(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 5 월 7 일 (07.05.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/064998 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/010161

(22) 국제출원일: 2014 년 10 월 28 일 (28.10.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0130264 2013 년 10 월 30 일 (30.10.2013) KR

(71) 출원인: **인하대학교 산학협력단 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE)** [KR/KR]; 153-803 인천시 남구 인하로 100, Incheon (KR).

(72) 발명자: **김응수 (KIM, Eung Soo)**; 135-554 서울시 강남구 언주로 30 길 26, 지동 5006 호, Seoul (KR). **이미진 (LEE, Mi Jin)**; 402-825 인천시 남구 인하로 95, 301 호, Incheon (KR). **김혜진 (KIM, Hye Jin)**; 407-721 인천시 계양구 새벌로 112 번길 12, 401 동 2504 호, Incheon (KR).

(74) 대리인: **특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1 로 151 이노플렉스 1 차 601 호, 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, 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, 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.

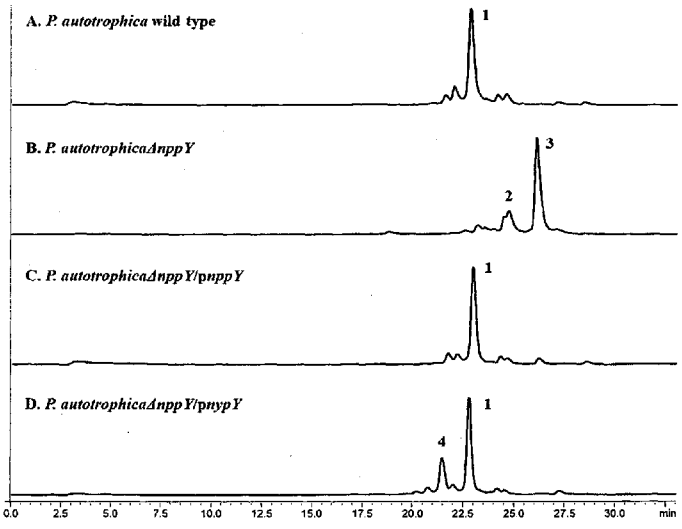
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL POLYENE-SPECIFIC GLYCOSYLTRANSFERASE DERIVED FROM *PSEUDONOCARDIA AUTOTROPHICA*

(54) 발명의 명칭 : 슈도노카디아 오토트로피카 유래의 폴리엔 특이적인 신규 당전이효소

[Fig. 3]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a novel polyene-specific glycosyltransferase derived from *Pseudonocardia autotrophica*, and provides glycosyltransferase comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a gene encoding the glycosyltransferase. In addition, the present invention provides a recombinant expression vector comprising the gene and a recombinant microorganism transformed with the recombinant expression vector. In addition, the present invention provides a method for producing glycosyltransferase, comprising the steps of: culturing transgenic recombinant microorganisms; and isolating glycosyltransferase from the cultured recombinant microorganisms.

(57) **요약서**: 본 발명은 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래의 폴리엔 특이적인 신규 당전이효소(glycosyltransferase)에 관한 것으로, 본 발명은 서열번호 1 의 아미노산 서열을 포함하는 당전이효소(glycosyltransferase) 및 상기 당전이효소를 암호화하는 유전자를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 재조합 미생물로부터 당전이효소를 분리하는 단계를 포함하는 당전이효소 생산방법을 제공한다.

WO 2015/064998 A1

명세서

발명의 명칭: 슈도노카디아 오토트로피카 유래의 폴리엔 특이적인 신규 당전이효소

기술분야

[1] 본 발명은 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래의 폴리엔 특이적인 신규 당전이효소(glycosyltransferase)에 관한 것이다.

배경기술

[2] 폴리엔 마크로라이드(Polyene macrolides)는 토양 방선균에서 전형적으로 생산되는 천연물 중 커다란 패밀리이다. 폴리엔 마크로라이드는 보통 모듈(modular) 및 커다란 타입 I 폴리케타이드 합성효소(type I polyketide synthases; PKSs)에 의해 생합성되는데, 여러 단계의 연속적인 후-PKS 변형이 일어난다. 후기 단계에서, 환외(exocyclic) 카르복실 그룹을 형성하기 위하여 사이토크롬 P450은 메틸 측면 체인을 산화시키고, 당전이효소(glycosyltransferase; GT)는 GDP-d-만노스(GDP-d-mannose) 유래 데옥시아미노슈가(deoxyaminosugar)인 마이코사민(mycosamine)의 부가를 촉진한다. 특히, 당전이효소(glycosyltransferases)는 아글리콘(aglycone)에 당의 부착을 촉진하므로, 중요한 클래스의 효소이고, 글리코실화된 천연물의 생합성에 있어서는 필수적이다. 상기 당들은 화합물의 용해도 및/또는 생물학적 활성을 포함하는 약리학적 특성에 있어서 대개 필수적이다. 최근 연구에 의하면, 천연물의 당 구조들을 변경하기 위한 효과적인 수단으로서, 반합성(semisynthesis), 경로 엔지니어링(pathway engineering) 및 시험관 내(in vitro) 효소학적 글리코실화 기술을 포함하는 여러 대체 기술들이 나타나고 있다.

[3] 여러 폴리엔 마크로라이드의 생합성 유전자 클러스터들이 확인되었는데, 대부분의 폴리엔 항생제들은 마크로락톤(macrolactones)이 붙은 단일 데옥시아미노슈가(deoxyaminosugar)를 포함한다. 화학적 변형 연구에서 폴리엔에 부착된 당 잔기들은 그들의 약리학적 특성을 개선할 수 있는 것으로 나타났다. 몇몇 폴리엔은 자연적으로 마이코사민이 붙은 추가적인 당 잔기들을 포함한다. 이당류(dissacharide)-변형-방향족 헵타엔(heptaene)인, 67-121C는 액티노플라네스 캐룰레우스(*Actinoplanes caeruleus*)로부터 분리되었다. 2차 당 잔기는 GDP-d-만노스(GDP-d-mannose)로 확인되었다. 확장된 당전이효소(glycosyltransferas) 유전자인 *pegA*는 67-121C 생합성 과정 동안 마이코사미닐 당(mycosaminyl sugar)에 만노실(mannosyl) 잔기의 부착을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 다른 일례로, 이당류(dissacharide) 마이코사민-글루코스를 가진 나이스타틴(nystatin) P1은 MS-MS 분석에 의해 확인되었고, 생합성 유전자 클러스터는 정원 일개미인 *Apterostigmaden tigerum* 로부터 수집된 슈도노카디아(*Pseudonocardia*) P1 균주에서 밝혀졌다. 2차 당

잔기는 완전하게 밝혀지지 않았으나, 헥소스(hexose)일 것으로 추정된다. 확장된 GT 유전자는 밝혀졌고, *nypY*로 명명하였다.

