(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0024049
(43) 공개일자 2015년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/76 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0100997
(22) 출원일자 2013년08월26일
심사청구일자 2013년08월26일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤여준
서울 강남구 압구정로 151, 126동 202호 (압구정동, 현대아파트)
유영지
서울 서대문구 독립문로 10, 105동 306호 (영천동, 삼호아파트)
(74) 대리인
안소영

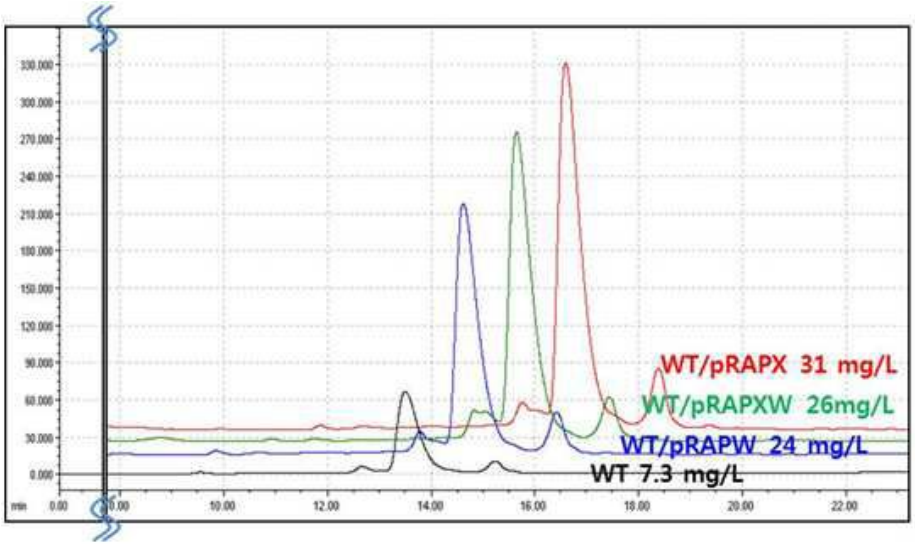
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **ｒａｐＸ 또는 ｒａｐＷ를 과발현하는 방선균주 및 이를 이용한 라파마이신 생산성 증대방법**

(57) 요 약

본 발명은 rapX 또는 rapW를 과발현하는 방선균주 및 이를 이용한 라파마이신 생산성 증대방법에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환 방선균주는 야생형 방선균주보다 동일한 조건에서 많은 양의 라파마이신을 생산할 수 있다. 따라서 본 발명은 면역억제제로서 널리 사용되는 라파마이신을 낮은 제조비용으로 대량 생산하는 데 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 서울R&BD프로그램 ST110024
부처명 서울산업통상진흥원
연구관리전문기관 서울시정개발연구원
연구사업명 신기술개발지원사업-서울형산업 기술개발 지원사업
연구과제명 Polyketide면역억제제의생합성조절기작규명을통한생산성향상
기 여 율 1/2
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2011.08.01 ~ 2013.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415129686
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 지식경제기술혁신사업-글로벌전문기술개발사업-우수기술연구센터(ATC)
연구과제명 오믹스기술을이용한면역억제제라파마이신의개발
기 여 율 1/2
주관기관 종근당바이오(주)안산공장
연구기간 2010.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

프로모터, 선별 마커 및 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자를 포함하는 rapX 재조합 발현벡터.

청구항 2

프로모터, 선별 마커 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 포함하는 rapW 재조합 발현벡터.

청구항 3

프로모터, 선별 마커, 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 포함하는 rapX 및 rapW 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 1항의 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주.

청구항 5

제 2항의 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주.

청구항 6

제 3항의 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주.

청구항 7

제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방선균주는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 ATCC29253 (*Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253)인 방선균주.

청구항 8

1) 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 재조합 발현벡터를 숙주 방선균주에 도입하여 형질 전환된 방선균주를 제조하는 단계;

2) 상기 1)단계에서 제조된 형질전환된 방선균주를 배양하는 단계; 및

3) 상기 2)단계의 배양액으로부터 라파마이신을 정제하는 단계를 포함하는, 라파마이신의 대량 생산 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 방선균주는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 ATCC29253 (*Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253)인, 라파마이신의 대량 생산 방법.

청구항 10

1) 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자를 플라스미드 벡터에 도입하여 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 1)단계에서 제조된 재조합 발현벡터를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 형질전환된 대장균주를 생산하는 단계; 및

3) 상기 2)단계에서 생산된 형질전환된 대장균주를 방선균주의 균사액과 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환된 방선균주의 제조방법.

청구항 11

1) 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 플라스미드 벡터에 도입하여 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 1)단계에서 제조된 재조합 발현벡터를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 형질전환된 대장균주를 생산하는 단계; 및

3) 상기 2)단계에서 생산된 형질전환된 대장균주를 방선균주의 균사액과 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환된 방선균주의 제조방법.

청구항 12

1) 프로모터, 선별 마커, 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 플라스미드 벡터에 도입하여 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 1)단계에서 제조된 재조합 발현벡터를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 형질전환된 대장균주를 생산하는 단계; 및

3) 상기 2)단계에서 생산된 형질전환된 대장균주를 방선균주의 균사액과 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환된 방선균주의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 rapX 또는 rapW를 과발현하는 방선균주 및 이를 이용한 라파마이신 생산성 증대방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 라파마이신 (Rapamycin)은 방선균에 속하는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 ATCC29253 (*Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253)에서 생합성된다. 방선균은 외부의 환경변화에 대응하거나, 자가독성을 피하기 위해서, 또는 외부의 적과 싸우기 위해서 이러한 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 라파마이신은 마크로사이클릭 폴리케타이드 계열에 속하며, 항진균 (antifugal), 항암 (anticancer), 면역억제 (immunosuppressant) 등의 생리활성을 가지고 있다. 특히 면역억제 기능이 우수하여 자가면역 질환 치료 및 장기 이식 후 면역거부반응 억제를 위하여 사용된다. 최근에는 세포의 노화를 방지하는 데에도 관여하는 것으로 보고된 바 있다.

