



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0032011
(43) 공개일자 2018년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01)
C12P 19/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0071 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0120629
(22) 출원일자 2016년09월21일
심사청구일자 2016년09월21일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김웅수
서울특별시 강남구 언주로30길 26, G동 5006호 (도곡동, 타워팰리스)
김민경
충청북도 청주시 흥덕구 대신로10번길 16-3, 104동 801호 (북대동, 현대1차아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

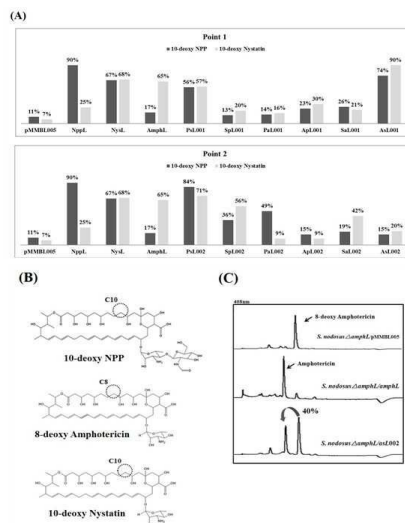
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 도메인 치환된 폴리엔 특이적인 하이브리드 수산화효소

(57) 요약

본 발명은 도메인 치환된 폴리엔(polyene) 특이적인 하이브리드 수산화효소에 관한 것으로, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리엔 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 폴리엔이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12P 19/62 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011296012016

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 신규 폴리엔 화합물 NPP 및 이의 유도체 생산

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리엔(polyene) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 252번째 내지 394번째 아미노산 또는 서열번호 2의 345번째 내지 401번째 아미노산으로 이루어진 도메인이 폴리엔의 기질특이성을 결정하는 것을 특징으로 하는 하이브리드 수산화효소.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리엔은 10-데옥시 나이스타틴-유사 슈도노카디아 폴리엔(10-deoxy nystatin-like Pseudocardia polyene; 10-deoxy NPP) 또는 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy nystatin)인 것을 특징으로 하는 하이브리드 수산화효소.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수산화효소는 10-데옥시 NPP를 NPP로 전환시키거나, 10-데옥시 나이스타틴을 나이스타틴으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 하이브리드 수산화효소.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및

상기 형질전환된 세포를 폴리엔이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 세포는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudocardia autotrophica*)인 것을 특징으로 하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 폴리엔은 10-데옥시 나이스타틴-유사 슈도노카디아 폴리엔(10-deoxy nystatin-like Pseudocardia polyene; 10-deoxy NPP) 또는 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy nystatin)인 것을 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 폴리엔 수산화는 10-데옥시 NPP를 NPP로 전환시키거나, 10-데옥시 나이스타틴을 나이스타틴으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 도메인 치환된 폴리엔(polyene) 특이적인 하이브리드 수산화효소에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사이토크롬 P450 수산화 효소(Cytochrome P450, CYP)는 철을 함유한 효소로서 생화학, 약리학, 독성학에서 중요한 역할을 하며 스테로이드, 지방산, 폴리케타이드 등을 기질로 인지하여 산화 혹은 하이드록실화를 일으킨다. 현재까지 CYP에 대한 많은 연구가 이루어져 왔는데, 폴리엔 화합물은 항진균제로서 사용되고 있지만 인체에 대한 높은 독성과 낮은 수용성으로 인하여 사용이 제한되고 있는 실정이며, 화학적 변형이 어려워 유용한 여러 폴리엔 유도체를 구축하는 데 어려움을 겪고 있다. 이러한 폴리엔 화합물의 생합성 단계에 관여하는 CYP를 조작하여 생물학적으로 다양한 유도체를 구축하기 위해서는 CYP의 기질특이성 규명이 필요하다. 하지만, 현재까지 CYP의 기질특이성을 나타내는 시스템이 알려진 바는 없다.

[0003] 대표적인 폴리엔 생산균주인 스트렙토마이세스 노도서스(*Streptomyces nodosus*), 스트렙토마이세스 노르세이(*Streptomyces noursei*) 및 회소방선균인 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)에는 각각 AmphL, NysL 및 NppL이라는 CYP가 존재하는데, 상기 유전자들은 폴리엔 생합성 과정에서 마지막 단계인 수산화 반응(hydroxylation)을 담당하고 있는 것으로 보고되었으나, 기질특이성을 나타내는데 영향을 미치는 도메인에 대해서는 명확하게 규명된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1379978호(2014.03.25 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리엔(polyene) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)를 제공하는 데에 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 하이브리드 수산화효소를 이용하여 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리엔(polyene) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 폴리엔이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 도메인 치환된 폴리엔 특이적인 하이브리드 수산화효소에 관한 것으로서, 폴리엔 특이적인 3가지의 CYP를 이용한 fusion CYP 구축을 통하여 기질특이성을 규명하였다. 본 발명은 기존 항진균제의 생합성에 관여하여 하나의 당을 기질로 인지하는 CYP 뿐만 아니라 특이적으로 두개의 당을 기질로 인지하는 CYP의 기질특이성을 분석하였으며, 이는 추후 기질특이성을 나타내는 CYP의 조작을 통해 단당체 뿐만 아니라 이당체 구조의 기질을 인지하여 다양한 폴리엔 유도체를 구축할 수 있을 것이며, 이를 통해 유용한 폴리엔 유도체의 생산이 가능해질 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1 (A) 폴리엔 생합성 기작을 나타낸다. 나이스타틴-유사 슈도노카디아 폴리엔(nystatin-like Pseudonocardia polyene; NPP)를 예시적으로 나타냈다. (B) 본 발명에서 사용된 클로닝 및 삽입 플라스미드를 나타낸다. (C) *P. autotrophica*△*nppY*△*nppL*, *P. autotrophica*△*nppL* 에서의 NppL, NysL, AmphL의 전환율을 나타낸다.

도 2a는 융합 CYPs를 제작하기 위한 아미노산 서열 분석 (PimD, NysL, NppL, AmphL) 및 2개의 중요 구역을 나타낸다. 도 2b는 돌연변이 CYP 유전자들을 나타낸다. 도 2c는 In-fusion에 의한 돌연변이 유전자들의 구축 모식도를 나타낸다.

도 3 (A) 융합 CYPs의 전환 수율을 나타낸다. (B) 폴리엔 생산 균주에 의해 생산되는 다양한 기질을 나타낸다. (C) *S. nodosus*△*amphL*에서 CYP-AsL002의 전환 수율을 나타낸다.

도 4 (A) 기질특이성을 나타내는 특정 구역을 나타낸다. (B) 특정 구역을 기반으로 한 융합 CYPs의 전환율을 나타낸다. pCYP-PsL001은 A 및 B 구역을 모두 pCYP-NysL로 치환하였고, pCYP-PsL003은 A 구역만을 pCYP-NysL로 치환하였으며, pCYP-PsL002는 B 구역만을 pCYP-NysL로 치환하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명자들은 각각의 폴리엔 특이적인 CYP(AmphL, NysL 및 NppL)의 이중숙주 발현을 진행하였고, 서로 다른 기질 특이성을 가지고 있음을 확인하였다. AmphL은 하나의 당(Mycosamine)을 기질로서 더 선호하며, NysL은 하나의 당(Mycosamine)과 두 개의 당(N-acetyl glucosamine, Mycosamine)을 모두 기질로 인지하였다. 마지막으로 NppL은 두 개의 당(N-acetyl glucosamine, Mycosamine)을 기질로서 더 선호하는 것을 확인하였다. 기질특이성을 나타내는 부위를 규명하기 위해 AmphL, NysL, NppL을 이용한 융합 CYP를 구축하고, 하나의 당(Mycosamine)과 두 개의 당(N-acetyl glucosamine, Mycosamine)에 대한 기질 특이성을 규명하고, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리엔(polyene) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase) 및 이의 기능적 동등물을 제공한다. 본 발명에서 상기 서열번호 1은 AsL001로 명명되었으며, 상기 서열번호 2는 PsL002로 명명되었다.

