187532), *snogE*(GeneBank 서열번호 AF187532), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 포함된 프래그먼트(fragment)를 pSE34의 같은 부위에 클로닝하여 pYJ631을 제작하였다. 또한 TDP-에피-L-다우노사민의 생합성에 있어 4-케토환원효소로 *EvaE*를 사용하고 TDP-에피-L-다우노사민의 *AknS/AknT*에 의한 형질전환을 위하여 하기와 같이 플라스미드(plasmid)가 제작되었다. *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자는 서열 27 및 28의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*A.orientalis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-CGGTTAATTAAGTTACGTAAGTCTCGCGTGCATCA-3' 및 5'-CGGTCTAGACCTAGGACACGCGTGGTCATGCGGAGCCT-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자의 PCR 산물은 *SnaBI* 및 *AvrII*로 잘려져 pYJ355의 같은 부위에 클로닝되어 pYJ620을 제작하였다. pYJ620을 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘라 얻은 *aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *aknT*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 포함된 프래그먼트(fragment)를 pSE34의 같은 부위에 클로닝하여 pYJ627를 제작하였다.

- <81> 에피루비신의 제조를 위해 TDP-에피-L-다우노사민의 생합성과 AknS/AknT에 의한 TDP-에피-L-다우노사민의 형질 전환, 에피 로도마이신 D에서 에피루비신으로의 전환에 필요한 단백질의 발현을 위한 플라스미드 pYJ546을 제작하였다. *dnrV-doxA*(GeneBank 서열번호 U77891) 유전자는 서열 29 및 30의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트랩토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTCGTGTGCCGATCCATCGAAA-3' 및 5'-TCTAGAATCAGCGCAGCCAGACGGGCAGT-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnrK-dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425) 유전자는 서열 31 및 32의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트랩토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTCTACCTCGGCACCTACCGCCAGCT-3' 및 5'-TCTAGATCACTGTGCGGCCCGGGTGTG-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *ermE** 프로모터(promoter)는 서열 33 및 34의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 *ermE** 프로모터가 포함된 pSE34로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTGAGCTCGGTACCAGCCCG-3' 및 5'-TCTAGATACCAACCGGCACGATTG-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnrK-dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425) 유전자의 PCR 산물은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 Litmus28의 같은 부위에 클로닝한 후 *dnrV-doxA*(GeneBank 서열번호 U77891) 유전자의 PCR 산물은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 *dnrK*(GeneBank 서열번호 L40425), *dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425) 유전자가 포함된 Litmus28의 *PacI* 및 *SpeI*으로 잘려진 부위에 클로닝한다. 이와 같은 전략으로 *dnrV*(GeneBank 서열번호 U77891), *doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *ermE** 프로모터를 추가적으로 클로닝한다. 결과적으로 *ermE** 프로모터, *dnrV*(GeneBank 서열번호 U77891), *doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrV*(GeneBank 서열번호 U77891), *doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrK*(GeneBank 서열번호 L40425) 및 *dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425) 유전자가 포함된 Litmus28을 제작하였다. 이 플라스미드를 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘라 얻은 *ermE** 프로모터, *dnrV*(GeneBank 서열번호 U77891), *doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrV*(GeneBank 서열번호 U77891), *doxA*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnrK*(GeneBank 서열번호 L40425) 및 *dnrP*(GeneBank 서열번호 L40425) 프래그먼트(fragment)를 pSE34의 같은 부위에 클로닝한다. 그 후 *PacI* 및 *SpeI*으로 잘라 pYJ355를 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘라 얻은 *aknT*(GeneBank 서열번호 AF264025), *aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmT*(GeneBank 서열번호 U77891), *dnmZ*(GeneBank 서열번호 AF006633), *dnmU*(GeneBank 서열번호 AF006633), *avrE*(GeneBank 서열번호 AB032523), *dnmJ*(GeneBank 서열번호 M80237)가 포함된 프래그먼트(fragment)와 클로닝하여 pYJ546을 얻었다.
- <82> TDP-D-올리보스와 AknS/AknT에 의한 형질전환을 위하여 하기와 같이 플라스미드가 제작되었다. pYJ146(Hong et al. (2004) *FEMS. Microbiol. Lett.* 238:391-399)은 *XbaI* 및 *HindIII*로 잘려 얻은 *oleV*(GeneBank 서열번호 AF055579), *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579) 및 *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)이 포함된 프래그먼트(fragment)가 pSE34의 같은 부위에 클로닝되었다. pYJ355이 *PacI* 및 *NheI*으로 잘려져서 *aknT*(GeneBank 서열번호 AF264025), *aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891)가 포함된 프래그먼트(fragment)는 *oleV*(GeneBank 서열번호 AF055579), *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579) 및 *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)이 포함된 pSE34의 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려진 부위에 클로닝되어 pYJ613이 제작되었다.
- <83> TDP-L-3'-N-메틸 다우노사민과 AknS/AknT에 의한 형질전환을 위하여 하기와 같이 플라스미드가 제작되었다. *aknX2*(GeneBank 서열번호 AF264025) 유전자는 서열 35 및 36의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트랩토미세스 갈릴라에우스(*S. galilaeus*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTCAATTGCGCCGACGGAGGAACAGACATGT-3' 및 5'-TCTAGACTCAGCGTGTTCGGAACACCGA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmV* 유전자는 서열 37 및 38의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 스트랩토미세스 페우세티우스(*S. peucetius*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTTACGTATCACGCGGAGACGGGTGAGCGGA-3' 및 5'-TCTAGACCTAGGTCGTGGAAGCCTGTGAGCTAGGC-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *dnmV*(GeneBank 서열번호 AF006633) 유전자의 PCR 산물은 *SnaBI* 및 *AvrII*로 잘려져서 pYJ355의 같은 부위에 클로닝되어 pYJ346이 제작되었다. *aknX2*(GeneBank 서열번호 AF264025) 유전자의 PCR 산물은 *MfeI* 및 *XbaI*으로 잘려져서 pYJ346의 *EcoRI* 및 *XbaI*으로 잘려진 부위에 클로닝되어 pYJ656이 제작되었다.
- <84> TDP-에피-L-반코사민과 AknS/AknT에 의한 형질전환을 위하여 하기와 같이 플라스미드가 제작되었다. *evaA*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자는 서열 39 및 40의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*A. orientalis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTGCTAGCCGCGGCTCGCCGGCTGAACACGAA-3' 및 5'-TCTAGACTCATGCACCTCCCGAGGCTGGG-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *evaB*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자는 서열 41 및 42의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*A. orientalis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-TTAATTAAACTAGTGACATCAGTTCATGGAAAGGC-3' 및 5'-TCTAGAGTTGTCAGAGGGTCGACAGCACTT-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *evaC*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자는 서열 43 및 44의 프라이머를 사용

하여 PCR에 의해 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*A.orientalis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다:5'-TTAATTAAACTAGTTCCTCCACAAATTCGTCGACGACAAG-3' 및 5'-TCTAGATTTTGGCAGATGGCGATCACGTCA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *evaD*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자는 서열 45 및 46의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 아미코랍토시스 오리엔탈리스(*A.orientalis*)의 게놈 DNA로부터 증폭되었다:5'-TTAATTAAACTAGTGACCTCTGACAACCTCCCACTACA-3' 및 5'-TCTAGATGTGGGCAAGCAGTCAGGTCGAGA-3'(밑줄친 부분은 제한 부분임). *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자의 PCR 산물은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 Litmus28의 같은 부위에 클로닝되었다. *evaD*(GeneBank 서열번호 AJ223998) 유전자의 PCR 산물은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998)가 포함된 Litmus28이 *PacI* 및 *SpeI*으로 잘려진 부위에 클로닝되었다. 이와 같은 전략으로 *evaC*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaB*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaA*(GeneBank 서열번호 AJ223998)가 차례대로 클로닝되었다. 결과적으로 제작된 *evaA*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaB*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaC*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaD*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998)가 포함된 Litmus28은 *PacI* 및 *XbaI*으로 잘려져 pSE34의 같은 부위에 클로닝되었다. pYJ355의 *aknT*(GeneBank 서열번호 AF264025), *aknS*(GeneBank 서열번호 AF264025), *desIII*(GeneBank 서열번호 AF079762), *desIV*(GeneBank 서열번호 AF079762), *dnmW*(GeneBank 서열번호 U77891)가 포함된 *PacI*-*NheI* 프래그먼트(fragment)는 *evaA*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaB*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaC*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaD*(GeneBank 서열번호 AJ223998), *evaE*(GeneBank 서열번호 AJ223998)가 포함된 pSE34의 *PacI*/*SpeI* 부위에 클로닝되어 pYJ714가 생성되었다.

