(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0026690
(43) 공개일자 2017년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0071 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0120213
(22) 출원일자 2015년08월26일
심사청구일자 2015년08월26일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김응수
서울특별시 강남구 언주로30길 26 G동 5006호 (도곡동,삼성타워팰리스)
우민우
인천광역시 남동구 만수로75번길 21 1009호 (만수동,태화상가아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

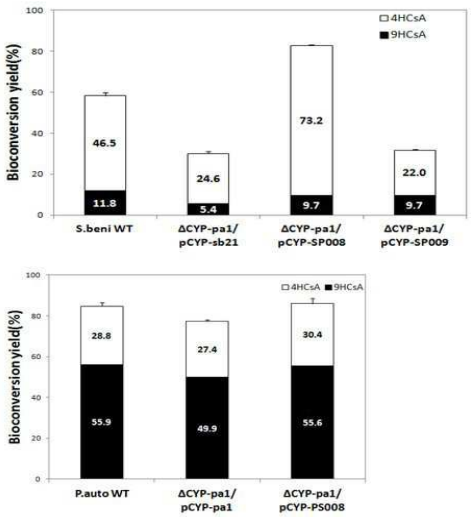
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **도메인 치환된 사이클로스포린 특이적인 하이브리드 수산화효소**

(57) 요 약

본 발명은 도메인 치환된 사이클로스포린 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것으로, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 사이클로스포린 A를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도3d



(52) CPC특허분류
C12P 21/00 (2013.01)
(72) 발명자
이보람
서울특별시 강남구 양재대로55길 10 103동 417호 (일원동,도시개발아파트)
나희주
서울특별시 강서구 방화대로49길 6-16 501호 (방화동,중앙하이빌)
최시선
인천광역시 부평구 부흥로 246 36동 407호 (부평동,동아2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395041234
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 신규 폴리엔 화합물 NPP 및 이의 유도체 생산
기 여 율 1/2
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345211630
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌연구네트워크지원
연구과제명 방선균 유전체공학을 이용한 면역억제 및 항암제 폴리케타이드 후보물질 토토마이세틴의 위치특이적 재설계
기 여 율 1/2
주관기관 인하대학교
연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 136번째 내지 225번째 아미노산으로 이루어진 도메인이 CsA 수산화반응의 위치-선택성(regio-selectivity)을 결정하는 것을 특징으로 하는 하이브리드 수산화효소.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 2의 135번째 내지 219번째 아미노산으로 이루어진 도메인이 CsA 수산화반응의 위치-선택성(regio-selectivity)을 결정하는 것을 특징으로 하는 하이브리드 수산화효소.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수산화효소는 CsA를 γ-하이드록시-N-메틸-L-Leu4-CsA(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA; 4HCsA) 또는 γ-하이드록시-N-메틸-L-Leu9-CsA(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA; 9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 하이브리드 수산화효소.

청구항 5

제1항의 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및

상기 형질전환된 세포를 배양하여 CsA를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 세포는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)인 것을 특징으로 하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 CsA 생전환(bioconversion)은 CsA를 γ-하이드록시-N-메틸-L-Leu4-CsA(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA; 4HCsA) 또는 γ-하이드록시-N-메틸-L-Leu9-CsA(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA; 9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 도메인 치환된 사이클로스포린 특이적인 하이브리드 수산화효소에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 박테리아의 사이토크롬 P450 수산화효소(Cytochrome P450 hydroxylase, CYP)는 힘(heme)-함유 모노옥시게네이

즈(monooxygenases)의 슈퍼패밀리에 속하며, 스테로이드, 지방산, 폴리케타이드 및 난분해성 화합물과 같은 천연물의 생전환을 포함하여 많은 형태의 반응을 촉매한다. 박테리아의 CYP는 CYP-결합된 산소 분자로부터 한 개의 산소 원자와, NAD(P)H로부터 한 개의 수소 원자를 함께 전달하는 것으로 알려져 있는데, NAD(P)H는 페레독신(ferredoxin; FD)-페레독신 환원효소(ferredoxin reductase; FDR) 전자 전달 시스템에 의해 재생된다. CYPs의 우수한 위치-(regio-) 및 입체(stereo-) 선택성으로 인해 CYPs의 촉매능은 매우 매력적인데, 이를 토대로 CYP-유래 생전환 공정에 의한 합성 화합물 뿐만 아니라 구조적으로 다양한 천연물의 수산화와 같은 다양한 생물공학적 적용 가능성이 예상된다.

[0003] 다양한 방선균에서 발견된 여러 CYPs는 약리학적으로 유용한 2차 대사산물을 생산하는데 사용되고 있다. 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)로 명명된 희소 방선균에서 발견된 CYPs는 2차 대사산물의 특정 위치에 하이드록실기를 도입하는 것으로 알려져 있다. 톨리포클라디움 인플라텀(*Tolypocladium inflatum*)으로부터 생산된 사이클로스포린 A(cyclosporine A; CsA)가 그 중 하나이며, 이는 4번째 아미노산인 메틸 류신(methyl leucine)에 하이드록실기가 도입된다(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA, 4HCsA). 또한, *S. benihana* CYP는 CsA의 9번째 메틸 류신(methyl leucine)에 하이드록실기를 도입하기도 하지만(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA, 9HCsA), 4번째 아미노산 위치에 하이드록실기를 붙이는 것을 더 선호한다. 또한, 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)로 명명된 다른 방선균은 4번째 또는 9번째 메틸 류신에 하이드록실기를 도입하지만, *P. autotrophica*는 9번째 메틸 류신 위치를 선호한다. 흥미롭게도, 면역억제제인 CsA의 4번째 또는 9번째 위치에 수산화된 형태는 면역억제 기능이 상당히 감소하는 것으로 나타나는 반면, CsA의 부작용인 모발 성장 촉진 효과는 남아있게 된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2013-0081394(2013.07.17 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 사이클로스포린 A(cyclosporine A, CsA) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)를 제공하는 데에 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 하이브리드 수산화효소를 이용하여 CsA를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase)를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 CsA를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 도메인 치환된 사이클로스포린 특이적인 하이브리드 수산화효소에 관한 것으로서, 사이클로스포린 A(cyclosporine A; CsA)를 구성하는 11개의 아미노산 중 4번째 또는 9번째 아미노산인 메틸 류신의 위치 특이적 수산화반응(hydroxylation)에 있어, 위치 선택성에 영향을 미치는 도메인을 파악함으로써, CsA 위치-선택적 수산화반응을 생물공학적으로 적용하여, 이를 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a는 CYP-sb21 및 CYP-pa1 간의 아미노산 서열 비교 결과를 나타내고, 도 1b는 In-Fusion 클로닝 방법에 의한 하이브리드 유전자의 구축방법에 대해 나타내며, 도 1c는 하이브리드 CYP 유전자 구조체의 모식도를 나타낸

다.

