(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월19일
(11) 등록번호 10-1342774
(24) 등록일자 2013년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0092670
(22) 출원일자 2012년08월23일
심사청구일자 2012년08월23일
(56) 선행기술조사문헌
J Exp Bot., Vol. 57, No. 6, Pages 1399-1411 (2006.)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
한태룡
경기도 용인시 수지구 상현동 금호베스트빌 251동 1803호
조만호
경기도 용인시 기흥구 상갈동 금화마을 대우현대아파트 111동 902호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

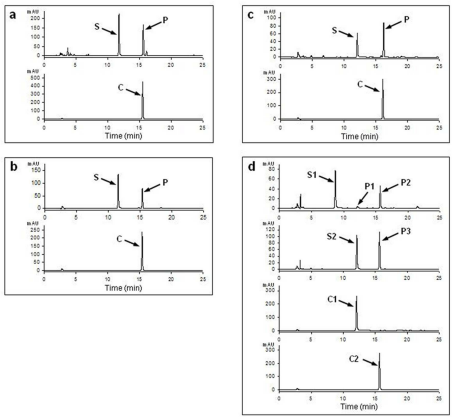
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **토마토 유래의 플라보노이드 3''/5''-O-메틸전이효소 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 토마토 유래의 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하여, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드로부터 메틸화된 플라보노이드를 제조하는 방법 및 상기 단백질, 형질전환체 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드의 메틸화된 플라보노이드로의 전환용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

부성희

경기도 용인시 기흥구 보라동 민속마을 쌍용아파트 109동 1003호

박혜린

울산광역시 남구 옥동 도성아파트 7동 209호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008094
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21
연구과제명	생리활성 구조변형 플라보노이드 생산을 위한 식물 대사 재설계 연구
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하여, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드로부터 메틸화된 플라보노이드를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소는 솔라넘 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum*) 유래인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질은 플라보노이드의 B 고리의 3' 탄소 또는 5' 탄소에 선택적인 메틸기 전이 활성을 가지는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드는 에리오딕티올(Eryodictiol), 디히드로퀘르세틴(Dihydroquercetin), 루테올린(Luteolin), 트리세틴(Tricetin), 퀘르세틴(Quercetin), 미리세틴(Myricetin) 및 라리시트린(Laricitrin)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 메틸화된 플라보노이드의 제조는 에리오딕티올(Eryodictiol)의 호모에리오딕티올(Homoeryodictiol)로의 전환, 루테올린(Lutenolin)의 크리소에리올(Chrysoeriol)로의 전환, 퀘르세틴(Quercetin)의 이소람네틴(Isorhamnetin)으로의 전환, 미리세틴(Myricetin)의 라리시트린(Laricitrin)으로의 전환 및 라리시트린(Laricitrin)의 시린게틴(Syringetin)으로의 전환으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전환 과정을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드의 메틸화된 플라보노이드로의 전환용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드는 에리오딕티올(Eryodictiol), 디히드로퀘르세틴(Dihydroquercetin), 루테올린(Luteolin), 트리세틴(Tricetin), 퀘르세틴(Quercetin), 미리세틴(Myricetin) 및 라리시트린(Laricitrin)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 메틸화된 플라보노이드의 전환은 에리오딕티올(Eryodictiol)의 호모에리오딕티올(Homoeryodictiol)로의 전환, 루테올린(Lutenolin)의 크리소에리올(Chrysoeriol)로의 전환, 퀘르세틴(Quercetin)의 이소람네틴(Isorhamnetin)으로의 전환, 미리세틴(Myricetin)의 라리시트린(Laricitrin)으로의 전환 및 라리시트린(Laricitrin)의 시린게틴(Syringetin)으로의 전환으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전환 과정을 포함하는 것인 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 토마토 유래의 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하여, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드로부터 메틸화된 플라보노이드를 제조하는 방법 및 상기 단백질, 형질전환체 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드의 메틸화된 플라보노이드로의 전환용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 플라보노이드는 식물 이차 대사산물 중에서 가장 크고 구조적으로 다양한 클래스이다. 플라보노이드는 병원균 및 초식동물에 대한 방어, 유해한 자외선에 대한 보호 및 꽃가루 매개자(pollinator)를 유도하기 위한 꽃의 색소에 있어 매우 중요하다. 상기와 같은 식물에서의 생리학적 기능뿐만 아니라, 플라보노이드는 항산화, 항균, 항염증 및 항암 활성 등 다양한 활성을 가지고 있다. 식품 성분으로서, 플라보노이드는 건강 촉진 및 질병 예방 기능을 가지고 있는 것으로 여겨지고 있다. 최근, 플라보노이드는 만성적인 인간 질환을 치료하기 위한 강력한 치료제로서 연구되고 있다.

[0003] 상기와 같은 플라보노이드의 다양한 생리학적 기능 및 생물학적 활성은 그들의 구조적인 다양성에서 기인한다. 상기 구조적인 다양성은 C 고리의 산화 정도 및 플라보노이드의 탄소 골격에서의 치환 정도에 기초하고 있다. 플라보노이드 골격의 일반적인 변형은 히드록실화(hydroxylaton), (이소)프레닐화((iso)prenylation) 및 설폰화(sulfonation)을 포함한다. 플라보노이드의 히드록시기는 또한 메틸기 또는 당 모이어티를 통하여 변형될 수 있다. 많은 플라보노이드 변형은 플라보노이드의 생물학적 활성을 증진시키거나 변형시킨다. 플라보노이드 나린게닌의 C-7 위치의 O-메틸화는 진균류인 쌀 병원균인 피리쿨라리아 오리재(*Pyricularia oryzae*)에 대한 나린게닌의 살진균 활성을 증진시킨다. 또한, 사쿠라네틴(7-O-methylnaringenin)의 메틸기는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 항균 활성에 매우 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드의 O-메틸화는 또한, 반응성이 있는 히드록시기를 불활성화시킬 수 있으며, 플라보노이드의 용해도 및 세포 내 구획화(intracellular compartmentalization)을 변화시킬 수 있다.

[0004] 최근, 천연 화합물을 변형시켜 증진된 물리화학적 속성 및 항균 활성을 가진 가치가 큰 물질을 개발 및 생산하려는 생명 공학 기술에 대한 관심이 높아지고 있다. 플라보노이드 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 형질전환된 미생물을 이용한 생전환 방법에 대한 다양한 연구가 이루어졌으며 상기 방법은 표적 플라보노이드의 구조 변형에 있어서 유망한 방법으로 여겨지고 있다(Amor IL et al., 2010, Nat Prod Commun 5:1893-1898; Kim DH et al., 2005, J Biotechnol 119:155-162; Kim BG et al., 2006, Phytochemistry 67:387-394).

[0005] 효소를 이용한 플라보노이드 O-메틸화는 AdoMet(S-adenosyl L-methionine)으로부터 메틸기를 수용체 분자의 히드록시기로 전이시키는 활성을 지니는, O-메틸전이효소(OMT)로 촉매될 수 있다. OMT는 일반적으로 AdoMet를 메틸 공여자로 사용하나, OMT의 종류에 따라 플라보노이드 구조에 대한 선택성 및 히드록실화 패턴이 상이하다. 따라서 특정 플라보노이드 변형에 있어서는 기질 및 위치 특이성이 서로 부합하는 적절한 OMT가 선택되어야 하며, OMT의 활성을 지닌 효소로 밝혀졌더라도 생물 공학에 적용하기 위해서는 그의 기질 특이성 및 위치 특이성이 규명되어야 한다.

