

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 30일 (30.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/052232 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/74 (2006.01) C12P 17/16 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) C12R 1/465 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010594
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 22일 (22.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0133892 2015년 9월 22일 (22.09.2015) KR
- (71) 출원인: 주식회사 팜한농 (FARM HANNONG CO., LTD.) [KR/KR]; 07320 서울시 영등포구 여의대로 24, Seoul (KR). 이화여자대학교 산학협력단 (EWhA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 남상집 (NAM, Sang-Jip); 14247 경기도 광명시 하안로 320, 1012 동 607 호, Gyeonggi-do (KR). 윤여준 (YOON, Yeo Joon); 06001 서울시 강남구 압구정로 151, 126 동 202 호, Seoul (KR). 유영지 (YOO, Young Ji); 03743 서울시 서대문구 독립문로 10, 105 동 306 호, Seoul (KR). 김면수 (KIM, Myoun-Su); 03764 서울시 서대문구 이화여대길 50-12, 106 동 203 호, Seoul (KR). 오기훈 (OH, Ki-Hoon); 35367 대전시 서구 도안

동로 77, 1803 동 3304 호, Daejeon (KR). 정봉진 (CHUNG, Bong Jin); 13802 경기도 과천시 관문로 143, 1102 동 804 호, Gyeonggi-do (KR). 조완제 (CHO, Wan-Je); 35367 대전시 서구 도안동로 77, 1803 동 2102 호, Daejeon (KR). 송남숙 (SONG, Nam Suk); 35206 대전시 서구 청사로 282, 16 동 1005 호, Daejeon (KR). 소은수 (SO, Eunsu); 35367 대전시 서구 도안동로 77, 1805 동 2904 호, Daejeon (KR). 박성환 (PARK, Seong-Whan); 34048 대전시 유성구 유성대로 1741, 107 동 501 호, Daejeon (KR). 김가은 (KIM, Kaeun); 35367 대전시 서구 도안동로 77, 1803 동 2102 호, Daejeon (KR). 전희선 (CHON, Heeson); 35367 대전시 서구 도안동로 77, 1808 동 2601 호, Daejeon (KR).

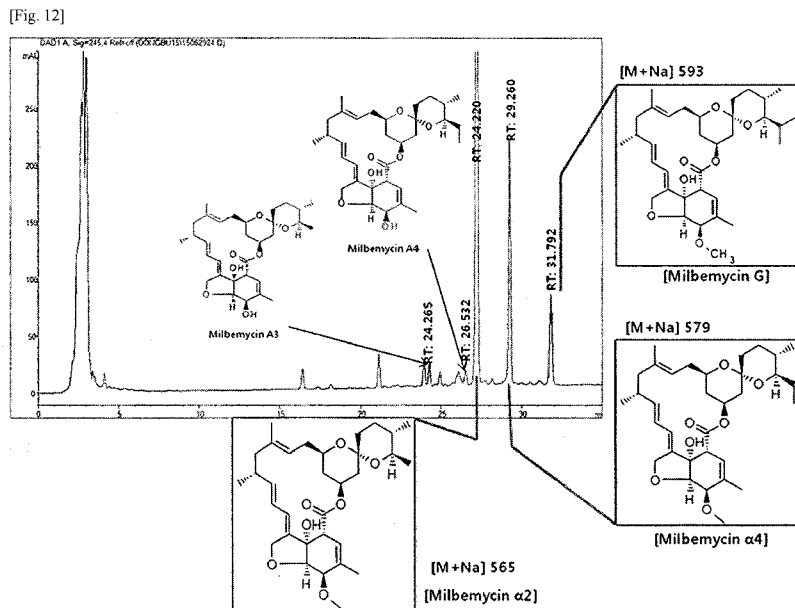
(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,

[다음 쪽 계속]

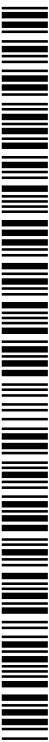
(54) Title: RECOMBINANT MICROORGANISM PRODUCING MILBEMYCIN, AND MILBEMYCIN PRODUCTION USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 밀베마이신을 생산하는 재조합 미생물 및 이를 이용한 밀베마이신 생산



(57) Abstract: A recombinant *Streptomyces avermitilis* strain producing milbemycin, and a milbemycin production method using the same are provided.

(57) 요약서: 밀베마이신을 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 균주 및 이를 이용한 밀베마이신 생산 방법이 제공된다.



WO 2017/052232 A1



SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

밀베마이신을 생산하는 재조합 미생물 및 이를 이용한 밀베마이신 생산 방법

5

【기술분야】

밀베마이신을 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 균주 및 이를 이용한 밀베마이신 생산 방법이 제공된다.

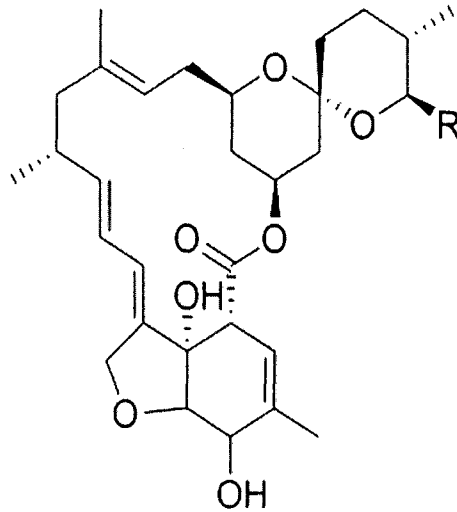
10

【배경 기술】

밀베마이신(Milbemycin)은 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아속 아우레오라크리모수스(*Streptomyces hygroscopicus subsp. aureolacrimosus*; 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*) (NRRL5739 또는 DSM 41911)라고도 칭함), 스트렙토마이세스 시아네오그리세우스 아속 논시아노게누스(*Streptomyces cyaneogriseus subsp. noncyanogenus*), 스트렙토마이세스 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*) 또는 스트렙토마이세스 빙칭젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*)등으로부터 생산되는 폴리케타이드 계열의 16-원환 매크로라이드 화합물로서 다양한 형태의 생물학적, 화학적 유도체로서 농업 및 동물 의약품 용도로 상품화되어 있다.

20

밀베마이신의 대표적인 예인 밀베멕틴(milbemectin)은 아래 그림과 같은 구조로서, 밀베마이신 A₃ 와 밀베마이신 A₄가 약 30:70 비율로 혼합되어 있는 형태이다.



Compound	R
Milbemycin A ₃	CH ₃
Milbemycin A ₄	CH ₂ CH ₃

Milbemectin

이 외에도, 밀베마이신 계열로서 밀베멕틴의 화학적 유도체인 레피멕틴(Lepimectin)이 살충제로서 이용되고 있으며, 동물의약품으로서 밀베마이신 옥심(Milbemycin Oxime)과 네마텍틴(Nemadectin)의 화학적 유도체인 목시텍틴(Moxidectin)이 상업화되어 있다.

한편, 아베멕틴(Avermectin)은 밀베마이신과 같이 멕틴계 살충제로 분류되며, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 등으로부터 생산되는 폴리케타이드 계열의 16-원환 매크로라이드 화합물이다. 이들 중 아베멕틴 B1a와 아베멕틴 B1b의 혼합물은 아바멕틴(Abamectin)으로서 응애 등에 대한 살충제로, 아베멕틴의 화학적 유도체인 에마멕틴 벤조에이트(Emamectin benzoate)는 나방 등에 대한 살충제 성분으로 사용되고 있으며, 동물의약품으로서 아베멕틴의 화학적, 생물학적 유도체인 이버멕틴(Ivermectin), 도라멕틴(Doramectin), 셀라멕틴(Selamectin), 에프리노멕틴(Eprinomectin) 등이 상업화되어 있다.

스트렙토마이세스 아베르미틸리스의 아베멕틴 생산성을 향상시키기 위하여 무작위적인 돌연변이법, 트랜스포존(transposon) 돌연변이법 등이 적용되었으며, 이를 효율적으로 스크리닝하기 위한 고속스크리닝법이 개발되었다[Ikeda et al. 1993; Weaden and Dyson 1998; Gao¹ et al. 2010; Gao² et al. 2010; Wang et al. 2010]. 또한, 생산균주의 주요 유전자를 제거하거나 과발현하여 생산성을 증가시키는 연구가 성공적으로 진행되었다[Duong et al. 2009; Li et al. 2010;

Zhuo et al. 2010; Qiu et al. 2011; He et al. 2014; Liu et al. 2015]. 이케다 등은 스트렙토마이세스 아베르미틸리스가 외래의 물질합성 유전자를 효과적으로 발현하여 물질을 생산할 수 있음을 밝히고 지놈엔지니어링을 통해 보다 효과적인 발현 균주로 개발하고 있다 [Ikeda et al. 2014]. 또한, 아베멕틴의 경우 현재

5 대규모의 상업적 생산이 이뤄지고 있어 아베멕틴 생산균주인 스트렙토마이세스 아베르미틸리스가 산업균주로서 보다 유리할 것으로 여겨지고 있다.

밀베마이신의 생산은 스트렙토마이세스 속에 속하는 세균을 배양하고, 균체를 배양액으로부터 분리하여 생산된 밀베마이신을 균체로부터 유기 용매로 추출한 후, 얻어진 목적 화합물을 포함하는 물질을 정제하는 등의 방법에 의해

10 행해지고 있다. 종래 밀베마이신의 생산에 관한 기술들을 살펴보면, 일본의 Sankyo 사에서 1980년대 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*)가 밀베마이신을 생산하는 것을 발견한 후, 무작위적인 돌연변이 개발 기술을 통해 상업적 수준의 밀베마이신의 생산을 시작하였다. 그러나, 이와 같이 개발된 균주를 이용하여 밀베마이신을 대량생산 할 때 발효조 내의 용존

15 산소량에 의한 생산성 변화가 상당히 크다는 것이 보고되었고, 개발된 균주의 생산성을 유지시키는 것이 상당히 어렵다는 것이 보고된 바 있다[Okada and Iwamatu. 1997; Ide et al.1993]. 또한 상기 균주의 밀베마이신을 생산하는 스트렙토마이세스 빙첵젠시스에서 조절 유전자인 nsdA의 삭제를 통하여 밀베마이신 A4의 생산성을 향상시켰다는 보고가 있고[Wang et al. 2009],

20 스트렙토마이세스 빙첵젠시스에서 milD를 삭제하여 밀베마이신 A3/A4의 생산성을 향상시켰다는 보고가 있다[Zhang et al. 2013].

그러나, 종래 기술은 원 균주인 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*)를 이용하여 상업적 수준으로 생산하는 경우에 있어서도 대량생산의 어려움 때문에 생산성 향상을 이루기 어려우며, 신규의

25 균주를 이용하는 경우에 있어서도 산업적 수준의 생산성을 얻기 까지 장기간이 걸린다는 문제가 있다.

【선행기술문헌】

【비특허문헌】

30 (비특허문헌 0001) Ikeda et al., J. Bacteriol., 175(7): 2077-2078 (1993년 4월)

- (비특허문헌 0002) Weaden and Dyson, *Microbiology*, 144:1963-1970 (1998년 7월)
- (비특허문헌 0003) Gao et al., *Bioresource Technology*, 100:4012-4016 (2009년 4월)
- 5 (비특허문헌 0004) Gao1 et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(13):4583-4586 (2010년 7월)
- (비특허문헌 0005) Gao2 et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85(4):1219-1225 (2010년 1월)
- (비특허문헌 0006) Wang et al., *J. Appl. Microbiol.*, 108(3):851-858 (2010년 3월)
- 10 (비특허문헌 0007) Duong et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19(2): 136-139 (2009년 2월)
- (비특허문헌 0008) Li et al., *Bioresour. Technol.*, 101(23): 9228-9235 (2010년 12월)
- (비특허문헌 0009) Zhou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (107(25):11250-11254
15 (2010년 6월)
- (비특허문헌 0010) Qiu et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92(2):337-345 (2011년 10월)
- (비특허문헌 0011) He et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(1):399-409 (2014년 1월)
- 20 (비특허문헌 0012) Liu et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(15):5157-5173 (2015년 8월)
- (비특허문헌 0013) Wang et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21(11):3320-3333 (2011년 6월)
- (비특허문헌 0014) Ikeda et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 41:233-250
25 (2014년 2월)
- (비특허문헌 0015) Wang et al., *The Journal of Antibiotics*, 62:309-313(2009년 5월)
- (비특허문헌 0016) Zhang et al., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 97(23):10091-10101(2013년 12월)
- 30 (비특허문헌 0017) Okada and Iwamatu., *J Chem Technol Biotechnol* 70(2):179-

187(1997년 10월)

(비특허문헌 0018) Ide et al., Annu. Rep. Sankyo Res. Lab. 45:1-98 (1993년)

【발명의 내용】

5 【해결하려는 과제】

본 발명은 밀베마이신의 산업용 생산 균주로 사용할 정도의 높은 생산성을 가지는 재조합 미생물 및 이를 이용한 밀베마이신 생산 방법과 관련 있다.

10 일 예는 아베멕틴의 고생산성 균주에서 아베멕틴 생산 유전자의 일부를 밀베마이신 생산 유전자로 치환함으로써 밀베마이신을 고생산하는 재조합 미생물을 제공한다.

다른 예는 밀베마이신 생산 유전자를 포함하는 밀베마이신을 고생산하는 재조합 미생물 제조에 사용 가능한 재조합 벡터를 제공한다.

15 다른 예는 상기 재조합 미생물을 이용한 밀베마이신 생산 방법을 제공한다.

다른 예는 아베멕틴의 고생산성 균주에서 아베멕틴 생산 유전자의 일부를 밀베마이신 생산 유전자로 치환함으로써 아베멕틴 유도체를 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주를 제공한다.

다른 예는 신규한 아베멕틴 유도체 또는 이의 염을 제공한다.

20 다른 예는 상기 신규한 아베멕틴 유도체 또는 이의 염을 포함하는 농약 및/또는 동물의약품 조성물을 제공한다.

【과제의 해결 수단】

상기 문제를 해결하기 위한 하나의 방안으로서, 본 명세서에서는,
 25 아베멕틴(ivermectin)과 밀베마이신(milbemycin)의 분자구조가 매우 유사하고 이들을 생산하는 폴리케타이드 합성효소의 모듈(module) 및 도메인(domain)의 구성이 유사함에 근거하여 아베멕틴 고생산성 균주의 아베멕틴 합성 폴리케타이드 합성효소를 밀베마이신 합성 폴리케타이드 합성효소로 전환함으로써 고생산성의 밀베마이신 생산균주를 제작하는 기술이 제공된다 (도
 30 18a-18d 참조).

하나의 양태로서, 본 발명은 아베멕틴의 고생산성 균주에서 아베멕틴 생산 유전자의 일부를 밀베마이신 생산 유전자로 치환하여 얻어진 재조합 미생물에 관한 것이다. 상기 재조합 미생물은 밀베마이신을 고효율로 생산하는 특징으로 갖는 것일 수 있다.

- 5 도 18a-18c는 아베멕틴과 밀베마이신의 분자구조 차이 및 이를 유발하는 유전자의 구성을 보여주는 그림이고, 도 18d는 밀베마이신 폴리케타이드 합성효소 유전자군 (gene cluster)과 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소 유전자군을 비교하여 보여주는 그림이다. 도 18a-18d에서, 각 원은 각각 도메인을 나타내며, 각 도메인으로부터 코딩되는 단백질은 각각 다음의 활성을 갖는다 (AT: 아실트랜스퍼라제 (Acyltransferase), KS: 케토-아실기 합성효소 (ketosynthase), KR: 케토-아실기 환원효소 (ketoreductase), DH: 탈수효소 (dehydratase), ER: 엔올 환원효소 (enoyl reductase), ACP: 아실기 운반단백질 (Acyl Carrier Protein), TE: 티오에스터라제 (Thioesterase)). 각각의 합성효소는 모듈로 구성되고 각 모듈은 도메인들로 구성되며, 합성효소 유전자군은 모듈 코딩 유전자들로 구성되며, 각
- 10 모듈 코딩 유전자는 각 도메인 코딩 유전자들로 구성된다.

- 각 모듈 내의 각 도메인은 KS 도메인부터 시작하여 ACP 도메인으로 끝나는 순서로 배열될 수 있다 [예컨대, N-말단에서 C-말단 방향으로, (KS)-(AT)-(DH 및/또는 KR; in any order)-(ACP) 순서로 배열, milA3의 모듈 7의 경우 (KS)-(AT)-(DH)-(ER)-(KR)-(ACP) 순서로 배열]. 밀베마이신 및 아베멕틴 폴리케타이드
- 20 합성효소의 모듈 10의 KR 도메인은 폴리케타이드 합성에 관여하지 않으며, 밀베마이신 폴리케타이드 합성효소 모듈 11의 KR 도메인과 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소 모듈 7의 DH 도메인은 활성이 없다.

- 도 18a-18d에서 알 수 있듯이, 아베멕틴과 밀베마이신의 분자 구조가 매우 유사하고, 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소 유전자군과 베마이신 폴리케타이드
- 25 합성효소 유전자군은 그 구성이 매우 유사하다.

두 화합물(아베멕틴과 밀베마이신)의 합성에 있어 차이는 다음에 기인한다:

- 1) 폴리케타이드 합성효소의 loading 모듈의 AT의 기질특이성 차이로 밀베마이신 합성효소의 loading 모듈의 경우 acetyl-CoA와 propionyl-CoA를 주요 기질로 사용하고, 아베멕틴 합성효소의 loading 모듈의 경우 isobutyryl-CoA와 2-
- 30 methylbutanoyl-CoA를 주요기질로 사용하고 있어서, 두 화합물의 각 탄소위치

25번에 연결되어 있는 탄소 사슬의 길이가 달라진다.

2) 두 화합물의 탄소위치 22-23의 탄소결합은 각 합성효소의 모듈 2의 도메인 구성에 의해 결정되어, DH-KR 도메인을 갖는 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소 모듈 2의 경우 이중 결합 또는 -OH 결합을 생성하는 반면, DH-ER-KR 도메인을 갖는 밀베마이신 폴리케타이드 합성효소 모듈 2는 단일결합을 생성한다.

3) 두 화합물의 탄소위치 13의 -OH기의 생성은 각 합성효소의 모듈 7의 도메인 구성에 의한다. 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소의 경우 KR 도메인만 작용하여 -OH가 생성되지만, 밀베마이신 폴리케타이드 합성효소의 경우 DH-ER-KR 도메인이 있어 탄소 단일결합의 형태가 생성된다.

10 상기 내용에 기초하여, 아베멕틴 생성 균주를 밀베마이신 생성 균주로 전환시키기 위하여 필수적으로 필요한 최소한의 도메인만을 선택적으로 치환할 수 있다. 본 명세서에서는 도메인 치환시의 활성 유지 정도를 고려하여, 적절한 모듈 또는 도메인 단위를 선택하여 치환을 시도하였다.

 보다 구체적으로, aveA3와 milA3의 기능적 차이는 모듈 7의 DH (dehydratase) 와 ER (Enoyl reductase) 활성 도메인의 포함 여부에 의존할 수 있다. aveA3의 모듈은 DH 도메인을 갖고 있지만 활성이 없는 반면, milA3는 모듈 7에 DH와 ER 활성을 갖는 도메인을 포함한다. 이외에, aveA3의 모듈 8과 모듈 9는 milA3의 모듈8과 모듈 9와 동일 내지 유사한 기능을 갖는다. 따라서, 기능적인 측면을 고려하면, 최소한 aveA3의 모듈 7 코딩 유전자 중의 DH 도메인 코딩 유전자를 milA3의 모듈7 코딩 유전자 중의 DH-ER 도메인 코딩 유전자로 치환시킴으로써, 아베멕틴 생성균주에 밀베마이신 생산 활성을 부여할 수 있다. 임의로, 폴리케타이드 합성효소와 같은 거대 효소에 있어 단백질 상호작용에 의해 합성이 조절되는 것이 매우 중요하기 때문에, 단순한 도메인 치환에 의하여 생길 수 있는 활성 감소를 방지하기 위하여, 모듈 단위 (예컨대, 모듈 7)로 치환하거나, 또는 앞서 설명한 도메인 이외의 적절한 도메인 또는 모듈을 추가로 치환할 수 있다.

 일 예에서, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 균주에서,

 아베멕틴 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소 유전자군의 1번 유전자(aveA1; 예컨대, *Streptomyces avermitilis* MA-4680의 aveA1 유전자 (GeneBank Accession number AB032367.1의 101번째부터 12019번째까지의 폴리뉴클레오타이드

부위(DNA 서열: 서열번호 66; 아미노산 서열 (BAA84474.1): 서열번호 67)) 등)가 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소 유전자군의 1번 유전자(milA1)로 치환되고,

- 아베맥틴 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소 유전자군의 3번 유전자 (aveA3)의 전부 또는 일부가 밀베마이신 생산 균주에서 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소 유전자군의 3번 유전자 (milA3)의 전부 또는 일부로 치환된,

재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주가 제공된다.

상기 aveA3 일부가 milA3의 일부로 치환된 것은, aveA3 (예컨대,

- 10 *Streptomyces avermitilis* MA-4680의 aveA3 유전자의 적어도 모듈 7 코딩 유전자의 전부 또는 일부 (적어도 DH 도메인 코딩 유전자를 포함)가 밀베마이신 생산 균주에서 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소 유전자군의 3번 유전자 (milA3)의 모듈 7 코딩 유전자의 전부 또는 일부 (적어도 DH (dehydratase) 도메인 코딩 유전자 및 ER (enoyl reductase) 도메인 코딩 유전자를 포함)로 치환된
15 것을 의미할 수 있다.

예컨대, 상기 aveA3는 GeneBank Accession number AB032367.1의

33436번째부터 50034번째까지의 폴리뉴클레오타이드 부위(DNA 서열: 서열번호 71 (polyketide synthase gene cluster (AB032367.1)의 33436번째부터 50034번째까지의 폴리뉴클레오타이드 부위); 아미노산 서열 (BAA84478.1): 서열번호 72 (Module 7: 20 38번째부터 1841까지 폴리펩티드; Module 8: 1862 번째부터 3641까지 폴리펩티드; Module 9: 3660번째부터 5438까지 폴리펩티드; module 7의 DH domain: 976번째부터 1148번째까지 폴리펩티드))일 수 있으며, 상기 aveA3의 일부는 적어도 모듈 7 (BAA84478.1 (서열번호 72)의 35번째부터 1841번째 또는 38번째부터 1841번째까지의 부위)의 코딩 유전자의 전부 또는 일부 (적어도 DH (dehydratase) 25 도메인 (BAA84478.1 (서열번호 72)의 976번째부터 1148번째까지의 부위)의 코딩 유전자를 포함)을 의미할 수 있다.

aveA3 유전자의 각 모듈, 도메인 및 이의 코딩 유전자는 웹사이트

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/5902891>)를 통하여 명확하게 특정할 수 있다.

상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는 밀베마이신의

- 30 고효율 생산 활성을 갖는 것일 수 있다.

폴리케타이드 합성효소 상에서 도메인, 모듈, 및/또는 단백질의 변이(예컨대, 치환) 시에, 각 영역을 암호화하는 유전자를 연결하는 docking 부분간의 상호작용이 해당 폴리케타이드 합성효소의 정상적 발현에 매우 중요하다. 특히 KS (ketosynthase) 도메인, AT (acyltransferase) 도메인, DH

- 5 (dehydratase), ER (enoylreductase) 도메인, KR (ketoreductase) 도메인, ACP (acyl carrier protein) 도메인 등을 포함하는 복합효소를 포함하는 폴리케타이드 합성효소 (상기한 도메인들은 N-말단에서 C-말단 방향으로 상기 기재 순서대로 위치하는 것일 수 있다)에서, 각 모듈의 KS와 AT는 upstream의 ACP와 상호작용한다. 이를 고려할 때, 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소의 정상적 발현을 위해서, aveA3
- 10 유전자의 일부가 milA3 유전자의 일부로 치환 시 치환이 일어나는 염기서열의 위치가 중요하게 고려되어야 한다.

- 상기 milA3 유전자의 일부로 치환되는 aveA3 유전자의 일부는 적어도 모듈 7의 전부 또는 일부 (적어도 DH 도메인을 포함)의 코딩 유전자를 포함할 수 있고, 이를 치환하는 milA3 유전자의 일부는 적어도 모듈 7의 전부 또는 일부
- 15 (적어도 DH 도메인 및 ER 도메인을 포함)의 코딩 유전자를 포함할 수 있다.

- aveA3 유전자의 일부를 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자의 일부로 치환 시, aveA3 유전자의 N-말단 코딩 부위 및 C-말단 코딩 부위의 docking 영역에 더하여, 모듈 7의 KS (KS7), 모듈 7의 AT 도메인 (AT7), 및/또는 모듈 9의 ACP 도메인 (ACP9)의 코딩 유전자 부위들이 아베멕틴 폴리케타이드
- 20 합성효소(aveA3 유전자)의 상기 도메인의 코딩 유전자 부위들로 보존되도록 유전자 치환이 일어날 수 있다.

예컨대, aveA3 유전자의 일부 치환은

- (a) aveA3 유전자 중 적어도 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH (dehydratase) 도메인 코딩 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자의 모듈
- 25 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH (dehydratase) 도메인 및 ER (enoyl reductase) 도메인 코딩 유전자로 치환되거나; 또는

(b) 상기 (a) 치환에 더하여, 다음을 추가로 포함하는 치환일 수 있다:

- (i) aveA3 유전자의 모듈 7 코딩 유전자 중의 DH 도메인 코딩 유전자를 제외한 나머지 도메인 중 하나 이상의 코딩 유전자 (예컨대, KS 도메인 코딩
- 30 유전자, AT 도메인 코딩 유전자, KR 도메인 코딩 유전자 및 ACP 도메인 코딩

유전자로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 유전자)의 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 코딩 유전자 중의 DH 도메인 및 ER 도메인을 제외한 나머지 도메인 중 하나 이상의 코딩 유전자 (예컨대, KS 도메인 코딩 유전자, AT 도메인 코딩 유전자, KR 도메인 코딩 유전자 및 ACP 도메인 코딩 유전자로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상)로의 치환;

(ii) *aveA3* 유전자의 모듈 8 및 모듈 9의 도메인들 중 하나 이상의 코딩 유전자의 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 8 및 모듈 9의 도메인들 중 하나 이상의 코딩 유전자로의 치환; 또는

(iii) 치환 (i) 및 (ii)의 조합.

10 앞서 설명한 *aveA1* 유전자의 전부가 *milA1* 유전자의 전부로 치환 및/또는 *aveA3* 유전자의 전부 또는 일부가 *milA3* 유전자의 전부 또는 일부로 치환된 균주는, *aveA1* 및/또는 *aveA3* 유전자의 유전자 치환 부위의 N-말단 및/또는 C-말단의 docking 영역 코딩 부위가 보존되어 있는 것일 수 있다. 즉, *aveA1* 유전자의 전부가 *milA1* 유전자의 전부로 치환 및/또는 *aveA3* 유전자의 전부 또는
15 일부가 *milA3* 유전자의 전부 또는 일부로 치환된 균주는, *aveA1* 및/또는 *aveA3* 유전자의 유전자 치환 부위의 upstream 및/또는 downstream 영역과 상동성을 가지는 부위를 상기 치환(도입)된 *milA1* 유전자 및/또는 *milA3* 유전자의 전부 또는 일부의 어느 한 말단 또는 양쪽 말단에 연결된 형태로 포함할 수 있다. 이러한 상동성을 가지는 부위의 도입은 상동 재조합시에 유리할 수 있다. 상기
20 상동성은 원래의 유전자 서열과 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상 동일성을 가짐을 의미한다.

상기 사용된 용어 "Docking 영역"은 폴리케타이드 합성효소를 코딩하고 있는 유전자 양 끝 부위에 의하여 코딩되는 부위로, 폴리케타이드 합성시 다음 단계의 합성효소와의 단백질-단백질 상호작용을 원활하게 하는 역할을 하는
25 부위이다. 통상적인 상동성 염기서열 분석을 범위의 특정이 가능하다.

상기 밀베마이신 생산 균주는 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*) (*milA1* 유전자: 서열번호 70; *milA3* 유전자: 서열번호 73; *milA3* 단백질: 서열번호 74 (BAA84478.1) (Module 7: 34번째부터 2139 번째까지 폴리펩티드; Module 8: 2163번째부터 3927번째까지 폴리펩티드; Module 9:
30 3951번째부터 5731 번째까지 폴리펩티드: DH-ER domain in module 7: 953번째부터

1775 번째까지 폴리펩티드 (DH domain in module 7: 953번째부터 1129 번째까지 폴리펩티드; ER domain in module 7: 1497 번째부터 1775 번째까지 폴리펩티드)),

스트렙토마이세스 시아네오그리세우스 아속 논시아노게누스(*Streptomyces cyaneogriseus subsp. Noncyanogenus*; 예컨대, Accession no. CP010849),

5 스트렙토마이세스 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*; 예컨대, Accession no. FJ952082; milA1 유전자 (Meilingmycin이 milbemycin과 구조가 유사하고 기능이 동일하여, 본 명세서에서는 meiA1와 milA1을 동일한 의미로 사용함): 서열번호 69; milA3 유전자(본 명세서에서는 meiA3와 milA3을 동일한 의미로 사용함): 서열번호 75 (GenBank: FJ952082 Sequence 영역 78606번째부터 96074번째까지

10 폴리뉴클레오티드); milA3 단백질: 서열번호 76 (Module 7: 39번째부터 2143 번째까지 폴리펩티드; Module 8: 2166번째부터 3931 번째까지 폴리펩티드; Module 9: 3952번째부터 5734 번째까지 폴리펩티드; Module 7의 DH-ER didomain 957번째부터 2143 번째까지 폴리펩티드 (Module 7의 DH domain: 957번째부터 1133 번째까지 폴리펩티드; 모듈 7의 ER domain: 1501번째부터 1779 번째까지 폴리펩티드))) 또는

15 스트렙토마이세스 빙첸젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*; 예컨대, Accession no. CP002047.1; milA1 유전자: 서열번호 68; milA3 유전자: 서열번호 77 (Accession no. CP002047.1 중 1063754::1081234 (유전자가 3'→5' 이어서 reverse complement seq를 기재함)); 단백질: 서열번호 78 (Genbank Accession No. ADI03854; Module 7: 35::2150, Module 8: 2173::3938, Module 9: 3990::5738, DH-ER didomain in module 7: 950::1772 (DH domain: 950::1126; ER domain: 1494::1772)))일 수 있다.

다른 구체예로, 상기 재조합 균주는 밀베마이신 A3, 밀베마이신 A4, 밀베마이신 $\alpha 2$, 밀베마이신 $\alpha 4$ 및 밀베마이신 G 로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상의 밀베마이신을 생산할 수 있다.

25 다른 구체예로, 상기 재조합 균주는 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-A 균주(수탁번호 KCTC12890BP)일 수 있다.

다른 구체예로, 상기 재조합 균주는 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-B 균주(수탁번호 KCTC12891BP)일 수 있다.

30 다른 양태로서, 앞서 설명한 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소 유전자 milA1 및 milA3의 전부 또는 일부 (적어도 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH-ER 도메인 코딩 유전자를 포함)를 포함하는 재조합 벡터를

적절한 숙주세포 (예컨대, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스와 같은 아베멕틴 생성 균주)에 도입하는 단계를 포함하는 재조합 미생물 (예컨대, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주)의 제조 방법을 제공한다.

상기와 같이 제조된 재조합 미생물은 상기 재조합 벡터가 도입되지 않은 미생물과 비교하여 밀베마이신을 생산 효율이 현저히 증가한 특징을 갖는다.

상기 도입시에, 숙주세포 (예컨대, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스와 같은 아베멕틴 생성 균주)의 폴리케타이드 합성효소 유전자 *aveA1* 및 *aveA3*의 전부 또는 일부 (적어도 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH 도메인 코딩 유전자를 포함)가 *milA1* 및 *milA3*의 전부 또는 일부 (적어도 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH-ER 도메인 코딩 유전자를 포함)로 치환이 일어날 수 있다. 또한, *aveA1* 및 *aveA3*의 활성이 제거된 상태에서 *milA1* 및 *milA3*의 전부 또는 일부 (적어도 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH-ER 도메인 코딩 유전자를 포함)를 포함하는 재조합 벡터가 도입되는 경우 보다 상승된 밀베마이신 생산 효과를 얻을 수 있다.

또 하나의 양태로서, 상기 재조합 미생물 (즉, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주) 또는 상기 재조합 벡터를 포함하는 밀베마이신 제조용 조성물이 제공된다.

또 하나의 양태로서, 상기 재조합 미생물을 이용한 밀베마이신 생산 방법이 제공된다.

구체예로, 본 발명은 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주를 배양하는 단계, 및 상기 배양된 균주 또는 균주의 배양물로부터 밀베마이신을 수득하는 단계를 포함하는, 밀베마이신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 균주에서 아베멕틴 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 1번 유전자(*aveA1*)가 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 1번 유전자(*milA1*)로 치환되며, 22,23-디하이드로-25-이소프로필-아베멕틴(22,23-dihydro-25-isopropyl-avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-

dihydro-25-ethyl-avermectin) 및 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-이소프로필-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-isopropyl-avermectin)으로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상의 아베멕틴 유도체를 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주에 관한 것이다. 예컨대, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는 앞서 설명한 milA1을 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 제작된 것일 수 있다.

