



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0081394
(43) 공개일자 2013년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0002330

(22) 출원일자 2012년01월09일

심사청구일자 2012년12월10일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

윤여준

서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호

반연희

서울특별시 강동구 암사동 489-83

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

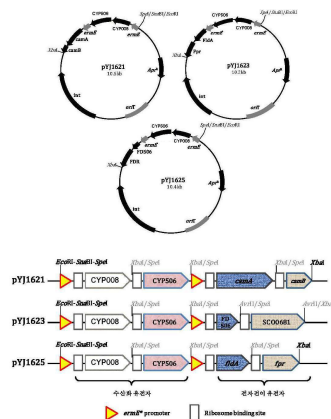
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규한 사이토크롬 P 450 수산화효소 및 이를 이용한 수산화된 사이클로스포린 A의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 세베키아 베니하나로부터 유래된 신규한 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP), 상기 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 CYP를 생산하는 방법, 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체를 이용하여 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 수산화된 사이클로스포린 A의 생산방법을 이용하면, 종래의 방법보다 4-(γ -hydroxy)-CyA를 높은 효율로 생산할 수 있으므로, 다양한 발모제의 개발 및 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

안은영

경기도 광주시 오포읍 신현리 현대모닝사이드1차아파트 104동 801호

한규범

대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 102동 1002호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KU080657M0209721

부처명 서울특별시

연구사업명 기술기반 구축사업

연구과제명 생물전환에 의한 차세대 기능성 의약소재 개량기술 개발

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2010.12.01 ~ 2011.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110018617

부처명 교육과학기술부

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 생합성경로 재설계를 통한 당포함 항생제 및 항암제(glycosylated antibiotic and anticancer)의 유도체 개발

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 사이클로스포린 A(Cyclosporin A, CyA)의 수산화물 매개하는 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP).

청구항 2

제1항에 있어서,

세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)로부터 유래된 것인 사이토크롬 P450 수산화효소.

청구항 3

제1항의 사이토크롬 P450 수산화효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제3항에 있어서,

서열번호 2의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제5항의 발현벡터가 도입되어 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 사이토크롬 P450 수산화효소를 발현하는 형질전환체.

청구항 7

(i) 제6항의 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및

(ii) 상기 배양물로부터 사이토크롬 P450 수산화효소(CYP)를 회수하는 단계를 포함하는, 사이토크롬 P450 수산화효소의 생산방법.

청구항 8

서열번호 1의 CYP, CYP501, CYP502, CYP503, CYP504, CYP506 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와, 퓨티다레독신(putidaredoxin)과 퓨티다레독신 환원효소(putidaredoxin reductase) 세트, 페레독신(ferredoxin)과 페레독신 환원효소(ferredoxin reductase) 세트 및 플라보독신(flavodoxin)과 플라보독신 환원효소(flavodoxin reductase) 세트로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 전자전이 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 9

제9항에 있어서,

CYP로서 서열번호 1의 CYP 및 CYP506을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 전자전이 효소로서 퓨티다레독신과 퓨티다레독신 환원효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 발현벡터.

청구항 10

제9항에 있어서,

CYP로서 서열번호 1의 CYP 및 CYP506을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 전자전이 효소로서 페레독신과 페레독신 환원효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 발현벡터.

청구항 11

제9항에 있어서,

CYP로서 서열번호 1의 CYP 및 CYP506을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 전자전이 효소로서 플라보독신과 플라보독신 환원효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 발현벡터.

청구항 12

제9항의 발현벡터가 숙주세포에 도입되어 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하는 형질전환체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 숙주세포는 내재적으로 사이클로스포린 A(CyA)를 수산화시킬 수 있는 것인 형질전환체.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 미생물은 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)인 것인 형질전환체.

청구항 15

(i) 사이토크롬 P450 수산화효소(CYP) 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제작하는 단계;

(ii) 상기 제작된 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제작하는 단계;

(iii) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(iv) 상기 배양물로부터 4-(γ -hydroxy)-CyA를 회수하는 단계를 포함하는, 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 숙주세포는 내재적으로 사이클로스포린 A(CyA)를 수산화시킬 수 있는 것인 형질전환체.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 배양은 고체배양 또는 액체배양에 의하여 수행되는 것인 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 신규한 사이토크롬 P450 수산화효소 및 이를 이용한 수산화된 사이클로스포린 A의 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 세베키아 베니하나로부터 유래된 신규한 사이토크롬 P450 수산화효소 (Cytochrome P450 hydroxylase, CYP), 상기 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 CYP를 생산하는 방법, 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체를 이용하여 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인체의 모발은 약 10 만 내지 15 만 개 정도이며, 각각의 모발은 서로 다른 주기를 가지며 성장기(anagen), 퇴행기(catagen), 휴지기(telogen)를 거쳐 성장, 탈락한다. 이러한 주기는 3~6 년에 걸쳐 반복되는데 그 결과 일일 평균 50내지 100 개의 모발이 정상적으로 탈락하게 된다. 일반적으로 탈모증이라 함은 이러한 주기 중에서 성장기의 모발 비율이 짧아지고 퇴행기 또는 휴지기의 모발이 많아져 비정상 적으로 모발이 탈락하는 숫자가 많아지는 것을 일컫는다.
- [0003] 탈모의 원인으로는 혈액순환 불량설, 남성호르몬 작용 과잉설, 피지 분비 과잉설, 과산화물, 세균 등에 의한 두피 기능 저하설, 유전적 요인, 노화, 스트레스 등이 논의되어 왔었다. 그러나 현재까지 탈모에 관한 명확한 원인은 밝혀져 있지 않으며, 최근 들어 식생활의 변화, 사회환경 등에 의한 스트레스의 증가 등으로 탈모로 고민하는 인구가 늘어나고 있는 추세이고 그 연령 또한 낮아지고 있으며, 여성의 탈모 인구도 늘어나고 있는 실정이다.
- [0004] 이러한 탈모증의 치료나 예방에 있어서 현재까지 가장 널리 사용되는 제제는 미녹시딜 함유 제제로서, 현재까지 미국 FDA의 승인을 받은 두 가지 발모제 성분 중의 하나이다. 미녹시딜은 혈압강하의 목적으로 개발된 고혈압 치료제이었지만 사용상의 부작용으로 발모 현상이 나타나면서 현재에는 발모제로 더 유명한 약물이 되었다. 미녹시딜의 발모 작용기전에 대해서는 정확히 밝혀져 있지는 않지만, 혈관 확장 효과를 통한 혈류량 증가로 모근에 영양을 공급하여 모발 성장을 촉진하는 것으로 생각되고 있다.
- [0005] 이밖에 최근에 발매가 시작된 머크(Merck)사의 프로페시아(Propecia) 주성분인 피나스테라이드(finasteride)는 남성호르몬 테스토스테론이 더 강력한 형태의 남성호르몬인 디하드로테스토스테론으로 전환되는 것을 억제한다. 1997년 12월 남성형 탈모증의 치료제로 1 mg 타블렛이 FDA로부터 사용 승인을 받아 현재 시판 중으로, 임상결과 유의할 만한 효과를 나타내는 것으로 판명되었으나 일부 남성 기능 억제 부작용도 보고되고 있다(J. Am. Acad. Dermatol., 1998; 39; 578~589). 그러나 이 약물 또한 미녹시딜과 같이 임상효과가 그다지 탁월하지 못하고 부작용에 대한 우려 때문에 좀 더 우수한 발모제 탐색연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0006] 한편, 사이클로스포린 류는 대표적인 면역 억제제인 동시에 바이러스, 진균, 원생동물을 억제하는 효과 및 부작용으로 신장독성, 간독성, 고혈압, 치주조직 비대, 발모효과 등 다양한 생리효과를 갖고 있다(Advances in Pharmacol., 1996; 35; 114~246 및 Drug Safety, 1994; 10; 310~317). 그 중 대표적인 사이클로스포린

A(Cyclosporin A, CyA)는 11개의 아미노산이 환상으로 결합된 올리고 펩타이드로서 장기이식 환자들의 거부반응을 치료하기 위한 강력한 면역억제제이며, 부작용으로 신장독성, 간 독성, 고혈압, 치주조직 비대, 발모효과 등의 다양한 생리효과를 가지고 있다. CyA는 불완전 균류인 토포클라디움 인플라툼 (Toypocladium inflatum)을 호기성 상태에서 액체배양 할 경우에 생성되는 24가지의 구조적으로 유사한 대사물질들 (사이클로스포린 A에서 Z까지) 가운데 가장 많이 생성되는 물질이다. CyA와 그 유사물질들은 사이클로스포린 신테타이즈 (Cyclosporin Synthetase)라는 다기능 단일 효소에 의해서 11개의 아미노산이 순서대로 활성화되고, N-메틸레이션(N-methylation)되고, 펩티드결합을 형성하는 Non-ribosomal 기작으로 생합성된다.

[0007] CyA의 여러 부작용 중에서 체모의 과대성장 부작용을 이용한 발모제로서의 개발 가능성이 그동안 여러 연구에 의해 수행되어 왔다. 그 중에는 동물 발모실험, 인간원형 탈모증, 인간 남성형 탈모증, 화학요법에 의한 탈모 동물에서 탈모억제 효과 등에 대한 광범위한 연구가 수행되었고, 마우스 등판 실험 결과로 비교한다면 시판되고 있는 미녹시딜보다 약 100 배 정도 우수한 효과를 보여주고 있다.

[0008] CyA는 다양한 세균과 진균류 등에 의한 생물전환을 통해 다양한 유도체로 전환된다. 회귀 방선균인 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)에 의해 4번 위치에 수산기가 부가된 형태의 유도체(4-(γ -hydroxy)-CyA, 4-(γ -hydroxy)-4-N-demethyl-CyA, Di-4,6-(γ -hydroxy)-CyA 등)로 전환됨이 확인되었는데(한국공개특허 제2004-88593호), 이 중 상기 4-(γ -hydroxy)-CyA는 CyA가 가지고 있는 면역억제 활성이 감소되고, 발모효과는 그대로 유지된다고 알려져 있다(한국등록특허 제316604호). 이러한 반응은 상기 균주에서 발현되는 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)와 전자전이효소에 의하여 수행되는 것으로 알려져 있는데, 상기 CYP는 식물, 박테리아, 동물, 고세균 등의 자연계의 모든 생물 중에서 발현되는 헴(heme)을 포함한 헤모프로테인(hemoprotein)의 일종으로서, 상기 헴에 포함된 철 이온이 일산화탄소(CO)와 결합 시 450nm에서 특징적인 흡광을 나타내고, 생체내의 다양한 산화 반응을 촉매 하는 효소로 알려져 있다. 현재까지 연구된 바에 의하면, 세베키아 베니하나에서 발현되는 CYP는 5종(CYP501, CYP502, CYP503, CYP504 및 CYP506)이 존재하는 것으로 알려져 있고, 이들 효소의 활성을 이용하여 세베키아 베니하나에서 4-(γ -hydroxy)-CyA로 전환되는 것으로 알려져 있으나, 상기 전환수율이 낮아서 산업적으로 이용하기가 어렵다는 문제점이 있었다.

