(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/76 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년09월29일
(11) 등록번호 10-0629896
(24) 등록일자 2006년09월22일

(21) 출원번호 10-2005-0035461
(22) 출원일자 2005년04월28일
(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 김응수
서울 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 120-501

강승훈
제주도 제주시 용담2동 639-28

박현주
서울특별시 동작구 흑석2동 28 한강현대아파트 112-1304

(74) 대리인 이원희

(56) 선행기술조사문헌
KR1019990050233 A
KR1020060000725 A *
US5665564 B
US5976830 B
US6210930 B
WO9627014 A1
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 신원혜

(54) 방선균 독소루비신 고생산 균주 및 독소루비신 생합성유전자군의 발현양상 분석을 위한 마이크로어레이칩

요약

본 발명은 독소루비신 대량생산을 위한 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 방선균, 독소루비신 생합성 관련 유전자가 포함된 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩 및 상기 DNA 마이크로 어레이칩를 이용한 유전자 분석방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체는 독소루비신의 대량생산에 활용될 수 있고, 본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩 및 이를 이용한 유전자 분석방법을 통하여, 독소루비신 대량생산을 위한 유전자를 선별할 수 있었다. 본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩 및 이를 이용한 유전자 분석방법은 보다 효율적인 독소루비신 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도

도 2

색인어

독소루비신, 방선균 ,마이크로어레이칩

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 독소루비신의 생합성 경로를 나타내는 개요도이다.

도 1b는 독소루비신 생합성 관련 유전자의 물리적 기능적 지도이다.

도 2는 독소루비신 고생산을 위한 발현벡터 pESK403 및 pESK404의 개열지도이다.

도 3a는 pSE34로 형질전환된 *S. peucetius*/pSE34(-◆-), pESK403으로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK403(-■-) 및 pESK404로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK404(-▲-)에서의 배양시간에 따른 독소루비신의 생산정도를 나타내는 그래프이고,

도 3b는 pSE34로 형질전환된 *S. peucetius*/pSE34(-目-), pESK403으로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK403(-▥-) 및 pESK404로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK404(-▨-)에서의 배양시간에 따른 다나루비신의 생산정도를 나타내는 그래프이다.

도 4는 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 DNA 마이크로어레이칩 칩에 관한 사진이다. (A) Cyto-61이 표지된 DNA 칩; (B) *S. peucetius*/pESK404의 T_0 대 T_2의 유전자 발현양상을 비교한 DNA 칩.

도 5는 액상 NDYE 배지에서의 *S. peucetius*/pESK403 및 *S. peucetius*/pESK404의 성장률을 나타내는 그래프이다. T_0-T_2는 총RNA 분리를 위한 배양액의 수확시기를 나타낸다.

도 6a는 *S. peucetius*/pESK403에서 *doxA* 유전자의 발현양상(-◆-)과 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 6b는 *S. peucetius*/pESK404에서 *dnrI* 유전자의 발현양상(-▲-)과 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)를 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 7a는 *S. peucetius*/pESK403에서 DnrI 의존적인 유전자인 *dnrG*(-◆-), *dpsA*(-●-) 및 *dpsE*(-▲-)의 발현양상 및 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 7b는 *S. peucetius*/pESK403에서 독소루비신 저항성 유전자인 *drrA*(-▲-), *drrB*(-●-), *drrC*(-◆-)의 발현양상 및 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 7c는 *S. peucetius*/pESK403에서 *dnmL* 유전자의 발현양상(-◆-) 및 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 8a는 *S. peucetius*/pESK404에서 DnrI 의존적인 유전자인 *dnrG*(-◆-), *dpsA*(-●-) 및 *dpsE*(-▲-)의 발현양상 및 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 8b는 *S. peucetius*/pESK404에서 독소루비신 저항성 유전자인 *drrA*(-▲-), *drrB*(-●-), *drrC*(-◆-)의 발현양상 및 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

도 8c는 *S. peucetius*/pESK404에서 *dnmL* 유전자의 발현양상(-◆-) 및 전체 독소루비신 생합성 관련 유전자의 평균적 발현양상(-■-)을 적색형광 대 녹색형광 강도 비의 로그값[$\log_2$(red/green)]으로 나타낸 마이크로어레이칩 분석결과 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 독소루비신의 생합성 유전자군의 발현양상 분석을 위한 마이크로어레이칩 및 그를 이용한 독소루비신 생합성 유전자군의 발현양상 분석 방법에 관한 것이다.

독소루비신은 스트렙토마이세스 퓨세티우스(*Streptomyces peucetius*)에 의해 생합성되는 안트라사이클린(anthracycline)계 II 형 폴리케타이드(polyketide) 화합물로서, DNA 토포이소머라제(topoisomerase) II의 작용을 저해하여 DNA 이중가닥을 파괴하는 기작을 통해 항암제로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Arcamone, F., *Med. Res. Rev.*, 4: 153-188, 1984). *S. peucetius*에서 생산되는 독소루비신은 유전체에 클러스터되어 있는 약 40여개의 유전자들이 암호화하는 다양한 효소반응을 거쳐 생합성 되는데, 우선 개시 단위(starter unit)인 한 분자의 프로피오닐 조효소 A(propionyl CoA)와 확장 단위(extender unit)인 9개의 말노닐 조효소 A(malonyl CoA)가 연속적으로 축합반응을 일으켜 폴리케타이드 사슬이 형성된다. 여기에 환형화, 탈수화 및 수산기화 반응을 거쳐 폴리케타이드 골격인인 엡실론-로도마이시논(ε-rhodomycinone)이 생합성되고(도 1a 및 1b 참조), 생합성된 엡실론-로도마이시논은 다음 단계로 메틸화, 수산기화, 탈카르복실화 및 글리코실화 반응을 거쳐서 최종적으로 독소루비신으로 생합성되는 것으로 알려져 있다(Grimm, A. *et al.*, *Gene*, 151: 1-10, 1994; Hutchinson, C. R. *et al.*, *J. IND. MICROBIOL. BIOT.*, 23: 647-652, 1999). 생합성 유전자와 더불어 독소루비신의 생산에 관여하는 또 다른 중요 유전자 군으로는, 내성 유전자 및 경로 특이적 조절 유전자가 보고되고 있다. *S. peucetius*의 독소루비신 내성유전자 산물은 DrrA, DrrB, DrrC, DrrD로 구성되는 것으로 알려져 있으며, 이 중 ABC 트랜스포터(transporter)의 일종인 DrrA는 DrrB와 쌍을 이루어서 합성된 독소루비신을 세포 밖으로 배출시키는 것으로 알려져 있다(Kaur, P. and Russell, J., *J. Biol. Chem.*, 273: 17933-17939, 1998; Lomovskaya, N. et al., *J. Bacteriol.*, 178: 3238-3245, 1996). 또한 *S. peucetius*에서의 독소루비신 생합성과 관련된 조절기작은 DnrO, DnrN, DnrI를 통한 연속단계(cascade) 형태로 이루어지고, 이러한 조절기작 중 가장 마지막 단계의 DnrI는 독소루비신 생합성 관련 유전자들의 프로모터 부분에 직접적으로 결합함으로써 독소루비신 생합성 유전자의 발현을 촉진시키는 역할을 한다고 보고되고 있다(Furuya, K. *et al.*, *J. Bacteriol.* 178: 6310-6318, 1996; Otten, S. L. *et al.*, *Microbiology*, 146: 1457-1468, 2000). 그러나, 독소루비신의 조절기작은 생합성 과정과 직접적인 연관이 있는 일부 유전자만이 알려져 있으며, 다른 대부분의 방선균에서와 마찬가지로 2차 대사과정과 관련이 있는 상위단계에서의 조절기작은 규명되지 않고 있는 실정이다.

독소루비신을 포함하여 산업적으로 유용산물을 생산하는 방선균에서의 유용산물 생산성 향상을 위한 균주개량 전략은 현재까지도 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)나 자외선등의 돌연변이 유발원(mutagen)을 사용한 돌연변이화 및 스크리닝 방법에 의존해 왔다. 그러나, 상기 방법은 생합성에 관여하는 조절유전자들의 분자유전학적 특성에 대한 이해와는 상관없이 무작위적으로 이루어지기 때문에, 독소루비신 생합성에 관여하는 모든 유전자군의 발현을 종합적으로 비교분석함으로써 보다 체계적이고 효과적인 분자수준에서의 균주개량 전략이 필요하다고 할 수 있다(Rodriguez, E. et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 480-488, 2003). 특히, 최근에는 DNA 마이크로어레이칩(microarray) 시스템을 이용하여 고생산성 산업균주인 사카로폴리스포라 에리트레이(*Saccharopolyspora erythreae*)가 생산하는 에리트로마이신(erythromycin)과 스트렙토마이세스 프라디애(*Streptomyces fradiae*)가 생산하는 틸로신(tylosin)의 생합성 유전자군

발현을 성공적으로 분석한 사례가 보고되고 있다(Lum, A. M. *et al.*, *Metabolic Engineering*, 6: 186-196, 2003). 그러나, 아직까지 마이크로어레이칩 시스템을 이용하여 방선균에서의 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상의 분석방법은 개발되고 있지 않은 실정이다.

이에, 본 발명자들은 우선 경로 특이적 조절유전자(*dnrI*) 또는 전구체 전환에 관여하는 특정 생합성 경로유전자(*doxA*)를 형질전환시킨 결과 방선균에서 독소루비신의 발현율이 매우 향상됨을 확인함으로써, 독소루비신 고생산성 재조합 균주를 제조하였고, 방선균의 독소루비신 생합성에 관여하는 35개의 유전자를 포함하는 DNA 마이크로어레이칩를 제작하고, 상기 DNA 마이크로어레이칩를 이용하여 상기 독소루비신 고생산성 재조합 균주의 독소루비신 생합성 유전자군 발현패턴을 분석한 결과, 독소루비신 생산성 향상에 결정적인 역할을 하는 유전자들을 선별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 첫 번째 목적은 독소루비신 생합성에 관연하는 유전자를 포함하는 방선균용 발현벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 두 번째 목적은 상기 발현벡터로 형질전환된 독소루시신 고생산성 형질전환 균주를 제공하는 것이다.