[4] 최근에, 본 발명자들은 이당류(dissacharide)인 마이코사민 (α1-4)-N-아세틸-2-아미노글루코스[mycosamine (α1-4)-N-acetyl-2-aminoglucose]를 포함하는 나이스타틴-유사 폴리엔(nystatin-like polyene; NPP)을 밝혀냈다. 흥미롭게도, 이당류(dissacharide) 부분에서 얻은 NPP는 오직 마이코사민을 포함하는 나이스타틴(nystatin)에 비해 용해도가 300배 이상 높았고, 용혈(hemolytic) 활성이 10배 이상 낮았다. 추가적인 *N*-아세틸-글루코사민(*N*-acetyl-glucosamine)은 폴리엔 화합물의 용해도를 증가시켰다. 하지만, 상기 확장된 GT 유전자는 주요 생합성 유전자 클러스터에서는 발견할 수 없었다.

[5] 한편, 한국공개특허 제10-2010-0089370호에서는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)의 폴리엔 생합성 유전자군 및 이의 염기서열에 대해 개시하고 있으나, 본 발명의 폴리엔 특이적인 신규 당전이효소에 관한 언급은 없다.

[6]

[7] 따라서, 본 발명자들은 드래프트(draft) 유전체 서열분석을 통해 NPP 생합성에 있어서 확장된 GT에 대해 밝혀내고, PCR-표적 유전자 파괴-보상 시스템을 통하여 폴리엔 생산 균주 내 코딩 유전자의 기능을 평가하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당전이효소(glycosyltransferase) 및 상기 당전이효소를 암호화하는 유전자를 제공하는 데에 있다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 데에 있다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 재조합 미생물로부터 당전이효소를 분리하는 단계를 포함하는 당전이효소 생산방법을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

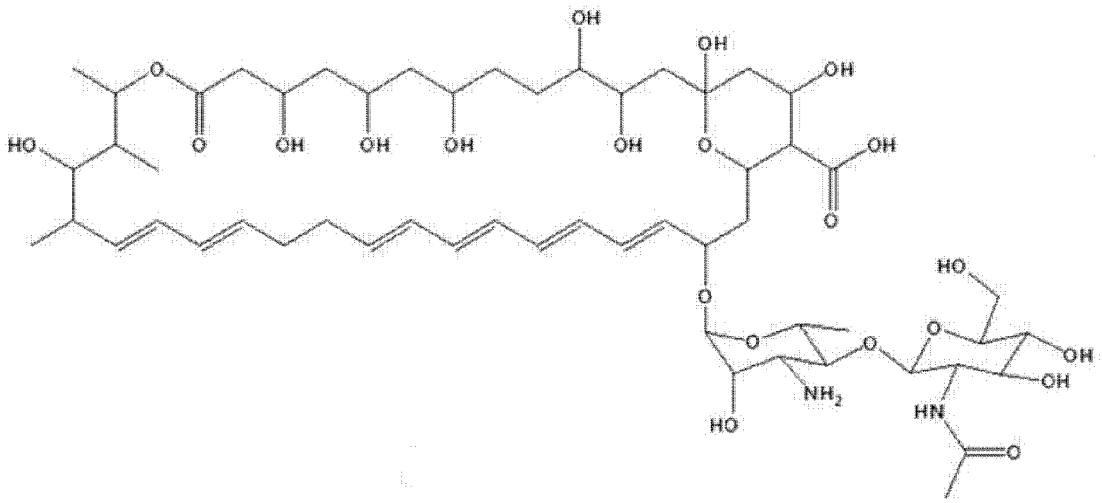
[11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당전이효소(glycosyltransferase) 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

[12] 상세하게는 상기 당전이효소는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래인 것을 특징으로 하고, 상기 당전이효소는 폴리엔(polyene) 특이적인 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는, 상기 폴리엔은 하기 화학식 1의 나이스타틴-유사 폴리엔(nystatin-like polyene; NPP)인 것을 특징으로 한다.

[13]

[14] < 화학식 1 >

[15]



[16]

[17] 또한 본 발명은 상기 당전이효소를 암호화하는 유전자를 제공한다. 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.

[18]

[19] 또한 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[20]

[21] 또한 본 발명은 상기 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 재조합 미생물로부터 당전이효소를 분리하는 단계를 포함하는 당전이효소 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[22] 본 발명은 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래의 폴리엔 특이적인 신규 당전이효소(glycosyltransferase)에 관한 것으로서, 상기 당전이효소에 의해 당을 2개 함유하는 NPP의 경우, 당이 하나인 나이스타틴(nystatin)에 비해 용해도가 증가하고, 용혈 활성(hemolytic activity)이 감소하는 것으로 나타났다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1(A)는 PCR-표적 *nppY* 교체 파괴 과정의 모식도를 나타내고, (B)는 제작된 *P. autotrophica*Δ*nppY* 돌연변이를 PCR 분석에 의해 확인한 결과이다. check F 및 check R을 이용한 야생형 균주(lane 1) 및 Δ*nppY* 돌연변이 균주들(lane 2 및 3) 유래 PCR 산물의 예상 크기는 1.5 kb 및 1.8 kb이고, oriT 프라이머-시험 프라이머 R을 이용한 Δ*nppY* 돌연변이 균주들(lane 5 및 6)은 약 500bp이다. 왼쪽 끝 레인의 DNA 사이즈 마커는 1kb labor DNA ladder (lane M1) 및 100 bp DNA ladder (lane

M2)이다(Cosmo Genetech, Korea).

[24] 도 2(A)는 방선균 발현 벡터인 pMMBL005 (pnppY) 내 *nppY* 유전자의 맵이다. (B)는 게노믹 DNA 샘플로 분석한 PCR 결과이다. Lane M, 1 kb DNA ladder; lane C, 야생형; lane 1, pnppY 플라스미드; lane 3, *P. autotrophica*Δ*nppY/pnppY*. (C) 게노믹 DNA 샘플로 분석한 PCR 결과이다. Lane M, 1 kb DNA ladder; lane C, 야생형; lane 1, pIJ10257 (pnypY) 플라스미드; lane 3, *P. autotrophica*Δ*nppY/pIJ10257*.

[25] 도 3은 *P. autotrophica* 야생형 (A), *P. autotrophica*Δ*nppY* (B), *P. autotrophica*Δ*nppY/pnppY* (C), *P. autotrophica*Δ*nppY/pIJ10257* (D)에서 생산되는 NPP 및 그의 유도체에 대한 HPCL 분석결과이다.