[0009] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 미생물에 의한 CyA의 생물전환시 수산화 효율을 향상시키는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, CyA의 수산화를 매개하는 신규한 효소단백질을 발굴하고, 상기 효소단백질을 전자전이 효소와 함께 발현시키도록 변이된 형질전환체를 사용할 경우, CyA의 수산화 효율을 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 CyA의 수산화를 매개하는 신규한 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현백터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 CYP를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터를 제공하는 것이다.

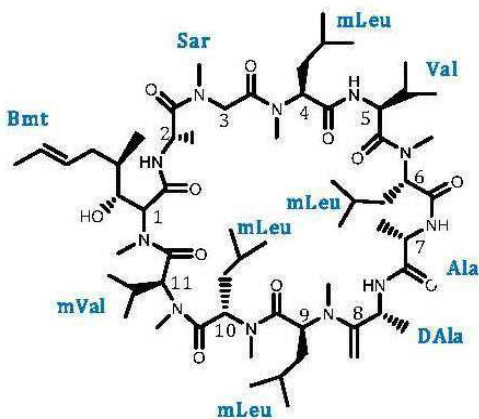
[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터가 도입된 형질전환체를 이용하여 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 사이클로스포린 A(Cyclosporin A, CyA)의 수산화물 매개하는 신규한 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)를 제공한다.
- [0019] 본 발명자들은 CyA를 수산화시켜서 면역억제활성이 감소된 유도체(4-(γ -hydroxy)-CyA)를 생산할 수 있는 방선균의 일종인 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)로부터 상기 CyA를 수산화시킬 수 있는 신규한 효소단백질을 규명하고자 하였다. 이를 위하여, 상기 균주의 게놈 DNA를 분석하여 공지된 5종 이외의 신규한 CYP를 코딩하는 유전자를 스크리닝하고자 하였다. 그 결과, 총 16종의 신규한 CYP(CYP001 내지 CYP016)를 코딩하는 것으로 예상되는 유전자를 발굴하고, 이들 중에서 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산에 관여하는 CYP를 코딩하는 유전자를 스크리닝한 결과, CYP008이 결실된 *S. benihana* 균주에서는 4-(γ -hydroxy)-CyA의 발현량이 야생형 균주의 것보다 감소됨을 확인하였으므로, 상기 CYP008이 CyA를 수산화시킬 수 있는 활성을 나타냄을 알 수 있었다(실시예 1).
- [0020] 본 발명의 용어 "사이클로스포린 A(Cyclosporin A, CyA)"란, 1개의 아미노산으로 구성된 사이클릭 펩타이드로서 아미노산의 구조에 따라 다양한 형태로 존재할 수 있으며, 하기의 화학식 1의 구조를 갖을 수 있는 화합물을 의미한다. 상기 CyA는 장기이식 후에 따르는 조직이식 거부반응을 억제하기 위한 면역억제제로서 사용되고, 부작용으로서 모발성장을 촉진시키는 활성을 나타낸다. 본 발명의 목적상 상기 CyA는 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하기 위한 전구체로서 사용되나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

화학식 1



- [0021]
- [0022] 본 발명의 용어 "사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)"란, 자연계의 모든 생물 종에서 발현되고, 다양한 산화반응을 촉매하며, 헴(heme)을 포함한 헤모프로테인의 일종을 의미하는데, 상기 헴에 포함된 철 이온이 일산화탄소(CO)와 결합할 경우에 450nm의 특징적인 흡광을 나타내고, 폴리케타이드, 지방산, 비타민, 스테로이드 계열의 항생제 등을 비롯한 여러 종류의 화합물을 기질로 사용하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 목적상 상기 CYP는 CyA를 수산화시키는 반응을 수행하기 위하여 사용되며, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 방선균 유래의 CYP가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 세베키아 베니하나로부터 유래된 CYP501, CYP502, CYP503, CYP504, CYP506, 또는 본 발명에서 새로이 선별된 CYP001 내지 CYP016 중 어느 하나가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 세베키아 베니하나로부터 유래된 신규한 CYP008이 될 수 있다. 특히, 상기 신규한 CYP008은 특별히 이에 제한되지 않으나, 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 단백질일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 용어 "상동성"이란, 단백질을 코딩하는 유전자의 염기 서열이나 아미노산 서열의 유사한 정도를 의미

하는데, 상동성이 충분히 높은 경우 해당 유전자의 발현 산물은 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있다.

[0024] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 CYP008을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입되어 CYP008을 발현할 수 있는 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 CYP008을 생산하는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명에서 제공하는 상기 신규한 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 세베키아 베니하나 균주에서 유래된 폴리뉴클레오티드가 될 수 있는데, 바람직하게는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 염기 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하고, 그 외에 시그널 펩타이드를 코딩하는 DNA, 인핸서 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λ EMBL3, λ EMBL4, λ FIXII, λ DASHII, λ ZAPII, λ gt10, λ gt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pDZ 벡터, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 pDZ 벡터 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 발현벡터는 CYP008을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여, CyA의 수산화물 매개하는 CYP008을 발현시키기 위하여 사용될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0027] 본 발명에서 용어, "형질전환체"는 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 갖는 벡터가 숙주세포에 도입되어 목적 단백질을 발현시키도록 형질이 감염된 세포를 의미하며, 진핵세포, 원핵세포 등의 모든 세포가 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 제공하는 CYP008을 생산하는 방법은 (i) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (ii) 상기 배양물로부터 CYP008을 회수하는 단계를 포함한다.

[0029] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0030] 본 발명자들은 세베키아 베니하나로부터 유래된 신규한 CYP인 CYP008이 CyA의 수산화물 매개할 수 있는지를 확인하기 위하여, 두개의 수산화 효소(CTY506 및 CYP008)를 코딩하는 유전자와 3세트의 전자전이 효소를 코딩하는 유전자를 조합하여 포함하는 발현벡터(pYJ1621, pYJ1623, pYJ1625)를 제작하고(실시예 2), 상기 제작된 각 발현 벡터를 세베키아 베니하나에 도입하여 형질전환체(YJ405, YJ407, YJ409)를 제작하였으며(실시예 3), 이들 형질 전환체에 목적하는 수산화 효소를 코딩하는 유전자와 전자전이 효소를 코딩하는 유전자가 정상적으로 도입되었

는지의 여부를 확인하고(실시예 4, 5, 6), 이들 제작된 각각의 형질전환체를 액체배지 또는 고체배지에서 배양한 결과, 야생형 세베키아 베니하나보다 4-(γ -hydroxy)-CyA를 1.1 내지 1.8배의 높은 함량으로 생산할 수 있음을 확인하였다(실시예 7, 8).

- [0031] 본 발명의 용어 "전자전이 효소"란, 생체내 산화 또는 환원반응에 관여하는 효소에 보조인자인 NAD, NADP 등을 통하여 추진력(driving force)으로 사용되는 전자 또는 수소이온 등을 제공하는 효소를 의미한다. 통상적으로, 푸티다레독신(putidaredoxin)과 푸티다레독신 환원효소(putidaredoxin reductase), 페레독신(ferredoxin)과 페레독신 환원효소(ferredoxin reductase), 플라보독신(flavodoxin)과 플라보독신 환원효소(flavodoxin reductase) 등과 같이 두개의 단백질이 쌍을 이루어 형성된다. 본 발명의 목적상 상기 전자전이 효소는 CYP에 수소이온을 공급하여 CYP에 의하여 CyA를 수산화시키기 위한 추진력을 제공하는 데 사용된다.
- [0032] 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 상기 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 전자전이 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 구성되는데, 특별히 이에 제한되지는 않으나, 상기 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 1종 또는 2종 이상의 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연속적으로 연결되도록 구성될 수도 있고, 보다 바람직하게는 숙주세포로 사용되는 세베키아 베니하나로부터 유래된 다양한 CYP를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 조합하여 연속적으로 연결되도록 구성될 수도 있으며, 가장 바람직하게는 CYP506을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 CYP008을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연속적으로 연결되도록 구성된 발현벡터를 사용함이 바람직하다. 아울러, 상기 전자전이 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 효소를 구성하는 두 개의 단백질(푸티다레독신과 푸티다레독신 환원효소, 페레독신과 페레독신 환원효소, 플라보독신과 플라보독신 환원효소 등)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연속적으로 연결되도록 구성될 수도 있고, 상기 전자전이 효소는 1종 또는 2종이상을 포함할 수도 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0033] 상기 CYP 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 적어도 CyA를 수산화시킬 수 있는 숙주세포에 상기 발현벡터가 도입되어, 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량을 증가시키도록 변이된 세포가 될 수 있고, 상기 CyA를 수산화시킬 수 있는 숙주세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 CyA를 수산화시킬 수 있는 방선균류의 미생물이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 CyA를 수산화시킬 수 있는 세베키아 속 미생물이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 CyA를 수산화시킬 수 있는 세베키아 베니하나가 될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 제공하는 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하는 방법은 (i) 사이토크롬 P450 수산화효소(CYP) 및 전자전이 효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제작하는 단계; (ii) 상기 제작된 발현벡터를 CyA를 수산화시킬 수 있는 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제작하는 단계; (iii) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (iv) 상기 배양물로부터 4-(γ -hydroxy)-CyA를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0035] 이때, 상기 CYP는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 세베키아 속 미생물 유래의 CYP가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 세베키아 베니하나 유래의 CYP가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 세베키아 베니하나 유래의 CYP501, CYP502, CYP503, CYP504, CYP506, CYP008 및 이들의 조합이 될 수 있다.
- [0036] 또한, 전자전이 효소는 특별히 이에 제한되지 않으나, *P. putida* 유래의 푸티다레독신(putidaredoxin)과 푸티다레독신 환원효소(putidaredoxin reductase), *S. benihana* 유래의 페레독신(ferredoxin)과 *S. coelicolor* A3(2) 유래의 페레독신 환원효소(ferredoxin reductase), *E. coli* 유래의 플라보독신(flavodoxin)과 플라보독신 환원효소(flavodoxin reductas) 등이 될 수 있다.
- [0037] 바람직하게는, CYP로서 CYP506 및 CYP008을 포함하고 전자전이 효소로서 푸티다레독신과 푸티다레독신 환원효소를 포함하는 조합, CYP로서 CYP506 및 CYP008을 포함하고 전자전이 효소로서 페레독신과 페레독신 환원효소를 포함하는 조합, CYP로서 CYP506 및 CYP008을 포함하고 전자전이 효소로서 플라보독신과 플라보독신 환원효소를 포함하는 조합 등을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [0038] 아울러, 상기 숙주세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, CyA를 수산화시킬 수 있는 방선균류의 미생물이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 CyA를 수산화시킬 수 있는 세베키아 속 미생물이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 CyA를 수산화시킬 수 있는 세베키아 베니하나가 될 수 있다.
- [0039] 상기 형질전환체의 배양은 특별히 이에 제한되지 않으나, 배지의 종류에 따라 액체배양, 고체배양 등의 방법으로 수행될 수 있고, 배지성분의 공급방법에 따라 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행됨이 바람직하고, 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH(pH 5 내지 9, 바람직하게는 pH 6 내지 8, 가장 바람직하게는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있으며, 배양온도는 20 내지 45℃, 바람직하게는 25 내지 40℃를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160시간 동안 배양함이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 오르니틴은 배지중으로 분비되거나 세포내에 잔류할 수 있다.
- [0040] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으며; 인 공급원으로서 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 기타 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 수산화된 사이클로스포린 A의 생산방법을 이용하면, 종래의 방법보다 4-(γ -hydroxy)-CyA를 높은 효율로 생산할 수 있으므로, 다양한 발모제의 개발 및 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하기 위한 발현벡터의 구성을 나타내는 개략도이다.
- 도 2는 *S. benihana*의 conjugation을 통한 형질 전환 방법을 나타내는 개략도이다.
- 도 3a는 발현벡터 pYJ1621에 포함된 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *camA* 및 *camB*)를 나타내는 개략도이고,
- 도 3b는 YJ405의 genomic DNA를 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- 도 3c는 YJ405의 genomic DNA를 southern blot hybridization 방법으로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- 도 4a는 발현벡터 pYJ1623에 포함된 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, FD506 및 SCO0681)를 나타내는 개략도이다.
- 도 4b는 YJ407의 genomic DNA를 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- 도 4c는 YJ407의 genomic DNA를 southern blot hybridization 방법으로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- 도 5a는 발현벡터 pYJ1625에 포함된 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *fldA* 및 *fpr*)를 나타내는 개략도이다.
- 도 5b는 YJ409의 genomic DNA를 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- 도 5c는 YJ409의 genomic DNA를 southern blot hybridization 방법으로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다.
- 도 6은 대조균의 균주에서 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA를 HPLC-ESI-MS로 분석한 결과이다.