<85> 표 1

<86>

균주 또는 플라스미드		특징	참고문헌
균주	<i>S. venezuelae</i> ATCC 15439	야생형	
	YJ028	<i>pikA</i> and <i>pikB</i> (<i>des</i>) deletion mutant	Jung W.S. et al. (2007) <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 76:1373-1381
	YJ183	YJ028/pSABC	본 발명

플라스미드	pSET152	Shuttle vector for <i>E.coli</i> and <i>Streptomyces</i>	Bierman M. et al. (1992) <i>Gene</i> 116:43-49
	pSE34	Shuttle vector for <i>E.coli</i> and <i>Streptomyces</i>	Yoon Y.J. et al (2002) <i>Chem. Biol.</i> 9:203-214
	pSABC	<i>ddlA</i> , <i>ddlB</i> , <i>ddlC</i>	본 발명
	pYJ146	<i>desVII</i> , <i>desVIII</i> , <i>oleV</i> , <i>oleW</i> , <i>urdR</i>	Hong J.S.J. et al. (2004) <i>FEMS. Microbiol. Lett.</i> 238:391-399
	pYJ366	<i>dnmS</i> , <i>dnmQ</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>dnmT</i> , <i>dnmZ</i> , <i>dnmU</i> , <i>avrE</i> , <i>dnmJ</i>	본 발명
	pYJ371	<i>aknS</i> , <i>aknT</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>dnmT</i> , <i>dnmZ</i> , <i>dnmU</i> , <i>avrE</i> , <i>dnmJ</i>	본 발명
	pYJ630	<i>stfG</i> , <i>stfP</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>dnmT</i> , <i>dnmZ</i> , <i>dnmU</i> , <i>avrE</i> , <i>dnmJ</i>	본 발명
	pYJ631	<i>snogE</i> , <i>snogN</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>dnmT</i> , <i>dnmZ</i> , <i>dnmU</i> , <i>avrE</i> , <i>dnmJ</i>	본 발명
	pYJ627	<i>aknS</i> , <i>aknT</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>dnmT</i> , <i>dnmZ</i> , <i>dnmU</i> , <i>evaE</i> , <i>dnmJ</i>	본 발명
	pYJ613	<i>aknS</i> , <i>aknT</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>oleV</i> , <i>oleW</i> , <i>urdR</i>	본 발명
	pYJ656	<i>aknS</i> , <i>aknT</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>dnmT</i> , <i>dnmZ</i> , <i>dnmU</i> , <i>dnmV</i> , <i>dnmJ</i> , <i>aknX2</i>	본 발명
	pYJ714	<i>aknS</i> , <i>aknT</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i> , <i>dnmW</i> , <i>evaA</i> , <i>evaB</i> , <i>evaC</i> , <i>evaD</i> , <i>evaE</i>	본 발명

<87> 표 2 프라이머 목록

<88>

Gene		Sequence(5'-3')	Restriction site
<i>ddlA-ddlB</i>	forward	CCCAGATCTCCATGTGACTACTGGGGCGT TAG	BglII
	reverse	GGGAAGCTTTCGGTACCTGTGTGTCAGTGGGCGT	HindIII
<i>ddlC</i>	forward	CCCAAGCTTCCGTC AATGTGAGGATGCTCATGC	HindIII
	reverse	GGGTCTAGAGGGTAAATTAACCTAGCACCCGGGTC AAGGATCA	XbaI
<i>dnmQ-dnmS</i>	forward	AGATCTTTAATTAAGATATCACAGTGTGAGGAGCACGA	BglII, PacI, EcoRV
	reverse	TCTAGACATATGGCTACGACAAGACAGCGA	XbaI, NdeI
<i>desIII-desIV</i>	forward	TTAATTAACTAGTTAACTCGCCACGCCGACCGTT	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGAGAGCTCCTCGTAGGCGGCCTT	XbaI
<i>dnmW</i>	forward	TTAATTAACTAGTATCGATCTCGCAGCCTCTCGTTGACGAAGA	PacI, SpeI, ClaI
	reverse	TCTAGAGTCAGTCCAGCCGTCCTCGGCTGA	XbaI
<i>dnmT</i>	forward	TTAATTAACTAGTGCTAGTCAACACCGCACCCTCACCCGGG	PacI, SpeI, NheI
	reverse	TCTAGAAACAGGACGCGCACGGGAACCTCA	XbaI
<i>dnmZ-dnmU</i>	forward	TTAATTAACTAGTCTCCGATCTTACGAGGAGTC	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGAATGTCCGCTCACCCGTCTCC	XbaI
<i>avrE</i>	forward	TTAATTAACTAGTTACGTAGCACCAGGAATTCGAGCGCCGCTA	PacI, SpeI, SnaBI
	reverse	TCTAGACCTAGGTCGACGAGAAGCTGTGACGCCGA	XbaI, AvrII
<i>dnmJ</i>	forward	TTAATTAACTAGTCCGACAAGGAGTCACGTGTCC	PacI, SpeI

	reverse	TCTAGAGAATTCCTCGGCCTAGCTCACAGGCTTC	XbaI, EcoRI
<i>aknT-aknS</i>	forward	GATATCCACGTCCCGAAGGAGACTGCCGTG	EcoRV
	reverse	AAGCTTTCACGCGGAGGTGGTCAGGGGGA	NdeI
<i>stfPII-stfg</i>	forward	TTAATTAAGATATCGCTCGACGCCACGCTCTGTTCGA	PacI, EcoRV
	reverse	TCTAGACATATGCCCATGGATAGGTGCGGGGCTTAC	XbaI, NdeI
<i>snogE</i>	forward	TTAATTAACTAGTACCACGAGCGACTTCCGGTGAC	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGACATATGTCGGGGCCCTCGGTGTGTACGCG	XbaI, NdeI
<i>snogN</i>	forward	TTAATTAAGATATCCTTGACGTGGCTGGAAGCTGGTT	PacI, EcoRV
	reverse	TCTAGAGTCCATGGAGAGTCCCTTCCGTTG	XbaI
<i>evaE</i>	forward	CGGTAAATTAAGTAGTTACGTACTCGCACGCTTCTCGCGTGCATCA	PacI, SpeI, SnaBI
	reverse	CGGTCTAGACCTAGGACACGCGTGGTCATGCGCGAGCCT	XbaI, AvrII
<i>dnrV-doxA</i>	forward	TTAATTAAGTAGTCGTGTGCCGATCCATCGAAA	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGAATCAGCGCAGCCAGACGGGCAGT	XbaI
<i>dnrK-dnrP</i>	forward	TTAATTAAGTAGTCTACCTCGGCACCTACGCCAGCT	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGATCACACTGTGCGGGCCCGGGTGTG	XbaI
<i>ermE*</i>	forward	TTAATTAAGTAGTGAGTCCGTACCAGCCCG	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGATACCAACCGGCACGATTG	XbaI
<i>aknX2</i>	forward	TTAATTAAGTAGTCAATTGCGCCGACGAGGGAACAGACATGT	PacI, SpeI, MfeI
	reverse	TCTAGACTCAGCGTGTTCGCGAACACCGA	XbaI
<i>dnmV</i>	forward	TTAATTAAGTAGTTACGTATCACGCGGAGACGGGTGAGGCGGA	PacI, SpeI, SnaBI
	reverse	TCTAGACCTAGGTCGTGGAAGCCTGTGAGCTAGGC	XbaI, AvrII
<i>evaA</i>	forward	TTAATTAAGTAGTGCTAGCCGCGGCTCGCCGGGTGAACACGAA	PacI, SpeI, NheI
	reverse	TCTAGACTCATGCACCTCCCGAGGCTGGG	XbaI
<i>evaB</i>	forward	TTAATTAAGTAGTGACATCAGTTCATGGAAGGC	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGAGTTGTGACAGGGTCGACAGCACTT	XbaI
<i>evaC</i>	forward	TTAATTAAGTAGTCCCCACAATTCGTCGACGACAAG	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGATTTTGCGACATGGCGATCACGTCA	XbaI
<i>evaD</i>	forward	TTAATTAAGTAGTGACCTCTGACAACCTCCACTACA	PacI, SpeI
	reverse	TCTAGATGTGGCAAGCAGTCAGGTCGAGA	XbaI

<89> TDP-에피-L-다우노사민의 생합성 및 형질전환을 위한 플라스미드 pYJ371, pYJ630, pYJ631, pYJ627, TDP-D-올리보스의 생합성과 형질전환을 위한 플라스미드 pYJ613, TDP-L-3'-N-메틸 다우노사민의 생합성과 형질전환을 위한 플라스미드 pYJ656과, TDP-에피-L-반코사민의 생합성과 형질전환을 위한 플라스미드 pYJ714는 돌연변이체 YJ183 안으로 형질전환되어 YJ183/pYJ371, YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631, YJ183/pYJ627, YJ183/pYJ613, YJ183/pYJ656 및 YJ183/pYJ714를 각각 제조하였다.