[0006] 효소 및 전체 세포 미생물(whole-cell-microorganism)과 같은 생촉매의 용도는 화학적인 방법으로 쉽게 가져올

수 없는 높은 기질 특이성, 위치 특이성 및 입체 특이성 등으로 인하여 합성 및 자연적으로 존재하는 화합물의 변형에 있어 효율적인 방법으로 여겨지고 있다. 유전공학적으로 조작된 미생물을 이용한 생전환은 효소적인 전환에 있어 요구되는 비싼 조효소의 사용을 절감할 수 있어 경제적인 방법으로 여겨지고 있다. 여러 연구들에서 플라보노이드 대사에 관여하는 유전자를 포함하는 형질전환된 박테리아를 사용한 생전환를 통하여 플라보노이드의 위치 특이적 메틸화를 가져옴이 보고되었다. 폰시레틴(ponciretin, 4'-methylnaringenin)은 헬리코박터 파일로리(helicobacter pylori)에 대하여 잠재적 항균 플라보노이드로 알려져있으며, 이는 콩(soybean)에서 유래한 위치 특이적으로 작용하는 4'-OMT를 포함하는 형질전환된 E.coli를 사용한 생전환으로 나린게닌(naringenin)을 폰시레틴으로 전환하였다. 증대된 생물학적 활성을 가진 메틸화된 플라보노이드를 생성하기 위하여 생전환을 사용하는 경우, 플라보노이드 OMT 유전자들의 기질 특이성, 위치 특이성 및 생화학적 속성은 규명되어야 한다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 3'/5'-메틸화를 위치 특이적으로 가져올 수 있으며 E.coli와 같은 형질전환체에서 성공적으로 발현될 수 있는 플라보노이드 OMT를 규명하기 위하여 예의 노력한 결과, 토마토 품종인 Micro-Tom으로부터 기질 및 위치 특이적인 플라보노이드 3'/5'-OMT를 새롭게 규명하였고, 상기 OMT가 형질전환체에서 매우 성공적으로 발현됨을 확인하여, 이를 단백질 또는 미생물의 형태로 기질 특이적이며 위치 특이적인 플라보노이드의 생전환에 적용시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하여, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드로부터 메틸화된 플라보노이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드의 메틸화된 플라보노이드로의 전환용 조성물을 제공하는 것이다.

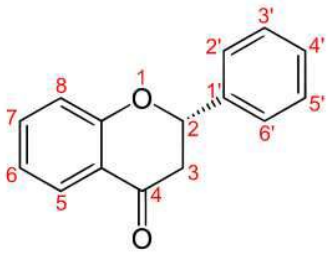
과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 이용하여, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드로부터 메틸화된 플라보노이드를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 용어, "플라보노이드"는 식물 이차 대사물(Plant secondary metabolite) 중 하나로서, 플라바논(Flavanone), 디히드로플라보놀(Dihydroflavonol), 플라본(Flavone) 및 플라보놀(Flavonol)로 분류될 수 있다. 상기 플라보노이드는 A, B 및 C 고리로 명명되는 3가지 고리를 포함한다(도 1).

[0012] 플라바논(Flavanone)은 하기 화학식 1과 같은 골격구조를 가지는 플라보노이드의 한 종류로서, 그 예로 헤스페레틴(Hesperetin), 나린게닌(Naringenin), 에리오딕티올(Eriodictyol) 및 호모에리오딕티올(Homoeriodictyol)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라바논은 다른 플라보노이드와 달리 C 고리가 포화되어 있는 특성이 있다.

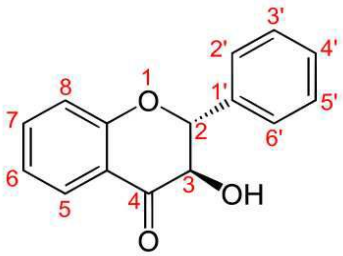
화학식 1



[0013]

[0014] 디히드로플라보놀(Dihydroflavonol)은 3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one을 골격으로 사용하는 플라보노이드의 한 종류로서, 하기 화학식 2의 기본 골격을 가진다. 상기 디히드로플라보놀은 3-히드록시플라바논(3-Hydroxyflavanone) 또는 플라바노놀(Flavanonol)로 명명될 수 있으며, 디히드로퀘르세틴(Dihydroquercetin, Taxifolin) 또는 디히드로캠프페롤(Dihydrokaempferol)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

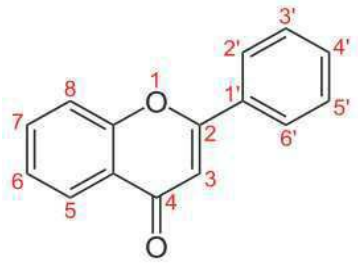
화학식 2



[0015]

[0016] 플라본(Flavone)은 2-phenylchromen-4-one(2-phenyl-1-benzopyran-4-one)을 기본 골격으로 하는 플라보노이드의 한 종류로서 하기 화학식 3의 기본 골격을 가진다. 상기 플라본의 예로 루테올린(Luteolin), 아피게닌(Apigenin), 트리세틴(Tricetin) 및 탄제리틴(Tangeritin)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

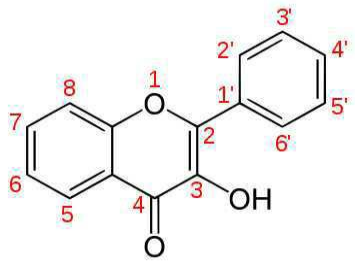
화학식 3



[0017]

[0018] 플라보놀(Flavonol)은 3-Hydroxyflavone 골격을 가지는 플라보노이드의 한 종류로서, 하기 화학식 4의 기본 골격 구조를 가진다. 상기 플라보놀의 예로 퀘르세틴(Quercetin), 캠프페롤(Kaempferol), 미리세틴(Myricetin), 피세틴(Fisetin), 이소람네틴(Isorhamnetin), 라리시트린(Laricitrin), 시린게틴(Syringetin), 파치포돌(Pachypodol) 및 람나진(Rhamnazin)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

화학식 4



[0019]

[0020] 상기 플라보노이드의 작용기(functional group) 및 탄소 골격의 차이에 따른 다양한 플라보노이드들의 구조에 대해서는 도 1에 모식도로 나타내었다.

[0021] 본 발명에서 용어, "3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드"는 플라보노이드의 B 고리의 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드를 의미한다. 상기 플라보노이드는 3' 탄소 또는 5' 탄소 중 하나에 히드록시기를 가지는 것이면 모두 포함하며, 3' 탄소 및 5' 탄소 모두에 히드록시기를 가지는 플라보노이드 역시 포함한다. 본 발명의 목적상 상기 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 메틸전이효소에 의해 메틸화될 수 있는 플라보노이드라면 제한없이 포함하며, 그 예로 에리오딕티올, 디히드로퀘르세틴, 루테올린, 트리세틴, 퀘르세틴, 미리세틴 또는 라리시트린이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 사용되는 상기 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드는 상용화된 화합물을 이용하거나, 상기 플라보노이드를 포함하는 다양한 식물로부터 분리 및 정제하여 이용할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 용어, "메틸화된 플라보노이드"는 하나 이상의 메톡시 기(methoxy group)를 가지는 플라보노이드를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 메틸화된 플라보노이드는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 메틸전이효소에 의하여 플라보노이드 3' 탄소 또는 5' 탄소의 히드록시기에 메틸기가 전달되어, 메톡시기를 가지게 된 플라보노이드라면 제한없이 포함하며, 그 예로 호모에리오딕티올, 크리소에리올, 이소람네틴, 라리시트린 또는 시린게틴일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에서 용어, "호모에리오딕티올"은 플라바논에 속하는 플라보노이드의 일종으로서, 플라보노이드의 B 고리의 3' 탄소에 메톡시기를 가지는 플라보노이드를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 호모에리오딕티올은 본 발명의 메틸전이효소에 의하여 에리오딕티올의 3' 히드록시기가 메틸화된 플라보노이드를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 호모에리오딕티올은 식물병원균인 클라도스포리움 쿠쿠메리넘(*Cladosporium cucumerinum*)에 대한 항진균 활성을 나타내며, 인간 CYP1B1 효소 활성을 억제하여 특정 암의 예방 및 치료 효과를 가져, 항진균 및 암과 같은 질병의 치료에 유용하게 사용될 수 있는 물질이다(Garo E et al., 1996, Phytochemistry 43:1265-1269; Doostdar H et al, 2000, Toxicology 144:31-38).