[26] 도 4는 NPP-관련 산물의 구조를 나타낸다. (A) NPP 구조, **1**; 나이스타틴(nystatin) A1, **2**; 10-데옥시나이스타틴(10-deoxynystatin), **3**; 헥소실-NPP(hexosyl-NPP), **4**.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

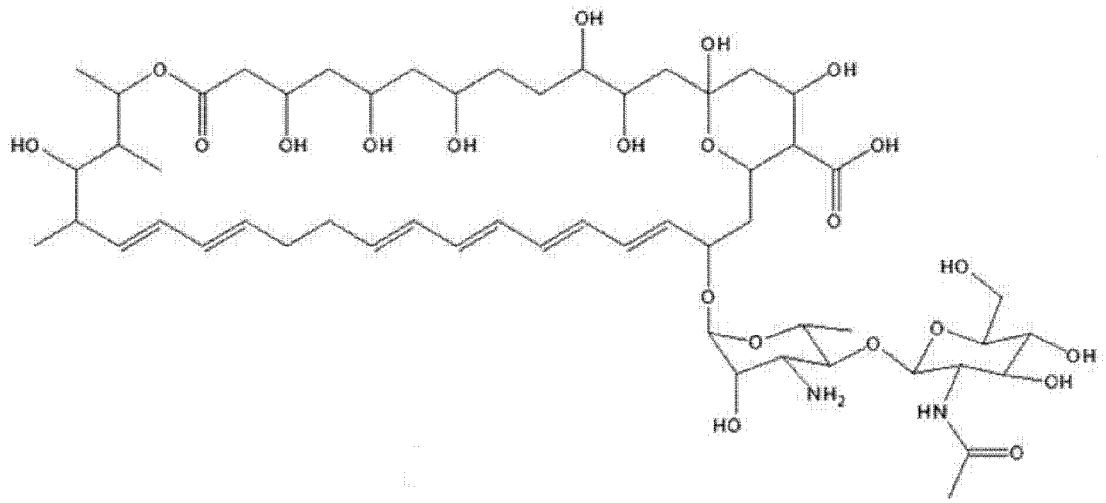
[27] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당전이효소(glycosyltransferase) 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

[28] 상세하게는 상기 당전이효소는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래인 것을 특징으로 하고, 상기 당전이효소는 폴리엔(polyene) 특이적인 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는, 상기 폴리엔은 하기 화학식 1의 나이스타틴-유사 폴리엔(nystatin-like polyene; NPP)인 것을 특징으로 한다.

[29]

[30] < 화학식 1 >

[31]



[32]

[33] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 1의 당전이효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 효소 기능을 유지하는 것 모두를 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는

보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly,Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 당전이효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

[34]

[35] 또한 본 발명은 상기 당전이효소를 암호화하는 유전자를 제공한다. 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.

[36] "등가의 핵산서열"에는 상기 당전이효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다. "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 당전이효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.

[37]

[38] 또한 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[39] 본 발명에 있어서,“벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[40] 본 발명에서 있어서,“발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[41]

[42] 또한 본 발명은 상기 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 재조합 미생물로부터 당전이효소를 분리하는 단계를 포함하는 당전이효소 생산방법을 제공한다.

[43]

[44] 본 발명에서 사용한 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[45] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[46]

[47] **< 실시예 1 > 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)** 유전체 서열분석 및 GTome 생물정보학

[48]

[49] 1. 균주, 배양 조건 및 DNA 조작

[50] 대장균 DH5α(*Escherichia coli* DH5α)는 클로닝 숙주로서 사용되었다. 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)로 형질전환을 위한 비메틸화된 DNA를 얻기 위하여, 플라스미드들은 *E. coli* ET12567(*dam2, dcm2, hrdM*)에서 증식시켰다. *E. coli*는 루리아-베르타니(Luria-Bertani; LB) 배지에서 배양하였고, 필요에 따라 적절한 항생제가 첨가된 LB 아가 배지에서 37℃로 유지하였다. 한국세포주은행(Korean Collection for Type Cultures; KCTC, Korea)에서 얻은 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)(KCTC 9441)는 포자형성(sporulation)을 위해 ISP medium 2 (glucose 0.4%, yeast extract 0.4%, malt extract 1%, agar 2%)에서 30℃로 배양하였다. 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 포자는 재현탁되었고, 멸균된 20% 글리세롤 용액으로 -20℃에서 보관하였다. 전체 DNA 분리를 위하여, 포자 현탁액을 25ml YEME 액체배지에 접종하였고, 30℃에서 2일 동안 배양하였다. *E. coli*로부터 DNA 단편 분리 및 아가로스 젤 전기영동은 LaboPass Kit (Cosmo Genetech, Korea)을 이용하여 수행하였다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Cosmo Genetech으로부터 구매하였다.

[51]

[52] 2. 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 유전체 서열분석 및 GTome 동정

[53] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 드래프트(draft) 유전체 서열은 54 GS-FLX (Roche) 시스템 및 전통적인 샷건 전체-유전체 생거 염기서열분석(shotgun whole-genome Sanger sequencing)에 의해 얻었는데, 게노믹 DNA의 무작위 절단에 의해 2개의 유전체 라이브러리(삽입물 크기 ~2 kb 및 ~35 kb)를 제작하였다. 서열 데이터는 Newbler, Phred/Phrap/Consed package 및 in-house scripts를 이용하여 분석하였다.

[54]

[55] 3. 결과

[56] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 드래프트(draft) 유전체 서열은

9,977,725 베이스로 구성되었고, 1,016 contigs (>500bp)로 조합되었으며, GC 함량은 69.9%였다. 또한, 유전체 서열 내에 10,581개의 단백질-코딩 서열(protein-coding sequences; CDSs)과 함께 96개의 예측 tRNAs 서열이 있었다. 특히, 코딩 백분율은 70.5%이었고, 7,466 CDSs가 기능을 예측할 수 있었다. COG 기능 분석에 의해, 주요 예측 단백질이 25 COG 카테고리로 분류되었다. 본 발명자들은 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 유래의 약 100개 당전이효소(glycosyltransferase; GT) 유전자를 확인하였고, 완전한 서열을 얻기 위해 노력중이다.

[57] 32,228 bp contig 하나에 이미 알려진 *nppF*로부터 *nppI*까지의 NPP 유전자 클러스터 일부분이 포함된다는 것을 알아냈고, 또한 하나의 메탈로포스포에스터라제(metallophosphoesterase) 상동 유전자와 2개의 추가적인 당전이효소(glycosyltransferase)도 포함된다는 것을 확인하였다. 유전자들의 순서는 나이스타틴(nystatin) P1 생합성 유전자 클러스터와 동일했다. 추가적인 유전자들은 *nppZ* [메탈로포스포에스터라제(metallophosphoesterase)], *nppX* 및 *nppY* [당전이효소(glycosyltransferases)]로 명명하였다. 흥미롭게도, 슈도노카디아(*Pseudonocardia*) P1의 *nypY*와 유사하게 *nppY*는 *nppF* 유전자의 바로 상부에 위치해 있다. NppY 단백질은 나이스타틴(nystatin) 폴리엔의 마이코사민(mycosamine)에 헥소스(hexose)를 붙여주는 NypY와 82%의 아미노산 상동성을 나타냈으며, 67-121C의 2차 당을 붙이는 확장 당전이효소(glycosyltransferase)인 PegA와는 51%의 아미노산 상동성을 나타냈으나, NppDI과는 42%의 상동성만 나타냈다. 동일 contig 내의 다른 당전이효소(glycosyltransferase)인, NppX는 *Rhodococcus* sp. 유래 아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제(acetylglucosaminyltransferase)과 약 30%의 아미노산 상동성을 나타냈다. 따라서, NppY는 NPP 확장 당전이효소(glycosyltransferase)에 가장 적당한 후보인데, 이는 NPP 생합성 과정 중의 NppDI과는 다르게 마이코사미닐 당(mycosaminyl sugar)에 글루코사민 잔기의 부착을 촉진한다.

