



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0107016
(43) 공개일자 2013년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0028776

(22) 출원일자 2012년03월21일

심사청구일자 2012년03월21일

(71) 출원인

종근당바이오 주식회사

서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

강태원

서울특별시 노원구 하계동 275 청구빌라 301동 203호

유성선

경기도 수원시 영통구 영통동 살구골 현대아파트 725동 603호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

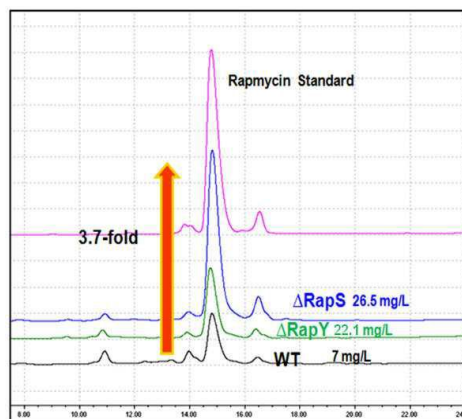
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **증가된 라파마이신 생성능을 갖는 신규 미생물 균주**

(57) 요약

본 발명은 (a) 불활성화(inactivated) *rapY* 유전자, (b) 불활성화(inactivated) *rapS* 유전자 또는 (c) 불활성화(inactivated) *rapY* 유전자와 불활성화(inactivated) *rapS* 유전자를 포함하는 라파마이신(Rapamycin) 생성능을 갖는 미생물 균주에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 종래의 라파마이신 생산 균주와 비교하여 현저하게 증가된 라파마이신 생성능을 나타낸다. 본 발명의 균주를 이용한 라파마이신 제조 방법은 라파마이신의 산업적 대량 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

이유원

서울특별시 양천구 목1동 405 대림APT 1012동 601호

윤여준

서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호

유영지

서울특별시 서대문구 영천동 삼호아파트 105동 306호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035861

부처명 지식경제부

연구사업명 우수제조기술연구센터사업

연구과제명 오믹스 기술을 이용한 면역억제제 라파마이신의 개발

주관기관 종근당바이오(주)

연구기간 2010.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 불활성화(inactivated) *rapY* 유전자, (b) 불활성화(inactivated) *rapS* 유전자 또는 (c) 불활성화(inactivated) *rapY* 유전자와 불활성화(inactivated) *rapS* 유전자를 포함하는 라파마이신(Rapamycin) 생성능을 갖는 미생물 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 미생물 균주는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속 균주인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 미생물 균주는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 불활성화는 상기 *rapY* 유전자 또는 *rapS* 유전자에서의 치환, 결실 또는 삽입 변이에 의한 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 불활성화는 상기 *rapY* 유전자 또는 *rapS* 유전자에서의 결실 변이에 의한 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 라파마이신 제조 방법:

- (a) 상기 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 미생물 균주를 탄소원, 에너지원 및 질소원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)의 결과물로부터 라파마이신을 회수하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 증가된 라파마이신 생성능을 갖는 미생물 균주에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 라파마이신(Rapamycin)은 마크로사이클릭 폴리케타이드 계열의 화합물로 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스에서 생합성되는 이차대사산물이다(도 1). 마크로사이클릭 폴리케타이드 계열의 화합물(Rapmycin, FK506)은 항진균(antifungal), 항암, 면역억제 등 다양한 유용한 생리활성을 가지고 있다. 특히 라파마이신은 면역억제제로서 심장혈관 질환과 자가면역 질환 그리고 신경질환의 치료에 사용되며 세포의 노화를 방지한다. 이런 이유로 야생 생산균주로부터 많은 양의 라파마이신 천연물질을 얻기 위하여 연구가 지속되고 있지만, 야생 생산균

주의 유전자조작은 매우 어렵거나 거의 불가능하여 일반적으로 항생제 생성 균주의 향상을 위하여 이용하고 있는 고전적 균주개량법으로 고생산 균주를 개발하는 연구가 연구되고 있다. 전통적인 방법인 돌연변이 유발방법에 의한 스크리닝은 고생산 균주의 선별을 가능하게 하였지만, 고생산 균주 제작에 오랜 시간과 노력이 들며 변이체의 활성을 유지하기가 어려운 단점이 있어 유전공학적 방법을 통하여 생산성이 향상된 균주를 개발하는 것이 산업적으로 유용하여 주목 받고 있다. 유전공학적 방법에는 대표적으로 조절유전자의 조작, 생합성 전구체의 유전자 조작 및 전구체의 공급 등이 있다. 미생물 이차대사산물의 전구체의 공급을 증가시켜 생산성 증대를 이루는 일반적인 방법은 주로 발효배지에 전구체를 과량 첨가하여 생산성을 증가시키는 방법이다. 그러나, 라파마이신의 경우에는 전구체가 고가이므로 다량의 전구체를 배지에 첨가하는 것이 비경제적이다. 따라서 생합성 유전자 집단내의 조절유전자의 조작을 통한 고생산 균주의 제작이 가장 효과적이다.