구체 예로, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-01 균주(수탁번호 KCTC12889BP)일 수 있다.

10 또 하나의 양태로서, 본 발명은 하기에서 선택되는, 아베멕틴 유도체 또는 이의 염에 관한 것이다: 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin) 또는 이의 염, 및 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin) 또는 이의 염.

15 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 아베멕틴 유도체 또는 이의 염의 작물 보호제 및/또는 동물의약품으로서의 용도에 관한 것이다.

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

스트렙토마이세스 아베르미틸리스는 아베멕틴을 생산하는 균주로서, 그 예로는, *S. avermitilis* SA-01 균주, *S. avermitilis* MA-4680 균주(NCBI 등록번호: NC_003155.4), *S. avermitilis* 76-02-e 균주(He et al. 2014), *S. avermitilis* 14-12A 균주(Gao et al. 2009), *S. avermitilis* 3-115 균주(Gao et al. 2010) 등을 들 수 있으나, 이에 20 제한되는 것은 아니다.

스트렙토마이세스 아베르미틸리스는 아베멕틴을 생산하기 위한 PKS 클러스터(Polyketide synthase gene cluster; 폴리케타이드 합성효소 유전자 클러스터)라는 거대 유전자군을 포함하고 있다. 상기 아베멕틴 PKS 유전자군은 25 aveA1, aveA2, aveA3 및 aveA4 유전자를 포함하고 있으며, aveA1 유전자는 로딩 모듈과 모듈 1번과 모듈 2번, aveA2 유전자는 모듈 3번 내지 모듈 6번, aveA3 유전자는 모듈 7 내지 모듈 9, aveA4 유전자는 모듈 10번 내지 모듈 12번을 포함하고 있고, 각 모듈은 하위 도메인들로 구성되어 있다.

30 밀베마이신 생산 균주는 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*), 스트렙토마이세스 시아네오그리세우스 아속

논시아노게누스(*Streptomyces cyaneogriseus* sp. *Noncyanogenus*), 스트렙토마이세스 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*) 또는 스트렙토마이세스 빙첸젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아속 아우레오라크리모수스로는,

5 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*) NRRL 5739 균주를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

밀베마이신 생산 균주는 밀베마이신을 생산하기 위한 PKS 클러스터 유전자군을 포함하고 있다. 상기 밀베마이신 PKS 유전자군의 구성은 아베멕틴 PKS 유전자군의 구성과 유사하며, *milA1*, *milA2*, *milA3* 및 *milA4* 유전자를
10 포함하고 있으며, 각 유전자는 모듈 및 하위 도메인들로 구성되어 있다.

본 발명은 아베멕틴 생산 균주인 스트렙토마이세스 아베르미틸리스의 *aveA1* 유전자, 이에 상응하는 밀베마이신 생산 균주의 *milA1* 유전자로 치환시킴으로써 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 내에 하이브리드 PKS 유전자가 포함되도록 하였고, 상기 하이브리드 PKS 를 포함하는 재조합
15 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주가 다양한 아베멕틴 유도체들을 생산할 수 있음을 확인하였다.

상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주가 생산하는 아베멕틴 유도체는, 22,23-디하이드로-25-이소프로필-아베멕틴(22,23-dihydro-25-isopropyl-
20 avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-
25 methyl-avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-
25 ethyl-avermectin) 및 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-이소프로필-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-isopropyl-
25 isopropyl-avermectin)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함한다.

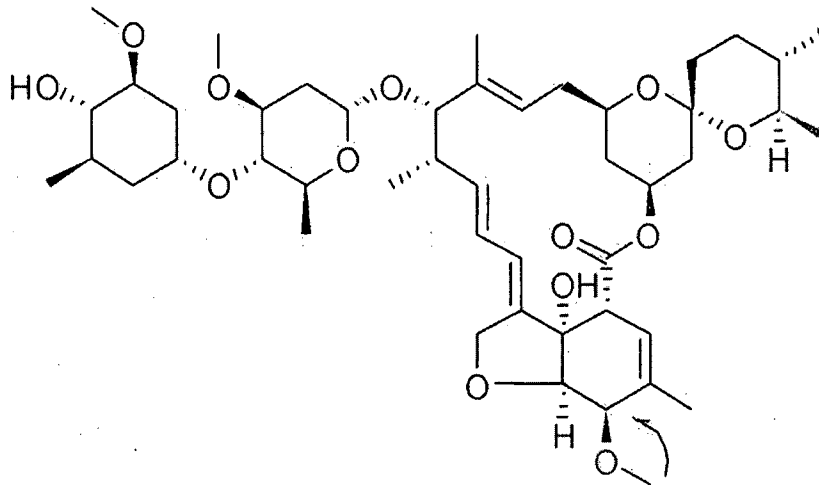
또한, 이 중에서 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-
25 22,23-dihydro-25-methyl-avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-
25 ethyl-avermectin)은 종래 구축된 화합물 데이터베이스에서 검색되지 않는 신규한 화합물임이 확인되었다. 이들 신규 아베멕틴 유도체들은 작물 보호제 및/또는 동물의약품 용도로 사용될 수 있으며, 종래 개발된 아베멕틴 유도체들을 대체할 수 있다.

30 다른 예로, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*)의

aveA1 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자의 전부 또는 일부로 치환되며, 아베멕틴 유도체들을 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주가 제공된다.

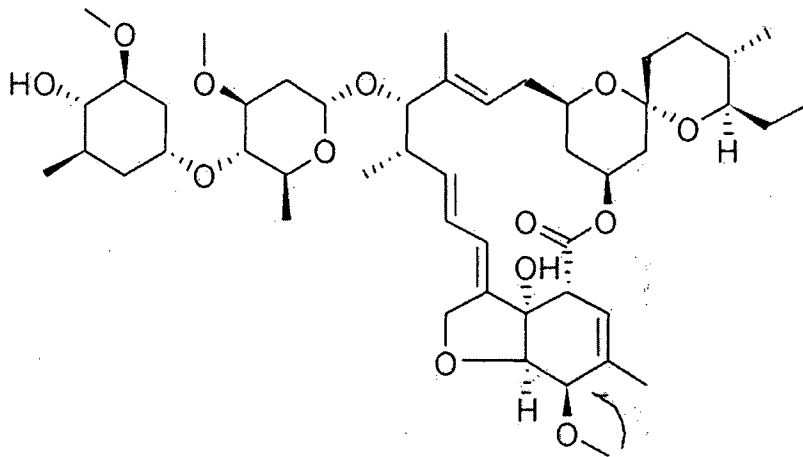
다른 예로, 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin) 또는 이의 염, 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin) 또는 이의 염, 및 이들 화합물들의 작물 보호제 및/또는 동물의약품으로서의 용도가 제공된다.

상기 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴은 다음의 화학식으로 나타낼 수 있다:



10

또한, 상기 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴은 다음의 화학식으로 나타낼 수 있다:



또한, 앞서 설명한 바와 같이, 아베멕틴 생산 균주인 스트렙토마이세스 아베르미틸리스의 aveA1 유전자 및 aveA3 유전자의 전체 또는 일부 (적어도 aveA3의 모듈 7의 DH 도메인 코딩 유전자를 포함)를, 이에 상응하는 밀베마이신

15

5 생산 균주의 milA1 및 milA3 유전자의 전체 또는 일부 (적어도 milA3의 모듈 7의 DH-ER 도메인 코딩 유전자를 포함)로 치환시킴으로써 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 내에 하이브리드 PKS 유전자가 포함되도록 하였고, 상기 하이브리드 PKS 유전자를 포함하는 재조합 균주가 밀베마이신을 생산할 수 있음이 확인되었다.

따라서, 다른 예로, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*)의 aveA1 유전자의 전부 또는 일부가 밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자의 전부 또는 일부로 치환되고, aveA3 유전자의 전부 또는 일부(적어도 aveA3의 모듈 7의 DH 도메인 코딩 유전자를 포함)가 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자의 전부 또는 일부(적어도 milA3의 모듈 7의 DH-ER 도메인 코딩 유전자를 포함)로 치환된, 밀베마이신을 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주가 제공된다.

상기 aveA3 유전자는 전체가 milA3 유전자로 치환될 수도 있으나, milA3 유전자 중에서 숙주 균주에 밀베마이신을 생산능을 부여할 수 있는 최소한의 부위만 aveA3 유전자의 상응하는 부위에 치환(삽입)되는 것이 가능하다. 예를 들어, 상기 milA3 유전자 중에서 숙주 균주에 밀베마이신을 생산능을 부여할 수 있는 최소한의 부위는 milA3 유전자 중 모듈 7 전부 또는 모듈 7의 DH-ER 도메인의 코딩 유전자를 포함할 수 있으며, aveA3 유전자 중 모듈 7 전부 또는 적어도 모듈 7의 DH 도메인을 포함하는 모듈 7의 일부의 코딩 유전자가, 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자 중 모듈 7 전부 또는 모듈 7의 DH-ER 도메인의 코딩 유전자로 치환될 수 있다.

일 구현예로, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주에서 aveA1 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자로 치환된 균주는, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-01 균주(수탁번호 KCTC12889BP)일 수 있다.

다른 예로, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주에서 aveA1 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자로 치환되고, aveA3 유전자의 모듈 7의 코딩 유전자 부위가 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자의 모듈 7의 코딩 유전자 부위로 치환된 균주는, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-A 균주(수탁번호 KCTC12890BP)일 수 있다.

다른 예로, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주에서 *aveA1* 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 *milA1* 유전자로 치환되고, *aveA3* 유전자의 모듈 7 중 KS 도메인을 제외한 모듈 7의 도메인들의 코딩 유전자 부위가 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중 KS 도메인을 제외한 모듈 7의 도메인들의 코딩 유전자 부위로 치환된 균주는, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-B 균주(수탁번호 KCTC12891BP)일 수 있다.

다른 예로, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주에서 *aveA1* 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 *milA1* 유전자로 치환되고, *aveA3* 유전자의 모듈 7 중 KS 도메인 및 AT를 제외한 모듈 7의 도메인들의 코딩 유전자 부위가 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중 KS 도메인 및 AT 도메인을 제외한 모듈 7의 도메인들의 코딩 유전자 부위로 치환되고, *aveA3* 유전자의 모듈 9 중 ACP 도메인을 제외한 모듈 9의 도메인들의 코딩 유전자 부위가 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 9 중 ACP 도메인을 제외한 모듈 9의 도메인들의 코딩 유전자 부위로 치환된 균주가 제공된다. 상기 균주는 *aveA3*의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인까지의 영역 (*aveA3*의 모듈 7의 DH 도메인, KR 도메인, 및 ACP 도메인, 모듈 8, 모듈 9의 KS 도메인, AT 도메인, DH 도메인, 및 KR 도메인을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 영역)의 코딩 유전자 부위가 밀베마이신 생산 균주의 *milA3*의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인까지의 영역(*milA3*의 모듈 7의 DH 도메인, ER 도메인, KR 도메인, 및 ACP 도메인, 모듈 8, 모듈 9의 KS 도메인, AT 도메인, DH 도메인, ER 도메인, 및 KR 도메인을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 영역)의 코딩 유전자 부위로 치환된 것일 수 있으며, 예컨대, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-C 균주(수탁번호 KCTC13083BP)일 수 있다.

그러나, 상기 기탁 균주들은 본 발명의 대표적인 구현예에 불과하며, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

스트렙토마이세스 아베르미틸리스의 *aveA1* 및/또는 *aveA3* 유전자의 치환은, 당업계에 알려진 공지의 기술들, 예를 들어 상동 재조합((homologous recombination)에 의하여 수행될 수 있다.

일 구현예로, 밀베마이신 생산 균주에서 분리한 *milA1* 및/또는 *milA3* 유전자의 전체 또는 일부가 상동 재조합을 통하여 숙주 균주 게놈에 통합될 수

있도록 하기 위한 유전자 치환용 벡터를 제조할 수 있다. 상기 벡터는 숙주 계놈의 특정 유전자 위치로 목적하는 유전자를 제거 또는 삽입할 수 있는 벡터로, 상동 재조합이 일어나도록 타겟팅하고자 하는 특정 유전자 부위에 상동인 염기 서열을 포함할 수 있다.

5 본 발명의 일 양태로서, 상기 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 재조합 균주 생산에 사용되는 재조합 벡터가 제공된다.

상기 재조합 벡터는

(1) 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 1번 유전자(milA1); 및

10 (2) 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 3번 유전자(milA3)의 전부 또는 일부 (적어도 milA3 유전자 중 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH 도메인 코딩 유전자 및 ER 도메인 코딩 유전자를 포함)

15 을 포함하는 것일 수 있다. 이 경우 milA1 유전자와 milA3의 전부 또는 일부는 하나의 벡터에 함께 포함되거나 각각 별개의 벡터에 포함될 수 있다.

일 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자; 및 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자 또는 밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 7의 전부 또는 일부의 코딩 유전자에 더하여, 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다:

20 밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 7의 DH-ER 도메인을 제외한 도메인들 (예컨대, KS, AT, KR, 및 ACP 도메인) 중에서 선택된 하나 이상의 코딩 유전자;

밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 8의 코딩 유전자 또는 모듈 8의 도메인들 중 하나 이상의 코딩 유전자; 및

25 밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 9의 코딩 유전자 또는 모듈 9의 도메인들 중 하나 이상의 코딩 유전자.

일 구체예에서, 상기 재조합 벡터는

밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자; 및 다음에서 선택된 milA3 유전자 일부 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다:

30 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자의 모듈 7 중의 KS 도메인의 코딩

유전자 부위가 결실된, 예컨대, *milA3* 유전자의 모듈 7의 AT 도메인, DH 도메인, ER 도메인, KR 도메인 및 ACP 도메인의 코딩 유전자를 포함하거나 이들로 구성된 *milA3* 유전자의 일부;

5 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중의 KS 도메인의 코딩 유전자가 *aveA3* 유전자의 모듈 7의 KS 도메인의 코딩 유전자로 치환된 *milA3*의 모듈 7 코딩 유전자 변이체;

10 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중의 AT 도메인의 코딩 유전자 부위가 결실된, 예컨대, *milA3* 유전자의 모듈 7의 KS 도메인, DH 도메인, ER 도메인, KR 도메인 및 ACP 도메인의 코딩 유전자를 포함하는 *milA3*의 모듈 7 코딩 유전자 변이체;

밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중의 AT 도메인의 코딩 유전자가 *aveA3* 유전자의 모듈 7의 AT 도메인의 코딩 유전자로 치환된 *milA3*의 모듈 7의 코딩 유전자 변이체;

15 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중의 KS 도메인 및 AT 도메인의 코딩 유전자가 결실된, 예컨대, *milA3* 유전자의 모듈 7의 DH 도메인, ER 도메인, KR 도메인 및 ACP 도메인의 코딩 유전자를 포함하는 *milA3*의 모듈 7의 코딩 유전자 변이체; 및

20 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 7 중의 KS 도메인 및 AT 도메인의 코딩 유전자가 각각 *aveA3* 유전자의 모듈 7의 KS 도메인 및 AT 도메인의 코딩 유전자로 치환된 *milA3*의 모듈 7의 코딩 유전자 부위 변이체.

상기 재조합 벡터는 다음으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다:

25 밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 9 중의 ACP 도메인의 코딩 유전자가 결실된, 예컨대, *milA3* 유전자의 모듈 9의 KS 도메인, AT 도메인, DH 도메인, 및 KR 도메인의 코딩 유전자를 포함하는 *milA3*의 모듈 9의 코딩 유전자 변이체; 및

밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자의 모듈 9 중의 ACP 도메인의 코딩 유전자가 *aveA3* 유전자의 모듈 9의 ACP 도메인의 코딩 유전자로 치환된 *milA3*의 모듈 9의 코딩 유전자 변이체.

30 일 예에서, 상기 재조합 벡터에 포함되는 *milA3* 유전자 변이체는

밀베마이신 생산 균주의 *milA3* 유전자 중의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인까지의 영역(예컨대, *milA3*의 모듈 7의 DH 도메인, ER 도메인, KR 도메인, 및 ACP 도메인, 모듈 8, 모듈 9의 KS 도메인, AT 도메인, DH 도메인, ER 도메인, 및 KR 도메인을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 영역)의 코딩
5 유전자를 포함하는 *milA3* 유전자 변이체 (일부)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본원의 일 실시예에서, *milA1*을 치환하기 위한 재조합 벡터는 *milA1* 유전자 전체를 포함하고, 상동 재조합을 위하여 *aveA1* 유전자의 upstream 및 downstream 지역과 상동성을 가지는 부위를 *milA1*의 어느 한쪽 말단 또는 양쪽
10 말단에 연결된 형태로 구성될 수 있다. 또한, 다른 실시예에서는, *milA3*을 치환하기 위한 재조합 벡터는, *milA3* 유전자의 7번 모듈의 코딩 유전자의 전체 또는 일부를 포함하고, 상동 재조합을 위하여 *aveA3* 및/또는 *aveA4* 유전자 지역과 상동성을 가지는 부위를 *milA3* 유전자의 7번 모듈의 코딩 유전자의 전체 또는 일부의 어느 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에 연결된 형태로 구성될 수 있다. 상기
15 벡터는 본원의 대표적인 실시예일뿐이며, 본원의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 벡터는, 상동 재조합을 위하여 숙주 유전자 부위와 상동성을 가지는 부위를 포함하는데, 여기에서 상동이란 숙주 유전자 부위의 염기 서열과의 동일성 정도를 나타내는 것으로, 예를 들어, 숙주 유전자의 염기서열과 90% 이상, 95%
20 이상 또는 98% 이상 동일한 것일 수 있다.

스트렙토마이세스에서 사용하기 위한 다양한 여러 벡터들, 예를 들어 파지, 고 카피수(high copy number) 플라스미드, 저 카피수 플라스미드, 및 대장균(*E. Coli*)-스트렙토마이세스 셔틀 벡터들이 개발되어 왔으며, 이들 벡터들을 본 발명을 구현하기 위하여 사용할 수 있다. 예를 들어, pCR-Blunt, pCR2.1(Invitrogen),
25 pGEM3Zf(Promega) 및 셔틀 벡터 pWHM3, pKC1139 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 벡터는, 형질전환된 세포를 선별하기 위한 목적으로 선별마커(selection marker)를 더욱 포함할 수 있으며, 예를 들어, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능
30 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있고, 포지티브 선별마커와 네가티브

선별마커를 예시할 수 있다. 포지티브 선별마커란 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선택 마커를 발현하는 세포만 생존하도록 하여 포지티브 선택을 가능하게 하는 마커로, 아프라마이신, 네오마이신, 하이그로마이신, 히스티디놀 디하이드로게나제(histidinol dehydrogenase gene: hisD) 또는 구아닌

- 5 포스포리보실트랜스퍼라제(guanine phosphoribosyltransferase: Gpt) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 네가티브 선별마커란 무작위적 삽입(random insertion)이 일어난 세포를 선별하여 제거하는 네가티브 선택을 가능하게 하는 마커로, 허피스 심플렉스 바이러스-싸이미딘 키나제(Herpes simplex virus-thymidine kinase: HSV-tk), 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제(hypoxanthine phosphoribosyl transferase: Hprt),
- 10 싸이토신 디아미네즈(cytosine deaminase), 디프테리아 독신(Diphtheria toxin) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

상기 벡터 제작은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 제한효소 등을 사용할 수 있다.

- 15 본 발명의 벡터는 스트렙토마이세스 세포에서 작용하지만, 예를 들어 클로닝 또는 발현 목적을 위해 다른 박테리아 또는 진핵 세포로 또한 형질전환될 수 있다. 예를 들어, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection; ATCC)로부터 구입할 수 있거나, 시판 중인 DH5 α 균주와 같은 에스케리키아 콜라이 균주가 전형적으로 사용될 수 있다. 바람직한 진핵 숙주 세포로는
- 20 포유동물 세포, 곤충 세포 또는 효모 세포가 또한 효과적으로 사용될 수 있다.

숙주 균주 내로 본 발명의 벡터를 도입 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 원형질체(protooplast) 형질전환, 전기천공법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), 미세주입법 (microinjection),

25 인산칼슘공동-침전법(calcium phosphate co-precipitation), 염화칼슘/염화루비듐법, 레트로바이러스 감염(retroviral infection), DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 양이온 리포솜(cationic liposome)법, 폴리에틸렌글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake), 유전자총(gene gun) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- 이 때 원형의 벡터를 적절한 제한효소로 절단하여 선형의 벡터 형태 또는
- 30 플라스미드를 제거한 선형의 벡터 형태로 도입할 수 있다. 형질전환체는 선별마커,

예를 들어 전술한 바와 같이 재조합 벡터와 연관된 항생물질 저항성을 발현시키는 세포를 선택하는 방법과 같은 표준 절차에 따라 선택할 수 있다.

이와 같이 제조된 재조합 균주를 배양하여 밀베마이신을 생산할 수 있으며, 예를 들어, 밀베마이신 A3, 밀베마이신 A4, 밀베마이신 $\alpha 2$, 밀베마이신 $\alpha 4$ 및 밀베마이신 G 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 밀베마이신을 생산할 수 있다.

재조합 균주의 배양은 균주의 생육과 밀베마이신의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다. 상기 배양 방법의 예에는, 회분식, 연속식 및 유가식 배양이 포함되나, 이에
10 제한되는 것은 아니다.

배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원, 인원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다. 발현 벡터가 유도성 촉진자를 포함하는 경우에는, 온도 변화, 영양원의 고갈, 무상 유도 물질(예를 들어, 이소프로필- β -D-티오갈락토피라노시드(IPTG)와 같은
15 탄수화물의 유사 물질)의 첨가, 과잉 대사 부산물의 축적 등과 같은 적절한 유도 조건은 발현을 유도하는데 필요에 따라 적용될 수 있다.

배지 내 탄소원으로는 글루코즈, 사카로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤,
20 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 배지 내 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

25 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 배지 내 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함하거나, 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기된
30 원료들은 배양 과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는

연속식으로 첨가될 수 있다.

또한, 필요에 따라, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있으며, 배양물의 온도는 보통 20 내지 45, 바람직하게는 25 내지 40 일 수 있다. 배양은 원하는 밀베마이신의 생산량이 최대로 얻어질 때까지 계속될 수 있다.

재조합 미생물로부터 생산된 밀베마이신은, 당업계에 널리 알려져 있는 방법으로 세포, 세포 용해물 또는 배양 배지로부터 단리되거나 실질적으로 정제될 수 있다. 밀베마이신의 회수 방법의 예로서, 유기용매 추출법, 원심분리, 초음파파쇄, 여과, 결정법(crystallization), 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography: HPLC), 가스 크로마토그래피(gas chromatography: GC) 등의 방법이 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 구체예로, 균주 배양물로부터 유기용매를 이용하여 생성 물질들을 추출한 후, 실리카겔, 알루미나, 텍스트란겔, 이온교환 수지, 합성흡착제, 분자체, C₈H₁₇, C₁₈H₃₇, C₆H₅ 등의 화학 결합형 실리카겔 등의 담체를 사용한 크로마토그래피에 부여하여, 얻어진 목적 화합물을 함유하는 분획을 농축 건조시키는 방법으로 회수할 수 있다.

본 발명의 다른 예는 앞서 설명한 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주 또는 상기 균주의 배양물; 재조합 벡터; 및 아베멕틴 유도체 또는 이의 염으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물을 제공한다.

다른 예는 앞서 설명한 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주 또는 상기 균주의 배양물; 재조합 벡터; 및 아베멕틴 유도체 또는 이의 염으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 작물에 적용하는 단계를 포함하는 해충 방제 방법을 제공한다.

상기 해충 방제는 해충에 대한 살충, 기피 등의 저해 효과를 포괄적으로 의미한다.

상기 해충은 동물 및/또는 식물에 위해를 가하는 모든 절지 동물의 성충,

유충 및 알을 총칭하는 것으로, 밀베마이신 또는 이의 유도체, 밧/또는 아베멕틴 또는 이의 유도체가 방제 활성을 갖는 모든 해충의 성충 및/또는 유충일 수 있다. 예컨대, 상기 해충은 다음으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다:

- 반시류 (Hemiptera) (예컨대, 다음을 포함함):

- 5 멸구류 (Delphacidae), 예컨대, 애멸구 (*Laodelphax striatellus*), 벼멸구 (*Nilaparvata lugens*), 흰등멸구 (*Sogatella furcifera*) 등; 매미충류 (Deltocephalidae), 예컨대, 끝동매미충 (*Nephotettix cincticeps*), 두점끝 동매미충 (*Nephotettix virescens*) 등; 진딧물류 (Aphididae), 예컨대, 목화진딧물 (*Aphis gossypii*), 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*), 양배추가루진딧물 (*Brevicoryne brassicae*), 감자수염진딧물
- 10 (*Macrosiphum euphorbiae*), 싸리수염진딧물 (*Aulacorthum solani*), 기장태두리진딧물 (*Rhopalosiphum padi*), 귤소리진딧물 (*Toxoptera citricidus*) 등; 노린재류 (Pentatomidae), 예컨대, 풀색노린재 (*Nezara antennata*), 툽다리개미허리노린재 (*Riptortus clavetus*), 호리허리노린재 (*Leptocorisa chinensis*), 가시점등글노린재 (*Eysarcoris parvus*), 썩덩나무노린재 (*Halyomorpha mista*), 장님노린재 (*Lysus lineolaris*)
- 15 등; 가루이류 (Aleyrodidae), 예컨대 온실가루이 (*Trialeurodes vaporariorum*), 담배가루이 (*Bemisia tabaci*), 은빛잎가루이 (*Bemisia argentifolii*) 등; 각지벌레류 (Coccidae), 예컨대, 캘리포니아붉은각지벌레 (*Aonidiella aurantii*), 샌호제각지벌레 (*Comstockaspis perniciososa*), 화살각지벌레 (*Unaspis citri*), 루비각지벌레 (*Ceroplastes rubens*), 이세리아각지벌레 (*Icerya purchasi*) 등; 방패벌레류 (Tingidae); 나무이류
- 20 (Psyllidae) 등);
- 인시류 (Lepidoptera) (예컨대, 다음을 포함함: 명나방류 (Pylalidae), 예컨대, 이화명나방 (*Chilo suppressalis*), 옐로우 라이스 나무좀 (*Tryporyza incertulas*), 흑명나방 (*Cnaphalocrocis medinalis*), 목화명나방 (*Notarcha derogata*), 화랑곡나방 (*Plodia interpunctella*), 조명나방 (*Ostrinia furnacalis*), 유럽조명나방 (*Ostrinia nubilalis*),
- 25 배추순나방 (*Hellula undalis*), 잔디포충나방 (*Pediasia tetterellus*) 등; 밤나방류 (Noctuidae), 예컨대, 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*), 파밤나방 (*Spodoptera exigua*), 멸강나방 (*Pseudaletia separata*), 도둑나방 (*Mamestra brassicae*), 검거세미나방 (*Agrotis ipsilon*), 가두배추금날개밤나비 (*Plusia nigrisigna*), 토리코플루시아류 (*Thoricoplusia* spp.), 담배밤나방류 (*Heliothis* spp.), 담배나방류 (*Helicoverpa* spp.) 등; 흰나비류
- 30 (Pieridae), 예컨대, 배추흰나비 (*Pieris rapae*) 등; 잎말이나방류 (Tortricidae), 예컨대,

애모무늬잎말이나방류 (*Adoxophyes* spp.), 복숭아순나방 (*Grapholita molesta*), 콩나방 (*Leguminivora glycinivorella*), 팔나방 (*Matsumuraeses azukivora*), 사과애모무늬잎말이나방 (*Adoxophyes orana fasciata*), 차애모무늬잎말이나방 (*Adoxophyes honmai*), 차잎말이나방 (*Homona magnanima*), 검모무늬잎말이나방 (*Archips fuscocupreanus*), 코드린나방 (*Cydia pomonella*) 등; 가는나방류 (*Gracillariidae*), 예컨대, 동백가는나방 (*Caloptilia theivora*), 사과굴나방 (*Phyllonorycter ringoniella*) 등; 심식나방류 (*Carposinidae*), 예컨대, 복숭아심식나방 (*Carposina niponensis*) 등; 굴나방류 (*Lyonetiidae*), 예컨대, 은무늬굴나방류 (*Lyonetia* spp.) 등; 독나방류 (*Lymantriidae*), 예컨대, 매미나방류 (*Lymantria* spp.), 독나방류 (*Euproctis* spp.) 등; 집나방류 (*Yponomeutidae*), 예컨대, 배추좀 나방 (*Plutella xylostella*) 등; 빨나방류 (*Gelechiidae*), 예컨대, 목화다래나방 (*Pectinophora gossypiella*), 감자빨나방 (*Phthorimaea operculella*) 등; 불나방류 (*Arctiidae*), 예컨대, 미국흰불나방 (*Hyphantria cunea*) 등; 곡식좀나방류 (*Tineidae*), 예컨대, 옷좀나방 (*Tinea translucens*) 등);

15 - 총채벌레목 (*Thysanoptera*), 예컨대, 다음을 포함함: 꽃노랑총채벌레 (*Frankliniella occidentalis*), 오이총채벌레 (*Thrips palmi*), 볼록총채벌레 (*Scirtothrips dorsalis*), 파총채벌레 (*Thrips tabaci*), 대만총채벌레 (*Frankliniella intonsa*), 담배총채벌레 (*Frankliniella fusca*) 등;

 - 쌍시류 (*Diptera*) (예컨대, 다음을 포함함:

20 굴파리류 (*Agromyzidae*), 예컨대, 고자리파리 (*Hylemya antiqua*), 씨고자리파리 (*Hylemya platura*), 벼잎굴파리 (*Agromyza oryzae*), 벼애잎굴파리 (*Hydrellia griseola*), 벼노랑굴파리 (*Chlorops oryzae*), 아메리카잎굴파리 (*Liriomyza trifolii*) 등; 멜론파리 (*Dacus cucurbitae*), 지중해과실파리 (*Ceratitis capitata*) 등);

 - 초시류 (*Coleoptera*), 예컨대, 점박이 무당벌레 (*Epilachna*

25 *vigintioctopunctata*), 오이잎벌레 (*Aulacophora femoralis*), 벼룩잎벌레 (*Phyllotreta striolata*), 벼잎벌레 (*Oulema oryzae*), 벼뿌리바구미 (*Echinocnemus squameus*), 벼물바구미 (*Lissorhoptrus oryzophilus*), 목화바구미 (*Anthonomus grandis*), 팔바구미 (*Callosobruchus chinensis*), 헌팅 바구미 (*Sphenophorus venatus*), 왜콩풍뎅이 (*Popillia japonica*), 구리풍뎅이 (*Anomala cuprea*), 옥수수잎벌레류 (*Diabrotica* spp.),

30 콜로라도감자잎벌레 (*Leptinotarsa decemlineata*), 방아벌레류 (*Agriotes* spp.), 켈런벌레

(*Lasioderma serricorne*) 등;

- 메뚜기류 (Orthoptera), 예컨대, 땅강아지 (*Grylotalpa africana*), 벼메뚜기 (*Oxya yezoensis*), 벼메뚜기 (*Oxya japonica*) 등;

- 막시류 (Hymenoptera), 예컨대, 무잎벌 (*Athalia rosae*), 가위개미(일개미)류 (5 *Acromyrmex* spp.), 불개미류 (*Solenopsis* spp.) 등;

- 이목 (Phthiraptera), 예컨대, 소 이 (*Damalinia bovis*, *Haematopinus eurysternus*, *Linognathus vituli*), 돼지 이 (*Haematopinus suis*) 등;

- 진드기류 (Acarina) (예컨대, 다음을 포함함:

응애류 (*Tetranychidae*), 예컨대, 점박이응애 (*Tetranychus urticae*), 굴응애 (10 *Panonychus citri*), 나무응애 류 (*Oligonychus* spp.) 등; 흑응애류 (*Eriophyidae*), 예컨대, 굴녹응애 (*Aculops pelekassi*); 먼지응애류 (*Tarsonemidae*), 예컨대, 차먼지응애 (*Polyphagotarsonemus latus*); 지응애류 (*Tenuipalpidae*); 치레응애류 (*tuckerellidae*); 가루진드기류 (*Acaridae*), 예컨대, 긴털가루진드기 (*Tyrophagus putrescentiae*) 등; 먼지진드기 류 (*Pyroglyphidae*), 예컨대, 큰다리먼지진드기 (15 *Dermatophagoides farinae*), 세로무늬먼지진드기 (*Dermatophagoides ptrebyssus*) 등; 발톱진드기류 (*Cheyletidae*), 예컨대, 짧은빛살발톱진드기 (*Cheyletus eruditus*), 발톱진드기 (*Cheyletus malaccensis*), 케일레투스 무레이 (*Cheyletus moorei*) 등; 움진드기류 (*scabies mites*), 예컨대, 움진드기 (*Sarcoptes scabiei*) 등;

선충류 (Nematodes), 예컨대, 소나무재선충 (*Bursaphelenchus xylophilus*),

20 뿌리혹선충 (*Meloidogyne* spp.) 벼잎선충 (*Aphelenchoides besseyi*), 딸기아선충 (*Nothotylenchus acris*), 개구충 (*Ancylostoma caninum*), 모두충 (*Capillaria* spp.), 개사상충 (*Dirofilaria immitis*), 가축에 기생하는 선충류 (roundworm) 등.

상기 작물은 해충에 의하여 피해를 입을 수 있는 모든 식물일 수 있다.