[0013] 상세하게는 상기 서열번호 1의 252번째 내지 394번째 아미노산 또는 서열번호 2의 345번째 내지 401번째 아미노산으로 이루어진 도메인이 폴리엔의 기질특이성을 결정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 상세하게는 상기 폴리엔은 10-데옥시 나이스타틴-유사 슈도노카디아 폴리엔(10-deoxy nystatin-like Pseudonocardia polyene; 10-deoxy NPP) 또는 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy nystatin)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 상세하게는 상기 수산화효소는 10-데옥시 NPP를 NPP로 전환시키거나, 10-데옥시 나이스타틴을 나이스타틴으로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 "폴리엔(polyene)"는 일반적으로 20 내지 40개의 탄소로 이루어진 거대한 마크로락톤(macrolactone) 링 구조를 지니며, 분자 내에 약 3 내지 8개의 접합된 이중결합(conjugated double bond)을 갖는 전형적인 유형 I 폴리케타이드 매크로라이드(polyketide macrolide) 화합물이다.

[0017] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 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 활성화에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 폴리엔이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 폴리엔을 수산화(hydroxylation)시키는 방법을 제공한다.

[0019] 상세하게는 상기 세포는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상세하게는 상기 폴리엔은 10-데옥시 나이스타틴-유사 슈도노카디아 폴리엔(10-deoxy nystatin-like Pseudonocardia polyene; 10-deoxy NPP) 또는 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy nystatin)일 수 있으나, 이에 한

정되는 것은 아니다.

[0021] 상세하게는, 상기 폴리엔 수산화는 10-데옥시 NPP를 NPP로 전환시키거나, 10-데옥시 나이스타틴을 나이스타틴으로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

[0022] 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.

[0023] "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.

[0024] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0025] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적인 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 암피실린(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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] <실험예>

[0029] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0030] 1. 균주, 배양 조건

[0031] 최소방선균 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) KCTC9441은 한국세포주은행(Korean Collection for Type Cultures; KCTC, Korea)으로부터 구입하였다. *P. autotrophica* 야생형 및 *P. autotrophica* 돌연변이 균주는 ISP2 액체 배지(glucose 0.4%, yeast extract 0.4% 및 malt extract 1%)로 28℃에서 배양하였고, 폴리엔 생산을 위해서는 YEME 액체 배지(yeast extract 0.3%, peptone 0.5%, malt extract 0.3%, glucose 1%, sucrose 34% 및 $MgCl_2 \cdot H_2O$ 2.5mM)에 배양하였다. 모든 *E. coli* 균주는 적절한 항생제가 첨가된 루리아 베르타니(Luria-Bertani) 액체 또는 루리아 베르타니(Luria-Bertani) 아가 배지로 37℃에서 배양하였다. *E. coli* ET12567/pUZ8002는 *E. coli-Streptomyces* 접합을 위한 공여 균주로 사용되었다.

[0032] 2. 돌연변이 CYP 유전자들의 구축

[0033] 모든 돌연변이 CYP 유전자는 In-Fusion HD Cloning kit (Clontech, CA, USA)을 사용하여 구축하였다. 선형화된 벡터는 제한효소 (*XbaI*)를 사용하여 제작하였고, DNA 단편은 PCR을 통해 증폭하였다. 선형화된 벡터 및 DNA 단편은 50℃에서 15분 동안 In-Fusion 클로닝 반응하여 융합하였다. 반응 혼합물을 컴피턴트(competent) *E. coli*에 형질전환하여 원하는 클론들을 얻었다. 돌연변이 CYP 유전자들을 제작하기 위해 사용된 프라이머 및 주형 DNA는 표 1에 나타냈으며, 프라이머 서열은 표 2에 나타냈다.

표 1

Mutant CYP gene	Fragment	Primer	Template DNA
CYP-PsL001	upstream	Infusion nppL(F), psL001(R)	pCYP-nppL
	downstream	psL001(F), Infusion nysL(R)	pCYP-nysL

CYP-SpL001	upstream	Infusion nysL(F), spL001(R)	pCYP-nysL
	downstream	spL001(F), Infusion nppL(R)	pCYP-nppL
CYP-PaL001	upstream	Infusion nppL(F), psL001(R)	pCYP-nppL
	downstream	paL001(F), Infusion amphL(R)	pCYP-amphL
CYP-ApL001	upstream	Infusion amphL(F), apL001(R)	pCYP-amphL
	downstream	apL001(F), Infusion nppL(R)	pCYP-nppL
CYP-SaL001	upstream	Infusion nysL(F), spL001(R)	pCYP-nysL
	downstream	saL001(F), Infusion amphL(R)	pCYP-amphL
CYP-AsL001	upstream	Infusion amphL(F), apL001(R)	pCYP-amphL
	downstream	asL001(F), Infusion nysL(R)	pCYP-nysL
CYP-PsL002	upstream	Infusion nppL(F), psL002(R)	pCYP-nppL
	downstream	psL002(F), Infusion nysL(R)	pCYP-nysL
CYP-SpL002	upstream	Infusion nysL(F), spL002(R)	pCYP-nysL
	downstream	spL002(F), Infusion nppL(R)	pCYP-nppL
CYP-PaL002	upstream	Infusion nppL(F), psL002(R)	pCYP-nppL
	downstream	paL002(F), Infusion amphL(R)	pCYP-amphL
CYP-ApL002	upstream	Infusion amphL(F), apL002(R)	pCYP-amphL
	downstream	apL002(F), Infusion nppL(R)	pCYP-nppL
CYP-SaL002	upstream	Infusion nysL(F), spL002(R)	pCYP-nysL
	downstream	saL002(F), Infusion amphL(R)	pCYP-amphL
CYP-AsL002	upstream	Infusion amphL(F), apL002(R)	pCYP-amphL
	downstream	asL002(F), Infusion nysL(R)	pCYP-nysL
CYP-PsL003	upstream	Infusion nppL(F), spL002(R)	pCYP-psL001
	downstream	spL002(F), Infusion nysL(R)	pCYP-spL002
CYP-SpL003	upstream	Infusion nysL(F), psL002(R)	pCYP-spL001
	downstream	psL002(F), Infusion nppL(R)	pCYP-psL002

표 2

[0035]