도 7은 액체배양 방법으로 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA의 수산화율을 분석한 결과이다.

도 8은 고체배양 방법으로 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA의 수산화율을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1: 사이클로스포린 A의 수산화를 매개하는 신규한 CYP 유전자의 선발

[0045] 사이클로스포린 A의 수산화율을 향상시키기 위하여, *S. benihana*(KTTC 9610)의 genome 분석을 통해 공지된 5종의 CYP 유전자 이외에 신규한 16종의 CYP 유전자를 선발하였다(표 1).

표 1

[0046] *S. benihana*로부터 선발된 CYP 유전자

No.	CYP name	Description
1	CYP501	Accession no. DI130758.1
2	CYP502	Accession no. DI131915.1
3	CYP503	Accession no. DI126285.1
4	CYP504	Accession no. DI129591.1
5	CYP506	Accession no. DI139785.1
6	CYP001	
7	CYP002	
8	CYP003	
9	CYP004	
10	CYP005	
11	CYP006	
12	CYP007	
13	CYP008	
14	CYP009	
15	CYP010	
16	CYP011	
17	CYP012	
18	CYP013	
19	CYP014	
20	CYP015	
21	CYP016	

[0047] 상기 표 1에서 보듯이, 6번 내지 21번의 16종의 CYP 유전자를 선발하였고, 상기 선발된 유전자 중에서 사이클로스포린 A의 수산화를 매개할 수 있는 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 선별하기 위하여, 상기 각 유전자를 결실시킨 변이주를 각각 제작하고, 이들 각각의 변이주로부터 발현되는 수산화된 사이클로스포린 A(4-(γ -hydroxy)-CyA)의 발현량을 측정한 다음, 상기 4-(γ -hydroxy)-CyA의 발현량이 야생형 균주의 것보다도 감소된 균주를 선발한 결과, CYP008 유전자만이 사이클로스포린 A의 수산화를 매개할 수 있는 활성을 나타내는 단백질을 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

[0048] 실시예 2: 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하기 위한 발현벡터의 제작

[0049] 상기 사이클로스포린 A에 대한 수산화 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 것으로 확인된 CYP008 유전자와 이미 수산화 활성이 입증된 CYP506 유전자(NCBI accession No.: D1139785.1)를 포함하고, 전자전이 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하였다. 이때, 사용된 전자전이 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자로는 3개의 그룹을 사용하였는데, 1번 그룹은 *P. putida* 유래의 putidaredoxin 유전자인 *camB*와 putidaredoxin reductase인 *camA* 유전자를 사용하였고, 2번 그룹은 *S. benihana*의 CYP506 유전자의 3'-downstream에 존재하는 ferredoxin 유전자인 *FD506*과 *S. coelicolor* A3(2) 유래의 ferredoxin reductase 유전자인 *SCO0681*을 사용하였으며, 3번 그룹은 *E. coli* 유래의 flavodoxin인 *fldA* 유전자와 ferredoxin (flavodoxin) reductase인 *fpr* 유전자를 사용하였다.

[0050] 상기 유전자들은 RBS(ribosome binding site)와 start codon 부터 stop codon까지의 염기서열이 포함되도록 PCR(polymerase chain reaction)을 수행함으로써 확보하였다. PCR에는 Tag 중합효소 (Genotech)를 사용하였고, 사용한 프라이머는 CYP008 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 3 및 4의 프라이머, CYP506 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 5 및 6의 프라이머, *camA* 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 7 및 8의 프라이머, *camB* 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 9 및 10의 프라이머, *FD506* 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 11 및 12의 프라이머, *SCO0681* 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 13 및 14의 프라이머, *fldA* 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 15 및 16의 프라이머, 및 *fpr* 유전자를 증폭시키기 위한 서열번호 17 및 18의 프라이머를 사용하였고, 상기 각 프라이머의 염기서열은 표 2와 같다. PCR 증폭을 통해 얻은 각각의 유전자 단편은 EcoRI (또는 PacI)과 XbaI의 제한효소를 처리하여 pLitmus28 벡터에 클로닝을 하였다.

표 2

[0051] 각 유전자의 PCR용 프라이머 서열

유전자	프라이머 종류	염기서열(5'-3')	서열번호
CYP008	정방향	TACGTAGAATTCAGTCTCGCGCTGGTTTCATA	3
	역방향	TCTAGAGGTTACGCCGAGGGTGAC	4
CYP506	정방향	TACGTAGAATTCAGTAGCGGAACGCGTAATATC	5
	역방향	TCTAGAATCCACTTCGAGTTCCAT	6
<i>camA</i>	정방향	TTAATTAACTAGTATCGATACACATGGGAGTGCCTGCTAAGTG	7
	역방향	TCTAGATTCAGGCACTACTCAGTTCAGCTT	8
<i>camB</i>	정방향	TTAATTAACTAGTCATAGCGTGTGAGGATAAACAGAT	9
	역방향	TCTAGATTACCATTCGCTATCGGGAACA	10
<i>FD506</i>	정방향	GAATTCTACGTAACAGTAGTATGGAAGTGAAGTGGAT	11
	역방향	TCTAGATCATGAAGGTCGCGCAGGCGA	12
<i>SCO0681</i>	정방향	GAATTCTACGTAACAGTAGTATCTGTCACCGCTCGAA	13
	역방향	TCTAGATCAGGCGCGCTCTCGCGGAG	14
<i>fldA</i>	정방향	GAATTCTACGTAACAGTTTCAATAAGTTTCAAGAG	15
	역방향	TCTAGATCAGGCATTGAGAATTTTCGTC	16
<i>fpr</i>	정방향	GAATTCTACGTAACAGTAAGGCAAGTCAATCAAAA	17
	역방향	TCTAGATTACCAGTAATGCTCCGCTGT	18

[0052] 상기 2개의 수산화 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자와 3그룹의 전자전이 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 조합하여 포함하는 각각의 발현벡터를 제작하였다(도 1). 도 1은 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하기 위한 발현벡터의 구성을 나타내는 개략도이다. 도 1에서 보듯이, 각각 3개의 발현벡터에서 프로모터로서는 *ermE*를 사용하고, 수산화 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자로는 CYP008 유전자와 CYP506 유전자를 순차적으로 연결한 것을 공통적으로 사용하였으며, 전자전이 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 각 그룹의 유전자와 함께 pLitmus28 벡터에서 조합한 뒤 이를 integration 벡터인 pSET152로 클로닝하여 사이클로스포린 A의 수산화화를 위한 발현벡터를 제작하였다. 이때, 1번 그룹을 포함하는 발현벡터를 "pYJ1621"라 명명하고, 2번 그룹을 포함하는 발현벡터를 "pYJ1623"라 명명하였으며, 3번 그룹을 포함하는 발현벡터를 "pYJ1625"라 명명하였다.

[0053] 아울러, 음성대조군으로서 상기 2개의 수산화 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자만을 포함하고 전자전이 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하지 않는 발현벡터를 제작하고, 이를 "pYJ1627"이라 명명

하였다.

실시예 3: 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하기 위한 형질전환체의 제작

먼저, 상기 실시예 2에서 제작된 각각의 발현벡터를 *E. coli* ET12567/pUZ8002에 도입하여 각각의 형질전환체를 수득하고, 이들 형질전환체를 LB 액체배지에 아프라마이신 25 μ g/ml을 넣고 37℃에서 12시간 배양한 후, 1ml의 배양액을 50ml의 LB 액체배지에 옮기고, 37℃에서 광학 밀도 (optical density, OD600)가 0.4-0.5가 될 때까지 배양하였다. 배양액을 원심분리한 후, 항생제가 없는 LB 액체배지로 두 번 세척을 하고 500 μ l의 LB로 농축을 하였다.

한편, *S. benihana* spore 80 μ l에 2xTY (trptone 0.16%, yeast extract 0.1%, NaCl 0.05%) 500 μ l를 혼합한 뒤 원심분리하고 재현탁 한 후 50℃에서 10분 동안 열충격 (heat-shock)을 가하여, 균사액을 수득하였다.

상기 각각의 *E. coli* 농축액 500 μ l와 균사액 500 μ l를 혼합하고, 이들 각각의 혼합물을 mISP4 고체배지(Difco ISP4 medium 3.7%, yeast extract 0.05% and tryptone 0.15%)에 도포한 다음, 30℃에서 18-20시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 고체배지에 30 μ l/ml의 나리딕신산(nalidixic acid)과 30 μ l/ml의 아프라마이신을 도말하고, 15-20일 동안 추가로 배양한 다음, 항생제 저항성을 나타내는 각각의 colony를 선별하였다(도 2). 도 2는 *S. benihana*의 conjugation을 통한 형질 전환 방법을 나타내는 개략도이다.

상기 발현벡터 pYJ1621가 도입된 형질전환체는 "YJ405"라 명명하고, 상기 발현벡터 pYJ1623이 도입된 형질전환체는 "YJ407"이라 명명하였으며, 상기 발현벡터 pYJ1625가 도입된 형질전환체는 "YJ409"라 명명하고, 음성대조 군인 상기 발현벡터 pYJ1627이 도입된 형질전환체는 "YJ410"이라 명명하였다.

