



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0049554
(43) 공개일자 2015년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0130263

(22) 출원일자 2013년10월30일

심사청구일자 2013년10월30일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

김용수

서울 강남구 언주로30길 26, G동 5006호 (도곡동, 타워팰리스)

김현범

인천 연수구 독배로40번길 48, 103동 1102호 (옥련동, 우성1차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

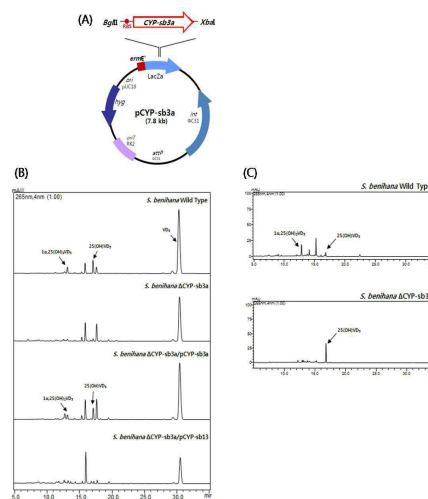
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 세베키아 베니하나 유래의 비타민 D₃ 특이적인 신규 수산화효소

(57) 요약

본 발명은 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) 유래의 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것으로, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 수산화효소(hydroxylase)를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 비타민 D₃를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 비타민 D₃ 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

반준규

인천 서구 청라커널로 232, 415동 607호 (경서동,
청라엘에이치)

이미진

인천 남구 인하로 95, 301호 (용현동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009522

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린21연구사업

연구과제명 희소방선균 유전체공학 기반의 폴리엔 바이오 신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 수산화효소(hydroxylase).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 수산화효소는 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) 유래인 것을 특징으로 하는 수산화효소.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 비타민 D₃ 특이적 수산화효소는 비타민 D₃를 25-하이드록시비타민 D₃(25-hydroxyvitamin D₃; 25(OH)VD₃) 또는 1 α ,25-디하이드록시비타민 D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 수산화효소.

청구항 4

제 1 항의 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및

상기 형질전환된 세포를 배양하여 비타민 D₃를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 비타민 D₃ 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 비타민 D₃ 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 비타민 D₃ 생전환(bioconversion)은 비타민 D₃를 25-하이드록시비타민 D₃(25-hydroxyvitamin D₃; 25(OH)VD₃) 또는 1 α ,25-디하이드록시비타민 D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 비타민 D₃ 생전환(bioconversion) 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) 유래의 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

높은 G+C의 그람-양성 토양 박테리아인 방선균(Actinomycetes)은 사이토크롬 P450 수산화효소(cytochrome P450 hydroxylases; CYPs)를 포함하는 다양한 생전환 효소 뿐만 아니라 항생제 및 항암제와 같은 많은 중요한 2차 대사산물의 생합성 클러스터들을 가지고 있다. 특히, 희소 방선균인 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)는 몬렌신(monensin), 니저리신(nigericin) 및 사이크로스포린 A(cyclosporine A)와 같은 다양한 천연물의 특정 부위에 수산기(hydroxyl group)를 결합시키는 뛰어난 능력을 가지고 있다. 헴(heme)-함유 모노옥시게나아제(monooxygenase) 효소인, CYP는 내인성(endogenous) 및 외인성(xenobiotic) 화합물의 위치-특이적 수산화반응을 촉진하는 가장 중요한 산업적 효소 중 하나이다. 또한, 이는 스테로이드 호르몬 합성 및 콜레스테롤 생전환

의 초기 단계를 포함하는 다양한 생물공정의 중요한 단계와 관련되어 있다. 일반적으로, CYP는 대부분 살아있는 유기체에 존재하고, 또한 페레독신(ferredoxin; FD) 및 페레독신 환원효소(ferredoxin reductase; FDR)와 같은 전자 전달 파트너들(electron transfer partners)이 CYP의 활성화에 필요하다.

[0003]

비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃)는 혈장 칼슘과 인산염의 항상성 조절, 세포 분화, 증식 및 면역제어에 결정적인 역할을 하는 프로호르몬이다. 이는 갑상선 저하(hypothyroidism), 골다공증(osteoporosis) 및 만성신부전과 같은 다양한 질병의 치료 및 예방에 있어 중요한 효과를 가진다. VD₃는 UV 빛에 노출된 피부에서 7-디하이드로콜레스테롤(7-dehydrocholesterol)로부터 합성되고, 생리학적으로 불활성화된 형태로 존재한다. 비타민 D 수용체와의 결합을 통하여 이의 생리학적인 기능을 수행하기 위해서는 VD₃가 25-하이드록시비타민 D₃(25-hydroxyvitamin D₃; 25(OH)VD₃) 및 1 α ,25-디하이드록시비타민 D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃)으로 전환되어야만 한다. 이러한 2개의 반응은 간 및 신장에 있는 각각의 CYPs에 의해 수행된다. 따라서, 간 또는 신장 기능 이상을 가진 환자들은 1 α ,25(OH)₂VD₃를 합성할 수 없고, 외부적으로 VD₃의 활성화된 형태를 섭취하여야만 한다.

[0004]

1 α ,25(OH)₂VD₃ 분자는 화학적 방법에 의해 콜레스테롤로부터 일반적으로 합성된다. 하지만, 상기 과정은 많은 반응 단계가 필요하고, 수율은 1% 미만으로 낮다. 반면에, 생물학적 공정은 단지 2-단계 공정에 의해 1 α ,25(OH)₂VD₃를 생산할 수 있으므로 효과적인 대안으로 제시되고 있다. 몇몇 연구자들은 여러 미생물들을 이용하여 VD₃의 25(OH)VD₃ 및 1 α ,25(OH)₂VD₃로의 전환에 대해 보고하였다. 25(OH)VD₃ 분자는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)로 명명된 회소 방선균에서 VD₃-특이적 25-수산화효소(VD₃-specific 25-hydroxylase)인 P450VD25 (CYP105A2)에 의해 성공적으로 생산되었다. 최근 연구에 따르면, 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 Vdh 및 *S. griseolus*의 CYP105A1을 포함하는 VD₃-특이적 수산화효소가 1 α ,25(OH)₂VD₃를 만들기 위해서 VD₃의 25번 및 1번 위치에서 이중 수산화반응을 수행하는 것으로 나타났지만, 아직 이들의 효소학적 동역학 수치는 명확하게 밝혀지지 않았다. 상기와 같은 문제점을 극복하고, VD₃-특이적인 생 전환 수율을 증가시키기 위해서, 무작위적 돌연변이(random mutagenesis), 효소 활성사이트 변형 및 방선균 이종숙주(heterologous) 발현과 같은 새로운 전략들이 추진되고 있다.