본 발명의 세 번째 목적은 방선균의 독소루비신 생합성에 관여하는 유전자가 집적된 DNA 마이크로어레이칩를 제공하는 것이다.

본 발명의 네 번째 목적은 상기 DNA 마이크로어레이칩를 이용하여 독소루비신 생합성 유전자군의 발현 양상을 비교 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 마지막 목적은 상기 분석 방법을 이용하여 독소루비신 생산성 향상에 관련된 유전자를 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 독소루비신 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 방선균용 발현벡터를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 형질전환된 독소루비신 고생산성 형질전환 균주를 제공한다.

또한, 본 발명은 방선균의 독소루비신 생합성 관련 유전자가 집적된 DNA 마이크로어레이칩를 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 DNA 마이크로어레이칩를 이용하여 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상을 분석하는 방법을 제공한다.

더 나아가, 본 발명은 상기 분석방법을 이용하여 독소루비신 생산성 향상에 관련된 유전자를 선별하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

본 발명의 방선균용 발현벡터는 방선균의 경로 특이적 조절유전자(*dnrI*) 또는 전구체 전환 생합성 유전자(*doxA*)를 포함한다. 이때, *dnrI*을 포함하는 발현벡터는 도 2의 개열지도로 나타내어지는 pESK404인 것이 바람직하고, *doxA*를 포함하는 발현벡터는 도 2로 나타내어지는 개열지도를 갖는 pESK403인 것이 바람직하다.

본 발명의 형질전환 균주는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pESK404로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK404 또는 pESK403으로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK403인 것이 바람직하다.

본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩은 하나 이상의 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 고체기판을 포함한다. 이때, 상기 기판은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 유리기판인 것이 바람직하고, DNA의 결합을 용이하게 하기 위한 양이온성 폴리머로 코팅되는 것이 바람직하며, 상기 양이온성 폴리머는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 폴리-L-라이신인 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 DNA 마이크로어레이칩는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 분석결과의 신뢰성을 향상시키기 위하여 대조군 유전자를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하

며, 상기 대조군 유전자는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 양성 대조군 유전자 및 음성 대조군 유전자를 모두 포함하는 것이 바람직하며, 상기 음성 대조군 유전자는 방선균에 존재하지 않는 유전자로 특별히 이에 제한되지 않고, 상기 양성 대조군 유전자는 방선균에서 일정한 수준으로 발현되는 하우스키핑 유전자로서 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 방선균의 16s rRNA인 것이 바람직하다.

본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석 방법은 (ⅰ) 하나 이상의 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 DNA 마이크로어레이칩를 제조하는 단계; (ⅱ) 배양시간을 달리하여 수득한 독소루비신 고생산성 균주로부터 총RNA를 추출하는 단계; (ⅲ) 추출된 각각의 총RNA로부터 역전사 반응을 이용하여 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 제조하는 단계; (ⅳ) 상기 각각의 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 단계 ⅰ에서 제조한 DNA 마이크로어레이칩와 경쟁적으로 혼성화시키는 단계; (ⅴ) 세척 후 각각의 형광을 검출하는 단계 및 (ⅵ) 각각의 형광의 강도를 비교하는 단계를 포함한다.

이때, 상기 독소루비신 생합성 관련 유전자는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, *dnmZ*, *dnrD*, *dnmJ*, *dnmL*, *dnrN*, *dpsG*, *dpsH*, *dnrE*, *drrB*, *dpsY*, *drrA*, *drrD*, *dpsF*, *dpsD*, *dnrI*, *doxA*, *dnrM*, *dnrO*, *dnrF*, *dnmT*, *dnmV*, *dnrG*, *dpsA*, *dpsB*, *dnrV*, *dpsE*, *dnrH*, *dnrK*, *dnrP*, *dnmS*, *dpsC*, *dnrX, dnmU, dnrC* 및 *drrC*로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 상기 독소루비신 고생산성 균주는 특별히 이에 제한되는 것이 아니나, 본 발명의 *S. peucetius*/pESK404 또는 *S. peucetius*/pESK403인 것이 바람직하며, 상기 배양시간은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 독소루비신이 생성되기 이전인 접종후 24시간 후를 T_0으로 하고, 독소루비신이 생성되는 시점인 접종후 48시간을 T_1으로 하며, 접종 후 80시간을 T_2로 하는 것이 바람직하다. 한편, 상기 형광물질은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 플루오레세인, 로다민, 녹색형광단백질, Cy-3 또는 Cy-5인 것이 바람직하며, Cy-3 또는 Cy-5인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, T_0 시점에서 수득된 독소루비신 고생산 균주로부터 추출된 총RNA는 Cy-3로 표지되고, T_1 또는 T_2 시점에서 수득된 독소루비신 고생산 균주로부터 추출된 총RNA는 Cy-5로 표지된다. 상기 단계 ⅳ의 혼성화 방법은 당업계에서 이미 공지되어 있다. 통상적으로 형광 표지된 cDNA를 혼성화 용액과 혼합한 후 끓는 물에 방치하여 DNA 이중가닥을 분리시키고, DNA 마이크로어레이칩에 적용시킨 다음, 적절한 온도(40 내지 70℃)로 8 내지 20시간 동안 반응시킨다. 이어, 수 차례 세척한 다음, 건조시키고 형광 스캐너로 형광을 검출한다. 상기 단계 ⅵ의 형광 강도를 비교하는 단계는 형광 스캐너와 연결된 컴퓨터의 통상의 분석용 소프트웨어로 수행될 수 있다.

또한, 본 발명의 독소루비신 생산성 향상에 관련된 유전자의 선별방법은 (ⅰ) 하나 이상의 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 DNA 마이크로어레이칩를 제조하는 단계; (ⅱ) 배양시간을 달리하여 수득한 독소루비신 고생산성 균주로부터 총RNA를 추출하는 단계; (ⅲ) 추출된 각각의 총RNA로부터 역전사 반응을 이용하여 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 제조하는 단계; (ⅳ) 상기 각각의 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 단계 ⅰ에서 제조한 DNA 마이크로어레이칩와 경쟁적으로 혼성화시키는 단계; (ⅴ) 세척 후 각각의 형광을 검출하는 단계; (ⅵ) 각각의 형광의 강도를 비교하는 단계 및 (ⅶ) 대조군에 비하여 형광 강도가 커지거나 발현 양상의 변화가 없는 유전자를 선별하는 단계를 포함한다.

이때, 상기 독소루비신 생합성 관련 유전자는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, *dnmZ*, *dnrD*, *dnmJ*, *dnmL*, *dnrN*, *dpsG*, *dpsH*, *dnrE*, *drrB*, *dpsY*, *drrA*, *drrD*, *dpsF*, *dpsD*, *dnrI*, *doxA*, *dnrM*, *dnrO*, *dnrF*, *dnmT*, *dnmV*, *dnrG*, *dpsA*, *dpsB*, *dnrV*, *dpsE*, *dnrH*, *dnrK*, *dnrP*, *dnmS*, *dpsC*, *dnrX, dnmU, dnrC* 및 *drrC*로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 상기 독소루비신 고생산성 균주는 특별히 이에 제한되는 것이 아니나, 본 발명의 *S. peucetius*/pESK404 또는 *S. peucetius*/pESK403인 것이 바람직하며, 상기 배양시간은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 독소루비신이 생성되기 이전인 접종후 24시간 후를 T_0으로 하고, 독소루비신이 생성되는 시점인 접종후 48시간을 T_1으로 하며, 접종 후 80시간을 T_2로 하는 것이 바람직하다(도 5 참조). 한편, 상기 형광물질은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 플루오레세인, 로다민, 녹색형광단백질, Cy-3 또는 Cy-5인 것이 바람직하며, Cy-3 또는 Cy-5인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, T_0 시점에서 수득된 독소루비신 고생산 균주로부터 추출된 총RNA는 Cy-3로 표지되고, T_1 또는 T_2 시점에서 수득된 독소루비신 고생산 균주로부터 추출된 총RNA는 Cy-5로 표지된다. 상기 단계 ⅳ의 혼성화 방법은 당업계에서 이미 공지되어 있다. 통상적으로 형광 표지된 cDNA를 혼성화 용액과 혼합한 후 끓는 물에 방치하여 DNA 이중가닥을 분리시키고, DNA 마이크로어레이칩에 적용시킨 다음, 적절한 온도(40 내지 70℃)로 8 내지 20시간 동안 반응시킨다. 이어, 수 차례 세척한 다음, 건조시키고 형광 스캐너로 형광을 검출한다. 상기 단계 ⅵ의 형광 강도를 비교하는 단계는 형광 스캐너와 연결된 컴퓨터의 통상의 분석용 소프트웨어로 수행될 수 있다.

본 발명자들은 독소루비신 생합성에 관련된 유전자 중 경로 특이적 조절유전자(*dnrI*) 또는 전구체 전환에 관여하는 특정 생합성 경로유전자(*doxA*)를 *ermE** 프로모터와 연결하여 제조한 pESK404 또는 pESK403 발현벡터로 방선균을 형질전

환시켜 독소루비신 고생산성 균주를 제조하였은데, 상기 형질전환된 독소루비신 고생산성 균주는 대조군에 비하여 독소루비신의 생산성이 최대 5.5배까지 향상되었다(도 6 참조). 상기 형질전환된 방선균 균주는 독소루비신의 고효율 생산에 직접적으로 사용될 수 있고, 독소루비신 생합성에 관련된 유전자군의 발현양상을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있다.