실시예 4: 1번 그룹이 도입된 형질전환체의 검정

상기 방법으로 제작된 각각의 형질전환체 중에서, 1번 그룹을 포함하는 발현벡터 pYJ1621가 도입된 형질전환체 YJ405에 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *camA* 및 *camB*)가 정상적으로 도입되었는지의 여부를 PCR 방법과 southern blot hybridization 방법으로 각각 검정하였다.

먼저, PCR 방법의 경우, YJ405의 genomic DNA를 주형으로 하고 상기 표 5에 개시된 각각의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 PCR 절편을 수득하고, 상기 수득한 PCR 절편을 전기영동하였다(도 3a 및 3b). 도 3a는 발현벡터 pYJ1621에 포함된 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *camA* 및 *camB*)를 나타내는 개략도이고, 도 3b는 YJ405의 genomic DNA를 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 3b에서 보듯이, 상기 YJ405의 genomic DNA에는 1.3kb의 CYP8 유전자, 1.3kb의 CYP506 유전자, 1.3kb의 *camA* 유전자 및 0.3kb의 *camB* 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.

다음으로, southern blot hybridization 방법의 경우, YJ405의 genomic DNA를 대상으로 CYP008의 유전자 및 CYP506 유전자인 약 2.8kb의 유전자 영역을 검출할 수 있는 프로브 1(서열번호 19)과 키트(DIG labeling and detection kit, Roche)를 사용한 southern blot hybridization 방법을 수행하였다(도 3c). 도 3c는 YJ405의 genomic DNA를 southern blot hybridization 방법으로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 3c에서 보듯이, probe로 사용한 DNA 단편의 크기인 2.8kb의 band가 확인되어 재조합 균주 YJ405 내에 수산화 유전자 및 전자전이 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

실시예 5: 2번 그룹이 도입된 형질전환체의 검정

상기 방법으로 제작된 각각의 형질전환체 중에서, 2번 그룹을 포함하는 발현벡터 pYJ1623이 도입된 형질전환체

YJ407에 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *FD506* 및 *SCO0681*)가 정상적으로 도입되었는지의 여부를 PCR 방법과 southern blot hybridization 방법으로 각각 검정하였다.

[0065] 먼저, PCR 방법의 경우, YJ407의 genomic DNA를 주형으로 하고 상기 표 5에 개시된 각각의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 PCR 절편을 수득하고, 상기 수득한 PCR 절편을 전기영동하였다(도 4a 및 4b). 도 4a는 발현벡터 pYJ1623에 포함된 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *FD506* 및 *SCO0681*)를 나타내는 개략도이고, 도 4b는 YJ407의 genomic DNA를 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 4b에서 보듯이, 상기 YJ407의 genomic DNA에는 1.3kb의 CYP8 유전자, 1.3kb의 CYP506 유전자, 0.2kb의 *FD506* 유전자 및 1.4kb의 *SCO0681* 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.

[0066] 다음으로, southern blot hybridization 방법의 경우, YJ407의 genomic DNA를 대상으로 CYP008 유전자의 일부(제한효소 *AscI* 절단부위 이후), CYP506 유전자 및 *FD506* 유전자의 일부(제한효소 *AscI* 절단부위 이전)인 약 2.5kb의 유전자 영역을 검출할 수 있는 프로브 2(서열번호 20)와 키트(DIG labeling과 detection kit, Roche)를 사용한 southern blot hybridization 방법을 수행하였다(도 4c). 도 4c는 YJ407의 genomic DNA를 southern blot hybridization 방법으로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 4c에서 보듯이, probe로 사용한 DNA 단편의 크기인 2.5kb의 band가 확인되어 재조합 균주 YJ407 내에 수산화 유전자 및 전자전이 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

[0067] 실시예 6: 3번 그룹이 도입된 형질전환체의 검정

[0068] 상기 방법으로 제작된 각각의 형질전환체 중에서, 3번 그룹을 포함하는 발현벡터 pYJ1625가 도입된 형질전환체 YJ409에 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *fldA* 및 *fpr*)가 정상적으로 도입되었는지의 여부를 PCR 방법과 southern blot hybridization 방법으로 각각 검정하였다.

[0069] 먼저, PCR 방법의 경우, YJ409의 genomic DNA를 주형으로 하고 상기 표 5에 개시된 각각의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 PCR 절편을 수득하고, 상기 수득한 PCR 절편을 전기영동하였다(도 5a 및 5b). 도 5a는 발현벡터 pYJ1625에 포함된 목적하는 유전자(CYP506, CYP008, *fldA* 및 *fpr*)를 나타내는 개략도이고, 도 5b는 YJ409의 genomic DNA를 PCR 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 5b에서 보듯이, 상기 YJ409의 genomic DNA에는 1.3kb의 CYP8 유전자, 1.3kb의 CYP506 유전자, 0.5kb의 *fldA* 유전자 및 0.7kb의 *fpr* 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.

[0070] 다음으로, southern blot hybridization 방법의 경우, YJ409의 genomic DNA를 대상으로 CYP506 유전자의 일부(제한효소 *NruI* 절단부위 이후) 및 *fldA* 유전자의 일부(제한효소 *SspI* 절단부위 이전)인 약 1.9kb의 유전자 영역을 검출할 수 있는 프로브 3(서열번호 21)과 키트(DIG labeling과 detection kit, Roche)를 사용한 southern blot hybridization 방법을 수행하였다(도 5c). 도 5c는 YJ409의 genomic DNA를 southern blot hybridization 방법으로 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 5c에서 보듯이, probe로 사용한 DNA 단편의 크기인 1.9kb의 band가 확인되어 재조합 균주 YJ409 내에 수산화 유전자 및 전자전이 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

[0071] 실시예 7: 액체배양 방법을 이용한 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산

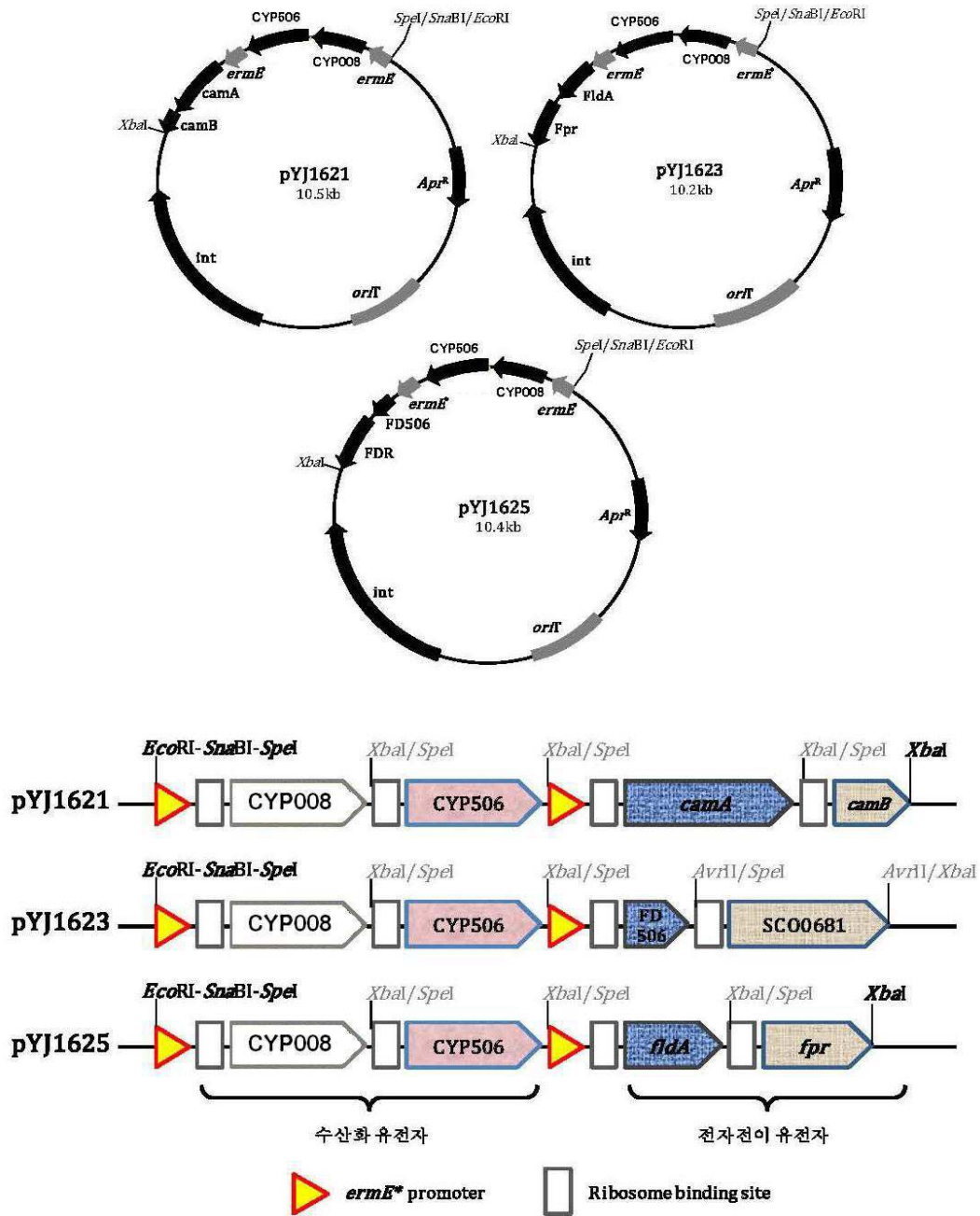
[0072] 상기 제작된 각 형질전환체를 액체배양 방법으로 배양하여 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하고, 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA의 함량을 측정하였다.