도 2a 및 도 2b는 *P. autotrophica* 야생형 및 *P. autotrophica* 재조합 균주에서의 CsA 생전환 HPLC 프로파일을 나타낸다. 도 2c는 *P. autotrophica* 야생형 및 *P. autotrophica* 재조합 균주에서의 생전환 효율을 나타낸다.

도 3a는 CYP-sb21 및 CYP-pa1의 2번째 도메인에 대한 아미노산 비교 결과를 나타낸다. 치환 잔기는 박스로 표시하였다. 도 3b 및 도 3c는 *P. autotrophica* 야생형 및 *P. autotrophica* 재조합 균주에서의 CsA 생전환 HPLC 프로파일을 나타낸다. 도 3d는 *P. autotrophica* 야생형 및 *P. autotrophica* 재조합 균주에서의 생전환 수율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이전에, 본 발명자들은 두 개의 CsA-특이적 CYPs를 밝혀냈다. CsA의 4번째 메틸 류신에 하이드록실기를 선택적으로 도입하는 *S. benihana* CYP-sb21 및 CsA의 9번째 메틸 류신을 선호하는 *P. autotrophica* CYP-pa1. 다른 선호도를 갖는 상기 2개의 CYP 유전자에서 어떤 도메인이 위치-선택성에 영향을 미치는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 2개의 CYP 유전자들을 4개의 도메인으로 분할하였고, 상호 간의 도메인 치환(domain swapping)을 통해 하이브리드 CYP 유전자를 구축하였다. 그 후, 각각의 하이브리드 CYP를 CYP-sb21 (*S. benihana* ΔCYP-sb21) 또는 CYP-pa1 (*P. autotrophica* ΔCYP-pa1) 결핍 돌연변이에 도입하여, CsA 위치-선택성을 담당하는 도메인을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열로 이루어진 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 하이브리드 수산화효소(hydroxylase) 및 이의 기능적 동등물을 제공한다. 본 발명에서 상기 서열번호 1은 CYP-SP008로 명명되었으며, 상기 서열번호 2는 CYP-PS008로 명명되었다.

[0013] 상세하게는 상기 서열번호 1의 136번째 내지 225번째 아미노산으로 이루어진 도메인이 CsA 수산화반응의 위치-선택성(regio-selectivity)을 결정할 수 있으며, 상기 서열번호 2의 135번째 내지 219번째 아미노산으로 이루어진 도메인이 CsA 수산화반응의 위치-선택성(regio-selectivity)을 결정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 상세하게는 상기 사이클로스포린 A 특이적 수산화효소는 사이클로스포린 A를 γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA) 또는 γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 "사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA)"는 우리 몸의 T림프구가 이식된 장기에 대하여 거부반응을 일으킬 때 분비되는 활성 세포물질(cytokine)을 억제하며, 주로 인터류킨-2, 감마인터페론(gamma interferon) 등을 억제하는 용도로 사용되는 면역억제제이다.

[0016] 상기 "γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA)"는 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 4번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기가 도입된 화합물이다.

[0017] 상기 "γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)"는 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 9번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기가 도입된 화합물이다.

[0018] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 수산화효소 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 수산화효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 하이브리드 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 CsA를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.

[0020] 상세하게는 상기 세포는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상세하게는, 상기 CsA 생전환(bioconversion)은 CsA를 γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA) 또는 γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

[0022] 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.

[0023] "등가의 핵산서열"에는 상기 수산화효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다. "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 수산화효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.

[0024] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] **<실험예>**

[0029] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0030] **1. 균주, 배양 조건**

[0031] *S. benihana* KCTC 9610 및 *P. autotrophica* KCTC9441은 한국세포주은행(Korean Collection for Type Cultures; KCTC, Korea)으로부터 구입하였다. *S. benihana* 야생형 및 *S. benihana* 돌연변이 균주는 GSMY 배지로 30℃에서 배양하였고, *P. autotrophica* 야생형 및 *P. autotrophica* 돌연변이 균주는 ISP2 배지로 30℃에서 배양하였다. *E. coli* 균주는 루리아 액체 또는 아가 배지로 37℃에서 배양하였다. 모든 박테리아 균주는 적절한 항생제를 포함하여 배양하였다. *E. coli* ET12567/pUZ8002는 *E. coli-Streptomyces* 접합을 위한 공여 균주로 사용되었다.

[0032] **2. 아미노산 서열 비교 및 3D 구조 모델링**

[0033] CYP-sb21 및 CYP-pa1의 아미노산 서열은 EMBL-EBI의 ClustalW2를 사용하여 비교하였다. 단백질 모델링을 하기 위해서, CYP-sb21 및 CYP-pa1에 대응하는 *P. autotrophica* 비타민 D3 수산화효소 CYP 주형을 SWISS-MODEL의 Automated Model로 검색하였다. CYP-sb21 및 CYP-pa1의 3D 구조 모델은 상기 주형을 사용하여 제작하였다.

[0034] **3. In-Fusion 클로닝 방법을 통한 돌연변이 유전자 구축**

[0035] 모든 하이브리드 유전자는 In-Fusion HD Cloning kit (Clontech, CA, USA)을 사용하여 구축하였다. 선형화된 벡터는 제한효소 (*Bam*HI, *Xba*I)를 사용하여 제작하였고, DNA 단편은 PCR을 통해 제작하였다. 선형화된 벡터 및 DNA 단편은 In-Fusion 효소에 의해 융합되었다. PCR은 이전에 보고한 조건에 따라 수행하였다(J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 41: 879-886). 모든 PCR 산물은 1% 아가로스 상에서의 젤 전기영동 및 DNA extraction kit (Cosmo genetech, Seoul, Korea)에 의해 정제되었다. 돌연변이 CYP 유전자를 만들기 위한 프라이머 및 주형 DNA는 표 1에 나타냈으며, 프라이머 서열은 표 2에 나타냈다.