상기 작물에 적용하는 단계는 침지, 분사, 도포 등의 통상적인 모든

25 방법에 의하여 수행될 수 있다.

본 명세서에 기재된 유전자 서열 및 아미노산 서열은 기능성 동등성을 유지하는 한, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 96% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 경우를 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

【발명의 효과】

본 발명에서 제공된 재조합 균주를 이용하여 밀베마이신을 대량으로 생산할 수 있으며, 이에 의해 생산된 밀베마이신은 농업 및 동물의약품 분야에 폭넓게 활용될 수 있다.

5

【도면의 간단한 설명】

도 1은 일 실시예에 따른 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 *milA1* 유전자의 구성을 나타낸 것이다.

도 2는 일 실시예에 따른 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 *milA1* 유전자를 확보하는 과정을 나타낸 것이다.

도 3은 pGEMB2-MA-DOWN-fu 벡터를 구성하는 염기서열을 나타낸 것이다.

도 4a 내지 도 4c는 일 실시예에 따른 pCR2.1-*milA1*-AC2 벡터를 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

도 5는 일 실시예에 따른 pCR2.1-Adu-M1Age 벡터를 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

도 6은 일 실시예에 따른 pCR2.1-Adu-*milA1*-Ac2 벡터를 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

도 7a는 일 실시예에 따른 *milA1* integration 벡터가 도입된 균주에서 교차를 통해 *milA1* 유전자가 삽입되는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 7b는 일 실시예에 따른 *milA1* integration 벡터가 도입된 균주에서 *milA1*이 성공적으로 삽입되었는지를 확인한 결과이다.

도 8은 일 실시예에 따른 *S. avermitilis* DBM-01 균주의 배양액으로부터 생성된 물질을 분석한 HPLC 결과를 나타낸다.

도 9a 및 도 9b는 일 실시예에 따른 pCR2.1-A3Mmo7A 및 pCR2.1-A3Mmo7B 벡터를 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

도 10a는 일 실시예에 따른 모듈7 교체 벡터가 도입된 균주에서 교차를 통해 모듈7 유전자가 삽입되는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 10b는 일 실시예에 따른 모듈7 교체 벡터가 도입된 균주에서 모듈 7이 성공적으로 삽입되었는지를 확인한 결과이다.

도 11a 내지 도 11c는 실시예에 따른 DBM-03-A와 DBM-03-B가 생성한

30

물질을 분석한 HPLC 분석 결과를 보여준다. 형성된 각 peak 중 retention time이 표기된 peak는 Milbemycin 표준품과 동일한 UV-흡광패턴 보여주는 것이다. 도 11a는 밀베마이신 표준품의 HPLC 분석결과, 도 11b는 *S. avermitilis* DBM-03-A가 생성한 물질의 HPLC 분석결과, 도 11c는 *S. avermitilis* DBM-03-B가 생성한 물질의 HPLC 분석결과를 각각 나타낸다.

도 12는 일 실시예에 따른 모듈7 치환 균주의 배양액으로부터 생성된 물질을 분석한 HPLC 결과 및 각 피크에서 생성된 물질을 나타낸다.

도 13은 aveA3 유전자와 milA3 유전자의 AT-DH 모듈간 영역의 코딩 유전자 부위 및 KR-ACP 모듈간 영역의 코딩 유전자 부위의 염기서열 분석 결과를 보여준다.

도 14는 일 실시예에 따른 milA3의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인까지의 영역을 코딩하는 유전자 부위를 포함하는 pD7K9milA3 벡터의 제작 과정을 모식적으로 보여준다.

도 15는 일 실시예에 따른 milA3 삽입 벡터 pD7K9milA3가 삽입된 스트렙토마이세스 아베미틸리스 균주의 제작 과정을 모식적으로 보여준다.

도 16은 일 실시예에 따라서 제작된 *S. avermitilis* DBM-03-C 균주의 생성 물질의 HPLC 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 17a 내지 17f는 일 실시예에 따라서 제작된 *S. avermitilis* DBM-03-C 균주의 생성 물질의 UPLC-qTOF-HR-MS 분석 결과를 보여주는 그래프이다 (도 17a: 밀베마이신 A3; 도 17b: 밀베마이신 A4; 도 17c: 밀베마이신 D; 도 17d: 밀베마이신 alpha2; 도 17e: 밀베마이신 alpha4; 도 17f: 밀베마이신 G).

도 18a-18c는 아베멕틴과 밀베마이신의 분자구조 차이 및 이를 유발하는 유전자의 구성을 보여주는 그림이고, 도 18d는 밀베마이신 폴리케타이드 합성효소 유전자군 (gene cluster)과 아베멕틴 폴리케타이드 합성효소 유전자군을 비교하여 보여주는 그림이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. milA1 삽입 벡터(milA1 integration vector) 제작

밀베마이신 생산 균주인 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 milA1 유전자를 *S. avermitilis* SA-01의 aveA1에 치환하기 위한 벡터를 제조하였다. 상기 벡터는 milA1 유전자 전체를 포함하고, 5 통합을 위한 상동성을 가지는 aveA1 유전자의 upstream 및 downstream 지역이 milA1의 양쪽 말단에 붙여진 형태로 구성하였다. 이하, 벡터 제작 과정을 상세히 설명한다.

1-1. milA1 유전자 확보

10 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739) genomic DNA로부터 milA1 유전자를 확보하였다. 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 경우 밀베마이신 생합성 유전자들의 DNA 염기서열이 알려져 있지 않기 때문에, NCBI에 등록된 스트렙토마이세스 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*; Accession no. FJ952082) 또는 15 스트렙토마이세스 빙청젠시스(*Streptomyces bingchengensis*; Accession no. CP002047.1)의 밀베마이신 생합성 유전자군의 염기서열을 기반으로 프라이머를 디자인하여 유전자를 증폭하여 이용하였다. 또한, 밀베마이신 생합성에 관여하는 폴리케타이드 생합성효소의 유전자는 매우 크고 높은 GC비율을 갖기 때문에 한 번에 증폭하는 것은 매우 어려운 일로 이를 극복하기 위해 유전자를 임의의 두 20 구역으로 나눠 증폭하였다 (도 1).

우선, milA1 유전자의 N-terminus쪽의 단편을 확보하기 위하여, 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 genomic DNA를 A1NT2-F 프라이머(GAACCGTGTGCGGAAGAA: 서열번호 1) 및 A1CT1-R 프라이머(ATCAGGTCGGTGAGACGGT: 서열번호 2)를 사용하여 PCR(95도에서 5분; 25 98도에서 20초, 60도에서 20초 및 68도에서 10분으로 30 사이클; 및 68도에서 10분)을 통해 증폭한 후 pCR2.1 벡터(TA 클로닝 벡터)에 클로닝하였다. 이 벡터를 pCR2.1-NM으로 명명하였다. 다음으로, milA1 유전자의 C-terminus쪽의 단편을 확보하기 위하여, 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 genomic DNA를 A1CT1-F 프라이머(GCAAGGTCGTCTTTGTGTGC: 30 서열번호 3) 및 A1CT2-R 프라이머(CCACCAACTCGATATGGGC: 서열번호 4)를

사용하여 PCR(95도에서 5분; 98도에서 20초, 60도에서 20초 및 68도에서 10분으로 30 사이클; 및 68도에서 10분)을 통해 증폭한 후 pCR2.1 벡터(TA 클로닝 벡터)에 클로닝하였다. 이 벡터를 pCR2.1-CT으로 명명하였다. 상기 제조한 pCR-NM과 pCR-CT 벡터를 각각 NcoI 제한효소로 처리하여 단편(NM fragment, CT fragment)을 확보한 후(도 1), 이들 단편을 연결(ligation)하여 하나의 벡터를 제조하였으며, 이를 pCR2.1-milA1으로 명명하였다(도 2; milA1 gene 서열 (서열번호: 70) 포함). 이때, 연결된 단편의 ORF의 염기서열을 확인한 결과, 스트렙토마이세스 밍첵젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*)의 염기서열과 100% 일치하는 것을 확인하였다.

10

1-2. C-terminus 쪽 arm 제작

milA1의 모듈 2의 위치에 해당하는 일부 DNA sequence와, aveA1 docking domain으로 추정되는 부위, 및 aveA2 sequence를 포함하는 DNA를 인공적으로 합성하였고, 합성된 DNA는 pGEM vector에 도입하여 pGEMB2-MA_DOWN_fu를 제작하였다(도 3; 서열번호 35 내지 서열번호 37). 상기 제작된 pGEMB2-MA_DOWN_fu를 BamHI/HindIII 제한효소로 잘라 insert를 분리한 후, BamHI/HindIII로 자른 pCR2.1-CT에 연결하여 milA1의 C-terminal 부위가 aveA1의 C-terminal 부위로 교체된 pCR2.1-CT-Ac 벡터를 제작하였다.

pCR2.1-CT-Ac 벡터의 결합부위를 연장하기 위하여, *S. avermitilis* SA-01균주의 genomic DNA로부터 A2-404F 프라이머(GGCGCTGGCAATGGACC: 서열번호 5) 및 A2PH-1500R 프라이머(GATTACGCCAAGCTTGGCTGATTCTCCCGGACG: 서열번호 6)를 이용하여 aveA2의 N-terminus region을 PCR 증폭하고, 이를 infusion ligation을 통해 pCR2.1-CT-AC의 3' 말단에 결합하여, pCR2.1-CT-Ac2 벡터를 제작하였다.

pCR2.1-CT-Ac2 벡터와 pCR2.1-NM 벡터를 각각 NdeI/XbaI 제한효소로 처리한 후 결합하여, milA1 유전자의 C-terminal부분이 aveA1의 것으로 치환된 milA1 유전자를 갖는 pCR2.1-milA1-Ac2 벡터를 제작하였다(도 4a 내지 도 4c 참조).

30

1-3. N-terminus 쪽 arm 제작

S. avermitilis SA-01 균주의 genomic DNA로부터 AveD2-F 프라이머(GATGACGGAAATCCCCTGG: 서열번호 7), AveD2-R 프라이머(AGAATGAAAGGAGCGCGA: 서열번호 8), MAINU-F 프라이머(GAGGACACAGCTCAGTTGCCCAAAGCCCAGAAC: 서열번호 9), M1Age-R 프라이머(TGATCGAAGAGCCGGGAGT: 서열번호 10), PHR-M1Ag 프라이머(CCGGCTCTTCGATCAAGCTTGGCGTAATCATGG: 서열번호 11) 및 PXF-AD2 프라이머(GGGATTTCCGTCATCAAGCTTGGCGTAATCATGG: 서열번호 12)를 이용하여 N-terminus arm에 해당하는 3개의 단편을 각각 PCR 증폭하고, 이를 infusion ligation을 통해 결합하여 pCR2.1-Adu-M1Age 벡터를 제작하였다(도 5).

10

1-4. milA1 유전자에 양쪽 arm이 결합된 형태의 vector 제작

pCR2.1-milA1-Ac2 벡터와 pCR2.1-Adu-M1Age 벡터를 XmnI 제한효소로 처리한 후 이를 infusion ligation을 통해 결합하여, pCR2.1-Adu-milA1-Ac2 벡터(서열번호 79)를 제작하였다(도 6). 이를 아베멕틴 생산균주로 도입하기 위해 스트렙토마이시스-대장균 셔틀벡터인 pKC1139 벡터(M. Bierman et al., Gene, 116:43-49)와 pCR2.1-Adu-milA1-Ac2 벡터를 각각 XbaI, HindIII 제한효소로 처리한 후 연결(ligation)하여 pKC1139에 Adu-milA1-Ac2 구조가 들어가 있는 형태인, pKC-Adu-milA1-Ac2 벡터를 제작하였다.

15

20

실시예 2. milA1 치환 균주 제작 및 생성물질 확인

milA1 integration 벡터를 S. avermitilis SA-01 균주 내로 도입시키고, 상동재조합이 일어나도록 유도하여 S. avermitilis SA-01 균주의 aveA1 유전자가 milA1 유전자로 치환된 형태의 균주를 확보하고, 배양을 통해 생성되는 신규물질을 확인하였다.

25

2-1. 접합법을 통한 형질전환

pKC-Adu-milA1-Ac2 벡터를 포함하고 있는 E. coli 균주(ET12567/pUZ8002 strain)를 chloramphenicol, kanamycin, apramycin을 넣은 LB 액체배지 3ml에 접종한 후 Shaking incubator에서 37, 200rpm 조건으로 18~24시간 배양하였다. 멸균된 250ml flask에 25ml LB broth를 위의 항생제와 함께 넣고, 배양액 250ul을 접종한 뒤 동일

30

조건으로 3시간 배양하였다. OD가 0.4~0.5에 이르렀을 때, 배양을 종료하고 5000rpm 에서 5분간 원심분리하였고(4 조건), Pellet만 취하여 냉각된 LB broth 1ml에 풀어주고 세척하여 균체 현탁액을 확보하였다. 또한, *S. avermilitis* SA-01 균주를 germination 하기 위하여, ISP4 agar plate에 host로 사용할 방선균을 7일 이상 배양하고, Spore를 loop로 긁어서 2X TY 배지에 풀어주고, 50 heating block에 넣고 10분간 activation을 실시하였다. 이와 같이 준비된 *E. coli* 균주 500ul과 germination된 host 균주 *S. avermilitis* SA-01 500ul을 microtube에 넣고 inverting으로 섞고, 8000rpm 에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 방법으로 접합(conjugation)을 유도하여, pKC-Adu-milA1-Ac2 벡터를 *S. avermilitis* SA-01 균주 내로 도입시켰다.

2-2. 교차에 의한 유전자 치환

상기와 같이 pKC-Adu-milA1-Ac2(Et) 벡터가 도입된 균주에서 1차 교차를 유도하여 벡터 전체가 균주의 염색체에 삽입되도록 하였다. 이를 위하여, apramycin이 25ug/ml 농도로 첨가된 ISP-4 고체배지를 제조한 후, pKC-Adu-milA1-Ac2 벡터 도입에 의해 생성된 colony를 취한 후, 준비된 고체 배지에 streaking 하였다. 이후 고온에 민감한 pKC1139 벡터의 성질을 이용하여 벡터가 복제 되는 것을 막기 위하여 37에서 7일간 배양하였다.

2-3. 2차 교차

상기 1차 교차가 일어난 균주에서 aveA1 유전자를 milA1 유전자로 치환하기 위해 2차 교차를 유도하였다(도 7). 이를 위하여, apramycin이 25ug/ml 농도로 첨가된 ISP-4 고체배지와 항생제가 첨가 되지 않은 배지를 각각 제조하고, 1차 교차를 유도한 균주를 ISP-4 고체 배지에 도말하여 2차 교차를 유도한 후, apramycin 저항성 유무로 후보 균주를 선발하였다. 스크리닝을 통해 확보한 후보 균주의 genomic DNA를 추출하여, aveA1, milA1 일부지역을 확인할 수 있는 프라이머(표 1)를 사용하여 유전자의 교체가 정확하게 이루어졌는지 확인하였다. 이와 같이 최종 균주를 선발하고 *S. avermilitis* DBM-01로 명명하였으며, KCTC(Korean Collection for Type Cultures, 한국생명공학연구원 미생물자원센터)에 기탁하여 2015년 8월 31일자로 기탁번호 KCTC12889BP 를 부여받았다.

【표 1】

Primer Name	Sequence	용도
aveFi-F	GGCAACACCAACCGTGAGAT(서열번호 13)	N-terminus fusion 확인
milA1i-R	GATGACCGAGGAGTGGAAACG(서열번호 14)	
milA1i-F	GTACTGGACCTGTTTCGAGCG(서열번호 15)	C-terminus fusion 확인
aveA2i-R2	ATGAATGCGGTCTTTCCTGC(서열번호 16)	
aveA1C-F	GGAATCGCTGATTCGGACAA(서열번호 17)	aveA1 일부지역 확인
aveA1C-R	GGAGCAGATGAATGCCCTCT(서열번호 18)	
milA1C-F	CCTGTGGGAGTTCATCACCG(서열번호 19)	milA1 일부지역 확인
milA1C-R	CGAGATTGTGGTGGACGAGG(서열번호 20)	

2-4. *S. avermitilis* DBM-01의 생성물질 확인

S. avermitilis DBM-01 균주를 배양하기 위한 종균 배양용 배지와 생산

5 배양용 배지를 각각 제조하였다. 종균 배지를 제조하기 위하여, soluble starch 30g/L(Junsei, Japan), yeast extract 15g/L(Duchefa, 네덜란드), KH₂PO₄ 0.4g/L(Junsei)의 농도가 되도록 적정량의 DW에 혼합한 후, pH를 7.2로 맞추고 121, 15분간 고압살균을 수행하였다. 충분히 식은 후, 멸살한 Corn steep liquor(Sigma)를 5g/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 또한, 생산 배지를 제조하기 위하여, soluble starch 80g/L, soybean meal 10g/L(Sigma), skim milk 15g/L(Difco), KH₂PO₄ 0.5 g/L의 농도가 되도록 적정량의 DW에 혼합한 후, pH를 7.2로 맞추고, 121, 15분간 고압살균을 실시하였다.

10 생산 배양에 접종할 균주의 양을 충분히 만들기 위해, 상기 제조한 종균 배지 25ml을 멸균된 250ml baffled flask에 넣고, 균주 mycelium을 agar plate로부터 1loop씩 떼서 종균 배지에 접종하였다. 230 rpm 및 28도 조건하에서 48시간 동안 배양하였다. 또한, 생산배지 25ml을 멸균된 250ml non-baffled flask 넣고 종균 배양액 1.25ml을 접종한 후, 230 rpm 및 28도 조건하에서 10일 동안 배양하였다.

15 생산 배양액으로부터 생성된 물질을 추출하기 위하여, 유기용매(acetonitrile : MeOH = 1 : 1 혼합 용액) 1.5ml과 배양액 0.5ml을 섞고 충분히 vortexing하였다. 5분간 sonication 한 후, 1시간 동안 교반하였다. 12000rpm에서 5분간 원심분리한 후

20 상등액만 취하여 분석하였다.

추출한 시료를 아래의 조건에서 HPLC/UVD 분석을 통해 분석하였다.

- Mobile phase : Acetonitrile/Water(v/v)= 40/60, v/v(5min), 90/10, v/v(30min), 90/10, v/v(10min)

- Flow rate : 1 ml/min

- wavelength : 245 nm

- Run time : 45 min

또한, DBM-01을 배양하여 나온 생성 물질 중 신규한 물질 4종(도 8에서

- 5 IV1, IV2, IV3, IV5로 표시함)에 대해 NMR 분석을 실시하여 구조를 분석한 결과는 다음과 같다:

600 MHz in CD₃OD(the internal references residual solvent protons and carbons; δ_H 4.78, δ_C 49.15)

- 10 IV1: δ_H : 3.16(m, H-2), 5.35(d, $J = 1.4$, H-3), 1.75(s, 3H, H-4a), 4.16(m, H-5), 3.70(m, H-6), 4.55(m, H-8a), 5.74(dd, $J = 1.9$ & 11.3, H-9), 5.81(ddd, $J = 3.4$ & 11.4 & 14.2, H-10), 5.65(ddd, $J = 1.9$ & 9.7 & 14.8, H-11), 2.59(m, H-12), 1.09(m, H-12a), 3.93(m, H-13), 1.48(s, 3H, H-14a), 5.15(m, H-15), 2.24(m, H-16), 3.63(m, H-17), 0.75(m, H-18), 1.86(m, H-18), 4.98(m, H-19), 1.14(m, H-20), 2.11(m, H-20), 1.24(m, H-22), 1.44(m, H-23), 1.52(m, H-23), 1.18(m, H-24), 0.77(d, $J = 6.6$, 3H, H-24a), 3.25(m, H-25), 1.08(m, H-26), 4.76(m, H-1'),
- 15 2.23(m, H-2'), 3.46(m, H-3'), 3.34(s, 3H, 3'-OMe), 3.12(m, H-4'), 3.76(m, H-5'), 1.17(m, H-6'), 5.26(d, $J = 3.2$, H-1''), 1.57(m, H-2''), 3.36(H-3''), 3.40(s, 3H, 3''-OMe), 3.64(m, H-4''), 2.97(m, H-5''), 1.15(m H-6'') δ_C : 173.6(C-1), 47.1(C-2), 120.3(C-3), 137.2(C-4), 19.9(C-4a), 69.1(C-5), 82.3(C-6), 82.2(C-7), 141.9(C-8), 68.7(C-8a), 121.8(C-9), 126.7(C-10), 138.4(C-11), 41.2(C-12), 21.0(C-12a), 82.7(C-13), 136.3(C-14), 15.4(C-14a), 120.1(C-15), 35.2(C-16),
- 20 69.1(C-17), 38.1(C-18), 69.9(C-19), 42.7(C-20), 99.1(C-21), 30.7(C-22), 36.9(C-23), 38.0(C-24), 18.2(C-24a), 72.7(C-25), 19.8(C-26), 96.3(C-1'), 36.2(C-2'), 79.7(C-3'), 57.0(3'-OMe), 82.3(C-4'), 69.9(C-5'), 19.1(C-6'), 99.9(C-1''), 37.3(C-2''), 79.5(C-3''), 57.6(3''-OMe), 69.2(C-4''), 77.1(C-5''), 18.3(C-6''). HRESQTOF m/z 855.4507 [M+Na]⁺(cald for C₄₅H₆₈O₁₄Na)

- 25 IV2: δ_H : 3.16(m, H-2), 5.36(d, $J = 1.5$, H-3), 1.75(s, 3H, H-4a), 4.17(m, H-5), 3.71(m, H-6), 4.55(m, H-8a), 5.75(dt, $J = 2.2$ & 11.3, H-9), 5.82(dd, $J = 11.2$ & 14.9, H-10), 5.65(dd, $J = 9.8$ & 14.9, H-11), 2.59(m, H-12), 1.10(d, $J = 7.0$, H-12a), 3.92(m, H-13), 1.48(s, 3H, H-14a), 5.13(m, H-15), 2.44(m, H-16), 3.62(m, H-17), 0.77(m, H-18), 1.85(m, H-18), 5.00(m, H-19), 1.16(m, H-20), 2.13(m, H-20), 1.26(m, H-22), 1.66(m, H-22), 1.15(m, H-23), 1.43(m,
- 30 H-23), 1.24(m, H-24), 0.76(d, $J = 6.5$, 3H, H-24a), 3.05(m, H-25), 1.29(m, H-26), 0.93(t, $J = 7.3$, H-27), 4.75(m, H-1'), 2.24(m, H-2'), 3.56(m, H-3'), 3.32(s, 3H, 3'-OMe), 3.12(m, H-4'), 3.65(m, H-5'), 1.18(d, $J = 6.2$, H-6'), 5.26(d, $J = 3.2$, H-1''), 1.56(m, H-2''), 3.35(H-3''), 3.35(s, 3H, 3''-OMe), 3.64(m, H-4''), 2.94(m, H-5''), 1.15(d, $J = 6.2$, H-6'') δ_C : 173.6(C-1), 47.1(C-2),

120.1(C-3), 137.2(C-4), 19.9(C-4a), 69.1(C-5), 82.2(C-6), 82.0(C-7), 142.0(C-8), 68.6(C-8a),
121.8(C-9), 126.7(C-10), 138.4(C-11), 41.2(C-12), 20.9(C-12a), 83.2(C-13), 136.5(C-14),
15.3(C-14a), 120.3(C-15), 35.1(C-16), 69.1(C-17), 38.1(C-18), 70.1(C-19), 42.9(C-20),
99.0(C-21), 30.9(C-22), 29.2(C-23), 35.6(C-24), 18.2(C-24a), 77.5(C-25), 26.9(C-26),
5 10.6(C-27), 96.4(C-1'), 36.2(C-2'), 80.9(C-3'), 56.9(3'-OMe), 82.2(C-4'), 70.1(C-5'), 19.1(C-
6'), 99.9(C-1"), 36.8(C-2"), 79.4(C-3"), 57.6(3"-OMe), 70.2(C-4"), 77.5(C-5"), 18.2(C-6").
HRESQTOF m/z 869.4663 $[M+Na]^+$ (cald for $C_{46}H_{70}O_{14}Na$)

IV3: δ_H : 3.16(m, H-2), 5.42(d, $J = 1.4$, H-3), 1.74(s, 3H, H-4a), 3.92(m, H-5), 3.41(s,
10 5-OMe), 3.90(m, H-6), 4.58(m, H-8a), 5.77(dd, $J = 1.9$ & 11.3, H-9), 5.85(ddd, $J = 3.4$ & 11.4
& 14.2, H-10), 5.68(ddd, $J = 1.9$ & 9.7 & 14.8, H-11), 2.59(m, H-12), 1.09(m, H-12a), 3.90(m,
H-13), 1.48(s, 3H, H-14a), 5.17(m, H-15), 2.24(m, H-16), 3.63(m, H-17), 0.75(m, H-18),
1.86(m, H-18), 5.00(m, H-19), 1.14(m, H-20), 2.11(m, H-20), 1.24(m, H-22), 1.44(m, H-23),
1.52(m, H-23), 1.18(m, H-24), 0.77(d, $J = 6.6$, 3H, H-24a), 3.25(m, H-25), 1.08(m, H-26),
15 4.76(m, H-1'), 2.23(m, H-2'), 3.46(m, H-3'), 3.34(s, 3H, 3'-OMe), 3.13(m, H-4'), 3.81(m, H-5'),
1.17(m, H-6'), 5.28(d, $J = 3.2$, H-1"), 1.57(m, H-2"), 3.36(H-3"), 3.40(s, 3H, 3"-OMe), 3.64(m,
H-4"), 2.97(m, H-5"), 1.15(m H-6") δ_C : 173.4(C-1), 47.0(C-2), 121.4(C-3), 135.4(C-4),
20.0(C-4a), 78.56(C-5), 57.8(5-OMe), 80.9(C-6), 82.2(C-7), 141.5(C-8), 68.7(C-8a), 121.9(C-
9), 126.7(C-10), 138.5(C-11), 41.2(C-12), 21.0(C-12a), 82.7(C-13), 136.3(C-14), 15.4(C-14a),
20 120.1(C-15), 35.2(C-16), 69.1(C-17), 38.1(C-18), 69.9(C-19), 42.7(C-20), 99.1(C-21),
30.7(C-22), 36.9(C-23), 38.0(C-24), 18.2(C-24a), 72.7(C-25), 19.8(C-26), 96.3(C-1'), 36.2(C-
2'), 79.7(C-3'), 57.0(3'-OMe), 82.3(C-4'), 69.9(C-5'), 19.1(C-6'), 99.9(C-1"), 37.3(C-2"),
79.5(C-3"), 57.6(3"-OMe), 69.2(C-4"), 77.1(C-5"), 18.3(C-6"). HRESQTOF m/z 869.4662
 $[M+Na]^+$ (cald for $C_{46}H_{70}O_{14}Na$)

25

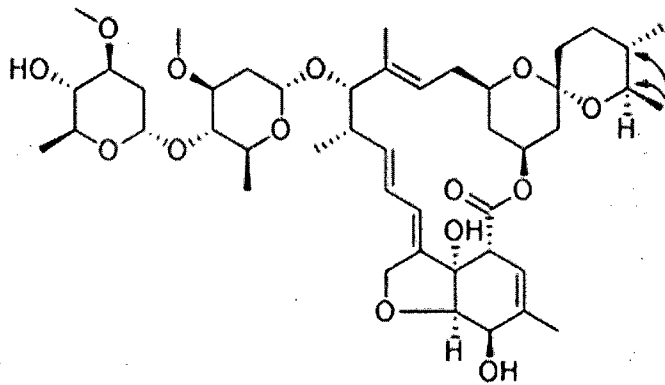
IV5: δ_H : 3.16(m, H-2), 5.41(d, $J = 1.5$, H-3), 1.74(s, 3H, H-4a), 3.93(m, H-5), 3.41(s,
5-OMe), 3.91(m, H-6), 4.57(m, H-8a), 5.76(dt, $J = 2.2$ & 11.3, H-9), 5.82(dd, $J = 11.2$ & 14.9,
H-10), 5.66(dd, $J = 9.8$ & 14.9, H-11), 2.59(m, H-12), 1.11(d, $J = 7.0$, H-12a), 3.92(m, H-13),
1.47(s, 3H, H-14a), 5.13(m, H-15), 2.43(m, H-16), 3.62(m, H-17), 0.78(m, H-18), 1.85(m, H-
18), 5.00(m, H-19), 1.15(m, H-20), 2.13(m, H-20), 1.25(m, H-22), 1.66(m, H-22), 1.14(m, H-
30 23), 1.43(m, H-23), 1.24(m, H-24), 0.76(d, $J = 6.5$, 3H, H-24a), 3.04(m, H-25), 1.29(m, H-26),
0.93(t, $J = 7.3$, H-27), 4.75(m, H-1'), 2.24(m, H-2'), 3.56(m, H-3'), 3.32(s, 3H, 3'-OMe),
3.12(m, H-4'), 3.65(m, H-5'), 1.18(d, $J = 6.2$, H-6'), 5.26(d, $J = 3.2$, H-1"), 1.56(m, H-2"),
3.35(H-3"), 3.35(s, 3H, 3"-OMe), 3.64(m, H-4"), 2.94(m, H-5"), 1.15(d, $J = 6.2$, H-6") δ_C :

173.5(C-1), 47.1(C-2), 121.5(C-3), 135.3(C-4), 20.2(C-4a), 78.4(C-5), 57.7(5-OMe), 80.8(C-6), 82.1(C-7), 141.4(C-8), 68.8(C-8a), 121.9(C-9), 126.8(C-10), 138.3(C-11), 41.2(C-12), 21.0(C-12a), 83.3(C-13), 136.4(C-14), 15.3(C-14a), 120.4(C-15), 35.2(C-16), 69.1(C-17), 38.0(C-18), 70.2(C-19), 42.7(C-20), 99.1(C-21), 30.7(C-22), 29.2(C-23), 35.6(C-24), 18.2(C-24a), 77.5(C-25), 26.8(C-26), 10.6(C-27), 96.4(C-1'), 36.2(C-2'), 80.9(C-3'), 56.9(3'-OMe), 82.2(C-4'), 70.1(C-5'), 19.1(C-6'), 99.9(C-1''), 36.8(C-2''), 79.4(C-3''), 57.6(3''-OMe), 70.2(C-4''), 77.5(C-5''), 18.2(C-6''). HRESQTOF m/z 883.4823 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{47}H_{72}O_{14}Na$)

Ivermectin 유도체 1(IV1)의 구조는 화학식 1과 같이 결정하였으며, HMBC correlation을 화살표로 표시하였다.

[화학식 1]

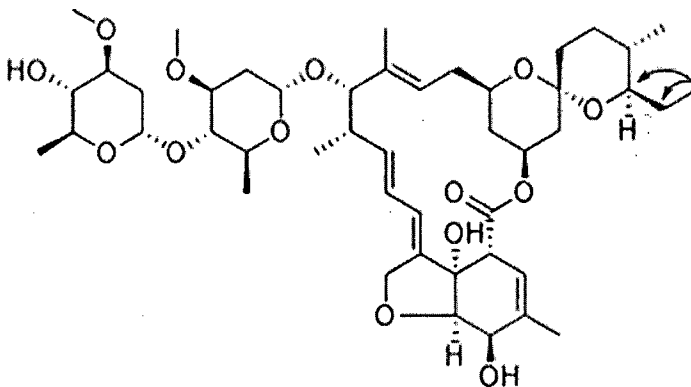
22,23-dihydro-25-methyl-avermectin



Ivermectin 유도체 2(IV2)의 구조는 화학식 2와 같이 결정하였으며, HMBC correlation을 화살표로 표시하였다.

[화학식 2]

22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin

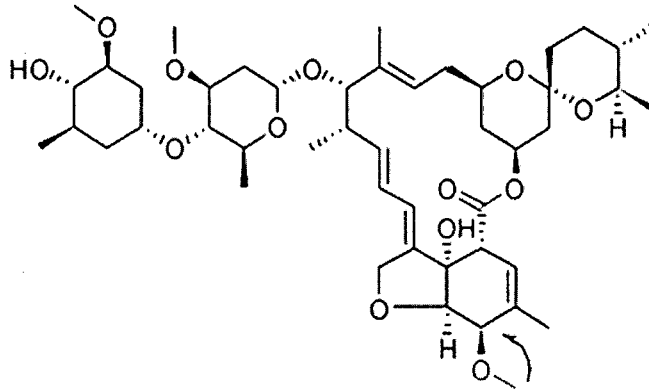


Ivermectin 유도체 3(IV3)의 구조는 화학식 3과 같이 결정하였으며, HMBC

correlation을 화살표로 표시하였다.

[화학식 3]

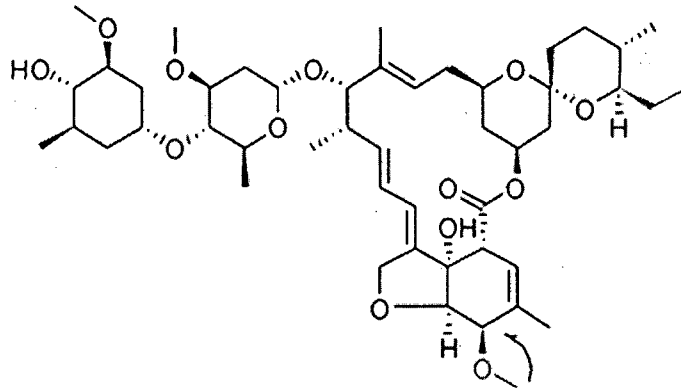
5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin



- 5 Ivermectin 유도체 5(IV5)의 구조는 화학식 4와 같이 결정하였으며, HMBC correlation을 화살표로 표시하였다.