- [0073] 구체적으로, 상기 제작된 각 형질전환체를 아프라마이신 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 5ml 의 GSMY 액체배지(glucose 0.7%, soluble starch 0.75%, yeast extract 0.45%, malt extract 0.5%, calcium carbonate 0.005%)에 접종하고, 30°C 에서 230rpm으로 진탕시키면서 3일동안 배양하였으며, 상기 각 배양물을 원심분리하여 각각의 균체를 수득하였다. 상기 수득한 각각의 균체 50mg 을 아프라마이신 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 50ml 의 GSMY 액체배지에 접종하고, 30°C 에서 230rpm으로 진탕시키면서 2일동안 배양하였으며, 상기 각각의 배양물에 사이클로스포린 A 1.25mg 을 첨가한 다음, 동일한 조건하에서 3일동안 추가로 배양하였다. 배양이 종료되면, 배양물을 원심분리하여 각각의 균체를 수득하고, 이에 배양물 부피의 2배 부피의 에틸아세테이트를 가하여 12시간 동안 방치시켰으며, 이로부터 각각의 에틸아세테이트 층을 수득하였다. 상기 수득한 에틸아세테이트 층으로부터 용매를 제거하여 각각의 시료를 수득하고, 이를 $200\mu\text{l}$ 의 메탄올에 용해시킨 것을 HPLC 및 HPLC-ESI-MS 분석용 시료로서 사용하였다. 이때, 대조군으로는 야생형 균주를 사용하였다.
- [0074] HPLC(high performance liquid chromatography) 분석은, 기기(waters (Milford, MA) model 2690 separation module), 컬럼(Phenomenex 사의 Gemini 5u C18 110A, $250 \times 4.60\text{mm}$, 5micron), 흡수 파장(210nm), 펌프유속($1.00\text{ml}/\text{min}$), 펌프압력(50.0psi), 컬럼의 온도(50°C), 용매 A(25%의 메탄올), 용매 B(100%의 아세토나이트릴) 및 분석조건(0~4분 동안은 용매 B 40%, 5~20분 동안은 용매 B 61%, 21~40분 동안은 용매 B 100%, 45~60분 까지는 용매 B 40%)을 사용하여 수행하였다.
- [0075] HPLC-ESI-MS(HPLC-Electro Spray Ionization-mass spectrometry) 분석은, 기기(waters (Milford, MA) model 2690 separation module), 컬럼(XTetra® MS C18 $3.5\mu\text{m}$, $2.1 \times 50\text{mm}$), 용매 A(5mM 암모늄아세테이트 및 0.05% 아세트산 수용액), 용매 B(5mM 암모늄아세테이트 및 0.05% 아세트산이 용해된 80% 아세토나이트릴), 유속($0.22\text{ml}/\text{min}$), 분석 조건(0~40분 동안 용매 A 40%, 41~47분 동안 용매 A 5%, 48~60분까지는 용매 A 40%)을 사용하여 수행하였다. 상기 컬럼을 통과한 시료를 micromass((Baverly, MA) Quattro LC triple-tandem quadrupole mass spectrometer)를 통과시키고, 양이온 모드의 검출기에 적용하였다(도 6). 도 6은 대조군의 균주에서 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA를 HPLC-ESI-MS로 분석한 결과를 나타내는데, A는 HPLC-ESI-MS 크로마토그램을 나타내고, B는 ESI-MS 스펙트라를 나타낸다. 도 6에서 보듯이, 대조군인 *S. benihana* 야생형 균주에 의해 4-(γ -hydroxy)-CyA가 생산될 뿐만 아니라, 수산화된 유도체 4번 methyl leucine 과 6번 methyl leucine 이 함께 수산화된 유도체(Di-4,6-(γ -hydroxy)-CyA)도 매우 소량으로 함께 생산됨을 확인하였다.
- [0076] 상술한 바와 같이, HPLC 및 HPLC-ESI-MS 분석을 수행한 결과는 도 7에 나타내었다. 도 7은 액체배양 방법으로 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA의 수산화율을 분석한 결과로서, A는 4-(γ -hydroxy)-CyA의 HPLC 크로마토그램을 나타내고, B는 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량과 수산화율을 각 형질전환체별로 비교한 결과를 나타내는 그래프이며, a는 4-(γ -hydroxy)-CyA를 나타내고, b는 CyA를 나타낸다.
- [0077] 상기 도 7에서 보듯이, 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량을 비교하면, 대조군에서는 0.55mg (생전환율 44%)이 생산되었고, 음성대조군인 형질전환체 YJ410에서는 0.56mg (생전환율 45%)이 생산되었으며, 형질전환체 YJ405에서는 0.63mg (생전환율 50%)이 생산되었으며, 형질전환체 YJ407에서는 0.61mg (생전환율 49%)이 생산되었고, 형질전환체 YJ409에서는 0.84mg (생전환율 67%)이 생산됨을 확인하였다.
- [0078] 이처럼, 대조군과 수산화 효소만이 과발현되는 음성대조군(YJ410)을 비교하면 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량에 별다른 차이를 나타내지 않음에 반하여, 전자전이 효소가 추가로 과발현되는 각 형질전환체(YJ405, YJ407 및 YJ409)는 1.1 내지 1.5배로 향상된 생산량으로 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산함을 확인하였다.
- [0079] 따라서, 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량을 증대시키기 위하여는 전자전이 효소를 단독으로 또는 수산화 효소와 함께 과발현시켜야 함을 알 수 있었다.
- [0080] **실시예 8: 고체배양 방법을 이용한 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산**

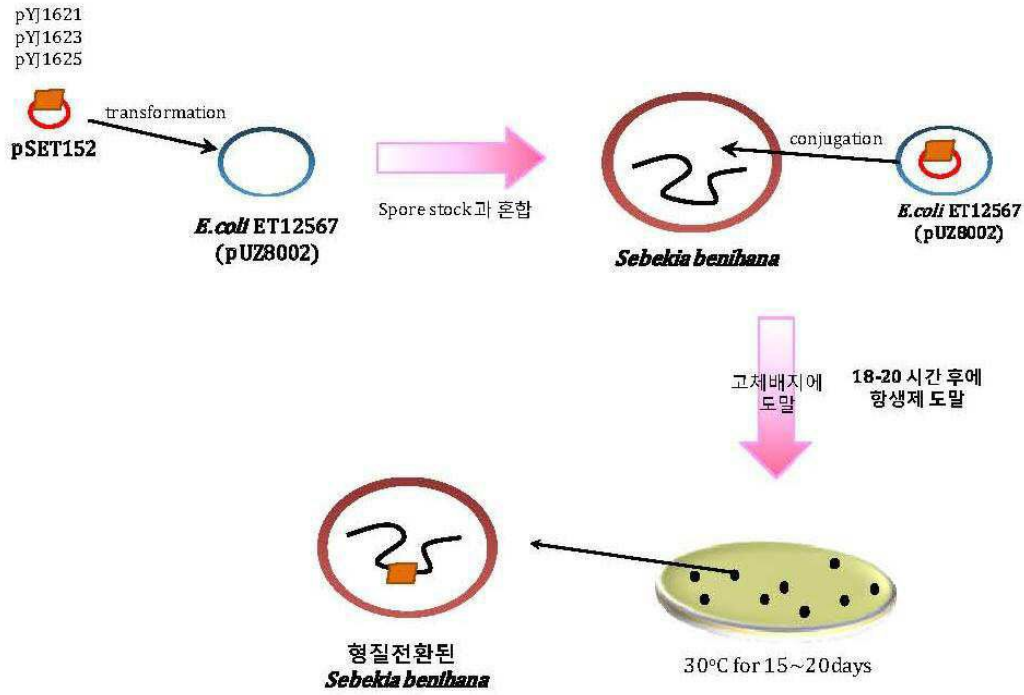
- [0081] 상기 제작된 각 형질전환체를 고체배양 방법으로 배양하여 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산하고, 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA의 함량을 측정하였다.
- [0082] 구체적으로, 상기 제작된 각 형질전환체를 아프라마이신 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 5ml 의 GSMY 액체배지에 접종하고, 30°C 에서 230rpm 으로 진탕시키면서 3일동안 배양하였으며, 상기 각 배양물 $20\mu\text{l}$ 을 1.25mg 의 사이클로스포린 A가 첨가된 GSMY 고체배지 50ml 에 도말하여 30°C 에서 5일간 배양하였다. 배양이 종료되면, 상기 고체배지를 $0.5\text{-}0.8\text{ mm}$ 의 크기로 절단하고, 이에 메탄올을 가하여 추출한 다음, 진공건조기에 적용하여 농축하였다. 상기 메탄올 농축물에 혼합용매(물:에틸아세테이트=1:3, v/v)를 가하여 12시간 동안 방치시켰으며, 이로부터 각각의 에틸아세테이트 층을 수득하였다. 상기 수득한 에틸아세테이트 층으로부터 용매를 제거하여 각각의 시료를 수득하고, 이를 $200\mu\text{l}$ 의 메탄올에 용해시킨 것을 HPLC 및 HPLC-ESI-MS 분석용 시료로서 사용하였다. 이때, 대조군으로는 야생형 균주를 사용하였다.
- [0083] 상기 시료를 사용한 HPLC 및 HPLC-ESI-MS 분석을 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 수행하고, 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0084] 도 8은 고체배양 방법으로 생산된 4-(γ -hydroxy)-CyA의 수산화율을 분석한 결과로서, A는 4-(γ -hydroxy)-CyA의 HPLC 크로마토그램을 나타내고, B는 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량과 수산화율을 각 형질전환체별로 비교한 결과를 나타내는 그래프이며, a는 4-(γ -hydroxy)-CyA를 나타내고, b는 CyA를 나타낸다.
- [0085] 상기 도 8에서 보듯이, 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량을 비교하면, 대조군에서는 0.55mg (생전환률 44%)이 생산되었고, 음성대조군인 형질전환체 YJ410에서는 0.56mg (생전환률 45%)이 생산되었으며, 형질전환체 YJ405에서는 0.69mg (생전환률 55%)이 생산되었으며, 형질전환체 YJ407에서는 0.68mg (생전환률 54%)이 생산되었고, 형질전환체 YJ409에서는 1.01mg (생전환률 81%)이 생산됨을 확인하였다.
- [0086] 상기 실시예 7의 결과와 동일하게, 대조군과 수산화 효소만이 과발현되는 음성대조군(YJ410)을 비교하면 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량에 별다른 차이를 나타내지 않음에 반하여, 전자전이 효소가 추가로 과발현되는 각 형질전환체(YJ405, YJ407 및 YJ409)는 1.2 내지 1.8배로 향상된 생산량으로 4-(γ -hydroxy)-CyA를 생산함을 확인하였다.
- [0087] 따라서, 4-(γ -hydroxy)-CyA의 생산량을 증대시키기 위하여는 전자전이 효소를 단독으로 또는 수산화 효소와 함께 과발현시켜야 함을 다시한번 알 수 있었다.