[58]

[59] **< 실시예 2 > 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 *nppY* 유전자의 동정 및 특성 분석**

[60]

[61] 1. *nppY*-파괴 돌연변이 *P. autotrophica*Δ*nppY* 제작

[62] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 돌연변이 균주는 PCR-표적 유전자 파괴-보상 시스템을 이용하여 제작되었다. *nppY* 유전자의 교체를 위한 아프라마이신(apramycin)-내성 유전자/*oriT* 카세트는 주형으로 pIJ773 및 다음의 프라이머들을 이용하여 증폭되었다. 정방향 프라이머(5'-ttttcccggcccccgcggtggtgcactggccgcatggagATTCCGGGGATCCGTCGACC-3') 및 역방향

프라이머(5'-gtcgaactggtcgacgaggtgggacggaccagcacgggaacTGTAGGCTGGAGCTGC TTC-3'). 낮은-케이스 타입(lower-case type)은 *nppY* 유전자 내부의 DNA 부위와 40nt 상동성을 나타낸다. 증폭된 PCR 산물은 *E. coli* BW25113/pIJ790에서 *nppY* 유전자를 포함하는 표적 코스미드 pESK621에 사용되었다. 돌연변이된 코스미드는 ET12567/pUZ8002를 통한 접합에 의해 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)로 옮겼고, 더블 크로스오버(double crossovers)의 산물인 원하는 돌연변이는 아프라마이신(apramycin)에는 내성을 있지만 카나마이신(kanamycin)에는 민감한 콜로니를 스크리닝하여 확인하였다. 더블-크로스오버(double-crossover) 접합완료체(exconjugants)는 표준 apr^R/kan^S 방법을 이용하여 선택하였고, 그 후 PCR을 통해 *P. autotrophica* 및 *P. autotrophica* Δ*nppY* 게노믹 DNA를 확인하였다. 더블-크로스오버(double-crossover) 재조합 균주를 확인하기 위해 사용된 3개의 다른 PCR 프라이머는 *nppY* 시험 프라이머 F(5'-CGGGATCCCGACCGGGGCCTGCTCGTCA-3'), *nppY* 시험 프라이머 R(5'-GCTCTAGAGCCGGGTGGTCCCGCTGGTGG-3') 및 *aprR/oriT* 카세트 내에 있는 *oriT* 시험 프라이머 F (5'-gaattcagcgtgacatcattctgtgg-3')이다.

[63]

[64] 2. *nppY* 유전자-파괴 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 돌연변이의 보상

[65] *nppY* 코딩 서열을 포함하는 1561 bp 단편은 *nppY* 유전자 파괴 실험에 사용된 동일한 올리고뉴클레오티드를 가진 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 게노믹 DNA로부터 PCR 증폭되었다. PCR 산물은 *Bam*HI/*Xba*I 단편으로서 결과적인 구조물로부터 잘라냈고, 플라스미드 p*nppY*에서 얻은 pMMBL005 벡터의 삽입 사이트에 넣었다. *nypY* 유전자를 가진 플라스미드인 pIJ10257는 Prof. Hutchings (UK)로부터 제공받았는데, 상기 플라스미드 또한 *nppY* 보상을 위해 사용하였다. 결과적인 재조합 플라스미드들은 *P. autotrophica*Δ*nppY* 돌연변이 균주에 각각 도입되었다.

[66]

[67] 3. NPP 생산에 대한 HPLC 정량화

[68] NPP 생산을 위하여, 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 균주는 28℃, YEME 아가 배지에서 3시간 동안 배양하였다. 추출물은 동일 부피의 부탄올로 추출하여 준비되었고, 그 후 농축하고 메탄올로 재현탁하였다. ZORBAX RX-C18 column (5 um, 4.6×150 mm, Agilent)이 장착된 Shimadzu SPD M10A (Shimadzu, Japan)가 분석을 위해 사용되었다. 샘플 주입 부피는 20㎕이고, 운전 시간은 30분으로 고정하였다. 컬럼은 50% 용매 A (50 mM 암모늄 아세테이트 6.5) 및 50% 용매 B(메탄올)로 평형화하였고, 다음으로 수행하였다. 50% B (0 min), 90% B (21 min), 100% B (25 to 30 min), 50% B (33 to 35 min)이고, 유량은 1 ml/min이며, UV/vis 검출은 305 nm에서 진행되었다. 매스 분석기(mass spectrometer)는 양이온 검출 모드에서 진행하였고, 100 내지 1500 m/z로

스캔하였다.

[69]

[70] 4. 결과

[71] 추정 NPP 확장 당전이효소(glycosyltransferase)의 기능을 확인하기 위해서, 방선균 PCR-표적 유전자 파괴 시스템을 통해 *nppY*를 불활성화시켰다. 코스미드 pESK621 내의 1473 bp-*nppY* 유전자는 아프라마이신 내성/*oriT* 카세트로 교체되었는데, 이렇게 제작된 돌연변이 코스미드는 pMJ621이며, 이는 접합을 통한 유전자 전달 방법에 의해 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 내로 도입되었다(도 1A). *nppY*-결핍 돌연변이(*P. autotrophica*Δ*nppY*로 명명)는 PCR 분석에 의해 확인되었다. 예상한 1.5 kb PCR-증폭 밴드를 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)로부터 분리한 게노믹 DNA 샘플에서 관찰하였고, *P. autotrophica*Δ*nppY*에서 분리된 게노믹 DNA 샘플에서도 예상 크기 1.8 kb의 밴드를 관찰하였다(도 1B). 또한, 아프라마이신 내성 유전자/*oriT* 카세트를 검출하기 위하여 제작된 PCR 프라이머쌍을 이용하여 증폭한 예측 크기 0.47 kb의 PCR-증폭된 단편은 오직 *P. autotrophica*Δ*nppY* 균주에서만 관측할 수 있었는데, 이는 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 내의 *nppY* 유전자가 예상대로 특이적으로 파괴되었다는 것을 나타낸다(도 1B).