[0003] 라파마이신의 생산성을 향상시키기 위한 방법으로서, *S. hygroscopicus* 균주를 개량 또는 돌연변이화하거나, 배양 배지 등 배양 조건을 최적화시켜 생산성을 높이거나, 라파마이신 생산을 위한 전구체를 배양시에 *S. hygroscopicus*에 공급하는 방법 등이 보고된 바 있다 (Park et al. 2012. J Antibiot (Tokyo) 63(8):434-441). 그러나 현재까지 보고된 방법들은 생산성 증대 효과가 미미하거나 방법이 너무 까다로워 경제성이 떨어지는 등의 단점이 있어 널리 상용화되지 못하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 rapX 및/또는 rapW 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주 및 그 제조 방법, 및 상기 방선균주를 이용하여 라파마이신을 대량 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자를 포함하는 rapX 재조합 발현벡터 및 상기 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주를 제공한다.

[0006] 본 발명은 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 포함하는 rapW 재조합 발현벡터 및 상기 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주를 제공한다.

[0007] 본 발명은 프로모터, 선별 마커, 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 포함하는 rapX 및 rapW 재조합 발현벡터 및 상기 벡터를 도입한 라파마이신 생산성이 향상된 방선균주를 제공한다.

[0008] 상기 rapX 유전자는 *S. hygroscopicus* ATCC29253의 라파마이신 생합성 유전자 집단의 upstream에 있는 유전자에 해당한다. rapX의 기능은 ABC transporter인 것으로 규명되었다. ABC transporter는 ATP-결합 카세트를 보

존부위 (conserved region)에 포함하고 있고 ATP를 소모하며 세포 내부에서 외부로 독성물질을 내보내는 기능을 수행하는 단백질에 해당한다 (Ikeno. 2000. Antibiot (Tokyo) 53(4):373-384).

[0009] 상기 rapW 유전자도 *S. hygroscopicus* ATCC29253의 라파마이신 생합성 유전자 집단의 upstream에 있는 유전자에 해당한다. 본 발명자들은 상기 rapW 유전자가 ABC-transporter permease protein을 코딩하는 유전자임을 최초로 규명하였다.

[0010] 종래에 라파마이신 생합성 유전자 집단에 속하는 유전자의 발현을 조절하여 라파마이신 생산성을 조절하는 것에 대해서는 연구된 바 있으나, 그 밖의 유전자를 라파마이신 생산성 조절에 이용하는 연구는 수행된 바 없다.

[0011] 상기 벡터는 플라스미드 벡터일 수 있고, pIJ41계열, pIJ702계열, pIJ922계열 및 KC400계열 벡터일 수 있다. 예를 들면 상기 벡터는 pSET152 벡터가 될 수 있다. 그러나 벡터의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0012] 상기 프로모터는 유전자 고유의 Native promoter를 이용 할 수 있다. 또한 상기 프로모터는 *ermE** 프로모터가 될 수 있다. 그러나 프로모터의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0013] 상기 선별 마커는 항생제 저항성 마커일 수 있으며, 예를 들어 클로람페니콜 저항성 마커, 테트라사이클린 저항성 마커, 카나마이신 저항성 마커, 아프라마이신 저항성 마커, 암피실린 저항성 마커, 티오스트렙톤 저항성 마커가 될 수 있다. 예를 들면 상기 선별 마커는 아프라마이신 저항성 마커가 될 수 있다. 그러나 선별 마커의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0014] 상기 방선균주는 라파마이신을 생산할 수 있는 방선균주이며, 일 예로 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 ATCC29253(*Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253)가 될 수 있다. *S. hygroscopicus* ATCC29253은 라파마이신을 생산하는 균주로서 널리 이용되어 왔으며, 세계적인 세포 기탁 기관인 ATCC로부터 일반인에게 제약 없이 분양될 수 있는 균주에 해당한다. 당업자는 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 재조합 벡터를 제작할 수 있고, 이를 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 *S. hygroscopicus* ATCC29253 등에 도입하면, 본 발명의 형질전환된 방선균주를 용이하게 제조할 수 있다.

[0015] 본 발명은 1) 상기 재조합 발현벡터를 숙주 방선균주에 도입하여 형질 전환 균주를 제조하는 단계;

[0016] 2) 상기 1)단계에서 제조된 형질전환 균주를 배양하는 단계; 및

[0017] 3) 상기 2)단계의 배양액으로부터 라파마이신을 정제하는 단계를 포함하는, 라파마이신의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0018] 상기 방법에서 1)단계는 재조합 발현벡터를 대장균주에 도입하여 형질전환시킨 후 상기 대장균주로부터 숙주 방선균주로 접합 전달(conjugation)이 일어나 재조합 발현벡터가 방선균주로 도입되도록 하는 방법으로 수행되었다. 그러나 방선균주의 형질전환 방법은 이에 제한되지 않는다.