표 1

[0036]

Mutant CYP gene	Fragment	Primer	Template DNA
CYP-SP001	upstream	ermE-F, PS1-R	pCYP-pa1

	downstream	SP1-F, M13-F	pCYP-sb21
CYP-SP002	upstream	ermE-F, PS2-R	pCYP-PS001
	downstream	SP2-F, M13-F	pCYP-sb21
CYP-SP003	upstream	ermE-F, SP2-R	pCYP-sb21
	downstream	PS2-F, M13-F	pCYP-PS004
CYP-SP004	upstream	ermE-F, SP3-R	pCYP-sb21
	downstream	PS3-F, M13-F	pCYP-pa1
CYP-SP005	upstream	ermE-F, PS2-R	pCYP-pa1
	downstream	SP2-F, M13-F	pCYP-sb21
CYP-SP006	upstream	ermE-F, SP2-R	pCYP-SP001
	downstream	PS2-F, M13-F	pCYP-SP003
CYP-SP007	upstream	ermE-F, SP2-R	pCYP-SP001
	downstream	SP2-F, M13-F	pCYP-SP004
CYP-SP008	upstream	ermE-F, SP1-R	pCYP-sb21
	downstream	SP4-F, M13-F	pCYP-sb21
CYP-SP009	upstream	ermE-F, SP4-R	pCYP-sb21
	downstream	SP5-F, M13-F	pCYP-sb21
CYP-PS001	upstream	ermE-F, SP1-R	pCYP-sb21
	downstream	PS1-F, M13-F	pCYP-pa1
CYP-PS002	upstream	ermE-F, SP2-R	pCYP-SP001
	downstream	PS2-F, M13-F	pCYP-pa1
CYP-PS003	upstream	ermE-F, PS2-R	pCYP-pa1
	downstream	SP2-F, M13-F	pCYP-SP004
CYP-PS004	upstream	ermE-F, PS3-R	pCYP-pa1
	downstream	SP3-F, M13-F	pCYP-sb21
CYP-PS005	upstream	ermE-F, SP2-R	pCYP-sb21
	downstream	PS2-F, M13-F	pCYP-pa1
CYP-PS006	upstream	ermE-F, PS2-R	pCYP-PS001
	downstream	SP2-F, M13-F	pCYP-PS003
CYP-PS007	upstream	ermE-F, PS2-R	pCYP-PS001
	downstream	PS2-F, M13-F	pCYP-PS004
CYP-PS008	upstream	ermE-F, PS1-R	pCYP-pa1
	downstream	PS2-F, M13-F	pCYP-pa1
CYP-PS009	upstream	ermE-F, PS4-R	pCYP-pa1
	downstream	PS5-F, M13-F	pCYP-pa1

표 2

[0037]

Primer	Sequence (5'-3')
ermE-F	TCGTGCCGGTTGGTAGGATC
SP1-F	GCGCTGCCGGGCGACCGC
SP2-F	GACGACGACGGCGACCGCTTC
SP3-F	TTCACCCAGTTCCGGTACCCGACCGTCGACGTGGAGCTCGGTGGC
SP4-F	GCCGCCGGGGCCGGTGGCGCGCCGGTGGACCTGGTCGAGGAGTAC
SP5-F	CGGACCGGGCCCGCGCTGCGGGCGGCGATCGCCCACATCCACGACCTGATCCCC
PS1-F	GAGGTCGCCGCCGCCGGG
PS2-F	GACGACGACGGCGACCGCCTC
PS3-F	GGCACCAGGGTCCGCTACGCGGCCGAGGACGTCGAGCTGGGCGGC
PS4-F	GCGCTGCCGGGCGACCGCGTCGTGGACCTGGTGGAGGCG
PS5-F	GCCATGGCCGAACCTGTGATCAGCATGGTCGACTACGTGCACGCCCTCGTCGAC
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT
SP1-R	ACCGGCCCCGGCGGCGGCGACCTCGTCGAGCAGCCTGCCACT
SP2-R	GTCGCCGTCGTCGTCGTG
SP3-R	CTCGGCCGCGTAGCGGAC
SP4-R	CGCGGGCCCGGTCCGCTCGCGGTCCATCGTGGTCAGCACCGCGCCCCACTCGCGCCA
PS1-R	GCGGTCGCCCGGCAGCGCGTCGAGCAGGGCGGCGGT
PS2-R	GTCGCCGTCGTCGTCCTG

PS3-R	GACGGTCGGGTACCGGAA
PS4-R	AGGTTCGGCCATGGCGCCAGGTGACAGAGACACCATCTTCCGCTCCCCATTCGTGCC

[0038] **4. CsA 및 이의 유도체들에 대한 생전환 분석 및 HPLC 분석**

[0039] 모든 방선균 균주들은 30 ml GSMY broth로 30℃에서 72시간 동안 배양하였다. 그 후, CsA(50 mg/l)를 배양 배지에 기질로서 첨가하였다. 48시간 동안 추가적으로 배양한 후, 8 ml의 배양액을 샘플링하였다. 각각 8 ml의 배양액을 동량의 에틸 아세테이트로 추출하였고, 혼합된 유기층은 회전 증발 농축하여 건조시켰다. 최종 잔여물은 0.7 ml 메탄올에 용해시켰다. 샘플들은 이전에 보고된 조건으로 분석하였다(J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 41: 879-886).

[0040] **<실시예 1> CsA-특이적 CYPs 간의 아미노산 서열 비교 및 도메인 치환(domain swapping)**

[0041] CYP-sb21 및 CYP-pa1 도메인을 4개로 분할할 수 있는 위치를 선별하기 위해서, 본 발명자들은 2개의 CsA-특이적 CYP 아미노산 서열을 비교하였다(도 1A). 아미노산 서열을 비교한 결과, 55% 유사성을 나타냈다. 이에 본 발명자들은 대조군과 비교시 더 많은 차이를 보이는 서열이나 아미노산이 삽입된 서열을 선택하였다. Swiss-model에 있어서, *P. autotrophica*에서 밝혀진 비타민 D3 수산화효소를 주형 CYP로 선택하기 위해 3D 구조가 알려진 다른 CYPs와 상기 2개의 CYPs의 유사성을 비교하였다. 비타민 D3 수산화효소 주형과 상기 2 개의 CYPs의 예상 3D 구조를 비교한 결과, CYP-sb21 및 CYP-pa1 유전자는 4개로 세분되었다. CYP-sb21 유전자는 1-135, 136-225, 226-301 및 302-410으로 나누어졌고, CYP-pa1 유전자는 1-134, 135-228, 229-304 및 305-412로 나누어졌다(도 1A).

[0042] CsA의 수산화반응 과정에서 특정 도메인이 위치-선택성에 영향을 미치는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 2개의 CYP 유전자들의 4개 도메인을 치환하였다. In-fusion 클로닝 방법을 사용하여(도 1B), 방선균 유전체 삽입 pMMBL005 벡터에 총 14개의 하이브리드 CYP 유전자를 만들었고, 각각 CYP-SP001 ~ CYP-SP007 및 CYP-PS001 ~ CYP-PS007로 명명하였다(도 1C). 도메인의 치환을 확인하기 위해서, 각 하이브리드 CYP 서열을 분석하였다. CsA가 하이브리드 CYP에 의해 수산화되는지 확인하기 위해서, *E. coli*-actinomycetes 종간 접합 방법을 사용하여 각각의 하이브리드 CYP 유전자들을 *S. benihana* ΔCYP-sb21 또는 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1에 도입하였다.

