



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0096292
(43) 공개일자 2008년10월30일

(51) Int. Cl.

C12N 15/03 (2006.01) *C12N 15/00* (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0041578

(22) 출원일자 2007년04월27일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김응수

서울 송파구 오륜동 올림픽선수촌APT 120동 501호

강승훈

경기 안산시 상록구 이동 609번지 303호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

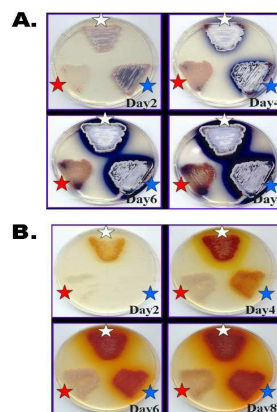
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) *wb1A* 유전자를 이용한 항생물질 고생산 균주 제조방법

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스속 미생물 항생물질 생합성 경로의 공통 억제자(global repressor)로 기능하는 유전자를 규명하고 상기 유전자를 이용한 항생물질 고생산 균주 제조방법 및 항생물질 생산을 증가시키는 물질의 스크리닝 방법을 제공하며, 보다 구체적으로 본 발명자들은 독소루비신을 생산하는 스트렙토마이세스 퍼시셔스(*S. peucetius*)의 야생형 균주 및 산업 균주 사이의 유전자 발현 양상 차이를 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*S. coelicolor*) 전체 게놈 마이크로어레이 칩을 이용하여 분석하고 특이적인 발현 차이를 보이는 유전자를 선별하고 선별된 유전자들을 상기 항생물질 생산균주 상에서 과발현시킨 다음, 상기 유전자들이 항생물질의 생산에 미치는 영향을 조사하여 스트렙토마이세스속 미생물의 항생물질 생합성 경로에서 공통 억제자로 작용하는 유전자가 *wb1A* 유전자임을 규명하였다. 본 발명이 개시한 상기 *wb1A* 유전자는 스트렙토마이세스속 미생물 중 항생물질 생산 미생물에서 항생물질 생합성 경로의 공통 억제자로 기능하므로, 상기 유전자는 항생물질 고생산 균주를 제조하거나 스트렙토마이세스속에서 생산되는 산업적으로 유용한 항생물질의 생산을 증가 또는 촉진시키는 화합물을 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

이한나

인천 연수구 옥련동 현대3차아파트 303동 602호

허윤아

서울 서초구 양재동 68-3 동서빌라 301호

지엔치안 후앙

디파트먼트 오브 제네틱스, 스탠포드 유니버시티
스쿨 오브메디슨, 스탠포드, 캘리포니아 94305

스탠리 엔, 코헨

디파트먼트 오브 제네틱스, 스탠포드 유니버시티
스쿨 오브메디슨, 스탠포드, 캘리포니아 94305

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 스트렙토마이세스속 항생물질 고생산 균주 및 이의 야생형 균주로부터 각각 전체 RNA를 수득하는 단계;
- 2) 단계 1)의 수득된 전체 RNA를 이용하여 스트렙토마이세스속 항생물질 고생산 균주와 이의 야생형 균주간의 유전자 발현 정도를 비교하는 단계;
- 3) 단계 2)의 비교된 유전자 발현 결과에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 선별하는 단계;
- 4) 단계 3)의 선별된 유전자를 스트렙토마이세스속 항생물질 생산균주에 도입하여 과발현시키는 단계;
- 5) 단계 4)의 선별된 유전자 도입되어 과발현된 균주에서 생산되는 항생물질의 양을 측정하는 단계;
- 6) 단계 5)의 측정된 항생물질 생산량을 선별된 유전자 도입전 스트렙토마이세스속 항생물질 생산 균주에서의 생산량과 비교하여 항생물질 생산경로 관련 유전자를 선별하는 단계;
- 7) 스트렙토마이세스속 항생물질 생산균주에 상기 선별된 유전자를 조작하여 돌연변이 균주를 제작하는 단계; 및
- 8) 단계 7)의 돌연변이 균주에서 항생물질 고생산 균주를 선별하는 단계를 포함하는 항생물질 고생산 스트렙토마이세스속 균주 제조방법.

청구항 2

제 2항에 있어서, 스트렙토마이세스속 미생물은 스트렙토마이세스 퍼시셔스(*Streptomyces peucetius*), 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 베네주엘라 (*Streptomyces venezuela*), 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*S. hygroscopicus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 1)의 항생물질은 독소루비신(doxorubicin), 액티노로딘(actinorhodin), 피크로마이신(picromycin), 젤다나마이신(geldanamycin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 2)는 마이크로어레이 칩을 이용하여 유전자 발현을 측정하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 마이크로어레이 칩은 *S. 코엘리칼라* 게놈 cDNA가 집적된 마이크로어레이칩인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 3)은 유전자 발현이 2배 이상 증가 또는 감소하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 단계 6)의 선별된 유전자는 *wblA*(*whiB-like* putative transcription factor gene: SC03579)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, *wblA* 유전자는 서열번호 1에 기재된 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 단계 7)의 유전자 조작 방법은 선별된 유전자의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 삽입, 치환 또는 결실인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 10

wblA 유전자가 통상의 유전자 조작기법에 의해 조작된 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 *wblA* 유전자는 서열번호 1에 기재된 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 12

제 10항에 있어서, 독소루비신 또는 액티노로딘을 고생산하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 13

제 10항에 있어서, 스트렙토마이세스속 균주는 스트렙토마이세스 퍼시셔스 또는 스트렙토마이세스 코엘리칼라인 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 14

제 10항에 있어서, 통상의 유전자 조작기법은 *wblA* 유전자의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 유전자 삽입, 치환 또는 결실인 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 15

wblA 유전자를 도입하여 형질전환된 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 *wblA* 유전자는 서열번호 1에 기재된 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 17

제 15항에 있어서, 독소루비신 또는 액티노로딘을 고생산하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 18

제 15항에 있어서, 스트렙토마이세스속 균주는 스트렙토마이세스 퍼시셔스 또는 스트렙토마이세스 코엘리칼라인 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주.