[0005]

본 발명자들은 이전 연구에서, 세베키아 베니하나(*S. benihana*)의 전체 유전체 염기서열분석 및 인 실리코(*in silico*) 분석을 통해, 21 CYPs 및 이의 전자 전달 파트너(7 FD 및 4 FDRs) 유전자들을 동정하였다. 또한, *E. coli* 접합-기반 PCR 표적 유전자 파괴 시스템에 의해 상기 CYPome 유전자들을 각각 불활성화시켰다. 상기 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYPome 돌연변이들을 이용하여, 사이클로스포린 A(cyclosporine A; CsA)-특이적 수산화효소 유전자인 CYP-sb21을 동정하였고, 4번째 N-메틸 류신(N-methyl leucine) 위치에 있어서 CsA 위치-특이적 수산화효소라는 것을 확인하였다.

[0006]

한편, 한국공개특허 제10-2013-0081394호에서는 세베키아 베니하나로부터 유래된 신규한 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)에 대해 개시하고 있으나, 본 발명의 비타민 D₃ 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 언급은 없다.

[0007]

따라서, 본 발명자들은 세베키아 베니하나(*S. benihana*)도 VD₃-특이적 수산화반응을 수행할 수 있다는 것을 확인하였고, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYPome 돌연변이들을 스크리닝함으로써 하나의 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYP 유전자가 VD₃의 위치-특이적 수산화반응에 관여한다는 것을 밝혀냈다. 또한, 본 발명자들은 VD₃ 비-수산화 방선균(*Streptomyces*) 숙주에서 이종숙주 발현 뿐만 아니라 유전학적 보상(genetic complementation) 실험을 통하여, 새롭게 분류된 VD₃-특이적 CYP 유전자의 기능을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 수산화효소

(hydroxylase)를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 비타민 D₃를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 비타민 D₃ 생전환(bioconversion) 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 수산화효소(hydroxylase) 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

[0011] 상세하게는 상기 비타민 D₃ 특이적 수산화효소는 비타민 D₃를 25-하이드록시비타민 D₃(25-hydroxyvitamin D₃; 25(OH)VD₃) 또는 1 α ,25-디하이드록시비타민 D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃)로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 1의 수산화효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 효소 기능을 유지하는 것 모두를 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly,Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 수산화효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 비타민 D₃를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 비타민 D₃ 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다. 상세하게는, 상기 비타민 D₃ 생전환(bioconversion)은 비타민 D₃를 25-하이드록시비타민 D₃(25-hydroxyvitamin D₃; 25(OH)VD₃) 또는 1 α ,25-디하이드록시비타민 D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃)로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

[0014] 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.

[0015] "등가의 핵산서열"에는 상기 수산화효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다. "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 수산화효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.

[0016] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0017] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 엮피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0018] 본 발명에서 사용한 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning,

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) 유래의 비타민 D₃(Vitamin D₃; VD₃) 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것으로서, VD₃를 25-하이드록시비타민 D₃(25-hydroxyvitamin D₃; 25(OH)VD₃) 및 1 α ,25-디하이드록시비타민 D₃(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃)으로 위치 특이적 수산화반응(hydroxylation)을 하여, 화학적 방법에 의해 콜레스테롤로부터 일반적으로 합성되는 과정보다 효과적으로 합성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 세베키아 베니하나(*S. benihana*)에서의 VD₃ 및 수산화된 VD₃의 구조 및 HPLC 프로파일을 나타낸다. 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 야생형은 GSMY 배지에서 48시간 동안 배양하였고, 그 후 수산화반응 기질로서 100 mg/L VD₃를 배양액에 첨가하여 48시간 동안 추가적으로 배양하였다. 샘플링은 기질을 첨가한 후 0 hr 및 48 hr 후, 2번 수행하였고, HPLC 분석하였다.

도 2는 세베키아 베니하나(*S. benihana*) (A) CYP 파괴체 및 (B) FD 및 FDR 파괴체에서 25(OH)VD₃ 및 1 α ,25(OH)₂VD₃의 전환 수율을 나타낸다. 수직 바는 2개 각각의 측정에 대한 평균의 표준 편차 값을 나타낸다.

도 3은 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a에 대한 유전학적 보상(genetic complementation)을 나타낸다. (A) 재조합 플라스미드 pCYP-sb3a를 나타낸다. (B) *S. benihana* 야생형 균주, *S. benihana* Δ CYP-sb3a, *S. benihana* Δ CYP-sb3a/pCYP-sb3a 및 *S. benihana* Δ CYP-sb3a/pCYP-sb13 균주에서의 VD₃ 생전환에 대한 HPLC 프로파일을 나타낸다. (C) *S. benihana* 야생형 및 *S. benihana* Δ CYP-sb3a에서의 25(OH)VD₃에서 1 α ,25(OH)₂VD₃로의 생전환 결과를 나타낸다.

도 4(A)는 CYP-sb3a, 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래 Vdh 및 스트렙토마이세스 그리세올러스(*Streptomyces griseolus*) 유래 CYP105A1의 서열 비교를 보여준다. 박스들은 CYP-특이적 모티브를 구성하는 보존된 아미노산 잔기를 나타낸다. (B) CYP-sb3a 및 다른 CYP 패밀리의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸다. CYP-sb3a (*S. benihana*), Vdh (*Pseudonocardia autotrophica*), CYP105A1 (*S. griseolus*), CYP51 (*Nocardia farcinica*), CYP101 (*Novosphingobium aromaticivorans*), CYP102 (*Bacillus anthracis*), CYP103 (*Agrobacterium tumefaciens*), CYP105 (*Saccharopolyspora erythraea*), CYP106 (*B. anthracis*), CYP110 (*Nostoc sp*); CYP111 (*N. aromaticivorans*), CYP112 (*Sinorhizobium fredii*), CYP113 (*S. erythraea*), CYP114 (*M. loti*), CYP115 (*M. loti*), CYP116 (*S. erythraea*), CYP117 (*S. fredii*); CYP119 (*Sulfolobus tokodaii*), CYP120 (*Trichodesmium erythraeum*).