또한 본 발명자들은 종래에 독소루비신 생합성에 관련하는 것으로 알려진 유전자인 *dnmZ*, *dnrD*, *dnmJ*, *dnmL*, *dnrN*, *dpsG*, *dpsH*, *dnrE*, *drrB*, *dpsY*, *drrA*, *drrD*, *dpsF*, *dpsD*, *dnrI*, *doxA*, *dnrM*, *dnrO*, *dnrF*, *dnmT*, *dnmV*, *dnrG*, *dpsA*, *dpsB*, *dnrV*, *dpsE*, *dnrH*, *dnrK*, *dnrP*, *dnmS*, *dpsC*, *dnrX*, *dnmU*, *dnrC* 및 *drrC*와 대조균 유전자를 PCR로 증폭하여 폴리-L-라이신이 코팅된 유리기판에 점적함으로써 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩를 제조하였으며, 상기 독소루비신 고생산성 균주를 접종한 뒤 독소루비신이 생산되기 전인 24시간 후(T_0), 독소루비신이 생산되는 시점인 48시간 후(T_1) 및 80시간 후(T_2)에 상기 균주로부터 각각 총RNA를 추출하여, T_0시점에서 추출한 총RNA는 Cy-5로, T_1 및 T_2 시점에서 추출한 총RNA는 Cy-3로 표지하여 cDNA를 제조한 다음, 상기 DNA 마이크로어레이칩에 상기 시점을 달리하여 제조한 형광표지 cDNA를 경쟁적으로 혼성화시키고, 세척 후 각각의 형광물질에서 발산되는 형광의 강도를 비교 분석하였다. 그 결과, 평균이상으로 유전자 발현이 증가되는 유전자군과 유전자발현 정도가 변함이 없는 유전자군을 선별할 수 있었다(표 2 참조). 특히, 유전자 발현 정도가 변함이 없는 유전자인 *dnmL*의 경우 독소루비신인 디옥시당 부분인 TDP-다우노사민(TDP-daunosamine)을 합성하는데 관여하는 포도당-1인산 티미딜릴트랜스퍼라제(glucose-1-phosphate thymidylyltrasferase)를 코딩하는 유전자로서 프로모터 부위에 *dnrI* 결합부위가 존재하는 것으로 알려져 있으나, 실제 *dnrI*이 과발현되는 균주에서 그 발현의 변화가 없음을 확인할 수 있었다(도 7c및 8c 참조). 이는 상기 유전자를 포함하는 독립적인 발현 카세트를 제조하여 *dnrI* 유전자와 동시에 형질전환시킬 경우, 독소루비신 생산성에 있어서, 상승효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전자를 포함하는 DNA 마이크로어레이칩 및 이를 이용한 유전자 발현양상 분석방법은 독소루비신의 생합성에 관련된 유전자들의 발현양상을 보다 체계적으로 분석할 수 있게 해주고, 이들 유전자간의 작용관계를 파악하는데 유용하게 사용할 수 있으며, 더 나아가, 독소루비신의 고효율 생산을 위한 전략 수립에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 독소루비신 고생산성 균주의 제조

독소루비신 생합성과정을 특이적으로 조절하는 *dnrI* 유전자의 도입으로 인해 독소루비신 생산성이 증가되었다는 사실은 이미 보고되었다(Park, H.-S. et al., *J. Microbiol. Biotechnol.,* In press, Stutzman-Engwall, K. J. et al., *J. Bacteriol.,* 174: 144-154, 1992). 그러나, 이러한 보고는 단순히 *dnrI* 유전자를 다중카피(multicopy) 형태로 도입하여 얻은 결과이기 때문에, 본 발명자들은 *ermE** 프로모터를 포함하는 방선균용 발현 벡터인 pSE34(Pfizer Inc, USA)에 *dnrI* 유전자를 클로닝하여 도입함으로서 세포내에서 안정적이고 효율적으로 *dnrI*가 발현될 수 있도록 유도하고자 하였다. 또한, 독소루비신의 전구체로부터 독소루비신으로의 생전환에 관여하는 *doxA* 유전자도 pSE34에 클로닝하여 도입함으로서 다나루비신에서 독소루비신으로의 생전환 효율을 높이고자 하였다(Lomovskaya, N. et al., *J. Bacteriol.,* 181: 305-318, 1999).

이를 위하여, 경로 특이적 조절유전자(*dnrI*) 및 전구체 전환 생합성 유전자(*doxA*)를 하기의 방법으로 *S. peucetius* ATCC29050 균주로부터 클로닝하였다:

먼저, R2YE배지에 *S. peucetius* ATCC29050 균주를 5일간 배양하여 Hopwood 등의 방법으로 게놈 DNA를 분리하였다(Hopwood, D. A. et al., Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, Norwich, UK, John Innes Foundation, 1985). 상기 게놈 DNA로부터 *doxA*와 *dnrI*를 각각 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭하기 위한 프라이머로 *doxA*에 대하여는 5'-GGATCCGGTCGAACTGCGGGAGGGGT-3'(정방향 프라이머 *doxA*-1, 서열번호 1) 및 5'-AAGCTTGCGGATCAGCGCAGCCAGAC-3'(역방향 프라이머 *doxA*-2, 서열번호 2)를 사용하였고, *dnrI*에 대하여는 5'-GGATCCGGAAATATGCCACCTGCTGA-3'(정방향 프라이머 *dnrI*-1, 서열번호 3) 및 5'-AAGCTTGTGGACACGTGACTCCTTGT-3'(역방향 프라이머 *dnrI*-2, 서열번호 4)를 사용하였다. 중합효소 연쇄반응은 Rapid Thermocycler^{TM}(Idaho Technology, USA)를 이용하여 96℃에서 30초간 분리, 40℃에서 30초간 서냉 및 68℃에서 35초간의 신장의 조건으로 30회 반복하였다(Kim, E.-S. et al., *J. Bacteriol.*, 177: 1202-1207, 1995). 상기 반응으로 증폭된 PCR 산물을 pGEM T-easy(Promega, USA) 벡터에 클로닝한 다음, *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 *E. coli* DH5α로부터 플라스미드 DNA를 분리하여, 상기 pGEM T-easy 벡터의 다중클로닝 부위에 존재하는

*Bam*H I과 *Hin*d III로 절단하여 *dnrI* 및 *doxA* 유전자 절편을 추출한 다음, 이를 각각 pSE34(Pfizer Inc, USA)로 다시 삽입하였다(도 2). 상기와 같이 제조된 플라스미드 벡터를 각각 pESK403 및 pESK404로 명명하였으며, 이를 *S. lividans* TK21 균주에 프로토플라스트를 통한 PEG 형질전환방법으로 형질전환시켰다(Kim, E.-S. et al., *J. Bacteriol.*, 177: 1202-1207, 1995). 형질전환된 균주는 티오스트렙톤(thiostrepton) 0.5 ㎎/㎖을 사용하여 선별하였다. 한편, 독소루비신의 고생산성 균주를 제조하기 위하여, 상기 형질전환된 *S. lividans* TK21 균주로부터 각각 분리된 pESK403 및 pESK404로 독소루비신을 생산하지 않는 야생형 균주인 *S. peucetius* ATCC27952 균주를 형질전환시켰으며, 이를 각각 *S. peucetius*/pESK403 및 *S. peucetius*/pESK404로 명명하였다. 상기 균주는 20% 글리세롤(glycerol)이 포함된 스톡(stock)으로 -20℃에 보관되었고, 이 스톡(stock)을 25㎖의 NDYE 배지(4.5% maltose, 0.5% yeast extract, 0.48% HEPES, 0.43 $NaNO_3$, 0.023% K_2HPO_4, 0.012% $MgSO_4$, 0.2% 10X trace element solution pH7.4)에 접종하여 30℃, 200rpm으로 배양하여 이후 분석에 사용하였다.

<실시예 2> 배양시간에 따른 독소루비신 고생산성 균주의 독소루비신 생산정도 정량분석

S. peucetius ATCC27952 및 상기 실시예 1에서 제조한 고생산성 균주(*S. peucetius*/pESK403 및 *S. peucetius*/pESK404)가 생산하는 독소루비신을 하기와 같은 방법으로 C-18 역상 (250×4.6 mm) 컬럼(Waters, Ireland)을 사용하여 고성능 액상 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)로 정량분석하였다: 먼저, 배양액의 일정량을 취하여 1 배 부피의 추출액 (Iso-propyl alcohol : 30% HCl = 50 : 1)을 섞고 30분 교반한 후 15000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 여과함으로써 추출액을 제조하였다. 이어, HPLC 분석을 위한 이동상으로는 아세토니트릴: 증류수(1 : 1 v/v) 혼합액에 소디움 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate) 1.327 g/ℓ와 인산용액(phosphoric acid) 0.68 ㎖/ℓ를 혼합하여 사용하였고, 유속은 1 ㎖/min, 컬럼 온도는 상온으로 유지하여 UV 검출기로 254 nm 파장에서 독소루비신의 생산량을 정량분석하였다(도 3a 및 3b).

도 3a는 pSE34로 형질전환된 *S. peucetius*/pSE34(-◆-), pESK403으로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK403(-■-) 및 pESK404로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK404(-▲-)에서의 배양시간에 따른 독소루비신의 생산정도를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 pSE34로 형질전환된 *S. peucetius*/pSE34(-目-), pESK403으로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK403(-▥-) 및 pESK404로 형질전환된 *S. peucetius*/pESK404(-▨-)에서의 배양시간에 따른 다나루비신의 생산정도를 나타내는 그래프이다.