[0019] 상기 2)단계에서 사용할 수 있는 배지에는 TSB 배지, M1 배지 (0.25% corn steep solid, 0.3% yeast extract, 0.3g calcium carbonate, 0.03% iron sulfate, 2.0% bacto agar, 1.0% wheat starch), RapV7 배지 (0.5% Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd), 3.5% Avedex W80 dextrin (Deymer Ingredients Ltd), 0.4% Corn Steep Solids(Sigma), 0.1% Glucose, 0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 1.6 ml Lactic acid (80%), 0.7% $CaCO_3$(Caltec), pH 7.5), MD6 배지(3% Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd), 3% Corn starch (Sigma), 1.9% Avedex W80 dextrin (Deymer Ingredients Ltd), 0.3% Yeast (Allinson), 0.1% Corn Steep Solids (Sigma), 0.25% KH_2PO_4, 0.25% K_2HPO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.5% NaCl, 0.1% $CaCO_3$ (Caltec), 0.001% $MnCl_2.4H_2O$, 0.00025% $MgSO_4JH_2O$, 0.012% $FeSO_4JH2O$, 0.005% $ZnSO_4JH2O$, 2.12% MES (2-morpholinoethane sulphuric acid monohydrate) pH 6.0)이 있다 (Gregory et al., PCT International Application, WO 04/007709). 일 예로 상기 배지는 TSB 배지가 될 수 있다. 그러나 사용할 수 있는 배지의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명은 1) 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자를 플라스미드 벡터에 도입하여 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0021] 2) 상기 1)단계에서 제조된 재조합 발현 벡터를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 형질전환된 대장균주를 생산하는 단계; 및

[0022] 3) 상기 2)단계에서 생산된 형질전환된 대장균주를 방선균주의 균사액과 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환된 방선균주의 제조방법을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 1) 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 플라스미드 벡터에 도입하여 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0024] 2) 상기 1)단계에서 제조된 재조합 발현 벡터를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 형질전환된 대장균주를 생산하는 단계; 및

[0025] 3) 상기 2)단계에서 생산된 형질전환된 대장균주를 방선균주의 균사액과 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환된 방선균주의 제조방법을 제공한다.

[0026] 또한 본 발명은 1) 프로모터, 선별 마커, 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 플라스미드 벡터에 도입하여 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0027] 2) 상기 1)단계에서 제조된 재조합 발현벡터를 대장균 (*Escherichia coli*)에 도입하여 형질전환된 대장균주를 생산하는 단계; 및

[0028] 3) 상기 2)단계에서 생산된 형질전환된 대장균주를 방선균주의 균사액과 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환된 방선균주의 제조방법을 제공한다.

[0029] 상기 1)단계는 rapX 유전자 및 rapW 유전자를 한번에 PCR로 증폭한 후 이를 플라스미드 벡터에 도입하는 방법으로 수행될 수 있다. rapX 유전자 및 rapW 유전자는 서로 인접한 유전자이므로 이와 같은 방법으로 재조합 발현벡터를 제조하는 것이 가능하다.

[0030] 또한 상기 1)단계는 rapX 유전자 및 rapW 유전자를 각각 PCR로 증폭하여 각각을 플라스미드 벡터에 도입하는 방법으로 수행될 수 있다.

[0031] 또한 상기 1)단계는 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 1로 기재되는 rapX 유전자를 플라스미드 벡터에 도입한 재조합 발현벡터 및 프로모터, 선별 마커 및 서열번호 2로 기재되는 rapW 유전자를 플라스미드 벡터에 도입한 재조합 발현벡터를 각각 제조한 후, 어느 하나의 재조합 발현벡터로부터 rapX 유전자 또는 rapW 유전자를 절단하여 다른 하나의 재조합 발현벡터에 도입하는 방법으로 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 형질전환 방선균주는 야생형 방선균주보다 동일한 조건에서 많은 양의 라파마이신을 생산할 수 있다. 따라서 본 발명은 면역억제제로서 널리 사용되는 라파마이신을 낮은 제조비용으로 대량 생산하는 데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 rapX와 rapW의 염기 서열을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 의해 생산되는 라파마이신의 구조를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 재조합 벡터인 pRAPX, pRAPW, pRAPXW의 모식도이다.

도 4는 야생형 방선균주(Wile Type, WT, 대조군), pRAPX 벡터로 형질전환된 방선균주 (WT/pRAPX), pRAPW 벡터로 형질전환된 방선균주 (WT/pRAPW), 및 pRAPXW 벡터로 형질전환된 방선균주 (WT/pRAPXW)의 유전형의 확인을 위한 Southern blot hybridization을 나타낸 도이다.

도 5는 WT, WT/pRAPX, WT/pRAPW, 및 WT/pRAPXW의 라파마이신의 생산성을 비교한 HPLC 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 Sigma Aldrich®로부터 구입한 것이다.

[0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0036] **<제조예> 형질전환된 *S. hygroscopicus* 균주의 제조**

[0037] **(1) rapX 및 rapW 유전자의 증폭**

[0038] rapX 및 rapW 유전자의 염기서열에 대해서는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재하였으며, 서열 목록 및 도

1에 나타내었다. 염기서열 분석을 통하여, 라파마이신 생합성 유전자 집단의 upstream에 있는 rapX와 rapW가 각각 ABC-transporter와 ABC-transporter permease protein을 코딩하는 유전자일 것으로 예측하였다.

[0039] 하기 표 1과 같이 rapX 및 rapW에 대한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍 (RapX_OE_F/RapX_OE_R, RapW_OE_F/RapW_OE_R, OE는 Over expression의 약자)을 제작하였다. 프라이머는 유전자 고유의 RBS (ribosomal binding site)를 포함하도록 디자인하였다. 밑줄친 부분은 클로닝에 사용한 제한효소인 *PacI*, *XbaI* 및 *SpeI* 제한효소(New England biolab)의 염기서열에 해당한다.

[0040] [표 1]

[0041]

종류	서열번호	서열
RapX_F	3	5'- TTAATTAAACTAGTCCGACCCCATCGACAAGATC-3'
RapX_R	4	5'- TCTAGAGCGACGATGAGTATCTGGAGAC-3'
RapW_F	5	5'- TTAATTAATGTGCCCGATGCCGAGAT-3'
RapW_R	6	5'-TCTAGAGAGTAGGTGTGGCTGACGC-3'

[0042] 상기 프라이머를 이용하여 rapX 및 rapW 유전자를 PCR로 증폭하였다.