[72] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 야생형 및 3개의 독립적으로 분리된 *P. autotrophica*Δ*nppY* 돌연변이 균주는 배양되었고, 폴리엔 생산을 위해 최적화시킨 후, HPLC-MS 분석을 수행하였다(도 3A 및 3B). 주요 산물은 화합물 3이었고, 약간의 화합물 2가 함께 포함되어 있었는데, 이들의 구조는 MS 분석을 통해 확인하였다. 화합물 3의 MS 스펙트럼은 m/z 909에서의 시그널을 함유하였다(분석 질량). 상기 분석 결과, 상기 화합물의 질량은 화합물 1 보다 작은 것으로 나타났으며, 데옥시나이스타틴(deoxynystatin)과 일치했는데, 이는 C-10 하이드록실(hydroxyl) 및 2차 당 부분이 모두 없는 화합물 3이 *nppY*-파괴 돌연변이에서 축적된다는 것을 나타낸다(도 4). 상기 분석에서는 화합물 3에 2차 당 뿐만 아니라 산소 원자도 없는 것으로 나타났고, 따라서 NppL은 C-10 위치에서 deoxyNPP 뿐만 아니라 데옥시나이스타틴(deoxynystatin)도 수산화하지 않을 수도 있다. NysL 및 NppL 사이의 서열 상동성(68 % 상동성)이 높은데도 불구하고, NppL 효소는 데옥시나이스타틴(deoxynystatin)을 기질로서 약하게 인지하는 것으로 보인다.

[73] NppY가 나이스타틴(nystatin)의 추가적인 글리코실화(glycosylation)에 꼭 필요한지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 *ermE**p 프로모터의 조절하에서 nppY를 발현함으로써 *P. autotrophica*Δ*nppY* 돌연변이의 트랜스(trans)-보상(complementation) 실험을 수행하였다. 상기 실험에 있어서, 본 발명자들은 삽입 접합 벡터 pMMBL005를 사용하여 *nppY*의 코딩 부위를 클로닝하고, pnppY를 만들었다(도 2A). 상기 플라스미드를 접합을 통해 *P. autotrophica*Δ*nppY*로 도입하였고, *P. autotrophica*Δ*nppY/pnppY* 균주는 PCR

분석을 통해 확인하였다(도 2B). HPLC-MS 분석 결과, NPP 생산이 *P. autotrophicaΔnppY/pnppY* 균주에서 회복되었는데(도 3C), 이는 *P. autotrophicaΔnppY*로부터 NPP가 생산되지 않는 것은 *nppY* 유전자가 결핍되었기 때문이라는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 NppY가 NPP의 2차 당을 붙이는 확장 당전이효소(glycosyltransferasse)라는 것을 나타낸다.

[74] *nppY* 유전자의 기능은 다른 마이코사미닐-폴리엔 생산 균주인 *S. noursei* 및 *S. nodosus* 균주에서의 이종 발현(heterologous expression)을 통해 조사하였다. pnppY 구조체(construct)는 접합을 통해 상기 균주들에 도입되었고, 재조합 균주(*S. noursei*/pnppY 및 *S. nodosus*/pnppY라고 명명)는 PCR 분석을 통해 확인한 후, 추출 및 HPLC 분석을 수행하였다. 주요 산물은 *S. noursei*/pnppY에서는 나이스타틴(nystatin)이었고, *S. nodosus*/pnppY에서는 암포테리신(amphotericins) A 및 B였다. 크로마토그램에 있어서 다른 특이할 만한 폴리엔 화합물은 검출되지 않았다. 다른 폴리엔 생산 균주에서 상기 유전자의 발현은 이당류(disaccharide)-변형 나이스타틴(nystatin) 또는 암포테리신(amphotericins)의 생산을 유도하지는 못했다.

[75] 또한, 데이터베이스-기반 인실리코(*in silico*) 분석을 통한 *nppY* 유전자 산물은 490 aa으로 구성된 단백질을 코딩하고, *Pseudonocardia* P1 유래 폴리엔 확장 당전이효소(glycosyltransferase)인 NypY와 82% 아미노산 상동성을 나타냈다. *P. autotrophicaΔnppY* 돌연변이는 *ermE**p 프로모터의 조절하에서 클로닝된 *nypY*가 포함된 플라스미드 pIJ10257(Prof. Hutchings로부터 제공받음)로 보상되었다. 상기 플라스미드를 *P. autotrophicaΔnppY* 돌연변이 균주로 도입하여 *P. autotrophicaΔnppY/pnypY*를 제작하고 PCR 분석을 통해 확인하였다(도 2C).

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당전이효소(glycosyltransferase).

[청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 당전이효소는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래인 것을 특징으로 하는 당전이효소.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 당전이효소는 폴리엔(polyene) 특이적인 것을 특징으로 하는 당전이효소.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 폴리엔은 나이스타틴-유사 폴리엔(nystatin-like polyene; NPP)인 것을 특징으로 하는 당전이효소.

[청구항 5] 제 1 항의 당전이효소를 암호화하는 유전자.