[0003] 라파마이신을 생산하는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 ATCC29253의 생합성 유전자 집단에서 유전자 염기서열 분석을 통하여 총 5종의 조절 유전자가 예측되고 있다. 양성(positive) 조절 유전자로 *rapH* 및 *rapG*가 예측되었으며, 음성 조절 유전자로 *rapY*, *rapS* 및 *rapR* 유전자가 예측되었다. 이 중 *rapH*와 *rapG* 유전자는 유전자의 과발현 및 삭제를 통하여 양성조절 유전자임을 밝힌 연구가 2007년에 보고되었으며, TetR 패밀리 전사조절자인 *rapY*, 반응 조절자인 *rapR* 및 감각 단백질 키나아제인 *rapS* 유전자의 조절 유전자로서의 역할은 아직 보고된 바가 없다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 증가된 라파마이신 생성능을 갖는 미생물 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 결실시켜 라파마이신 생성능이 증가한 변이주를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 증가된 라파마이신 생성능을 갖는 미생물 균주를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 라파마이신의 제조 방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 불활성화(inactivated) *rapY* 유전자, (b) 불활성화(inactivated) *rapS* 유전자 또는 (c) 불활성화(inactivated) *rapY* 유전자와 불활성화(inactivated) *rapS* 유전자를 포함하는 라파마이신(Rapamycin) 생성능을 갖는 미생물 균주를 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 증가된 라파마이신 생성능을 갖는 미생물 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 불활성화(예컨대, 결실)시켜 라파마이신 생성능이 증가한 변이주를 생산할 수 있음을 규명하였다.

[0011] 본 발명의 미생물 균주는 종래의 라파마이신 생산 균주와 비교하여 증가된 라파마이신 생성능을 나타낸다.

[0012] 본 발명의 가장 큰 특징은 미생물의 지놈으로부터 *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 불활성화 시키는 것이다.

[0013] 본 명세서에서 *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자를 언급하면서 사용되는 용어, “불활성화”는 *rapY* 유전자 및 *rapS*

유전자가 발현되어 생성되는 기능적 단백질(functional protein)을 생성하지 못하도록 변이된 것을 의미한다.

예를 들어, 불활성화 *rapY* 유전자는 *rapY* 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 불완전한 형태, 불완전화 활성을 갖는 형태, 절단 형태(truncated form) 또는 단백질의 비형성을 포함한다. 불활성화는 하나 또는 그 이상의 유전자의 기능적 발현을 저해하는 것을 포함한다. 유전자 불활성화는 결실(deletion), 단백질 코딩 서열의 파괴(disruption), 삽입(insertion), 추가(addition), 돌연변이(mutation), 유전자 침묵(gene silencing)(예를 들어, RNAi)을 포함할 수 있다.