[화학식 4]

5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin



- 10 결과적으로, 상기 물질의 분석을 통해 avermectin 생산 균주인 *S. avermitilis* SA-01의 avermectin 생산 유전자군의 첫번째 유전자인 *aveA1*을 *S. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*의 밀베마이신 생산 유전자군의 첫번째 유전자인 *milA1*으로 교체하였을 때, 숙주 균주와 다른 형태의 물질 생산 패턴을 나타냄을 확인할 수 있었으며, *milA1*이 삽입된 균주는 각각 22,23-dihydro-25-methyl-avermectin (CAS No. 137330-81-5; Ref: DE4031039), 22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin (CAS No. 71972-13-9; Ref: FR2387231), 22,23-dihydro-25-isopropyl-avermectin(즉, Ivermectin B1b, CAS NO. 70209-81-3; Ref. US4199569), 5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin, 5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin, 및 5-methoxy-22,23-dihydro-25-isopropyl-avermectin

(즉, Ivermectin A1b; Ref. US4199569)을 생성함을 알 수 있었다.

이들 중, 5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-ivermectin (화학식 3; IV3) 및 5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-ivermectin (화학식 4; IV5)의 경우, 물질 구조를 이용한 SciFinder 검색에서 일치하는 구조를 찾지 못하였는 바, 신규 화합물인 것으로 판단되었다.

2-5. S. avermitilis DBM-01 생성물질인 IV3와 IV5의 생물학적 활성

상기 실시예 2-4에서 신규 화합물로 확인된 IV3(화학식 3) 및 IV4(화학식 4)의 생물학적 활성을 평가하여, 상기 화합물류가 해충의 유충 및 성충, 특히 점박이응애와 배추좀나방의 해충 구제 (살충)에 활성효과가 있음을 확인하였다.

상기 화합물류의 살충 활성을 측정하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 상기 시험 화합물 IV3 및 IV4을 각각 용매인 acetone에 용해시키고 농도가 100ppm이 되도록 용해시켜 stock를 만든 후, 각 시험에서의 처리 농도 (표 2 및 표 3 참조)가 되도록 희석하여 사용하였다. 점박이 응애의 경우, 성충을 대상으로 하였으며, 상기 준비된 희석액을 배추 (Φ5cm/disk)에 1ml을 spray 처리하고, 1 내지 2일 후 생충수를 측정하였다. 이 경우, 대조약제는 아바멕틴(Sigma)을 사용하였다. 배추좀나방의 경우, 2령충을 대상으로 하였으며, 배추(Φ5cm/disk) 절편에 침지 처리한 후 시험충을 절편당 10마리 접종하여 1 내지 2일 후 생충수를 측정 하였다. 이 경우, 대조약제는 에바멕틴(Sigma)를 사용하였다.

상기 얻어진 결과를 아래의 표 그 결과를 표 2 및 표 3에 각각 나타내었다.

【표 2】

점박이 응애 성충에 대한 IV3 및 IV5의 생물학적 활성 (살충률)

물질	처리 농도	처리기간	
		1 일차	2 일차
IV3	0.6 ppm	100.0	100.0
IV5		76.7	86.7
abamectin		100.0	100.0

【표 3】

배추좀나방 유충에 대한 IV3, IV5의 생물학적 활성 (살충률)

물질	처리 농도	처리기간 (2 일차)
IV3	0.06 ppm	100
IV5		100
Abamectin		96.7

상기 표 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 화합물 IV3 및 IV4는 대조약물과 비교하여 동등 이상의 해충의 유충 및 성충에 대한 방제 활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

5

실시예 3. 모듈 7 교체 벡터 제작

스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 milA3 유전자에 존재하는 7번 모듈을 *S. avermitilis* DBM-01의 물질 생산 유전자군의 7번 모듈과 치환하기 위한 벡터를 제조하였다. 상기 벡터는 7번 모듈 전체 또는 10 일부를 포함하고, 통합을 위한 상동성을 가지는 aveA3, aveA4 유전자의 지역이 양쪽 말단에 붙여진 형태로 구성하였다. 이하, 벡터 제작 과정을 상세히 설명한다.

3-1. 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)

genomic DNA로부터 모듈7 유전자 확보

15 모듈 7 전체와 모듈 7 중 KS(Ketosynthase) 도메인만 숙주 균주인 *S. avermitilis* DBM-01의 것을 사용한 두 가지 형태로 모듈의 치환을 계획하고 이에 따른 유전자를 확보하고자 하였다. 앞서 milA의 클로닝 경우와 마찬가지로 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 모듈 7의 염기서열이 알려져 있지 않기 때문에, NCBI에 등록된 스트렙토마이세스 20 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*) 또는 스트렙토마이세스 빙청젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*)의 milA3의 염기서열을 활용하여 프라이머를 디자인하였다.

스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739) genomic DNA로부터 모듈7에 해당하는 부위를 두 가지 형태로(A 및 B)로 클로닝하기 25 위하여, MA3-6503R 프라이머(TGCCAATGATCGCGATGGCCTCATC: 서열번호 21), MA3-104Fin(A) 프라이머(GGGTCAGTGGCACGAACGCCCATGTGATCCTCG: 서열번호 22) 및 MA3-1368Ffu(B)

프라이머(GGAGGCGTCCAGCGAACCCATCGCCATCATC: 서열번호 23)를 사용하여 PCR(95도에서 5분; 98도에서 20초, 60도에서 20초 및 68도에서 6분으로 30 사이클; 및 68도에서 10분)을 통해 증폭한 후 pCR2.1 벡터(TA 클로닝 벡터)에 클로닝하였다. 이 벡터를 pCR2.1-Mo7A, pCR2.1-Mo7B로 명명하였다 (도 9a 및 도 5 9b).

3-2. 양쪽 arm 제작

S. avermitilis DBM-01 균주의 모듈7 지역에 교차를 일으키기 위한 결합부위를 제작하였다. S. avermitilis DBM-01 균주의 genomic DNA를 아래 10 프라이머를 사용하여 증폭하여 양쪽 arm에 해당하는 부위의 fragment를 확보한 후, pCR2.1 벡터(TA 클로닝 벡터)에 각각 클로닝하였다.

AA3-8600RH : aaaagcttAACGGTGTGTGGAGCGTCAG (서열번호 24)

AA3-5597FSp : aaaactagTCGCGATCATTGGCATG (서열번호 25)

AA3-111RSp : aaaactagTCTGGACGCCTCCATGGC (서열번호 26)

15 AA3-1369RSp : aaaactagTCGTGCCACTGACCCCGAAC (서열번호 27)

AA4-2300FNs : aaatctagaGCTCCGTGCAGACCGAGAAC (서열번호 28)

벡터를 회수하여 NsiI/SpeI, SpeI/HindIII 제한효소로 각각 처리 한 후 ligation 하여 두 fragment를 붙인 형태로 양쪽 arm이 벡터 하나에 존재하도록 제작하였다. 이 벡터를 pCR2.1-armA, pCR2.1-armB 로 명명하였다(도 9).

20 확립한 pCR2.1-armA, pCR2.1-armB 벡터의 양쪽 arm 사이를 SpeI 제한효소로 자르고, pCR2.1-mo7A, pCR2.1-mo7B 벡터를 EcoRI 으로 잘라서 insert를 수득하였다. 이 두 단편을 각각 infusion ligation을 통해 결합하여 7번 모듈 교체 벡터의 구조를 완성하였다. 이 벡터를 각각 pCR2.1-A3Mmo7A, pCR2.1-A3Mmo7B로 명명하였다(도9)

25 pKC1139 벡터와 pCR2.1-A3Mmo7A, pCR2.1-A3Mmo7B 벡터를 각각 XbaI, HindIII 제한효소로 처리하고, pKC1139 벡터 fragment와 pCR2.1-A3Mmo7A, pCR2.1-A3Mmo7B 벡터의 insert fragment를 접합하여 pKC1139에 A3Mmo7A 또는 A3Mmo7B 구조가 들어가 있는 형태를 제작하였다. 이를 각각 pKC-A3Mmo7A, pKC-A3Mmo7B 벡터로 명명하였다 (도 9).

실시예 4. 모듈 7 교체 균주 제작 및 생성물질 확인

모듈7 교체 벡터를 DBM-01 균주 내로 도입시키고, 상동 재조합이 일어나도록 유도하여 *S. avermitilis* DBM-01 균주의 모듈7이 milA3의 모듈7로 치환된 형태의 균주를 확보하고, 배양을 통해 생성되는 신규물질을 확인하였다.

5

4-1. PEG-mediated protoplast transformation을 통한 벡터 도입

Lysozyme을 처리하여 protoplast를 제조하고, pKC-A3Mmo7A(110), pKC-A3Mmo7B(110) 벡터를 섞고 PEG1000를 처리하여, PEG-mediated protoplast transformation을 통해 상기 벡터를 DBM-01 균주 내로 도입하였다. 24시간 배양한 후 항생제(apramycin)를 처리하였고, 위 벡터의 apramycin 저항성 유전자인 aac 유전자를 확인 할 수 있는 aac3iv-F 프라이머(GGTTTCATGTGCAGCTCCATC: 서열번호 29) 및 aac3iv-R 프라이머(CGTCGCGGTGAGTTCAGG: 서열번호 30)를 사용하여 도입이 이루어졌음을 확인하였다.

15

4-2. *S. avermitilis* DBM-01 균주로 모듈 7의 삽입

상기와 같이 모듈7 교체 벡터의 도입이 이루어진 균주에 1차 교차를 유도하여 벡터 전체가 *S. avermitilis* DBM-01 균주의 genomic DNA에 삽입되도록 하였다(도 10). 이를 위하여, apramycin이 25 μ g/ml 농도로 첨가된 ISP-4 고체배지를 제조한 후, 벡터 도입에 의해 생성된 colony를 취한 후, 준비된 고체 배지에 streaking 하였다. 이후 고온에 민감한 pKC1139 벡터의 성질을 이용하여 벡터가 복제 되는 것을 막기 위하여 37에서 7일간 배양하였다.

20

상기 1차 교차가 일어난 균주에서 aveA3의 모듈7을 milA3 모듈7로 치환하기 위해 2차 교차를 유도하였다(도 10). 이를 위하여, apramycin이 25 μ g/ml 농도로 첨가된 ISP-4 고체배지와 항생제가 첨가 되지 않은 배지를 각각 제조하고, 1차 교차를 유도한 균주를 ISP-4 고체 배지에 도말하여 2차 교차를 유도한 후, apramycin 저항성 유무로 후보 균주를 선발하였다. 스크리닝을 통해 확보한 후보 균주의 genomic DNA를 추출하여, aveA3 내의 모듈7, 및 milA3 내의 모듈7 일부지역을 확인할 수 있는 프라이머(표 4)를 사용하여 유전자의 교체가 정확하게 이루어졌는지 확인하였다 (도 10). 이를 통해 확보된 균주 중 A3Mmo7A가 삽입된 균주를 *S. avermitilis* DBM-03-A, A3Mmo7B가 삽입된 균주를 *S. avermitilis* DBM-03-

30

B로 명명하였다. *S. avermitilis* DBM-03-A 균주는 2015년 8월 31일자로 기탁번호 KCTC12890BP 를 부여받았고, *S. avermitilis* DBM-03-B 균주는 2015년 8월 31일자로 기탁번호 KCTC12891BP 를 부여받았다.

【표 4】

Primer Name	Sequence	용도
Amo7i-F	GTTGTTCGGTGTGCTTCCG (서열번호 31)	aveA3 의 모듈 7 확인
Amo7i-R	CACATCACACGCAACAATCC (서열번호 32)	
Mmo7i-F	ACATCAGCGGCCTCTACGA (서열번호 33)	milA3 의 모듈 7 확인
Mmo7i-R	CCAGGTCCATCACTCCCTC (서열번호 34)	

5

4-4. 모듈7 치환 균주의 생성물질 확인

모듈7 치환 균주를 배양하기 위한 종균 배양용 배지와 생산 배양용 배지를 각각 제조하였다. 종균 배지를 제조하기 위하여, soluble starch 30g/L, yeast extract 15g/L, KH₂PO₄ 0.4g/L의 농도가 되도록 적정량의 DW에 혼합하여 교반기로 충분히 섞어주고, 충분히 식은 후, 멸살한 Corn steep liquor 을 5g/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 또한, 생산 배지를 제조하기 위하여, soluble starch 80g/L, soybean meal 10g/L, skim milk 15g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L의 농도가 되도록 적정량의 DW에 혼합하여 교반기로 충분히 섞어주고, pH를 7.2로 맞춘 후, 121, 15분간 고압살균을 실시하였다. 생산 배양액에 접종할 균주의 양을 충분히 만들기 위해, 상기 제조한 15 종균 배지 25ml을 멸균된 250ml baffled flask에 넣고, 균주 mycelium을 agar plate로부터 1loop씩 떠서 종균 배지에 접종하였다. 230 rpm 및 28도 조건하에서 48시간 동안 배양하였다. 또한, 생산배지 25ml을 멸균된 250ml non-baffled flask 넣고 종균 배양액 1.25ml을 접종한 후, 230 rpm 및 28도 조건하에서 10일 동안 배양하였다. 생산 배양액으로부터 생성된 물질을 추출하기 위하여, 20 유기용매(acetonitrile : MeOH = 1 : 1 혼합 용액) 1.5ml과 배양액 0.5ml을 섞고 충분히 vortexing하였다. 5분간 sonication 한 후, 1시간 동안 교반하였다. 12000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 분석하였다.

추출한 시료를 아래의 조건에서 HPLC/UVD 분석을 통해 분석하였다.

- Mobile phase : Acetonitrile/Water(v/v)= 40/60 v/v, 90/10 v/v, 90/10 v/v - Flow rate :

25 0.7 ml/min

- wavelength : 245 nm

- Run time : 40 min

그 결과, 밀베마이신 표준품의 HPLC 결과에서 나온 milbemycin A3와 A4의 peak (도 11a 참조)가 *S. avermitilis* DBM-03-A (도 11b 참조), *S. avermitilis* DBM-03-B 배양액 (도 11c 참조)의 HPLC분석 결과에서도 형성됨을 확인하였다(도 11a 내지

5

또한, 모듈 7 치환 균주를 배양하여 수득한 생성물 중, HPLC로 확인 한 milbemycin A3, milbemycin A4 이외의 생성물질에 대한 분석을 실시하였다. 그 결과, HPLC 상에 보인 major peak에 대한 mass 분석을 실시하여 분자량을 근거로 예측했을 때, milbemycin α 2, milbemycin α 4, milbemycin G 가 생성 되었음을 확인할

10

수 있었다(도 12).

실시에 5. aveA3의 변이를 위한 milA3 삽입 벡터(milA3 integration vector)

제작

아베펙틴과 밀베마이신의 AT-DH 모듈간 영역 및 KR-ACP 모듈간 영역의

15

염기서열 분석을 통해 공통적인 amino acid를 코딩하는 지점을 치환이 일어나는 fusion site로 결정하고, amino acid의 서열에 변화를 주지 않는 범위 내에서 제한효소 site를 도입하였다. 상기 결과를 도 13에 나타내었으며, 하기의 유전자 변형을 위한 재조합 벡터의 제조의 제작시에 이를 참조하였다.

20

상기 실시예 2-3에서 제작된 스트렙토마이세스 아베미틸리스 DBM-01의 aveA3 유전자의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인을 포함하는 영역의 코딩 유전자 부위를 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 물질 생산 유전자군 milA3 유전자의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인 포함 영역의 코딩 유전자 부위로 치환하기 위한 벡터를 제작하였다. 이 벡터는 milA3의 일부를 포함하고 균주 내 재조합을 위한

25

상동성을 지니는 aveE 및 aveA3 유전자의 영역이 양쪽 말단에 연결된 형태로 구성하였다.

5-1. MilA3 의 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인까지의 코딩 유전자 부위의 확보

30

밀베마이신 생산 균주인 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S.*

milbemycinicus NRRL5739)로부터의 *milA3* 모듈 7 DH~모듈 9 KR 영역까지의 코딩 유전자의 확보를 위해 NCBI에 등록된 또 다른 밀베마이신 생산 균주 스트렙토마이세스 빙첵젠시스 (*Streptomyces binchenggensis*)의 밀베마이신 폴리케타이드 합성효소의 염기서열을 활용하여, 하기의 표 5와 같은 염기서열로

5 프라이머를 디자인하였다 (제작하고자 하는 DNA fragment가 매우 거대하여, 3개의 구역(fragments)로 나누어 PCR을 수행한 후, 하기의 실시예 5-3의 과정을 통해 합성함).

【표 5】

Primer	Sequence (5' → 3')	용도
DK1F	GCGTCCGGGGTCGACATGGGATGCAGGCCTGAGCGGTTGATGCGGGCCC G (서열번호 38)	Fragment 1'
DK1R	ATGGGACTGCGGCTGCTTAAGACCTCACCCGTC(서열번호 39)	합성
DK2F	GCTAGCGGGGTGTGGTCG(서열번호 40)	Fragment 3
DK2R	TTCGAACACGCGGGAATCGAC(서열번호 41)	
DK3F	GCATGCCGTGTCCACGCGCCC(서열번호 42)	Fragment 5-6'
DK3R	ACACCCACCCCCACAACCACCACCTAGATCTGCCACCTACGCCTTCCA(서열번호 43)	

10 상기 프라이머를 사용하여 얻어진 각 fragment를 PCR (1. 97 °C 3분, 2. 72 °C 1분, 3. 98 °C 10초, 4. 55 °C 15초, 5. 68 °C 1분 30초, 6. 스텝 3~ 스텝 5 에 대해 31 사이클 반복 수행, 7. 72 °C 10분, 8. 4 °C, 9. end)을 통해 증폭하였다. 각 fragment는 pGEMTeasy 벡터 (Promega)에 클로닝되어 DNA sequencing을 통해 염기서열을 확인하였다. 이와 같이 얻어진 벡터를 pYJ1950, pYJ1951, pYJ1952로 명명하였다.

15 이들 각 플라스미드의 insert는 도14의 fragment 1', 3과 5-6'에 해당하며, 각 fragment는 클로닝의 용이성을 위해 *milA3* 모듈 7의 DH 도메인부터 모듈 9의 KR 도메인 영역에 존재하는 제한효소 위치를 참조하여 디자인 하였다.

5-2. Left arm 및 Right arm의 제작

20 스트렙토마이세스 아베미틸리스 DBM-01 균주의 모듈 7 DH~모듈 9 KR 영역에 상동재조합을 통한 교차를 일으키기 위해 각 벡터를 제작하였다. 스트렙토마이세스 아베미틸리스 DBM-01 균주의 genomic DNA를 주형으로

사용하고, DKLF/DKLR 및 DKRF/DKRR 프라이머를 이용하여 (아래의 표 6 참조), milA3 유전자의 모듈 7 DH~모듈 9 KR 영역에 연결될 left 및 right flanking 영역 fragment를 PCR로 확보한 뒤, 각각 pGEMTeasy 벡터에 클로닝하였다. 이 때 각 fragment는 연결 될 milA3 영역과 상동성을 갖도록 디자인 되었고 이를 각각 pYJ1948 및 pYJ1949로 명명하였다. 각각 플라스미드의 insert는 도 14의 LA와 RA에 해당한다.

【표 6】

Primer	Sequence (5'→3')	용도
DKLF	AACCCGAACGACCGAGCGCAGCGGCGGCCGCGAATTCATACGGCTA CGAGGAT(서열번호 44)	Left arm (LA)의
DKLR	CTCGACCGCACCGACCGGGCCCGCATCAACCGCTCAGGCCTGCATC CCATGTCGACCCC(서열번호 45)	제작
DKRF	GCCAGTAGCGGCGGCGCTGGAAGGCGTAGGTGGGCAGATCTAGGTG GTGGTTGTGGGGTG(서열번호 46)	Right arm (RA)의
DKRR	CTTAGGACCGTTATAGTTACGCGCTTCTCGCTCACTGACTTTAATTA AAAGCTTACGTTTCGCTTGCCGATG(서열번호 47)	제작

5-3. milA3 유전자에 양쪽 arm이 결합된 형태의 vector 제작

10 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)로부터의 PCR을 통해 확보된 milA3 영역을 포함하는 pM5-2 벡터 및 pM6-4 벡터를 제작하고, pM5-2 벡터에 제한효소 AfIII/BmtI를 처리하여 도 14의 fragment 2를 얻었으며, pM6-4 벡터에 제한효소 BstBI/SphI를 처리하여 도 14의 fragment 4를 확보하였다.

15 상기 과정을 보다 구체적으로 기재하면 다음과 같다:

스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*S. milbemycinicus* NRRL5739)의 milbemycin 생산유전자군을 클로닝하기 위하여, 스트렙토마이세스 빙청젠시스 (*S. bingchengensis* BCW-1)의 genome 염기서열 정보 (Accession no. CP002047.1)를 기반으로 milA2, milA3, milA4 지역을 포함하는 61kb의 영역을 각각 10kb씩 6개
20 영역으로 나누어 프라이머를 디자인 하였다(표 7 및 도 19 참조)

【표 7】

Fragment 명칭	Primer Name	Sequence	용도
----------------	-------------	----------	----

M1	M1171-1NF	aaaatgcatCTACCGCCGCTTCAACAGC(서열번호 48)	Fragment 1 증폭
	M10810-1R	aaaactagtGGAGAGGAAGAAGGAGAGCCG(서열번호 49)	
M2	M10762-2NF	aaaatgcatCACCCACACAGGACAGGGA(서열번호 50)	Fragment 2 증폭
	MC20300-2R	aaaactagtATGACAGGCCGGGTACATCA(서열번호 51)	
M3	M20255-3NF	aaaatgcatCGCGTACCTGATGTCCCTGA(서열번호 52)	Fragment 3 증폭
	M30434-3R	aaaactagtGGCCACACGGTCTTCATCG(서열번호 53)	
M4	M30377-NF2	aaaatgcatCCTGCACACCGACCGAGAC(서열번호 54)	Fragment 4 증폭
	M40160-4R	aaaactagtACCTTCGTACCCGTCTCGC(서열번호 55)	
M5	M40091-5NF	aaaatgcatGTGCGGACGATCGTGAGAAG(서열번호 56)	Fragment 5 증폭
	M50273-5R	aaaactagtAACACGCGGAATCGACC(서열번호 57)	
M6	M50196-6NF	aaaatgcatGTAGTCCGTCCGCATCACAC(서열번호 58)	Fragment 6 증폭
	M60390-6R	aaaactagTCGAGACCGTCCCTATGTCC(서열번호 59)	
M4N	M30290-F	ACGTCAGGAAGCGGTTCA(서열번호 60)	Fragment M4N 증폭
	M34887-R	CGTCCGAACGTTTCTGGA(서열번호 61)	
M4CN	M4M4502F	GAGCTCCAGAAACGTTCTGG(서열번호 62)	Fragment M4CN 증폭
	M4F7910R	GGATCGTCAACATCTCCTCC(서열번호 63)	
M4CC	M4C-ScF	CGGCCACCAGAACACCTTC(서열번호 64)	Fragment M4CC 증폭
	M4C25R	ACACGTTCTCACGATCGTC(서열번호 65)	

다음의 표 8 의 조건으로 PCR 용 mixture 를 제조하였다:

【표 8】

PCR 용 mixture 의 조성

Component	1 reaction 당 (μL)	
5X GXL buffer	5	Primer 를 제외한 component 를 모두 혼합 후 21 ul / tube 첨가
2.5 mM dNTPs	2	
S. milbemycinicus Genomic DNA (1/50 dil.)	2	
DW	16.5	
PrimeSTAR Pol.	0.5	

Primer for. (N), 5 pmol/ul	2	
Primer rev. (C), 5 pmol/ul	2	

상기 mixture 에 대하여 MyCycler (Bio-Rad 사)를 사용하여 다음의 표 9 의 조건에서 PCR 을 수행하였다

【표 9】

Step	Temperature	Time	Cycles
First denaturation	95 C	5 min	1
Denaturation	98 C	20 sec.	30
Extension	68 C	10 min	
Final extension	68 C	10 min	1

5

증폭된 DNA fragment 중 milA3 에 해당되는 fragment 인 M5 와 M6 를 pCR2.1 TOPO cloning 시스템 (Invitrogen, 미국)을 이용하여 클로닝하고 *E. coli* DH5a 를 형질전환하여 각각 pM5-2, pM6-4 를 확보하였다.

상기 얻어진 fragments 와, 상기 표 5 의 프라이머 DK1F/DK1R, DK2F/DK2R, DK3F/DK3R 를 사용한 PCR 결과물 및 left, right flanking 영역과 단계적으로 overlap PCR 방법과 통상적인 ligation 반응을 통하여 pLitmus28 (NEB, 미국) 에서 한 fragment 로 연결하였다. 이와 같이 얻어진 재조합 벡터를 pYJ1957 로 명명 하고, 이로부터 EcoRI/HindIII 제한효소 처리를 통해 얻은 left flanking region-milA3 모듈 7 DH~모듈 9 KR-right flanking region 을 pKC1139 로 옮겨 milA3 모듈 7 DH~모듈 9 KR 영역의 발현을 위한 재조합 벡터 (milA3 삽입 벡터; milA3 integration vector)를 제작하였다(도 14 참조; LA: left arm; RA: right arm; 1', 2, 3, 4, 5, 6: fragments). 이를 pD7K9milA3 으로 명명하였다 (서열번호 80; LA: 6074-7261 부위; 1': 7256-10476 부위; 2: 10471-15043 부위; 3: 15038-17193 부위; 4: 17188-20776 부위; 5 및 6: 20771-21226 부위; RA: 21221-22436 부위).

20

실시예 6. milA3 삽입 벡터(milA3 integration vector)가 삽입된 균주 제작 및 생성물질 확인

상기 실시예 5-3 에서 제작된 milA3 integration 벡터 (pD7K9milA3) 를 *S. avertmili* DBM-01 균주 내로 도입시키고, 상동재조합이 일어나도록 유도하여 *S.*

avertmilis DBM-01 균주의 aveA3 유전자가 milA3 유전자로 치환된 형태의 균주를 확보하고, 배양을 통해 생성되는 신규물질을 확인하였다.

6-1. 접합법을 통한 벡터 도입 및 유전자 치환

5 *E. coli* ET12567/pUZ8002 (The John Innes Foundation, 영국) 를 치환 벡터(pD7K9milA3)로 형질전환시킨 형질전환체를 아프라마이신 (apramycin), 클로람페니콜 (chloramphenicol), 카나마이신 (kanamycin)이 포함된 2xTY (trptone 16 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L) 또는 LB (peptone 10g/L, yeast extract 5g/L, sodium chloride 10g/L) 액체 배지를 이용하여 37 °C에서 배양하였다. 12 시간 후, 1 ul 의
 10 배양액을 25 mL 의 2xTY 에 옮기고, 37°C에서 광학 밀도 (optical density)가 0.6 이 될 때까지 배양하였다. 배양액의 세포를 동일한 액체 배지로 두 번 세척한 뒤, 500 uL 의 2xTY 로 현탁하여 얼음에 보관하였다. 스트렙토마이세스 아베미틸리스 DBM-01 의 포자액 30-50 uL 를 원심분리 (12,000 rpm 으로 10 분간)하고, 500 uL 의 2xTY 에 현탁한 후, 50°C에서 10 분 동안 열충격을 가하여 균사액을 준비하였다.
 15 얼음에 보관해둔 *E. coli* 현탁액 500 uL 과 상기 준비된 균사액 500 uL 을 서로 혼합한 후 MS (agar 20g/L, D-mannitol 20g/L, soya flour 20g/L) 배지에 도포하여 28°C에서 24 시간 동안 배양한 뒤 날리딕신산 (nalidixic acid)과 아프라마이신 (apramycin) 각 1mg 을 배지위에 도말하였다. 7~10 일 뒤 아프라마이신 저항성을 지닌 콜로니를 선별하고 37 °C에서의 배양을 통해 항생제 저항성 여부를 재확인
 20 후, 삼차 스트리킹 (streaking)을 통해 얻은 콜로니에 대해 PCR 및 PCR 결과물에 대한 sequencing 을 수행하여 일차교차 균주를 선별하였다.

상기 선별된 콜로니로부터의 계대배양을 통해 이차교차를 유도하고, 이를 아프라마이신이 첨가된 ISP4 고체배지와 아프라마이신이 첨가되지 않은 ISP4 고체배지에 각각 도말하여 아프라마이신 저항성을 잃은 콜로니를 선별하였다.

25 상기 사용된 ISP4 고체배지의 조성을 아래의 표 10 에 나타내었다:

【표 10】

Reagents	g/L
Soluble starch	10.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0

NaCl	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
CaCO ₃	2.0
Trace salt solution	1 mL
Agar	20.0

PCR 분석을 통해 최종 milA3 가 치환된 이차교차 균주가 확보되었다. 상기 균주 제작 과정을 도 15 에 모식적으로 나타내었다.

상기와 같이 확보된 균주를 *S. avermitilis* DBM-03-C 로 명명하였다. *S. avermitilis* DBM-03-C 균주는 2016 년 8 월 24 일자로 대한민국 전라북도 정읍시에 위치하는 한국생명공학연구원(Korean collection for type culture)에 기탁하여 수탁번호 KCTC13083BP 를 부여받았다.

6-2. milA3 치환균주의 배양

Milbemyci 의 생산확인을 위한 종균배양 및 생산배양을 수행하였으며, 이 때 상용된 배지의 조성을 다음의 표 11 에 나타내었다:

【표 11】

Seed culture	g/L	Main culture	g/L
Soluble starch	30.0	Soluble starch	80.0
Yeast extract	15.0	Soybean flour	10.0
Corn steep liquor	5.0	Skim milk	15.0
KH ₂ PO ₄	0.4	KH ₂ PO ₄	0.5

각 분량의 soluble starch, yeast extract, corn steep liquor, 및 KH₂PO₄ 를 DW 에 녹여서 혼합한 후, NaOH 를 사용하여 pH 7.2 로 맞춘 후, 121℃에서 20 분간 고압살균하였다. ISP4 고체배지 (상기 표 5 참조)에 배양한 milA3 발현 균주 (*S. avermitilis* DBM-03-C)의 포자 혹은 mycelium 을 긁어 종균배지에 접종한 뒤 28℃, 230rpm 에서 40~48 시간 배양하여 종균배양액을 준비하였다. Soluble starch, soybean flour, skim milk, 및 KH₂PO₄ 를 DW 에 녹이고 pH 7.2 에 맞춰 제조한 생산배양 배지를 종균배양 배지와 같은 조건하에서 고압 멸균한 뒤 생산배양 배지 총 부피의 5 % 비율로 상기 준비된 종균배양액을 접종하여 230 rpm 및 28℃

조건에서 10~15 일간 배양하였다.

6-3. 생성물질의 추출 및 분석

분석을 위한 시료의 전처리를 위하여, 상기 얻어진 배양액 0.5 mL 을 동일 부피의 acetonitrile 및 methanol 혼합 용액 (acetonitrile:methanol=1:1 (v:v)) 또는 동일 부피의 ethyl acetate 와 혼합하여 2 분간 vortex 처리 한 뒤 10 분간 초음파 추출을 수행하였다. 5 분간 원심분리하여 고형물을 제외하고 상층액만을 취하였다. 동일한 방법으로 추출을 3 회 반복하여 분석시료를 확보하였다. 상기 확보된 시료는 HPLC 및 UPLC-qTOF-HR-MS 를 통해 분석하였다.

10 HPLC 는 PDA detector 와 gradient pump 로 구성된 HPLC system (YL Instrument Co. Ltd)하에서 Phenomenex Luna (4.6x100 mm, 5 mm) column 을 이용하여 수행하였고, 물 기반의 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)를 용매 A 로 하고 acetonitrile 을 용매 B 로 하고 표 12 와 같은 용매 기울기를 사용하여, 238~245 nm 에서 1 mL/min 의 flow rate 로 총 60 분간 시료를 분석하였다.

15 【표 12】

Time (min)	0.05 % TFA in water (%(v/v))	Acetonitrile (%(v/v))
0	60	40
5	60	40
35	10	90
55	10	90
60	60	40

20 Milbemycin A3/A4 의 30%/70% (w/w) 표준품인 milbemectin (Bioaustralis, Australia) 및 milbemycin D (Bioaustralis, Australia)를 사용하여 본 HPLC 분석 조건에서의 해당 milbemycin 의 retention time (RT) 및 245 nm 에서의 absorbance 를 확인하였다. 상기 확보된 시료 (S. avermitilis DBM-03-C 균주)의 생성 물질을 분석한 결과를 도 16 에 나타내었다. 도 16 에서, (a)는 표준품 milbemectin (Bioaustralis, Australia) 및 milbemycin D (Bioaustralis, Australia)의 분석 결과를, (b)는 S. S. avermitilis DBM-03-C 균주의 생성물질 분석 결과를 각각 보여준다. 도 16 에 나타난 바와 같이, 상기 S. avermitilis DBM-03-C 균주는 milbemycin A3 (CAS NO. 25 51596-10-2), A4 (CAS NO. 51596-11-3), α 2 (CAS No. 51596-12-4), D (CAS NO. 77855-81-

3), α4 (CAS No. 51596-13-5), 및 G (CAS No. 83471-31-2)로 추정되는 피크를 확인할 수 있고, 이 중에서, milbemycin A3, A4, 및 D는 표준품 milbemycin 과 동일한 RT 값을 지님을 확인할 수 있다. 특히 milbemycin A3, A4 및 D로 추정되는 peak는 표준품 milbemycin 과 동일한 RT 값을 지님을 알 수 있다. 도 16의

5 HPLC 분석 결과에 나타난 각 물질의 RT는 다음과 같다:

Milbemycin A3 RT: 29.0 min

Milbemycin A4 RT: 32.1 min

Milbemycin D RT: 35.4 min

Milbemycin α2 RT: 33.7 min

10 Milbemycin α4 RT: 36.3 min

Milbemycin G RT: 39.4 min.