[0024] 본 발명에서 용어, "크리소에리올"은 플라본에 속하는 플라보노이드의 일종으로서 플라본의 기본 골격의 B 고리 3' 탄소에 메톡시기를 가지는 플라보노이드를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 크리소에리올은 본 발명의 메틸전이효소에 의하여 루테올린의 3' 히드록시기가 메틸화되어 전환된 플라보노이드를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 크리소에리올은 인간 다발성 골수종(Human multiple myeloma)에서 PI3K-Akt-mTOR 신호전달경로를 억제시킴으로써 항암 효과를 나타낼 수 있는 플라보노이드이며(Yang Y et al., 2010, J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2010 Dec;30(6):734-40), MC3T3-E1 세포의 과산화수소에 의해 유도되는 분화 억제로부터 보호하는 역할을 수행한다(Kim YH et al., 2010, J Appl Toxicol. 2010 Oct;30(7):666-73.). 따라서 상기 크리소에리올은 암과 같은 질병의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어, "이소람네틴"은 플라보놀에 속하는 플라보노이드의 일종으로서 플라보놀의 기본 골격에서 B 고리의 3' 탄소에 메톡시기를 가지는 플라보노이드의 일종을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 이소람네틴은 본 발명의 메틸전이효소에 의하여 퀘르세틴의 3' 히드록시기가 메틸화되어 전환된 플라보노이드를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 이소람네틴은 식도 편평상피암 세포인 Eca-109 세포의 증식을 억제하며, 세포 사멸을 유도한다(Ma G et al., 2007, Chem-Biol Interact 167:153-160). 또한, 3T3-L1 세포의 지방분화

(Adipogenesis)를 억제하는 역할도 수행하여(Lee J et al., 2009, Obesity 17:226-232), 상기 이소람네틴은 암의 치료 및 지방세포 분화 조절에 이용될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어, "라리시트린"은 플라보놀에 속하는 플라보노이드의 일종으로 플라보놀의 기본 골격에서 B 고리의 3' 탄소에 메톡시기를 가지며, 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드의 일종을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 라리시트린은 본 발명의 메틸전이효소에 의하여 미리세틴의 3' 히드록시기가 메틸화되어 전환된 플라보노이드를 의미하나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에서 용어, "시린게틴"은 플라보놀에 속하는 플라보노이드의 일종으로서 플라보놀의 기본 골격에서 B 고리의 3' 탄소 및 5' 탄소에 메톡시기를 모두 가지는 플라보노이드를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 시린게틴은 본 발명의 메틸전이효소에 의하여 미리세틴의 3' 탄소 및 5' 탄소의 히드록시기 모두에 순차적으로 메틸화되어 전환된 플라보노이드 또는 라리시트린의 5' 탄소의 히드록시기가 메틸화되어 전환된 플라보노이드를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 라리시트린 및 시린게틴은 적포도주에 포함되어 있는 대표적인 플라보노이드로서, 상기 라리시트린 및 시린게틴을 포함하는 플라보노이드가 대장암 증식을 억제시킬 수 있음이 보고되어 있다(Sergio GA et al., 2012, Food Chemistry 130;493-500).

[0028] 상기와 같은 유용성을 지닌 호모에리오딕티올, 크리소에리올, 이소람네틴, 라리시트린 및 시린게틴과 같은 메틸화된 플라보노이드들은 특정 기질로부터 위치 특이적으로 메틸화를 가져오는 메틸전이효소를 이용하여 생산될 수 있다. 다만, 메틸전이 활성을 가진 단백질이라 하더라도 그 종류에 따라 기질 특이성 및 위치 특이성이 상이하며, 같은 종에서 유래한 메틸전이효소라 하더라도 그 전환활성이 상이할 수 있으므로, 플라보노이드 B 고리에 존재하는 3' 탄소 또는/및 5' 탄소 위치에 특이적으로 메틸화를 가져오는 적절한 플라보노이드 메틸전이효소를 규명해야할 필요성이 있다. 이에 본 발명자들은 상기 Micro-Tom(*Solanum lycopersicum*) 유래의 메틸전이효소 SlOMT3 단백질이 플라보노이드에 대한 메틸전이 활성을 가짐을 규명하였고, 구체적으로 3' 탄소 또는/및 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드에 대해 메틸전이 활성을 가지는 것을 확인하였다.

[0029] 본 발명에서 용어, "플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질"은 플라보노이드를 기질로 하여 O-메틸화(O-Methylation)를 가져오는 단백질로서, 구체적으로 플라보노이드에 존재하는 히드록시기에 메틸기를 전달하여 메톡시기로 전환시키는 활성을 지닌 단백질을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소는 플라보노이드 B 고리의 3' 탄소 또는/및 5' 탄소에 존재하는 히드록시기에 메틸기를 전달하는 활성을 지니는 단백질을 의미하며, 바람직하게는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 단백질뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 O-메틸화 활성을 갖는 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 실질적으로 O-메틸화 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0030] 상기 유사성이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 유사성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.

[0031] 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소는 솔라넘 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) 유래의 O-메틸전이효소 단백질로서, 본 발명에서 SlOMT3와 혼용되어 사용될 수 있다. 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 플라보노이드의 B 고리의 3' 탄소 또는 5' 탄소에 선택적인 메틸기 전이 활성을 가져, 에리오딕티올의 3' 탄소에 위치한 히드록시기에 메틸 공여자인 AdoMet으로부터 메틸기를 전달하여 호모에리오딕티올로 전환시키며, 루테올린의 3' 탄소에 위치한 히드록시기에 메틸기를 전달하여 크리소에리올로 전환시키며, 퀘르세틴의 3' 탄소에 위치한 히드록시기에 메틸기를 전달하여 이소람네틴으로 전환시키며, 미리세틴의 3' 탄소에 위치한 히드록시기에 메틸기를 전달하여 라리시트린으로 전환시키고, 다시 라리시트린의 5' 탄소에 위치한 히드록시기에 메틸기를 전달하여 시린게틴으로 전환시키는 활성을 지닌다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서는 상기와 같이 3' 탄소 또는/및 5' 탄소에 히드록시기를 가지지 않는 플라보노이드인 나리게닌, 아피게닌 및 캠프페롤에 대해서도 실험을 수행한 결과, 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 상기 플라보노이드에 대해서는 메틸전이활성을 나타내지 않음을 확인하였다. 특히, 캠프페롤의 경우, 다른 위치에 히드록시기를 가짐에도 불구하고 활성을 나타내지 않아 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 B 고리의

3' 탄소 또는/및 5' 탄소에 특이적인 활성을 가짐을 다시 한번 확인할 수 있었다(표 2).

[0033] 또한, C 고리의 포화도에 따라 본 발명의 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소의 활성에 차이를 나타낼 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 C 고리가 포화되지 않은 퀘르세틴 및 라리시트린을 기질을 하는 경우, C 고리가 포화된 에리오딕티올을 기질로 하는 경우보다 효소 활성이 10배 가량 더 뛰어남을 확인하였다(표 2).

[0034] 본 발명의 메틸화된 플라보노이드를 제조하는 방법은 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물과 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기를 가지는 플라보노이드를 반응시키는 단계를 포함한다.

[0035] 본 발명의 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소 단백질을 코딩하는 핵산은 바람직하게는 서열번호 2로 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 플라보노이드 3' 또는/및 5' 히드록시기에 메틸기를 전이하는 활성을 지니는 단백질을 코딩하는 핵산이라면 상기 서열번호 2로 기재된 핵산 서열뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 서열을 포함한다. 또한, 플라보노이드 3' 또는/및 5' 히드록시기에 메틸기를 전이하는 활성을 지니는 단백질을 코딩하는 핵산이라면 일부 서열이 결실, 치환, 변형 또는 삽입된 핵산 서열도 포함한다. 상기 유사성에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0036] 본 발명의 핵산을 포함하는 발현 벡터는 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물을 말한다. 상기 제조된 재조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환(Transformation) 또는 형질감염(Transfection) 시킴으로써, 목적하는 단백질들을 수득할 수 있게 된다.

[0037] 본 발명에서 제공하는 핵산을 포함하는 발현 벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)를 포함한다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP)가 있다. 또한, 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus) 또는 백시니아 바이러스(Vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스(Baculovirus)와 같은 곤충 바이러스가 또한 사용될 수 있다.