- [0014] 본 명세서에서 용어 “결실(deletion)”은 단백질 코딩 전체 서열이 삭제되는 것을 의미하며, 코딩 서열의 일부 또는 플랜킹 부분을 포함하는 코딩 서열을 삭제를 포함할 수 있다. 유전자 결실은 하나의 엑손 또는 하나 이상의 엑손, 인트론 또는 유전자 발현을 조절하는 조절영역에 존재할 수 있다. 유전자 결실은 다양한 사이즈로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 50 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 100 kb, 110 kb, 120 kb, 130 kb, 140 kb, 150 kb, 200 kb, 300 kb, 400 kb, 500 kb, 600 kb, 700 kb, 800 kb, 900 kb, 1000 kb 또는 그 이상의 길이일 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서 용어 “파괴(disruption)”는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 삽입으로 인해 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 야생형 서열과 비교하여 변형되는 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 “삽입(insertion)” 또는 “추가(addition)”는 내인성 염색체 서열 또는 단백질 생성물과 비교하여 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 첨가되어 전체 핵산 또는 아미노산 서열에 변화가 유도된 것을 의미한다.
- [0016] 추가적으로, 본 명세서에서 용어 “불활성”은 상술한 “불활성화”에 의해 유도된다. 몇몇 구현예에 따르면, 불활성화된 유전자에 의해 유전자 또는 유전자 생성물의 측정 가능한 활성 변화가 나타나지 않을 수 있다. 몇몇 구현예에 따르면, 불활성화된 유전자에 의해 유전자의 기능적 발현이 나타나지 않거나, 조금 나타날 수 있다. 따라서, 불활성화된 유전자는 부분적으로 활성화된 표현형을 나타낼 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따르면, 본 발명의 균주는 *rapY* 유전자 또는 *rapS* 유전자에서 치환, 결실 또는 삽입 변이 유도하여 해당 유전자를 불활성화시켜 제조한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, *rapY* 유전자 또는 *rapY* 유전자 전체를 삭제하는 인-프레임 결실을 실시하여 해당 유전자를 불활성화시킨다.
- [0019] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 결실시킨 미생물은 야생형 미생물보다 라파마이신 생성능이 향상된다. 예를 들어, 야생형 균주에서 *rapY* 유전자를 결실시킨 균주의 경우, 야생형 균주에 비해 라파마이신 생산성이 약 3.1배 높게 측정되었으며, 야생형 균주에서 *rapS* 유전자를 결실시킨 균주의 경우, 야생형 균주에 비해 라파마이신 생산성이 약 3.7배 높게 측정되었다(표 3). 즉, *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자의 결실은 라파마이신 생산능을 향상시킨다.
- [0020] 본 발명의 미생물 균주는 바람직하게는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속 균주이다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 균주는 스트렙토마이세스 아크로모게네스(*S. achromogenes*), 스트렙토마이세스 암보페이션스(*S. ambofaciens*), 스트렙토마이세스 오레오페이션스(*S. aureofaciens*), 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*S. avermitilis*), 스트렙토마이세스 클라블리게루스(*S. clavuligerus*), 스트렙토마이세스 펠레우스(*S. felleus*), 스트렙토마이세스 페라리티스(*S. ferralitis*), 스트렙토마이세스 필라멘토서스(*S. filamentosus*), 스트렙토마이세스 그리세우스(*S. griseus*), 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*S. hygroscopicus*), 스트렙토마이세스 이위소슈퍼피쿠스(*S. iysosuperficus*), 스트렙토마이세스 리비단스(*S. lividans*), 스트렙토마이세스 노우르세이(*S. noursei*), 스트렙토마이세스 스카비에스(*S. scabies*), 스트렙토마이세스 소마리엔시스(*S. somaliensis*), 스트렙토마이세스 썬모비올라세우스(*S. thermoviolaceus*), 스트렙토마이세스 톡시트리시나이(*S. toxytricini*), 스트렙토마이세스 츠쿠벤시스(*S. tsukubaensis*), 스트렙토마이세스 베네즈엘라(*S. venezuelae*), 스트렙토마이세스 비올라세오루버(*S. violaceoruber*) 또는 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*S. coelicolor*)이며, 보다 바람직하게는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*S. hygroscopicus*)이다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 라파마이신 제조 방법을 제공한다:

- [0023] (a) 상기 본 발명의 미생물 균주를 탄소원, 에너지원 및 질소원을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0024] (b) 상기 단계 (a)의 결과물로부터 라파마이신을 회수하는 단계.
- [0025] 본 발명의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)에서 이용되는 배지는 탄소원 및 질소원을 포함하며, 상기 탄소원은 총 배지에 대하여 0.5-40 %(w/v)이고, 상기 질소원은 총 배지에 대하여 0.01-10 %(w/v)일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 방법에서 이용되는 탄소원은 다양한 탄수화물이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 글루코오스, 수크로오스, 프럭토스, 갈락토오스, 아라비노스 및 락토오스이며, 가장 바람직하게는 글루코오스이다. 본 발명의 방법에서 이용되는 질소원은 유기 질소원이 이용되며, 바람직하게는 효모 추출물, 펩톤, 트립톤 및 소이톤이며, 가장 바람직하게는 트립톤 및 소이톤이다.
- [0027] 본 발명의 방법에 있어서, 배양 온도는 바람직하게는 20-35℃이고, 보다 바람직하게는 23-30℃이며, 가장 바람직하게는 28-30℃이다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 미생물 균주를 배양하고 배양액으로부터 라파마이신을 회수한다. 라파마이신은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 회수할 수 있는데, 예를 들어, 배양액에 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 혼합한 후, 원심분리하여 수득한 상등액으로부터 라파마이신을 회수할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 제조방법은 라파마이신 생성능이 매우 우수한 신규한 균주를 이용하며, 상술한 바람직한 배양 조건 및 배지 조성을 따르는 경우에는 라파마이신을 저가로 대량 생산할 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0031] (a) 본 발명의 균주는 *rapY* 유전자 및 *rapS* 유전자로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자가 결실된 것이다.
- [0032] (b) 본 발명의 균주는 종래의 라파마이신 생산 균주와 비교하여 현저하게 증가된 라파마이신 생성능을 나타낸다.
- [0033] (c) 본 발명의 균주를 이용한 라파마이신 제조 방법은 라파마이신의 산업적 대량 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 라파마이신의 구조식을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 pRAPY 및 pRAPS 벡터 맵을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 pΔRAPY 및 pΔRAPS 벡터 맵을 나타낸 그림이다.
- 도 4는 WT/pRAPY 및 WT/pRAPS 균주의 서던 블롯 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 5는 ΔrapY 및 ΔrapS 균주의 유전형의 서던 블롯 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 6은 ΔrapY 및 ΔrapS 균주의 라파마이신 생산성 향상을 보여 주는 HPLC 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0036] 실시예