[0043] **(2) 재조합 벡터의 제조**

[0044] PCR 후 증폭된 유전자 절편을 pGEM T easy (Promega)벡터에 클로닝한 재조합 벡터로 *E. coli* DH5α 균주(ATCC에서 분양받음)를 형질전환시킨 후, 이로부터 rapX 및 rapW 유전자의 염기 서열을 확인하였다. 상기 과정을 통해 rapX 및 rapW 유전자가 PCR에서 성공적으로 증폭되었음을 확인한 후, 증폭된 rapX 및 rapW 유전자를 각각 *PacI* 및 *XbaI* 제한효소 (New England bio.)를 이용하여 pSET152(*ermE**) 벡터에 클로닝함으로써 (Plasmids cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. (Bierman, M., et al., Gene 116:43-49 참조) 재조합 발현벡터인 pRAPX 및 pRAPW를 제조하였다. 통합 발현 플라스미드로 pSET152벡터에 *ermE** 프로모터가 클로닝된 pSET152(*ermE**) 벡터를 사용한 것은 유전자의 복수 카피의 존재에 의해 예상치 못한 효과가 나타나는 것을 피하기 위한 것이다.

[0045] 제한 효소인 XbaI으로 절단된 부위는 제한효소인 *SpeI*으로 절단된 부위와 결합이 가능하다. 따라서, pRAPX에 *PacI*, *SpeI* 제한효소 접합부위가 있으므로 pRAPX를 *PacI* 및 *SpeI* 제한효소로 잘라 rapW가 접합될 자리를 만들고, pRAPW로부터 rapW를 *PacI* 및 *XbaI* 제한효소로 잘라 분리하여 상기 제한효소로 처리된 pRAPX에 접합함으로써 pRAPXW를 제조하였다.

[0046] 제작된 pRAPX, pRAPW 및 pRAPXW의 모식도는 도 3에 나타내었다.

[0047] **(3) *E. coli*의 형질전환**

[0048] 상기에서 제작한 pRAPX, pRAPW 및 pRAPXW 벡터를 사용하여 *E. coli*인 ET12567/pUZ8002를 각각 형질전환하였다. 시판중인 ET12567/pUZ8002 균주를 분양받아 세포벽에 구멍이 다수 생성되도록 처리하여 형질전환이 용이하게 이루어질 수 있도록 준비하였다. (2)에서 제조한 pRAPX, pRAPW 및 pRAPXW를 각각 상기에서 준비한 ET12567/pUZ8002 균주와 함께 얼음에서 30분 동안 정치시켰다. 그리고 나서 42℃ water bath 에서 1분 30초 동안 두어 형질전환을 유도하였다 (MacNeil DJ, et al. 1992. Analysis of Streptomyces avermitilis genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene 111:61-68 참조).

[0049] 형질전환된 ET12567/pUZ8002를 30℃에서 2xTY 액체배지 (triptone 16 g/l, yeast extract 10 g/l, NaCl 5 g/l)에서 배양하였다. 2xTY 액체배지에는 클로람페니콜과 카나마이신을 첨가하여 ET12567/pUZ8002이 아닌 세포를 배제하였고, 아프라마이신을 첨가하여 형질전환되지 않은 ET12567/pUZ8002를 배제하였다. 또한 배양한지 1일 경과 후 1 ㎖의 배양액을 25 ㎖의 2xTY 액체배지에 옮기고, 37℃에서 광학 밀도 (optical density)가 0.25-0.6이 될 때까지 배양하였다. 그 후 배양액으로부터 세포만을 회수하고, 첨가했던 항생제 선별 마커를 세척하기 위하여 2xTY 액체배지를 넣고 혼합한 후 원심분리하여 상층액을 버리는 과정을 2회 수행한 후, 침전물을 0.5 ㎖의 2xTY 액체배지에 희석하였다.

[0050] **(4) 형질전환된 *E. coli*를 이용한 *S. hygroscopicus* ATCC29253의 형질전환**

[0051] 라파마이신의 야생 생산균주인 *S. hygroscopicus* ATCC29253을 사용하였다. *S. hygroscopicus* ATCC29253은 ATCC로부터 분양받았다. *S. hygroscopicus*의 형질전환은 상기 (3)에서 제조한 형질전환된 ET12567/pUZ8002을 사용하여 하기와 같이 접합전달 (conjugation) 방법으로 하였다 (MacNeil DJ, et al. 1992. Analysis of

Streptomyces avermitilis genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene 111:61-68 참조).

[0052] *S. hygroscopicus* ATCC29253을 고체배지에서 포자가 생성될 때까지 약 10일 이상을 배양한 후, 멸균한 삼차증류수를 배양한 고체배지위에 넣고 균사와 포자를 한꺼번에 루프를 이용하여 분리하고, 이를 cotton filter로 여과하여 포자액을 수득하였다. 상기 포자액 60㎕를 500 ㎕ 2xTY 에 녹인 후, 50℃에서 10분 동안 열충격을 가하여 포자가 발아(germination)하도록 하였다.