[0038] 아울러 본 발명의 벡터로서, 핵산 발현 활성화 단백질(예를 들어, B42같은)이 연결된 융합 플라스미드(fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 플라스미드 벡터는 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 융합 플라스미드에는 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등을 태그(tag)로 포함할 수 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 융합 플라스미드가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터 제작에 있어서, pET28a(+) 벡터를 사용하였다. 또한, 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질의 경우, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 헥사히스티딘이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다. 본 발명의 핵산을 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한 부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소 단백질을 코딩하는 핵산은 벡터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 핵산 외에 인핸서(Enhancer)와 같은 시스 요소(Cis element), 스플라이싱 시그널(Splicing signal), 폴리 A 추가 시그널(Poly A addition signal), 선택 마커(Selection marker), 라이보좀 결합 서열(Ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소(Dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다. 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 방법에 DMSO(Dimethyl

sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(Electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*)속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)같은 바실러스(*Bacillus*)속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 세균; 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)같은 효모; 동물세포 및 곤충 세포가 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 대장균 균주의 구체적인 예로는 CL41(DE3), BL21 또는 HB101이, 바실러스 서브틸리스 균주의 구체적인 예로는 WB700 또는 LKS87이 있다. 대장균과 같은 세균이 숙주로서 사용될 때, 본 발명의 재조합 벡터는 숙주 내에서 자율적인 복제를 할 수 있고, 프로모터, 라이보좀 결합서열, 본 발명의 핵산 및 전사 종료 서열(Transcription termination sequence)로 구성되어 있다. 본 발명의 프로모터는, 본 발명의 핵산을 대장균과 같은 숙주에서 발현하도록 하는 한 어떠한 프로모터도 사용될 수 있다. 예를 들어, trp 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터 또는 PR 프로모터 같은 대장균 또는 파아지-유래 프로모터; T7 프로모터 같은 대장균 감염 파아지-유래 프로모터가 사용될 수 있다. 또한 tac 프로모터 같은 인공적으로 변형된 프로모터도 사용될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체의 배양물은 상기 형질전환체를 공지된 미생물 배양방법에 따라 배양한 다음 수득한 산물을 의미한다.

[0043] 본 발명의 형질전환체 및 이의 배양물은 플라보노이드 O-메틸전이효소를 포함하여 플라보노이드의 3' 탄소 또는/및 5' 탄소의 히드록시기에 메틸기를 전이하는 생물학적 활성을 지니므로, 플라보노이드 기질인 에리오딕티올을 호모에리오딕티올로, 루테올린을 크리소에리올로, 퀘르세틴을 이소람네틴으로, 미리세틴을 라리시트린 및 시린게틴으로, 라리시트린을 시린게틴으로 전환시킬 수 있다. 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소인 SlOMT3는 *E.coli* 형질전환체에서 성공적으로 발현되어 O-메틸전이활성을 지니므로 형질전환체를 이용한 플라보노이드의 생전환에 유용하게 이용될 수 있다(실험예 2).

[0044] 본 발명의 일 실시예에서는 Micro-Tom 토마토 cDNA 데이터베이스로부터 O-메틸전이활성을 가질 것으로 예상되는 SlOMT3 유전자를 획득하였다(실험예 1). SlOMT3 유전자를 *E.coli* 형질전환체에 발현시켰을 때, 상기 단백질 중 SlOMT3만이 생물학적 활성을 가지는 형태로 발현되는 결과를 나타내었다(실험예 2). 상기 SlOMT3 단백질의 기질 특이성 및 위치 특이성을 확인한 결과, 이소플라보노이드에 대해서는 기질 특이성을 나타내지 않고, 플라보노이드에 대해서만 기질 특이성을 나타내며, 플라보노이드 3' 또는/및 5' 탄소에 위치한 히드록시기를 가지는 플라보노이드에 대하여 위치 특이적으로 메틸 전이 활성을 가져, 에리오딕티올을 호모에리오딕티올로, 루테올린을 크리소에리올로, 퀘르세틴을 이소람네틴으로 전환시키며, 미리세틴을 순차적으로 라리시트린, 시린게틴으로 전환시킴을 확인하였다(표 2 및 실험예 3, 도 3 및 4). 그 중에서도 C 탄소가 포화된 에리오딕티올에 비하여 퀘르세틴 및 라리시트린을 보다 효과적으로 전환시키는 결과를 나타내었다(표 2, 3 및 실험예 3 및 4). 또한, 본 발명의 SlOMT3가 형질전환된 *E.coli* 형질전환체는 플라보노이드 에리오딕티올, 퀘르세틴 및 루테올린의 생전환을 효과적으로 가져오는 결과를 나타내어(도 5 및 6), 본 발명의 형질전환체 및 이의 배양물 역시 3'/5' 특이적인 메틸화가 필요한 플라보노이드의 생전환에 있어 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0045] 또 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 정의되는 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드의 메틸화된 플라보노이드로의 전환용 조성물을 제공한다.

[0046] 상기 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질, 발현벡터, 형질전환체, 배양물, 3' 탄소 또는 5' 탄소에 히드록시기(Hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드 및 메틸화된 플라보노이드에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0047] 본 발명의 메틸화된 플라보노이드로의 전환용 조성물은 플라보노이드의 B 고리에 존재하는 3' 또는/및 5' 탄소에 존재하는 히드록시기에 메틸기를 전달하여 메톡시기로 효과적으로 전환시키므로, 3' 또는/및 5' 탄소에 메톡

시기를 가지는 플라보노이드 예컨대, 호모에리오딕티올, 크리소에리올, 이소람네틴, 라리시트린 및 시린게틴으로의 전환에 있어 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 플라보노이드 O-메틸전이효소(O-methyltransferase) 단백질은 플라보노이드의 3' 또는/및 5' 탄소에 존재하는 히드록시기에 메틸기를 선택적으로 전달시키므로, 3' 또는/및 5' 탄소에 메톡시기를 가지는 산업적으로 유용한 플라보노이드의 생산에 유용하게 이용될 수 있으며, 플라보노이드의 구조 변형을 통한 기능성 천연물의 개발 및 식물의 대사공학적 개량에 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은, 플라보노이드 및 이소플라보노이드의 구조를 나타낼 것으로, 3가지 고리 구조 및 이의 넘버링(Numbering)을 보여준다.

도 2는, *E.coli*에 발현시킨 재조합 SlOMT3 단백질을 정제한 것을 나타내는 도이다. M: 사이즈마커; 1번 레인: 미유도한 E.coli 형질전환체의 조추출물; 2번 레인: IPTG로 유도시킨 E.coli 형질전환체의 조추출물; 3번 레인: 친화도로 정제한 SlOMT3

도 3은, 플라보노이드 기질과 재조합 SlOMT3와의 반응 생성물에 대한 대표적인 HPLC 프로파일(profile)을 나타낸 도이다. (a-c) 도 3a는 에리오딕티올과 SlOMT3와의 반응, 도 3b는 루테올린과 SlOMT3와의 반응, 도 3c는 퀘르세틴과 SlOMT3과의 반응을 나타내는 도이며, S는 기질(Substrate)을, P는 반응 생성물(reaction product)을 나타낸다. C는 검증된 메틸화된 화합물(Authentic methylated compounds)을 나타내는 약어로서 도 3a에서 C는 호모에리오딕티올을, 도 3b에서 C는 크리소에리올을, 도 3c에서 C는 이소람네틴을 나타낸다. (d) 도 3d는 미리세틴(S1)과 SlOMT3와의 반응 생성물을 나타낸 것으로서, 두 반응 생성물을 나타낸다(P1 및 P2). SlOMT3를 라리시트린(기질)과 반응시켰을 때 반응 생성물을 P3로 표기하였다. C1 및 C2는 각각 라리시트린 및 시린게틴으로서 검증된 메틸화된 화합물이다.

도 4는, SlOMT3 어세이의 반응 생성물과 상업적으로 이용가능한 검증된 스탠다드와의 질량 스펙트럼 결과를 나타내는 도이다. (A 내지 E) A 내지 E는 검증된 스탠다드를 나타내는 것으로서, (A) 호모에리오딕티올(RT=5.07min), (B) 크리소에리올(RT=5.35min), (C) 이소람네틴(RT=5.64min), (D) 라리시트린(RT=3.60min) 및 (E) 시린게틴(RT=5.54min)을 나타낸다; (F 내지 J) F 내지 J는 본 발명의 SlOMT3와 플라보노이드 기질 간의 반응 생성물을 나타나내는 것으로, (F)는 에리오딕티올의 메틸화된 생산물(RT=4.90min), (G)는 루테올린의 메틸화된 생산물(RT=5.34min), (H)는 퀘르세틴의 메틸화된 생산물(RT=5.61min), (I)는 미리세틴의 메틸화된 생산물(P1: RT=3.55, P2: RT=5.51min) 및 (J)는 라리시트린의 메틸화된 생산물(RT=5.54min)을 나타낸다.

도 5는, SlOMT3를 발현하는 *E.coli*를 이용한 플라보노이드의 생전환 동역학 결과를 나타낸 도이다. SlOMT3를 발현하는 *E.coli* 형질전환체의 의하여, 플라보노이드(●)인 퀘르세틴(a), 루테올린(b) 및 에리오딕티올(c)의 각각 대응하는 3' 메틸화된 화합물(■)인 이소람네틴, 크리오에리솔 및 호모에리오딕티올로의 전환을 나타낸다. 상기 결과는 3번의 독립적인 실험의 평균 및 표준 편차를 나타낸다.