Primer	Sequence (5'→3')
Infusion nppL(F)	GGTTGGTAGGATCCTCTAGAGACCTGGCTCGCCGAGCT
Infusion nppL(R)	GGGCTGCAGGTCGACTCTAGACGGGCGGGTGTGCC
Infusion nysL(F)	TGCCGGTTGGTAGGATCCATGAGCACACCGACCG
Infusion nysL(R)	GGGCTGCAGGTCGACTCTAGATCACCAGGTGACGGGCA
Infusion amphL(F)	TGCCGGTTGGTAGGATCCGACCTCACCCTCTCCC
Infusion amphL(R)	CAGGTCGACTCTAGAGCGGGAGGTACCAGGT
psL001(F)	CTGTTTCGCGACCCACCCGACCGAGCTCGCCGC
spL001(F)	CTGTTTCATCCAGCACCCCGACCGAGCTGGCGGC
paL001(F)	CTGTTTCGCGACCCACCCGACCGAGCTGAAGGAG
apL001(F)	CTGTTTCACGCAGTAC CCCGACCGAGCTGGCGGC
saL001(F)	CTGTTTCATCCAGCACCCCGACCGAGCTGAAGGAGG
asL001(F)	CTGTTTCACGCAGTACCCCGACCGAGCTCGCCGC
psL002(F)	CTGTTTCGCGACCCACCCGACCGAGCTCGCCGC
spL002(F)	CACCTGACGTTTCGGCCACGGCATGTGGCACTGCA
paL002(F)	CACCTGACCTTCGGACACGGCATGTGGCACTGC
apL002(F)	CACCTGACGTTTCGGGCACGGCATGTGGCACTGC
saL002(F)	CGCACCTGACGTTTCGGCCACGGCATGTGGCACTGCA
asL002(F)	GAGCACCTGACGTTTCGGGCACGGCATGTGGCACTG
psL001(R)	GTGGGTCGCGAACAGCAGT
spL001(R)	GTGCTGGATGAACAGCACC
apL001(R)	GTACTGCGTGAACAGCAC
psL002(R)	TCCGAAGGTCAGGTGCGG
spL002(R)	GCCGAACGTCAGGTGCGG
apL002(R)	CCCGAACGTCAGGTGCTC

[0036]

3. 방선균(*Actinomycetes*)에서의 이중숙주 발현

[0037] 돌연변이 CYPs은 접합을 통해 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에서 이중숙주 발현되었다. 각각의 재조합 플라스미드를 포함한 *E. coli* ET12567/pUZ8002는 공여 균주로 사용되었고, *P. autotrophica*Δ*nppL*, *P. autotrophica* Δ*nppY*Δ*nppL*은 수여 균주로 사용되었다. 삽입 플라스미드 및 수여 균주의 리스트는 표 3에 나타났다. 공여 균주는 LB 배지로 2번 씻어냈고, 수여 균주는 2XYT 액체 배지(tryptone 1.6%, yeast extract 1%, NaCl 0.5%)로 한 번 씻어냈다. 수여 균주를 발아시킨 후, mISP4 고체 배지(ISP4 37%, yeast extract 0.5%, tryptone 1.5%)로 50℃에서 10분 동안 접촉시켰다. 30℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 재조합 균주의 선별을 위해 하이그로마이신(Hygromycin) 및 날리딕산(Nalidixic acid)을 함유한 증류수를 플레이트 상에 흘려보냈다. 하이그로마이신을 함유하는 ISP2 고체 배지 상에서 반복적으로 계대배양하여 돌연변이 균주들을 얻었다.

표 3

Plasmid	Characteristic
pMMBL005	Integrative plasmid, Hyg ^r
Strain	Characteristic
<i>Pseudonocardia autotrophica</i> KCTC9441	Wild-type, NPP producing strain
<i>P. autotrophica</i> Δ <i>nppL</i>	<i>nppL</i> mutant producing 10-deoxy NPP
<i>P. autotrophica</i> Δ <i>nppY</i> Δ <i>nppL</i>	<i>nppY nppL</i> double mutant producing 10-deoxy Nystatin

[0039] 4. 폴리엔 특이적 수산화반응에 대한 생전환 분석 및 HPLC 분석

[0040] 폴리엔 유도체들을 동량의 부탄올로 추출한 후, 원심분리하고 메탄올에 녹였다. 상기 추출물은 Zorbax SB-C18 column (5μm particles, 4.6 x150 mm, Agilent)이 장착된 Shimadzu SPD M10A (Shimadzu, Japan)을 사용하여 분석하였다. 상기 컬럼은 50% solvent A (0.05M ammonium acetate, pH 6.5) 및 50% solvent B (methanol)로 평형화시킨 후, 다음의 용매 기울기(gradient)로 분석을 수행하였다. 1.0 ml/min 유량에서, 50% B (0 min), 75% B (3 min), 100% B (30 min), 50% B (33 min) 및 50% B (40 min)이고, UV/Vis 검출은 305 nm에서 수행하였다. 폴리엔 유도체 정량은 나이스타틴 A1(Nystatin A1; Sigma Aldrich)을 표준으로 하여 HPLC를 통해 수행하였다.

[0041] <실시예 1> 폴리엔 특이적 CYP의 이중 숙주 발현

[0042] 폴리엔 특이적인 수산화 효소들이 기질특이성을 가지고 있는지, 각각 어떤 기질을 선호하는지에 대해 규명하기 위하여 각각의 수산화 효소들을 이중숙주 발현하였다. 폴리엔 화합물 암포테리신(Amphotericin), 나이스타틴(Nystatin), 나이스타틴-유사 슈도노카디아 폴리엔(nystatin-like *Pseudonocardia* polyene; NPP)의 생합성 과정(도 1A)에서 하이드록실화를 담당하는 CYP-AmphL, CYP-NysL, CYP-NppL을 선정하였고, 방선균 염색체 내에 삽입되는 벡터(도 1B)를 이용하여 이중숙주 발현하였다. 기질은 마이코사민(mycosamine)을 포함하는 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy Nystatin)과 마이코사민(mycosamine) 및 N-아세틸 글루코사민(N-acetyl glucosamine)을 포함하는 10-데옥시 NPP(10-deoxy NPP)이며, 이를 각각 생산하는 균주인 *P. autotrophica*Δ*nppY*Δ*nppL*, *P. autotrophica*Δ*nppL*을 숙주로 이용하였다. 그 결과, CYP-AmphL은 하나의 당(mycosamine)을 기질로 선호하였으며, 그에 반해 CYP-NppL은 두 개의 당(mycosamine, N-acetyl glucosamine)을 더 선호하였다. 마지막으로 CYP-NysL은 하나의 당과 두 개의 당을 모두 높은 비율로 인지하는 것을 확인하였다(도 1C). 이를 통해 폴리엔 특이적인 수산화 효소들이 각각 선호하는 기질이 있으며 즉, 기질특이성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0043] <실시예 2> 도메인 스와핑(Domain swapping) 및 융합 CYPs의 이중 숙주 발현

[0044] 기존의 연구 결과를 통해 폴리엔 특이적인 수산화 효소들이 기질특이성을 가지고 있음을 확인하였다. 이러한 기질특이성을 나타내는 부위를 밝혀내기 위해 도메인 스와핑을 진행하였다. 단백질 3차 구조를 포함하여 다양한 연구가 진행된 폴리엔 수산화 효소인 CYP-PimD에서 기질과의 거리가 6Å 이내이며, 기질과의 상호작용에 중요한 기능을 하는 두 도메인을 선정하였고, 아미노산 서열에서 CYP-PimD와 50% 이상의 상보성을 보이는 CYP-NppL, CYP-NysL, CYP-AmphL에 적용하였다(도 2a). 각각의 수산화 효소를 두 도메인을 기반으로 혼합하였고, 총 12개의 융합 CYP(도 2b)를 Infusion 방법을 이용하여 제작 하였다(도 2c). 이를 *P. autotrophica*Δ*nppY*Δ*nppL*과 *P. autotrophica*Δ*nppL*에 접합(conjugation) 방법을 통해 이중숙주 발현하여 기질특이성을 분석하였다.