도면

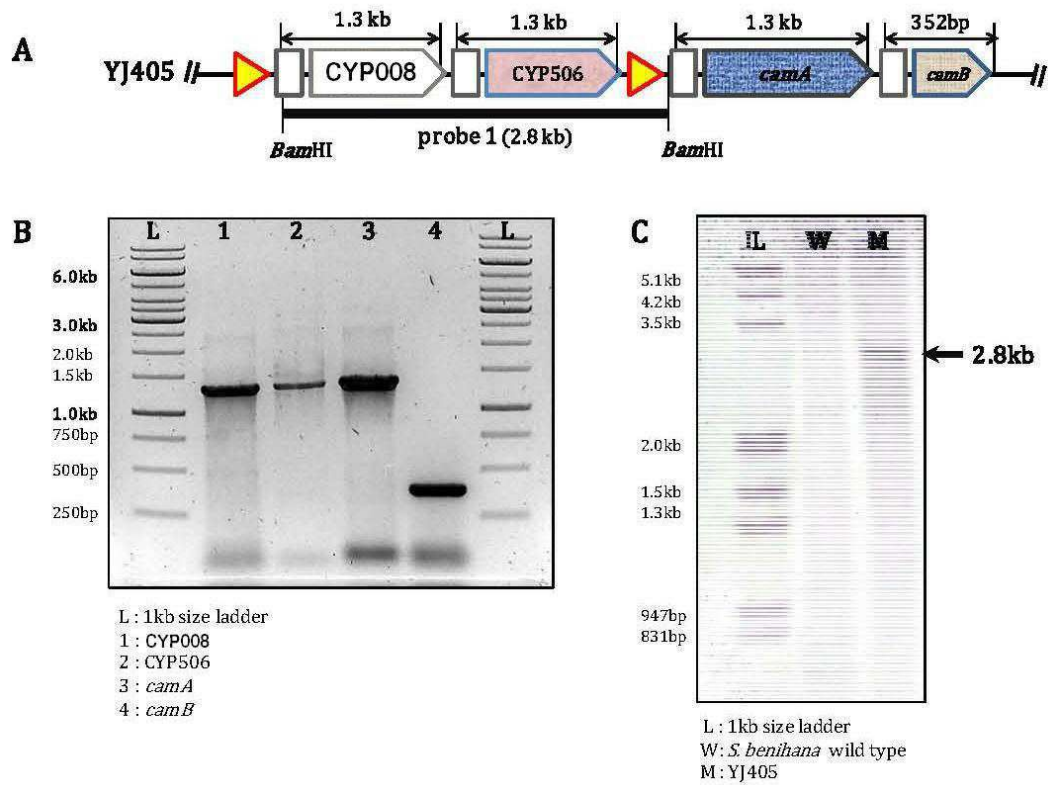
도면1



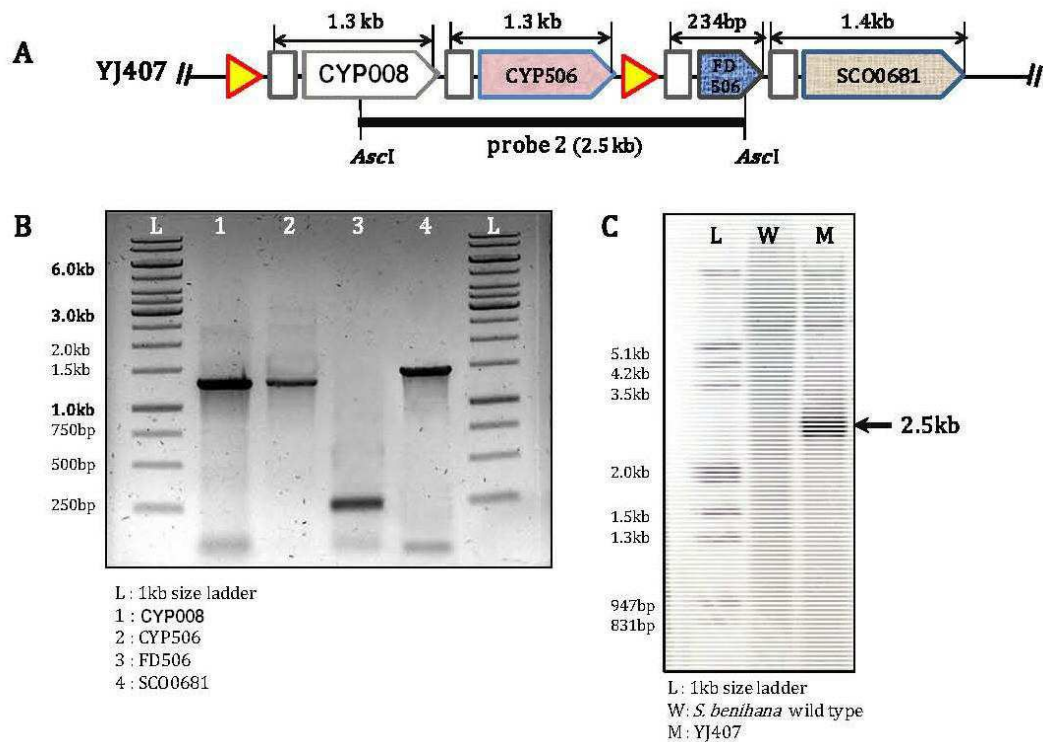
도면2



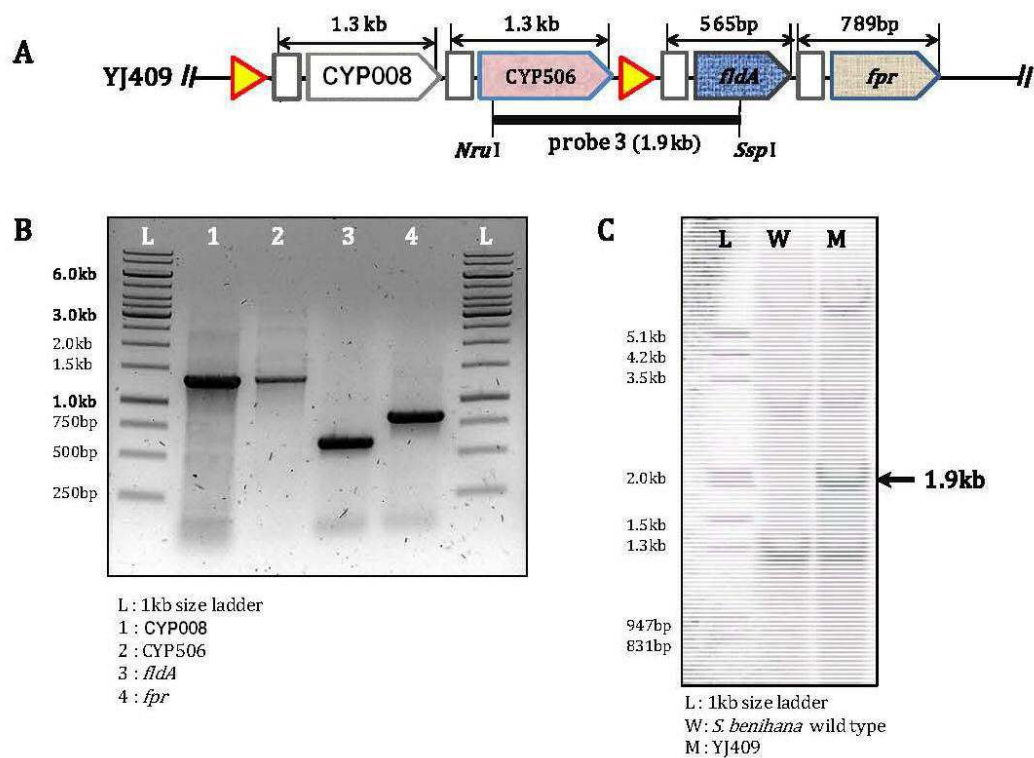
도면3



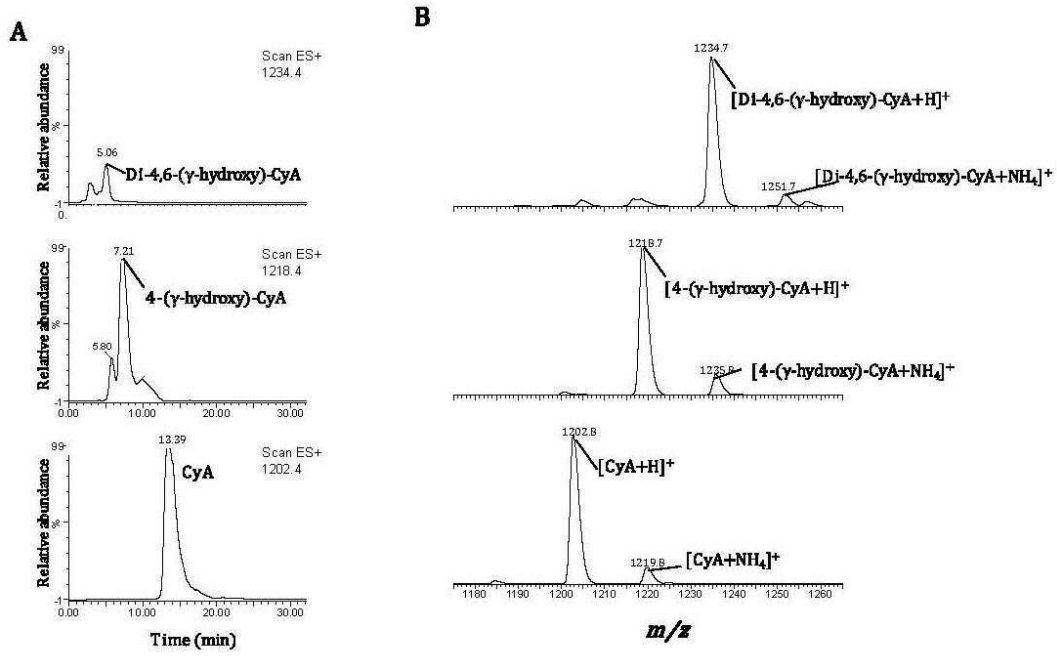
도면4



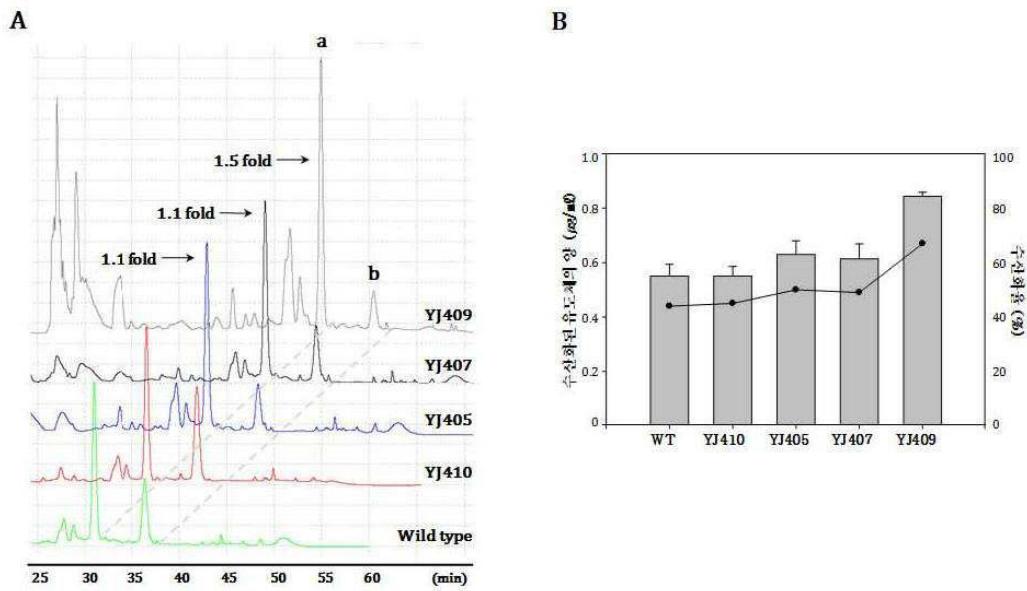
도면5



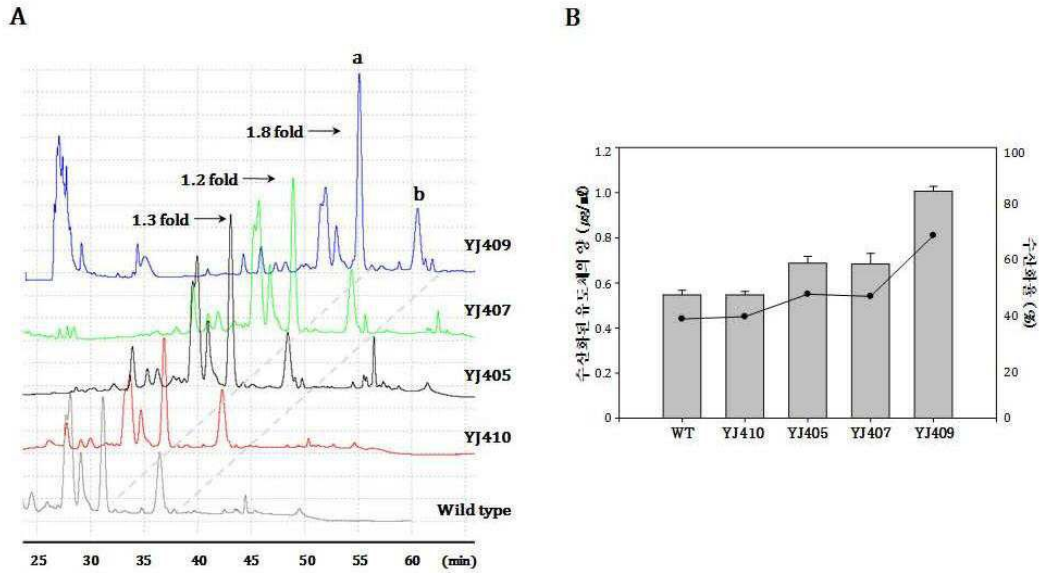
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