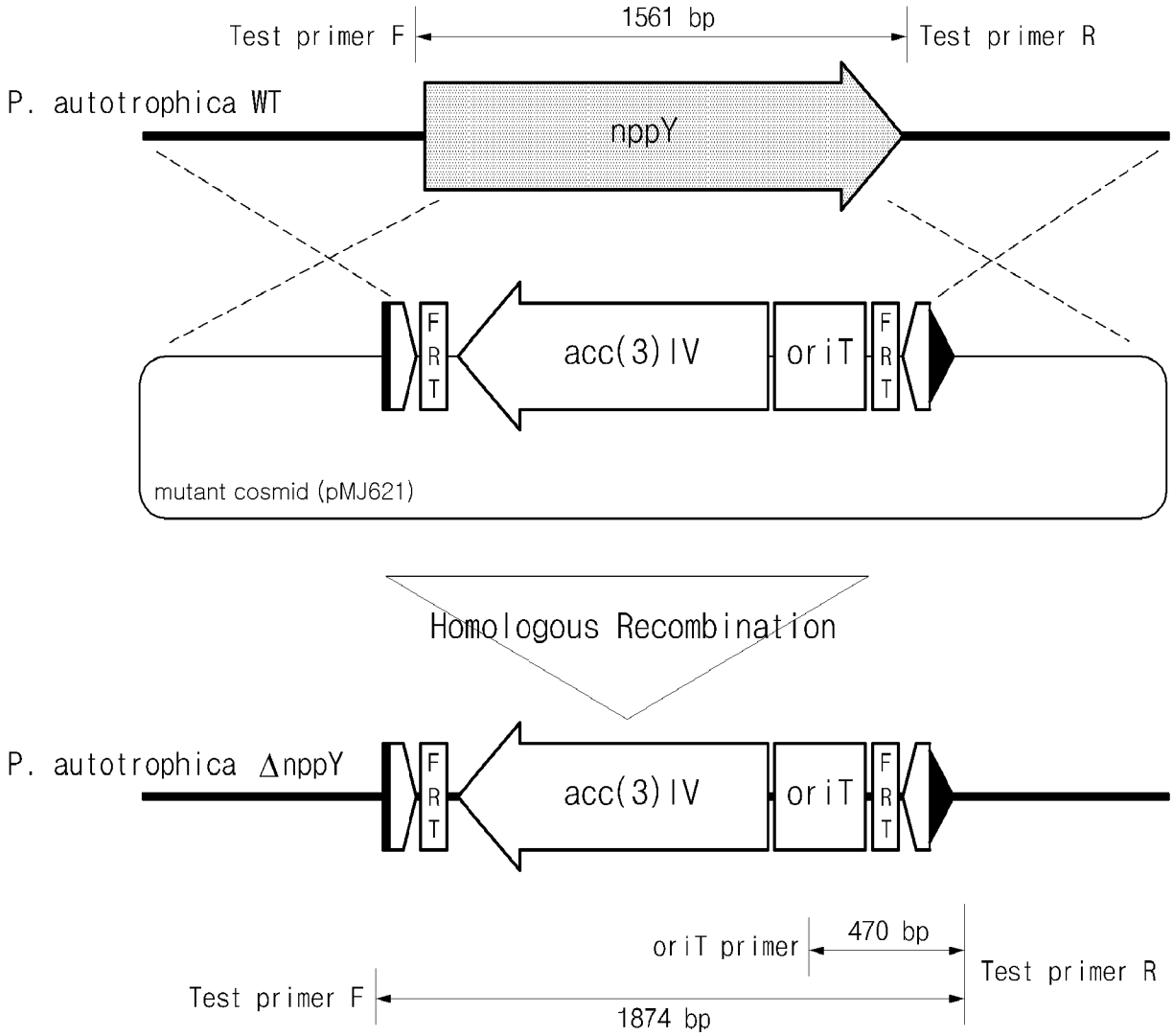
[청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.

[청구항 7] 제 5 항 또는 제 6 항의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

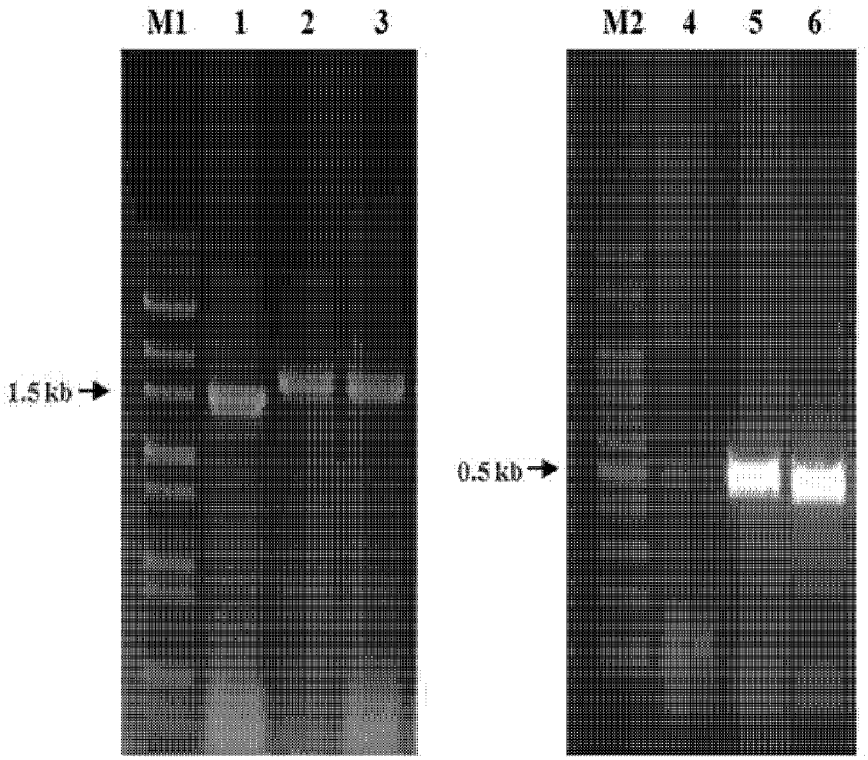
[청구항 8] 제 7 항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

[청구항 9] 제 8 항의 형질전환된 재조합 미생물을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 재조합 미생물로부터 당전이효소를 분리하는 단계를 포함하는 당전이효소 생산방법.

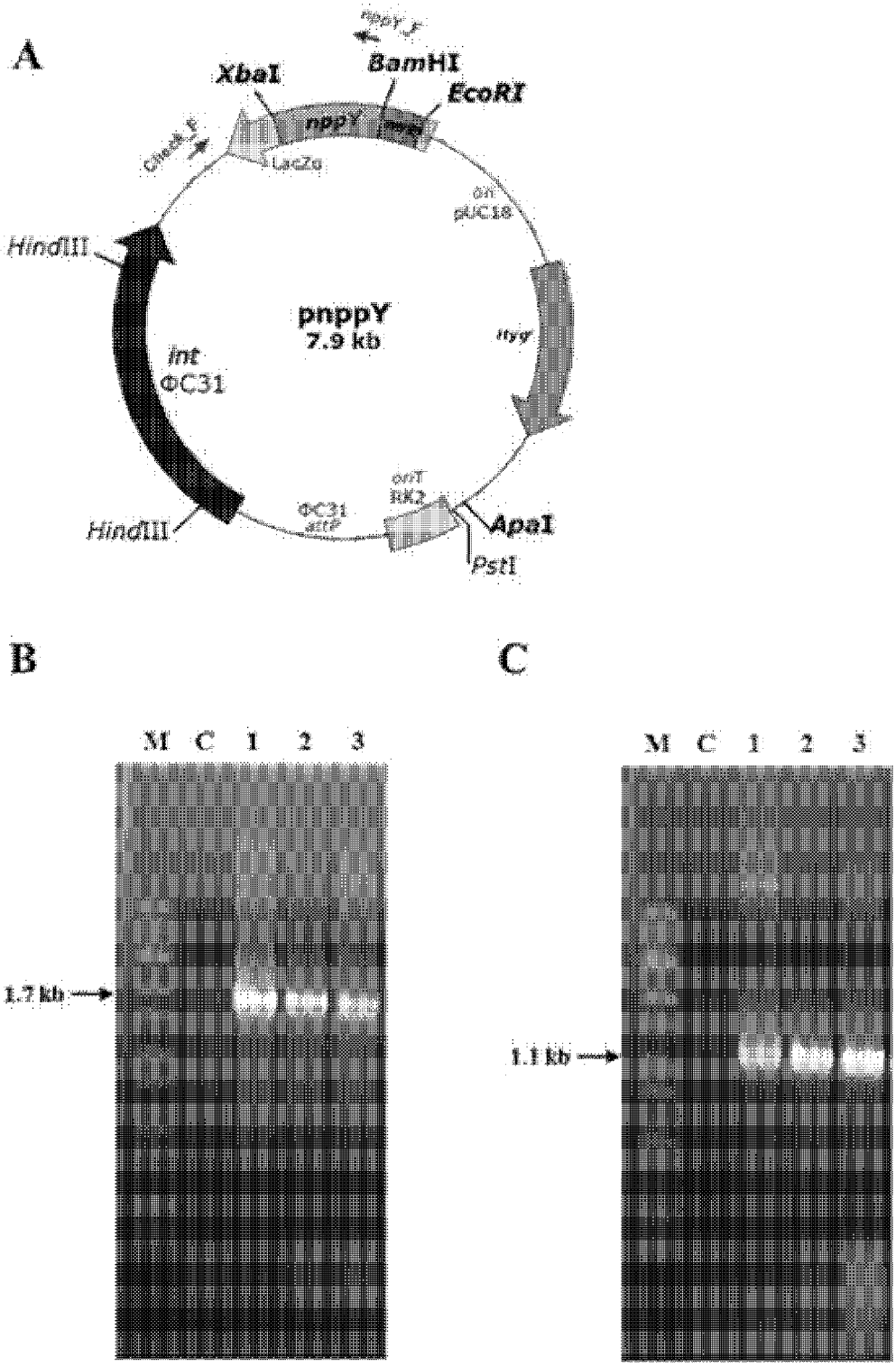
[Fig. 1a]