[0045] <실시예 3> 융합 CYPs의 생전환율을 분석하기 위한 이중 숙주 발현

[0046] 폴리엔 특이적인 수산화 효소의 기질특이성 규명을 위하여 CYP-NppL, CYP-NysL, CYP-AmphL을 특정 위치를 기반

으로 도메인을 치환하였고, 총 12개의 융합 CYP를 하나의 당을 포함한 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy Nystatin)과 두 개의 당을 포함한 10-데옥시 NPP(10-deoxy NPP)를 생산하는 *P. autotrophica* $\Delta nppY\Delta nppL$ 과 *P. autotrophica* $\Delta nppL$ 에 이중숙주 발현하였다. 유용한 폴리엔 유도체의 생산을 위해서는 폴리엔 생합성에 관여하는 CYP의 규명이 필요하다. 즉, CYP의 기질특이성을 나타내는 부위를 밝히는 것이 중요하다. 이를 위해 특정한 하나의 기질에만 뚜렷한 특이성을 보이는 폴리엔 CYP인 NppL과 AmphL을 NysL과 혼합하였을 때, 본래의 기질특이성을 잃어 버리고 NysL과 같이 두 가지의 기질을 모두 높은 비율로 인지하는 융합 CYP를 분석하였다(도 3A).

[0047] pCYP-PsL001(56%, 57%), pCYP-PsL002(84%, 71%)는 pCYP-NppL을 기반으로 C-말단에 pCYP-NysL을 포함함으로써 두개의 당을 기질로 인지하던 pCYP-NppL의 성질을 잃고 pCYP-NysL처럼 두 가지의 기질을 모두 인지하였다. 또한 pCYP-AsL001(74%, 90%)은 pCYP-AmphL을 기반으로 C-말단에 pCYP-NysL을 포함함으로써 하나의 당을 기질로 인지하던 pCYP-AmphL의 성질을 잃고 pCYP-NysL과 같이 두 가지의 기질을 모두 인지하였다. 즉, CYP의 C-말단 부분이 치환됨으로서 본래의 기질 특이성을 잃게 된 것이다.

[0048] 하지만 CYP-AsL002는 C-말단에 pCYP-NysL을 포함하고 있음에도 불구하고 두가지의 기질을 모두 인지하지 못하였다. CYP-AsL의 N-말단에 포함된 pCYP-AmphL은 야생형(Wild type) 균주인 *S. nodosus* 에서 8번 탄소에 하이드록실기가 없으며 7개의 연속적인 이중탄소결합을 가진 heptaene 형태의 8-데옥시 암포테리신(8-deoxy Amphotericin)을 기질로 인지하여 작용하는 수산화 효소이다(도 3B). 그러나 연구에 사용된 기질은 10번 탄소 위치에 하이드록실기가 없으며 tetraene 형태의 aglycone인 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy Nystatin)과 10-데옥시 NPP(10-deoxy NPP)이다. 이러한 기질의 구조적 차이로 인해 pCYP-AmphL이 1번 위치를 기반으로 앞부분에 있는 CYP-AsL001 보다 더 많은 부분을 차지하는, 즉 2번 위치를 기반으로 앞부분에 CYP-AmphL이 상당부분 차지하는 CYP-AsL002는 다른 기질특이성을 보여 *P. autotrophica* 에서 정상적으로 작동하지 못한 것으로 판단하였다. 이를 검증하기 위하여 CYP-AsL002를 *S. nodosus*에서 CYP 기능을 없앤 *S. nodosus* $\Delta amphL$ 에 보충하였다. *P. autotrophica* $\Delta nppY\Delta nppL$ 에서는 20%의 전환율로 10-데옥시 나이스타틴(10-deoxy Nystatin)을 기질로 인지하여 전환을 일으킨 반면, *S. nodosus* $\Delta amphL$ 에서는 전환율이 40%로 증가하여 8-데옥시 암포테리신(8-deoxy Amphotericin)을 기질로 삼아 암포테리신(Amphotericin)을 생합성하였다(도 3C). 이를 통해 CYP-AmphL의 본래의 기질특이성과 이중숙주 발현을 위해 사용한 균주의 차이로 인해 예상과 다른 결과가 나온 것이라 판단하였다.

[0049] CYP의 C-말단 중 특이적으로 어떤 부분에 의해 활성이 변하는지 좀 더 구체적인 위치를 규명하기 위하여 도메인을 세분화하여 분석하였다. pCYP-AmphL이 보인 다른 기질특이성으로 인해 같은 구조의 aglycon을 기질로 인지하는 pCYP-NppL과 pCYP-NysL의 융합 CYP를 통해 분석하였다. C-말단 중 1번 위치 기반으로 뒷부분을 A구역, 2번 위치 기반으로 뒷부분을 B 구역이라 명명하였다(도 4A). pCYP-NppL 기반으로 A, B 구역과 A 구역, B 구역을 각각 pCYP-NysL로 치환한 pCYP-PsL001, pCYP-PsL003, pCYP-PsL002를 통해 C-말단 중 어떤 위치가 기질 인지에 중요한지 분석하고자 하였다(도 4B).