[0053] 상기 (3)에서 제조한 형질전환된 ET12567/pUZ8002의 농축액 500 ㎕와 상기 *S. hygroscopicus* ATCC29253의 발아된 포자를 포함하는 용액 500 ㎕를 서로 혼합한 후 M1 고체배지 (Con steep powder 2.5%, Yeast extract 3%, Calcium carbonate 3%, Iron sulphate 0.3%, Bacto agar 20%, Wheat starch 10%)에 도포하고, 28℃에서 24시간 동안 배양하여 형질전환된 ET12567/pUZ8002로부터 *S. hygroscopicus* ATCC29253로 pRAPX, pRAPW 및 pRAPXW이 각각 접합전달되도록 하였다. M1 고체배지에는 1 mg의 날리딕신산 (nalidixic acid)과 1 mg의 아프라마이신을 도말하였다. 날리딕신산은 그람음성균인 *E. coli*의 성장을 억제하기 때문에 ET12567/pUZ8002의 성장은 억제되고, 그람양성균인 *S. hygroscopicus* ATCC29253만이 성장할 수 있다. 또한 아프라마이신을 도말했기 때문에 형질전환되지 않은 *S. hygroscopicus* ATCC29253은 배제되었다. 이와 같이 3~7일 동안 배양하여 *rapX*, *rapW* 그리고, *rapX-rapW*가 과발현된 *S. hygroscopicus* ATCC29253균주를 제작하였다.

[0054] 형질전환된 *S. hygroscopicus* ATCC29253는 각각 WT/pRAPX, WT/pRAPW, WT/pRAPXW로 명명하였다.

[0055] **(5) 형질전환된 균주의 확인**

[0056] pSET152(*ermE**) 벡터를 사용해서 재조합 벡터를 제조하였으므로, 삽입된 유전자의 앞쪽에 *ermE**가 존재하게 된다. 따라서 상기에서 제작된 균주가 형질전환되었는지 여부를 확인하기 위해 P*ermE**를 probe로 이용하여 하기의 방법으로 확인하였다. 먼저 제한효소를 사용하여 유전자를 *ermE**와 각 삽입 유전자를 포함하는 단편으로 절단하고, 전기영동을 수행하고, 이를 나일론 막에 옮긴 후 *ermE**에 대한 프로브를 사용하여 각 삽입유전자가 성공적으로 균주 세포 내로 도입되었는지 Southern blot 방법으로 최종 확인하였다 (도 4). Lane 1은 wild-type. Lane 2는 WT/pRAPW, Lane 3은 WT/pRAPX, Lane 4-7, pRAPXW를 나타낸다.

[0057] 또한 육안으로 관찰했을 때 M1 배지 플레이트 상에서 형질전환된 균주가 포자 생성과 성장에 있어서 야생생산균주와 다른 점이 없음을 확인하였다.

[0058] **(6) 대조군의 제작**

[0059] 형질전환된 *S. hygroscopicus* ATCC29253 균주의 대조군으로, pSET152(P*ermE**) 벡터를 *S. hygroscopicus* ATCC29253에 도입하여 형질전환시킨 균주를 제작하였다.

[0060] 이상 제조예에서 사용한 균주 및 벡터에 대해서는 하기 표 2에 구체적으로 나타내었다.

[0061] [표 2]

Strain/plasmid	Characteristics§
Bacterial strain	
Escherichia coli	
DH5α	Plasmids construction and general subcloning, F⁻*recA lacZ* ΔM15
ET12567/pUZ8002	Non-methylating ET12567 containing non-transmissible RP4 derivative plasmid pUZ8002, Cml^R, Kan^R
Streptomyces	
Streptomyces hygroscopicusATCC29253	Wild-type rapamycin producing strain
WT/pSET152(P_{ermE*})	Wild-type stain with integrative plasmid pSET152(P_{ermE*})
WT/pRAPX	Wild-type with integrative plasmid pRAPX, Apr^r
WT/pRAPW	Wild-type with integrative plasmid pRAPW, Apr^r
WT/pRAPXW	Wild-type with integrative plasmid pRAPXW, Apr^r
Plasmid	
pGEM-Teasy	E.*coli* vector for cloning PCR products, Amp^r
pSET152(P_{ermE*})	Integrative plasmid containing P_{ermE*}, *oriT*, *attP*, *ΦC31 int* and *aac(3)IV*
pRAPX	pSET152(P_{ermE*}) based integrative plasmid containing single copy of *rapX*, Apr^r
pRAPW	pSET152(P_{ermE*}) based integrative plasmid containing single copy of *rapW*, Apr^r
pRAPW	pSET152(P_{ermE*}) based integrative plasmid containing of *rapX-rapW*, Apr^r

[0062]

[0063] §F-: F 플라스미드를 갖고 있지 않음;

[0064] recA1: DNA 클론 내에서 원하지 않는 재조합의 발생을 감소시킴;

[0065] lacZΔM15: β-갈락토시다제 유전자의 α-상보성(α-complementation)을 허용하는 lacZ 유전자를 일부 결실시킴;

[0066] Cmlr: 클로람페니콜 저항성임; Tetr은 테트라사이클린 저항성임;

[0067] Kanr은 카나마이신 저항성임;

[0068] Aprr: 아프라마이신 저항성임;

[0069] Ampr:엠피실린 저항성임;

[0070] *oriV*: 복제 원점임;

[0071] *oriT*: 이동(transfer) 원점임;

[0072] *attP*: 플라스미드 *Φ31* 부착 부위임;

[0073] *Φ31 int*:인테그레이즈유전자임;

[0074] *aac(3)IV*: 아프라마이신 저항성 유전자임;

[0075] P_{ermE}*: 돌연변이된 구성성 프로모터(constitutive promoter)임.

[0076] **<실시예> 라파마이신의 생산성 확인**

[0077] **(1) 형질전환된 *S. hygroscopicus* ATCC29253 균주의 배양**

[0078] 상기 제조예에서 제작한 형질전환균주인 WT/pRAPX와 WT/pRAPW, 및 WT/pRAPXW 및 대조군을 하기의 방법으로 배양하였다.

[0079] Seed 배양을 위하여, 5 ㎖ 의 TSB 액체배지 (trypic soy broth 3%, 0.01% iron sulfate, 1.5% glucose, pH 6 with H_2SO_4)(Difco 사에서 구매)에 제조예에서 수득한 WT/pRAPX와 WT/pRAPW, 및 WT/pRAPXW의 균사와 포자로부터

포자만을 분리하여 접종하고 28℃, 250 rpm 조건으로 3일 동안 진탕 배양하였다.