[0043] **<실시예 2> 하이브리드 CYPs에 의한 CsA 수산화반응**

[0044] 야생형 CYP 및 하이브리드 CYPs 간의 수산화반응에 대한 위치-선택성에 변화가 있는지 확인하기 위해서, *S. benihana* 및 *P. autotrophica* 야생형 균주와 함께 재조합 균주들의 CsA 생전환에 대해 시험하였다. 재조합 *S. benihana* ΔCYP-sb21 균주의 생전환율은 위치-선택성을 비교하기에는 모두 너무 낮아서, *S. benihana* ΔCYP-sb21는 하이브리드 CYP 생전환 분석에 있어서는 적합하지 않은 숙주라고 결론을 내렸다. 흥미롭게도, 재조합 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1 균주의 경우에는, 2개의 재조합 균주(*P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-SP007 및 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-PS002)에서 상당한 생전환 활성을 나타냈다(도 2A 및 도 2B). *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-SP007에 있어서는, 9HCsA/4HCsA의 비율이 1.6이었는데, 이는 대조군인 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-pa1의 위치-선택도와 비슷한 수준이었다(도 2C). 반면, *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-pPS002는 9HCsA/4HCsA의 비율이 4.3이었는데, 이는 CYP-pa1에 비해 9HCsA를 더 선호한다고 볼 수 있다(도 2C). 상기 결과는 9HCsA로의 CsA 위치-특이적 수산화반응에 CYP-pa1의 2번째 도메인 (135 - 228)이 중요한 부위라는 것을 나타낸다.

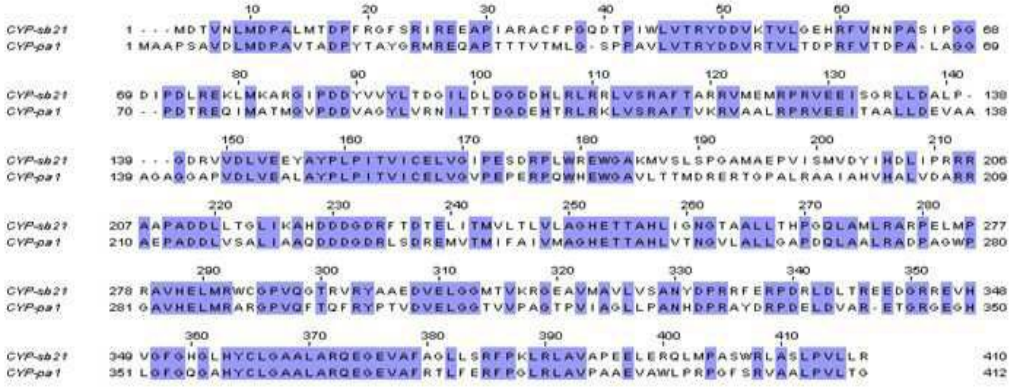
[0045] **<실시예 3> 2번째 도메인에서의 위치-선택적 부위 확인**

[0046] 2번째 도메인 (135 - 228)에 있어서 어떤 부분이 위치-선택성에 영향을 미치는지 확인하기 위해서, CYP-sb21 및 CYP-pa1의 2번째 도메인에 대한 아미노산 서열을 비교하였다. 비교 후, 가장 큰 차이를 보이는 두 부분을 선택하였다(도 3A). 본 발명자들은 CYP-sb21 및 CYP-pa1의 선택된 두 부분을 치환하여 추가적으로 4개의 하이브리드 CYP를 더 제작하였고, 각각을 CYP-SP008, CYP-SP009, CYP-PS008 및 CYP-PS009로 명명하였다. 각각의 하이브리드 CYP 유전자에 의해 CsA가 수산화되는지 알아보기 위해서, 하이브리드 CYP 유전자 구조체는 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1로 도입되었고, 생전환 분석을 수행하였다. *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-SP009 및 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-PS008에 있어서는, 생전환 및 위치-선택성에 큰 차이를 나타내지 않았다(도 3B 및 도 3C). 반면, *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-SP008은 *P. autotrophica* ΔCYP-pa1/pCYP-sb21 보다 약 52%가 더 생전환되었으며, 4HCsA/9HCsA의 비율은 7.5였다(도 3B 및 도 3C). *S. benihana* 야생형과 비교시, 9HCsA 보다 4HCsA가 약 27% 정도 더 생전환되었는데, 이는 CsA가 4HCsA로 생전환되는데 있어 CYP-sb21의 2번째 도메인 (136-138 of CYP-sb21)이 영향을 미치는 것으로 확인되었다(도 3D).

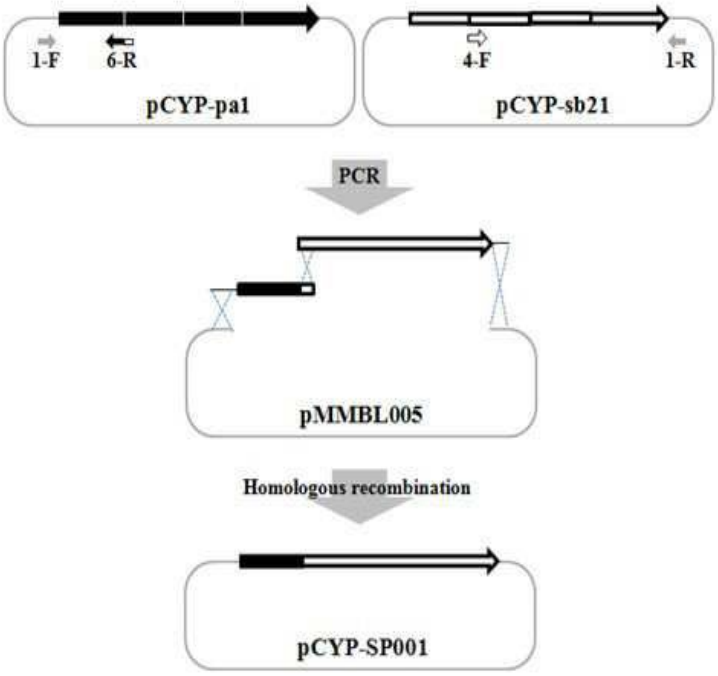
[0047] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