도 6은, SlOMT3를 발현하는 *E.coli*를 이용한 플라보노이드의 생전환 수율을 나타내는 도이다. SlOMT3를 발현하는 *E.coli* 형질전환체의 의하여, 플라보노이드 기질인 퀘르세틴(a), 루테올린(b) 및 에리오딕티올(c)의 각각 대응되는 3'-메틸화된 생성물로의 반응 시간에 따른 전환율을 보여준다. 상기 결과는 3번의 독립적인 실험의 평균 및 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] **실시예 1: 시험물질**

[0052] 본 발명에서 사용된 라리시트린(laricitrin) 및 시린게틴(syringetin)은 Extrasynthese(Genay Cedex, France)로부터 구입하였고, 그 외 모든 플라보노이드는 Indofine Chemical Company(Hillsborough, NJ)로부터 구입하였다. HPLC 등급의 물(HPLC grade water), 아세토나이트릴 및 아세트산은 Avantor Performance Materials(Phillipsburg, NJ)로부터 구입하였고, 제한효소는 New England Biolabs(Hertfordshire, U.K.)로부터 구입하였다. AdoMet 및 다른 물질들은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO)로부터 구입하였고, 미니아쳐 토마토 품종인 Micro-Tom(Solanum lycopersicum cv Micro-Tom)의 씨앗은 Ball Horticultural Company(Victoria, Australia)로부터 구입하였다.

[0053] **실시예 2: SlOMT의 클로닝**

[0054] 전체 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 미니어쳐 토마토 품종인 Micro-Tom의 잎으로부터 추출하였다. 첫번째 가닥 cDNA 합성 키트(a first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR, Roche Diagnositics, Indianapolis, IN)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 4개의 전장(full-length) SlOMT 유전자는 첫번째 가닥 cDNA(first strand cDNA)로부터 PCR을 이용하여 증폭하였다. 본 발명에서 사용한 프라이머 세트는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

[0055]

유전자	서열(5'->3')	서열번호
SlOMT3	5'-CGGATCCATGGGTTCAACAAGCCTA-3'	3
	5'- CGAGCTCTCACTTGGTGAATTCCATAA-3'	4

[0056] 상기 SlOMT3에 대한 프라이머에서, NdeI(CATATG) 및 EcoRI(GAATTC) 제한효소 위치에 대해서는 밑줄(underline)로 표시하였다.

[0057] PCR로 수득한 생산물은 다시 pGEM™-T Easy 벡터(Promega, Madison, WI)에 서브클로닝하였다. 서열 확인 후, 적절한 제한효소를 이용하여 각각의 SlOMT 유전자를 잘랐고, pET28a(+) 벡터(Novagen, Madison, WI)로 삽입하였다. 그 결과 수득한 SlOMT/pET28a(+) 작제물은 재조합 SlOMT의 이종 발현(heterologus expression)을 위하여 E.coli BL21(DE3)로 형질전환하였다.

[0058] **실시예 3: 재조합 SlOMT3의 발현 및 정제**

[0059] SlOMT3/pET28a(+)를 포함하는 E.coli 형질전환체는 37℃에서 카나마이신(25㎍/㎖)을 포함하는 LB 배지에서 OD_{600}의 값이 0.6이 될때까지 배양하였다. 0.5mM IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 상기 배지에 첨가하여 SlOMT3의 발현을 유도하였다. 그 다음, 25℃에서 20시간동안 배양하였고, 원심분리하여 상기 세포를 수득하였다. 상기 세포 펠릿은 리소자임(1mg/㎖) 및 벤조네이즈(25 unit/㎖)을 첨가한 BugBuster Protein Extraction Reagent(Novagen)를 이용하여 재현탁하였다. 실온에서 10분간 배양한 다음, 원심분리를 이용하여 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거하였고, 상등액을 수득하였다. 조추출물은 다시 Ni-NTA 아가로스 비드(Qiagen, Hilden, Germany)와 혼합한 다음, 1시간 동안 4℃에서 교반하였다. 단백질 슬러리는 크로마토그래피 컬럼에 팩킹(packing)하였고, 50mM 이미다졸이 포함된 Tris 완충액(50mM Tris, pH 8.0, 300mM NaCl) 6 컬럼 부피로 세척하였다. 재조합 SlOMT3는 150mM 이미다졸이 포함된 Tris 완충액(50mM Tris, pH 8.0, 300mM NaCl)으로 용출하였다.

[0060] **실시예 4: 플라보노이드 O-메틸전이효소 어세이**

[0061] O-메틸전이효소 활성 측정을 위한 반응 혼합물로서 최종 부피가 500㎕인 20mM Tris-HCl(pH 7.5) 및 50μM 기질을 녹인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)와 100μM AdoMet로 구성된 반응 혼합물을 사용하였다. 재조합 SlOMT3를 추가함으로써 어세이를 개시하였고, 반응 혼합물은 30℃에서 30분간 배양하였다. 그 다음, 5N HCl을 추가함으로써 반응을 중단시켰고, 반응 생성물은 에틸 아세테이트를 2회 사용하여 추출하였다. 유기상(Organic phase)은 *in*

*vacuo*에서 건조시켰고, MeOH:H_2O(1:1, v/v) 100㎕에서 재구성(Reconstitution)하였다. 각각의 앨리컷(Aliquot)은 Sunfire C18 컬럼(Waters, Miliford, MA)이 장착된 역상 HPLC(Reversed phased high performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였고, 이때 3% 아세트산-물에서 25 내지 60% 아세토나이트릴의 선형 구배(Linear gradient)를 25분간 사용하였고, 280nm에서 검출하였다.

[0062] 검증된 스탠다드(Authentic standards)의 보유 시간(Retention time) 및 질량 스펙트럼(Mass spectra)와 서로 비교하여 생성물을 규명하기 위하여 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)으로 LC-MS 분석을 수행하였다. 질량 스펙트럼은 음성 모드 전자스프레이 이온화(Negative mode electronspray ionization)의 이온 공급원으로 얻었다.

[0063] 동역학적 파라미터(Kinetic parameters)를 결정하기 위하여, 고정된 AdoMet 농도(100μM)하에서 기질의 농도를 서로 달리하여 효소 반응을 수행하였다. 퀘르세틴(Quercetin), 루테올린(Luteolin) 및 에리오딕티올(Eriodictyol) 농도는 각각 0.2 내지 2, 0.1 내지 1.5 및 8 내지 50μM였다.

[0064] **실시예 5: 플라보노이드의 생전환(biotransformation)**

[0065] SlOMT3/pET28a(+)를 포함하고 있는 E.coli 형질전환체는 상기에서 설명한 바와 같이 배양하였고, IPTG로 발현을 유도하였다. IPTG를 4시간 처리하여 발현을 유도한 다음, 형질전환체를 수확하였고 25㎍/㎖농도의 카나마이신을 포함하는 신선한 LB 배지에서 재현탁하였다. 플라보노이드 기질인 퀘르세틴, 루테올린 및 에리오딕티올(50μM) 각각을 새로운 배양액에 추가하였고, 25℃에서 배양하였다. 배양액의 앨리컷을 상기 혼합액으로부터 각각의 시간지점에서 수득하였고, 무-세포 배양액을 모았다. 수득한 배양액은 에틸 아세테이트를 이용하여 2회 추출하였고, 그 결과 얻어진 유기상은 HPLC로 분석하여 반응물과 생성물을 정량화하였다.

[0066] **실험예 1: Micro-Tom으로부터 OMT 유전자의 분리 및 분자적인 특성 규명**

[0067] 플라보노이드 변형에 적합한 플라보노이드 O-메틸전이효소를 규명하기 위하여, 미니어쳐 토마토 품종인 Micro-Tom의 Kuzusa 전장 토마토 cDNA 데이터베이스(http://www.pgb.kazusa.or.jp/kaftom/)를 조사하였고, 그 결과 OMT 유전자로 주해하는 14개의 유전자를 찾을 수 있었다. 그 중 4개가 플라보노이드 OMT에서 일반적으로 발견되는 단백질 도메인인 O-메틸전이효소 패밀리 2 도메인을 포함하고 있는 것을 확인하였다. 상기 유전자 중 하나(SlOMT3)를 Micro-Tom 잎의 cDNA로부터 분리하였다. SlOMT3은 357개의 아미노산을 포함하는 단백질을 인코딩하고 있었다.