HPLC 상에서 milbemycin 으로 추정되는 물질의 분자량을 비교하기 위하여, UPLC-qTOF-HR-MS를 다음과 같이 수행하였다. 상기 HPLC 상에서 분석된 여섯 종류의 milbemycin 의 해당 분자량 값을 Xselect® CSH column XP (2.1x100 mm, 2.5 um; Waters)을 통해 Waters XEVO® G2S Q-TOF mass spectrometer; Waters) 상에서 15 확인하였다. 이 때 사용된 용매 기울기는 아래의 표 13과 같이 하였다.

【표 13】

Time (min)	Water (vol%)	Acetonitrile (vol%)
0	50	50
1	50	50
7	25	75
15	10	90
18	10	90
20	50	50

상기 얻어진 질량 스펙트럼 결과를 도 17a 내지 17f에 나타내었다 (도 17a: 20 밀베마이신 A3; 도 17b: 밀베마이신 A4; 도 17c: 밀베마이신 D; 도 17d: 밀베마이신 alpha2; 도 17e: 밀베마이신 alpha4; 도 17f: 밀베마이신 G). 도 17a 내지 17f에 나타난 바와 같이, milbemycin A3에 해당하는 m/z=527.3014, milbemycin A4 및 α2에 상응하는 m/z=541.3171, milbemycin D 및 α4를 나타내는 m/z=555.3327, milbemycin G의 값인 m/z=569.3484을 negative ion mode에서 확인할 수 있었으며,

각각 분자의 알려진 분자량과 잘 일치하는 것으로 보아 제작된 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-C 가 밀베마이신을 생산함을 알 수 있었다.

5 【수탁번호】

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12889BP

수탁일자 : 20150831

10 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12890BP

수탁일자 : 20150831

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

15 수탁번호 : KCTC12891BP

수탁일자 : 20150831

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13083BP

20 수탁일자 : 20160824

특허출원을 위한 부다택스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제양식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 의한 수탁증

수신: 오기훈

대한민국 충청남도 논산시 연무읍 동안로 1113번길 39-23 (33010)

I. 미생물의 명칭	
기탁사에 의해 주어질 명칭: <i>Streptomyces avermitilis</i> DBM-01	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 12889BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I 에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: [x] 과학적 성질 [] 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 항목 I 에 표시된 미생물을 수탁받고 2015년 8월 31일자로 수령하였다.	
IV. 이관장구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____ 에 항목 I 에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____ 에 원기탁의 부다택스트 국제 조약하의 기탁으로의 이관장구를 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 미생물자원센터 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 125번지 (우편번호) 305-806 한국생명공학연구원	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2015. 9. 14.

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제양식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 의한 수탁증

수신: 오기훈

대한민국 충청남도 논산시 연무읍 동안로 1113 번길 39-23 (33010)

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Streptomyces avermitilis</i> DBM-03-A	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 12890BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: [x] 과학적 성질 [] 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 항목 I에 표시된 미생물을 수탁받고 2015년 8월 31일자로 수령하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁소요의 이관청구를 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 미생물자원센터 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 125번지 (우편번호) 305-806 한국생명공학연구원	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2015. 9. 14.

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제양식

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된
원기탁에 의한 수탁증

수신: 오기훈

대한민국 충청남도 논산시 연무읍 동안로 1113 번길 39-23 (33010)

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Streptomyces avermitilis</i> DBM-03-B	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 12891BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: [x] 과학적 성질 [] 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 항목 I에 표시된 미생물을 수탁받고 2015년 8월 31일자로 수령하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 미생물자원센터 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 125번지 (우편번호) 305-806 한국생명공학연구원	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2015. 9. 14.

특허절차상 미생물 기탁의
승인에 관한 부다페스트 조약

국제용 양식

수 신: 오기훈

대한민국 충청남도 논산시
연무읍 동안로 1113 번길 39-23
(우) 33010

이건 문서의 아랫부분에 기재된
국제기탁기관에 의해
조약 7.1에 따라 발행된
원기탁에 관한 접수

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Streptomyces avermitilis</i> DBM-03-C	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC13083BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I 에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. <input checked="" type="checkbox"/> 과학적 성질 <input checked="" type="checkbox"/> 분류학상 위치 (적용대상에 체크할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I. 에 표시된 미생물을 수탁받고 2016년 8월 24일 (원기탁 일자) ¹ 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 미생물자원센터 주소: 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원 (우) 56212 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인: 날짜: 2026년 8월 30일

¹ 조약 6.4(d)는, 국제기탁기관의 지위를 획득한 날; 국제기탁기관의 지위를 획득한 이후에 부다페스트 조약국 이외에서 행해진 기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로 전환한 경우에는 국제기탁기관이 접수한 날로 적용한다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 균주에서,
아베멕틴 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 1번
유전자(aveA1)의 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는
폴리케타이드 합성효소의 1번 유전자(milA1)로의 치환; 및

아베멕틴 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 3번 유전자(aveA3)
또는 이의 일부가 밀베마이신 생산 균주에서 밀베마이신 생합성을 수행하는
폴리케타이드 합성효소의 3번 유전자(milA3) 또는 이의 일부로 치환된,

재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 aveA3 유전자의 일부가 밀베마이신 생산 균주의
milA3 유전자의 일부의 치환된 것은, aveA3 유전자 중 적어도 모듈 7 코딩 유전자
또는 모듈 7의 DH (dehydratase) 도메인 코딩 유전자가 밀베마이신 생산 균주의
milA3 유전자의 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH (dehydratase) 도메인 및
ER (Enoyl reductase) 도메인 코딩 유전자로 치환된 것을 포함하는, 재조합
스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 aveA3 유전자의 일부가 밀베마이신 생산 균주의
milA3 유전자의 일부로 치환된 것은,

(i) aveA3 유전자의 모듈 7 코딩 유전자의 KS 도메인 코딩 유전자, AT
도메인 코딩 유전자, KR 도메인 코딩 유전자 및 ACP 도메인 코딩 유전자로
이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 milA3
유전자의 모듈 7 코딩 유전자의 KS 도메인 코딩 유전자, AT 도메인 코딩 유전자,
KR 도메인 코딩 유전자 및 ACP 도메인 코딩 유전자로 이루어진 균에서 선택된
하나 이상으로 치환된 것;

(ii) aveA3 유전자의 모듈 8 및 모듈 9의 도메인들 중 하나 이상의 코딩
유전자가 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자의 모듈 8 및 모듈 9의 도메인들
중 하나 이상의 코딩 유전자로의 치환된 것; 또는

(iii) 치환 (i) 및 (ii)의 조합

을 추가로 포함하는 것인,

재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 4】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 밀베마이신 생산 균주는 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*), 스트렙토마이세스 시아네오그리세우스 아속 논시아노게누스(*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *Noncyanogenus*), 스트렙토마이세스 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*), 또는 스트렙토마이세스 빙첸젠시스(*Streptomyces bingchenggensis*)인, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 5】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 균주는 밀베마이신 A3, 밀베마이신 A4, 밀베마이신 $\alpha 2$, 밀베마이신 $\alpha 4$, 밀베마이신 G, 및 밀베마이신 D로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상의 밀베마이신을 생산하는 것인, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-A 균주(수탁번호 KCTC12890BP)인, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-B 균주(수탁번호 KCTC12891BP)인, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-03-C 균주(수탁번호 KCTC13083BP)인, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 9】

스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주에서, *aveA1* 유전자가 밀베마이신 생산 균주의 *milA1*로의 치환되고,

22,23-디하이드로-25-이소프로필-아베멕틴(22,23-dihydro-25-isopropyl-

avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin), 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin) 및 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-이소프로필-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-isopropyl-avermectin)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 아베멕틴 유도체를 생산하는,

재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주는, 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 DBM-01 균주(수탁번호 KCTC12889BP)인, 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주.

【청구항 11】

(1) 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 1번 유전자(milA1); 및

(2) 밀베마이신 생산 균주의 밀베마이신 생합성을 수행하는 폴리케타이드 합성효소의 3번 유전자(milA3)의 전부 또는 일부를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 milA3의 일부는 적어도 milA3 유전자 중 모듈 7 코딩 유전자 또는 모듈 7의 DH 도메인 코딩 유전자 및 ER 도메인 코딩 유전자를 포함하는 것인, 재조합 벡터.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 다음으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 재조합 벡터:

밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 7의 KS 도메인, AT 도메인, KR 도메인, 및 ACP 도메인 중에서 선택된 하나 이상의 코딩 유전자;

밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 8의 코딩 유전자 또는 모듈 8의 도메인들 중 하나 이상의 코딩 유전자; 및

밀베마이신 생산 균주의 milA3의 모듈 9의 코딩 유전자 또는 모듈 9의 도메인들 중 하나 이상의 코딩 유전자.

【청구항 14】

제 11 항에 있어서,
 밀베마이신 생산 균주의 milA1 유전자; 및
 밀베마이신 생산 균주의 milA3 유전자 중의 모듈 7 의 DH 도메인부터 모듈 9 의 KR 도메인까지의 영역의 코딩 유전자를 포함하는 milA3 유전자의 일부를 포함하는, 재조합 벡터.

【청구항 15】

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 밀베마이신 생산 균주는 스트렙토마이세스 밀베마이시니쿠스 (*Streptomyces milbemycinicus*), 스트렙토마이세스 시아네오그리세우스 아속 논시아노게누스(*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*), 스트렙토마이세스 난찬젠시스(*Streptomyces nanchangensis*) 또는 스트렙토마이세스 빙첸젠시스(*Streptomyces bingchengensis*)인, 재조합 벡터.

【청구항 16】

제1항 내지 제3항 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주를 포함하는, 밀베마이신 생산용 조성물.

【청구항 17】

제1항 내지 제3항 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주를 배양하는 단계, 및

상기 배양된 균주 또는 균주의 배양물로부터 밀베마이신을 수득하는 단계를 포함하는,

밀베마이신을 생산하는 방법.

【청구항 18】

하기에서 선택되는 아베멕틴 유도체 또는 이의 염:

5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-methyl-avermectin), 및

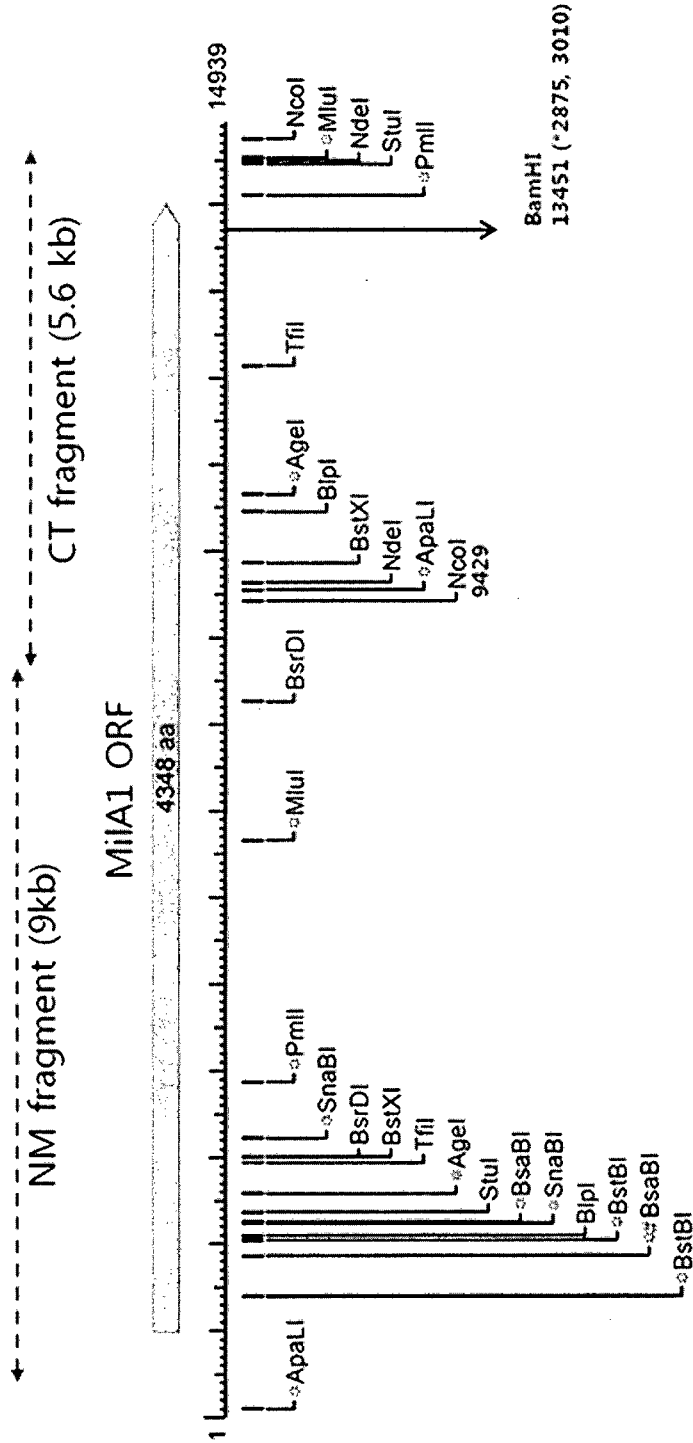
5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴(5-methoxy-22,23-dihydro-25-ethyl-avermectin).

【청구항 19】

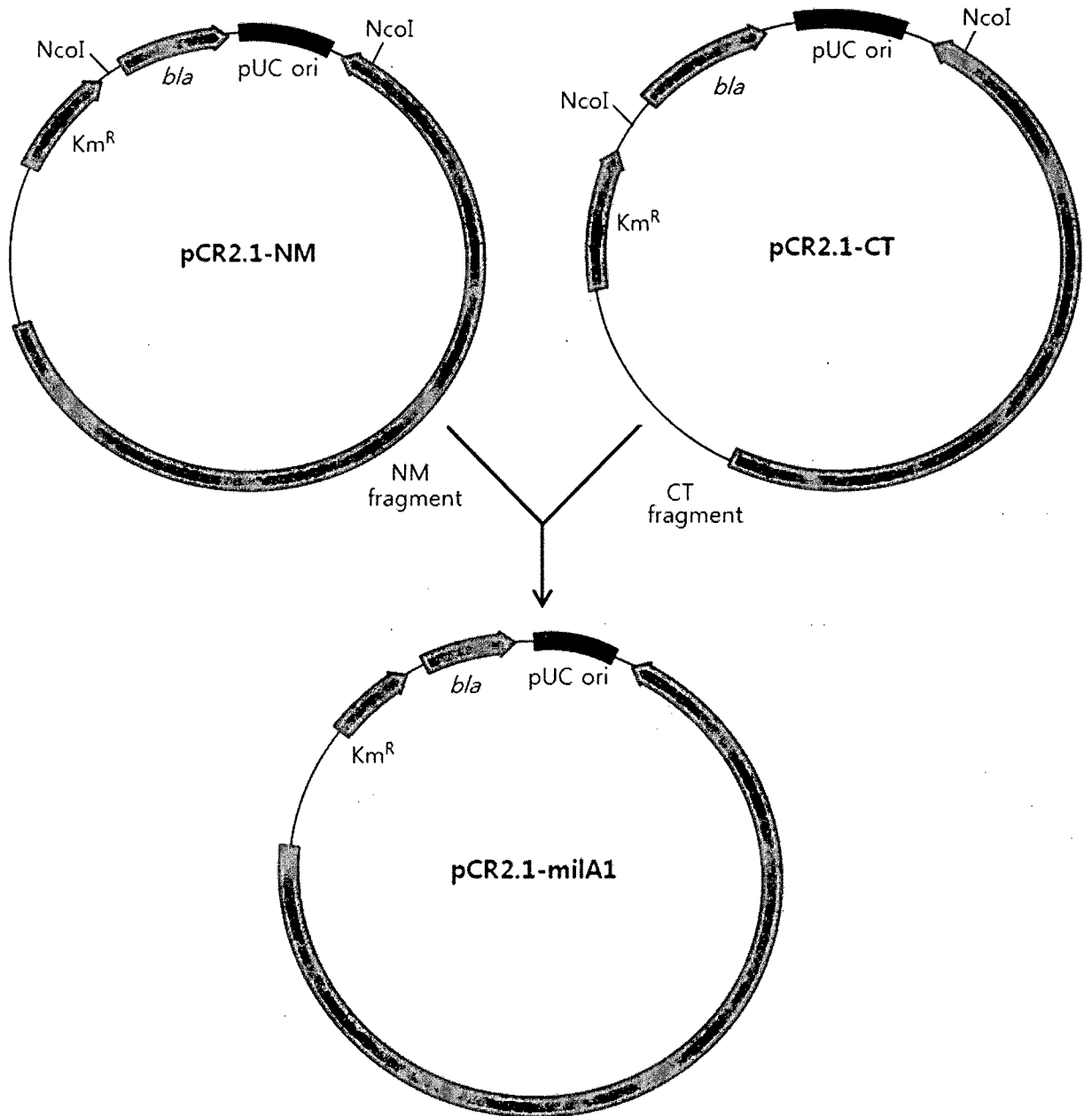
제9항 또는 제10항 중 어느 한 항의 재조합 스트렙토마이세스 아베르미틸리스 균주 또는 상기 균주의 배양물; 또는

제18항의 아베멕틴 유도체 또는 이의 염
를 포함하는, 해충 방제용 조성물.

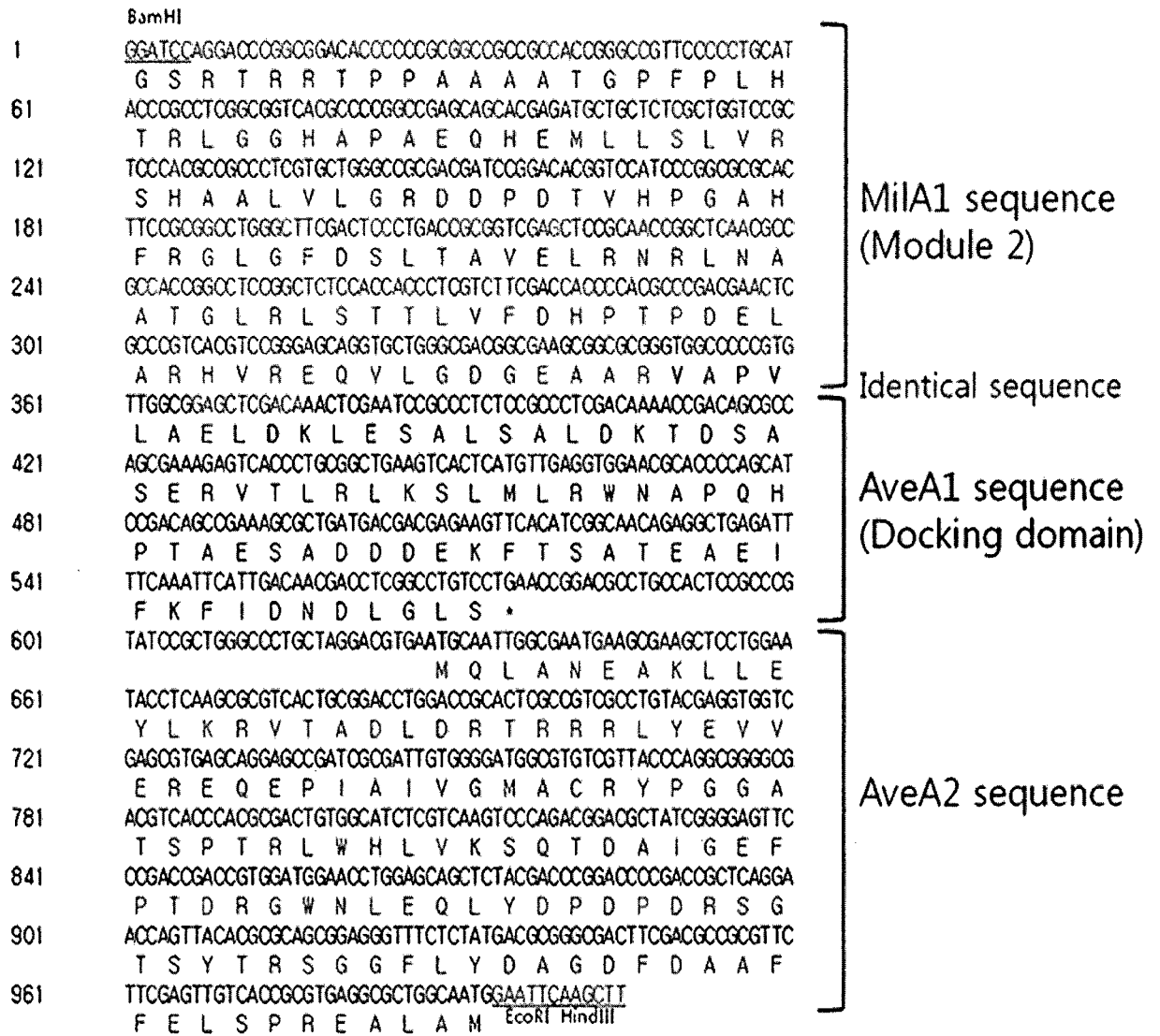
[Fig. 1]



[Fig. 2]



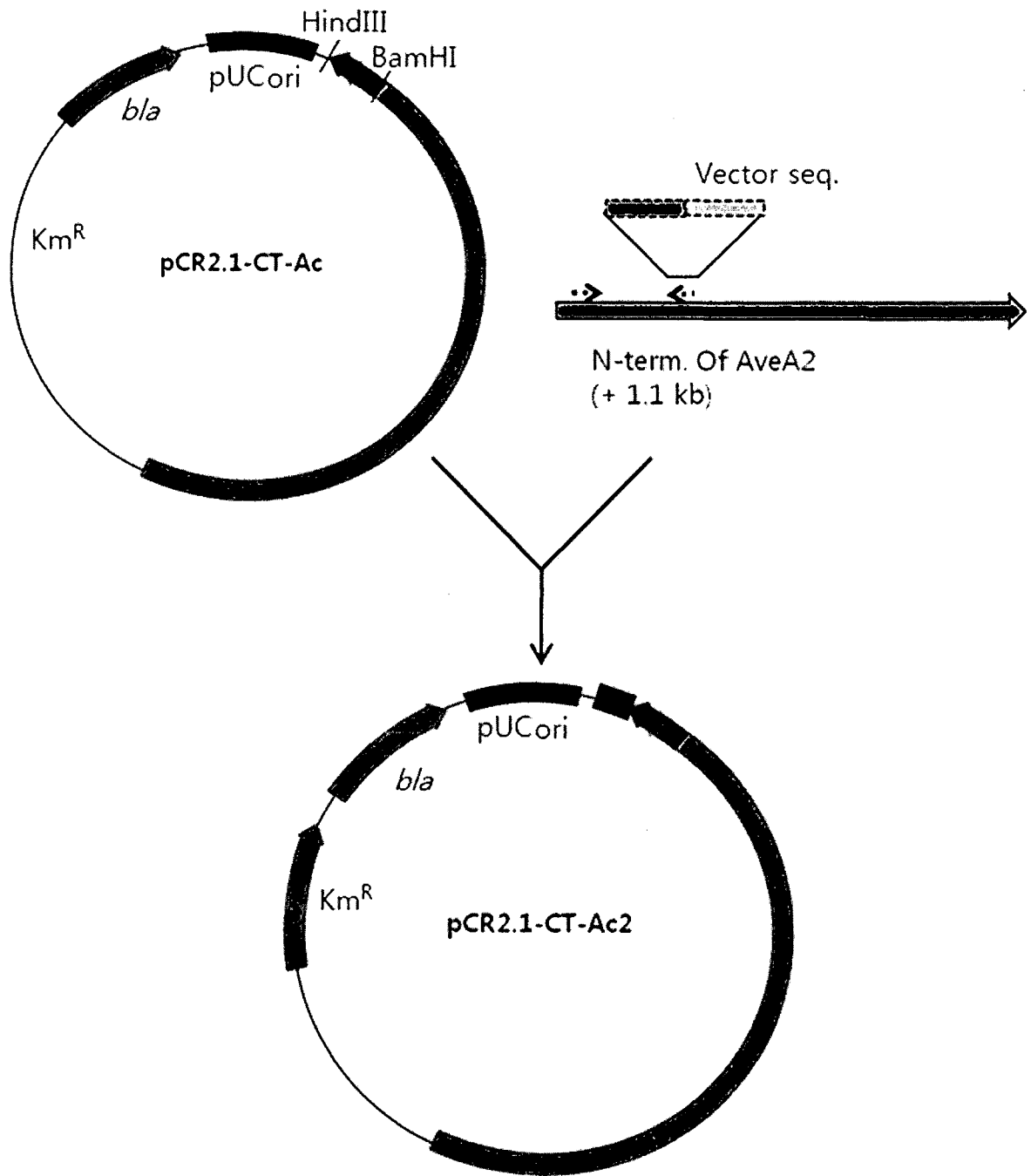
[Fig. 3]



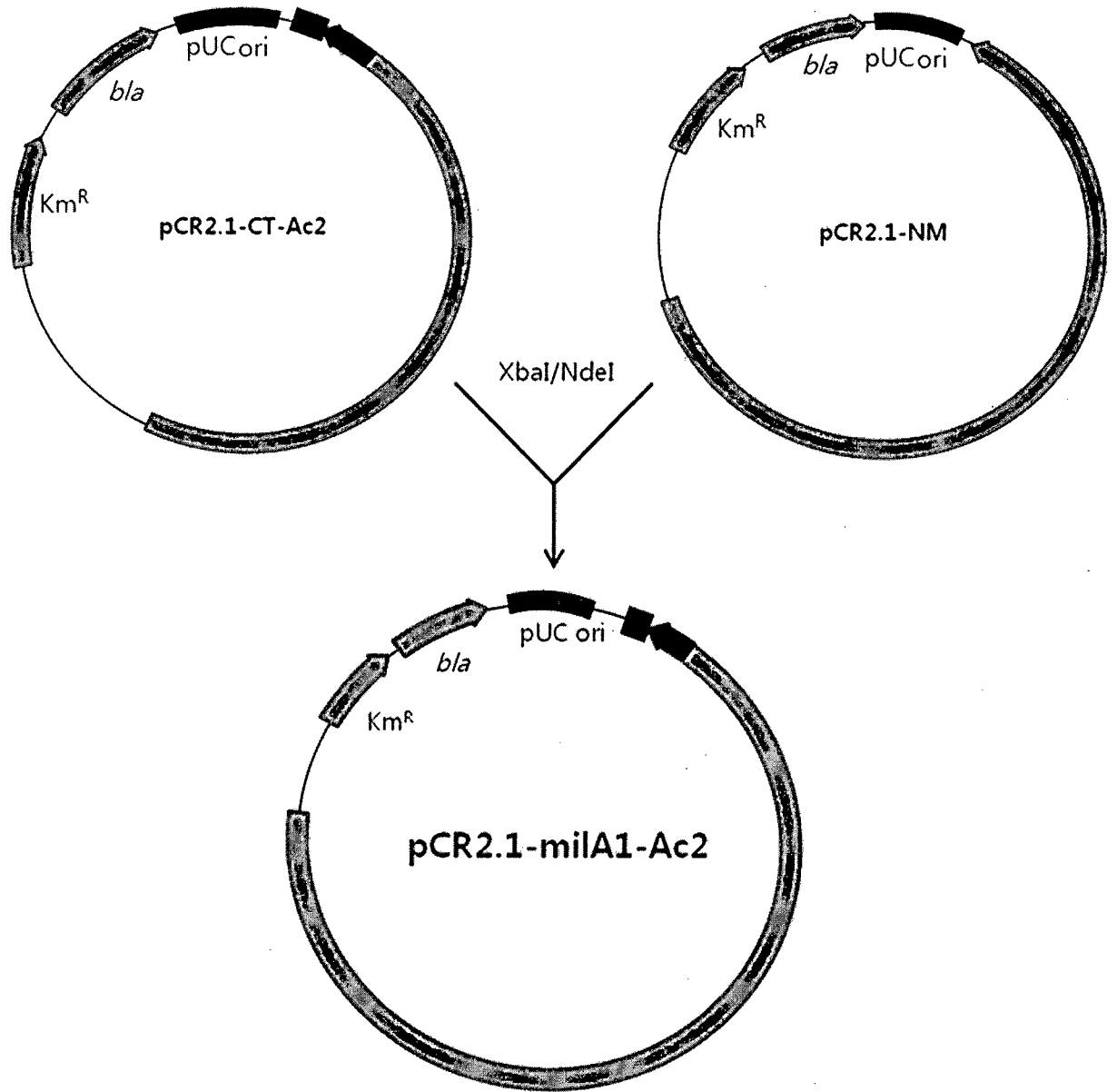
[Fig. 4a]



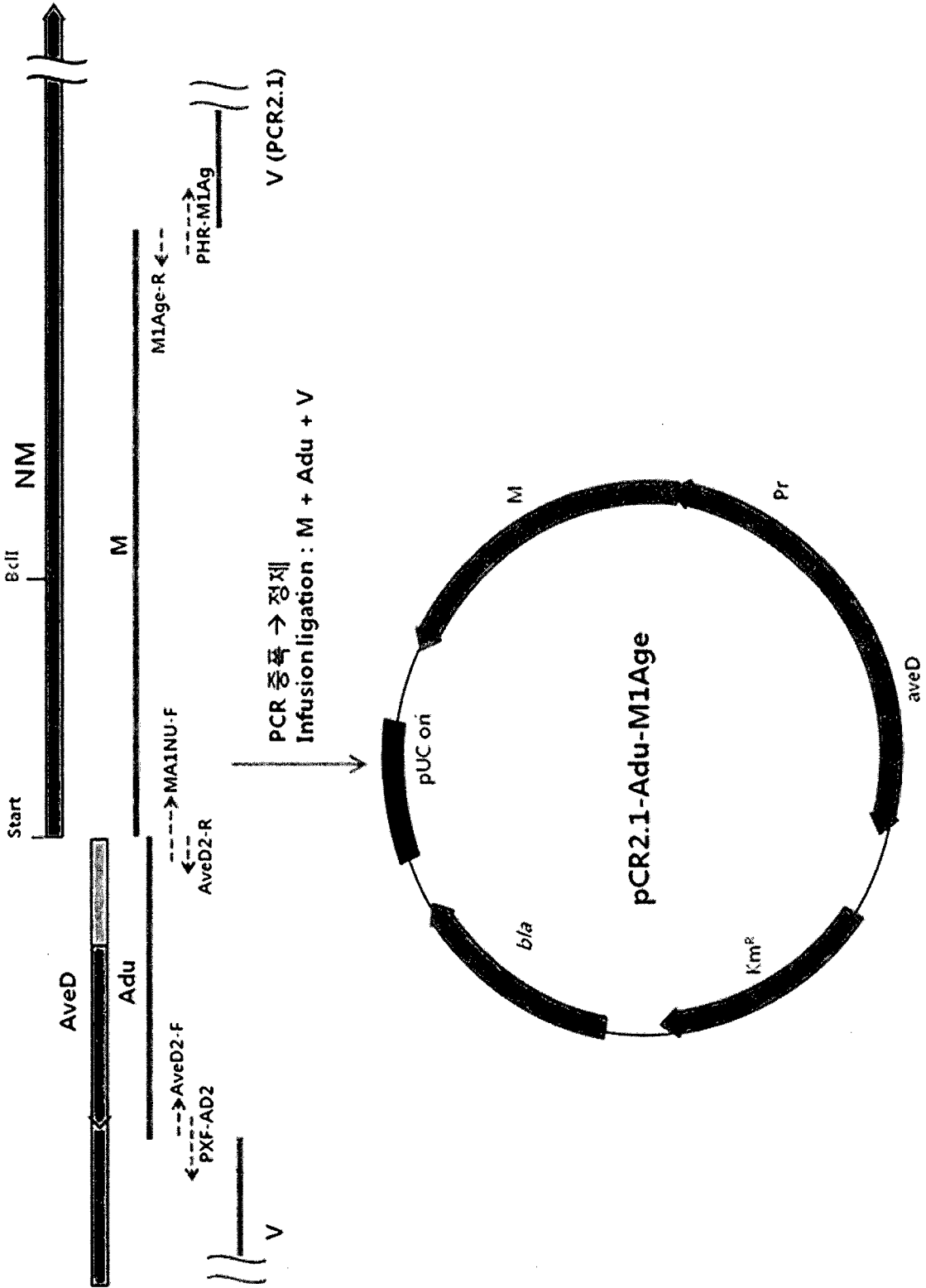
[Fig. 4b]