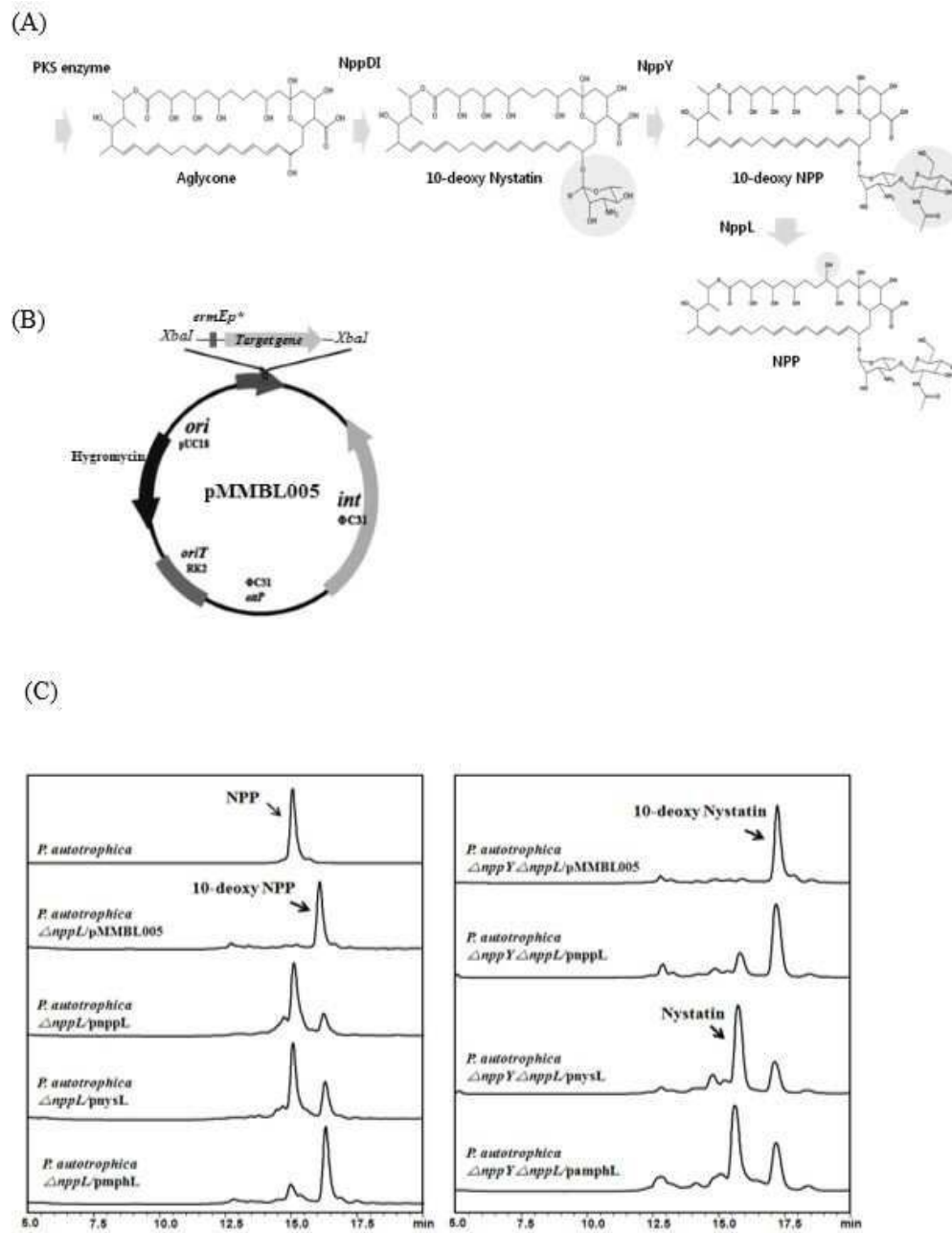
[0050] A, B 구역을 모두 pCYP-NysL로 치환한 pCYP-PsL001은 두 가지의 기질을 모두 인지하였다. 하지만 A 구역만을 pCYP-NysL로 치환한 pCYP-PsL003은 pCYP-NysL의 성질을 나타내지 않았고, pCYP-NppL과 같이 두 개의 당이 포함된 기질을 특이적으로 인지하였다. B 구역만을 pCYP-NysL로 치환한 pCYP-PsL002는 pCYP-NysL의 성질을 나타냈다. 즉, C-말단 중 2번 위치 기반으로 뒷부분인 B구역이 다른 CYP로 치환됨으로써 활성이 변하는 것을 확인하였다.

[0051] 본 발명을 통해 폴리엔 특이적인 수산화 효소의 기질특이성이 있음을 밝혀냈고, 10번 탄소위치에 하이드록실기가 없으며 tetraene 구조에 당의 개수에 따른 기질특이성을 확인하였다. 또한 공통적으로 2번 위치 기반으로 뒷부분인 B 구역의 CYP에 따라 기질특이성이 변화하는 것을 통해 기질특이성을 나타내는 부위를 규명하였다.