[0080] 그 후 본 배양을 위하여 상기 seed 배양에서 얻은 배양액에 TSB 액체배지를 더 첨가하여 ㎖당 0.2794 g의 방선균이 포함되도록 농도를 조절하고, 농도가 조절된 배양액 10 ㎕을 새로운 5 ㎖ TSB 생산배지에 접종하여 250 rpm, 28℃ 조건하에서 4일 동안 진탕 배양하였다.

[0081] pRAPX, pRAPW 및 pRAPXW에는 선별 마커로 아프라마이신 (apramycin) 내성 유전자가 삽입되어 있기 때문에, 형질전환균주인 WT/pRAPX와 WT/pRAPW, 및 WT/pRAPXW의 배양시에는 형질전환된 균주만 선택적으로 배양되도록 하기 위하여 아프라마이신(Sigma-Aldrich)을 배지에 첨가하여 배양하였다.

[0082] **(2) 라파마이신의 추출**

[0083] 에틸아세테이트를 이용하여 세포의 추출은 방지하고 세포 밖으로 유출된 라파마이신만을 추출하였다.

[0084] 상기 본 배양에서 4일동안 진탕 배양하여 수득한 배양액 5 ㎖에 동량의 에틸아세테이트 (ethyl-acetate) (JT.Baker)를 넣어 2분간 격렬하게 섞어준 후 상온에서 10분 동안 원심분리하였다. 그 후, 상기 에틸아세테이트 추출물 상등액 1 ㎖을 마이크로센트리퓨즈 튜브에 담아서 증류하여 건조시켰다. 건조 후 남은 잔류물을 0.1 ㎖의 메탄올 (methanol)에 녹였다.

[0085] **(3) 라파마이신 생산성의 비교**

[0086] 상기에서 수득한 메탄올 용액 내의 라파마이신 양을 정량적으로 분석하기 위하여 HPLC를 수행하였다. HPLC 조건은 하기와 같다.

[0087] <검출 HPLC 조건>

[0088] 검출기: 자외가시부흡광광도계 277 nm

[0089] 칼럼: C18 컬럼 (4.6mm X 250mm Watchers 120 OPS-BP 5m, DAISO)

[0090] 이동상: (최초 0~14분 동안) 메탄올 75%와 H_2O 25%의 혼합액

[0091] (그 후 15~30분 동안) 메탄올 100% 용액

[0092] 주입량: 20 ㎕

[0093] 도 5는 WT, WT/pRAPX, WT/pRAPW, 및 WT/pRAPXW의 라파마이신의 생산성을 비교한 HPLC 크로마토그램이다.

[0094] rapX를 과발현한 균주는 라파마이신의 생산성이 야생생산균주보다 약 4.2 배 향상되어 31.1 mg/L의 라파마이신을 생산하였다. rapW를 과발현한 균주는 24.5 mg/L의 라파마이신을 생산하였으며, 이는 대조군보다 3.3 배 라파마이신의 생산성이 향상된 결과이다. 이를 통하여 rapX와 rapW가 라파마이신의 생산성을 향상시키는 역할을 함을 알 수 있었다 (도 5 및 표 3).

[0095] 또한 WT/pRAPXW는 WT/pRAPW와 거의 비슷한 정도인 약 26 mg/L의 라파마이신을 생산하였으며, 이는 대조군보다 3.5 배 라파마이신의 생산성이 향상된 결과이다 (도 5 및 표 3).

[0096] [표 3]

[0097]

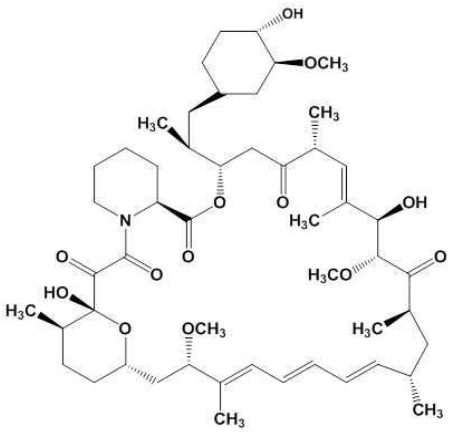
균주	라파마이신 생산성 (mg/l)
대조군 (WT)	7.3 ± 0.46
WT/pRAPX	31.1 ± 0.41
WT/pRAPW	24.5 ± 1.3
WT/pRAPXW	26 ± 2.04