[0068] **실험예 2: SlOMT3의 발현 및 정제**

[0069] 재조합 SlOMT3의 이종 발현은 다양한 성장 온도 및 IPTG 농도에서 이루어졌다. SlOMT3는 0.5mM IPTG 농도 및 25℃의 성장온도에서 His-태그 융합 단백질의 형태로서 *E.coli*에서 성공적으로 발현되었다. 그 다음, 추가적인 분석을 위해 재조합 SlOMT3를 정제하였다. 재조합 SlOMT3는 Ni^{2+} 친화도 크로마토그래피를 이용하여 균질성을 가지도록 정제되었다(도 2). 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였고, 약 42.5kDa의 분자량을 가지고 있는 것을 확인하여, 정제를 위한 추가 아미노산을 포함하고 있는 재조합 SlOMT3의 예측한 분자량과 부합하는 것을 확인하였다.

[0070] **실험예 3: SlOMT3의 기질 선호도 및 위치 특이성**

[0071] SlOMT3가 플라보노이드의 O-메틸화를 가져올 수 있는지 확인하기 위하여 하기와 같은 기질을 사용하여 확인하였다. 플라바논(나린게닌(Naringenin) 및 에리오딕티올(Eriodictyol)), 디히드로플라보놀(탁시폴린(Taxifolin)), 플라본(아피게닌(Apigenin), 루테올린(Luteolin) 및 트리세틴(Tricetin)), 플라보놀(캠프페롤(Kampferol), 퀘르세틴(Quercetin), 미리세틴(Myricetin) 및 라리시트린(Laricitrin)) 및 이소플라보노이드(다이드제인(Daidzein) 및 게니스테인(Genistein))을 포함하는, (이소)플라보노이드 기질을 이용하여 AdoMet의 존재하에서 효소 반응을 수행하였다. 상기 플라보노이드 기질의 구조를 도 1에 나타내었고, 효소 반응 결과를 하기 표 2에

나타내었다.

표 2

Substrate	Relative activity (%)[a]	Reaction product
Flavanone		
Naringenin	0	–
Eriodictyol	11	Homoeriodictyol
Dihydroflavonol		
Dihydroquercetin	+[b]	ND[c]
Flavone		
Apigenin	0	–
Luteolin	42	Chrysoeriol
Tricetin	+	ND
Flavonol		
Kaempferol	0	–
Quercetin	100	Isorhamnetin
Myricetin	+	Laricitrin, syringetin
Laricitrin	114	Syringetin
Isoflavonoid		
Daidzein	0	–
Genistein	0	–

(주 1) 표 2의 상대활성은 각 기질(50uM) 및 정제된 SlOMT3 1ug을 사용하여 결정하였음

(주 2) + 표시는 HPLC 분석에서 생성물 피크를 나타내는 플라보노이드 기질임을 나타냄. 기질의 상대활성을 결정되지 않았음

(주 3) ND: 결정되지 않았음(Not Determined)

[0072]

[0073] 그 결과, SlOMT3는 플라보노이드 기질에 대해서는 활성을 나타내었으나, 이소플라보노이드 기질인 다이드제인, 게니스테인에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. 특히, 플라보노이드 기질 중에서도 퀘르세틴 및 라리시트린에 대해서는 C 고리가 포화된 에리오딕티올에 비해 10배가량 강한 활성을 나타내었다. 상기 결과는 C 고리의 포화 정도가 SlOMT3의 기질 선택성에 있어서 중요한 요소임을 나타내는 것이다(표 2).

[0074] 또한, SlOMT3에 반응하는 플라보노이드의 경우 대부분 3'-OH 기를 포함하고 있는 특성이 있었다. 나린게닌과 같은 3'-OH기가 없는 플라보노이드의 경우, SlOMT3와의 반응에도 어떠한 반응 생성물도 나타내지 않았다. 이러한 결과는 본 발명의 SlOMT3의 경우, 플라보노이드의 3'-OH기로 AdoMet으로부터 메틸기를 전이하는 활성이 있음을 나타내는 것이다.

[0075] 이러한 SlOMT3의 위치 특이성을 확인하기 위하여, 상업적으로 판매되는 검증된 스탠다드를 HPLC로 분석하였으며, 본 발명의 SlOMT3와의 반응물의 결과와 서로 비교하였다. 그 결과, 각 반응 생성물의 HPLC의 보존 시간(Retention time)은 검증된 3'-O-메틸화 스탠다드인 호모에리딕티올(Homoeriodictyol, 3'-methyleriodictyol), 크리소에리올(Chrysoeriol, 3'-methylluteolin) 및 이소람네틴(Isorhamnetin, 3'-methylquercetin)과 동일한 결과를 나타내었다(도 3 a 내지 c). 또한, LC-MS 분석을 수행하여 반응 생성물이 3'-O-메틸화 생성물인지 여부를 추가로 확인하였다(도 4). 상기와 같은 결과들은 본 발명의 SlOMT3가 위치 특이적인 플라보노이드의 3'-O-메틸화를 가져오는 것을 뒷받침하는 것이다.

[0076] 또한, 플라보노이드의 B 고리의 3'- 및 5'- 위치는 구조적으로 동등하기 때문에, 플라보노이드의 3'-OMT는 기질의 3'- 및 5'-위치의 연속적인 메틸화(Sequential methylation)을 대개 촉매한다. 그러나, 벼에서 유래한 ROMT-9 및 애기장대에서 유래한 AtOMT1과 같은 몇몇 플라보노이드 3'-OMT들은 플라보노이드 기질의 3'-OH로만 메틸기를 전이시키기도 한다. 따라서, 본 발명의 SlOMT3가 3'- 및 5'- 위치에 모두 메틸기를 전이시키는지 여부를 확인하였다.

[0077] 미리세틴 반응 혼합물의 HPLC 분석결과, 본 발명의 SlOMT3는 초기 보존 시간에서 작은 피크와 후기 보존 시간에서 보다 큰 피크를 가진 두 가지 반응생성물을 나타내었다(도 3 d). HPLC 및 LC-MS 분석 결과, 초기 보존 시간에 나타난 작은 피크는 라리시트린(Laricitrin, 3'-methylmyricetin)이고, 후기 보존 시간에 나타나는 큰 피크

는 시린게틴(Syringetin, 3', 5'-dimethylmyricetin)으로 규명되었다(도 4). 이러한 결과는 본 발명의 SlOMT3가 라리시트린의 5'-OH기로 메틸기를 전이시킬 수 있는 활성을 지녀 시린게틴을 생산하는 것임을 나타내는 것이다. 따라서, 상기의 결과들은 본 발명의 SlOMT3는 3'-O-메틸화뿐만 아니라, 플라보노이드의 3'- 및 5'- 위치의 연속적인 O-메틸화를 가져오는 활성을 지님을 시사한다.

[0078] **실험예 4: SlOMT3의 동역학적 파라미터**

[0079] 선별한 플라보노이드 기질인 에리오딕티올, 루테올린 및 퀘르세틴을 이용하여 본 발명의 SlOMT3의 동역학적 파라미터를 확인하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 하기 표 3에 나타낸 실험 결과는 3번의 독립적인 실험의 평균 및 표준 편차를 나타내는 것이다. 재조합 SlOMT3의 퀘르세틴 및 루테올린에 대한 Km 값은 각각 0.57 및 0.74 μM이었고, 에리오딕티올에 대한 Km 값은 22.43 μM이었다(표 3).

표 3

[0080]

Substrate	K_m (μM)	V_{max} (nmol min^{-1} mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
Quercetin	0.57 ± 0.05	37.19 ± 2.89	0.026	4.56×10^{-2}
Luteolin	0.74 ± 0.13	42.57 ± 8.98	0.030	4.05×10^{-2}
Eriodictyol	22.43 ± 5.43	99.60 ± 13.77	0.055	2.45×10^{-3}

[0081] SlOMT3는 또한 퀘르세틴 및 루테올린에 대해 각각 $4.56x10^{-2}$ 및 $4.05x\ 10^{-2}$ $\mu M^{-1}s^{-1}$의 Kcat/Km 값을 나타내어, 에리오딕티올에 대한 $2.45x10^{-3}$ $\mu M^{-1}s^{-1}$ 값에 비하여 높은 촉매 활성을 가짐을 확인하였다(표 3). SlOMT3는 에리오딕티올보다 퀘르세틴 및 루테올린에 대하여 매우 높은 친화도(30배 이상)를 나타내어, 상기 SlOMT3의 촉매 활성 결과와 서로 부합하였다. 이러한 결과는 플라보노이드의 C 고리 구조가 효소-기질 결합에 중요함을 나타내는 것으로, 플라보노이드 중에서 C 고리가 포화되지 않은 플라보놀 및 플라본이 플라바논 등에 비하여 SlOMT3의 선호되는 기질임을 나타내는 것이다.