도 3a 및 3b에서 보는 바와 같이, 경로 특이적 조절유전자인 *dnrI*가 도입된 *S. peucetius*/pESK404의 경우 대조군으로 벡터만 포함된 *S. peucetius*/pSE34에 비해 약 5.5배의 생산성 증가가 이루어진 것으로 확인되었고, 전구체 전환 생합성 유전자인 *doxA*가 도입된 *S. peucetius*/pESK403의 경우 대조군에 비해 약 2.5배의 독소루비신 생산성 증가가 이루어진 것으로 확인되었다. 독소루비신의 전구체인 다나루비신의 생산성을 측정한 결과, *S. peucetius*/pESK403의 경우 3일째 까지 미량의 다나루비신이 생산되는 것으로 확인되었고, 이러한 결과는 세포내에서 생합성 된 다나루비신 중 대부분이 DoxA에 의해 독소루비신으로 생전환된 것으로 추측된다. 반면 *S. peucetius*/pESK404에서의 다나루비신은 3일째까지 높은 농도로 생산되는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 DnrI에 의해 세포성장 후반까지 독소루비신 생합성과정이 지속됨을 시사한다. 그러나, *S. peucetius*/pESK403의 경우와는 달리 *S. peucetius*/pESK404에서의 다나루비신 생산성이 지속되는 이유는 세포내 DoxA의 발현양이 극히 적기 때문에 대부분의 다나루비신이 독소루비신으로 생전환 되지 못하고 남아있는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 조절유전자의 도입이나 생합성 과정의 대사 흐름(metabolic flux)를 원활하게 만들어줌으로서 유용 생리활성 물질의 생산성을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

<실시예 3> 독소루비신 생합성 유전자군 PCR 증폭 및 DNA 마이크로어레이칩 제작

DNA 마이크로어레이(microarray)칩 제작을 위한 독소루비신 생합성 유전자 염기서열은 미국 국립 생명공학 정보센터(National Center for Biotechnoloy Information, NCBI)의 엔트레즈 핵산 데이터베이스(Entrez Nucleotides Database)에서 확보하였고, PCR 증폭을 위한 프라이머는 각 유전자들의 모든 ORF를 포함하도록 제작되었다(표 1). 각 유전자들을 증폭하기 위한 PCR 조건은, No. 1: 96℃에서 30초간 분리, 40℃에서 30초간 서냉, 68℃에서 35초간 신장; No. 2: 96℃에서 30초간 분리, 55℃에서 30초간 서냉, 68℃에서 35초간 신장; No. 3: 96℃에서 30초간 분리, 50℃에서 30초간 서냉, 68℃에서 60초간 신장의 세 가지이고, 세 조건 모두 30 회 반복하여 반응시켰다. 각 유전자들의 프라이머 염기서열과 PCR 조건은 표 1로 정리하였다(*는 상업적으로 판매되는 상품을 구입하였다(Stratagene, USA)). 한편, DNA 칩에는 35개의 독소루비신 생합성 유전자와 세 개의 양성 대조군을 포함하였다. 양성 대조군으로는 식물 유래의 유전자 두 종류와 *S. peucetius*의 16S rDNA를 사용하였다. PCR을 통해 증폭된 각각의 유전자 산물은 pGEM T-easy(Promega, USA) 벡터에 클로닝 시킨 후 시퀀싱을 통하여 DNA의 염기서열을 확인하였다. 시퀀싱을 통한 염기서열 확인 중 dnrU, dumQ 두 유전자는 다른 유전자로 밝혀져 DNA 마이크로어레이 칩 제작 과정에서 제외하였다. pGEM T-easy 벡터에 클로닝된 각 유

전자들은 벡터 내에 포함된 보편적 프라이머(universal primer)를 사용하여 각각 다시 PCR로 증폭시켰고, DNA 마이크로어레이칩 제작을 위한 시료로 사용하였다. DNA 마이크로어레이칩은 폴리-L-라이신(poly-L-lysine)이 코팅된 슬라이드 글래스를 사용하였고, 유전자의 점적에는 Pixsys 5500^{TM}(Cartesian Technologies Inc., USA)를 사용하였으며, DNA 마이크로어레이칩의 스캐닝에는 Genepix Personal 4100A^{TM}(Axon Instruments Inc., USA)를 사용하였다.

[표 1]

독소루비신 생합성 관련 유전자 및 이의 증폭을 위한 프라이머

유전자	점적위치		유전자 산물	PCR 프라이머	서열번호	PCR 조건
	행	열				
dnmZ	1	1	잠재적 플라보프로테인	정방향: catatgacaaagccatctgtgcacg 역방향: tcatcggcccaacgccacttcgctc	5 6	1
dnrD	1	2	메틸아클라논산 사이클라제	정방향: catatgagcacgcagatcgatctgg 역방향: tcaggggcgccagccctcgggggtg	7 8	1
dnmJ	1	3	잠재적 단백질 키나제	정방향: catatgtccacctacgtctggcaat 역방향: tcacaggcttccgacgacctcccgc	9 10	1
dnmL	1	4	포도당-1인산 트랜스퍼라제	정방향: catatgaaggctctcgtcctgtccg 역방향: tcatgaggagatctccaccctgctg	11 12	1
dnrN	1	5	조절 단백질	정방향: catatgaccatccgagtcgtgattg 역방향: tcagatccagccggacatactggcg	13 14	1
dpsG	1	6	다나루비신 아실 운반체 단백질	정방향: catatggctgagctcagcctggcgg 역방향: tcatgccgccgctcgcagcctctcg	15 16	1
dpsH	1	7	다나루비신 생합성 효소	정방향: catatggaccgacggttgtccgctc 역방향: tcagtccagcccgtcccgggtgacg	17 18	1
dnrE	1	8	기능 불명	정방향: catatggagaacacacagcgatccg 역방향: tcacgtcaccgagagacccccgtcc	19 20	1
drrB	1	9	다나루비신 저항성 단백질	정방향: catatgacgacgtcccccggcaccg 역방향: tcagtgggcgttcttgttgcggtac	21 22	1
dpsY	1	10	폴리케타이드 사이클라제	정방향: catatgtgctgtggtggcccgagag 역방향: tcattcgtcgacgaaggcgaccgcg	23 24	1
drrA	2	1	다나루비신 저항성 단백질	정방향: catatgaacacgcagccgacacggg 역방향: tcatgccaccttctcctcttccgcc	25 26	1
drrD	2	2	다나루비신 저항성 단백질	정방향: catatgagcggcgcacctactgtcc 역방향: tcacgaaggcgcccccgtagccgcg	27 28	1
dpsF	2	3	다나루비신-독소루비신 폴리케타이드 합성효소	정방향: catatgtccgagttgccgcttcagc 역방향: tcaggcgctggactcggcgtactgc	29 30	1
dpsD	2	4	다나루비신-독소루비신 폴리케타이드 합성효소	정방향: catatggatgcgcccgcgattctcc 역방향: tcaccgcccgggtcgcccactgagc	31 32	1
dnrI	2	5	잠재적 전사 조절자	정방향:ggatccggaaatatgccacctgctga 역방향:aagcttgtggacacgtgactccttgt	33 34	1
doxA	2	6	다나루비신 C-14 히드록실라제	정방향:ggatccggtcgaactgcgggaggggt 역방향:aagcttgcggatcagcgcagccagac	35 36	1
dnrM	2	7	TDP-D-포도당-4,6-탈수효소	정방향: catatgaccatgaagatcctggtga 역방향: tcaggatccggtgagcggtgcccac	37 38	2
dnrO	2	8	잠재적 억제자	정방향: catatgaccgagacgccatcccgca 역방향: tcacccggctgctggcccgctgacc	39 40	2
dnrF	2	9	아클라비논 C-11 히드록실라제	정방향: catatggccttgacgaagccggatg 역방향: tcagttcgccggaggggggcggcgac	41 42	2
dnmT	2	10	독소루비신 생합성 단백질 DnmT	정방향: catatgaccgcccagatcgcccggt 역방향: gaactcacctccggggcggggcgga	43 44	2
dnmV	3	1	티미딘 이인산-4-케토-2,3,6-트리디옥시-헥슐로스 환원효소	정방향: catatgcgggtcgtggttctggggg 역방향: ctaggccggggcgccgtgcgcggtc	45 46	2
dnrG	3	2	안트라퀴놀 모노옥시게나제	정방향: catatgccacagccagaaccgaacg 역방향: ttcacgtcgtccgccctccgggccc	47 48	2
dpsA	3	3	다나루비신-독소루비신 폴리케타이드 합성효소	정방향: catatgaaccggcggatcgtcatca 역방향: tcacctctcgagacggctcagcagc	49 50	2

dpsB	3	4	다나루비신-독소루비신 폴리케타이드 합성효소	정방향: catatgacaggtaccgcggcacgga 역방향: tcacgccgccccccggaccaccaga	51 52	2
dnrV	3	5	독소루비신 생합성 단백질 DnrV	정방향: catatgaccaggttcgcgcccggcg 역방향: tcgccgctcacgaggcaccgcccgc	53 54	2
dpsE	3	6	다나루비신-독소루비신 폴리케타이드 합성효소	정방향: catatgtccgaggcagccgaccggg 역방향: tcagtagctgccgaggccaccacag	55 56	2
dnrH	3	7	잠재적 바우마이신 생합성 단백질	정방향: catatgcgcgtcctgttcgccacca 역방향: ctaggcaccgccggtggaaggcgac	57 58	2
dnrK	3	8	카미노마이신 O-메틸트랜스퍼라제	정방향: catatgacagccgaaccgacggtcg 역방향: tcgtgtgtcaggcgccggtggccgc	59 60	2
dnrP	3	9	10-카르보메톡시-13-디옥시카미노마이신 에스테라제	정방향: catatgccgacacgcatgatcacca 역방향: tcacactgtcgcggcccgggtgtgg	61 62	2
dnmS	3	10	글리코실 트랜스퍼라제	정방향: catatgaaggtgctcgtgacggcgt 역방향: aaagcccctagtgccggacgccctg	63 64	2
dpsC	4	1	다나루비신-독소루비신 폴리케타이드 합성효소	정방향: catatgagcgtgccgcaggggcgc 역방향: atgacgggctcctcaccgggcggcc	65 66	2
dnrX	4	2	다나루비신/독소루비신 생합성 효소	정방향: catatggagccgaacgaatcgacat 역방향: tcaccctgagcggatccagcggccc	67 68	3
dnmU	4	3	잠재적 에피머라제	정방향: catatgaaggcgcgggaactggcgg 역방향: tcacccgtctccgcgtgacccggcc	69 70	3
dnrC	4	4	기능 불명	정방향: catatgcaggattcgtcctacaaag 역방향: tcagtgggcgacccgggcggtgacg	71 72	3
drrC	4	5	다나루비신 저항성 단백질(UvrA-유사 단백질)	정방향: catatgcagcagcaggctattcaga 역방향: aaggatcagcgccgggcccggtggt	73 74	3
dnrU	-	-	다나루비신 C-13 케토리덕타제	정방향: catatgacggcctccaccccgcacc 역방향: tcagtgcgcggtgtcgccgacggcg	75 76	2
dnmQ	-	-	기능 불명	정방향: catatgcccacacccacgtccgcgc 역방향: tcacttctgggccagccgcagcgag	77 78	3
대조군 1	4	6	*S. peucetius* 16S rDNA (양성 대조군)	정방향 : agagtttgatcmtggctcag 역방향 : ggctaccttgttacgactt	79 80	2
대조군 2	4	7	식물 유전자(아라비돕시스 탈리아나 광계I 클로로필 a/b-결합 단백질(X56062)) (양성 대조군)	_	_	*
대조군 3	4	8	식물 유전자(아라비돕시스 탈리아나 RUBISCO 액티바제(X14212)) (양성 대조군)	_	_	*