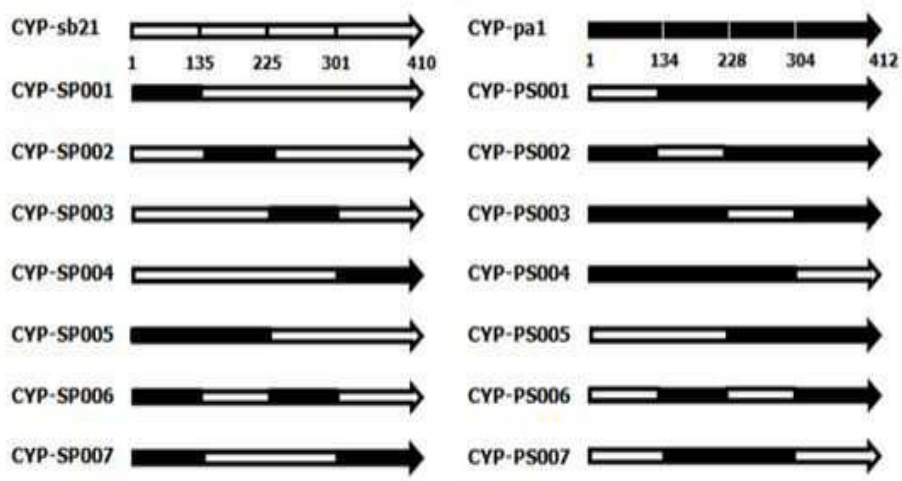
도면1a



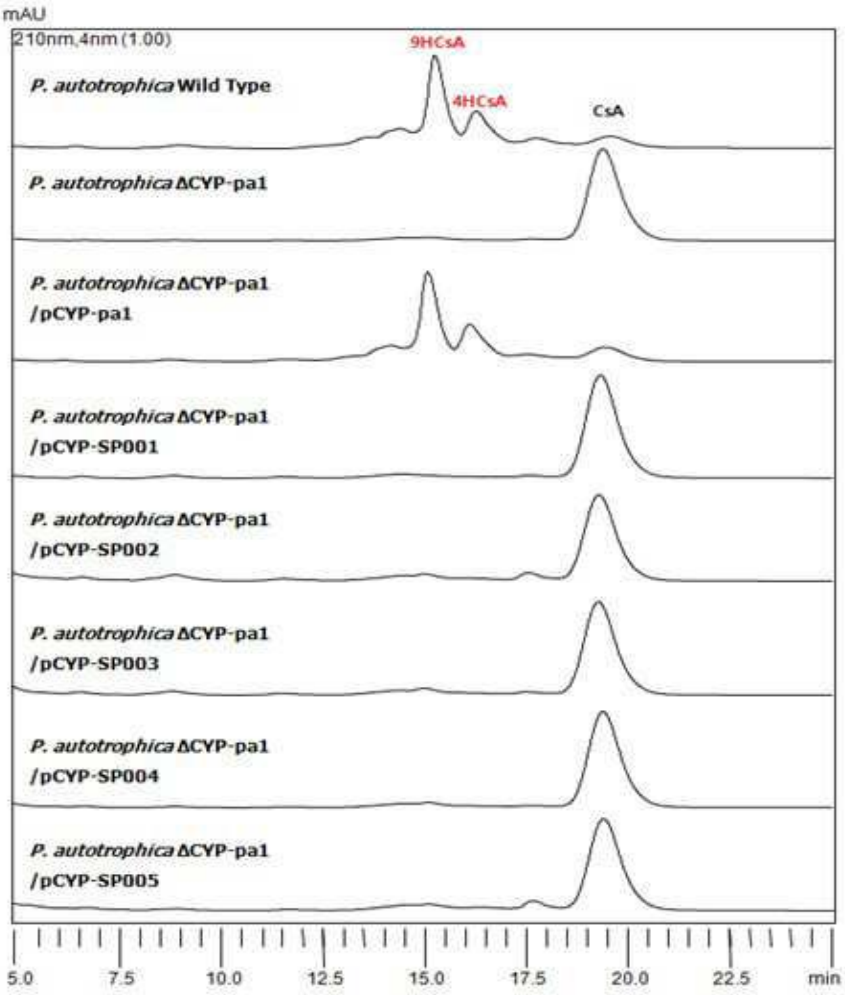
도면1b



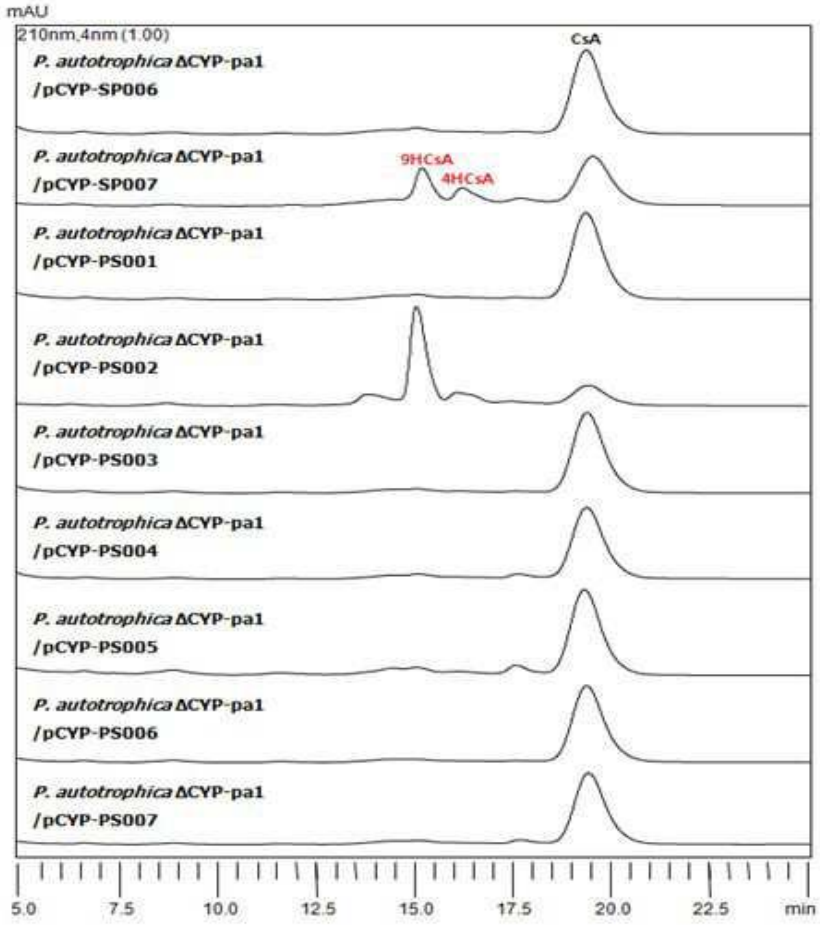
도면1c


CYP-sb21
1
135
225
301
410
CYP-pa1
1
134
228
304
412
CYP-SP001
CYP-SP002
CYP-SP003
CYP-SP004
CYP-SP005
CYP-SP006
CYP-SP007
CYP-PS001
CYP-PS002
CYP-PS003
CYP-PS004
CYP-PS005
CYP-PS006
CYP-PS007