[0082] 식물 OMT는 대개 여러 μM 내지 약 100 μM의 범위 내에서 플라보노이드 기질에 대한 결합 친화도를 나타내는 것으로 알려져 있다. AtOMT1의 Km은 퀘르세틴에 대하여 1.76 μM 값을 나타내며, 반면 쌀 유래의 ROMT017의 루테올린에 대한 Km값은 104 μM을 나타낸다. 퀘르세틴 및 루테올린에 대한 SlOMT의 Km값은 플라보노이드 기질에 대해서 가장 높은 결합 친화도를 가진 식물 OMT로 보고된 *Solanum habrochaites* ShOMT1의 미리세틴(Km=0.46 μM) 및 라리시트린(Km=0.21 μM)의 값과 유사한 정도를 나타내었다. 또한, SlOMT3는 다른 식물 OMT와 비슷한 정도의 촉매 효율을 나타내었다. 퀘르세틴에 대한 AtOMT1의 Kcat/Km 값은 $1.6x10^{-2}$ $\mu M^{-1}s^{-1}$ 이고, 벼 유래의 ROMT-17의 루테올린에 대한 Kcat/Km 값은 $5.34x10^{-4}$ $\mu M^{-1}s^{-1}$ 을 나타낸다. 이러한 동역학적 속성들은 본 발명의 SlOMT3가 다른 식물 OMT와 비교했을 때, 상대적으로 높은 기질 특이성을 가져 퀘르세틴 및 루테올린과 같은 플라보노이드의 위치 특이적인 3'-O-메틸화를 효율적으로 가지고 올 수 있음을 나타내는 것이다.

[0083] **실험예 5: SlOMT3가 형질전환된 *E.coli*를 이용한 플라보노이드의 생전환**

[0084] 메틸화된 플라보노이드는 항암 활성 및 항균활성을 나타내는 것으로 알려져있다. 이소람네틴의 경우, 심혈관 질환의 치료에 사용되는 산자나무(Sea buckthorn)와 같은 약용 식물에서 활성 성분이며, 또한 이는 다양한 암 세포주에 대해서 항암 활성을 나타내며, 지방세포 분화에 있어서 억제 활성을 나타낸다. 호모에리오딕티올은 클라도스포리움 쿠쿠메리넘(*Cladosporium cucumerinum*)에 대하여 항진균 활성을 나타내며, 인간 CYP1B1 효소 활성을 저해함으로써 특정 암에서 예방효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0085] 본 발명에서는 본 발명의 SlOMT3 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 *E.coli* 형질전환체를 이용하여 퀘르세틴, 루테올린 및 에리오딕티올을 각각 상기와 같은 활성을 지니는 이소람네틴, 크리소에리올 및 호모에리오딕티올로 생전환시켰고, 하기와 같은 과정을 수행하였다.

[0086] 선정한 플라보노이드 각각을 *E.coli* 배양물에 첨가하였고, 메틸화된 생산물의 생성 여부를 확인하였다. 그 결과, 실험에 사용한 모든 플라보노이드 즉, 퀘르세틴, 루테올린 및 에리오딕티올은 모두 성공적으로 이소람네틴, 크리소에리올 및 호모에리오딕티올로 각각 전환되었다. C 고리의 포화도에 따른 S1OMT3의 촉매 효율에 따라 상기 형질전환된 *E.coli*는 에리오딕티올을 호모에리오딕티올로의 전환에 비하여 퀘르세틴 및 루테올린의 이소람네틴 및 크리소에리올로의 전환을 빠르게 가져왔다(도 5). 또한, 본 발명에서 사용된 실험 조건에서 퀘르세틴 및 루테올린은 대부분 사용되었으며, 2시간 내에 생성물로 전환되는 결과를 나타내었다(도 5 a 및 b). 퀘르세틴 및 루테올린 각각의 생성물의 양은 반응 시간 90분에 최고조에 달하였으며, 그 후 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 생전환된 생성물의 감소는 *E.coli* 내부에 존재하는 효소에 의한 비특이적 분해에 의한 것으로 여겨졌다. 또한, 전환 속도는 퀘르세틴 및 루테올린에 비하여 낮았지만, 에리오딕티올 또한 4시간 내에서 대부분 호모에리오딕티올로 전환되는 결과를 나타내었다(도 5 c).

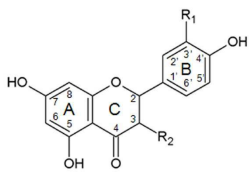
[0087] 본 발명에서 사용된 실험 조건에서, 퀘르세틴 및 루테올린의 각각의 메틸화된 생성물로의 최대 생전환 효율은 63 및 93%로서, S1OMT3가 형질전환된 *E.coli* 형질전환체와 각각 기질들을 90분간의 배양하여 얻어진 값이었다(도 6 a 및 b). 또한, 에리오딕티올의 호모에리오딕티올로의 전환 수율의 경우, 생전환 4시간 만에 95%의 수율에 달하는 결과를 나타내었다(도 6 c).

[0088] 상기와 같은 결과는 본 발명의 S1OMT3가 형질전환된 *E.coli*가 플라보노이드의 위치 특이적 전환에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 결과이다.

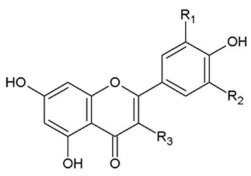
[0089] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

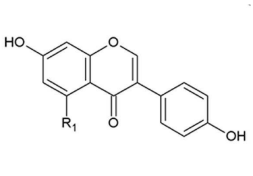
도면1



Naringenin; R_1 = H, R_2 = H
Eriodictyol; R_1 = OH, R_2 = H
Homoeriodictyol; R_1 = OCH_3, R_2 = H
Dihydroquercetin; R_1 = OH, R_2 = OH

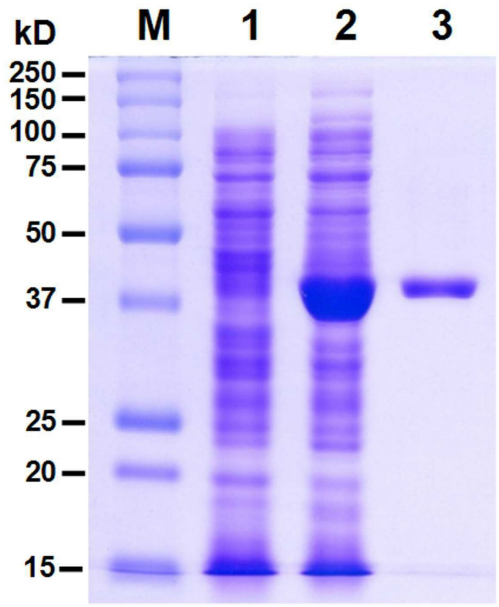


Apigenin; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H
Luteolin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H
Chrysoeriol; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = H
Tricetin; R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = H
Kaempferol; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH
Quercetin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH
Isorhamnetin; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH
Myricetin; R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH
Laricitrin; R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = OH
Syringetin; R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OH