<실시예 4> DNA microarray 시스템을 이용한 유전자 발현패턴 분석

상기 실시예 1에서 제조한 독소루비신 고생산성 균주를 배양하고, 특정 배양시간에 따라 총RNA를 총RNA 분리 키트 (RNeasy^{TM} Mini Kit, QIAGEN, Germany)을 사용하여 추출한 다음, cDNA합성을 위한 주형로 사용하였다. 독소루비신이 생산되기 이전인 접종 후 24시간 후를 T_0 시점으로 정하고, 이때 추출한 총RNA를 형광물질인 Cy-3로 표지하여 cDNA를 제조하였다. 그 이후의 시점은 독소루비신 생산이 시작되는 시점인 접종 후 48시간 후를 T_1 시점, 독소루비신 생산성이 최대인 접종 후 80 시간후를 T_2 시점으로 정하였고, T_1 및 T_2 시점에 추출한 총RNA는 각각 Cy-5로 표지하여 cDNA를 제조하였다(도 5).

도 5는 액상 NDYE 배지에서의 *S. peucetius*/pESK403 및 *S. peucetius*/pESK404의 성장률을 나타내는 그래프이다. 이때, T_0-T_2는 총RNA 분리를 위한 배양액의 수확시기를 나타낸다.

상기와 같이 표지된 T_0 시점의 cDNA와 T_1 또는 T_2 시점의 cDNA를 각각 1:1로 혼합하여, 경쟁적으로 DNA 칩 상에서 하기와 같은 방법으로 혼성화 시켰다: 먼저, cDNA 합성을 위하여 사용된 총RNA는 각각 15 ㎍이며, 역전사 반응을 위한 프라이머로는 70% GC-함량을 가진 무작위적 헥사머를 사용하였다. 형광 표지를 위하여, 우선 총RNA를 70℃에서 10분간 처리하여 분리시킨 후 바로 얼음에 보관하고 상기 무작위적 프라이머 및 반응 용액[5X first stand buffer, 0.1M DTT,

dNTP(4mM dATP, 4mM dTTP, 10mM dGTP, 0.5mM dCTP), Cy-3 (또는 Cy-5)-dCTP(PerkinElmer, USA) 및 역전사 효소(SuperScript II, Invitrogen, USA)]를 혼합하였다. 그런 다음, 42℃에서 2시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고, 종결 용액(stop solution)을 첨가한 다음, 65℃에서 10분간 정치시켰다. 여기에 3 M 소디움-아세테이트(pH 5.2)와 100% 에탄올을 첨가하고 -20℃ 냉동고에서 30 분동안 침전시킨 다음 원심분리과정을 통해 cDNA를 분리하였다. 혼성화는 상기 표지된 cDNA와 혼성화 용액을 혼합한 후 65℃에서 10분간 정치시키고, 각각 Cy-3와 Cy-5로 표지된 cDNA를 1:1로 섞은 다음, 끓는 물에서 2분간 방치하고 바로 45℃에서 20분간 정치시켰다. DNA 칩상에서 유전자가 점적된 부분에 준비된 cDNA 시료를 적재하고 커버글래스를 덮은 다음 65℃에서 12 내지 16시간 정도 혼성화시켰다(Huang, J. et al., *Genes Dev.,* 15: 3183-3192, 2001). 상기 혼성화된 DNA 칩을 세척하기 위하여, 0.1% SDS가 포함된 2X SSC 완충액 50 ㎖에 담근 후, 2분간 흔들어주고, 바로 1X SSC 완충액 50 ㎖로 옮겨 3분간 흔들어 주었다. 마지막으로 0.2X SSC 완충액으로 옮긴 후, 다시 2분간 흔들어주고 세척 용액을 버린 다음, 원심분리를 통해서 혼성화된 DNA 칩에서 세척 용액 성분을 제거하였다. 세척이 끝난 DNA을 건조한 다음, DNA 칩 스캐너(Genepix Personal 4100A, Axon Instruments Inc., USA)를 사용하여 형광신호를 검출하였다(도 4).

도 4는 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 DNA 마이크로어레이칩에 관한 사진이다. 이 때, A는 Cyto-61이 표지된 DNA 마이크로어레이칩을 나타내고, B는 *S. peucetius*/pESK404의 T_0 대 T_2의 유전자 발현양상을 비교한 DNA 마이크로어레이칩을 나타낸다.

결과 분석은 스캐닝을 통해 분석된 각 점의 형광 강도의 값을 기준으로 전체 유전자의 발현 패턴을 순위적 클러스터링(hierachical clustering)을 통해 그룹화하여 분석하였다(표 2 및 도 6 내지 8).

[표 2]

S. peucetius/pESK403 및 S. peucetius/pESK403에서의 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상

유전자	*S. peucetius*/pESK403		*S. peucetius*/pESK404	
	형광 강도의 비		형광 강도의 비	
	T_1/T_0	T_2/T_0	T_1/T_0	T_2/T_0
dnmZ	F*	3.053	0.521	2.103
dnrD	1.412	6.638	1.093	3.924
dnmJ	F	3.454	1.043	3.584
dnmL	F	1.485	0.32	1.329
dnrN	F	3.887	0.925	4.848
dpsG	F	7.992	0.75	5.674
dpsH	F	F	0.607	2.334
dnrE	F	1.26	F	1.71
drrB	F	5.478	0.611	4.4
dpsY	F	5.513	0.478	2.417
drrA	F	11.05	0.879	8.53
drrD	F	F	F	F
dpsF	F	2.304	F	2.996
dpsD	F	F	F	F
dnrI	1.361	7.311	1.847	3.808
doxA	1.932	23.951	0.113	3.606
dnrM	F	3.029	0.435	2.278
dnrO	F	6.606	0.864	6.207
dnrF	F	F	0.363	1.328
dnmT	F	5.447	F	2.191
dnmV	F	1.814	F	2.042
dnrG	F	10.486	F	99.765
dpsA	F	3.054	F	8.578
dpsB	F	F	F	F
dnrV	F	F	F	F
dpsE	F	5.635	0.575	7.65
dnrH	F	F	F	F

dnrK	0.025	2.863	1.134	2.203
dnrP	F	4.58	0.393	4.082
dnmS	F	F	F	2.704
dpsC	F	3.51	0.151	4.992
dnrX	F	4.523	0.521	5.062
dnmU	F	5.426	0.594	11.619
dnrC	F	4.945	0.687	10.942
drrC	F	17.99	2.696	35.153

표 2에서 볼 수 있듯이, DNA 마이크로어레이칩를 통하여 분석한 결과, *S. peucetius*/pESK403과 *S. peucetius*/pESK404 두 균주 모두 독소루비신 생산성의 증가에 따라 독소루비신 생합성 유전자군의 발현패턴이 유사하게 증가하는 양상을 보였다. 그러나, 일부 점들에서는 공통적으로 신호가 관찰되지 않았는데(상기 표에서 F*로 나타낸 부분: Flagging), 이는 상기 유전자들의 발현이 극히 낮은 수준으로 이루어졌거나, 유전자의 발현은 이루어졌지만 cDNA합성에 사용된 무작위적 헥사머가 모든 생합성 관련 유전자의 cDNA를 합성하는데 적합하지 못했던 것으로 추측된다. 과발현을 유도한 *S. peucetius*/pESK403의 *doxA* 유전자나 *S. peucetius*/pESK404의 *dnrI* 유전자 모두 다른 독소루비신 생합성 유전자들보다 높은 수준으로 발현되었다. 이는 pSE34의 *ermE** 프로모터에 의해 세포성장 초기부터 안정적으로 유전자의 발현이 이루어지고 있음을 입증하고 있다(도 6a 및 6b).

또, *S. peucetius*/pESK403의 독소루비신 관련 유전자군의 발현패턴은 전반적으로 독소루비신 생합성 유전자의 발현뿐만 아니라 내성유전자의 발현 역시도 두드러지게 증가하였으며(도 7b), 상기 경향은 *S. peucetius*/pESK404의 경우에서도 유사하게 나타났다(도 8b). 따라서, 본 연구 결과는, 내성유전자의 과 발현을 유도함으로서 독소루비신 생산성 증가를 이끌어 낼 수 있다는 가능성을 제시해 주고 있다(Dairi, T. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(10): 1835-1841, 1995).