SNU R&DB FOUNDATION

<120> A novel Cytochrome P450 hydroxylase and process for preparing
hydroxylated Cyclosporin A employing the same

<130> PA111000/KR

<160> 21

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 394

<212> PRT

<213> CYP008

<400> 1

Val Asn Ile Asp Leu Val Asp Gln Asp His Tyr Ala Thr Phe Gly Pro

1 5 10 15

Pro His Glu Gln Met Arg Trp Leu Arg Glu His Ala Pro Val Tyr Trp

20 25 30

His Glu Gly Glu Pro Gly Phe Trp Ala Val Thr Arg His Glu Asp Val

35 40 45

Val His Val Ser Arg His Ser Asp Leu Phe Ser Ser Ala Arg Arg Leu

50 55 60

Ala Leu Phe Asn Glu Met Pro Glu Glu Gln Arg Glu Leu Gln Arg Met
65 70 75 80
Met Met Leu Asn Gln Asp Pro Pro Glu His Thr Arg Arg Arg Ser Leu
85 90 95

Val Asn Arg Gly Phe Thr Pro Arg Thr Ile Arg Ala Leu Glu Gln His
100 105 110
Ile Arg Asp Ile Cys Asp Asp Leu Leu Asp Gln Cys Ser Gly Glu Gly
115 120 125
Asp Phe Val Thr Asp Leu Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Val Ile Cys
130 135 140
Glu Leu Leu Gly Ala Pro Val Ala Asp Arg Asp Lys Ile Phe Ala Trp
145 150 155 160
Ser Asn Arg Met Ile Gly Ala Gln Asp Pro Asp Tyr Ala Ala Ser Pro

165 170 175
Glu Glu Gly Gly Ala Ala Ala Met Glu Val Tyr Ala Tyr Ala Ser Glu
180 185 190
Leu Ala Ala Gln Arg Arg Ala Ala Pro Arg Asp Asp Ile Val Thr Lys
195 200 205
Leu Leu Gln Ser Asp Glu Asn Gly Glu Ser Leu Thr Glu Asn Glu Phe
210 215 220
Glu Leu Phe Val Leu Leu Leu Val Val Ala Gly Asn Glu Thr Thr Arg
225 230 235 240

Asn Ala Ala Ser Gly Gly Met Leu Thr Leu Phe Glu His Pro Asp Gln
245 250 255
Trp Asp Arg Leu Val Ala Asp Pro Ser Leu Ala Ala Thr Ala Ala Asp
260 265 270
Glu Ile Val Arg Trp Val Ser Pro Val Asn Leu Phe Arg Arg Thr Ala
275 280 285
Thr Ala Asp Leu Thr Leu Gly Gly Gln Gln Val Lys Ala Asp Asp Lys
290 295 300
Val Val Val Phe Tyr Ser Ser Ala Asn Arg Asp Ala Ser Val Phe Ser

305 310 315 320
 Asp Pro Glu Val Phe Asp Ile Gly Arg Ser Pro Asn Pro His Ile Gly
 325 330 335
 Phe Gly Gly Gly Gly Ala His Phe Cys Leu Gly Asn His Leu Ala Lys
 340 345 350
 Leu Glu Leu Arg Val Leu Phe Glu Gln Leu Ala Arg Arg Phe Pro Arg
 355 360 365
 Met Arg Gln Thr Gly Glu Ala Arg Arg Leu Arg Ser Asn Phe Ile Asn
 370 375 380

Gly Ile Lys Thr Leu Pro Val Thr Leu Gly

385 390

<210> 2
 <211> 1185
 <212> DNA
 <213> CYP008
 <400> 2

gtgaacatcg acctcgtcga tcaggaccac tacgcgacct tcggccccc gcacgagcag	60
atgcgctggc tgagagagca cgtccccgtc tactggcacg agggcgagcc gggattcttg	120
gccgtcacc gccacgagga cgtcgtccac gtctcccgcc actccgacct gttctctctc	180
gcgcgcaggc tcgccctggt caacgagatg ccggaggagc agcgggagct gcagcggatg	240
atgatgtcga accaggaccc gcccgagcac accagaaggc gtcacctggt caaccgcgt	300
ttcacccgc gcaccatccg cgcgctggag cagcacatcc gcgacatctg cgacgacctg	360
ctcgaccagt gtcaggcga aggagacttc gtcaccgacc tcgccgcgcc cctcccgtc	420
tacgtgatct gtgagctgct cggcgcgccc gtcccgacc gcgacaagat cttcgcttg	480
tccaaccgca tgatcggcgc ccaggacccc gactacgcc cctcaccgga ggaggcggc	540
gccgcggcca tggaggtcta cgctacgcc tccgaactgg ccgccagcg tcgcgccgcc	600
ccgcgcgacg acatcgtcac caagctctc cagtcgacg agaacggcga gagcctgacg	660
gagaacgagt tcgagctctt cgtgctgctc ctcgtggtcg cgggcaacga gaccaccgt	720
aacgccgct cggcgccat gtcaccctc ttcgagcatc cggaccagtg ggacaggctg	780
gtcccgacc cctccctcgc cgccacggcc gccacgaga tcgtccgctg ggtctcgccg	840
gtgaacctct tccgccgtac ggcgacagcc gacctaccc tgggcggaca gcaggtcaag	900
gccgacgaca aggtcgtggt cttctactcc tctgccaaca gggacgcgtc ggtcttctcc	960

gatccggagg tcttcgacat cggacggtct cccaacccgc acatcgggtt cggaggcgga	1020
ggcgcgcact tctgcctggg caaccatctg gccaaagctcg agctgcgcgt actcttcgag	1080
cagctggcca ggaggttccc gcggatgcgg cagaccggcg aggcccgccg gttgcgctcg	1140
aacttcatca acggcatcaa gaccctcccc gtcaccctcg gctga	1185
<210> 3	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
tacgtagaat tcactagtcc tcgcgctggt ttcata	36
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
tctagaggtt cagccgaggg tgac	24
<210> 5	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
tacgtagaat tcactagtag cggaacgcgt aatatc	36
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
tctagaatcc acttcgagtt ccat	24
<210> 7	

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ttaattaaac tagtatcgat acacatggga gtgcgtgcta agtg 44

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

tctagattca ggcactactc agttcagctt 30

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

ttaattaaac tagtcatagc gtgtgaggat aaacagat 38

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

tctagattta ccattgccta tcgggaaca 29

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gaattctacg taactagtat ggaactcgaa gtggat 36

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

tctagatcat gaagggtccg caggcga 27

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gaattctacg taactagtga tctgtcaccg ctcgaa 36

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

tctagatcag gcgccgctct cgcggag 27

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gaattctacg taactagttt caataagttt caagag 36

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400>	16	
tctagatcag gcattgagaa tttcgtc		27
<210>	17	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	17	
gaattctacg taactagtaa ggcaagtcaa tcaaaa		36
<210>	18	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	18	
tctagattac cagtaatgct ccgctgt		27
<210>	19	
<211>	2822	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe 1	
<400>	19	
ggatcctcta gtctcgcgc tggtttcata ccctggcacc taccaagcgc ttgaccaagc		60
ccgaggtgac ggctcgtgaa catcgacctc gtcgatcagg accactacgc gaccttcggc		120
cccccgcacg agcagatgcg ctggctgaga gaggacgctc ccgtctactg gcacgagggc		180
gagccgggat tctgggccgt caccgccac gaggacgtcg tccacgtctc ccgccactcc		240
gacctgttct cctccgcgcg caggctcgcc ctgttcaacg agatgccgga ggagcagcgg		300
gagctgcagc ggatgatgat gctcaaccag gaccgccccg agcacaccag aaggcgctcc		360
ctggtcaacc gcggtttcac cccgcgcacc atccgcgcgc tggagcagca catccgcgac		420
atctgcgacg acctgctcga ccagtgtca ggccaaggag acttcgtcac cgacctcgcc		480
gcgccccctc cgctctacgt gatctgtgag ctgctcggcg cgccccgcgc cgaccgcgac		540
aagatcttcg cctgggtcaa ccgcatgac ggcgcccagg accccgacta cgccgcctca		600