도 5(A)는 a pHSEV-1에서 파생된 pHE-CYP-sb3a 플라스미드 맵을 나타낸다. (B)는 *S. coelicolor* M145/pHE-CYP-sb3a에서 CYP-sb3a를 이중발현시킨 VD₃ 대사체의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0022] <실시예 1> 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)에서 VD₃-특이적 수산화반응 유전자의 동정

[0023] 1. 균주, 배양 조건

[0024] 희소 방선균 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) KCTC 9610은 한국세포주은행(Korean Collection for Type

Cultures; KCTC, Korea)으로부터 구입하였고, VD₃ 수산화반응을 확인하기 위해 GSMY 배지(glucose 0.7%, yeast extract 0.45%, malt extract 0.5%, soluble starch 0.75% 및 calcium carbonate 0.005%)에서 배양하였다. 한편, 접합(conjugation) 실험을 위해서는 RARE3 배지(glucose 1%, yeast extract 0.4%, malt extract 1%, peptone 0.2%, MgCl₂ · 6H₂O 0.359%, glycerol 0.5%)에서 30℃로 배양하였다. 대장균 BL21 (DE3)(*Escherichia coli* BL21 (DE3))는 루리아-베르타니(Luria-Bertani; LB) 배지에서 배양하였고, 필요에 따라 적절한 항생제가 첨가된 LB 아가 배지에서 37℃로 유지하였다. 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145는 VD₃ 수산화반응을 확인하기 위해 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에서 배양되었고, 원형질체(protoplast) 형질전환을 위해서 YEME 배지(yeast extract 0.3%, peptone 0.5%, malt extract 0.3%, glucose 1%, sucrose 34% 및 MgCl₂ · 6H₂O 5mM, 별도로 멸균된 glycine 0.5%)에서 30℃로 더 배양되었다.

[0025]

2. VD₃-특이적 수산화반응에 대한 HPLC 분석

[0026]

선별된 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 균주는 GSMY 배지에서 37℃로 72 hr 동안 배양되었고, 수산화반응 기질로서 VD₃ (100 mg/L)로 처리되었으며, 추가적으로 48 hr 동안 더 배양되었다. 미정제(crude) 화합물은 에틸아세테이트(ethylacetate)를 사용하여 배양 용액으로부터 추출하였고, 에틸아세테이트는 증발시켰으며, 미정제 화합물은 메틸 알콜로 재현탁하였다. 샘플들은 다음의 조건하에서 광다이오드 어레이(photodiode array) 검출기가 장착된 HPLC를 사용하여 분석되었다: 컬럼(column), YMC-Pack ODS-AM (4.6X300mm) (YMC, Tokyo, Japan); UV 검출(detection), 265 nm; 유량(flow rate), 1.5mL/min; 컬럼 온도(column temperature), 40℃ 및 a 이중 완충액(two-buffer) gradient system; ddH₂O (완충액 A) 및 100% 아세토니트릴(acetonitrile) (완충액 B). 완충액 B gradient의 한 사이클(cycle)은 50%에서 시작하여 100%까지 10분 동안 진행한 후, 100% 및 50%로 25분 및 10분 동안 각각 용출하는 것으로 프로그램화되었다. 주입 부피는 20μL이었다.

[0027]

3. 대장균(*E. coli*)-세베키아 베니하나(*S. benihana*) 이중 간 접합 (intergeneric conjugation)

[0028]

RARE3 배지(2% MgCl₂ · 6H₂O가 첨가된 것을 제외하고는 상기에서 언급한 것과 동일한 배지 조성물)에서 3일간 배양한 10 mL 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 배양액을 90 mL의 새로운 배지로 희석하였고, 30℃에서 24시간 동안 다시 배양하였다. 그 후, 배양액을 원심분리하고, 10 mL의 새로운 배지로 재현탁하였으며, 균질화시키고, 초음파처리에 의해 단편화하였다(ultrasonic generator를 사용하여 3초 작동 및 4초 미작동으로 2회, 출력(power) 36%, Ulsso Hitech, Korea). 30℃에서 20시간 동안 추가적으로 배양한 후에, 배양액을 다시 원심분리하고, 배지에 재현탁하였으며, 이전과 동일하게 초음파처리하였다. 파괴 구조체(disruption construct)를 옮기기 위한 기증체 *E. coli* 균주 ET12567/pUZ8002는 표준 대장균(*E. coli*)-방선균(*Streptomyces*) 접합에 따라 준비하였다. 각 교배(mating) 실험 과정에서, 기증체 및 수여체 세포는 혼합되었고, 변형 ISP4 배지(soluble starch 1%, dipotassium phosphate 0.1%, magnesium sulfate USP 0.1%, sodium chloride 0.1%, ammonium sulfate 0.2%, calcium carbonate 0.2%, ferrous sulfate 0.0001%, manganous chloride 0.0001%, zinc sulfate 0.0001%, tryptone 0.15%, yeast extract 0.05%, agar 2%)에 배양하였다. 30℃에서 20시간 동안 배양한 후, 각 플레이트는 각각 최종 농도 100ug/mL 및 25ug/mL의 하이그로마이신(hygromycin) 및 날리덱스산(nalidixic acid)을 함유하는 1 mL의 멸균된 물로 잠기게 하였다. 또한, 보상 실험의 경우에는 추가적으로 최종 농도 50ug/mL 아프라마이신(apramycin)을 첨가하였다. 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 접합완료체(exconjugant) 콜로니들은 보통 배양 1-2주 후에 나타났다.

[0029]

4. 결과

[0030]

세베키아 베니하나(*S. benihana*)는 여러 천연물의 특이 위치에 수산기를 결합시키는 것으로 보고되었으므로, 세베키아 베니하나(*S. benihana*)가 VD₃-특이적 수산화반응을 수행할 수 있는지 확인하기 위해서 VD₃ 생전환 분석을 진행하였다. 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 균주는 GSMY 배지에서 37℃로 72시간 동안 배양하였고, VD₃ (100 mg/L)을 수산화반응 기질로서 첨가하였다. 추가적으로 48시간 동안 배양한 후에, 미정제 추출물을 HPLC 분석하였다. 여러 추정 VD₃ 유도체가 검출되었다. 표준 샘플 스팅킹 및 LC-MS 분석을 통하여, 2개의 알려진 VD₃ 유도

체가 동정되었고, 이는 25(OH)VD₃(m/z 401.3426 [M+H]) 및 1 α ,25(OH)₂VD₃(m/z 417.3376 [M1-H])로 확인되었다(도 1). 상기 결과는 세베키아 베니하나(*S. benihana*)가 VD₃-특이적 수산화반응을 수행할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0031]