도면

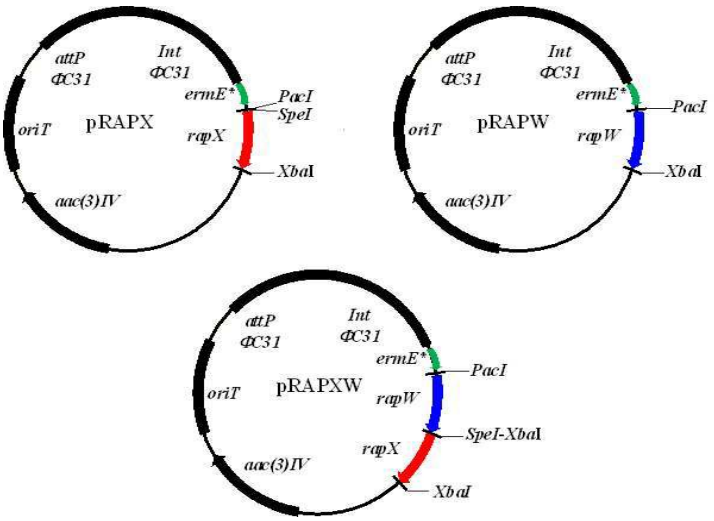
도면1

유전자	염기서열
rapX	GTGACCCGCCATGACCAGCGCCACCGCCGCCCCGCCCGTTCTGCGTCTCGCGGGCGTCAG CCACACCTACTCGGGCCAGCGCCGCAGGACCGCGGTCCTCAAGGACATCGACTACGCCT TCGAACGCGGCACCTTTTACACCATCCTGGGCCCTTCCGGCAGCGGCAAGACCACCCTGC TCTCCCTCGCCAGCGGTCTCGACACCCCCACCAAGGGCACCATCACCTTCGAGGGCCAGG ACCTCACCGAACTGGGCCTCGGCCGGTACCGCAACCAGCACGCCGCCACGATCTTCCAG CAGTACAACCTCCTCACCTACCTGACCGCCCTCCAGAACGTCACCTGCGCCATGGAGATC ACCGGCACCAAACCCACGACCGGCAGTCGCAAGGCCCGGGCTCTGCACCTGCTGGAGAA GATCGGCCTCGACAAGGCGATGGCCACCCGCAACGTCCTCCAGCTCTCCGGAGGCCAGC AGCAGCGCGTCGCCATCGCCCGCGCCCTCGCCTGCGACGTCGACATCCTCTTCGCCGACG AACCCACCGGAAACCTCGACGAGGACACCGCCGCGGGCATCATCGGCACCTTCCGCGAA CTCGCTCACGAGCAGGACAAATGCGTGGTCGTCGTGTCCCACTCCCAGCAACTGGCCGCC CAGTCCGACCGTGTCCTCACCCTGCGCAAGGGAAAACTCACAGAACAGGTCAACG CCCGATGA
rapW	ATGAACTTCGTCAAACGCGCGGGACTCAGCCTGTGGTCCCGCAAGGGCCGCACCCTGA TCACCCTCGCCACCTTCCTCGTCATCTCCGTGATGGTGCTGGCCGGTGTCCTGATCAACGA CGCCACGGCCCAGGCCGAGCAAGACGCCAGGCGTTCCGTCGGCGCCGAGGTCAACCTCG AGGCGGATTTGGGCCAGTTGGGCGGCGGGAGCGAGCTGAGGGCTCCGCGCAT CGACGCCGCG ACCGTCGACAAGGTCGGGGC TCTGCCCCAG GTGCGGAAGT ACACCTACTCGATCTGGGACCGCGTCCTCCTCAAGGGCGGCCCCCAACTGGCCGACGGTG GGCCGAAGGAGCCCATGGGCCCCGGCGGCACCGTGGGCATGGGCGTGCTCGACACCTCG CTGCTGCCCGACTTCCGCAGCGGCAAGTTCACGCTGCTGTCCGGTGAGCACCTCACCGCC GCCGACAAGGGCAAGAAGCGACTCCTGATCGAGGAACGGCTCGCCAAGGAG AACAAGCTCG GTGTCGGCGA CACGATCACC CTGACCGGCA ACGACGAGAA GACCACGGCCGACTTCACCGTGGCCGGCGTCTACCGCGACCCGAGCCCTGCCACCGAAC CGGACAGCGAGTACGGCATCAGTCCGGCCAACATGCTGTACGGCACGGTGGGCGGCCTC TCCGCGCTCAGCTCCGAGCGGAACGGGCCGCTCCAGGCAGGTAAGGCGACCTTCCTCCTC CAGGACGCCGACACGCAGGGTGCGTTCAAGGACGAGGCCAAAAAGGTCGCGG GCCCGGCGCTCGACGGTTTCAAGCTGGACG CCAACGACAA GGCCATCCGG CAGATGACCGGCCCGCTCAAGTCCATCAGCACTACCGCCACCCTGGCCATGTGGCTGATG GGGCTCGCCGGTGCGGCCGTCCTGACGCTGCTGGTCAACCTCGCCGTCAAGCAGCGCCAC AAGGAGTACGGCGTCCTGCTGGCCATGGGCGAGAAGAAACGCAAGCTCAT CGCCCAACAGGCCCTGGAGATCCTCGTCGTCGGCGCCCTCGCCATCGGCCTGAGCTCCCT GTTCGCCCCGCGGCTGACCCAGAGCGCCGGGCAGGCCCTGCTCGGCAGGGAAGCCACCA GCGCCCAGCACAAGATCGACTCCTGGCAGGGCCCGCCGTCCGGCAGTACCGGCCTCGGC GAGGGCATCGACCCGAACGACAAGCCCGTCGAGGACGCCGACCCCATCGACAAGATCAC CGTACGACTCGATCCGGCGGACCTCGCCACCCTCGGCGCCATCGGCCTCGGCATCGGCCT GCTCGCCACCGCCGTCCCGGCCGGTGCCGTGCTGCGGCTGAGCCCCCGCACCA TCCTCACGAA GGGCAAGTGA