[0037] 재료 및 방법

[0038] 균주, 플라스미드, 유전자 조작법, 배지 및 사용화합물

[0039] 야생 생산균주인 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 ATCC 29253을 사용하였다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스의 형질전환은 *E. coli* ET12567/pUZ8002을 사용하여 접합(conjugation) 방법으로 실시하였다. Litmus 28 (New England Biolabs), pGEM T easy(Promega) 및 pSET152 벡터는 DNA 클로닝을 위한 서브클로닝에 사용되었으며, 유전자의 삭제를 위하여 대장균-스트렙토마이세스 셔틀 벡터인 pKC1139 벡터(Bierman M, et al. Plasmids cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene 1992.116,4349.)를 사용하였다. 본 발명에서 사용한 균주와 플라스미드를 표 1로 정리하였다. 유전자의 과발현 및 삭제의 여부는 서던 블롯으로 확인하였으며 DIG 라벨링과 검출 키트(Roche)을 이용하였다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스의 포자생성과 유전자 삭제를 위한 배지로 M1(콘 스틱 파우더 2.5%, 효모 추출물 3%, 칼슘 탄산염 3%, 철 황산염 0.3%, 박토 아가 20%, 탄수화물 10%) 고체 배지를 사용하고 라파마이신 생산성 확인을 위하여 TSB(Difco)(티립틱 대두 배지 3%, 0.01% 철 황산염, 1.5% 글루코오스, pH 6) 액체 배지를 이용하여 28℃, 250 rpm 에서 5일간 진탕 배양하였다.

표 1

[0040]

균주/플라스미드	특징 [§]
박테리아 균주	
대장균(<i>Escherichia coli</i>)	
DH5 α	플라스미드 제작 및 일반적인 서브클로닝, F ⁻ <i>recA</i> <i>lacZ</i> ΔM15
ET12567/pUZ8002	플라스미드 pUZ8002(Cm ^r , Tet ^r , Kan ^r)에서 파생된 비-전달성 RP4를 포함하는 비-메틸화 ET12567
스트렙토마이세스	
ATCC29253	야생형 라파마이신 생성 균주
WT/pSET152(P _{ermE} [*])	플라스미드 pSET152(P _{ermE} [*])를 포함하는 야생형 균주
WT/pRAPY	플라스미드 pRAPY(Apr ^r)를 포함하는 야생형 균주
WT/pRAPS	플라스미드 pRAPS(Apr ^r)를 포함하는 야생형 균주
Δ <i>rapY</i>	<i>rapY</i> 가 결실된 ATCC29253의 돌연변이 균주
Δ <i>rapS</i>	<i>rapS</i> 가 결실된 ATCC29253의 돌연변이 균주
Δ <i>rapY</i> /pRAPY	플라스미드 pRAPY(Apr ^r)를 포함하는 Δ <i>rapY</i> 균주
Δ <i>rapS</i> /pRAPS	플라스미드 pRAPS(Apr ^r)를 포함하는 Δ <i>rapS</i> 균주
플라스미드	
pGEM-Teasy	PCR 생성물의 클로닝을 위한 대장균 벡터(Amp ^r)
pSET152(P _{ermE} [*])	P _{ermE} [*] , <i>oriT</i> , <i>attP</i> , Φ <i>C31int</i> 및 <i>aac(3)IV</i> 를 포함하는 통합 플라스미드
pKC1139	<i>oriT</i> 및 <i>aac(3)IV</i> 를 포함하는 유전자 결실용 온도 민감성 대장균-스트렙토마이세스 셔틀벡터
pRAPY	<i>rapY</i> 를 단일 카피 포함하는 pSET152(P _{ermE} [*]) 기반 통합 플라스미드 (Apr ^r)
pRAPS	<i>rapS</i> 를 단일 카피 포함하는 pSET152(P _{ermE} [*]) 기반 통합 플라스미드 (Apr ^r)
pΔRAPY	<i>rapY</i> 의 인-프레임 결실을 유도하는 pKC1139 기반 플라스미드
pΔRAPS	<i>rapS</i> 의 인-프레임 결실을 유도하는 pKC1139 기반 플라스미드