이전에, 본 발명자들은 21 CYPs 및 7 FD와 4 FDR 유전자와 같은 전자 전달 단백질을 포함하는 완전한 CYPome를 동정하였다. 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYPs에 대한 GenBank accession numbers는 KC208044 내지 KC208064이다. 그 후, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYPome 돌연변이를 제작하기 위해서, 각 유전자들은 PCR-표적 유전자 파괴에 의해 불활성화되었다. 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYPome 돌연변이 선별을 통해 CsA-특이적 수산화반응을 담당하는 독특한 CYP(CYP-sb21로 명명)를 확인하였다. VD₃-특이적 수산화반응을 담당하는 독특한 CYP를 확인하기 위해서, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYPome 돌연변이도 유사하게 선별하였다. 시험된 32개의 돌연변이 중에, Δ CYP-sb6, Δ CYP-20 및 Δ CYP-24와 같이 몇몇 다른 CYP 파괴균주에서도 약간 감소되는 것이 관찰되었지만, VD₃에서 25(OH)VD₃ 및 1 α ,25(OH)₂VD₃로의 전환이 모두 뚜렷하게 감소된 것은 Δ CYP-sb3 및 Δ CYP-sb3a 돌연변이 균주에서 나타났다(도 2A). Δ CYP-sb3 돌연변이 균주는 번역과정에서 커플된(translationally-coupled) 2개의 CYP 유전자인, CYP-sb3a 및 CYP-sb3b에 결실을 포함한다. 이러한 결과는 CYP-sb3a가 VD₃-특이적 수산화반응에 주로 관여한다는 것을 나타낸다. 비록 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a에 소량의 25(OH)VD₃ 및 1 α ,25(OH)₂VD₃가 존재하지만, 이는 다른 비-특이적 CYPs의 효과일 수도 있다. 반면에, 대부분의 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ FD-sb 및 Δ FDR-sb 돌연변이는 여전히 VD₃ 수산화반응 활성이 존재하는데(도 2B), 이는 단일 FD 또는 FDR은 VD₃-특이적 수산화반응을 담당하지는 않는다는 것을 나타낸다. NAD(P)H로부터 CYP의 헴-철(heme-iron)로의 전자 전달에 관여하는, FD 및 FDR은 대부분의 방선균(actinomycetes) 중에서 낮은 수로 존재하므로, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) VD₃-특이적 CYP-sb3a는 VD₃-특이적 수산화반응에 있어서 FD 또는 FDR에 대해 특이적인 선호도를 가지지 않은 것으로 보인다.

[0032]

<실시예 2> 세베키아 베니하나(*S. benihana*)의 CYP-sb3a의 보상(complementation) 및 특성 확인

[0033]

1. 재조합 삽입 플라스미드 pCYPs의 제작

[0034]

세베키아 베니하나(*S. benihana*)에서 CYP-sb3 유전자의 기능적 과발현 및 보상 실험을 위해서, 전체 CYP-sb3 유전자를 포함하는 2.4 kb DNA 단편은 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 유래 게노믹 DNA를 주형으로 사용하고 다음의 프라이머들을 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다: CYP-sb3 정방향 프라이머(5'-AGATCTCCCGTCGTCATCAAG-3') 및 역방향 프라이머(5'-TCTAGAAGGGGGCCCGGCCATAC-3'). 유사하게, CYP-sb3a 유전자(1.2 kb) DNA 단편은 CYP-sb3a 정방향 프라이머(5'-AGATCTCCCGTCGTCATCAAG-3') 및 역방향 프라이머(5'-TCTAGAAGGGGGCCCGGCCATAC-3')를 이용하여 얻었고, CYP-sb3b 유전자(1.2 kb) DNA 단편은 CYP-sb3b 정방향 프라이머(5'-AGATCTCCCGGCTCGGCGACATCA-3') 및 역방향 프라이머(5'-TCTAGAAGGGGGCCCGGCCATAC-3')를 이용하여 얻었다. 각각의 정방향 및 역방향 프라이머는 BglIII (AGATCT) 및 XbaI (TCTAGA) 제한 효소 사이트를 포함하였다. PCR은 각 프라이머 0.4 M, 4 dNTPs 각각 0.25 mM, 추출 DNA(400 ng/uL) 1uL, 반응 완충액에 녹인 1U Ex Taq polymerase (TaKaRa, Japan) 및 10% 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)가 포함된 최종 부피 20uL로 수행하였다. 다음의 프로파일에 따라, thermal cycler (BioRad, USA)로 증폭을 수행하였다: 95°C에서 60 s, 58°C에서 60 s, 및 75°C에서 60 s로 30 회. 증폭된 PCR 산물은 1% (w/v) 아가로스 젤 전기영동에 의해 분석되었고, DNA extraction kit (COSMO, Korea)를 이용하여 정제하였다. 그 후, PCR 산물은 pGEM T-easy vector (TaKaRa, Japan)에 라이게이션하였다. 라이게이션된 벡터는 완전성(integrity)을 확인하기 위해서 완전히 서열분석되었다(MacroGen, Korea). PCR 산물은 최종적으로 항시발현(constitutive) 프로모터(constitutive promoter) ermE* 및 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자를 포함하는 삽입 플라스미드 pSET152에 서브클로닝되었다(도 3A). 결과적인 프라이머는 각각 pCYP-sb3, pCYP-sb3a 및 pCYP-sb3b로서 제작되었다. 상기 플라스미드들은 접합을 통해 (과발현을 위해) 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 야생형, (보상을 위해) 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYPs 내로 도입되었고, 그 후 attB 사이트에 삽입하고 하이그로마이신(hygromycin)으로 선별하였다. CYP-sb13 (CYP506) 유전자를 포함하는 pCYP-sb13 (pMML301)은 음성 대조군으로 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a로 도입되었다.

[0035]

2. 결과

[0036]

VD₃-특이적 수산화반응에 있어서 CYP-sb3a의 역할에 대해 확인하기 위해서, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a에서 CYP-sb3a의 유전자 보상 실험을 수행하였다. CYP-sb3a의 코딩 서열은 항시발현(constitutive) *ermE** 프로모터를 포함하는 염색체 삽입 플라스미드 내로 클로닝되었다. pCYP-sb3a는 접합에 의해 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a의 유전체 내로 도입되었고, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a/pCYP-sb3a의 게놈 DNA는 PCR 증폭에 의해 확인되었다. HPLC 결과, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a/pCYP-sb3a에서 25(OH)VD₃ 및 1 α ,25(OH)₂VD₃로의 VD₃ 수산화반응은 상당히 회복되었다(도 3A). 반면, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a에서 CYP-sb13의 과발현(음성 대조군)은 25(OH)VD₃ 및 1 α ,25(OH)₂VD₃를 모두 생산하는데 실패하였다(도 3B). 25(OH)VD₃를 수산화반응 기질로서 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 배양에 첨가하였을 때, 25(OH)VD₃은 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb3a 돌연변이가 아니라 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 야생형에서 더 많이 1 α ,25(OH)₂VD₃로 전환되었다(도 3C). 이러한 결과는 VD₃ 수산화반응이 25번 위치에서 먼저 일어나고, 그 후 1 α 위치에서 2차 수산화반응이 일어난다는 것을 나타낸다. Δ CYP-sb3a 돌연변이에서 25(OH)VD₃은 1 α ,25(OH)₂VD₃로 더 전환되지 않았는데, 이는 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYP-sb3a가 25번 위치 및 1 α 위치에서 모두 VD₃ 수산화반응을 담당하는 것을 나타낸다.