Test primer F
1561 bp
Test primer R
P. autotrophica WT
nppY
FRT
acc(3)IV
oriT
FRT
mutant cosmid (pMJ621)
Homologous Recombination
P. autotrophica ΔnppY
FRT
acc(3)IV
oriT
FRT
oriT primer
470 bp
Test primer R
Test primer F
1874 bp

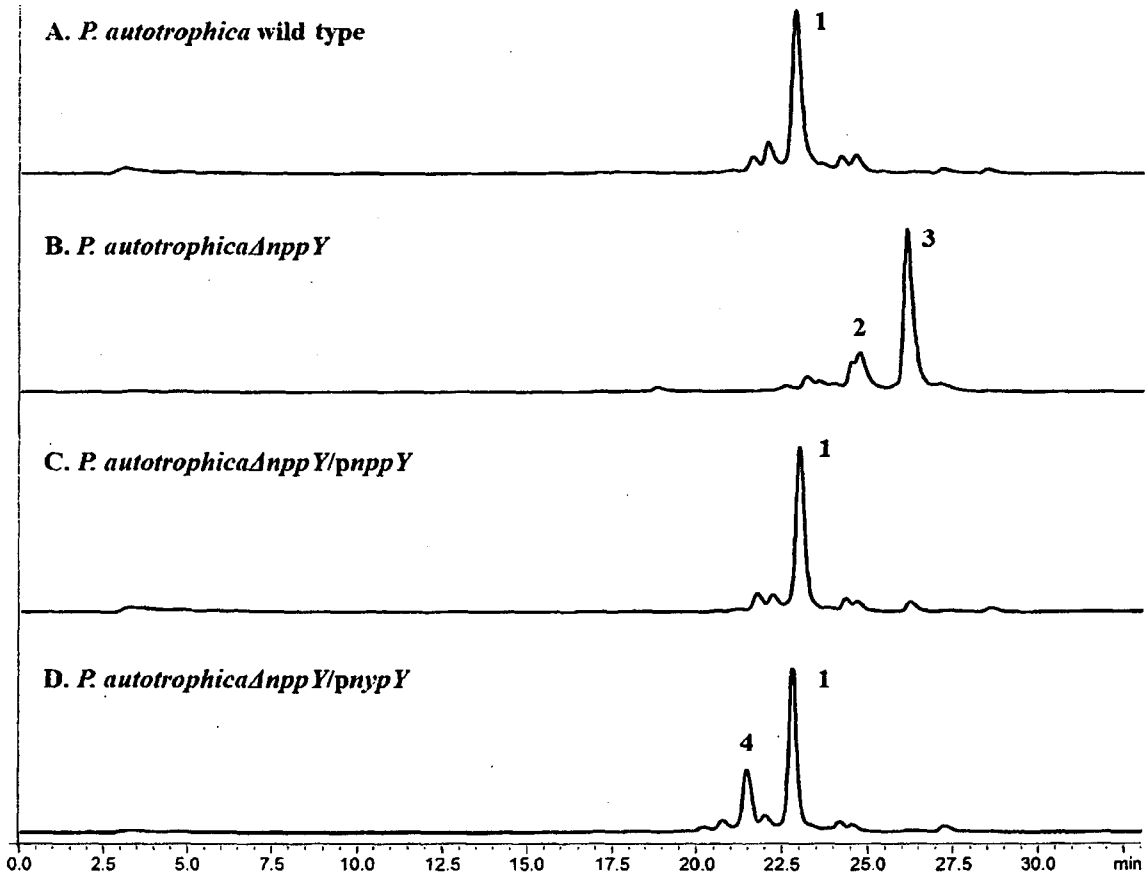
[Fig. 1b]


M1 1 2 3
M2 4 5 6
1.5kb
0.5kb

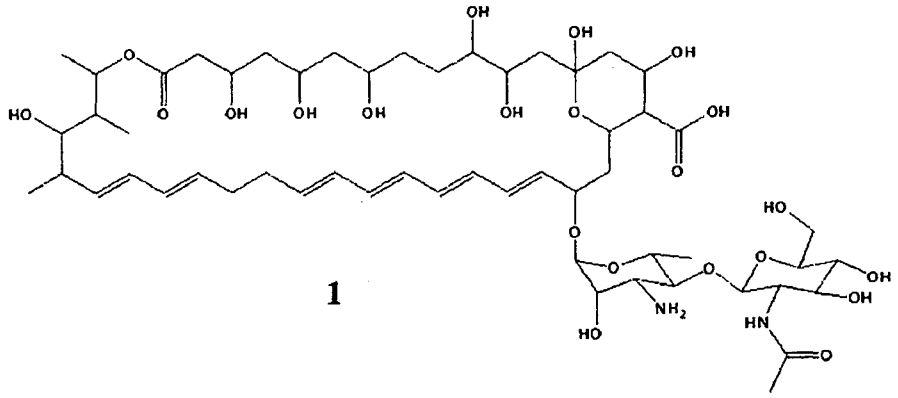
[Fig. 2]


A
XbaI
BamHI
EcoRI
nppY
LacZα
ori pUC18
HindIII
pnppY
7.9 kb
int ΦC31
Hygr
oriT RK2
ΦC31 attP
HindIII
ApaI
PstI
B
M C 1 2 3
1.7 kb
C
M C 1 2 3
1.1 kb