[0041] [§]F-는 F 플라스미드를 갖고 있지 않음; *recA*1는 DNA 클론 내에서 원하지 않는 재조합의 발생을 감소시킴; *lacZ* ΔM15는 β-갈락토시다제 유전자의 α-상보성(α-complementation)을 허용하는 *lacZ* 유전자를 일부 결실시킴; Cm^r은 클로람페니콜 저항성임; Tet^r은 테트라사이클린 저항성임; Kan^r은 카나마이신 저항성임; Apr^r은 아프라마이신 저항성임; Amp^r은 엠페실린 저항성임; *oriV*는 복제 원점임; *oriT*는 이동(transfer) 원점임; *attP*는 플라스미드 Φ*31* 부착 부위임; Φ*31 int*는인테그레이즈유전자임; *aac(3)IV*는 아프라마이신 저항성 유전자임; P_{ermE}^{*}는 돌연변이된 구성성 프로모터(constitutive promoter)임.

[0042]

[0043] 유전자 과발현 및 삭제

[0044] RapY, RapS의 과발현을 위하여 rapY, rapS 유전자를 *ermE** 프로모터가 있는 pSET152 벡터(Bierman, M., et al. Gene 116:43-49)에 PacI 및 XbaI 제한효소(New England bio.)를 이용하여 클로닝하였다. RapY_OE_F/RapY_OE_R, RapS_OE_F/RapS_OE_R 프라이머 쌍을 디자인하여 rapY 및 rapS의 PCR 절편을 각각 증폭하였다. PCR 증폭을 위한 모든 프라이머는 그들의 RBS(ribosomal binding site)를 포함하도록 디자인하였다. 유전자의 PCR 프라이머는 표 2에 나타내었다.

[0045] pSET152에 클로닝된 pRAPY 및 pRAPS 벡터(도 2)를 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스로 도입하기 위하여 형질전환된 *E.coli*를 30℃에서 2xTY(트립톤 16 g/L, 효모 추출물 10 g/L, NaCl 5 g/L) 액체 배지를 이용하여 배양하였다. 다음날 1 ml의 배양액을 25 ml의 2xTY에 옮기고, 37℃에서 광학 밀도(optical density)가 0.25-0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양액의 세포는 2xTY로 두 번 세척하고, 0.5ml의 2xTY로 농축하였다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 포자액 200 μ l를 원심분리하고 500 μ l 2xTY에 녹인 후 50℃에서 10분 동안 열충격을 가했다. 500 μ l의 *E.coli* 농축액과 500 μ l의 균사액을 서로 혼합한 후 M1 배지에 도포하고 28℃에서 24시간 동안 배양한 후 1 mg의 날리딕신산(nalidixic acid)과 1 mg의 아프라마이신(aprmycin)을 도말하여 3-7일 후 확인하여 pRAPY와 pRAPS가 과발현된 균주를 제작하였다.

[0046] 대장균-스트렙토마이세스 서틀 벡터인 pKC1139는 유전자 결실을 위해 사용하였다. rapY와 rapS의 삭제를 위하여 유전자의 왼쪽(LA) 및 오른쪽 측면(RA) 절편을 PCR 증폭하여 벡터를 제작하였다. RapY_LA_F/RapY_LA_R 프라이머쌍을 이용하여 타겟 유전자의 왼쪽 측면을 PCR 증폭하였고, RapY_RA_F/RapY_RA_R 프라이머쌍을 이용하여 타겟 유전자의 오른쪽 측면을 PCR 증폭하였다. 각각의 증폭된 rapY_LA와 rapY_RA 절편을 최종 pKC1139 벡터에 클로닝하여 p Δ RAPY를 제작하였으며, 마찬가지로 방법으로 p Δ RAPS 플라스미드를 제작하였다(도 3). 상기에 언급된 바와 같이, 이들 플라스미드는 그 후 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스로 도입하였다. 플라스미드가 도입된 균주를 아프라마이신이 첨가된 고체배지에서 7-10일간 37℃에서 배양하였다. 이 과정을 3번 반복하여 계대배양하였다. 아프라마이신 저항성을 갖는 균주를 선별하여 서던 블롯을 진행하여 단일 교차(single cross-over)를 확인한다. 단일 교차가 확인된 균주를 아프라마이신이 없는 고체배지에서 배양하며 이때의 온도는 2번의 배양은 37℃에서 7-10일간 진행하였고, 마지막 배양은 28℃에서 7-10일간 배양하였다. 마지막 배양한 균주를 아프라마이신이 있는 고체배지와 없는 고체배지에서 배양하여 아프라마이신이 없는 고체배지에서만 자라는 균주를 선별하고, rapY, rapS가 삭제된 이중 교차 돌연변이인 Δ rapY 및 Δ rapS 균주를 PCR로 확인 후, 서던 블롯 분석으로 최종적으로 확인하였다.