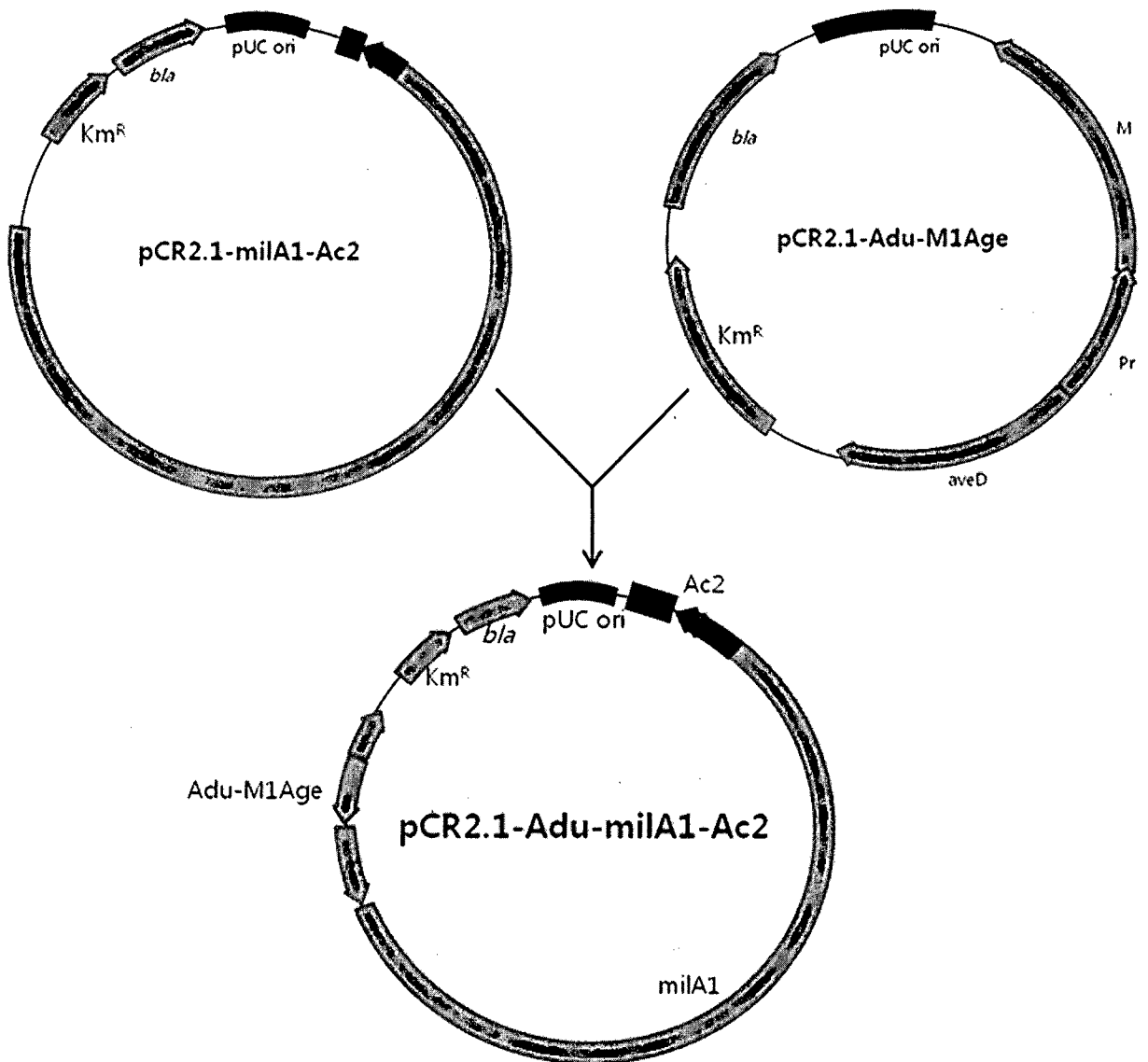
[Fig. 4c]



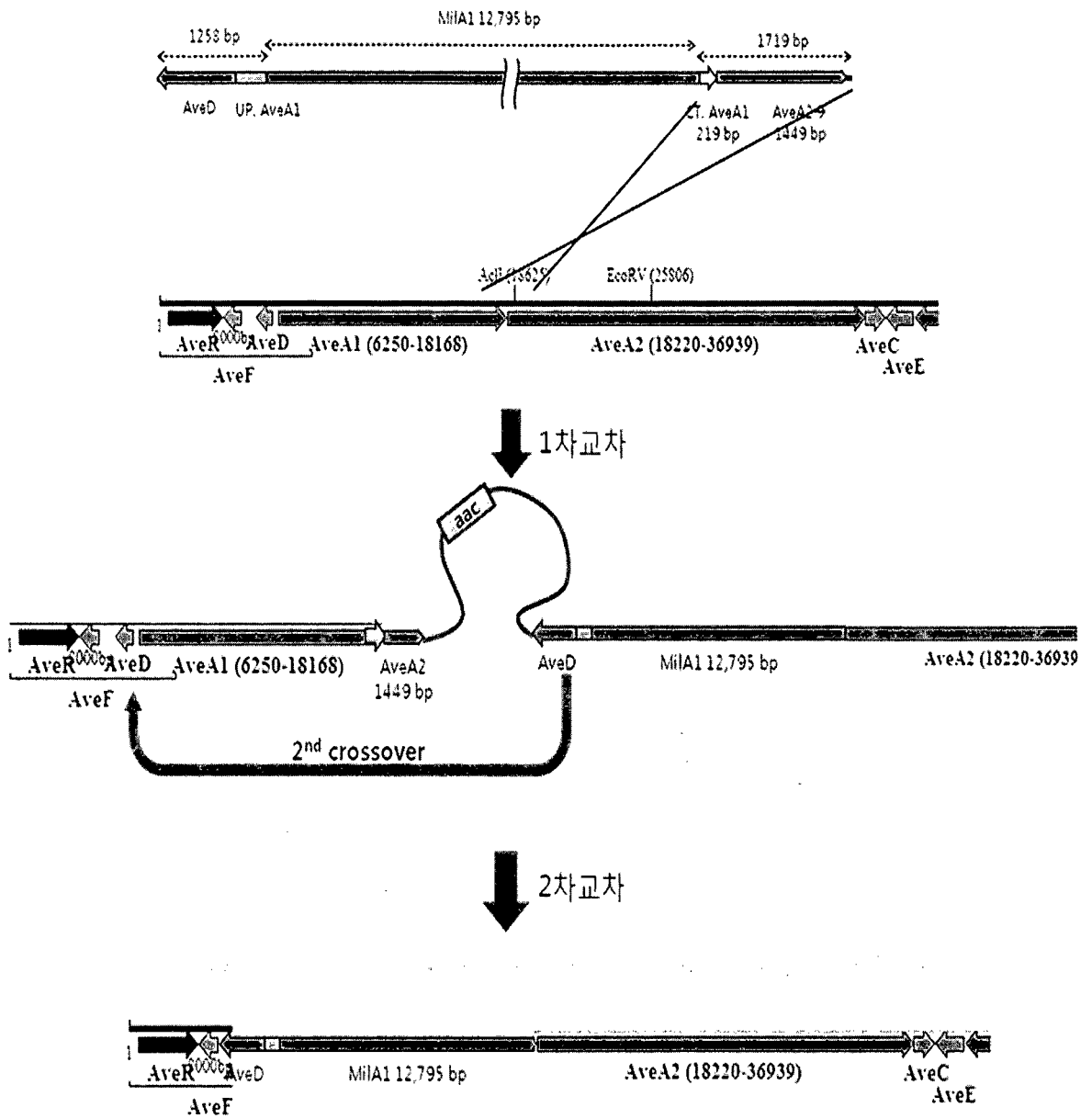
[Fig. 5]



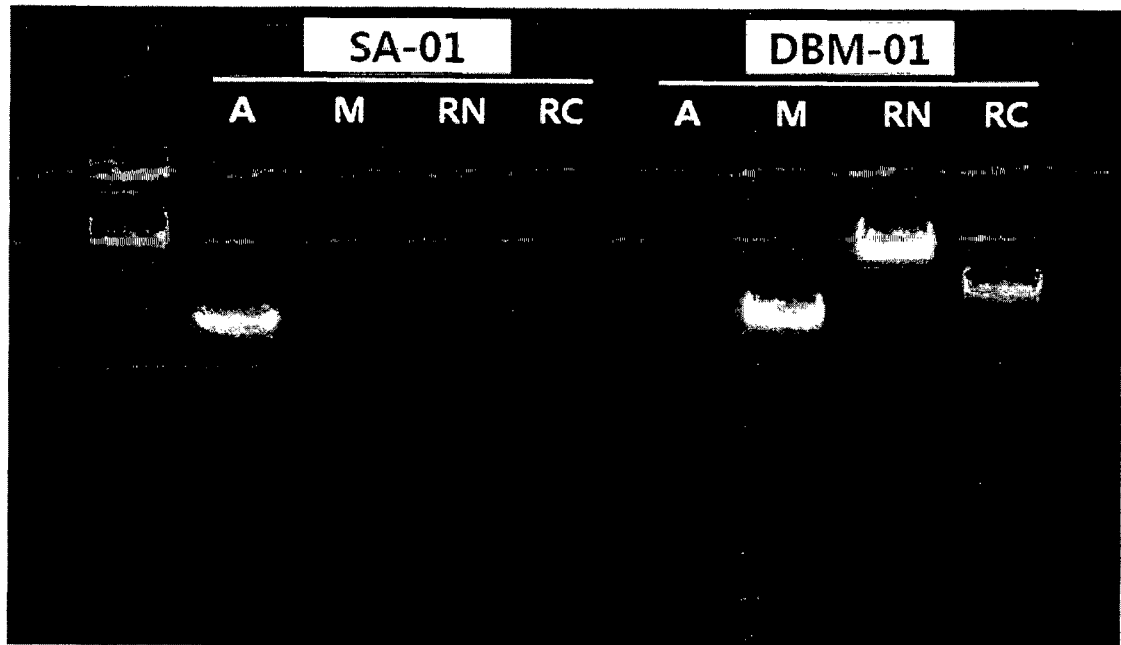
[Fig. 6]



[Fig. 7a]

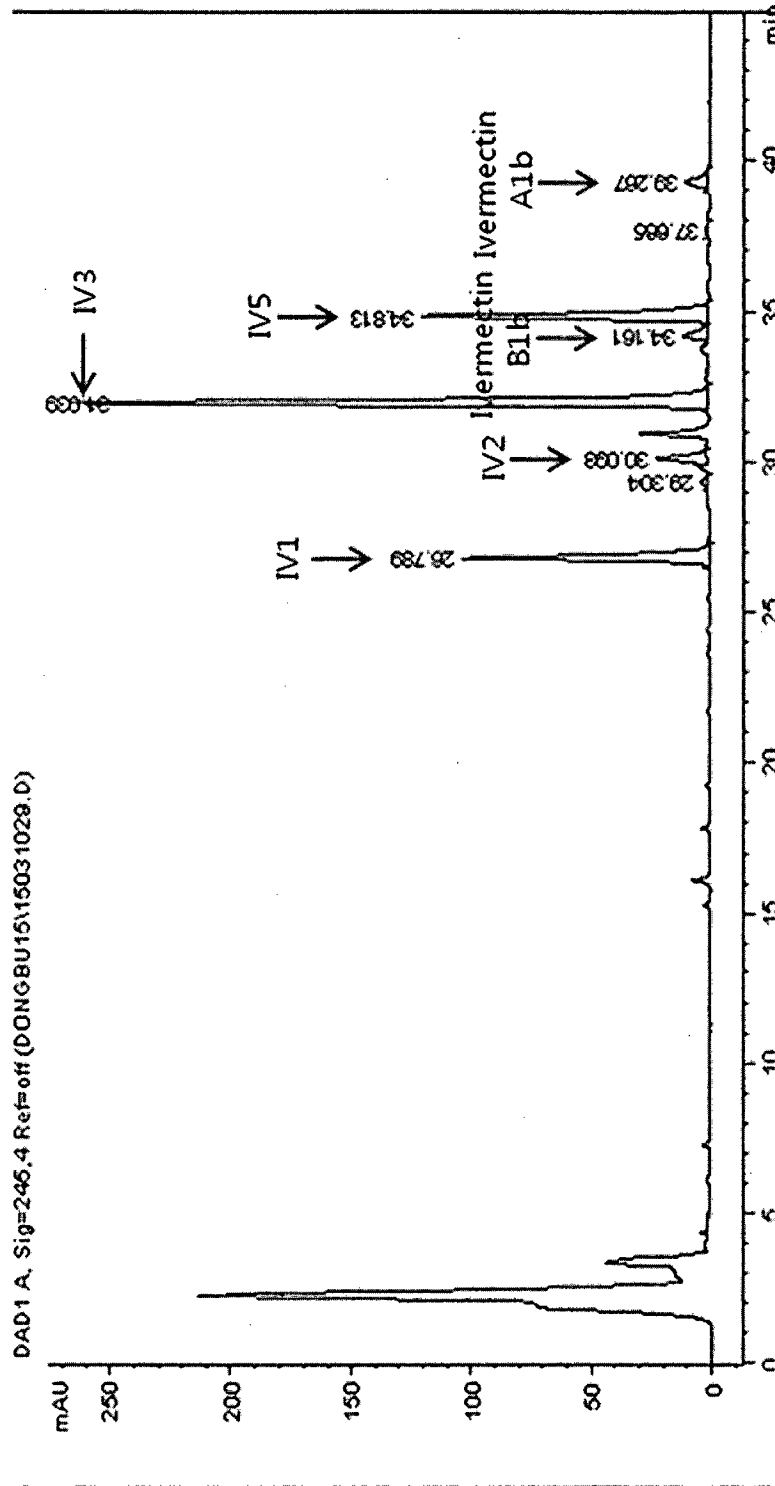


[Fig. 7b]

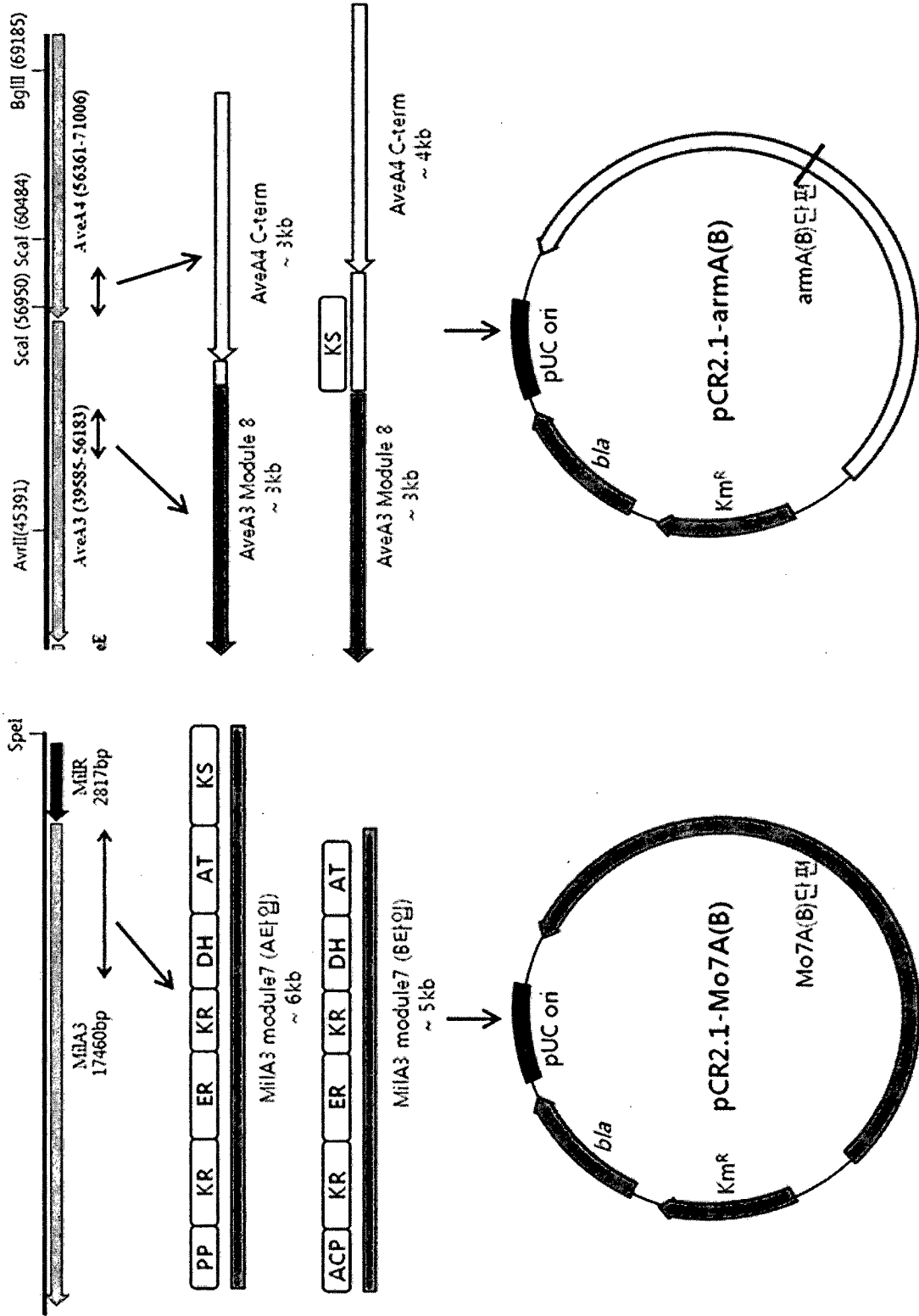


A : aveA1 지역 (2.2K)
M : milA1 지역 (2.4K)
RN : N-fusion (4.0K)
RC : C-fusion (3.3K)

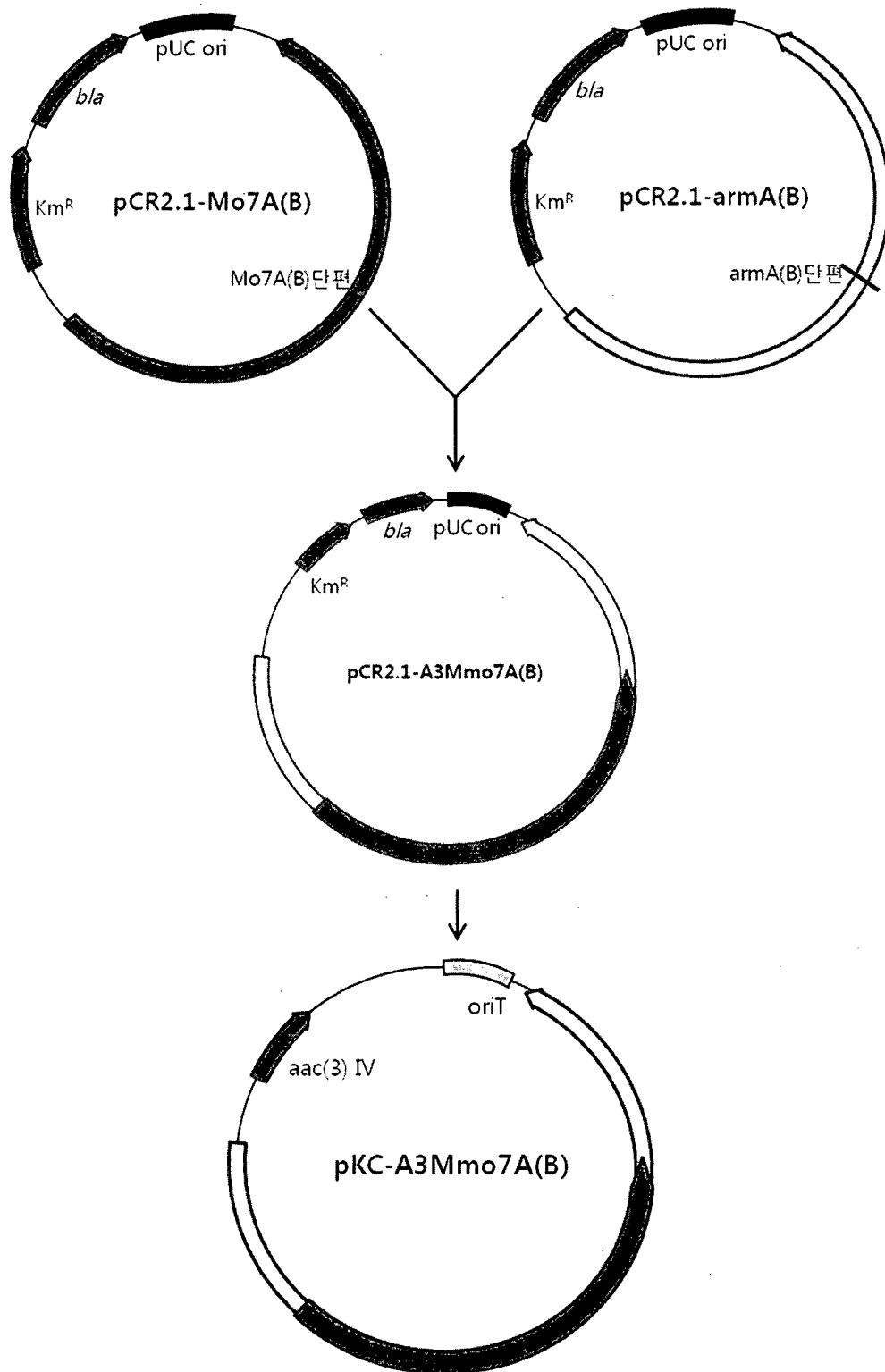
[Fig. 8]



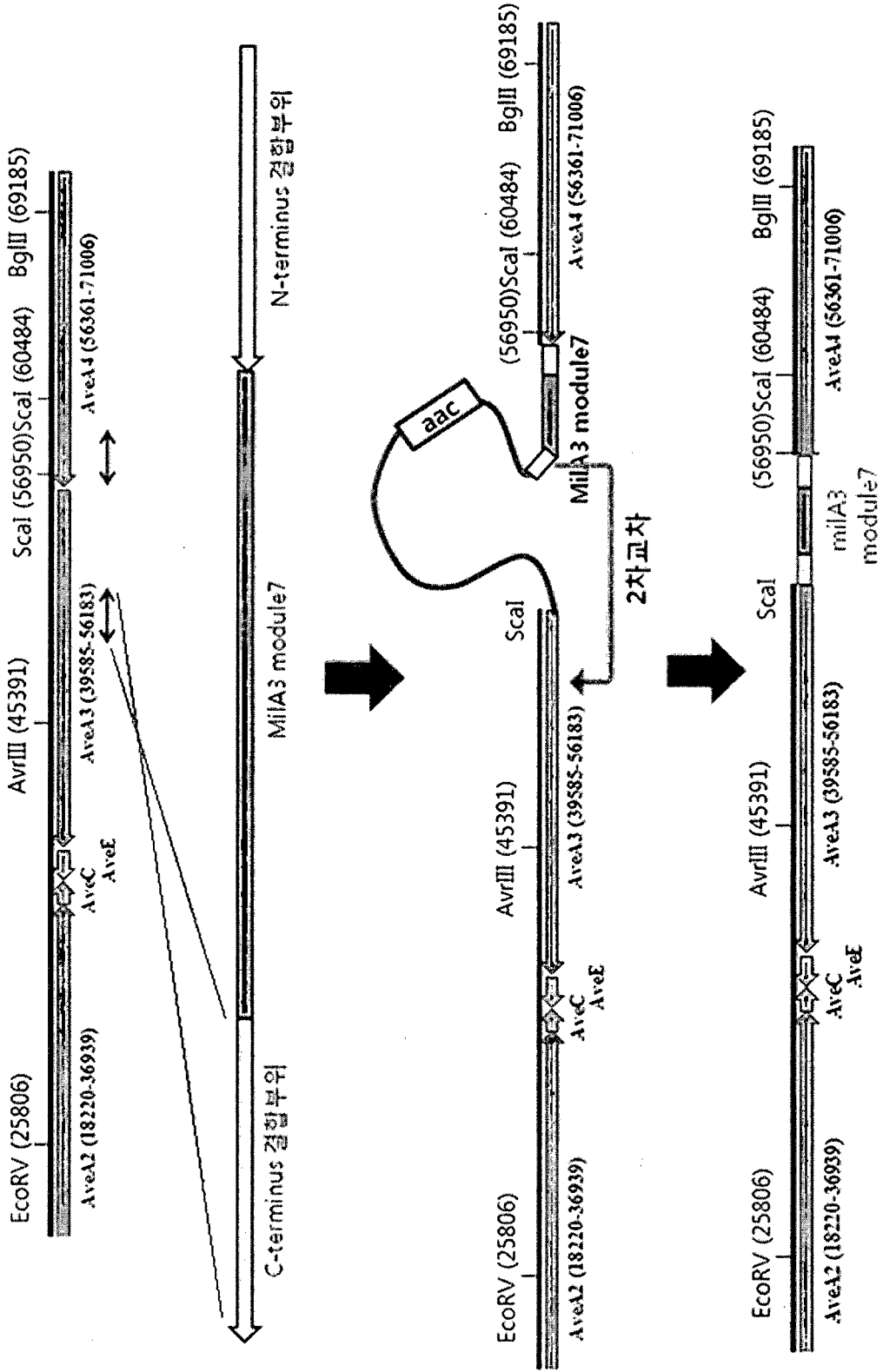
[Fig. 9a]



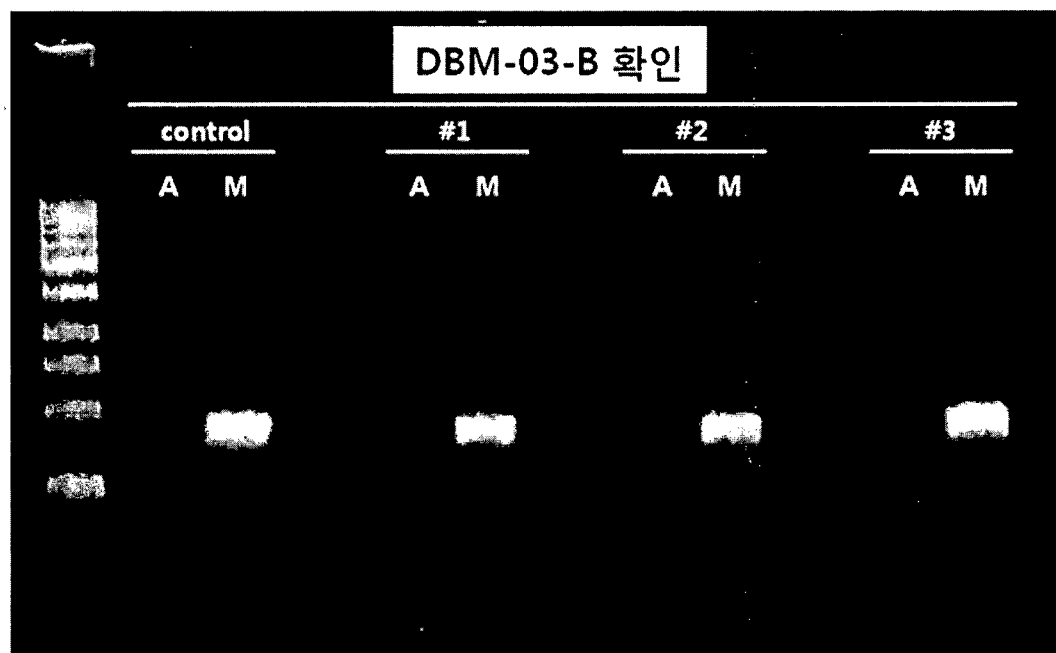
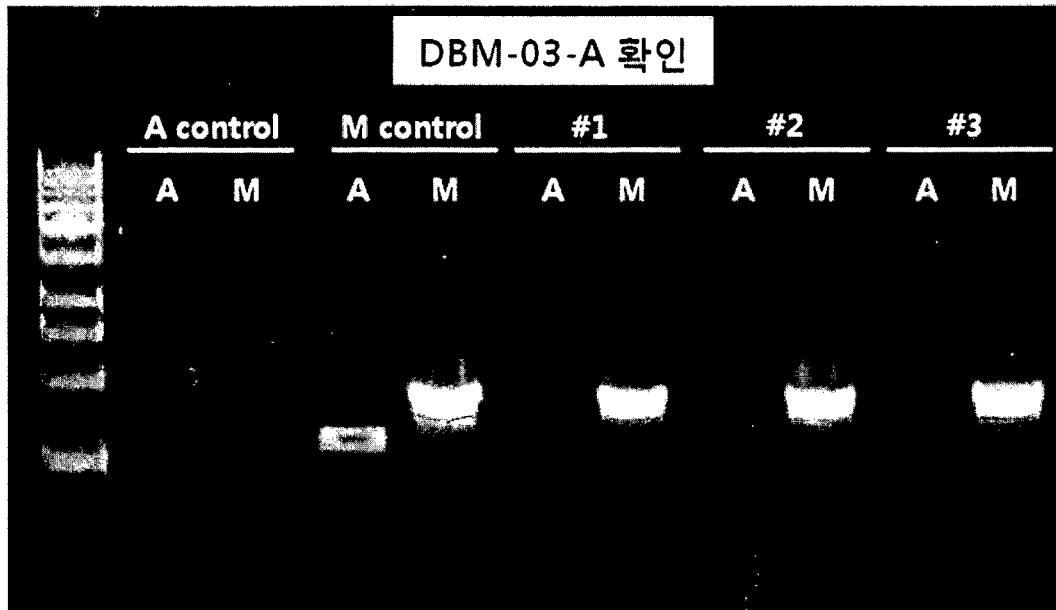
[Fig. 9b]



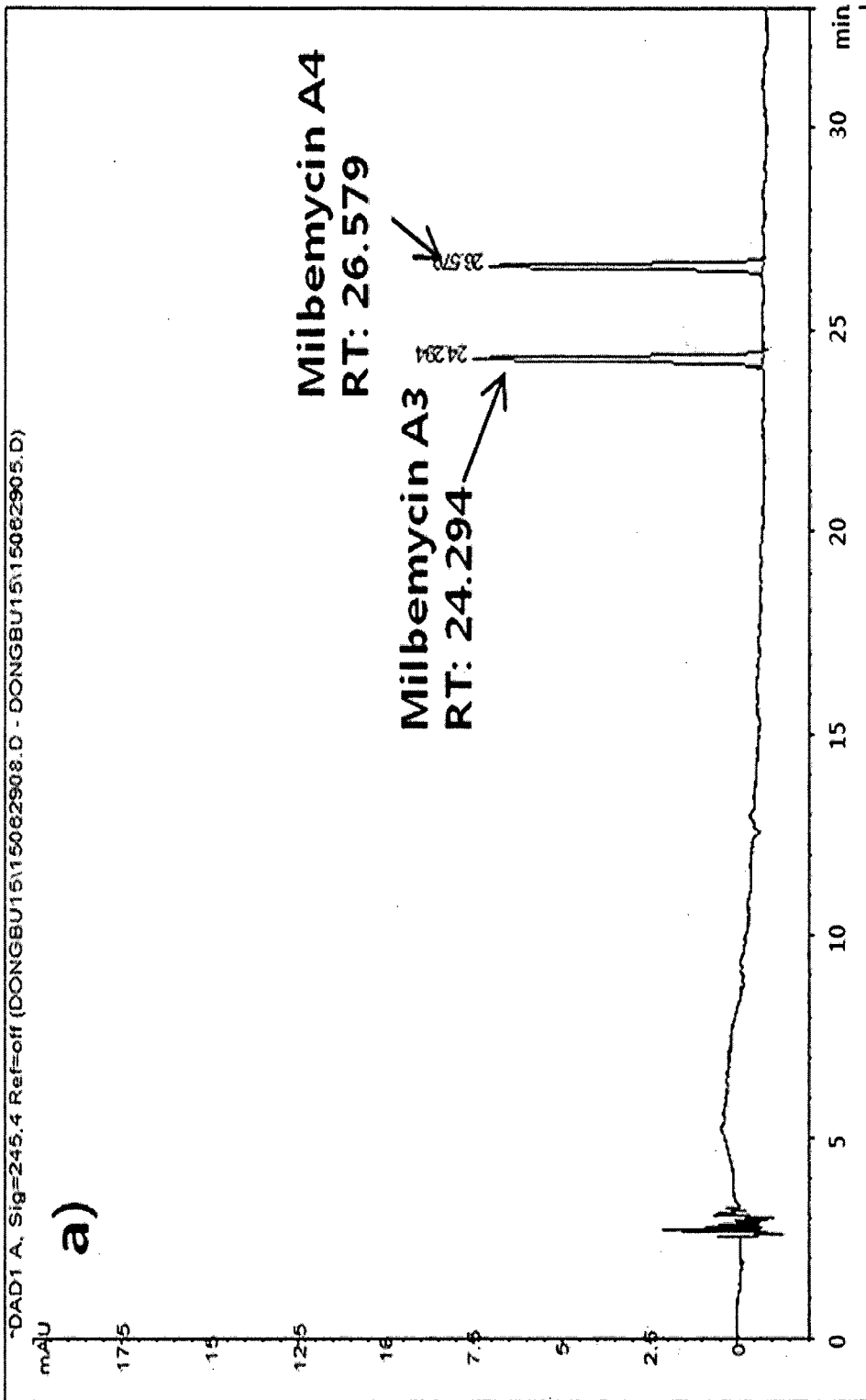
[Fig. 10a]