[0037]

본 발명자들은 이전에 보고된 VD₃-특이적 CYPs과 아미노산을 비교함으로써 CYP-sb3a 내의 CYP-특이적 모티프(motif)를 분석하였다(도 4A). 전형적인 3개의 CYP-보존 모티프가 CYP 아미노산 서열 내에 존재하고 있었다. GXXXCXG 모티프는 시스테인(cysteine) 헴-철(heme-iron) 리간드 부위이고, K-helix 부위 내의 EXXR 모티프는 산화-환원 파트너들 사이의 상호작용과 연관되어 있으며, GXXT 모티프는 산소-결합 사이트이다. 도 4B에 나타난 서열 상동성 및 계통발생학적(phylogenetic) 결과는 CYP105 패밀리의 VD₃ 수산화효소인 *S. griseolus*의 CYP105A1 (32% 상동성) 보다 CYP107 패밀리의 VD₃ 수산화효소인 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 유래 Vdh (41% 상동성)와 높은 아미노산 유사성을 나타냈다. 이러한 결과는 VD₃의 25번 위치 및 1 α 위치 모두에 이중 수산화반응을 일으키는, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYP-sb3a가 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) Vdh 유사 박테리아 CYP107 패밀리에 속한다는 것을 나타낸다.

[0038]

<실시예 3> 이중 숙주에서의 CYP-sb3a의 기능적 발현

[0039]

1. 이중(heterologous) 발현 플라스미드 pHE-CYP-sb3a의 제작

[0040]

스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 내에서 CYP-sb3a 유전자를 이중 발현시키기 위해서, 전체 CYP-sb3a 유전자를 포함하는 1.2 kb DNA 단편은 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 유래 게놈 DNA를 주형으로 사용하고, CYP-sb3a Hexp 정방향 프라이머(5'-CATATGAGCGACAAGCTG-3') 및 역방향 프라이머(5'-GAATTCCTCGAACGGTAGTTTC-3')를 이용하여 증폭하였다. 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 *NdeI* (CATATG) 및 *EcoRI* (GAATTC) 제한효소 사이트를 포함하고 있다. PCR은 각 프라이머 0.4 M, 4 dNTPs 각각 0.25 mM, 추출 DNA(400 ng/uL) 1uL, 반응 완충액에 녹인 1U Ex *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 및 10% DMSO가 포함된 최종 부피 20uL로 수행하였다. 다음의 프로파일에 따라, thermal cycler (BioRad, USA)로 증폭을 수행하였다: 95℃에서 60 s, 54℃에서 60 s, 및 75℃에서 60 s로 30 회. 증폭된 PCR 산물은 1% (w/v) 아가로스 젤 전기영동에 의해 분석되었고, DNA extraction kit (COSMO, Korea)를 이용하여 정제하였다. 그 후, PCR 산물은 T&A cloning vector (Real Biotech Corporation, Taiwan)에 라이게이션하였다. 라이게이션된 벡터는 완전성(integrity)을 확인하기 위해서 완전히 서열분석되었다(MacroGen, Korea). PCR 산물은 유도성 *tipA* 프로모터를 포함하는 pHSEV-1 플라스미드에 최종적으로 서브클로닝하였고, 결과적인 플라스미드는 pHE-CYP-sb3a로 명명하였다. pHE-CYP-sb3a 플라스미드는 원형질(protoplast) 형질전환 방법을 통해 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 내로 도입한 후, 카나마이신(kanamycin; kan)에 의해 선별되었다.

[0041]

2. 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 내에서 CYP-sb3a 유전자의 이중 발현

[0042]

재조합 플라스미드 pHE-CYP-sb3a는 원형질(protoplasts) 형질전환을 위해 사용되었다. 원형질(protoplasts)을 준비하기 위해서, YEME 배지에서 배양한 스트렙토마이세스 실리칼라(*S. coelicolor*)에 라이소자임(lysozyme) 용액 (1 mg/mL)을 처리하였다. 형질전환은 pHE-CYP_{vd1} 및 P 완충액(sucrose 10.3%, K₂SO₄ 0.025%, MgCl₂ · 6H₂O 0.0202%, trace element solution 0.2%)에 녹인 25% PEG 1000 용액으로 수행하였다. 형질전환된 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*)는 R2YE 아가 플레이트(sucrose 10.3%, K₂SO₄ 0.025%, MgCl₂ · 6H₂O 1.012%, glucose 1%, casamino acids 0.01%, agar 1.1%, KH₂PO₄ (0.5%) 0.1%, CaCl₂ · 2H₂O (3.68%) 0.8%, L-proline (20%) 0.15%, TES buffer (5.73%, pH 7.2로 조정) 1%, trace element solution 0.02%, 별도로 준비된 NaOH (1N) 0.05%)에 30℃로 배양하였고, 재조합 균주의 선별을 위해서 카나마이신(kanamycin; kan)을 사용하였다.

[0043]