[0052] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백한 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2a

```

NysL      MSTPT-----APPSLHAEVPPVLRSLPRLRELQSRAPVCKVRTPAGDEGWLVTNRHTE 52
AmphL     MVNPT-----PPPSLEDAAPSVLRSLPRLRELQMRAPVTKIRTPAGDEGWLVTNRHAE 52
NPFL      MTSPTTCFVTGGGPPPSLEGQTPFVLRSLPRLRELQQAAPVCKVRTPTGDEAWLVTRYAE 60
PimD      MTAAS-----HDLPCLNLEPPKMLKLSPLLRLAQDRGPIHRVRTPAGDEAWLVTRHAE 53
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

NysL      LKQLLHDDRILARAHADPANAPRYVHNPFLLDLVVDD-DFDLARTLHAEMRSLFTQFSARR 111
AmphL     LKQLLHDERILARAHADPANAPRYVKSPIMDLLIMD-DVEAARAHAELRLLTTPQFSARR 111
NPFL      LKALLHDERILGRAHADPANAPRYVRNPFLLDLVVDD-DAQQARDLHTEMRRLLTPQFSARR 119
PimD      LKQLLHDERIGRTHPDPPSAAQVVRSPFLDLLISDADAESGRRQHAETRLITPLFSARR 113
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

NysL      VMDLTPRVEALAEGLAHFVAQGGPPADLHNDPFLSPLSVLCALIGVPAEEQKGLIAALT 171
AmphL     VLNMMFPMVEGIAEQILNGFRAQEQPADLRGNFSLPYSLTVLCALIGIPLOEQGQLLAVLG 171
NPFL      VLGLAPTVSAVAEQVLDGFAAGNPGDLHGGSMPYSLTVLCALIGIPPODRPELVRTIM 179
PimD      VLEMQPKVEEAADTLLDAFIAQGGPPGDLHGELTVFPALTVLCVIGVPPQRRRAELTTLA 173
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

NysL      KLGELDDPARVQEGQDELFGLLSGLARRKRITPEDDVISRLCLKVPSDERIGPIASGLLF 231
AmphL     EMATLNDAESVARSOAKLFGLLTDLAGRKRAEPGDDVISRLCETVPEDERIGPIAASLLF 231
NPFL      TMGEVDDAERVATVQAEFLGLLSAVARRKRAEPTDDVVSRLCAQVP-DEIRIGPIAAGLLF 238
PimD      GIAKLDDREGAVRAQDDLFQYVAGLVENKRAEPGDDVISRLNDGELTEDRVVAHLAMGLLF 233
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

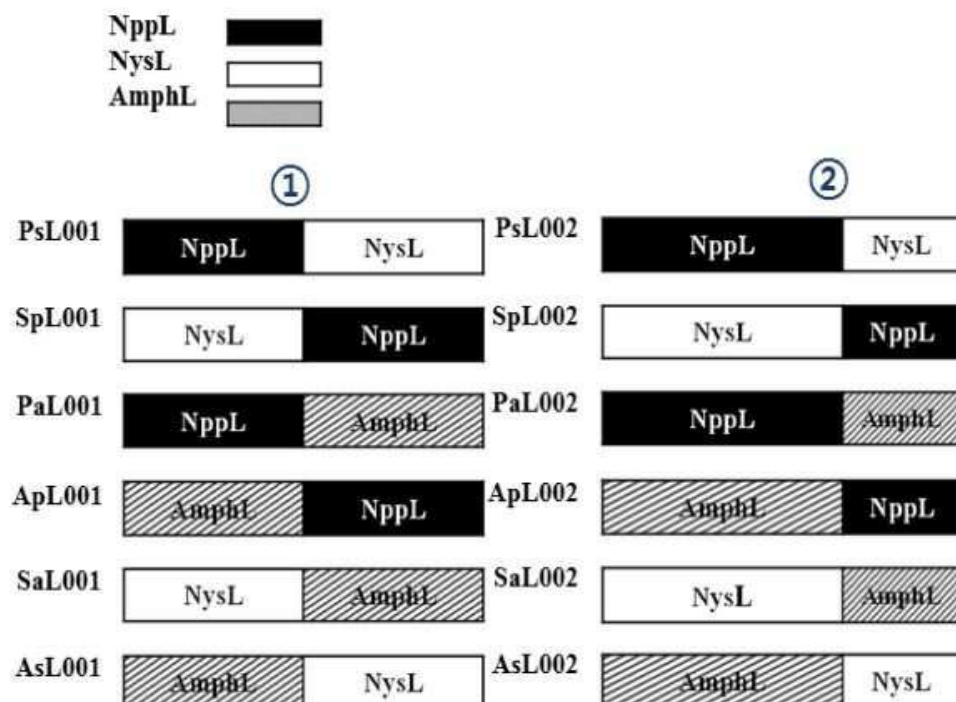
NysL      AGLDSVASHIDLGVLFIQHPDQLAAALADEKLMRGAVEEILRSKAGGS--VLPYRYATA 289
AmphL     AGLDSVATHVDLGVLFITQYPDQLKEALADEKLMRSGVEEILRAKAGGS--VLPYRYATD 291
NPFL      AGLDSVASHVDLGVLLFATHPDQLAAALADEKLMRSGVEEILRSKAGGS--VLPYRYATD 296
PimD      AGLDSVASIMDNGVLLAAHPDQRAALADPDVMAVAEEVLRTPARAGGS--VLPYRYASE 292
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

NysL      DVPIGDVTIRAGDLVLLDFTLVNFDRTVFDEPELFDIRRAPNPHLTFCHGMWHCIGAPLA 349
AmphL     DIEIADVITRTGDLVLLDFTLVNFDRTVFDEPELFDIRRAPNPHLTFCHGMWHCIGAPLA 351
NPFL      DVEIGGVTLRTGDLVLLDFTLVNFDRTVFDEPELFDIRRAPNPHLTFCHGMWHCIGAPLA 356
PimD      DMEFGGVTLIRAGDLVLLDFTLVNFDRTVFDEPELFDIRRAPNPHLTFCHGMWHCIGAPLA 352
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

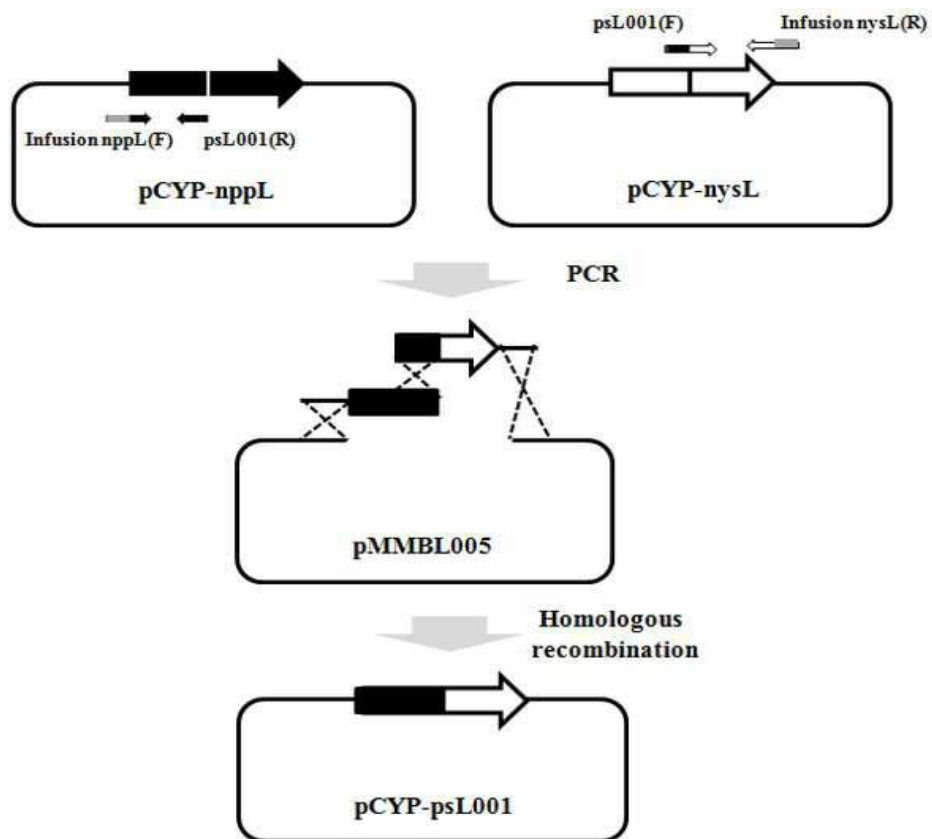
NysL      RVNLRITAYTLLFTRLPLGLRLVRPVEELRVLSGQLSAGGTELFPVTN 394
AmphL     RMMLKTAITYQLFTRLPLGLRLSSVEELRVLSGQLNGGTELFPVTN 396
NPFL      RMLKRTAFTLRLFTRLPLGLRLPARPVEEMRSGEGLSGGTELFPVTN 401
PimD      RLELRITMFTLRLFTRLPLGLRLPELVEQLRKEGQLSGGTELFPVTN 397
          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:          * .:

```

도면2b

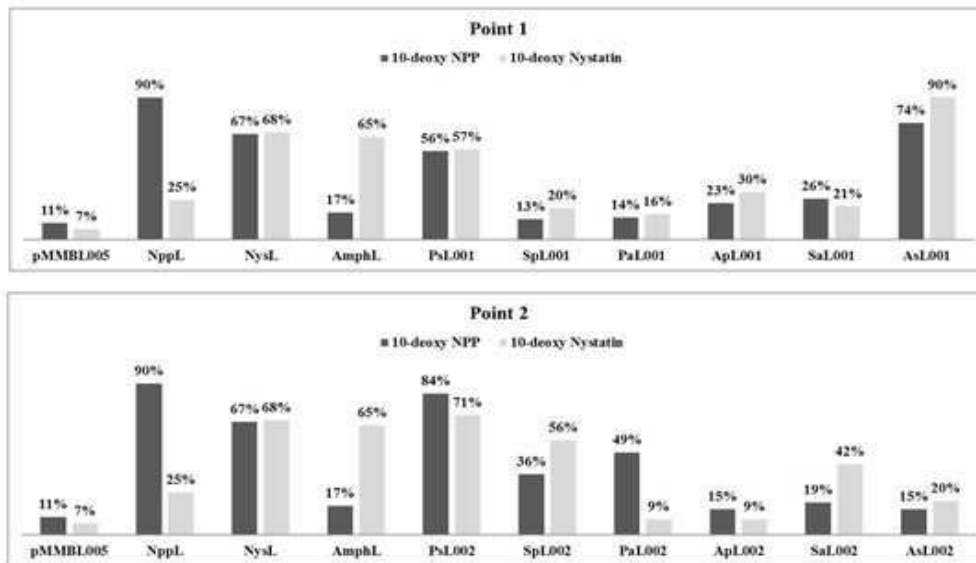


도면2c

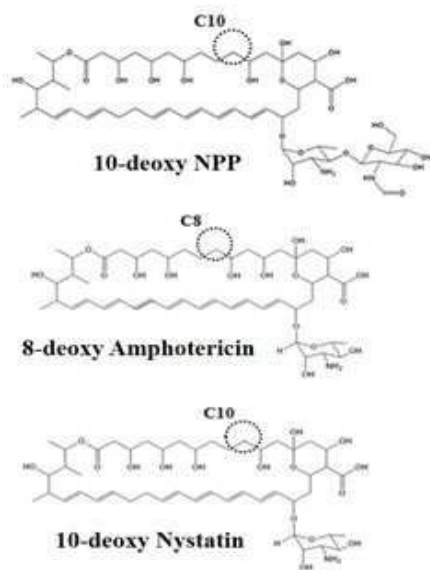


도면3

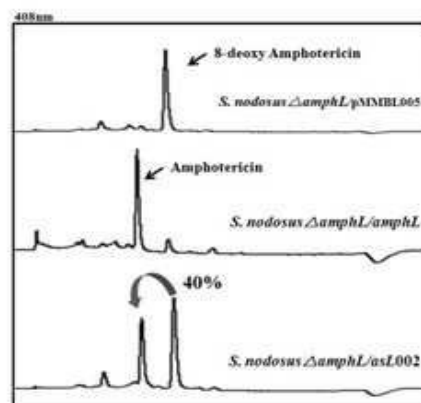
(A)



(B)

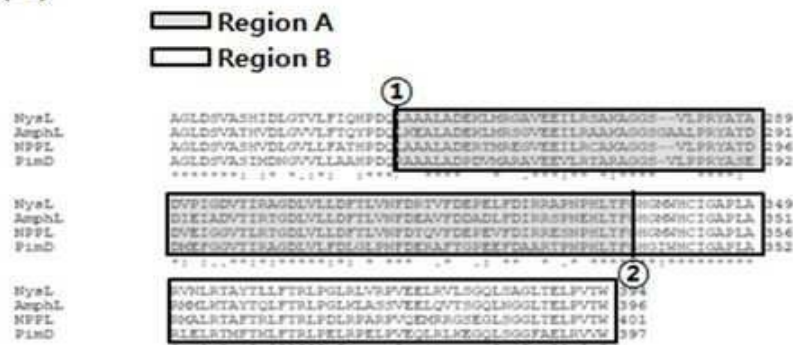


(C)

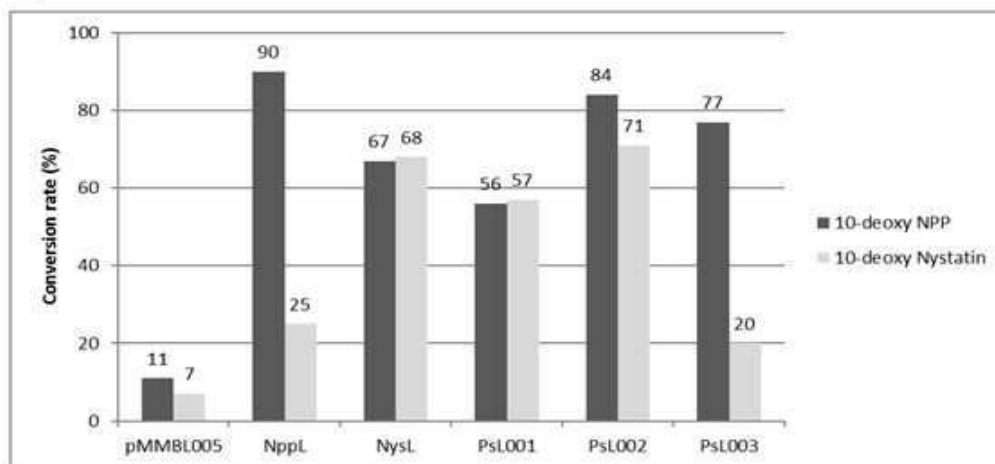


도면4

(A)



(B)



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Novel polyene specific hybrid hydroxylase constructed by domain swapping
- <130> ADP-2015-0268
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 394
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> hybrid hydroxylase_AsL001
- <400> 1

Met Val Asn Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Glu Asp Ala Ala Pro Ser

1 5 10 15
 Val Leu Arg Leu Ser Pro Leu Leu Arg Glu Leu Gln Met Arg Ala Pro

 20 25 30
 Val Thr Lys Ile Arg Thr Pro Ala Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Thr
 35 40 45
 Arg His Ala Glu Leu Lys Gln Leu Leu His Asp Glu Arg Leu Ala Arg
 50 55 60
 Ala His Ala Asp Pro Ala Asn Ala Pro Arg Tyr Val Lys Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Leu Ile Met Asp Asp Val Glu Ala Ala Arg Ala Ala His
 85 90 95

 Ala Glu Leu Arg Thr Leu Leu Thr Pro Gln Phe Ser Ala Arg Arg Val
 100 105 110
 Leu Asn Met Met Pro Met Val Glu Gly Ile Ala Glu Gln Ile Leu Asn
 115 120 125
 Gly Phe Ala Ala Gln Glu Gln Pro Ala Asp Leu Arg Gly Asn Phe Ser
 130 135 140
 Leu Pro Tyr Ser Leu Thr Val Leu Cys Ala Leu Ile Gly Ile Pro Leu
 145 150 155 160
 Gln Glu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Val Leu Gly Glu Met Ala Thr Leu

 165 170 175
 Asn Asp Ala Glu Ser Val Ala Arg Ser Gln Ala Lys Leu Phe Gly Leu
 180 185 190
 Leu Thr Asp Leu Ala Gly Arg Lys Arg Ala Glu Pro Gly Asp Asp Val
 195 200 205
 Ile Ser Arg Leu Cys Glu Thr Val Pro Glu Asp Glu Arg Ile Gly Pro
 210 215 220
 Ile Ala Ala Ser Leu Leu Phe Ala Gly Leu Asp Ser Val Ala Thr His
 225 230 235 240

 Val Asp Leu Gly Val Val Leu Phe Thr Gln Tyr Pro Asp Gln Leu Ala
 245 250 255

Ala Ala Leu Ala Asp Glu Lys Leu Met Arg Gly Ala Val Glu Glu Ile
260 265 270

Leu Arg Ser Ala Lys Ala Gly Gly Ser Val Leu Pro Arg Tyr Ala Thr
275 280 285

Ala Asp Val Pro Ile Gly Asp Val Thr Ile Arg Ala Gly Asp Leu Val
290 295 300

Leu Leu Asp Phe Thr Leu Val Asn Phe Asp Arg Thr Val Phe Asp Glu

305 310 315 320

Pro Glu Leu Phe Asp Ile Arg Arg Ala Pro Asn Pro His Leu Thr Phe
325 330 335

Gly His Gly Met Trp His Cys Ile Gly Ala Pro Leu Ala Arg Val Asn
340 345 350

Leu Arg Thr Ala Tyr Thr Leu Leu Phe Thr Arg Leu Pro Gly Leu Arg
355 360 365

Leu Val Arg Pro Val Glu Glu Leu Arg Val Leu Ser Gly Gln Leu Ser
370 375 380

Ala Gly Leu Thr Glu Leu Pro Val Thr Trp
385 390

<210> 2

<211> 401

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hybrid hydroxylase_PsL002

<400> 2

Met Thr Ser Pro Thr Thr Cys Pro Val Thr Gly Gly Gly Pro Pro Pro
1 5 10 15

Ser Leu Glu Gly Gln Thr Pro Pro Val Leu Arg Leu Ser Pro Leu Leu
20 25 30

Arg Glu Leu Gln Gln Gln Ala Pro Val Cys Arg Val Arg Thr Pro Thr
35 40 45

Gly Asp Glu Ala Trp Leu Val Thr Arg Tyr Ala Glu Leu Lys Ala Leu
50 55 60

Leu His Asp Glu Arg Leu Gly Arg Ala His Ala Asp Pro Ala Asn Ala
 65 70 75 80
 Pro Arg Tyr Val Arg Asn Pro Phe Leu Asp Leu Leu Val Val Asp Asp
 85 90 95
 Ala Gln Gln Ala Arg Asp Leu His Thr Glu Met Arg Arg Leu Leu Thr
 100 105 110