<90> **실시예 4: 돌연변이체 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 내에서의 안트라사이클린 생합성 및 분석**

<91> 각각의 돌연변이체 스트렙토미세스 베네주엘라에(*S. venezuelae*) 즉, YJ183/pYJ371, YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631, YJ183/pYJ627, YJ183/pYJ613, YJ183/pYJ656 또는 YJ183/pYJ714를 0.6 mg의 엡실론 로도마이시논을 0.025 mg/ml의 농도로 포함한 60 mL의 R2YE 고체배지에서 30 °C 조건으로 5 일 동안 배양하였다. 결과적으로 얻은 배양물을 물과 메탄올의 동량 혼합용매로 추출한 다음 메탄올로 농축하였다. 얻어진 생성물을 LC(Liquid Chromatography)/MS(Mass spectrometry)와 MS/MS를 조합 이용하여 분석하였다. LC는 이중 이동상[용매 A: 5 mM 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 0.05 % 빙초산 수용액(glacial acetic acid); 용매 B: 5 mM 암모늄 아세테이트, 0.05 % 빙초산에 아세토니트릴(acetonitrile)/메탄올(methanol) 4:1 혼합용매; A: 80-30 %, 25 분, 30-20 %, 15 분, 20 %, 9 분, 20-80 %, 1 분, 80 %, 10 분]이 형성된 페노메넥스 시너지 폴라 알피(Phenomenex Synergi Polar-RP) 컬럼((150 mm×4.6 mm, 4 μm)을 사용하여 유속 0.25 mL/min에서 워터스(Waters, Milford, MA) 모델 2690 분리모듈로 수행하였다. 얻어진 유출물은 마이크로매스 콰트로 LC 트리플 탠덤 사중극자 질량 분석계(Micromass Quattro LC triple tandem quadrupole mass spectrometer)(Beverly, MA)에 주입한 다음 질량 분광학적 데이터는 양-이온 모드(positive-ion mode)로 수집하였다. 얻어진 화합물의 상대량은 LC/MC 크로마토그램으로부터 얻은 피크 세기를 이용하여 비교하였다.

- <92> 먼저, AknS 글리코실트랜스퍼라제, AvrE 4-케토환원효소의 작용에 의하여 어떤 에피 로도마이신 D(도 2b)가 합성되는지를 조사하기 위하여, 엽실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ371의 성장 배지에 첨가하였다. 엽실론 로도마이시논이 주입된 YJ183/pYJ371의 유기 추출물을 LC/MS를 통해 분석한 결과, 에피 로도마이신 D(도 3)에 해당하는 $m/z=558$ 의 피크가 보유시간 38.5 분에서 관찰되어졌다. MS/MS 분석 결과, $m/z=558$ 피크의 에피 로도마이신 D는 에피 로도마이신 D에 해당하는 $m/z=558$ 의 이온 피크, 에피-L-다우노사민의 유실을 나타내는 $m/z=428$ 의 피크, 및 에피-L-다우노사민에 해당하는 $m/z=130$ 의 피크를 나타내었다(도 4). 주입된 엽실론 로도마이시논의 30 %정도가 에피 로도마이신 D로 전환됨을 확인하였다.
- <93> 더 나아가, 엽실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631 또는 YJ183/pYJ627의 성장 배지에 주입하였다. LC/MS 분석을 통해, 에피 로도마이신 D에 해당하는 피크들을, AknS/AknT가 글리코실트랜스퍼라제와 보조적 단백질 쌍(auxiliary protein pair), AvrE가 4-케토환원효소로서 발현되어진 YJ183/pYJ371에 의해 생산된 이들 화합물들의 동일 보유시간에서 각각 관찰할 수 있었다. 이는 YJ183/pYJ630, YJ183/pYJ631과 YJ183/pYJ627 성장배지 각각에 에피 로도마이신 D가 존재함을 입증하는 것이라 판단되며, 각각 주입된 엽실론 로도마이시논의 30 %, 10 %, 25 %정도가 에피 로도마이신 D로 전환됨을 확인하였다.
- <94> 한편, AknS 글리코실트랜스퍼라제, AvrE 4-케토환원효소, 에피 로도마이신 D에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질 DnrP, DnrK, DnrV, DoxA의 작용에 의하여 에피루비신(도 2b)이 합성되는지를 조사하기 위하여, 엽실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ546의 성장 배지에 첨가하였다. 엽실론 로도마이시논이 주입된 YJ183/pYJ546의 유기 추출물을 LC/MS를 통해 분석한 결과, 에피루비신(도 5)에 해당하는 $m/z=544$ 의 피크가 보유시간 26.9 분에서 소량 관찰되어졌다. MS/MS 분석 결과, $m/z=544$ 피크의 에피루비신은 에피루비신에 해당하는 $m/z=544$ 의 이온 피크 및 에피 다우노사민에 해당하는 $m/z=130$ 의 피크를 나타내었다(도 6). 이러한 MS/MS 단편패턴(fragmentation pattern)은 표준품 에피루비신의 MS/MS 단편패턴(도 6)과 일치하였다.
- <95> AknS 글리코실트랜스퍼라제의 작용에 의하여 7-O-D-올리보실 엽실론 로도마이시논(도 2b)이 합성되는지를 조사하기 위하여, 엽실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ613의 성장 배지에 첨가하였다. 엽실론 로도마이시논이 주입된 YJ183/pYJ613의 유기 추출물을 LC/MS를 통해 분석한 결과, 7-O-D-올리보실 엽실론 로도마이시논(도 7)에 해당하는 $m/z=559$ 의 피크가 보유시간 40 분 6 초에서 관찰되어졌다. MS/MS 분석 결과, $m/z=559$ 피크의 7-O-D-올리보실 엽실론 로도마이시논은 7-O-D-올리보실 엽실론 로도마이시논에 해당하는 $m/z=559$ 의 이온 피크, D-올리보스의 유실을 나타내는 $m/z=428$ 의 피크를 나타내었다(도 8). 주입된 엽실론 로도마이시논의 2 %정도가 7-O-D-올리보실 엽실론 로도마이시논으로 전환되었다.
- <96> AknS 글리코실트랜스퍼라제의 작용에 의하여 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엽실론 로도마이시논(도 2b)이 합성되는지를 조사하기 위하여, 엽실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ656의 성장 배지에 첨가하였다. 엽실론 로도마이시논이 주입된 YJ183/pYJ656의 유기 추출물을 LC/MS를 통해 분석한 결과, 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엽실론 로도마이시논(도 9)에 해당하는 $m/z=572$ 의 피크가 보유시간 38 분 12 초에서 관찰되어졌다. MS/MS 분석 결과, $m/z=572$ 피크의 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엽실론 로도마이시논은 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엽실론 로도마이시논에 해당하는 $m/z=572$ 의 이온 피크, L-3'-N-메틸 다우노사민의 유실을 나타내는 $m/z=428$ 의 피크 및 L-3'-N-메틸 다우노사민에 해당하는 $m/z=144$ 를 나타내었다(도 10). 주입된 엽실론 로도마이시논의 85 %정도가 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엽실론 로도마이시논으로 전환됨을 확인하였다.
- <97> AknS 글리코실트랜스퍼라제의 작용에 의해 7-O-에피-L-반코사미닐 엽실론 로도마이시논(도 2b)이 합성되는지를 조사하기 위하여, 엽실론 로도마이시논을 YJ183/pYJ714의 성장 배지에 첨가하였다. 엽실론 로도마이시논이 주입된 YJ183/pYJ714의 유기 추출물을 LC/MS를 통해 분석한 결과, 7-O-에피-L-반코사미닐 엽실론 로도마이시논(도 11)에 해당하는 $m/z=572$ 의 피크가 보유시간 40 분 48 초에서 관찰되어졌다. MS/MS 분석 결과, $m/z=572$ 피크의 7-O-에피-L-반코사미닐 엽실론 로도마이시논은 7-O-에피-L-반코사미닐 엽실론 로도마이시논에 해당하는 $m/z=572$ 의 이온 피크, 에피-L-반코사민의 유실을 나타내는 $m/z=428$ 의 피크 및 에피-L-반코사민에 해당하는 $m/z=144$ 를 나타내었다(도 12). 주입된 엽실론 로도마이시논의 45 %정도가 7-O-에피-L-반코사미닐 엽실론 로도마이시논으로 전환됨을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