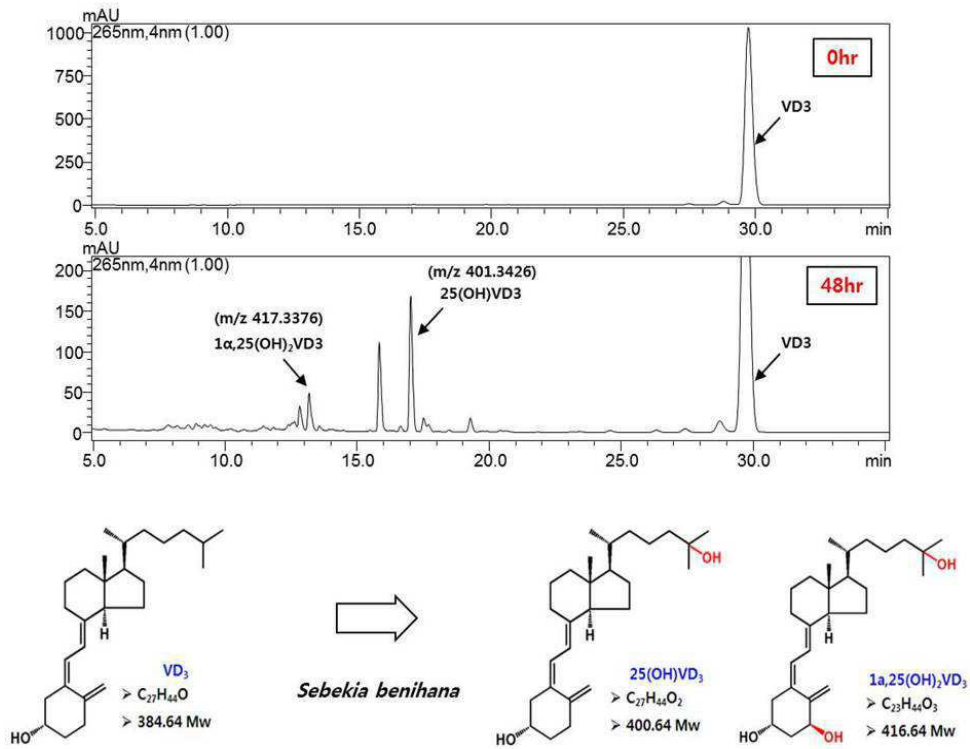
3. 결과

[0044]

이중 숙주 내에서 CYP-sb3a의 생체 내(*in vivo*) 기능을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 유전적 조작이 쉬운 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145를 발현 숙주로서 사용하였다. 더 중요하게는 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*)는 VD₃-특이적 수산화반응을 수행하지 않는다. CYP-sb3a 유전자는 티오스트렙톤(thiostrepton)-유도 *tipA* 프로모터를 포함하는 pHSEV-1로 클로닝되었고(pHE-CYP-sb3a, 도 5A), 상기 재조합 플라스미드는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG)-기반 원형질 형질전환을 통해 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145 내로 도입한 후, 카나마이신(kanamycin)으로 선별하였다. 25(OH)VD₃는 *S. coelicolor* M145/pHE-CYP-sb3a 균주에서 명확하게 검출되었으나, 벡터 자체만 포함하는 *S. coelicolor* M145 야생형 균주에서는 어떤 수산화반응도 관찰할 수 없었다(도 5B). 이러한 결과는 심지어 이중 숙주에서도 CYP-sb3a가 VD₃-특이적 수산화반응에 있어 주요 역할을 하고 있다는 것을 나타낸다. 하지만, 흥미롭게도 *S. coelicolor* M145/pHE-CYP-sb3a 균주에서 1 α ,25(OH)₂VD₃ 피크는 명확하게 검출되지 않았는데, 이는 이중 숙주 시스템에서는 25(OH)VD₃의 1 α 위치에서 일어나는 2차 수산화반응의 효율이 VD₃의 25번 위치에서 일어나는 1차 수산화반응 보다 좋지 않다는 것을 나타낸다. 다만, CYP-sb3a 이외에 세베키아 베니하나(*S. benihana*)에 존재하는 몇몇 추가적인 인자들이 *S. coelicolor*에서의 2차 수산화반응에 필요할 수도 있다는 가능성을 배제할 수는 없다. 결론적으로, 본 발명자들은 박테리아 CYP107 패밀리의 새로운 멤버인 세베키아 베니하나(*S. benihana*) CYP-sb3a가 위치-특이적 VD₃ 수산화반응에 관여하는 주요 사이토크롬(cytochrome) P450 수산화효소라는 것을 처음으로 밝혀냈다.