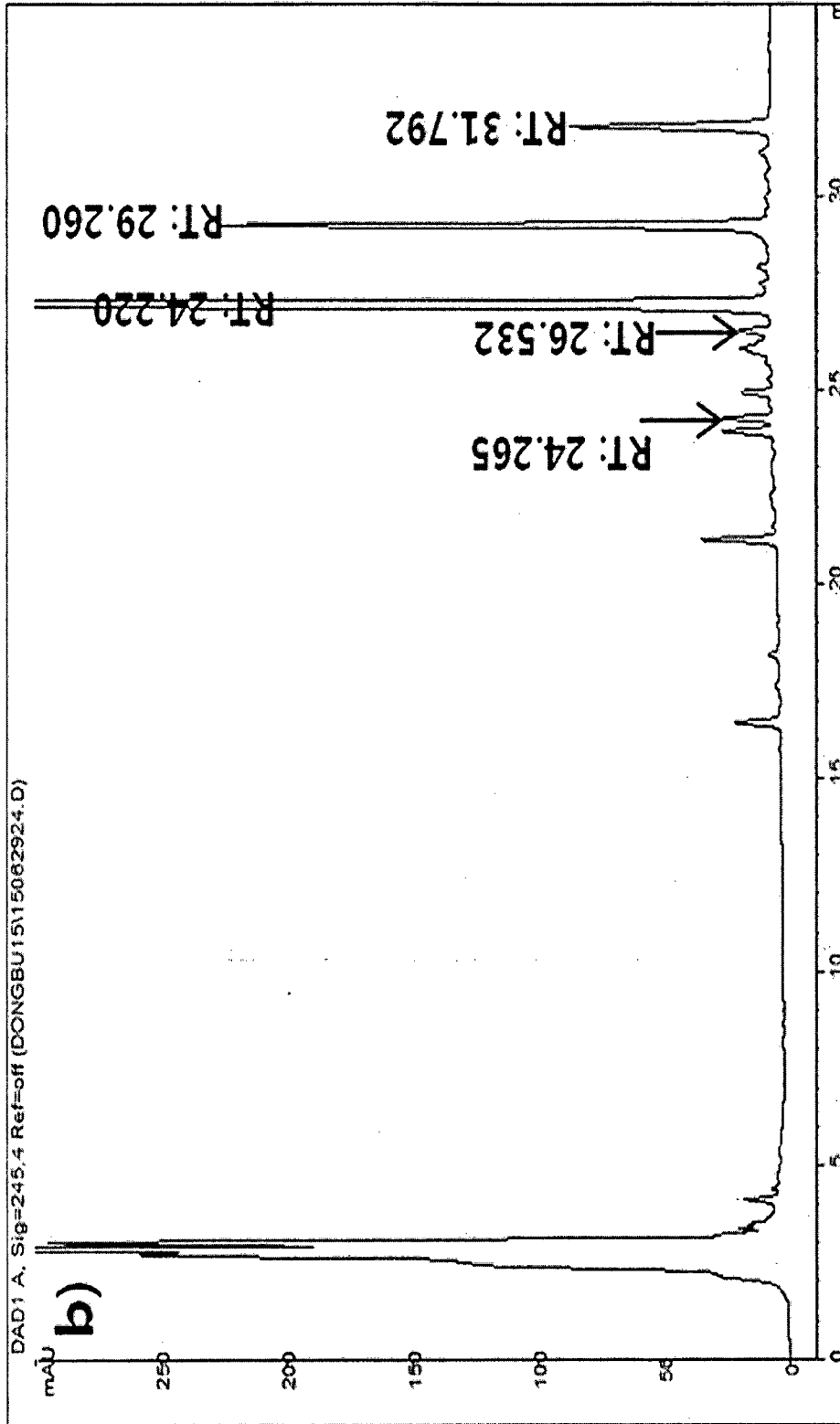
[Fig. 10b]



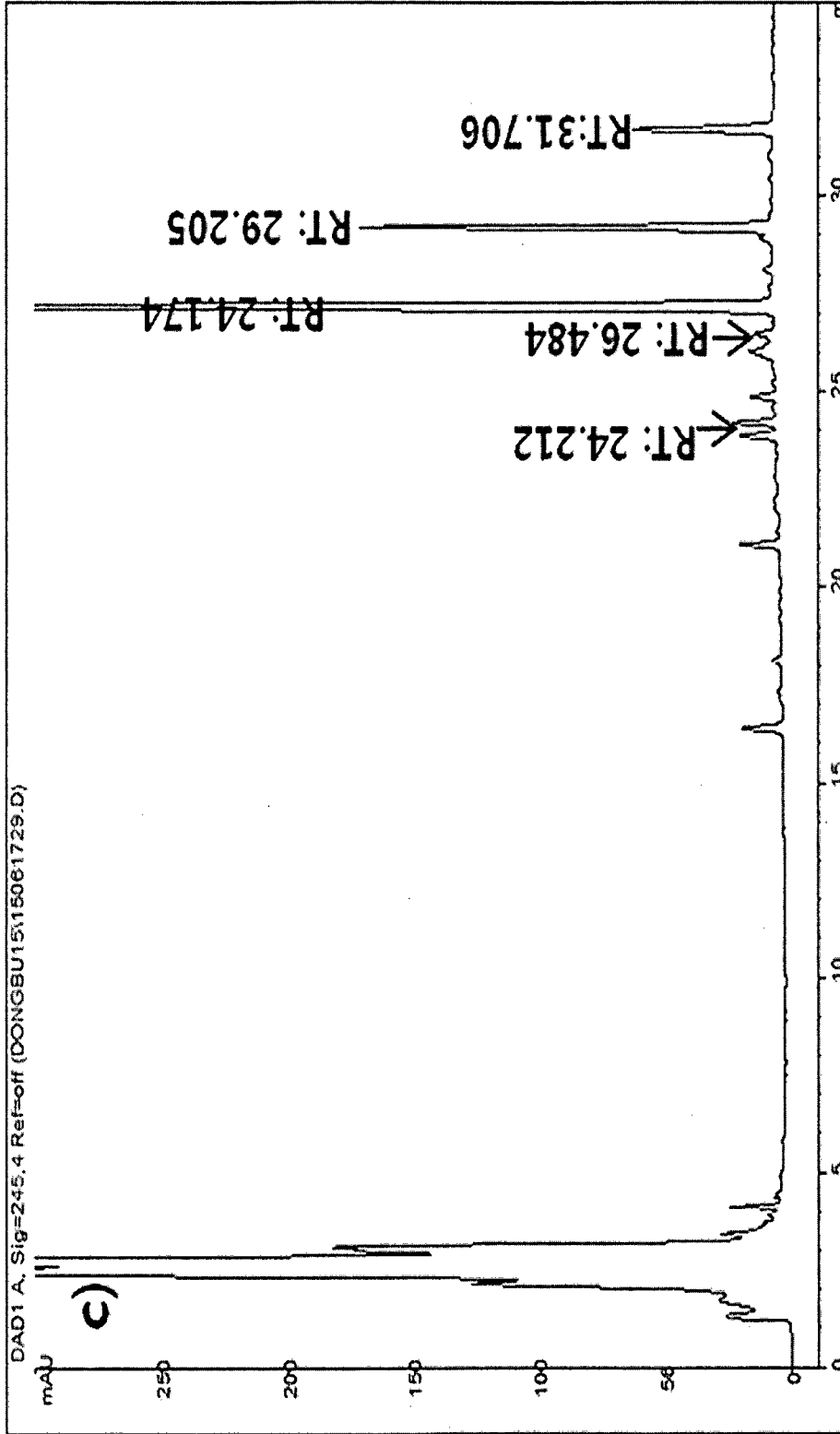
[Fig. 11a]



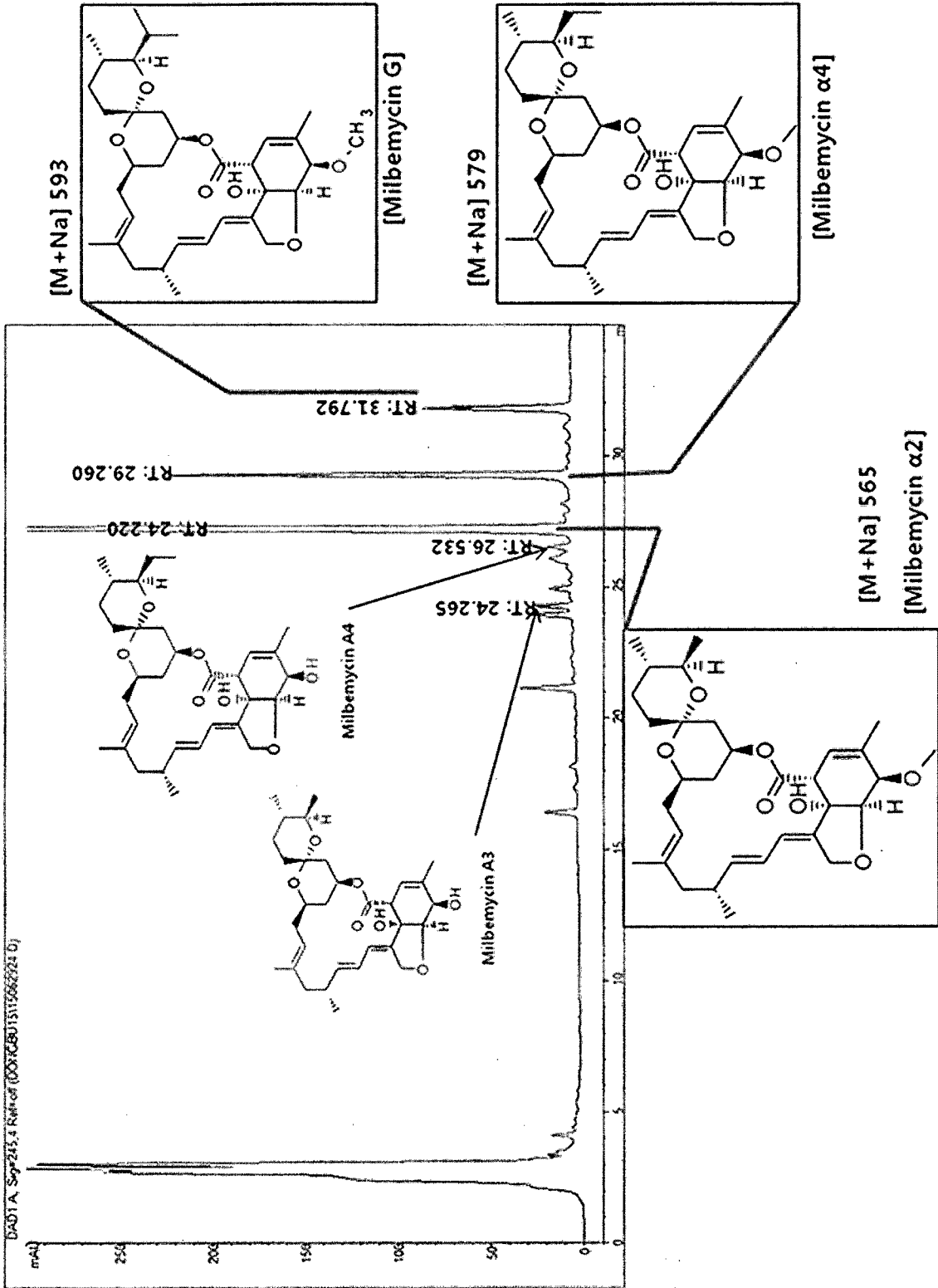
[Fig. 11b]



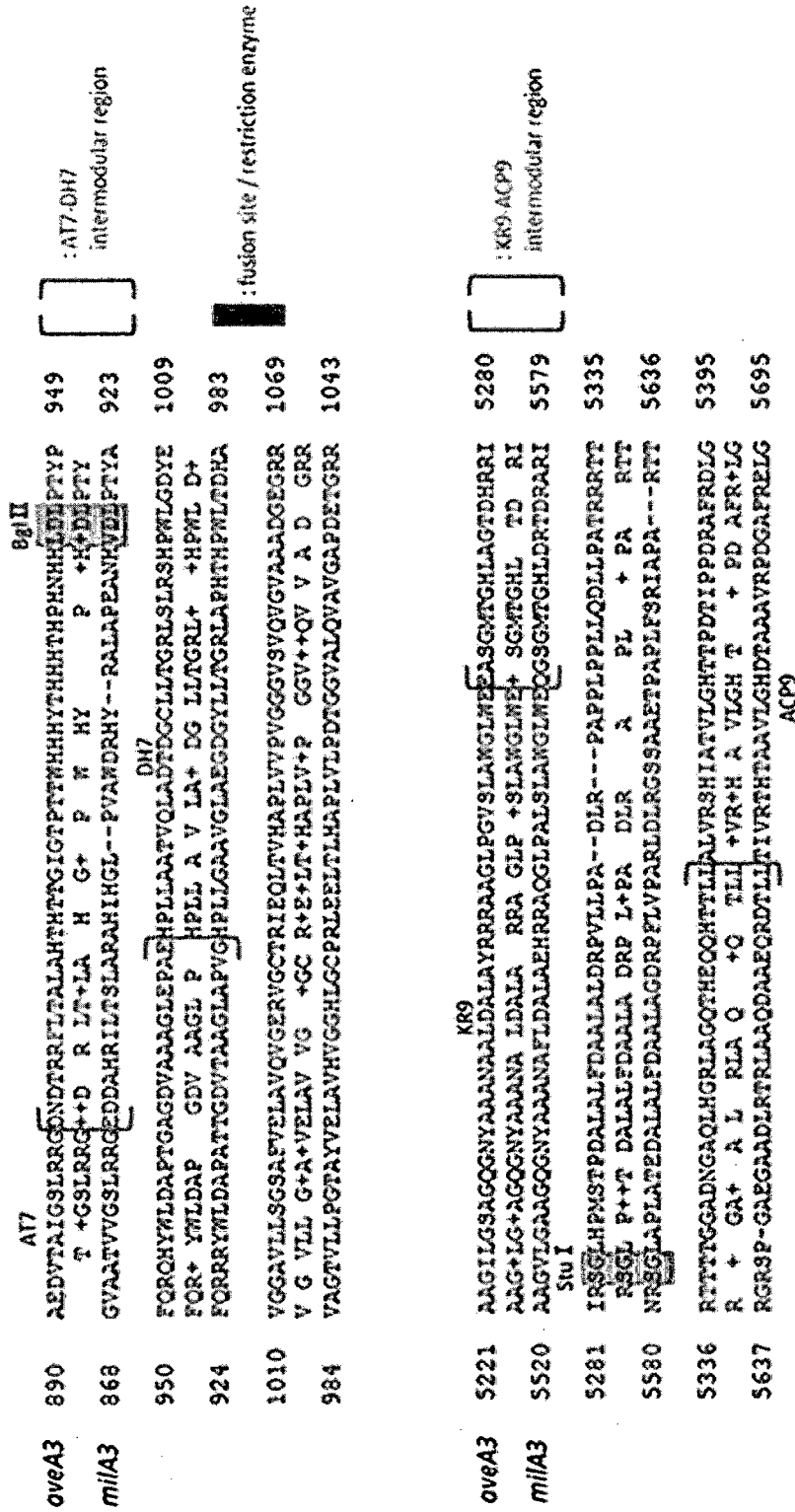
[Fig. 11c]



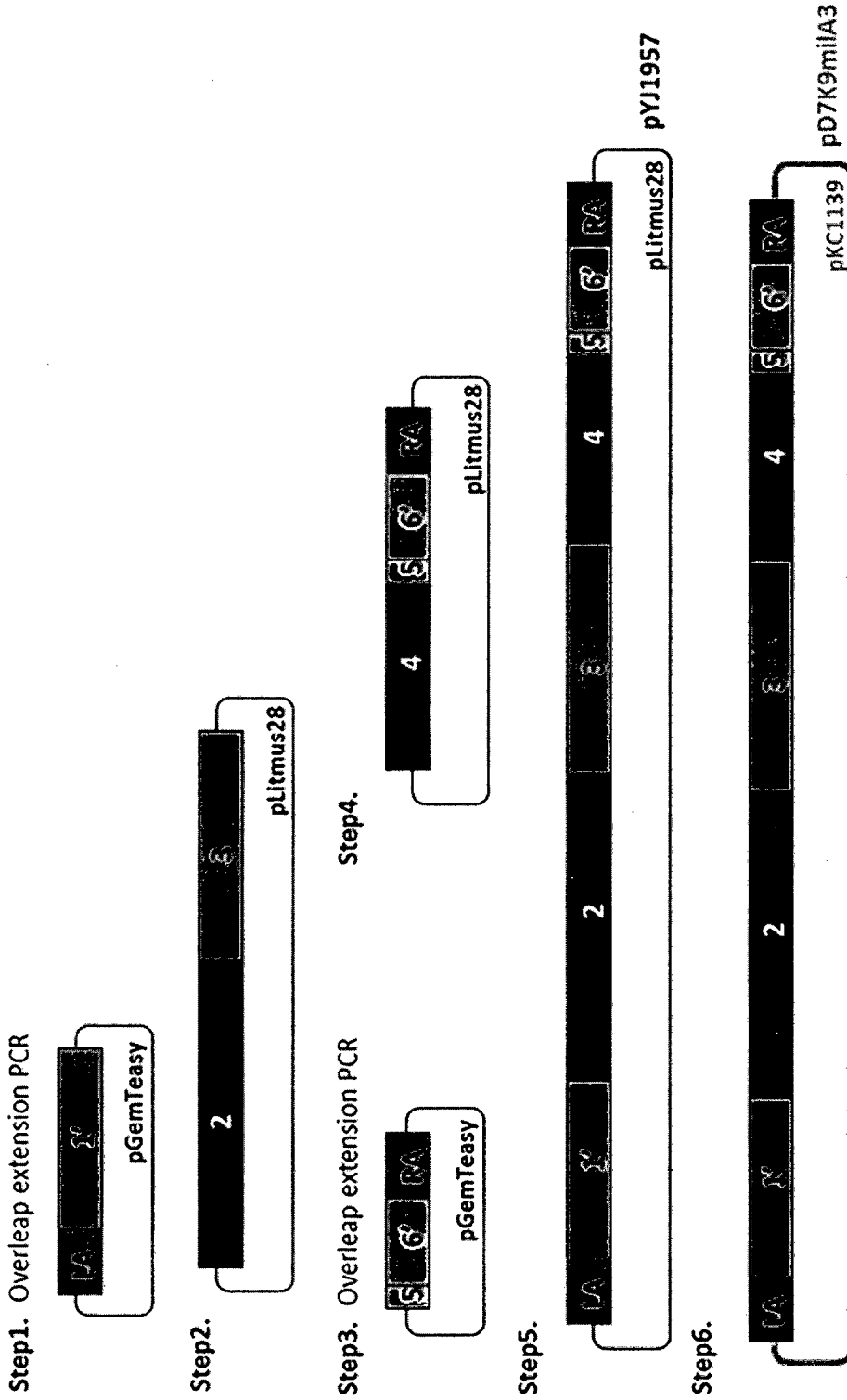
[Fig. 12]



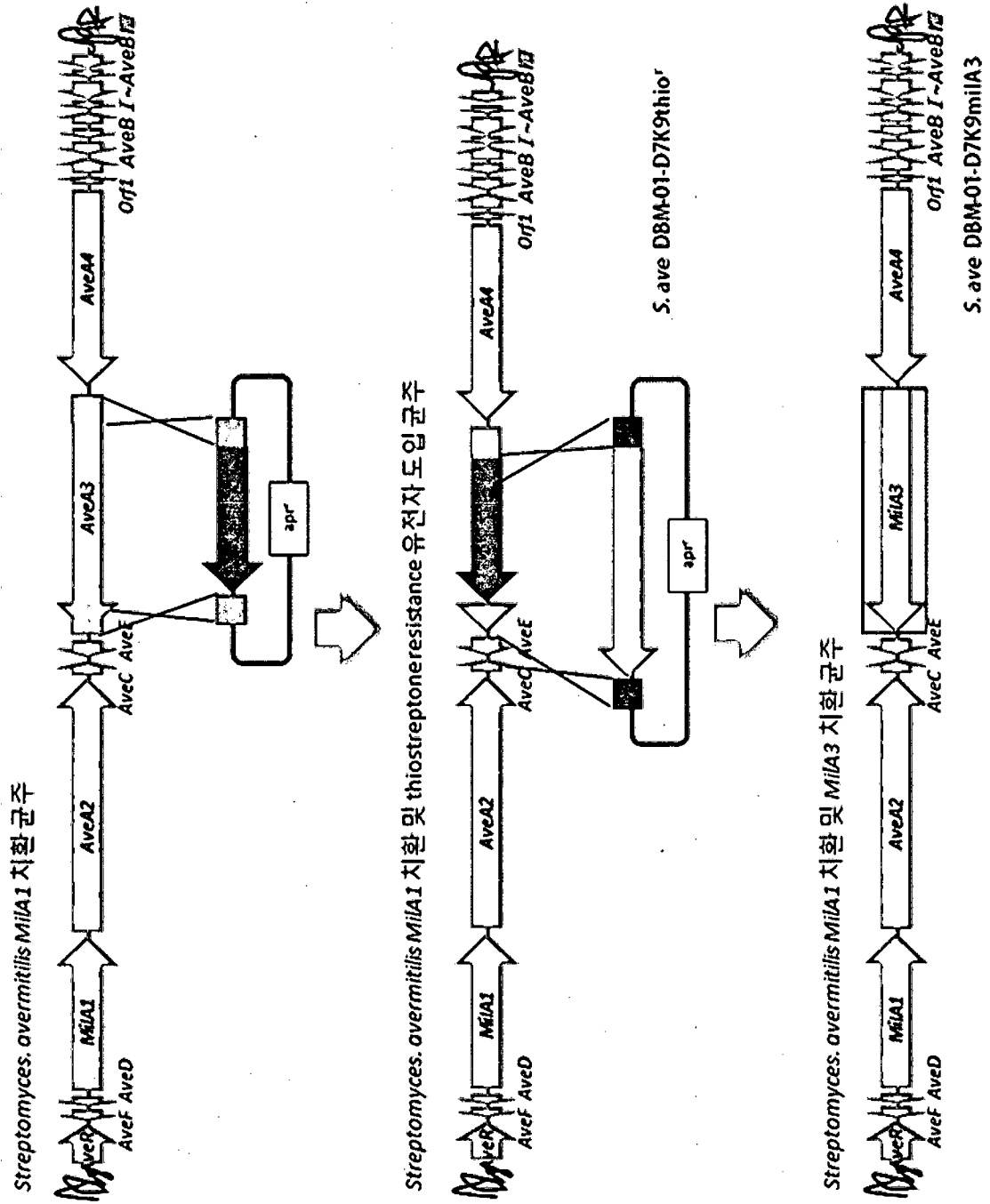
[Fig. 13]



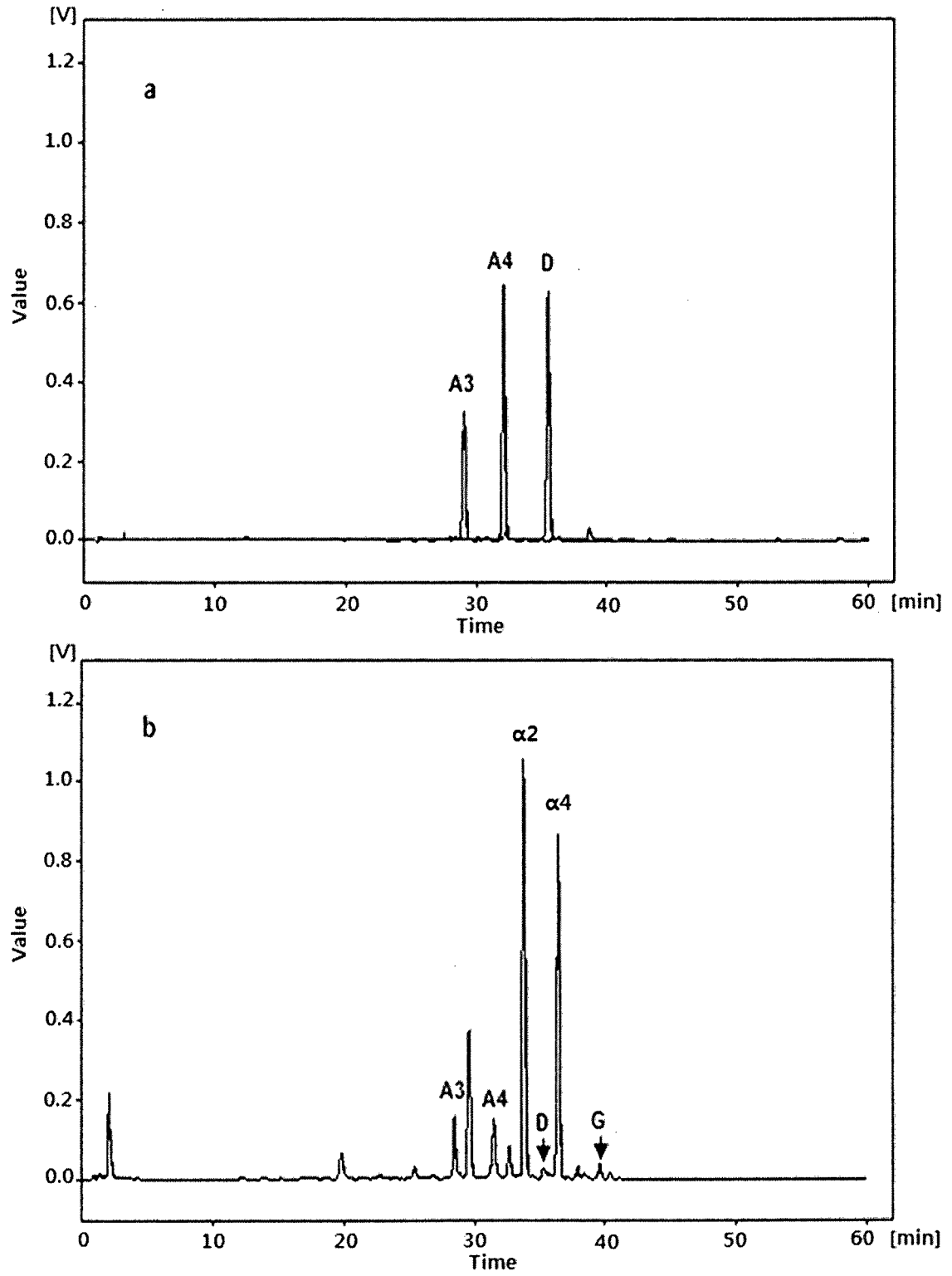
[Fig. 14]



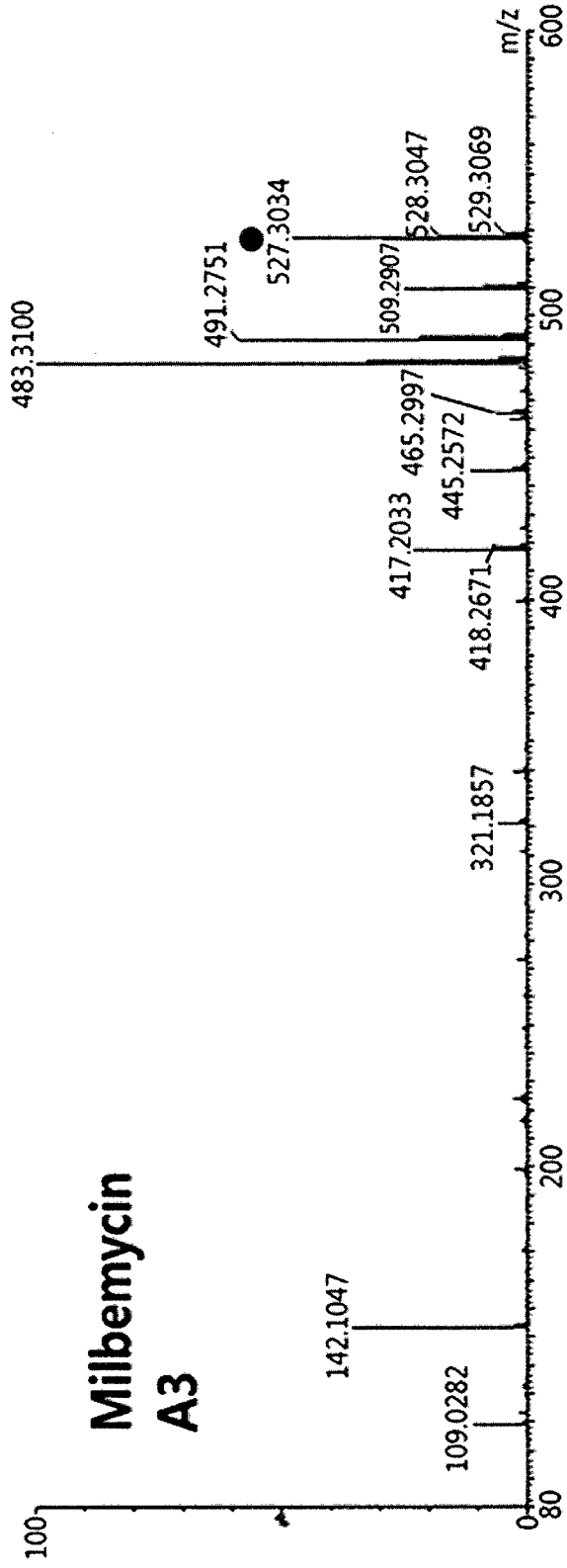
[Fig. 15]



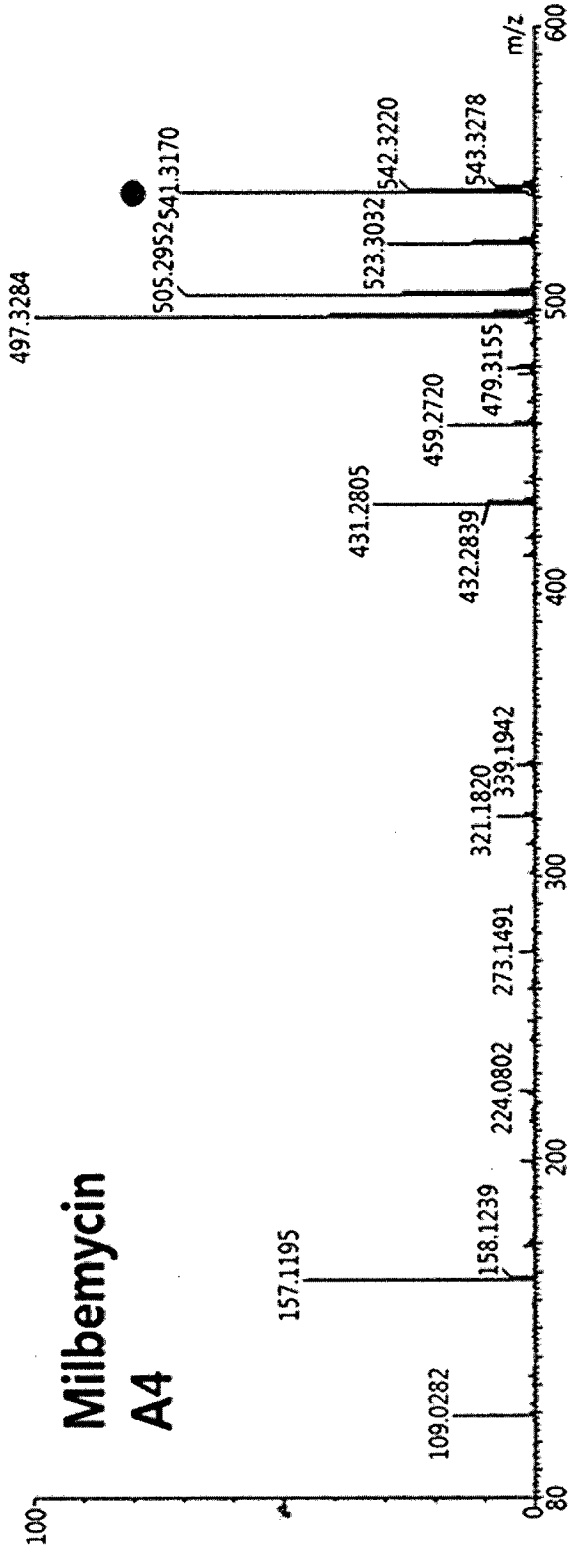
[Fig. 16]