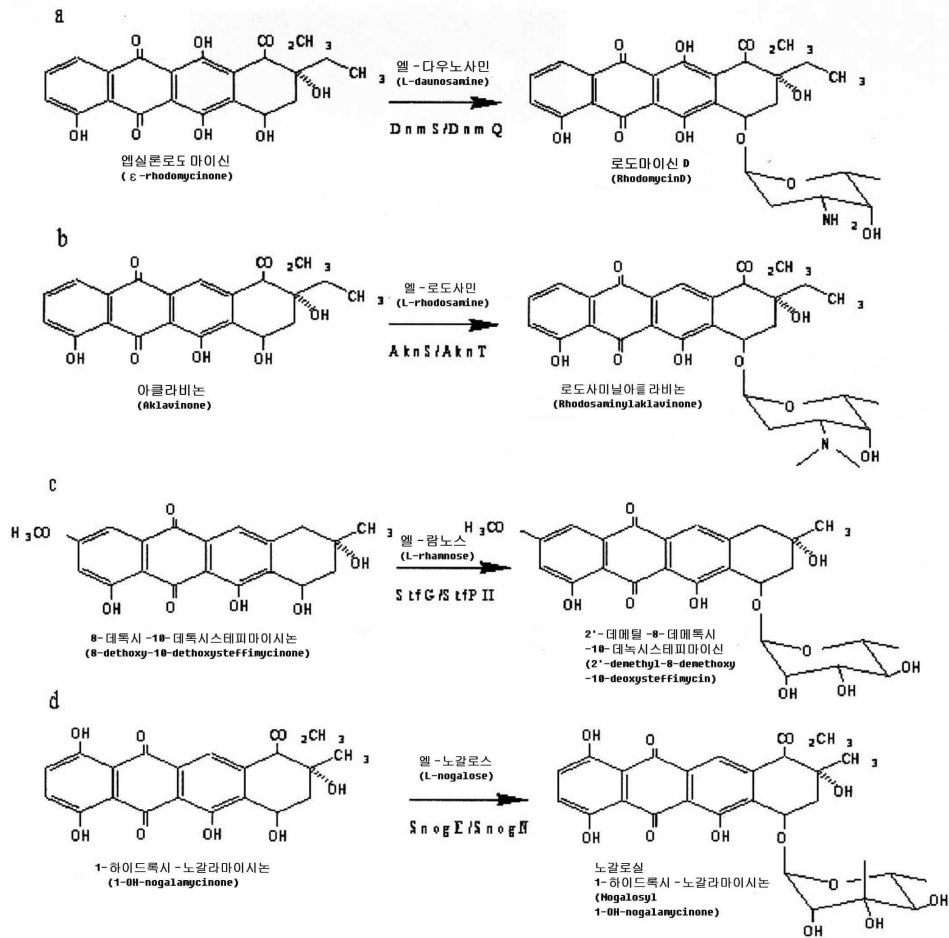
- <98> 도 1은, 로도마이신 D, 로도사미닐 아클라비논(Rhodosaminyl aklavinone), 람노실 6-디메톡시 10-디옥시스테피마이시논(Rhamnosyl 8-demethoxy-10-deoxysteffimycinone) 및 노갈로실 1-하이드록실 노갈라마이시논(Nogalosyl 1-OH-nogalamycinone)의 생합성 경로를 나타낸 것이다. a는 DnmS/DnmQ가 TDP-L-다우노사민을 엽실

론 로도마이시논에 연결시킨 유도체의 반응스킴을, b는 AknS/AknT가 TDP-L-로도사민(rhodamine)을 아클라비논에 연결시킨 유도체의 반응스킴을, c는 St fG/St fPII가 TDP-L-람노스(rhamnose)을 8-디메톡시 10-디옥시스테피마 이시논에 연결시킨 유도체의 반응스킴을, d는 TDP-L-노갈로스(nogalose)를 1-하이드록실 노갈라마이시논에 연결시킨 유도체의 반응스킴을 나타낸다.

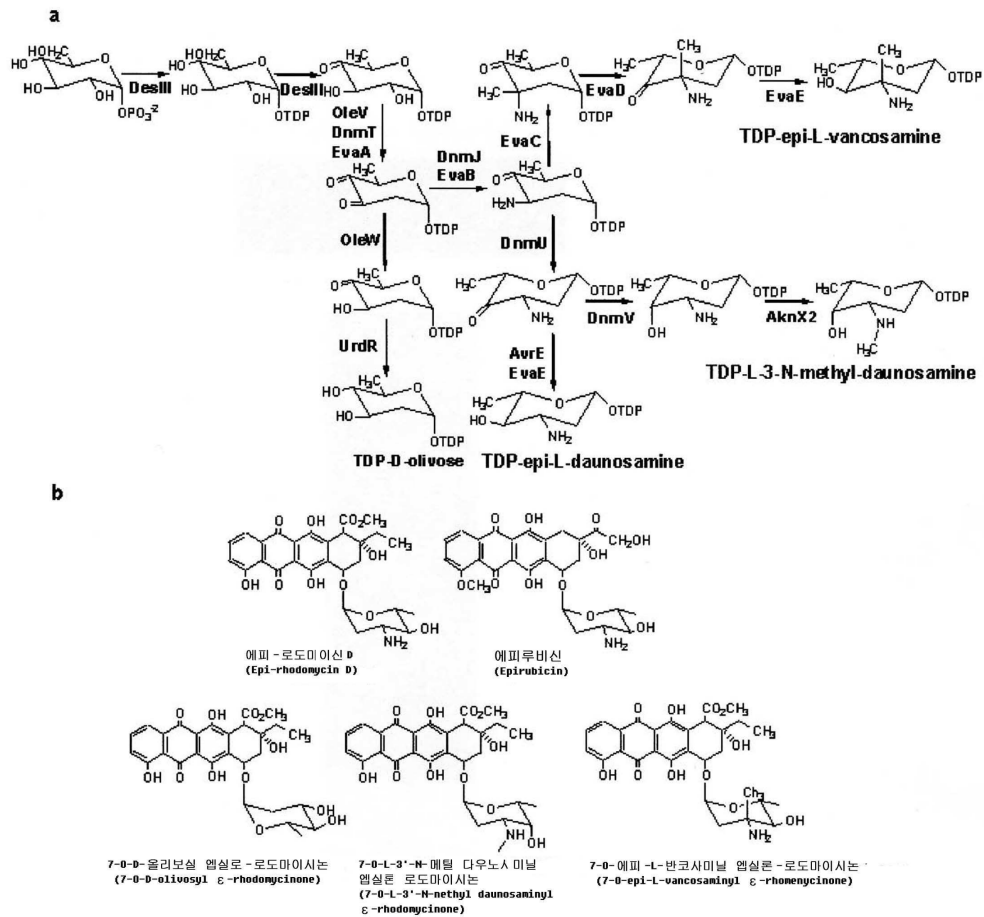
- <99> 도 2는, TDP-에피-L-다우노사민, TDP-D-올리보스, TDP-L-3'-N-메틸 다우노사민 및 TDP-에피-L-반코사민의 생합성 경로(a)와 에피 로도마이신 D, 에피루비신, 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논, 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논, 및 7-O-에피-L-반코사미닐 엡실론 로도마이시논의 구조(b)를 나타낸다.
- <100> 도 3은, 글리코실트랜스퍼라제 AknS, 4-케토환원효소 AvrE에 의해 생산된 에피 로도마이신 D의 LC/MS 분석 결과 도이다.
- <101> 도 4는, 글리코실트랜스퍼라제 AknS, 4-케토환원효소 AvrE에 의해 생산된 에피 로도마이신 D의 MS/MS 분석 결과 도이다.
- <102> 도 5는, 글리코실트랜스퍼라제 AknS, 4-케토환원효소 AvrE, 에피 로도마이신 D에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질 DnrP, DnrK, DnrV, DoxA에 의해 생산된 에피루비신의 LC/MS 분석 결과 도이다.
- <103> 도 6는, 글리코실트랜스퍼라제 AknS, 4-케토환원효소 AvrE, 에피 로도마이신 D에서 에피루비신으로의 전환에 작용하는 단백질 DnrP, DnrK, DnrV, DoxA에 의해 생산된 에피루비신의 MS/MS 분석 결과와 에피루비신 표준물질(Standard)의 MS/MS 분석 결과 도이다.
- <104> 도 7은, 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논의 LC/MS 분석 결과 도이다.
- <105> 도 8은, 7-O-D-올리보실 엡실론 로도마이시논의 MS/MS 분석 결과 도이다.
- <106> 도 9는, 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논의 LC/MS 분석 결과 도이다.
- <107> 도 10은, 7-O-L-3'-N-메틸 다우노사미닐 엡실론 로도마이시논의 MS/MS 분석 결과 도이다.
- <108> 도 11은, 7-O-에피-L-반코사미닐 로도마이시논의 LC/MS 분석 결과 도이다.
- <109> 도 12는, 7-O-에피-L-반코사미닐 로도마이시논의 MS/MS 분석 결과 도이다.
- <110> 도 13은, pYJ371의 개열지도를 나타낸다.
- <111> 도 14는, pYJ546의 개열지도를 나타낸다.
- <112> 도 15는, pYJ613의 개열지도를 나타낸다.
- <113> 도 16은, pYJ656의 개열지도를 나타낸다.
- <114> 도 17은, pYJ714의 개열지도를 나타낸다.
- <115> 도 18은, pYJ630의 개열지도를 나타낸다.
- <116> 도 19는, pYJ631의 개열지도를 나타낸다.
- <117> 도 20은, pYJ627의 개열지도를 나타낸다.