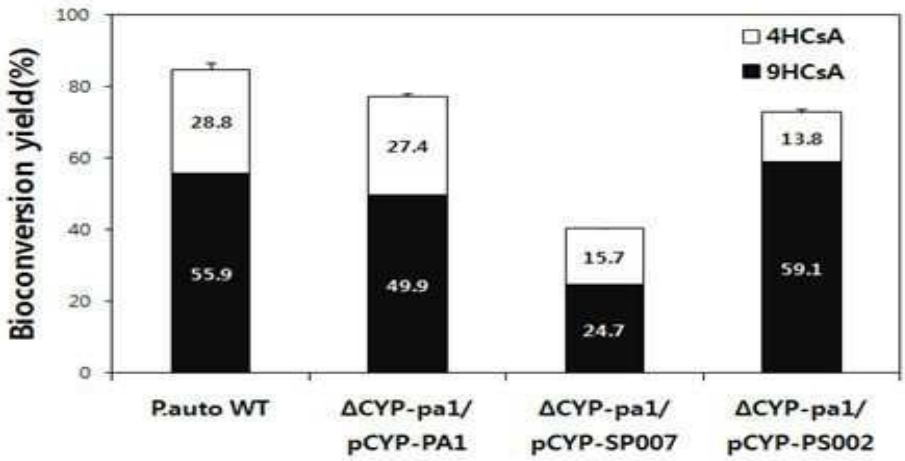
도면2a


mAU
210nm,4nm (1.00)
9HCsA
4HCsA
CsA
P. autotrophica Wild Type
P. autotrophica ΔCYP-pa1
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-pa1
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP001
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP002
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP003
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP004
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP005
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
min

도면2b


mAU
210nm,4nm (1.00)
CsA
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP006
9HCsA
4HCsA
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-SP007
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS001
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS002
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS003
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS004
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS005
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS006
P. autotrophica ΔCYP-pa1 /pCYP-PS007
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
min

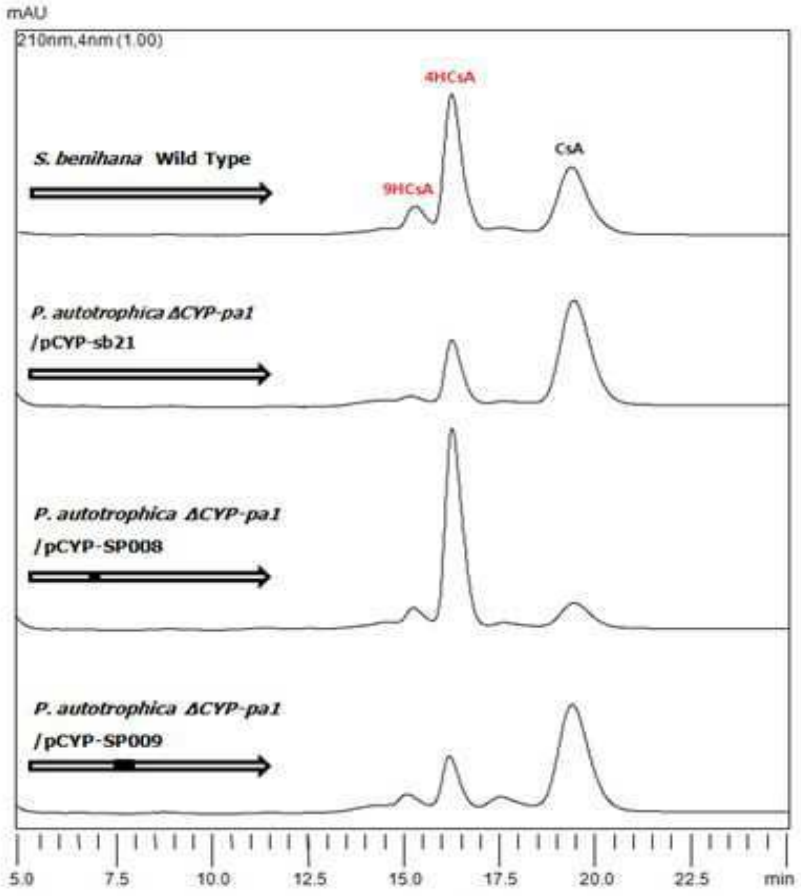
도면2c


Bioconversion yield(%)
100
80
60
40
20
0
4HCsA
9HCsA
28.8
55.9
27.4
49.9
15.7
24.7
13.8
59.1
P.auto WT
ΔCYP-pa1/ pCYP-PA1
ΔCYP-pa1/ pCYP-SP007
ΔCYP-pa1/ pCYP-PS002