 Pro Gln Phe Ser Ala Arg Arg Val Leu Gly Leu Ala Pro Thr Val Ser
 115 120 125
 Ala Val Ala Glu Gln Val Leu Asp Gly Phe Val Ala Ala Gly Asn Pro
 130 135 140
 Gly Asp Leu His Gly Gly Phe Ser Met Pro Tyr Ser Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160
 Cys Glu Leu Ile Gly Ile Pro Pro Gln Asp Arg Pro Glu Leu Val Arg
 165 170 175
 Thr Ile Met Thr Met Gly Glu Val Asp Asp Ala Glu Arg Val Ala Thr

 180 185 190
 Val Gln Ala Glu Leu Phe Gly Leu Leu Ser Ala Val Ala Arg Arg Lys
 195 200 205
 Arg Ala Glu Pro Thr Asp Asp Val Val Ser Arg Leu Cys Ala Gln Val
 210 215 220
 Pro Asp Glu Arg Ile Gly Pro Ile Ala Ala Gly Leu Leu Phe Ala Gly
 225 230 235 240
 Leu Asp Ser Val Ala Ser His Val Asp Leu Gly Val Leu Leu Phe Ala
 245 250 255

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

Asp Thr Gln Val Phe Asp Glu Pro Glu Val Phe Asp Ile Arg Arg Glu

	325		330		335
Ser	Asn	Pro	His	Leu	Thr
	340		345		350
Ala	Pro	Leu	Ala	Arg	Val
	355		360		365
Thr	Arg	Leu	Pro	Gly	Leu
	370		375		380
Val	Leu	Ser	Gly	Gln	Leu
	385		390		395
					400

Trp

<210> 3

<211> 1185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hybrid hydroxylase_AsL001

<400> 3

atggtcaacc cgacaccgcc gccctctctc gaggatgccg cgccttcggt gtcgcgcctc	60
agcccgcgtgc tgcgcgagct ccagatgcgt gctcccgctca ccaagatccg caccgccgcc	120
ggcgacgagg gctggctggt gaccggcac gccgagctga agcagctgct gcacgacgag	180
cgctggccc gtgcgcacgc cgaccggcc aacgcgccc gctacgtcaa gagcccttg	240
atggacctgc tcatcatgga cgacgtggag gcggcccgcg ccgcgcacgc cgagctgcgc	300
acctgctca cccgcagtt ctccgccgc cgggtgctca acatgatgcc catggtggag	360
gggatcgagg agcagatcct gaacggcttc gccgccagg aacaaccgc cgatctgcgg	420
ggcaacttct cgctgccgta ctgcgtgacc gtgctgtgcg ccctgatcgg catcccgtg	480
caggagcagg gccaaactct cgcggtgctg ggcgagatgg ccacgtgaa cgacgcggag	540
agcgtcgcca ggagccaggc gaagctgttc gggctgctga ccgacctggc cggccgcaag	600
cgggccgaac ccggcgacga cgtgatctcc cgctgtgcg agacggctcc ggaggacgag	660
cgcacggcc ccacgccgc gagcctgctc ttgccggcc tcgacagcgt tgccacccat	720
gtcgacctgg gcgtcgtgct gttcacgcag taccggacc agctcgccgc ggccctggcc	780

gacgagaagc tgatgcgcgg cgccgtcgag gagatcctgc ggtccgcaa ggccggcggg 840
tcggtgctcc cgcggtacgc gaccgccgat gtaccgatcg gcgacgtgac catcagggcc 900
ggcgacctgg tgctgctgga cttcaccctg gtgaacttcg accgcacggt cttcgacgag 960
ccggagctct tcgacatccg gcgcgcccc aaccgcacc tgacgttcgg ccacggcatg 1020
tggcactgca tcggcgcgcc gctggccccg gtcaatctgc gcaccgcta caccctgctg 1080
ttcaccgcc tgcccgccct gcggctgggtg cgcccggtcg aggaactgag ggtgctgtcg 1140

gggcagtgtg cgcccgccct gacggagctg cccgtcacct ggtga 1185

<210> 4

<211> 1206

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hybrid hydroxylase_PsL002

<400> 4

atgaccagcc cgacgacctg cccggtcacc ggccggcggc ccccgccgtc cctggagggg 60
cagaccccg cgggtgctcg gctgagcccg ctgctgcggg agctgcagca gcaggcacc 120
gtgtgccggg tccggacccc caccggcgac gaggcctggc tggtcacccg ctacgccgag 180
ctgaaagcac tgctgcacga cgagcgctc ggccgcgcgc acgccgatcc ggcgaacgcg 240

ccgcggtacg tgcgcaacc gttcctggac ctgctggtcg tcgacgacgc ccagcaggcc 300
cgggacctgc acaccgagat gcggcgctg ctacccccgc agttctccgc gcgcggggtg 360
ctgggcctgg cgccacggg gtccgcggtc gccgagcagg tgctcgacgg gttcgtcgcc 420
gcgggcaacc ccggcgacct gcacggcggg ttctccatgc cgtactcgct gacgggtgctg 480
tgcaactca tcgggatccc gccgcaggac cgacccgagc tggcgcggac catcatgacg 540
atgggtgagg tggacgacgc cgagcgctc gccacggtcc aggccgagct gttcgggctg 600
ctgtccgccg tcgcccggcg caagcgggcc gagcccaccg acgacgtcgt gtcccggctg 660

tgcgcgagg tgcccgacga gcggatcggc ccgatcgccg ccggtctgct gttcgccggg 720
ctcgacagcg tcgccagcca cgctgacctg ggcgtactgc tgttcgcgac ccaccccgac 780
cagctggcgg ccgcgtcgc cgacgagcgc accatgcgcg agggcgctga ggagatcctg 840
cgctgcgcca aggcgggcgg atcgggtgctg ccccgctatg ccaccgacga cgtcgagatc 900
ggtggcgta ccctgcgcac cggcgacctg gtgctgtggt acttcaccct ggtcaacttc 960
gacacccagg tgttcgacga gccggagggtg ttgacatcc gccgggagtc gaacccgcac 1020
ctgaccttcg gacacggcat gtggcactgc atcggcgcac cgctggcccc ggtcaatctg 1080

cgcacgcct acacctgct gttcacccgc ctgcccggcc tgcggctggt gcgcccggtc	1140
gaggaactgc gggtgctgtc ggggcagttg tcggccggcc tgacggagct gcccgtcacc	1200
tggtga	1206