도면

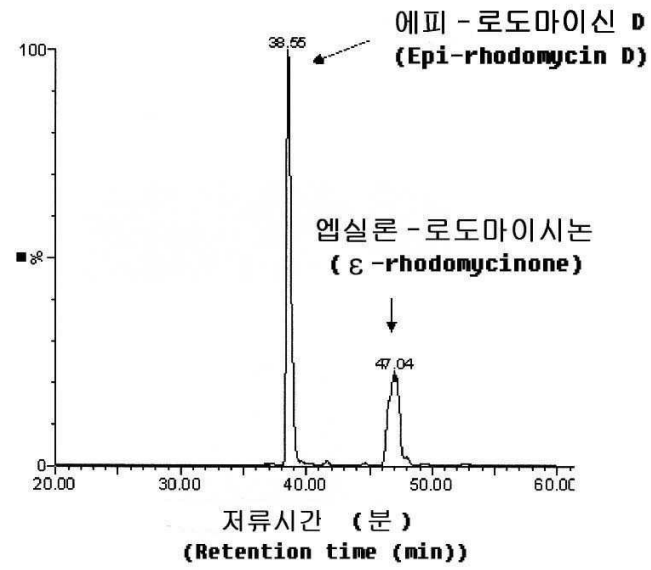
도면1



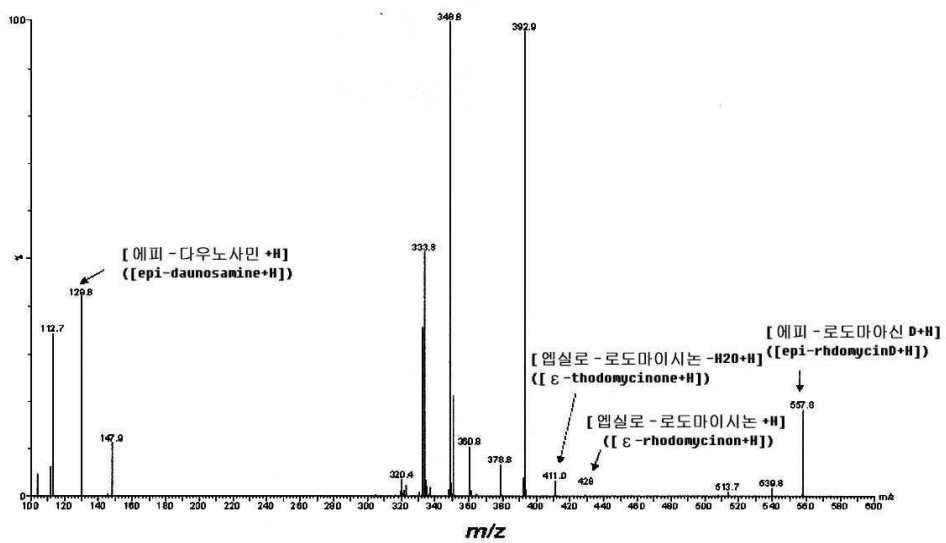
도면2



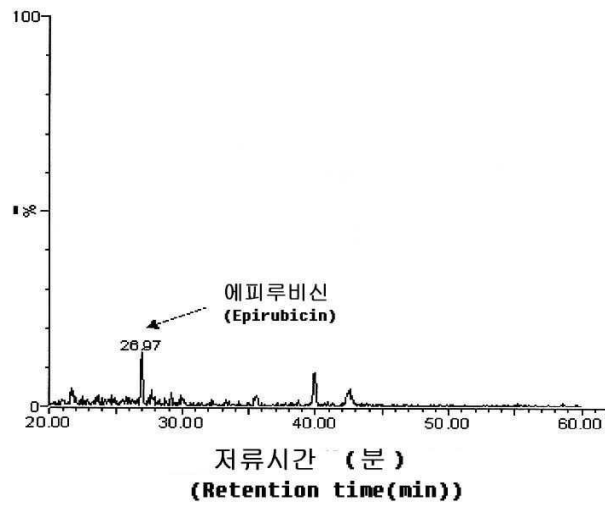
도면3



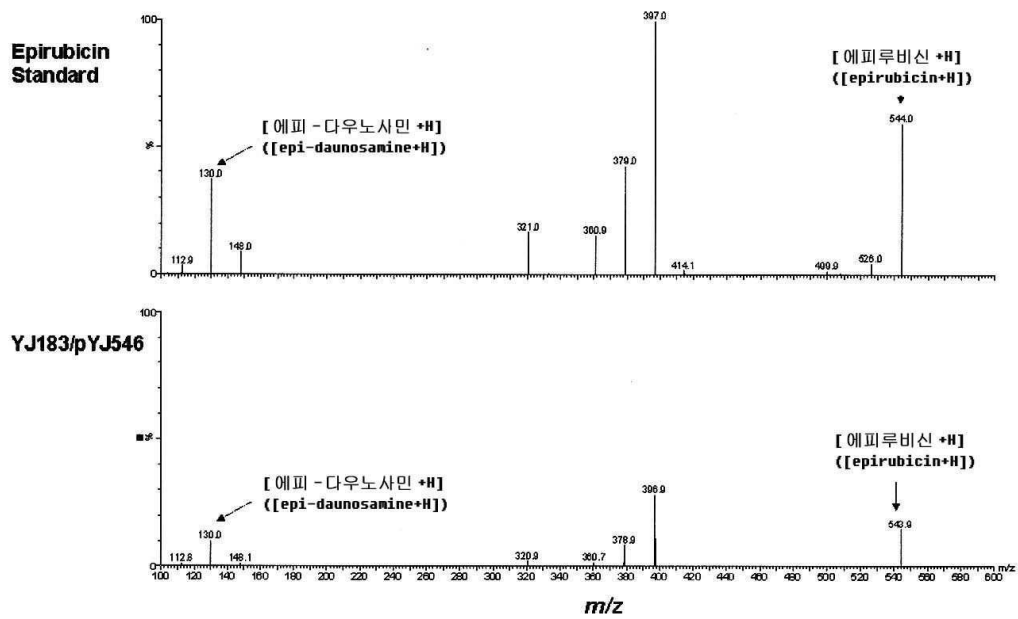
도면4



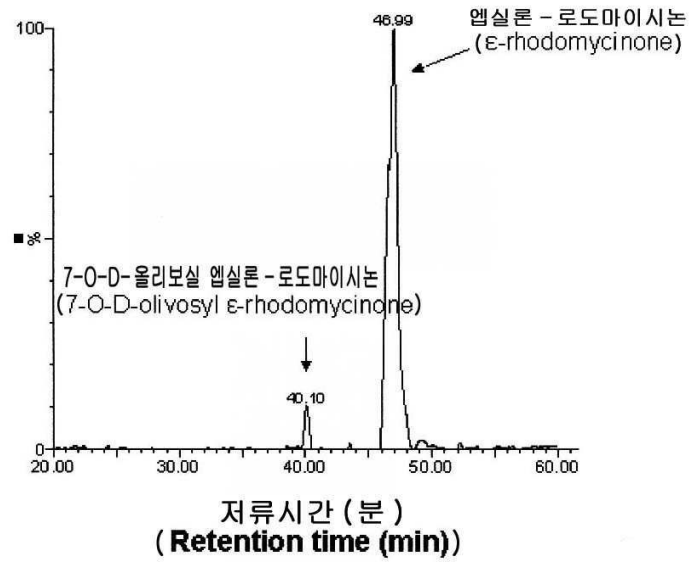
도면5



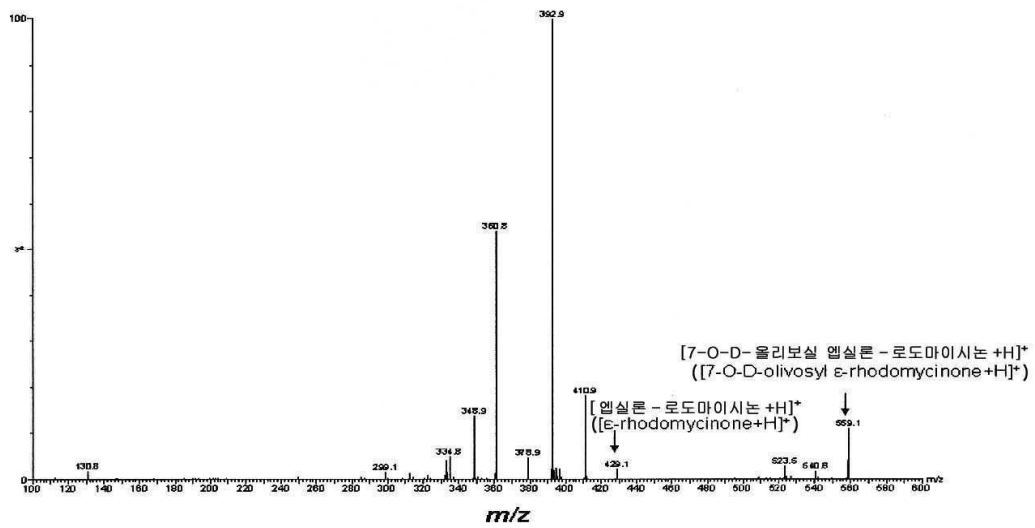
도면6



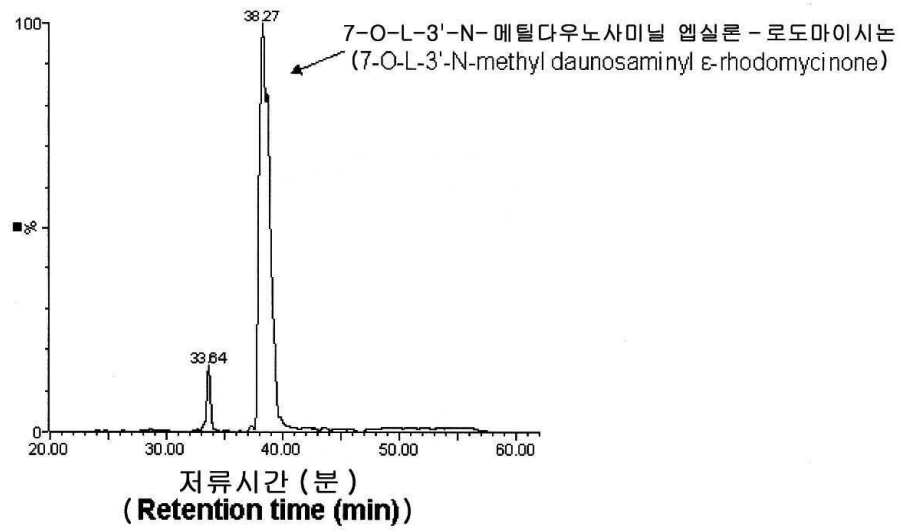
도면7



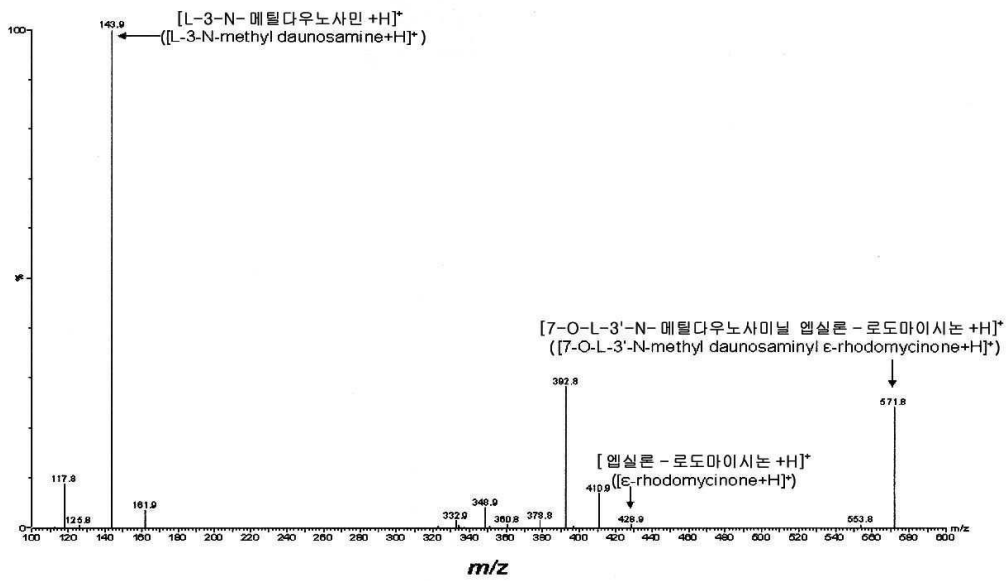
도면8



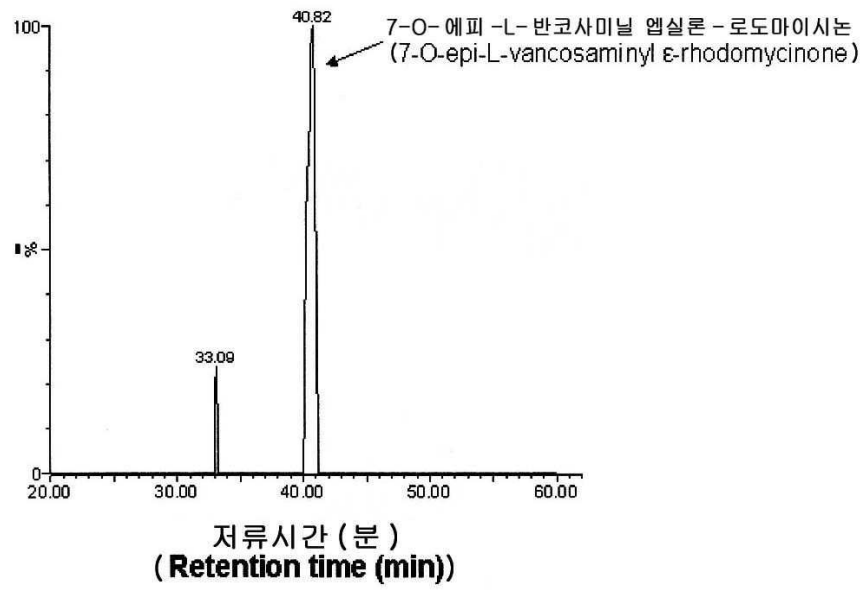
도면9



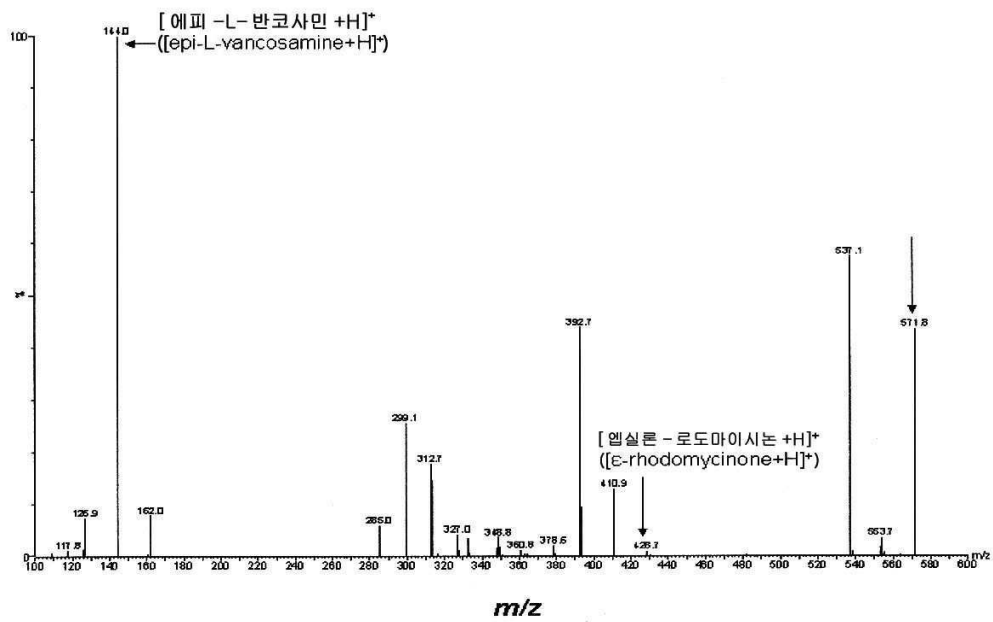
도면10



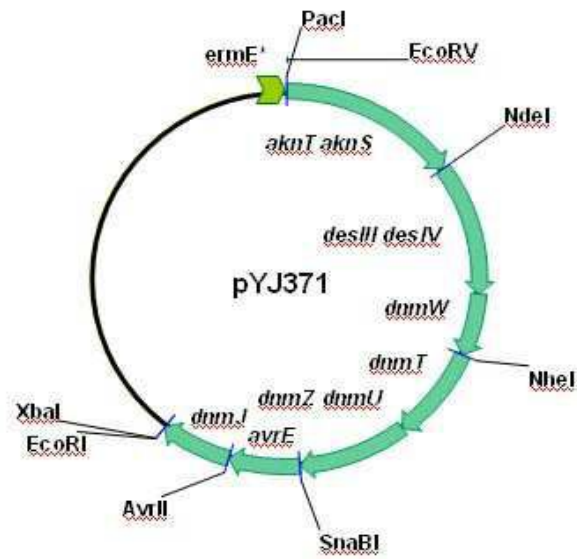
도면11



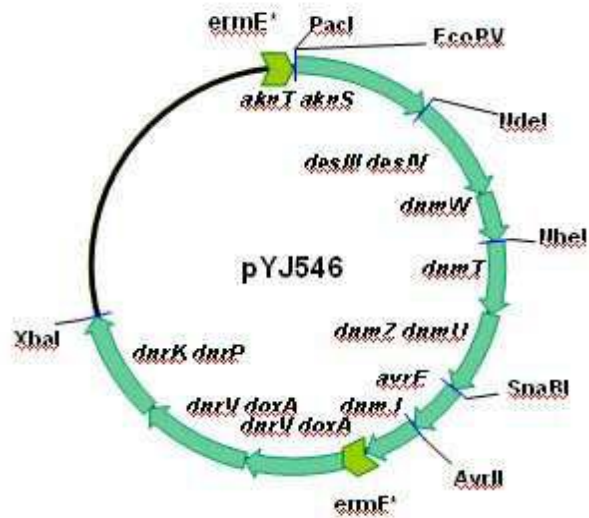
도면12



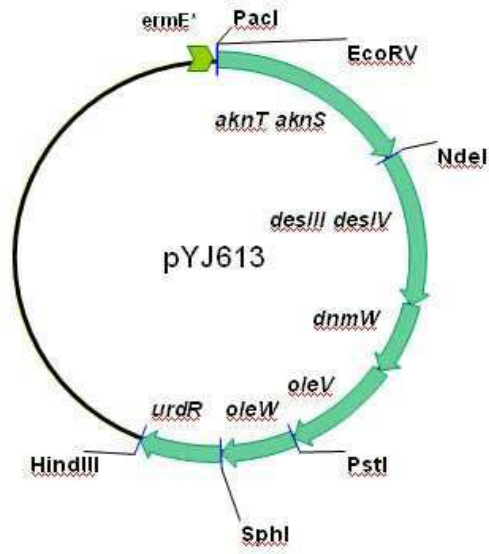
도면13



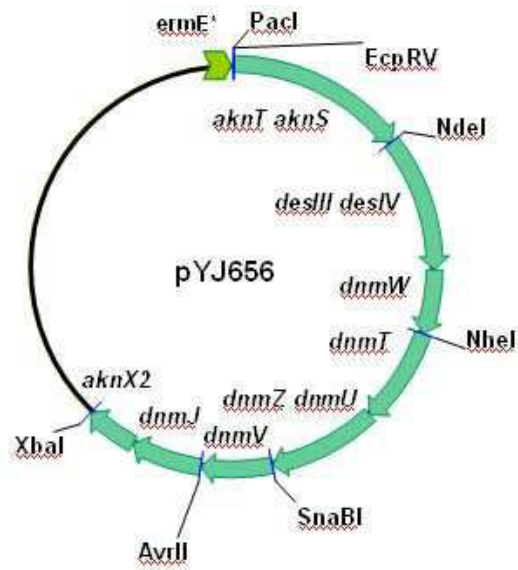
도면14



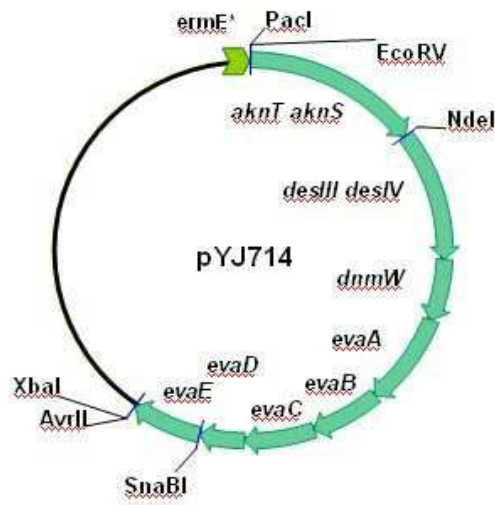
도면15



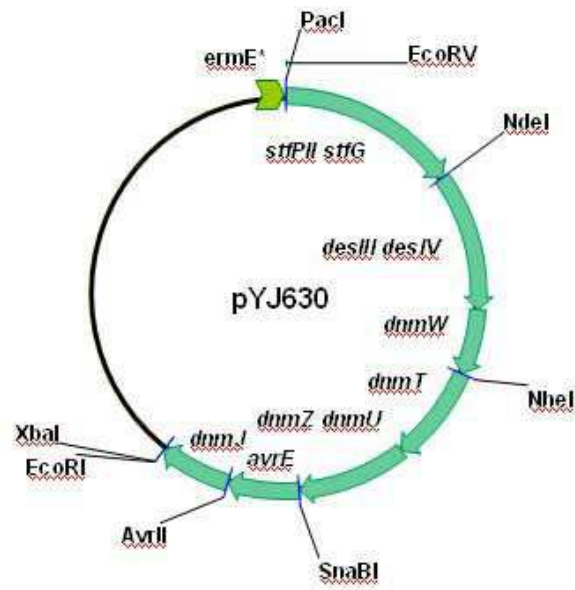
도면16



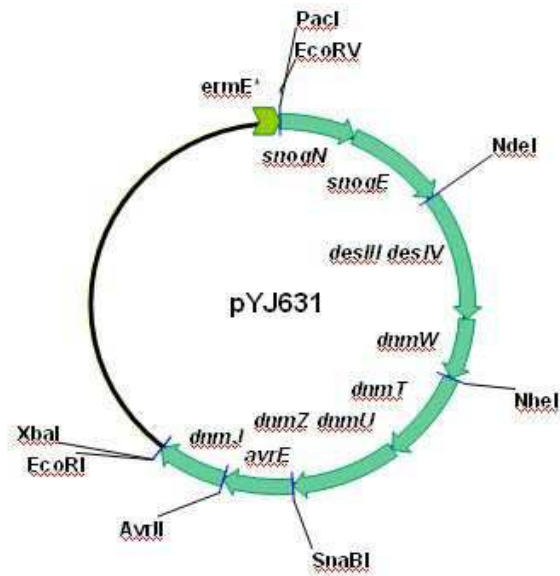
도면17



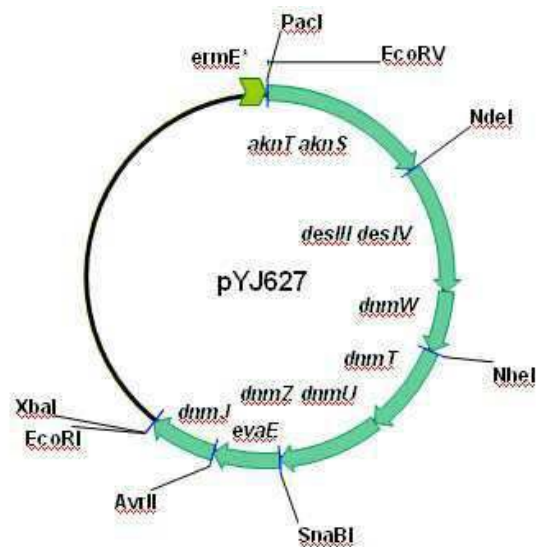
도면18



도면19



도면20



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Biosynthetic Method for preparation of antitumor agent epirubicin,
novel glycosylated anthracycline derivatives and their preparaion
methods
- <130> 20080222-ewha
- <160> 46

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(drrA-drrB)(forward)

<400> 1

cccagatctc catgtgacta ctgggggcgt tag

33

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(drrA-drrB)(reverse)

<400> 2

gggaagcttt ccggtacctg tgcagtggtg cgt

33

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(drrC)(forward)

<400> 3

cccaagcttc cgtcaatgtg aggatgctca tgc

33

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(drrC)(reverse)

<400> 4

gggtctagag ggttaattaa cttagcaccc ggggtcaagg atca

44

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(dnmQ-dnmS)(forward)

<400> 5

agatctttaa ttaagatatc acagtgtgag gaggcacga