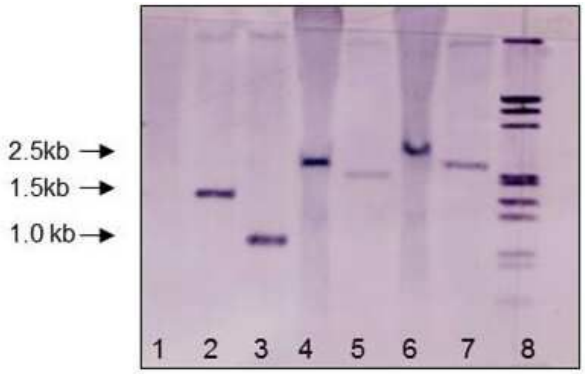
도면2



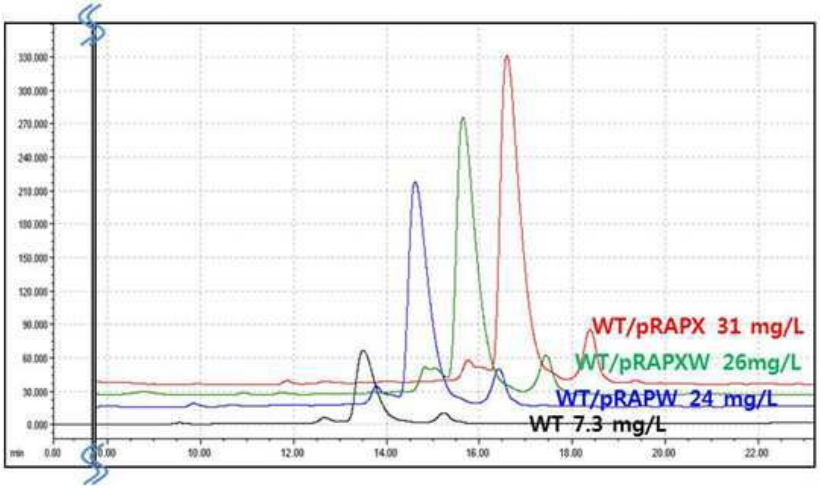
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> A bacterium Streptomycess overexpressing rapX or rapW and a method to increase rapamycin production using the same

<130> P13-066-EWHA

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 718

<212> DNA

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 1

gtgacccgcc atgaccagcg ccaccgccgc cccgcccgtt ctgcgtctcg cgggcgtcag 60

ccacacctac tcgggccagc gccgcaggac cgcggtcctc aaggacatcg actacgcctt 120

cgaacgcggc acctttaca ccatcctggg cccttccggc agcggcaaga ccaccctgct 180

ctccctcgcc agcggtctcg acacccccac caagggcacc atcaccttcg agggccagga 240

cctcaccgaa ctgggcctcg gccggtaccg caaccagcac gccgccacga tcttccagca 300

gtacaacctc ctcacctacc tgaccgccct ccagaacgtc acctgcgcca tggagatcac 360

cggcaccaaa cccacgaccg gcagtcgcaa ggcccgggct ctgcacctgc tggagaagat 420

cggcctcgac aaggcgatgg ccacccgcaa cgtcctccag ctctccggag gccagcagca 480

gcgcgtcgcc atcgcccgcg ccctcgcctg cgacgtcgac atcctcttcg ccgacgaacc 540

caccggaaac ctcgacgagg acaccgccgc gggcatcatc ggcaccttcc gcgaactcgc 600

tcacgagcag gacaaatgcg tggtcgtcgt gtcccactcc cagcaactgg ccgcccagtc 660

cgaccgtgtc ctcaccctgc gcaagggaaa actcacagaa caggtcaacg cccgatga 718

<210> 2

<211> 1380

<212> DNA

<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 2

atgaacttcg tcaaacgcgc gggactcagc ctgtggtccc gcaagggccg caccctgatc 60

accctcgcca ccttcctcgt catctccgtg atggtgctgg ccggtgtcct gatcaacgac 120

gccacggccc aggccgagca agacgccagg cgttccgtcg gcgccgaggt caacctcgag 180

gcggatttgg gccagttggg cggcgggagc gagctgaggg ctccgcgcat cgacgccgcg 240

accgtcgaca aggtcggggc tctgccccag gtgcggaagt acacctactc gatctgggac 300

cgcgtcctcc tcaagggcgg cccccaactg gccgacggtg ggccgaagga gcccatgggc 360

cccggcggca ccgtgggcat gggcgtgctc gacacctcgc tgctgcccga cttccgcagc 420

ggcaagttca cgctgctgtc cggtgagcac ctcaccgccg ccgacaaggg caagaagcga 480

ctcctgatcg aggaacggct cgccaaggag aacaagctcg gtgtcggcga cacgatcacc 540

ctgaccggca acgacgagaa gaccacggcc gacttcaccg tggccggcgt ctaccgcgac 600

ccgagccctg ccaccgaacc ggacagcgag tacggcatca gtccggccaa catgctgtac 660

ggcacggtgg gcggcctctc cgcgctcagc tccgagcgga acgggccgct ccaggcaggt 720

aaggcgacct tcctcctcca ggacgccgac acgcagggtg cgttcaagga cgaggccaaa 780

aaggtcgcgg gcccggcgct cgacggtttc aagctggacg ccaacgacaa ggccatccgg 840

cagatgaccg gcccgctcaa gtccatcagc actaccgcca ccctggccat gtggctgatg 900

gggctcgccg gtgcggccgt cctgacgctg ctggtcaacc tcgccgtcaa gcagcgccac 960

aaggagtacg gcgtcctgct ggccatgggc gagaagaaac gcaagctcat cgcccaacag 1020

gccctggaga tcctcgtcgt cggcgccctc gccatcggcc tgagctccct gttcgccccg 1080

cggctgaccc agagcgccgg gcaggccctg ctcggcaggg aagccaccag cgcccagcac 1140

aagatcgact cctggcaggg cccgccgtcc ggcagtaccg gcctcggcga gggcatcgac 1200

ccgaacgaca agcccgtcga ggacgccgac cccatcgaca agatcaccgt acgactcgat 1260

ccggcggacc tcgccaccct cggcgccatc ggcctcggca tcggcctgct cgccaccgcc 1320

gtcccggccg gtgccgtgct gcggctgagc ccccgcacca tcctcacgaa gggcaagtga 1380

1380

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for rapX

<400> 3

ttaattaaac tagtccgacc ccatcgacaa gatc 34

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for rapX

<400> 4

tctagagcga cgatgagtat ctggagac 28

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for rapW

<400> 5

ttaattaatg tgcccgatgc cgagat 26

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for rapW

<400> 6

tctagagagt aggtgtggct gacgc 25