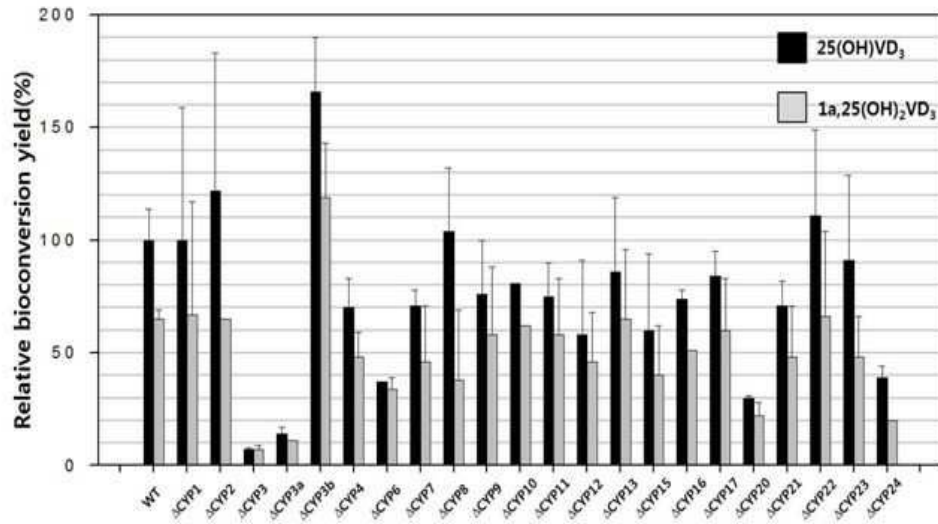
도면

도면1

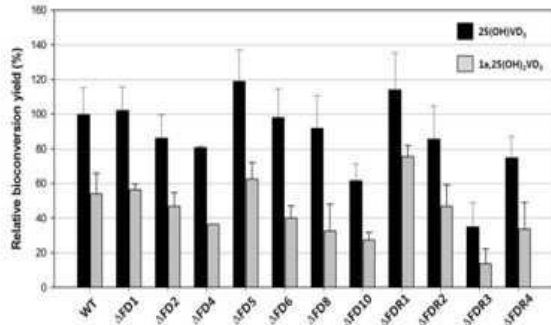


도면2

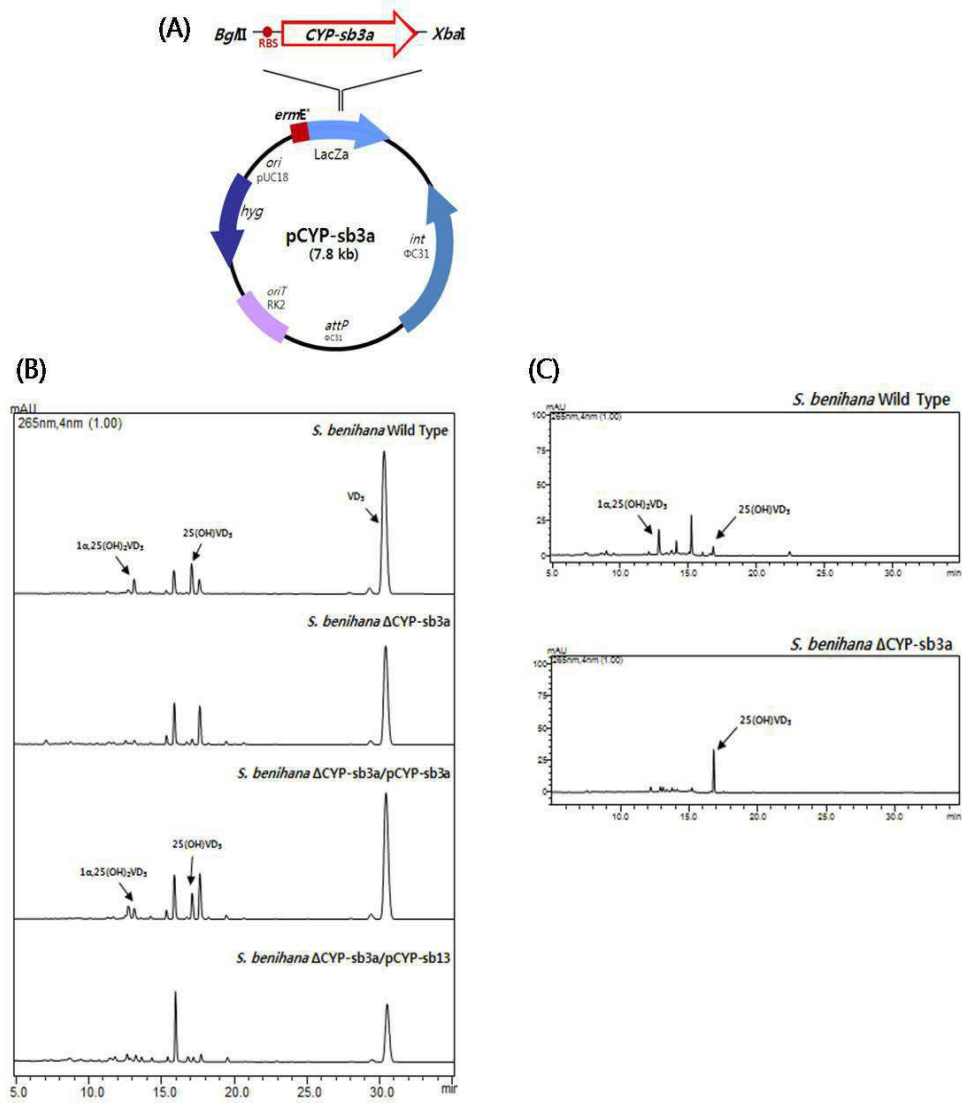
(A)



(B)

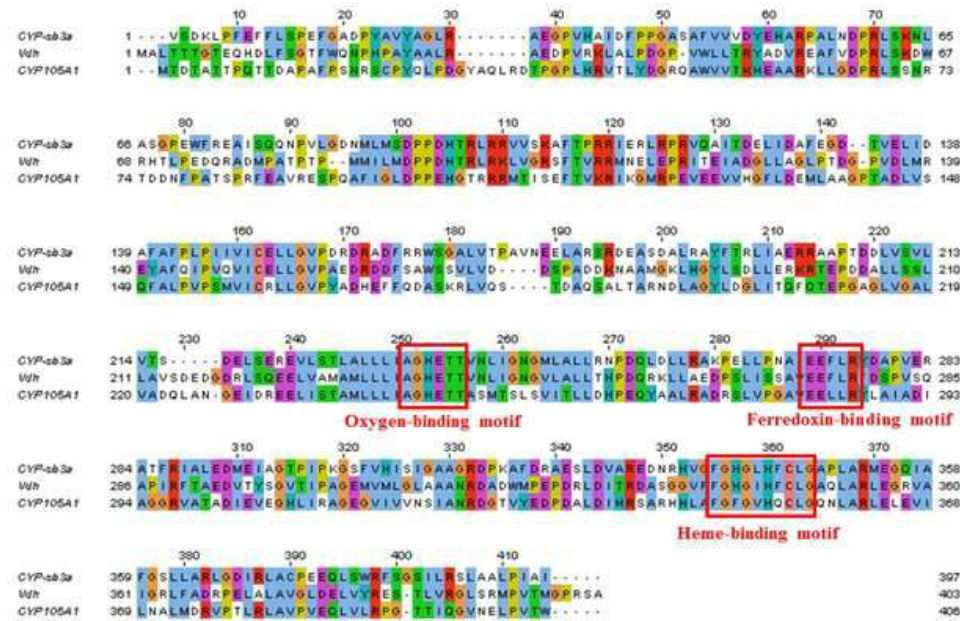


도면3

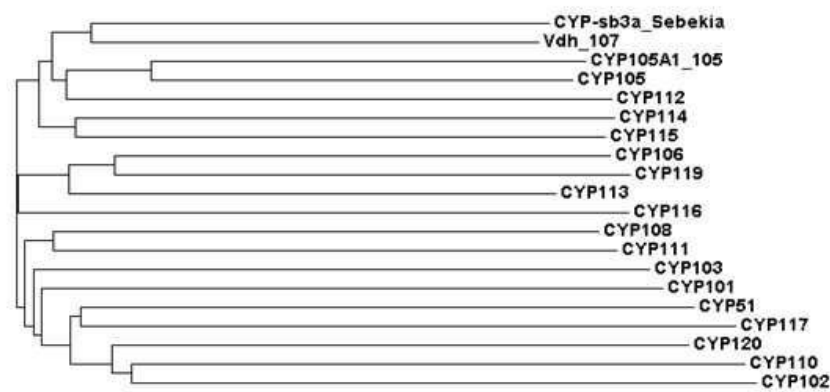


도면4

(A)

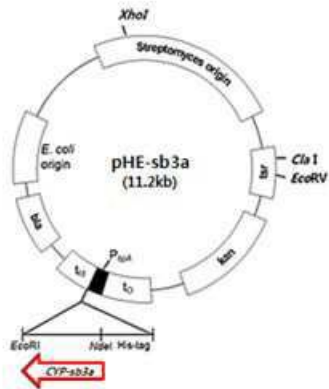


(B)