38

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(dnmQ-dnmS)(reverse)

<400> 6

tctagacata tggctacgac aagacagcga

30

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(desIII-desIV)(forward)

<400> 7

ttaattaaac tagttaactc gccacgccga ccgtt 35

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(desIII-desIV)(reverse)

<400> 8
tctagagagc tcctcgtagg cggcctt 27

<210> 9
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmW)(forward)

<400> 9
ttaattaaac tagtatcgat ctgcgagcct ctcggtgacg aaga 44

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmW)(reverse)

<400> 10
tctagagtca gtccagcccg tcccgggtga 30

<210> 11
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmT)(forward)

<400> 11
ttaattaaac tagtgctagc tcaaacaccg caccgtcacc cggg 44

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmT)(reverse)

<400> 12
tctagaaaca ggacgcgcac ggggaactca 30

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmZ-dnmU)(forward)

<400> 13
ttaattaaac tagtctccga tccttacgag gagtc 35

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmZ-dnmU)(reverse)

<400> 14

tctagaatgt ccgcctcacc cgtctcc

27

<210> 15
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(avrE)(forward)

<400> 15
ttaattaaac tagttacgta gcaccaggaa ttcgagcgcc gcta

44

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(avrE)(reverse)

<400> 16
tctagaccta ggtcgacgag aagctgtgac ggccga

36

<210> 17
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmJ)(forward)

<400> 17
ttaattaaac tagtccgaca aggagtcacg tgtcc

35

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmJ)(reverse)

<400> 18
tctagagaat tcccggccta gctcacaggc ttc 33

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(aknT-aknS)(forward)

<400> 19
gatatccacg tcccgaagga gactgccgtg 30