ccggaggagg gcggcgccgc ggccatggag gtctacgcct acgcctccga actggccgcc	660
cagcgtcgcg ccgccccgcg cgacgacatc gtcaccaagc tcttccagtc cgacgagaac	720
ggcgagagcc tgacggagaa cgagttcgag ctcttcgtgc tgctcctcgt ggtcgcgggc	780
aacgagacca ccgtaacgc cgcctccggc ggcatgctca cctctttcga gcatccggac	840
cagtgggaca ggctggtcgc cgacccctcc ctgcgcgcca cggccgcca cgagatcgtc	900
cgctgggtct cgccggtgaa cctcttccgc cgtacggcga cagccgacct caccctgggc	960
ggacagcagg tcaaggcca cgacaaggtc gtggctttct actcctctgc caacagggac	1020
gcgtcggctt tctccgatcc ggaggtcttc gacatcggac ggtctcccaa cccgcacatc	1080
gggttcggag gcggaggcgc gcaattctgc ctgggcaacc atctggccaa gctcgagctg	1140
cgctactct tcgagcagct ggccaggagg ttcccgcgga tgcggcagac cggcgaggcc	1200
cgccggttgc gctcgaactt catcaacggc atcaagacc tccccgtcac cctcggtga	1260
acctctagta gcggaacgcg taatatcgcg actaaggagc tgacgtgacg gagccccgt	1320
acaccgtgac cgcgctgccc accatgcgcc ctcccggctg ccggttcgac ccgcccagg	1380
agttggcgca gctgcgcgag cagcaccac tcagcaggat ggtcttcccc gacgggcacg	1440
tcggctggct ggtgaccagt cagccctgg ctgcgcggt cgtggccgac cccgcttca	1500
gctcgcggca cgagctcatg cactcgccgt tccctggggc catctcggcg gagaggccgc	1560
cgccggccgc gcccggcatg ttcateggcg tcgatccgcc cgagcacacc cgctaccga	1620
agctgctcac ggggaagttc accgtccga ggatgcgcag tctcgcgcc cgctcgagg	1680
agatcaccgc cgagcacctg gacgcatgg agcggcaggg cccgcctgtg gacctggtgc	1740
aggcctacgc ccagcccgtc cccgcgtga tgatctgca gctgctcggc gttccctacg	1800
ccgacaggga gttcttcag cgtcacgcgc tggcgtgaa caacttcgac gccgtccccg	1860
aggagcagta cggccctac gtcgcgtgc aggagtacct gcacgcgtg gtctggcca	1920
aacgcgccac cccaccgac gacctgctcg gcgatctgc gcgcgaggag ctaccgacg	1980
aggagctcac caacatcggg gttctgtgc tggcgccgg gctcgacacc accgccaaca	2040
tgtcgcgtt gggcaccttc gccctgtga gccaccccg ccagctgcc gccctgcgcg	2100
ccgacccggg ctcgccgac caggccgtcg aggagctgct gcgctacctg agcatcacc	2160
acaccgggat acgggccgca ctggaggatg tcgagctgaa cggtcacgtg atcaaagcgg	2220
gggagagcgt cgccctctcg gcgcaggcgg ccaaccgca cctgagcgc ttcgccgacc	2280
ccgacactct cgacctgcac cgtcaggcca ccggacatct gagcttcggg cacggcgtcc	2340
accagtgcct cggccagcag ctggcccgcg tggagatgcg cgtcgccctt cccgcgtgg	2400
tcacccgttt cccgacgctg cggtggcca tatctcagc agagggtccg ctgcgcacca	2460

attccgacat ctacggcgtg caccggctcc cggtcgcgtg ggacaaggag tagccgatgg	2520
aactcgaagt ggattctagt gagctcggta ccagcccgac ccgagcacgc gccggcacgc	2580
ctggtcgatg tcggaccgga gttcgaggta cgcggcttgc aggtccagga aggggacgtc	2640
catgcgagtg tccgttcgag tggcggcttg cgcccgatgc tagtcgcggt tgatcggcga	2700
tcgcaggatg acgcggtcga tcttgacggc tggcgagagg tgcggggagg atctgaccga	2760
cgcggtcac acgtggcacc gcgatgctgt tgtgggcaca atcgtgccgg ttggtaggat	2820
cc	2822
<210> 20	
<211> 2460	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe 2	
<400> 20	
ggcgcgcccc tcgccgaccg cgacaagatc ttcgcctggt ccaaccgcat gatcggcgcc	60
caggaccccc actacccgc ctaccggag gagggcggcg ccgcggccat ggaggtctac	120
gcctacgcct ccgaactggc cgcccagcgt cgcgccgcc cgcgcgacga catcgtcacc	180
aagctctcc agtcgacga gaacggcgag agcctgacgg agaacagatt cgagctcttc	240
gtgtgtctcc tcgtggtcgc gggcaacgag accacccgta acgccgcctc cggcggcatg	300
ctcacctct tcgagcatcc ggaccagtgg gacaggctgg tcgccgacc ctcctcgcc	360
gccacggccg ccgacgagat cgtccgctgg gtctcgccgg tgaacctctt ccgccgtacg	420
gcgacagccg acctcacctt gggcggacag caggtaagg ccgacgacaa ggtcgtggtc	480
ttctactcct ctgccaacag ggacgcgtcg gtcttctccg atccggaggt cttcgacatc	540
ggacgggtct ccaaccgcga catcgggttc ggaggcggag gcgcgcactt ctgcctgggc	600
aaccatctgg ccaagctcga gtcgcgcgta ctcttcgagc agctggccag gaggttccc	660
cggatgcggc agaccggcga ggcccgcgg ttgcgctcga acttcatcaa cggcatcaag	720
acctccccg tcacctcgg ctgaacctt agtagcggaa cgcgtaatat cgcgactaag	780
gagctgacgt gacggagccc ccgtacaccg tgaccgcgt gccaccatg cgccctccc	840
gctgcccgtt cgaccgccc gaggagtgg cgcagctcg cgagcagcac ccaactcagca	900
ggatgggtct ccccacggg cagtcggct ggctgggtgac cagtcacgcc ctggctcgcg	960
cggctcgtggc cgacccccg ttcagctcgc ggcacgagct catgcactcg ccgttcctg	1020
gggccatctc ggcggagagg ccgccgcgg ccgcgcccg catgttcac ggctcgatc	1080

cgcccgagca caccgctac cgcaagctgc tcacggggaa gttcacgcgc cgcaggatgc	1140
gcagtctcgc cgcccgctc gaggagatca ccgccgagca cctggacgcc atggagcggc	1200
agggcccgcc tgtggacctg gtgcaggcct acgccagcc cgtccccgcg ctgatgatct	1260
gcgagctgct cggcggtccc tacgccgaca gggagtcttt ccagcgtcac gcgctggcgc	1320
tgaacaactt cgacgcgcgc cccgaggagc agtacgccgc ctacgtcgcg ctgcaggagt	1380
acctgcacgc gctggctctg gccaaacgcg ccacccccac cgacgacctg ctcggcgatc	1440
tcgcgcgcga ggagctcacc gacgaggagc tcaccaacat cgggggttctg ctgctgggcg	1500
ccgggctcga caccaccgcc aacatgctcg cgctgggcac ctctgccctg ctgagccacc	1560
ccggccagct cgccgccctg cgcgccgacc cgggcctcgc cgaccaggcc gtcgaggagc	1620
tgtctcgcta cctgagcatc acccacaccg ggatacgggc cgcactggag gatgtcgagc	1680
tgaacggtca cgtgatcaaa gcgggggaga gcgtcgccct ctcggcgcag gcggccaacc	1740
gcgacctga gcgttcgcc gaccccgaca ctctcgacct gcaccgtcag gccaccggac	1800
atctgagctt cggtcacggc gtccaccagt gcctcggcca gcagctggcc cgcgtggaga	1860
tgcgcgtcgc ctttcccgcg ctggtcaccc gtttcccgcg gctgcggctg gccatctct	1920
cagcagaggt gccgctgcgc accaattccg acatctacgg cgtgcaccgg ctcccggctg	1980
cgtgggacaa ggagtagccg atggaactcg aagtggattc tagtgagctc ggtaccagcc	2040
cgacccgagc acgcgccgcg acgcctggtc gatgtcggac cggagttcga ggtacgcggc	2100
ttgcagggtc aggaagggga cgtccatcgc agtgtccgtt cgagtggcgg cttgcgcccg	2160
atgctagtgc cggttgatcg gcgatcgagc gtgcacgcgg tcgatcttga cggctggcga	2220
gaggtgcggg gaggatctga ccgacgcggt ccacacgtgg caccgcgatg ctgttgtggg	2280
cacaatcgtg ccggttggtg ggatcctcta gtatggaact cgaagtggat cgcgagcgt	2340
gcatcggggc gggcatgtgc gcgctgaccg cccccgaggt ctctgaccag gacctgacg	2400
acggcagggt gatgctgctg gattcgtcgc cgcccccg gcaccaggcg aaggcgcgcc	2460
	2460
<210> 21	
<211> 1865	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe 3	
<400> 21	
tcgcgactaa ggagctgacg tgacggagcc ccgtacacc gtgaccgcgc tgcccacat	60

gcgcctcccc ggctgcccgt tgcacccgcc cgaggagttg gcgcagctgc gcgagcagca	120
cccactcagc aggatggctt tccccgacgg gcacgtcggc tggctggtga ccagtcacgc	180
cctggctcgc gcggtcgtgg ccgacccccg cttcagctcg cggcacgagc tcatgcactc	240
gccgttcctt gggggccatct cggcggagag gccgccgccg gccgcgcccg gcatgttcat	300
cggcgtcgat ccgcccagc acacccgcta ccgcaagctg ctcacgggga agttcacctg	360
ccgcaggatg cgcagctcgc ccgcccgcgt cgaggagatc accgccgagc acctggacgc	420
catggagcgg cagggccccg ctgtggacct ggtgcaggcc tacgccagc ccgtccccgc	480
gctgatgatc tgcgagctgc tcggcgcttc ctacccgac agggagttct tccagcgtca	540
cgcgctggcg ctgaacaact tcgacccgt ccccgaggag cagtacccg cctacgtcgc	600
gctgcaggag tacctgcacg cgctggtcct ggccaaacgc gccaccccc cgcacgacct	660
gctcggcgat ctgcgcgcg aggagctcac gcacgaggag ctcaccaaca tcggggttct	720
gctgctgggc gccgggctcg acaccaccg caacatgctc gcgctgggca ccttcgcct	780
gctgagccac cccggccagc tcgccgcctt gcgcgccgac ccgggcctcg ccgaccaggc	840
cgtcgaggag ctgctgcgtt acctgagcat caccacacc gggatacggg ccgactgga	900
ggatgtcgag ctgaacggtc acgtgatcaa agcgggggag agcgtcgccc tctcggcgca	960
ggcggccaac cgcgaccctg agcgcttcgc cgaccccgac actctcgacc tgcaccgtca	1020
ggccaccgga catctgagct tcggtcacgg cgctcaccag tgcctcgcc agcagctggc	1080
ccgcgtggag atgcgcgtcg ccttccccg gctggtcacc cgtttccga cgctcggct	1140
ggccatatcc tcagcagagg tgccgtcgc caccaattcc gacatctac gcgtgcaccg	1200
gctcccggtc gcgtgggaca aggagtagcc gatggaactc gaagtggatt ctagtgagct	1260
cggtaccagc ccgacccgag cacgcgccgg cacgcctggt cgatgtcgga ccgagttcg	1320
aggtacgcgg cttgcaggtc caggaagggg acgtccatgc gagtgtccgt tcgagtggcg	1380
gcttgcgccc gatgctagtc gcggttgatc ggcatcgca ggtgcacgcg gtcgatcttg	1440
acggctggcg agaggtgcgg ggaggatctg accgacgcgg tccacacgtg gcaccgcgat	1500
gctgttgtgg gcacaatcgt gccggttggt aggatcctct agtttcaata agtttcaaga	1560
ggttatttca ctcatggcta tcaactggcat ctttttcggc agcgacaccg gtaataccga	1620
aaatatcgca aaaatgattc aaaaacagct tggtaaagac gttgccgatg tccatgacat	1680
tgcaaaaagc agcaagaag atctggaagc ttatgacatt ctgctgctgg gcatcccaac	1740
ctggtattac ggcaagcgc agtgtgactg ggatgacttc ttcccgaact tcgaagagat	1800
tgatttcaac ggcaactgg ttgcgctgtt tggttgtggt gaccaggaag attacgccga	1860
atatt	1865