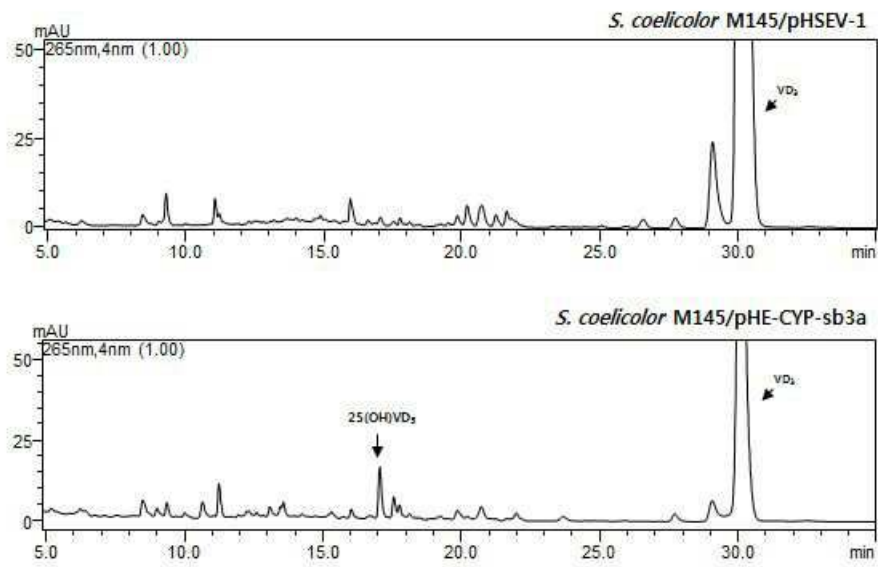


도면5

(A)



(B)



서열목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Novel vitamin D3 specific hydroxylase from Sebekia benihana
- <130> ADP-2013-0421
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 397
- <212> PRT
- <213> Sebekia benihana

<400> 1

Val Ser Asp Lys Leu Pro Phe Glu Phe Phe Leu Ser Pro Glu Phe Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ala Ile Asp Phe Pro Pro Gly Ala Ser Ala Phe Val Val Val Asp

35 40 45

Tyr Glu His Ala Arg Pro Ala Leu Asn Asp Pro Arg Leu Ser Lys Asn

50 55 60

Leu Ala Ser Gly Pro Glu Trp Phe Arg Glu Ala Ile Ser Gln Gln Asn

65 70 75 80

Pro Val Leu Gly Asp Asn Met Leu Met Ser Asp Pro Pro Asp His Thr

85 90 95

Arg Leu Arg Arg Val Val Ser Lys Ala Phe Thr Pro Arg Arg Ile Glu

100 105 110

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

115 120 125

Phe Glu Gly Asp Thr Val Glu Leu Ile Asp Ala Phe Ala Phe Pro Leu

130 135 140

Pro Ile Ile Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Pro Asp Arg Asp Arg

145 150 155 160

Ala Asp Phe Arg Arg Trp Ser Gly Ala Leu Val Thr Pro Ala Val Asn

165 170 175

Glu Glu Leu Ala Arg Ser Arg Asp Glu Ala Ser Asp Ala Leu Arg Ala

180 185 190

Tyr Phe Thr Arg Leu Ile Ala Glu Arg Arg Ala Ala Pro Thr Asp Asp

195 200 205

Leu Val Ser Val Leu Val Thr Ser Asp Glu Leu Ser Glu Arg Glu Val

210 215 220

Leu Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Val

225 230 235 240

Asn Leu Ile Gly Asn Gly Met Leu Ala Leu Leu Arg Asn Pro Asp Gln

245 250 255
 Leu Asp Leu Leu Arg Ala Lys Pro Glu Leu Leu Pro Asn Ala Ile Glu
 260 265 270
 Glu Phe Leu Arg Tyr Asp Ala Pro Val Glu Arg Ala Thr Phe Arg Ile
 275 280 285
 Ala Leu Glu Asp Met Glu Ile Ala Gly Thr Pro Ile Pro Lys Gly Ser
 290 295 300
 Phe Val His Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Arg Asp Pro Lys Ala Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Ala Glu Ser Leu Asp Val Ala Arg Glu Asp Asn Arg His Val
 325 330 335
 Gly Phe Gly His Gly Leu His Phe Cys Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg
 340 345 350
 Met Glu Gly Gln Ile Ala Phe Gly Ser Leu Leu Ala Arg Leu Gly Asp
 355 360 365
 Ile Arg Leu Ala Cys Pro Glu Glu Gln Leu Ser Trp Arg Phe Ser Gly
 370 375 380
 Ser Ile Leu Arg Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ile Ala Ile

385 390 395

<210> 2

<211> 1194

<212> DNA

<213> Sebekia benihana

<400> 2

gtgagcgaca agctgccgtt tgagttcttc ctctccccgg agttcggcgc cgaccctac 60

gcggtctacg ccgggctccg ggccgaagga cccgtccacg ccatcgactt ccctcctgga 120

gcgtccgcgt tcgtggtcgt cgactacgag caccgaggc ccgcgctgaa cgatccgcgc 180

ctgtccaaga acctcgccag cggaccgag tgggtccgcg aggccatctc gcagcagaac 240

cccgtgctcg gcgacaacat gctgatgtcg gatcctcccg accacaccg gctgcggcgg 300

gtggtctcga aggcgttcac gccgcgcagg atcgagcggc tgcgccgcg cgtccaggcg 360

atcaccgacg agctgatcga cgccttcgag ggcgacaccg tcgagctgat cgacgccttc	420
gccttcccgc tgcgatcat cgtgatctgc gagctgctgg gcgtgccga ccgtgacagg	480
gccgatttcc gcaggtgttc gggggcgctg gtcacgccgg ccgtcaacga ggagctggcc	540
aggagccgcg acgaggccag cgacgcgctg cgcgcctact tcacccgcct gatcgccgaa	600
cgacgcgccg ctcccaccga cgacctgggtg agcgtgctgg tgaccagcga cgagctgagc	660
gagcgggagg tgctctccac cctggcgctg ctgctgatcg ccggccacga gaccaccgtc	720
aacctcatcg gcaacggcat gctggccctg ctgcgcaacc ccgaccagct cgacctgctg	780
cgcgccaagc ccgagctgct gccgaacgcg atcgaggagt tctgcgtta cgacgcgcc	840
gtcgagcggg cgaccttcgc catcgcctc gaggacatgg agatcgccgg cacccccac	900
cccaagggca gcttcgtgca catctccac ggcgcgccgg gccgtgatcc gaaggccttc	960
gaccgggccc agagcctcga cgtcgccgcg gaggacaaca ggcacgtcgg cttcgccac	1020
ggcctccact tctgcctcgg cgcgccgctc gcgcgcatgg agggacagat cgccttcggc	1080
tcactgctcg cccggctcgg cgacatcagg ctggcctgcc ccgaggagca gtcagctgg	1140
cgttcagcg gctccatcct gagatcgtg gctgcccttc cgatagcgat ctag	1194