표 2

[0047]

프라이머명	서열(5' → 3')	제한효소	설명
rapY_OE_F	TTAATTAACTAGTCACCGTTCCGCCTTACCTTCGAAG	pacI-SpeI	rapY에 대한 정방향 프라이머
rapY_OE_R	TCTAGAGGTCAGCGGACGCCGCTC	XbaI	rapY에 대한 역방향 프라이머
rapS_OE_F	TTAATTAACTAGTCGGCTGCGCGGCAAACTC	pacI-SpeI	rapS에 대한 정방향 프라이머
rapS_OE_R	TCTAGACTTCAACGGCGGCAAGGGAAG	XbaI	rapS에 대한 역방향 프라이머
rapY_LA_F	AAGCTTTAC AGC ACG CAC GCG GCT ACG	HindIII	rapY-LA에 대한 정방향 프라이머
rapY_LA_R	TCTAGACGA CAT CCG CGC GTA CCC GG	XbaI	rapY-LA에 대한 역방향 프라이머
rapY_RA_F	TCTAGAATC CGC GGC AAG GTC ACC GAC A	XbaI	rapY-RA에 대한 정방향 프라이머
rapY_RA_R	GAATTCGCT CTC CCT CGC CAG CGG TCT	EcoRI	rapY-RA에 대한 역방향 프라이머
rapS_LA_F	AAGCTTGAC CTG CTC GCA CCG TGC C	HindIII	rapS-LA에 대한 정방향 프라이머
rapS_LA_R	TCTAGATGT GAG ATT CGG CCG GGT GGG	XbaI	rapS-LA에 대한 역방향 프라이머

rapS_RA_F	TCTAGACGC AAT GCC ATC CAG TAC AAC CAC CC	XbaI	rapS-RA에 대한 정방향 프라이머
rapS_RA_R	GAATTCGCG GGT CGC AAC ACG GTG G	EcoRI	rapS-RA에 대한 역방향 프라이머

[0048]

[0049] **라파마이신의 생산성 확인 및 분석**

[0050] 액체 배지를 통한 라파마이신의 생산량 확인에는 5 ml TSB 생산배지에서 28℃, 250 rpm 조건으로 3일 동안 진탕 배양한 것을 0.2794 g/ml로 농도를 맞추고 여기서 10 μl을 새로운 5 ml TSB 생산배지에 접종하여 250 rpm, 28℃ 조건으로 5일 동안 진탕 배양하였다. pRAPY와 pRAPS가 삽입된 형질전환체의 경우는 항생제인 아프라마이신(Sigma-Aldrich)을 0.5 mg/ml이 포함된 TSB 생산배지를 사용하였고 야생 생산균주의 생산에는 항생제가 이용되지 않았다.

[0051] 라파마이신 추출에는 배지와 동량의 에틸 아세테이트(ethyl-acetate)(JT.Baker)를 넣어 2분간 혼합한 후 상온에서 10분 동안 원심분리하였다. 에틸아세테이트 상등액 1 ml을 마이크로센트리퓨즈 튜브에 담아서 증류하여 건조시켰다. 잔유물은 0.1 ml의 메탄올(methanol)에 녹였다. 라파마이신 화합물의 양은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 통하여 정량 분석하였다. 흡수 파장은 277nm 였고, 10 μl의 추출액은 C18 컬럼(4.6mm X 250mm Watchers 120 OPS-BP 5m, DAISO)에 도입하여 분석하였다. 분석 조건은 0-14분 동안은 메탄올 75%, H₂O 25% 이며, 15-30분 까지는 메탄올 100%였다.