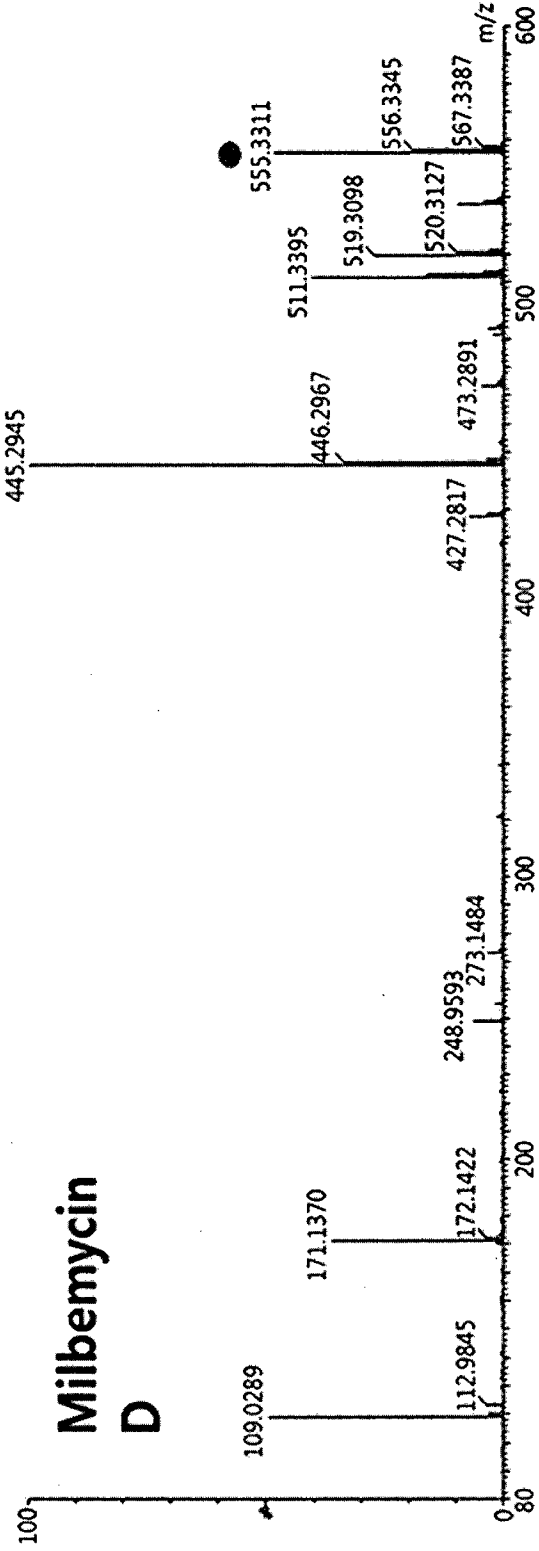
[Fig. 17a]



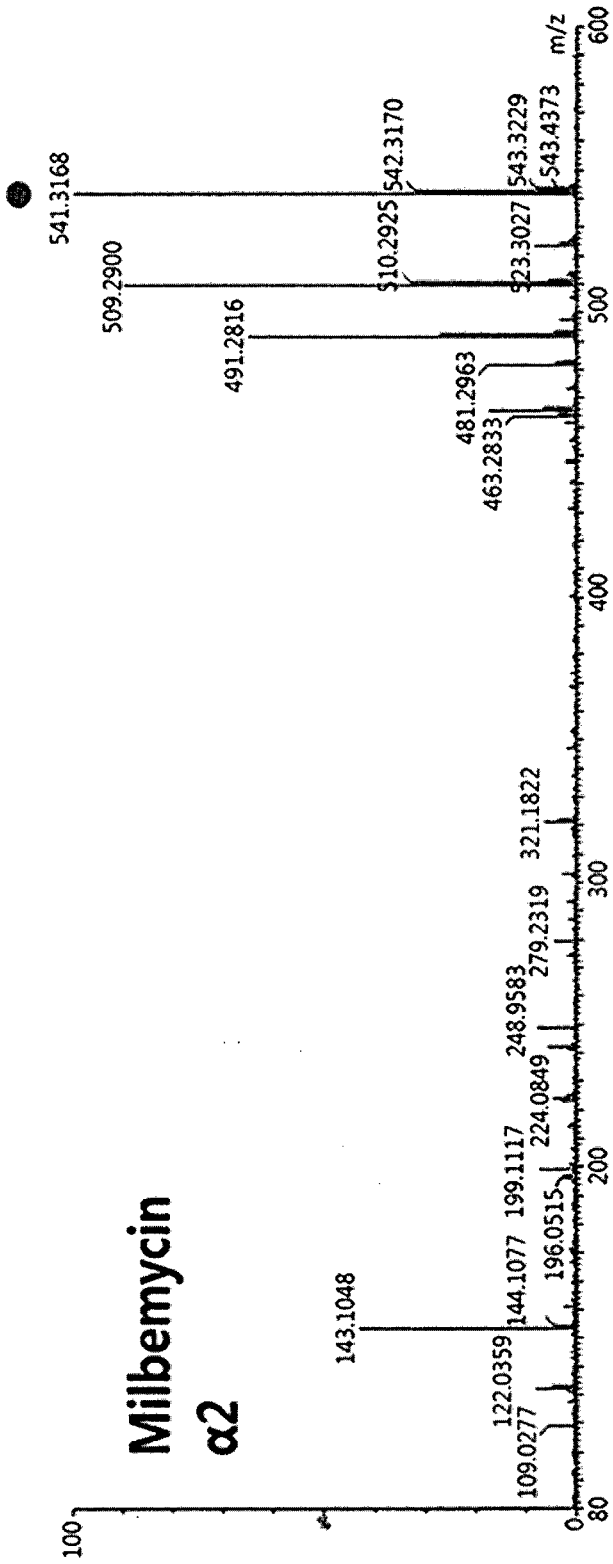
[Fig. 17b]



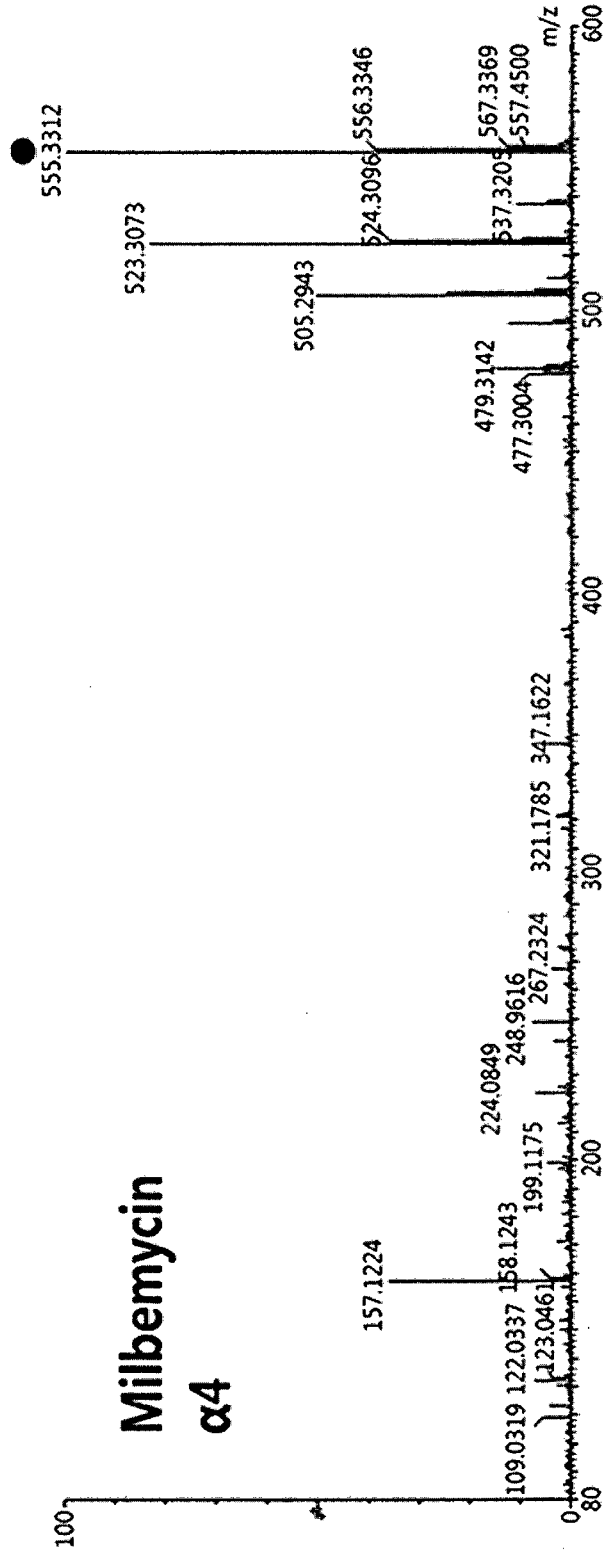
[Fig. 17c]



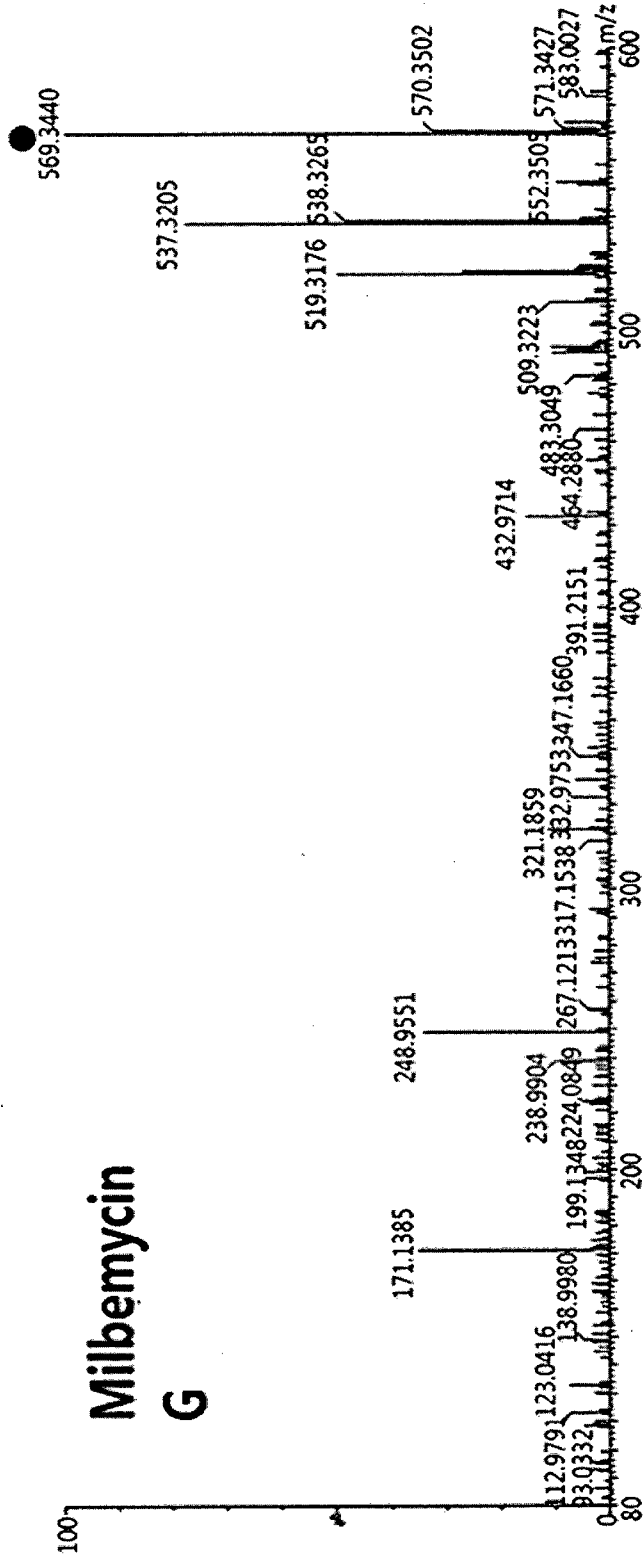
[Fig. 17d]



[Fig. 17e]

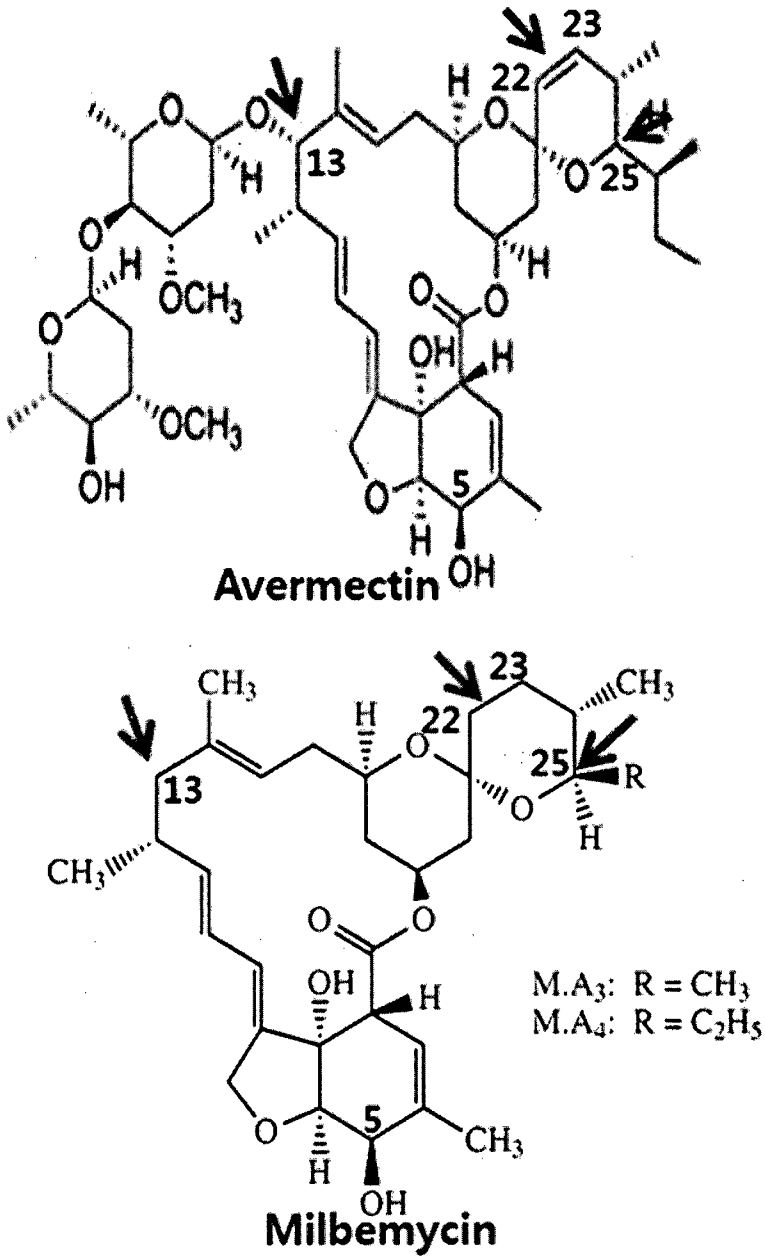


[Fig. 17f]



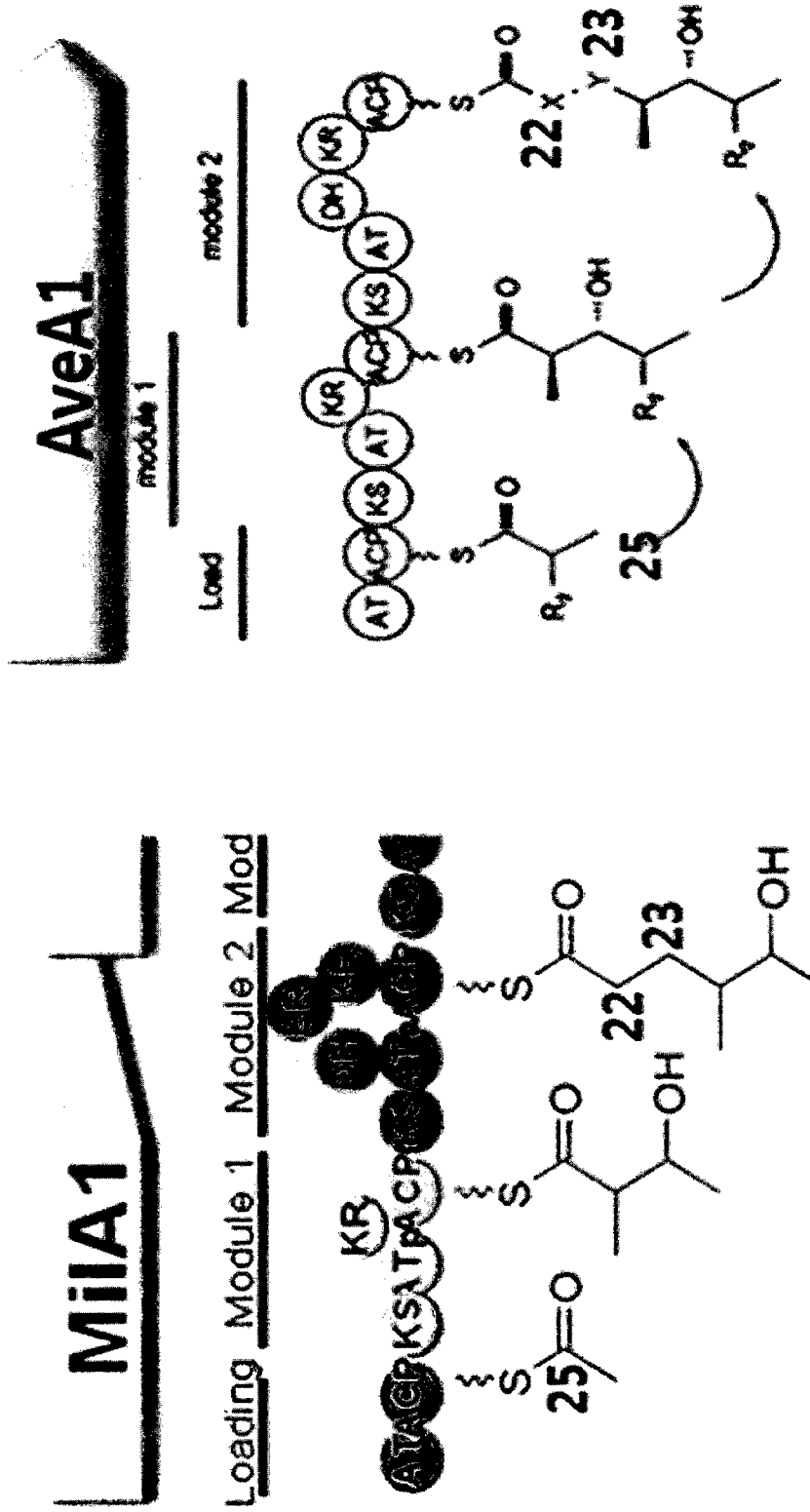
[Fig. 18a]

Milbemycin 과 Avermectin



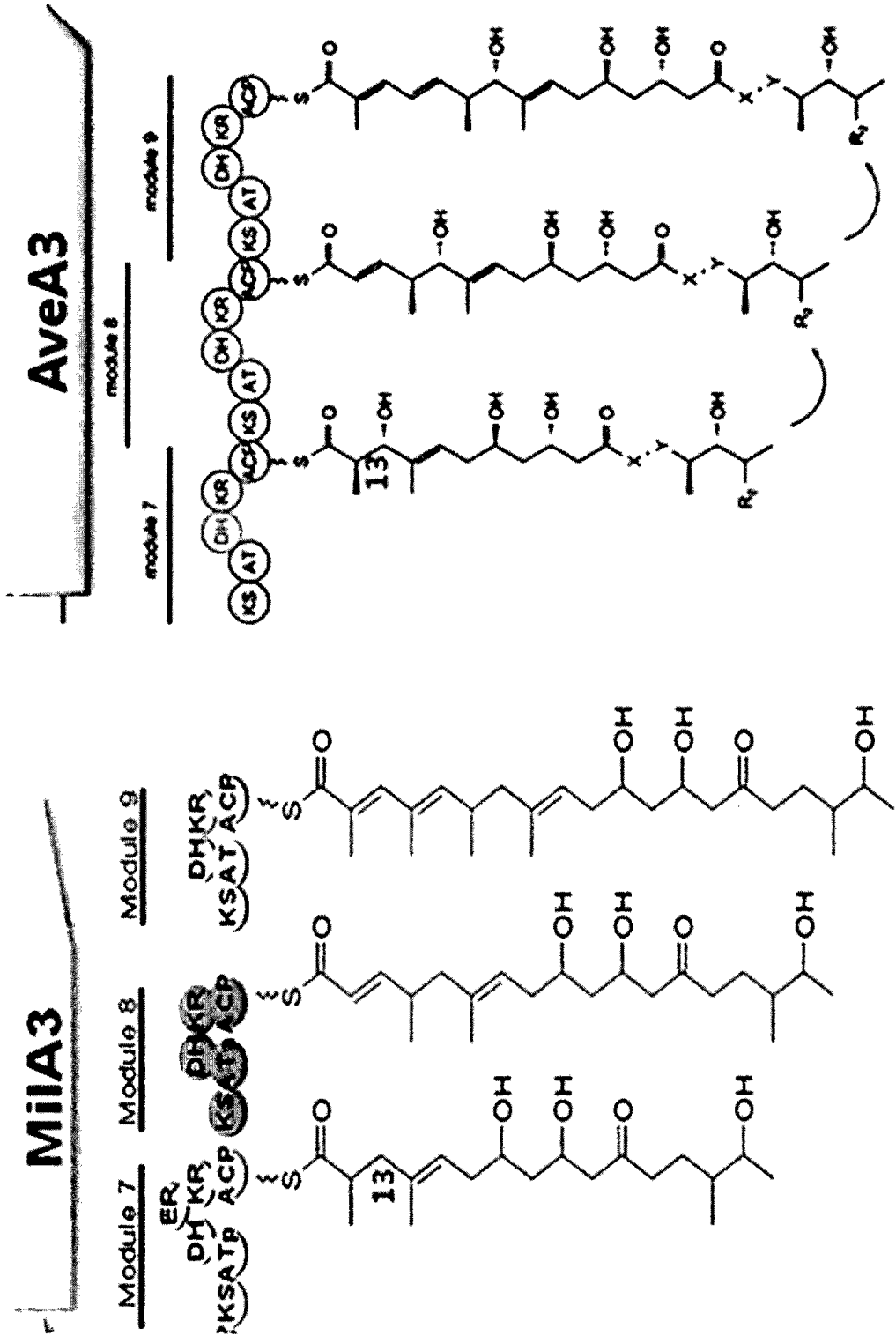
[Fig. 18b]

MiIA1과 AveA1의 차이

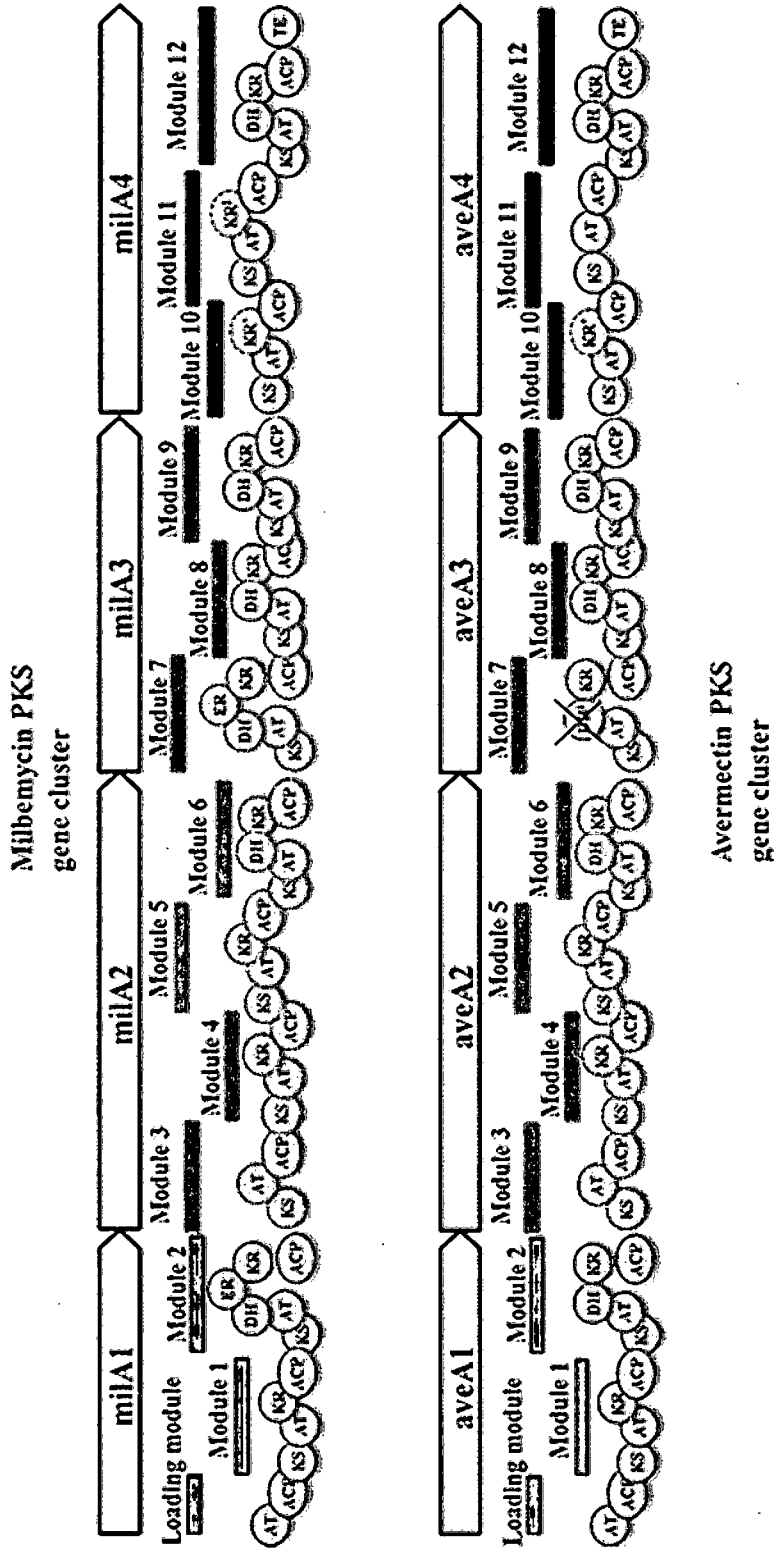


[Fig. 18c]

MiIA3과 AveA3의 차이



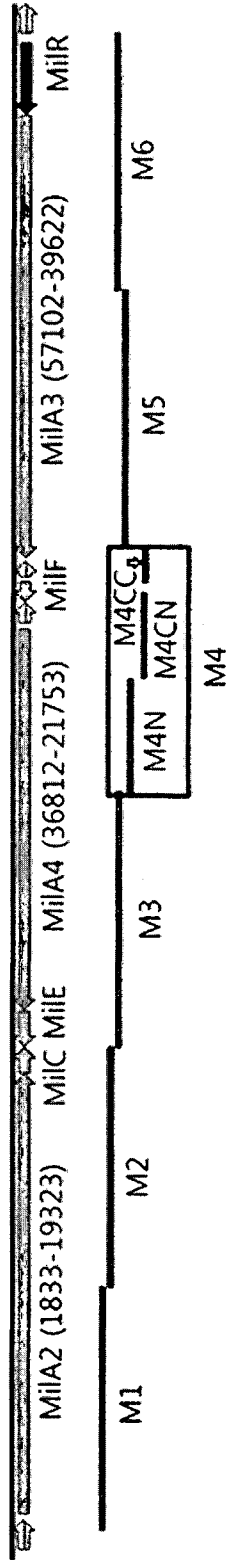
[Fig. 18d]



[Fig. 19]

Mil gene cluster (1024133-1085642)

61510 bp



- M1 (1171-10810)
- M2 (10762-20300)
- M3 (20255-30434)
- M4N (30290-34887)
- M4CN (34866-38274)
- M4CC (38620-40115)
- M5 (40091-50273)
- M6 (50196-60390)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010594**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 15/74(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12P 17/16(2006.01)i, C12R 1/465(2006.01)n*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/74; A61K 31/70; C07H 17/08; C12N 1/21; C12R 1/465; C12N 15/52; C12P 17/18; A01N 43/02; C12N 9/00; C12P 17/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Streptomyces avermitilis, Avermectin, Milbemycin, substitution, aveA1, milA1, aveA3, milA3, 5-methoxy-22, 23-dihydro-25-methyl-avermectin, 5-methoxy-22, 23-dihydro-25-ethyl-avermectin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG, Jun et al., "Gene Replacement for the Generation of Designed Novel Avermectin Derivatives with Enhanced Acaricidal and Nematicidal Activities", Applied and Environmental Microbiology, August 2015, vol. 81, no. 16, pages 5326-5334 See the entire document.	1-19
A	WO 2015-135242 A1 (ZHEJIANG HISUN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 17 September 2015 See abstract; claims 1-12.	1-19
A	PAN, Jun-Jie et al., "Three New Milbemycins from a Genetically Engineered Strain S. Avermitilis MHJ1011", The Journal of Antibiotics, (e-pub.) 02 September 2015, vol. 69, pages 104-107 See the entire document.	1-19
A	CN 1687403 A (CHINA AGRICULTURE UNIV.) 26 October 2005 See abstract; claims 1-6.	1-19
A	US 5292647 A (BONJOUKLIAN, Rosanne et al.) 08 March 1994 See abstract; claims 1-6.	1-19
A	US 4199569 A (CHABALA, John C. et al.) 22 April 1980 See abstract; claims 1-4.	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 JANUARY 2017 (13.01.2017)

Date of mailing of the international search report

13 JANUARY 2017 (13.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/010594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-135242 A1	17/09/2015	AU 2014-386509 A1	22/09/2016
		AU 2015-230474 A1	06/10/2016
		CA 2940016 A1	17/09/2015
		CA 2941862 A1	17/09/2015
		CN 104910228 A	16/09/2015
		WO 2015-135467 A1	17/09/2015
		CN 1687403 A	26/10/2005
US 5292647 A	08/03/1994	AU 5196093 A	09/06/1994
		AU 667141 B2	07/03/1996
		BR 9304843 A	14/06/1994
		CA 2109767 A1	31/05/1994
		CO 4130314 A1	13/02/1995
		CZ 282908 B6	12/11/1997
		CZ 9302502 A3	15/06/1994
		EP 0600656 A2	08/06/1994
		EP 0600656 A3	05/07/1995
		FI 935246 A	31/05/1994
		HU T69970 A	28/09/1995
		IL 107702 A	30/10/1998
		JP 06-237761 A	30/08/1994
		MX 9307410 A	29/07/1994
		NO 934293 A	31/05/1994
		NZ 250247 A	22/12/1994
		PH 30116 A	27/12/1996
		PL 301204 A1	13/06/1994
RU 2125609 C1	27/01/1999		
ZA 9308723 A	22/05/1995		
US 4199569 A	22/04/1980	EP 0001689 A1	02/05/1979
		EP 0001689 B1	21/03/1984
		JP 3017837 B	11/03/1991
		JP 54-061198 A	17/05/1979

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 15/74(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12P 17/16(2006.01)i, C12R 1/465(2006.01)n

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
 C12N 15/74; A61K 31/70; C07H 17/08; C12N 1/21; C12R 1/465; C12N 15/52; C12P 17/18; A01N 43/02; C12N 9/00; C12P 17/16

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
 eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 스트렙토마이세스 아베르미틸리스, 아베멕틴, 밀베마이신, 치환, aveA1, mila1, aveA3, mila3, 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-메틸-아베멕틴, 5-메톡시-22,23-디하이드로-25-에틸-아베멕틴

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HUANG, JUN 등, 'Gene replacement for the generation of designed novel avermectin derivatives with enhanced acaricidal and nematocidal activities', Applied and Environmental Microbiology, 2015.08, 제81권, 제16호, 5326-5334 페이지 전체 문헌 참조.	1-19
A	WO 2015-135242 A1 (ZHEJIANG HISUN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2015.09.17 요약; 청구항 1-12 참조.	1-19
A	PAN, JUN-JIE 등, 'Three new milbemycins from a genetically engineered strain S. avermitilis MHJ1011', The Journal of Antibiotics, (전자공개)2015.09.02, 제69권, 104-107 페이지 전체 문헌 참조.	1-19
A	CN 1687403 A (CHINA AGRICULTURE UNIV.) 2005.10.26 요약; 청구항 1-6 참조.	1-19
A	US 5292647 A (BONJOUKLIAN, ROSANNE 등) 1994.03.08 요약; 청구항 1-6 참조.	1-19
A	US 4199569 A (CHABALA, JOHN C. 등) 1980.04.22 요약; 청구항 1-4 참조.	1-19

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2017년 01월 13일 (13.01.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 01월 13일 (13.01.2017)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 조기훈 전화번호 +82-42-481-5655
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2015-135242 A1	2015/09/17	AU 2014-386509 A1 AU 2015-230474 A1 CA 2940016 A1 CA 2941862 A1 CN 104910228 A WO 2015-135467 A1	2016/09/22 2016/10/06 2015/09/17 2015/09/17 2015/09/16 2015/09/17
CN 1687403 A	2005/10/26	CN 100487109 C	2009/05/13
US 5292647 A	1994/03/08	AU 5196093 A AU 667141 B2 BR 9304843 A CA 2109767 A1 CO 4130314 A1 CZ 282908 B6 CZ 9302502 A3 EP 0600656 A2 EP 0600656 A3 FI 935246 A HU T69970 A IL 107702 A JP 06-237761 A MX 9307410 A NO 934293 A NZ 250247 A PH 30116 A PL 301204 A1 RU 2125609 C1 ZA 9308723 A	1994/06/09 1996/03/07 1994/06/14 1994/05/31 1995/02/13 1997/11/12 1994/06/15 1994/06/08 1995/07/05 1994/05/31 1995/09/28 1998/10/30 1994/08/30 1994/07/29 1994/05/31 1994/12/22 1996/12/27 1994/06/13 1999/01/27 1995/05/22
US 4199569 A	1980/04/22	EP 0001689 A1 EP 0001689 B1 JP 3017837 B JP 54-061198 A	1979/05/02 1984/03/21 1991/03/11 1979/05/17