DnrI에 의해 조절을 받는 독소루비신 생합성 유전자는 *drrAB, dnrG-dpsABCD, dpsEF, dnrDKPQS, dnmLM* 오페론과 *dnrC, drrC* 유전자들로 알려져 있다(Otten, S. L. et al., *J. Bacteriol.,* 177: 1216-1224, 1995; Sheldon, P. J. et al., *Mol. Microbiol.*, 44(2): 449-460, 2002). *S. peucetius*/pESK403의 경우 DnrI에 의해 조절을 받는 유전자들의 발현을 관찰한 결과, 다른 독소루비신 생합성 유전자들과 비슷한 수준으로 발현이 이루어졌다(도 7a). 반면, 비교적 초반부터 *dnrI* 유전자를 과발현시킨 *S. peucetius*/pESK404의 경우, DnrI에 의해 조절을 받는 대부분의 유전자들은 다른 생합성 유전자들에 비해 발현 수준이 높게 유지되고 있음을 확인할 수 있었다(도 8a). 그러나, *S. peucetius*/pESK404의 경우, *dnrI* 유전자를 과발현시켰음에도 불구하고 독소루비신의 디옥시당 부분인 TDP-다나사민(TDP-daunosamine)을 합성하는데 관여하는 포도당-1인산 티미딜릴트랜스퍼라제인 *dnmL* 유전자는 다른 DnrI 의존적인 유전자들과 비교하여 그 발현양이 상당히 낮은 수준임을 확인할 수 있었다(도 8c). 상기 결과는 *S. peucetius*/pESK403의 경우에서도 마찬가지로 확인되었다(도 7c). *dnmL*의 프로모터 부분의 염기서열을 확인한 결과, 다른 *dnrI*-의존적 유전자들과 마찬가지로 DnrI-결합 지역이 온전히 보존되어있는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 *S. peucetius*의 독소루비신 생합성 과정에 있어 *dnmL*의 발현을 극대화함으로써 TDP-다우노사민의 공급을 원활하게 만들어준다면 결과적으로 독소루비신 생산성의 증가를 유도할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

본 발명자들은 상기와 같이 DNA 마이크로어레이칩 시스템을 통한 독소루비신 생합성 유전자 발현패턴 분석결과, 전체 생합성 관련 유전자의 발현을 촉진하는 경로 특이적 유전자인 *dnrI* 유전자뿐 아니라, DnrI에 조절을 받는 디옥시당 합성 유전자인 *dnmL* 그리고 독소루비신 내성유전자인 *drrA, drrB, drrC*의 안정적이고 꾸준한 발현이 독소루비신 생산성 증가를 위한 주요 인자임을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명은 독소루비신 대량생산을 위한 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 방선균, 독소루비신 생합성 관련 유전자가 포함된 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩 및 상기 DNA 마이크로 어레이를 이용한 유전자 분석방법에 관한 것이다. 상기에서 주장하고 입증한 바와 같이, 본 발명의 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체는 독소루비신의 대량생산이 가능하였다. 또한, 본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전

자 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩 및 이를 이용한 유전자 분석방법을 통하여, 독소루비신 대량생산을 위한 유전자를 선별할 수 있었다. 본 발명의 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩 및 이를 이용한 유전자 분석방법은 보다 효율적인 독소루비신 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

독소루비신 생산용 발현벡터에 있어서, 도 2의 개열지도로 표시되며 방선균의 경로 특이적 조절유전자(*dnr*Ⅰ)를 포함하는 독소루비신 생산용 발현벡터 (pESK404) 또는 전구체 전환 생합성 유전자(*dox*A)를 포함하는 독소루비신 생산용 발현벡터 (pESK403).

청구항 2.

삭제

청구항 3.

제 1항의 독소루비신 생산용 발현벡터로 형질전환된 방선균 스트렙토마이세스 퓨세티우스(*S. peucetius*).

청구항 4.

제 3항에 있어서, *S. peucetius*/pESK404 또는 *S. peucetius*/pESK403인 것을 특징으로 하는 형질전환된 방선균 스트렙토 마이세스 퓨세티우스.

청구항 5.

하나 이상의 독소루비신 생합성 관련 유전자를 포함하는 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 독소루비신 생합성 관련 유전자는 *dnmZ*, *dnrD*, *dnmJ*, *dnmL*, *dnrN*, *dpsG*, *dpsH*, *dnrE*, *drrB*, *dpsY*, *drrA*, *drrD*, *dpsF*, *dpsD*, *dnrI*, *doxA*, *dnrM*, *dnrO*, *dnrF*, *dnmT*, *dnmV*, *dnrG*, *dpsA*, *dpsB*, *dnrV*, *dpsE*, *dnrH*, *dnrK*, *dnrP*, *dnmS*, *dpsC*, *dnrX*, *dnmU*, *dnrC* 및 *drrC*로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩.

청구항 7.

제 5항에 있어서, 대조유전자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 독소루비신 생합성 관련 유전자의 발현 양상 분석용 DNA 마이크로어레이칩.

청구항 8.

(i) 하나 이상의 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 DNA 마이크로어레이칩을 제조하는 단계;

(ii) 배양시간을 달리하여 수득한 독소루비신 고생산성 균주로부터 총RNA를 추출하는 단계;

(iii) 추출된 각각의 총RNA로부터 역전사 반응을 이용하여 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 제조하는 단계;

(iv) 상기 각각의 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 단계 i 에서 제조한 DNA 마이크로어레이칩와 경쟁적으로 혼성화시키는 단계;

(v) 세척 후 각각의 형광을 검출하는 단계 및

(vi) 각각의 형광의 강도를 비교하는 단계를 포함하는 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석 방법.

청구항 9.

제 8항에 있어서, 상기 독소루비신 생합성 관련 유전자는 *dnmZ*, *dnrD*, *dnmJ*, *dnmL*, *dnrN*, *dpsG*, *dpsH*, *dnrE*, *drrB*, *dpsY*, *drrA*, *drrD*, *dpsF*, *dpsD*, *dnrI*, *doxA*, *dnrM*, *dnrO*, *dnrF*, *dnmT*, *dnmV*, *dnrG*, *dpsA*, *dpsB*, *dnrV*, *dpsE*, *dnrH*, *dnrK*, *dnrP*, *dnmS*, *dpsC*, *dnrX*, *dnmU*, *dnrC* 및 *drrC* 로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석 방법.

청구항 10.

제 8항에 있어서, 상기 독소루비신 고생산성 균주는 *S. peucetius*/pESK404 또는 *S. peucetius*/pESK403인 것을 특징으로 하는 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석 방법.

청구항 11.

제 8항에 있어서, 상기 배양시간은 독소루비신이 생성되기 이전인 접종후 24시간 후를 T_0으로 하고, 독소루비신이 생성되는 시점인 접종후 48시간을 T_1으로 하며, 접종 후 80시간을 T_2로 하는 것을 특징으로 하는 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석 방법.

청구항 12.

제 8항에 있어서, 상기 형광물질은 플루오레세인, 로다민, 녹색형광단백질, Cy-3 또는 Cy-5인 것을 특징으로 하는 독소루비신 생합성 관련 유전자 발현양상 분석 방법.

청구항 13.

(i) 하나 이상의 독소루비신 생합성 관련 유전자가 점적된 DNA 마이크로어레이칩를 제조하는 단계;

(ii) 배양시간을 달리하여 수득한 독소루비신 고생산성 균주로부터 총RNA를 추출하는 단계;

(iii) 추출된 각각의 총RNA로부터 역전사 반응을 이용하여 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 제조하는 단계;

(iv) 상기 각각의 서로 다른 형광물질이 표지된 cDNA를 단계 i 에서 제조한 DNA 마이크로어레이칩와 경쟁적으로 혼성화시키는 단계;

(v) 세척 후 각각의 형광을 검출하는 단계;

(vi) 각각의 형광의 강도를 비교하는 단계 및

(vii) 대조군에 비하여 형광 강도가 커지거나 발현 양상의 변화가 없는 유전자를 선별하는 단계를 포함하는 독소루비신 생산성 향상에 관련된 유전자의 선별방법.

청구항 14.

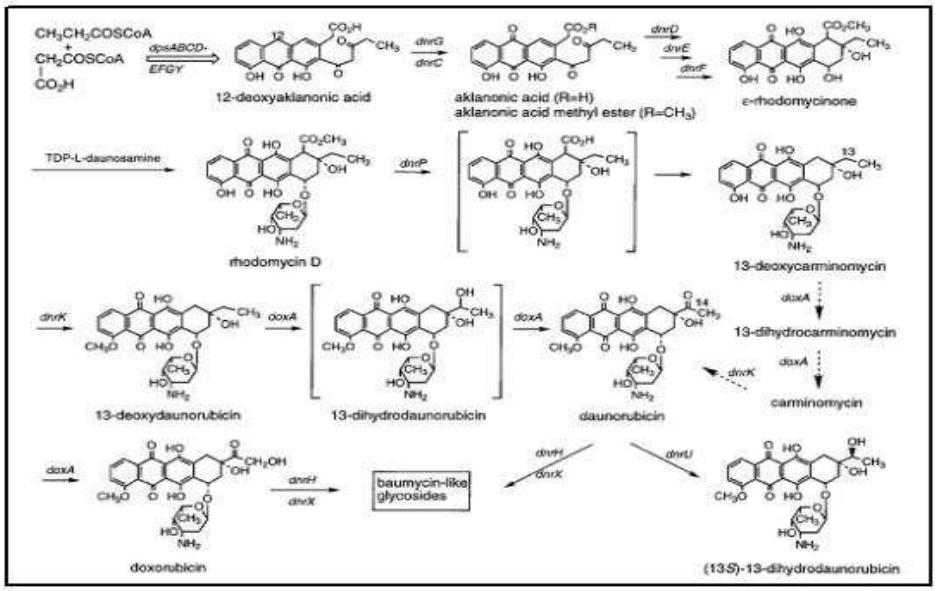
제 13항에 있어서, 상기 독소루비신 생합성 관련 유전자는 *dnmZ*, *dnrD*, *dnmJ*, *dnmL*, *dnrN*, *dpsG*, *dpsH*, *dnrE*, *drrB*, *dpsY*, *drrA*, *drrD*, *dpsF*, *dpsD*, *dnrI*, *doxA*, *dnrM*, *dnrO*, *dnrF*, *dnmT*, *dnmV*, *dnrG*, *dpsA*, *dpsB*, *dnrV*, *dpsE*, *dnrH*, *dnrK*, *dnrP*, *dnmS*, *dpsC*, *dnrX*, *dnmU*, *dnrC* 및 *drrC*로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 독소루비신 생산성 향상에 관련된 유전자의 선별방법.