[0052]

[0053] **실험결과**

[0054] *rapY*, *rapS* 유전자의 과발현

[0055] *rapY* 및 *rapS* 유전자의 기능을 규명하기 위하여 과발현을 하였다. 이때 유전자의 복수 카피의 존재에 의한 예상되지 않은 효과를 피하기 위해, 통합 발현 플라스미드로 pSET152 벡터를 기초로 하여 클로닝한 pRAPY 및 pRAPS를 각각 야생 생산균주인 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스로 도입하였다. 과발현된 균주의 확인은 P_{ermE}*를 프로브로 서던 블롯을 이용하여 최종 확인하였다(도 4). 대조군으로는 pSET152(P_{ermE}*)벡터를 형질전환하였으며, TSB 액체배지에서 배양하였을 때 야생 생산균주와 비교하여 라파마이신의 생산성에는 차이가 없음을 확인하였다. 표 3에 나타난 것처럼 WT/pRAPY균주의 라파마이신의 생산성은 진탕배양 5일 후 야생 생산균주보다 현저하게 감소함을 확인하였다. 마찬가지로 WT/pRAPS 균주에서도 라파마이신의 생산성이 약 2.1 mg/L로 야생 생산균주보다 약 3배 가량 감소한 것을 확인하였다. 이를 통하여 *rapY* 및 *rapS* 유전자가 라파마이신의 생합성에 음성 조절 유전자로서의 역할을 함을 알 수 있다.

표 3

[0056]

균주	라파마이신 생산성(mg/L)
야생형 생산균주(WT)	7.3 ± 0.46
WT/pRAPY	2.4 ± 0.21
WT/pRAPS	2.1 ± 0.14
Δ <i>rapY</i>	22.1 ± 0.04
Δ <i>rapS</i>	26.5 ± 0.16

[0057]

[0058] **인-프레임 결실 방법을 통한 *rapY* 및 *rapS* 유전자의 삭제**

[0059] *rapY* 및 *rapS* 유전자의 조절기능을 규명하기 위하여 다른 생합성 유전자가 영향을 받는 것을 막기 위하여 인-프레임 결실 방법을 이용하여 *rapY* 또는 *rapS* 유전자를 삭제하였다. 유전자가 결실된 Δ*rapY*와 Δ*rapS* 균주는 서던 블롯으로 최종 확인하였다(도 5). Δ*rapY*와 Δ*rapS* 균주의 포자생성과 생산량 확인을 위하여 M1 고체배

지 및 TSB 액체배지에서 배양하였을 때 야생 생산균주와 비교하여 형태학적 성질에서 어떠한 변화도 보이지 않음을 확인하였다. $\Delta rapY$ 균주는 5일 동안 진탕배양 하였을 때 야생 생산균주보다 약 3.1배 라파마이신의 생산성이 증가하였으며, $\Delta rapS$ 유전자의 경우는 최종 26.5 mg/L 로 약 3.7배 라파마이신의 생산성이 야생 생산균주보다 향상된 것을 확인하였다(표 3). 이는 HPLC를 이용하여 확인하였으며 크로마토그램은 도 6과 같다. 이들 결과는 *rapY* 및 *rapS* 유전자가 라파마이신의 생합성에 음성조절 유전자의 역할을 함을 증명한다.

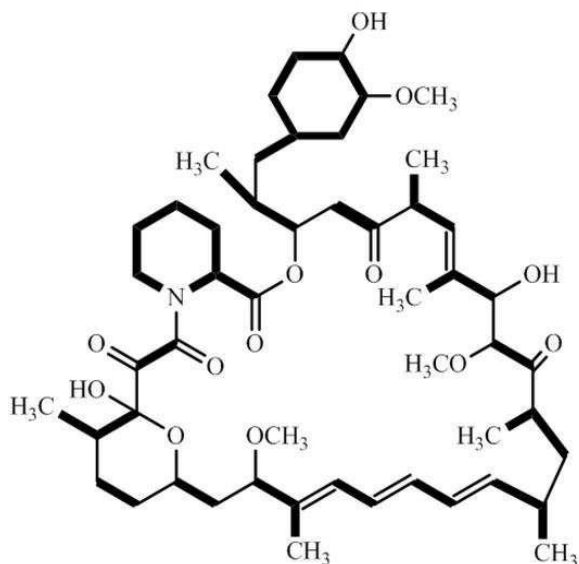
[0060] *rapY* 및 *rapS* 유전자의 삭제가 직접적으로 라파마이신의 생산성에 영향을 미치는지의 확인을 위하여 $\Delta rapY$ 균주에서 플라스미드-기반 상보성 실험을 진행하였다. pSET152(*Perme**) 벡터를 사용하여 원래의 RBS를 포함하는 *rapY* 유전자를 재도입하였다. HPLC 분석을 통해 라파마이신의 생산성이 pRAPY를 포함하는 $\Delta rapY$ 균주에서 야생 생산균주에서 관찰되는 것과 비교할 만큼의 수준으로 라파마이신의 생산성이 복구됨을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여 *rapY* 유전자가 결여된 $\Delta rapY$ 균주에서 라파마이신의 생산성이 향상된 원인으로 오직 *rapY* 유전자의 불활성화라고 말할 수 있으며 *rapY* 유전자는 음성조절 유전자임을 증명한다. 마찬가지로 *rapS* 유전자에서 같은 실험을 하였으며 *rapY*와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이를 통하여 *rapS* 또한, 오직 *rapS* 유전자의 불활성화로 인하여 라파마이신의 생산성이 향상 되었으며, 음성 조절 유전자로서의 역할을 함을 확인하였다.