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(aknT-aknS)(reverse)

<400> 20
aagctttcac gcggaggtgg tcagggggaa 30

<210> 21
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(stfPII-stfG)(forward)

<400> 21

ttaattaaga tategctcga ccgccacgct ctgttcga 38

<210> 22
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer(stfPII-stfG)(reverse)

<400> 22
 tctagacata tgcccatgga taggtgcggg gcttac 36

<210> 23
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer(snogE)(forward)

<400> 23
 ttaattaaac tagtaccacc gagcggactt ccggtgac 38

<210> 24
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer(snogE)(reverse)

<400> 24
 tctagacata tgtccgggcc ctcggtgtgt cagcgc 36

<210> 25
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(snogN)(forward)

<400> 25
ttaattaaga tacccttgac gtggcctgga agctgggtt 38

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(snogN)(reverse)

<400> 26
tctagagtcc atggagagtc cttccgttg 30

<210> 27
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaE)(forward)

<400> 27
cggttaatta aactagttac gtactcgac gcttctcgcg tgcatca 47

<210> 28
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaE)(reverse)

<400> 28

cggctctagac ctaggacacg cgtgggtcatg cgcgagcct 39

<210> 29
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer(dnrV-doxA)(forward)

<400> 29
 ttaattaaac tagtcgtgtg ccgatccatc gaaa 34

<210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer(dnrV-doxA)(reverse)

<400> 30
 tctagaatca ggcgagccag acgggcagt 29

<210> 31
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer(dnrK-dnrP)(forward)

<400> 31
 ttaattaaac tagtctacct cggcacctac cgccagct 38

<210> 32
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnrK-dnrP)(reverse)

<400> 32
tctagatcac actgtcgcg cccgggtgtg 30

<210> 33