청구항 15.

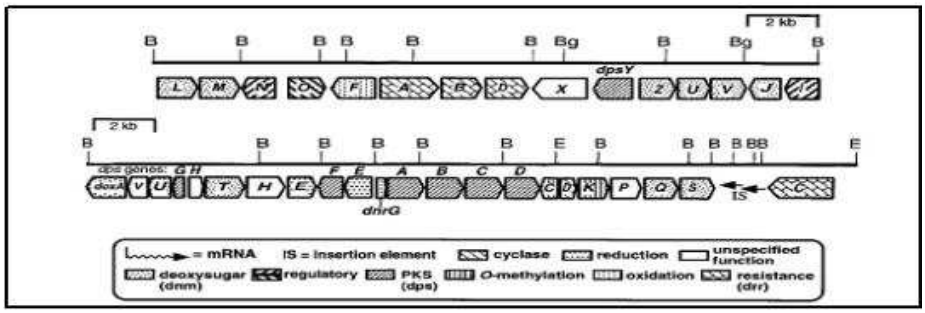
제 13항에 있어서, 상기 독소루비신 고생산성 균주는 *S. peucetius*/pESK404 또는 *S. peucetius*/pESK403인 것을 특징으로 하는 독소루비신 생산성 향상에 관련된 유전자의 선별방법.

도면

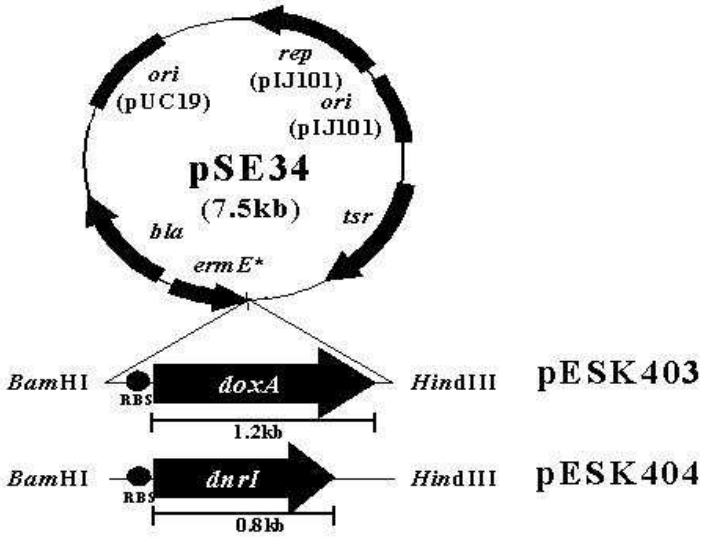
도면1a



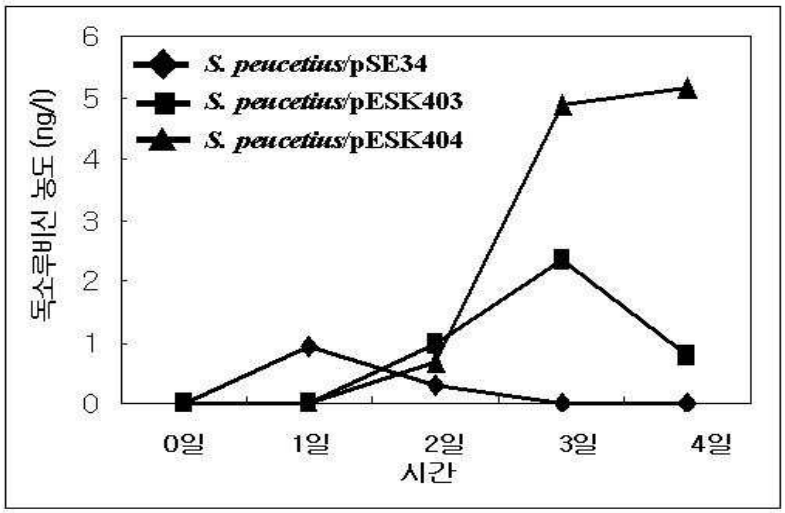
도면1b


2 kb
B
Bg
dpsY
dnrG
= mRNA
IS = insertion element
cyclase
reduction
unspecified function
deoxysugar (dnm)
regulatory
PKS (dps)
O-methylation
oxidation
resistance (drr)

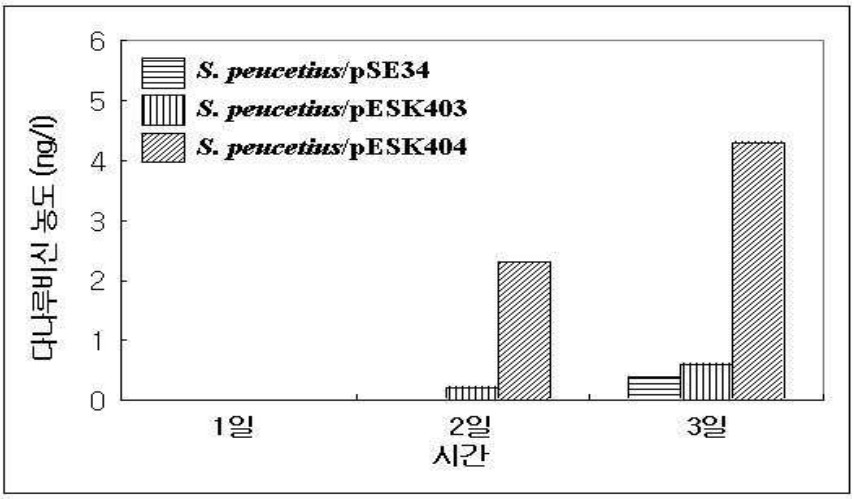
도면2


rep
(pIJ101)
ori
(pUC19)
ori
(pIJ101)
pSE34
(7.5kb)
tsr
bla
ermE*
BamHI
RBS
doxA
HindIII
pESK403
1.2kb
BamHI
RBS
dnrI
HindIII
pESK404
0.8kb