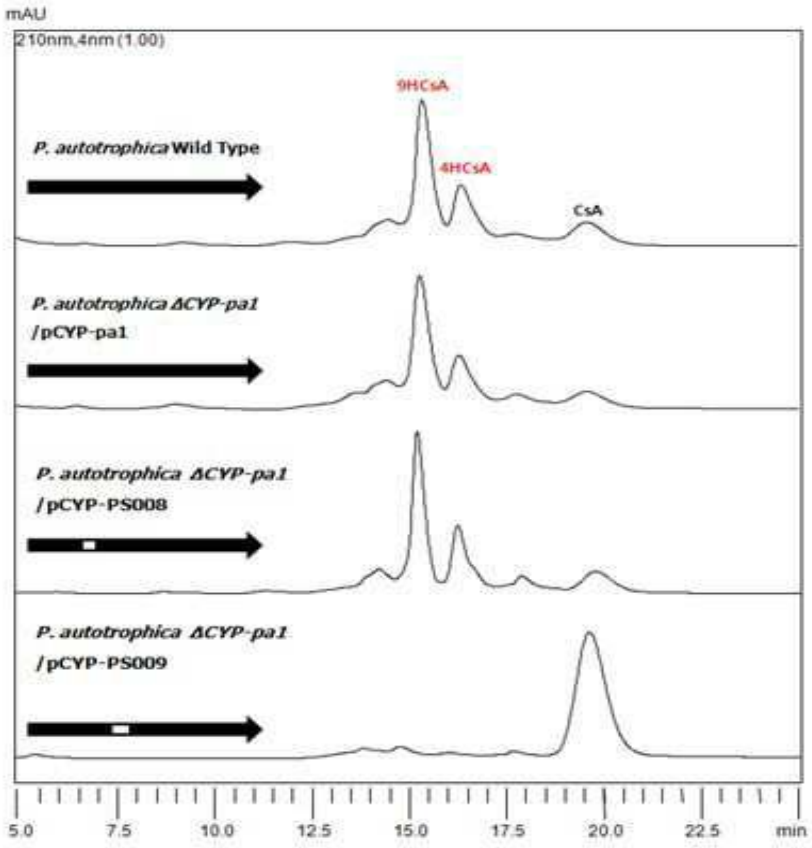
도면3a


CYP-sb21
CYP-pa1

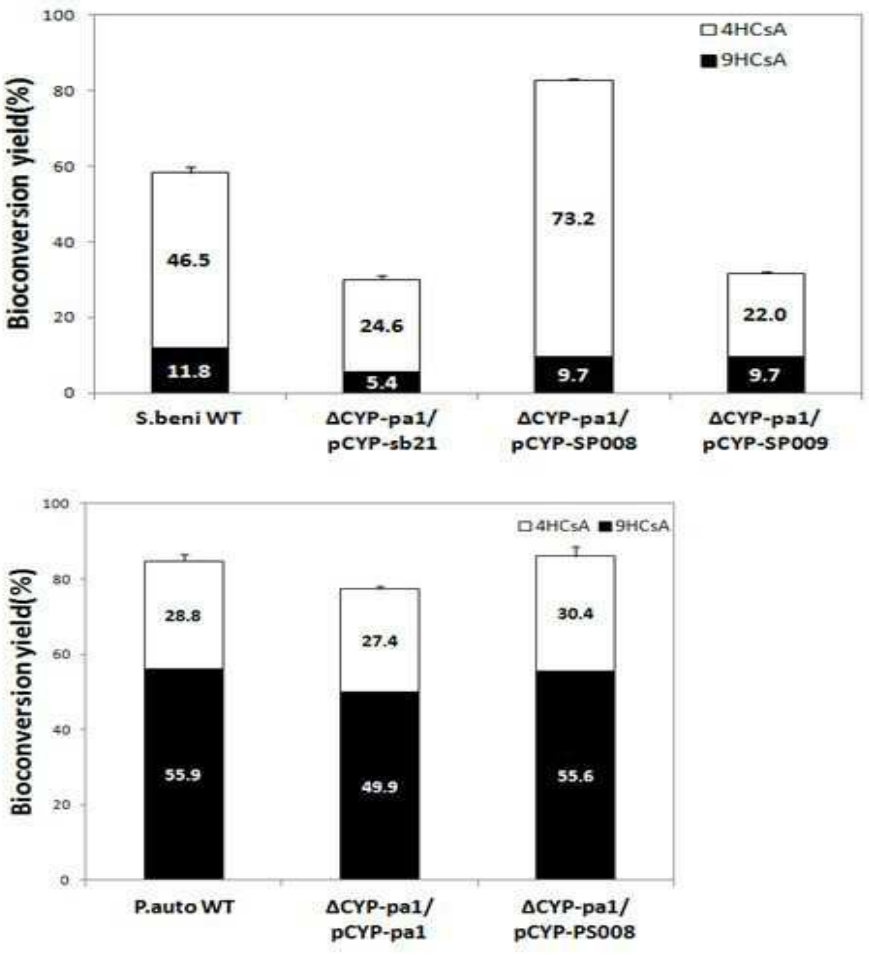
도면3b


mAU
210nm,4nm (1.00)
4HCsA
CsA
9HCsA
S. benihana Wild Type
P. autotrophica ΔCYP-pa1
/pCYP-sb21
P. autotrophica ΔCYP-pa1
/pCYP-SP008
P. autotrophica ΔCYP-pa1
/pCYP-SP009
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
min

도면3c


mAU
210nm,4nm (1.00)
9HCsA
4HCsA
CsA
P. autotrophica Wild Type
P. autotrophica ΔCYP-pa1
/pCYP-pa1
P. autotrophica ΔCYP-pa1
/pCYP-PS008
P. autotrophica ΔCYP-pa1
/pCYP-PS009
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
min

도면3d



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Novel cyclosporin specific hybrid hydroxylase constructed by domain swapping

<130> ADP-2015-0221

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 414

<212> PRT

<213> Sebekia benihana, Pseudonocardia autotrophica

<400> 1

Met Asp Thr Val Asn Leu Met Asp Pro Ala Leu Met Thr Asp Pro Phe
1 5 10 15

Arg Gly Phe Ser Arg Ile Arg Glu Glu Ala Pro Ile Ala Arg Ala Cys

20 25 30

Phe Pro Gly Gln Asp Thr Pro Ile Trp Leu Val Thr Arg Tyr Asp Asp

35 40 45

Val Lys Thr Val Leu Gly Glu His Arg Phe Val Asn Asn Pro Ala Ser

50 55 60

Ile Pro Gly Gly Asp Ile Pro Asp Leu Arg Glu Lys Leu Met Lys Ala

65 70 75 80

Arg Gly Ile Pro Asp Asp Tyr Val Val Tyr Leu Thr Asp Gly Ile Leu

85 90 95

Asp Leu Asp Gly Asp Asp His Leu Arg Leu Arg Arg Leu Val Ser Arg

100 105 110

Ala Phe Thr Ala Arg Arg Val Met Glu Met Arg Pro Arg Val Glu Glu

115 120 125

Ile Ser Gly Arg Leu Leu Asp Glu Val Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asp

130 135 140

Arg Val Val Asp Leu Val Glu Glu Tyr Ala Tyr Pro Leu Pro Ile Thr

145 150 155 160

Val Ile Cys Glu Leu Val Gly Ile Pro Glu Ser Asp Arg Pro Leu Trp

165 170 175

Arg Glu Trp Gly Ala Lys Met Val Ser Leu Ser Pro Gly Ala Met Ala

180 185 190

Glu Pro Val Ile Ser Met Val Asp Tyr Ile His Asp Leu Ile Pro Arg

195 200 205

Arg Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asp Leu Leu Thr Gly Leu Ile Lys Ala

210 215 220

His Asp Asp Asp Gly Asp Arg Phe Thr Asp Thr Glu Leu Ile Thr Met

225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Val Leu Ala Gly His Glu Thr Thr Ala His Leu Ile

245 250 255

Gly Asn Gly Thr Ala Ala Leu Leu Thr His Pro Gly Gln Leu Ala Met

260 265 270

Leu Arg Ala Arg Pro Glu Leu Met Pro Arg Ala Val His Glu Leu Met

275 280 285

Arg Trp Cys Gly Pro Val Gln Gly Thr Arg Val Arg Tyr Ala Ala Glu

290 295 300

Asp Val Glu Leu Gly Gly Met Thr Val Lys Arg Gly Glu Ala Val Met

305 310 315 320

Ala Val Leu Val Ser Ala Asn Tyr Asp Pro Arg Arg Phe Glu Arg Pro

325 330 335

Asp Arg Leu Asp Leu Thr Arg Glu Glu Asp Gly Arg Arg Glu Val His

340 345 350

Val Gly Phe Gly His Gly Leu His Tyr Cys Leu Gly Ala Ala Leu Ala

355 360 365

Arg Gln Glu Gly Glu Val Ala Phe Ala Gly Leu Leu Ser Arg Phe Pro

370 375 380

Lys Leu Arg Leu Ala Val Ala Pro Glu Glu Leu Glu Arg Gln Leu Met

385 390 395 400

Pro Ala Ser Trp Arg Leu Ala Ser Leu Pro Val Leu Leu Arg

405 410

<210> 2

<211> 407

<212> PRT

<213> Sebekia benihana, Pseudonocardia autotrophica

<400> 2

Met Ala Ala Pro Ser Ala Val Asp Leu Met Asp Pro Ala Val Thr Ala

1 5 10 15

Asp Pro Tyr Thr Ala Tyr Gly Arg Met Arg Glu Gln Ala Pro Thr Thr

20 25 30

Thr Val Thr Met Leu Gly Ser Pro Pro Ala Val Leu Val Thr Arg Tyr

35 40 45

Asp Asp Val Arg Thr Val Leu Thr Asp Pro Arg Phe Val Thr Asp Pro

50 55 60

Ala Leu Ala Gly Gly Pro Asp Thr Arg Glu Gln Ile Met Ala Thr Met
65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Asp Val Ala Gly Tyr Leu Val Arg Asn Ile Leu Thr
85 90 95