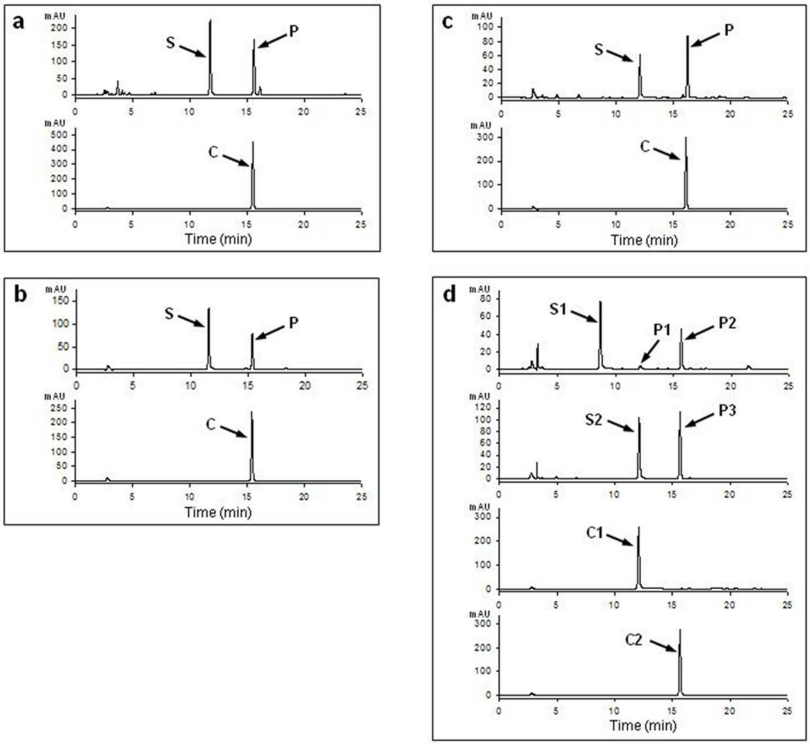


Daidzein; R_1 = H
Genistein; R_1 = OH

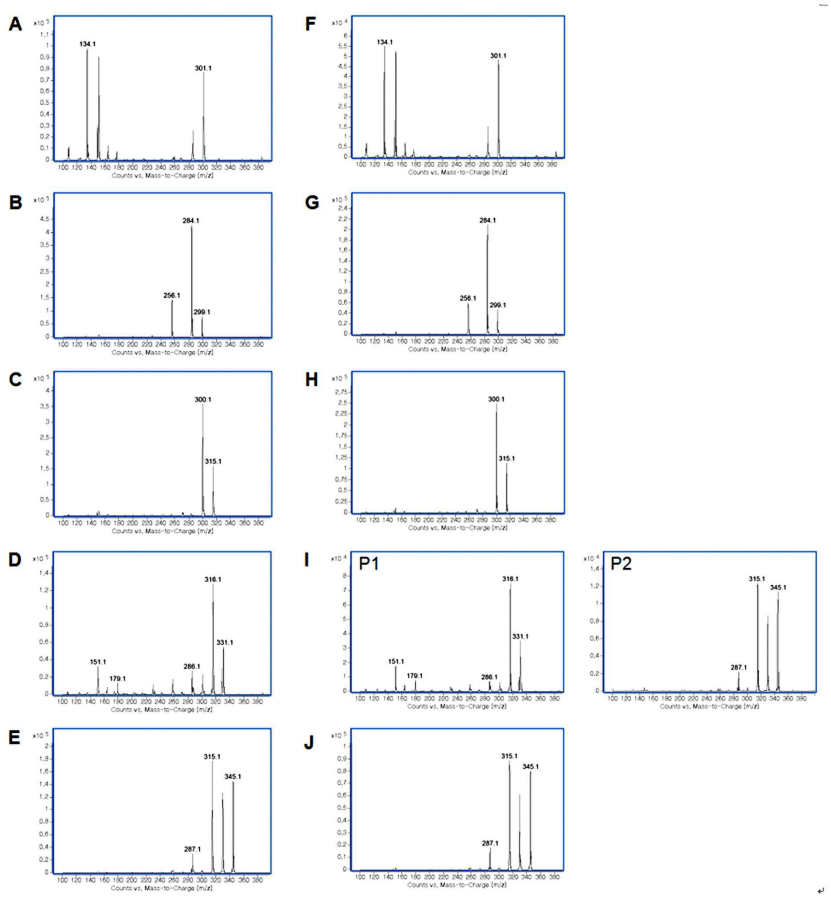
도면2


kD
M
1
2
3
250
150
100
75
50
37
25
20
15

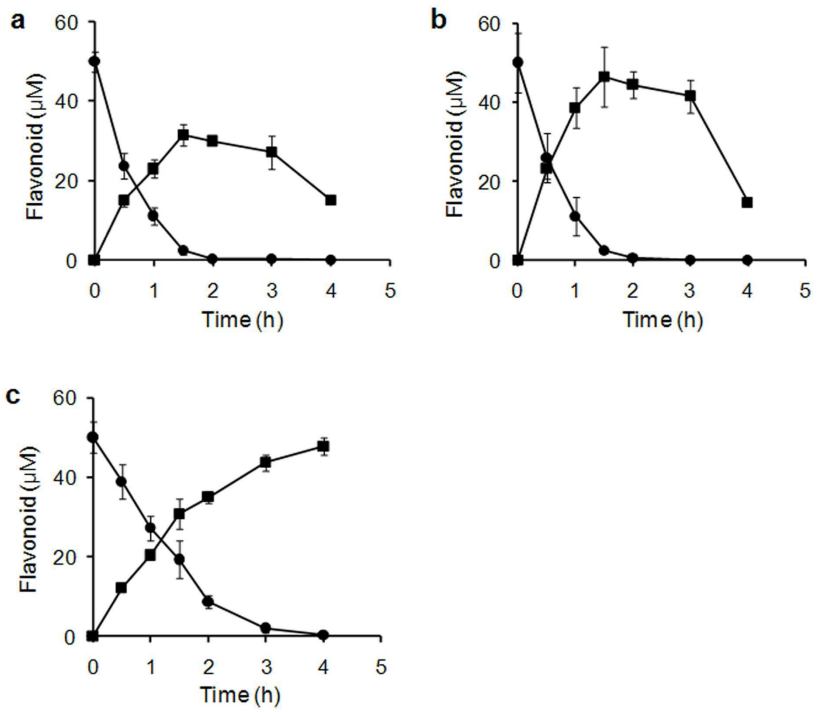
도면3


a
b
c
d
S
P
C
S1
P1
P2
S2
P3
C1
C2
mAU
Time (min)

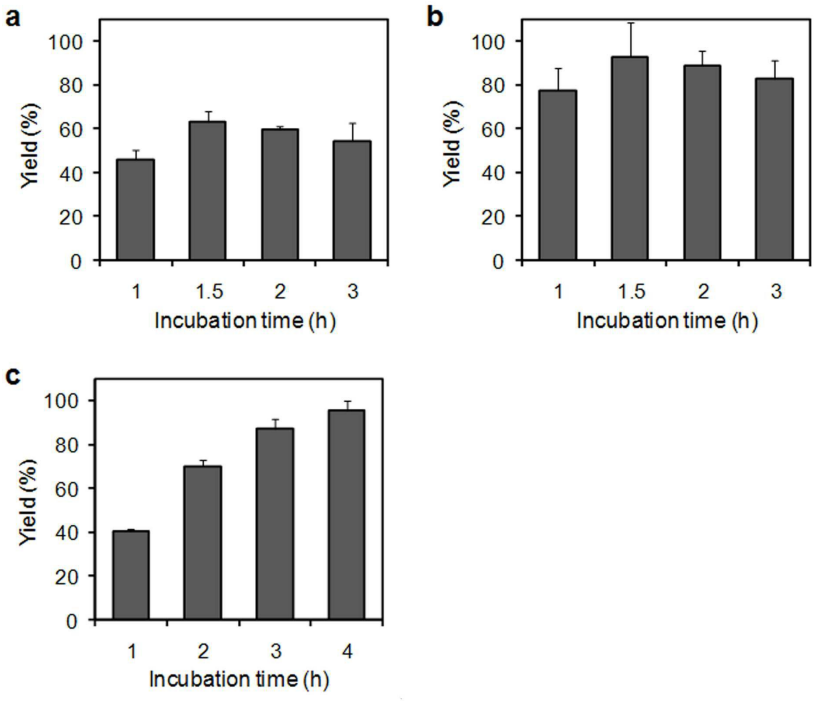
도면4


A
134.1
301.1
F
134.1
301.1
B
284.1
256.1
299.1
G
284.1
256.1
299.1
C
300.1
315.1
H
300.1
315.1
D
316.1
331.1
151.1
179.1
286.1
I
P1
316.1
331.1
151.1
179.1
286.1
P2
315.1
345.1
287.1
E
315.1
345.1
287.1
J
315.1
345.1
287.1
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

도면5


a
b
c
Flavonoid (μM)
Time (h)
0
20
40
60
0
1
2
3
4
5

도면6



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부