[0061] 본 발명의 결과로 라파마이신의 생합성 음성 조절 유전자의 기능을 규명하였으며, 이를 통하여 라파마이신의 생산성이 3.1배, 3.7배로 각각 향상된 균주를 제작하였다. 이미 밝혀져 있는 양성 조절 유전자와의 조합 생합성 발현을 통하여 라파마이신 생산성이 더욱 향상된 균주를 제작할 수 있는 전기를 마련하였으며, 이는 산업적으로 유용한 균주의 후보물질 발굴에 한 층 더 다가설 수 있게 하였다.

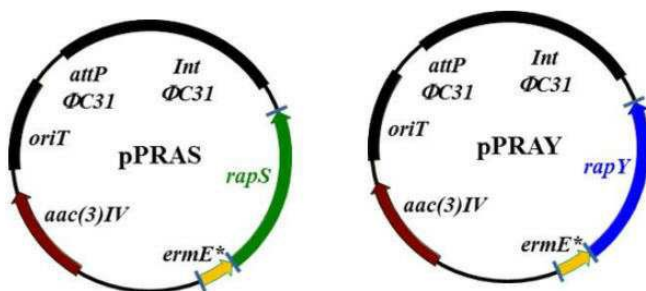
[0062] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

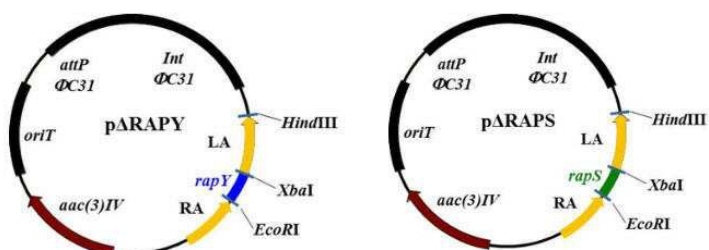
도면1



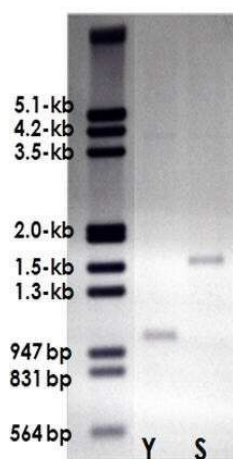
도면2



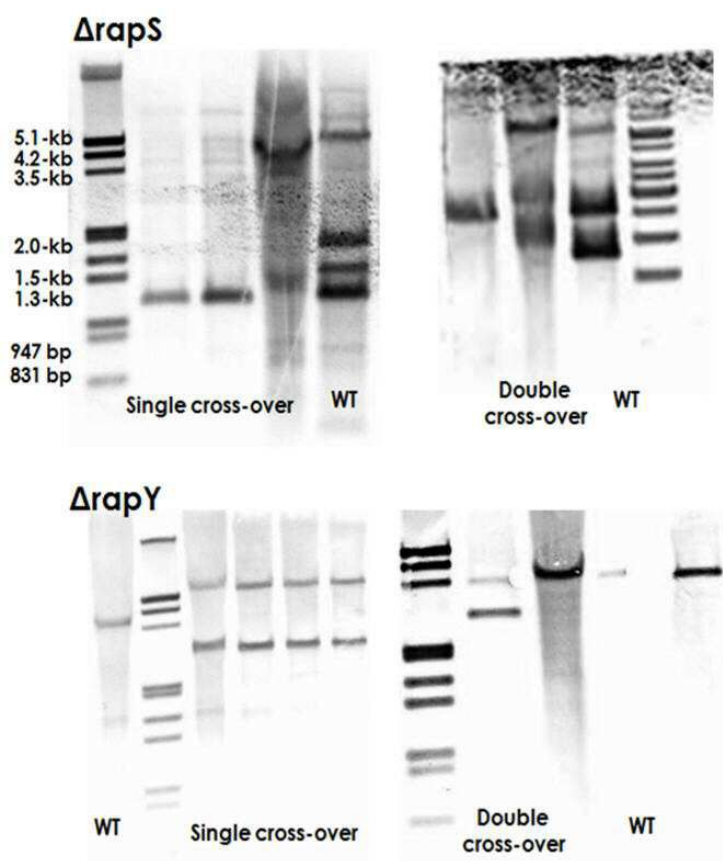
도면3



도면4



도면5



도면6