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

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

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

305 310 315 320

Asn His Asp Pro Arg Ala Tyr Asp Arg Pro Asp Glu Leu Asp Val Ala

325 330 335

Arg Glu Thr Gly Arg Gly Glu Gly His Leu Gly Phe Gly Gln Gly Ala

340 345 350

His Tyr Cys Leu Gly Ala Ala Leu Ala Arg Gln Glu Gly Glu Val Ala

355 360 365

Phe Arg Thr Leu Phe Glu Arg Phe Pro Gly Leu Arg Leu Ala Val Pro

370 375 380

Ala Ala Glu Val Ala Trp Leu Pro Arg Pro Gly Phe Ser Arg Val Ala

385 390 395 400

Ala Leu Pro Val Leu Thr Gly

405

<210> 3

<211> 1245

<212> DNA

<213> Sebekia benihana, Pseudonocardia autotrophica

<400> 3

atggacaccg tcaacctgat ggatcccgca ctgatgaccg acccccttcag gggcttctca 60

cgaatcaggg aggaggcgcc catcgcgcgc gcctgcttcc ccggtcagga cacacccatc 120

tggctggtca cccggtacga cgacgtcaag accgtgctgg gcgagcaccg cttcgtcaac 180

aatccggcct ccattcccgg cggcgacatc cccgacctgc gcgagaagct catgaaggcg 240

cgcgggatcc ccgacgacta cgtcgtctac ctcaccgacg gcatcctcga cctcgacggc 300

gatgaccacc tcaggctgcg ccgactcgtc tcgcgggcct tcaccgccag gcgcgtcatg 360

gagatgcgtc cgcgggtcga ggagatcagt ggcaggctgc tcgacgaggt cgccgccgcc 420

ggggccggcg accgcgtcgt ggacctggtc gaggagtacg cctacccgct gccgatcacg 480

gtcatctgcg agctcgtcgg catccccgag agcgaccgtc cgctgtggcg cgagtggggc 540

gcgaagatgg tgtctctgtc acctggcgcc atggccgaac ctgtgatcag catggtcgac 600

tacatccacg acctgatccc ccgccgccgc gccgcgcccg ccgacgacct gctcaccggg 660

ctgatcaaag cgcacgacga cgacggcgac cgcttcaccg acaccgagct gatcacgatg 720

gtgctcacgc tcgtcctggc tggacacgag accaccgccc acctgatcgg caacggcacc 780

gcggccctgc tcacccaccc cggccagctt gccatgctgc gcgcgcggcc cgagctcatg 840

ccgcgcgccg tccacgagct catgcgctgg tgcgggccgg tgcagggcac cagggtccgc 900

tacgcggccg aggacgtgga gctcggtggc atgacggtga agcggggcga ggccgtgatg 960

gccgtactgg tctcggccaa ctacgaccct cgccgcttcg agcgccccga ccggctcgac 1020

ctcacccgcg aggaggacgg caggcgcgag gtccacgtcg gcttcgggca cggcctgcac 1080

tactgcctcg gcgcggcgct ggccaggcag gagggcgagg tcgccttcgc cgggctgctc 1140

tcacgcttcc cgaagctgcg cctcgccgtc gcacccgagg agctcgaacg gcagctcatg 1200

cccgcctcgt ggcggctcgc gagccttccc gtactcctgc gctga 1245

<210> 4

<211> 1224

<212> DNA

<213> Sebekia benihana, Pseudonocardia autotrophica

<400> 4

atggccgcac cgagtgccgt ggacctgatg gacccggccg tcaccgccga cccgtacacc 60

gcctacgggc ggatgcgcga gcaggcgccc accaccaccg tgacgatgct gggcagcccg 120

cccgccgtgc tcgtcacccg ctacgacgac gtccgcacgg tcctgaccga cccgcggttc 180

gtgaccgatc cggcgctcgc cggcgggccg gacacccgcg agcagatcat ggcgacgatg 240

ggggttcccg acgacgtcgc gggctacctg gtgcgcaaca tcctcaccac cgacggcgac 300

gagcacaccc ggctgcgcaa gctcgtgtcg cgcgcgttca cggtgaagcg ggtagcggcg 360

ctgcgcccgc gggtggagga gatcaccgcc gccctgctcg acgcgctgcc gggcgcgccg 420

gtggacctgg tggaggcgct ggcctacccg ctgccgatca ccgtgatctg cgagctcgtc 480

ggggtacccg agcccgagcg cccgcagtgg cacgaatggg gagcggtgct gaccacgatg 540

gaccgcgagc ggaccgggcc cgcgctgcgg gcggcgatcg cccacgtgca cgccctcgtc 600

gacgcccgcc gggccgagcc cgccgacgac ctggtcagcg ccctgatcgc cgcccaggac 660

gacgacggcg accgcctctc ggaccgcgag atggtcacga tgatcttcgc gatcgtcatg 720

gccgggcacg agacgacggc gcacctggtc accaacggcg tgctggcgct gctgggcgcc 780

ccggaccagc tcgccgcgct gcgggccgac ccggcgggct ggccgggcgc ggtacacgag 840

ctgatgcgcg cccgcggccc ggtgcagttc acccagttcc ggtacccgac cgtcgacgtc 900

gagctgggcg gcaccgtcgt gcccgccggg accccggtca tcgccgggct gctgccggcc 960

aaccacgacc cgcgcgccta cgaccggccc gacgagctcg acgtcgcccg ggagaccggg 1020

cggggcgagg gacacctcgg gttcggacag ggcgcgcact actgcctggg cgcggcgctg 1080

gcccggcagg agggcgaggt ggccttccgg acgctgttcg aacgcttccc cggcctgcgg 1140

ctcgccgtgc cggccgcgga ggtcgcctgg ctgccccgtc ccgggttcag ccgggtggcg 1200

gcgctgccgg tgctcaccgg gtga 1224