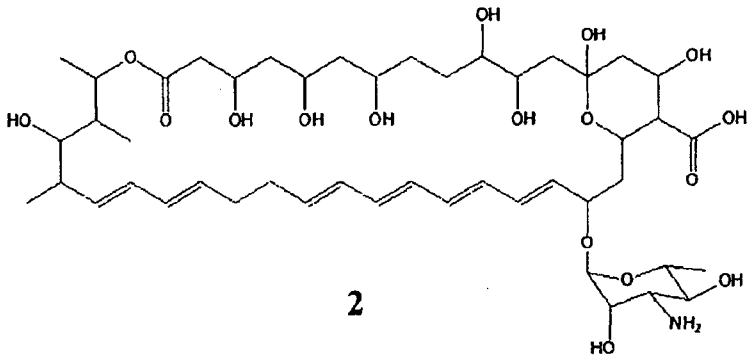
[Fig. 3]


A. P. autotrophica wild type
1
B. P. autotrophicaΔnppY
2
3
C. P. autotrophicaΔnppY/pnppY
1
D. P. autotrophicaΔnppY/pnypY
4
1
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
25.0
27.5
30.0
min

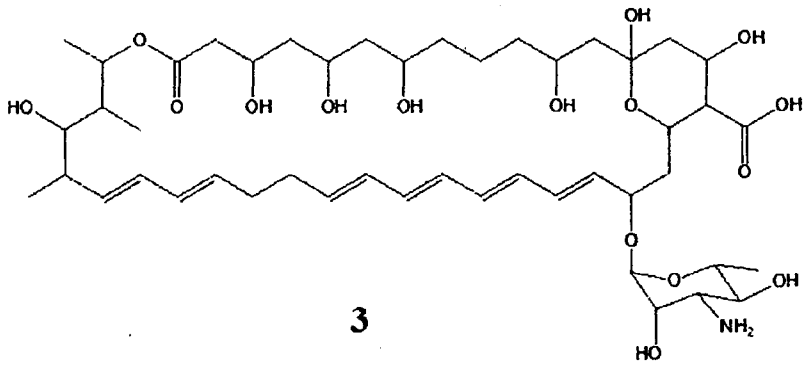
[Fig. 4]



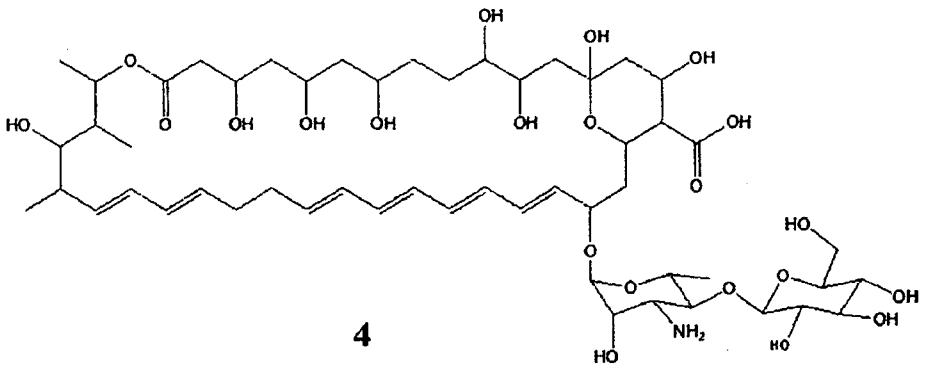
1



2



3



4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/010161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i

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 9/10; C07H 17/08; C07C 69/732; C12N 15/53; C12N 15/31; C12N 15/54; C12N 1/21

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: glycosyltranferase; GT, pseudonocardia autotrophica, polyene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, Yong-Geong et al., "Investigation of the NPP-specific polyene glycosyltransferase from Pseudonocardia autotrophica", In: KSBE, 2013 Fall Conference and International Symposium, 16-18 October 2013, BEXCO, page 218, (P0046). See the entire document.	1-9
A	WO 2013-100315 A1 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) 04 July 2013 See abstract; paragraph [0040].	1-9
A	KR 10-2010-0089370 A (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE et al.) 12 August 2010 See abstract; paragraph [0071]; claim 1.	1-9
A	LEE, Mi-Jin et al., "Structural analysis and biosynthetic engineering of a solubility-improved and less-hemolytic nystatin-like polyene in Pseudonocardia autotrophica", Applied Microbiology and Biotechnology, 01 March 2012, vol.95, no.1, pages 157-168. See the entire document.	1-9
A	NCBI, GenBank accession no. AGM12656.1 (27 May 2013) See the entire document.	1-9

☐ 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
"T" 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	Date of mailing of the international search report
24 FEBRUARY 2015 (24.02.2015)	**25 FEBRUARY 2015 (25.02.2015)**

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/KR2014/010161

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2013-100315 A1	04/07/2013	KR 10-1379978 B1	02/04/2014
		KR 10-2013-0078227 A	10/07/2013
		US 2014-0371436 A1	18/12/2014
KR 10-2010-0089370 A	12/08/2010	NONE	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2014/010161

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/10(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 9/10; C07H 17/08; C07C 69/732; C12N 15/53; C12N 15/31; C12N 15/54; C12N 1/21

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:당전이효소, 슈도노카디아 오토트로피카, 폴리엔

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, YONG-GYEONG 외, 'Investigation of the NPP-specific polyene glycosyltransferase from Pseudonocardia autotrophica', In: 한국생물공학회, 2013 추계학술발표대회 및 국제심포지엄, 2013.10.16-18, BEXCO, 218 페이지, (P0046). 전체 문헌 참조.	1-9
A	WO 2013-100315 A1 (인하대학교 산학협력단) 2013.07.04 요약; 단락 [40] 참조.	1-9
A	KR 10-2010-0089370 A (인하대학교 산학협력단 외) 2010.08.12 요약; 단락 [0071]; 청구항 1 참조.	1-9
A	LEE, MI-JIN 외, 'Structural analysis and biosynthetic engineering of a solubility-improved and less-hemolytic nystatin-like polyene in Pseudonocardia autotrophica', Applied Microbiology and Biotechnology, 2012.03.01, 제95권, 제1호, 157-168 페이지. 전체 문헌 참조.	1-9
A	NCBI, GenBank accession no. AGM12656.1 (2013.05.27.) 전체 문헌 참조.	1-9

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2015년 02월 24일 (24.02.2015)	2015년 02월 25일 (25.02.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/010161

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2013-100315 A1	2013/07/04	KR 10-1379978 B1	2014/04/02
		KR 10-2013-0078227 A	2013/07/10
		US 2014-0371436 A1	2014/12/18
KR 10-2010-0089370 A	2010/08/12	없음	