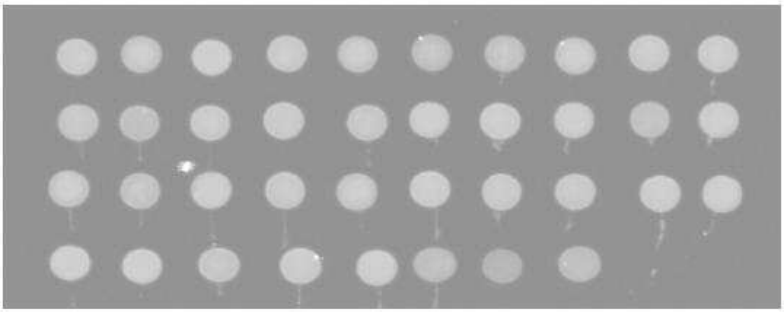
도면3a


S. peucetius/pSE34
S. peucetius/pESK403
S. peucetius/pESK404
독소루비신 농도 (ng/l)
0
1
2
3
4
5
6
0일
1일
2일
3일
4일
시간

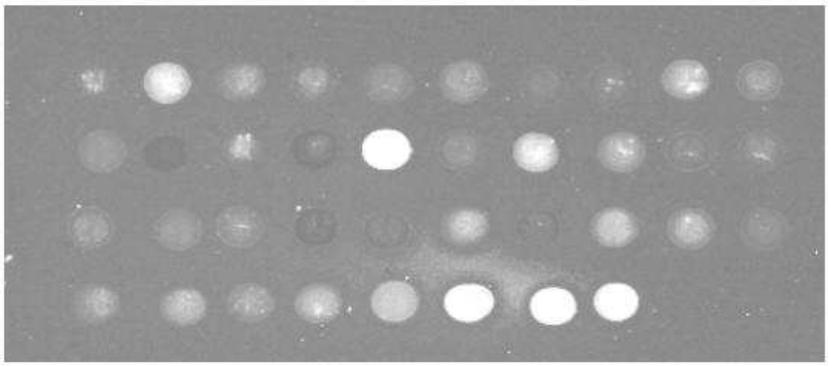
도면3b


S. peucetius/pSE34
S. peucetius/pESK403
S. peucetius/pESK404
다나루비신 농도 (ng/l)
0
1
2
3
4
5
6
1일
2일
3일
시간

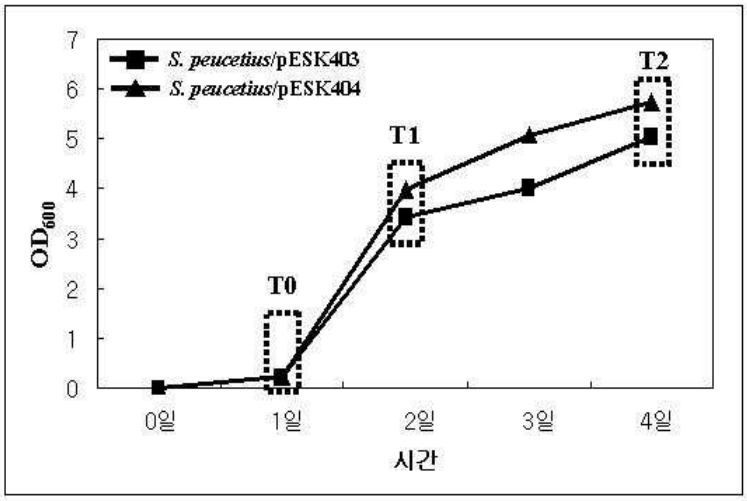
도면4a



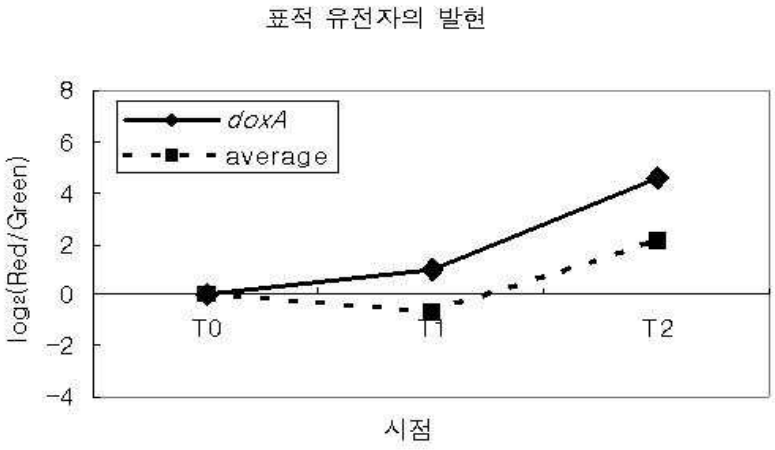
도면4b



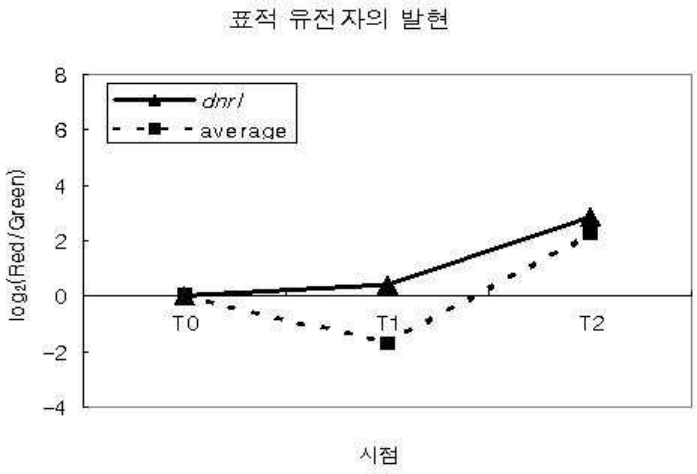
도면5


S. peucetius/pESK403
S. peucetius/pESK404
T0
T1
T2
OD600
0
1
2
3
4
5
6
7
0일
1일
2일
3일
4일
시간

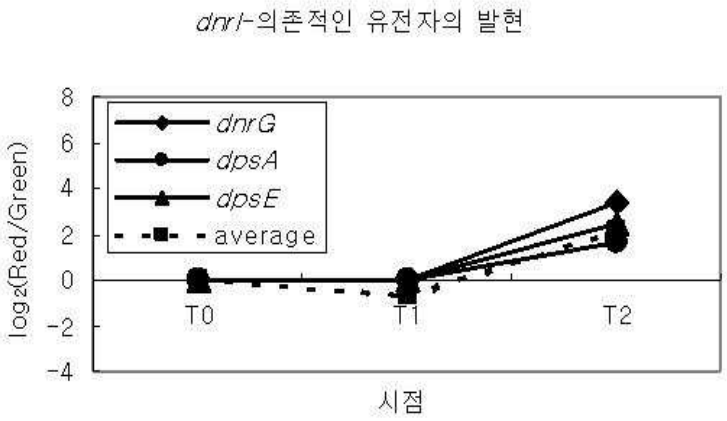
도면6a



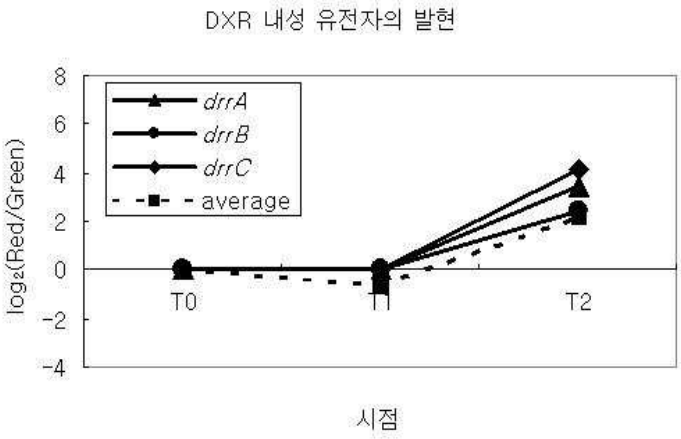
도면6b



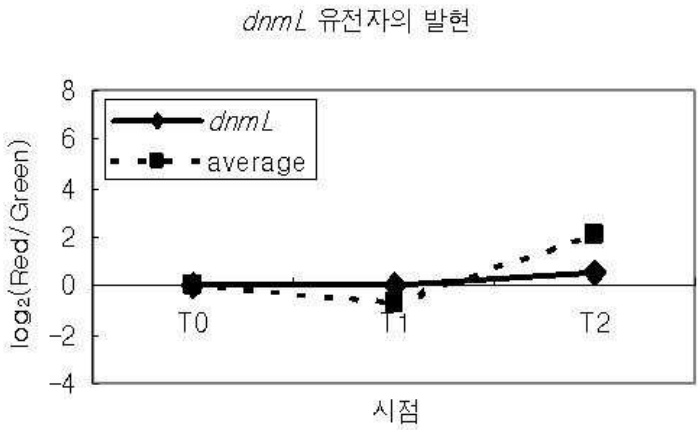
도면7a


dnrI-의존적인 유전자의 발현
8
6
4
2
0
-2
-4
log2(Red/Green)
dnrG
dpsA
dpsE
average
T0
T1
T2
시점

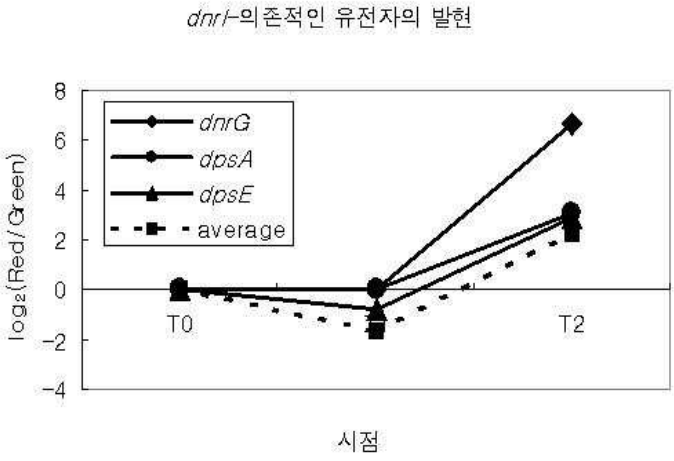
도면7b


DXR 내성 유전자의 발현
8
6
4
2
0
-2
-4
log2(Red/Green)
drrA
drrB
drrC
average
T0
T1
T2
시점

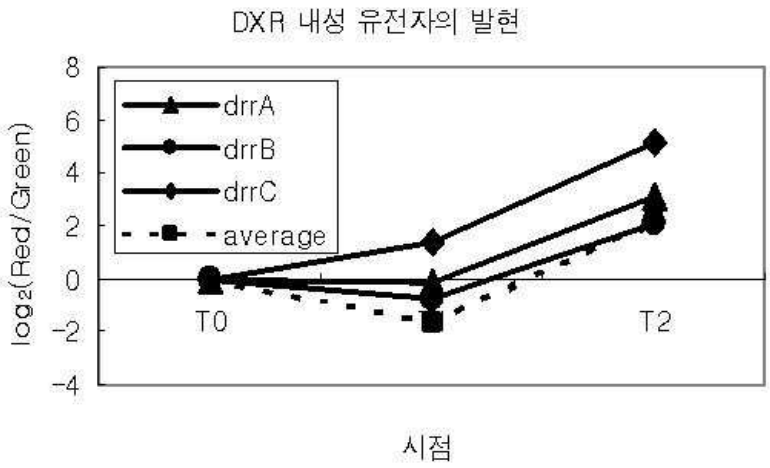
도면7c



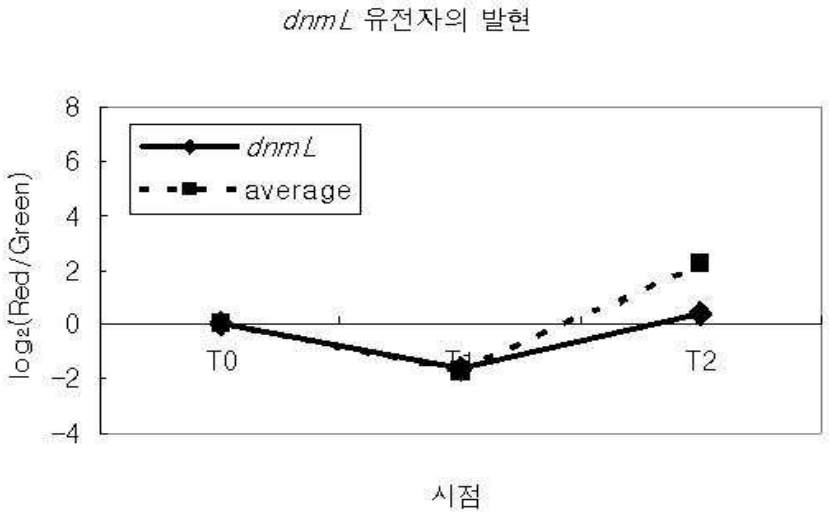
도면8a


dnrI-의존적인 유전자의 발현
8
6
4
2
0
-2
-4
log2(Red/Green)
dnrG
dpsA
dpsE
average
T0
T2
시점

도면8b


DXR 내성 유전자의 발현
8
6
4
2
0
-2
-4
log2(Red/Green)
drrA
drrB
drrC
average
T0
T2
시점

도면8c



서열목록

서열목록 전자파일 첨부