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(ermE*)(forward)

<400> 33
ttaattaaac tagtgagctc ggtaccagcc cg 32

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(ermE*)(reverse)

<400> 34
tctagatacc aaccggcacg attg 24

<210> 35
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(aknX2)(forward)

<400> 35

ttaattaaac tagtcaattg cgccgacgga gggaacagac atgt 44

<210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(aknX2)(reverse)

<400> 36
tctagactca gcgctgttcg cgaacaccga 30

<210> 37
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmV)(forward)

<400> 37
ttaattaaac tagttacgta tcacgcggag acgggtgagg cgga 44

<210> 38
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(dnmV)(reverse)

<400> 38
tctagaccta ggtcgtcgga agcctgtgag ctaggc 36

<210> 39
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaA)(forward)

<400> 39
ttaattaaac tagtgctagc cgcggctcgc cggctgaaca cgaa 44

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaA)(reverse)

<400> 40
tctagactca tgcacctccc cgaggctggg 30

<210> 41
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaB)(forward)

<400> 41
ttaattaaac tagtgacatc agttcatgga aaggc 35

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaB)(reverse)

<400> 42

tctagagttg tcagagggtc gacagcactt 30

<210> 43
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaC)(forward)

<400> 43
ttaattaaac tagttcccca caatttcgtc gacgacaag 39

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaC)(reverse)

<400> 44
tctagatddd gcgacatggc gatcacgtca 30

<210> 45
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer(evaD)(forward)

<400> 45
ttaattaaac tagtgaccct ctgacaactc ccactaca 38

<210> 46
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer(evaD)(reverse)

<400> 46

tctagatgtg ggcaagcagt caggtcgaga

30