청구항 19

- 1) *wblA* 유전자를 도입하여 스트렙토마이세스속 균주에서 과발현시키는 단계;
- 2) 단계 1)의 균주에 피검화합물을 처리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 피검화합물을 처리한 스트렙토마이세스속 균주의 항생물질 생산을 측정하는 단계;
- 4) 단계 3)의 측정 결과를 피검화합물 처리 전 스트렙토마이세스속 균주의 항생물질 생산 측정과 비교하여 항생물질 생산 증가 효과를 가지는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 항생물질 생산증가 화합물 스크리닝 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 단계 1)의 *wblA* 유전자는 서열번호 1에 기재된 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 21

제 19항에 있어서, 단계 1)의 스트렙토마이세스속 균주는 스트렙토마이세스 퍼시셔스 또는 스트렙토마이세스 코엘리칼라인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 22

제 19항에 있어서, 단계 2)의 피검화합물은 인공화합물 또는 천연화합물 또는 이들의 유도체인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 23

제 19항에 있어서, 단계 3)의 항생물질은 독소루비신 또는 액티노로딘인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <43> 본 발명은 마이크로어레이 칩을 이용하여 항생물질 생산 경로에 영향을 미치는 유전자를 선별하고, 상기 선별된 유전자를 통상의 유전자 조작기법을 이용하여 조작함으로써 제조되는 항생물질 고생산 스트렙토마이세스속 균주 및 상기 유전자가 도입된 형질전환체를 이용하여 항생물질의 생산을 증가시키는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- <44> 독소루비신(doxorubicin)은 임상적으로 매우 중요한 항암제로서, 높은 G+C 그람-양성 토양 균주인 스트렙토마이세스 퍼시셔스 var. 카에시우스(*Streptomyces peucetius* var. *caesius*) 균주에 의해 생합성되는 타입 II 폴리케타이드 화합물의 구조적 패밀리에 포함된다(Acramone, F. 1984, *Med. Res. Rev.* 4: 153-188; Nicholls, G., et al., 1992, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10: 949-957; Vetrivel, LS. and K. Dharmalingam, 2001, *J. Genet.* 80:31-38). 스트렙토마이세스 종 중 다른 이차 대사산물의 생합성과 마찬가지로, 독소루비신의 합성은 엄격하게 조절되고 있으므로 야생형 *S. 퍼시셔스*에서는 독소루비신의 생산이 제한되어 있다(Kalakoutskii, L. V. et al., *Bacteriol. Rev.* 40:469-524, 1976; Otten, S.L., et al., *J. Bacteriol.* 177:1216-1224, 1995; Peggy, A.R. et al., *J. Bacteriol.* 137:891-899, 1979; Stutzman-Engwall, K.J. et al., *J. Bacteriol.* 174:144-154, 1992). 분자 유전학 기초에 의한 증강된 생산은 밝혀지지 않은 부분이 많음에도 불구하고 무작위적이며 반복적인 돌연변이 즉 UV를 이용한 돌연변이 유도 방식이나 NTG 또는 HNO₂와 같은 화학적 요법을 이용한 무작위 돌연변이를 통해 개량된 산업용 균주는 독소루비신의 합성 증가에 이용되어 왔다(Acramone, F. *Med. Res. Rev.* 4:153-188, 1984; Park, H.-S., et al., *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 66-61, 2005; Park, H.-S. et al., *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* 18:289-293, 2003; Rodriguez, E., et al., *J. Int. Microbiol. Biotechnol.* 30:480-488, 2003; Vetrivel, K.S., et al., *J. Genet.* 80:31-38, 2001). 그러나 상기와 같은 무작위 돌연변이 방법은 시간적으로나 노동적인 측면에서 많은 소비가 예상되고 그 확률 또한 낮다고 할 수 있다.
- <45> 최근 cDNA 마이크로어레이를 포함하는 “체학(Omics)-유도 기술”이 산업용 균주의 이차 대사산물의 과발현과 관련된 유전자 발현 변화의 동정에 이용되고 있다. 에리트로마이신(erythromycin)을 생산하는 *사카로폴리소라 에리트로리애*(*Saccharopolysora erythrae*) 및 타이로신(tyrosin)을 생산하는 스트렙토마이세스 프라디아(*Streptomyces fradiae*)의 전사 분석을 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*) cDNA 마이크로어레이(Lum, A.M., et al., *Metabolic Engineering* 6:186-196, 2003)를 이용하였다는 보고가 있다. 이 경우 야생형 균주와 산업용 균주 간의 전사물의 차이를 분석하였는데 생산성에 영향을 주는 의미있는 변화가 있는 유전자는 실험적으로 입증하지 못했다(Lum, A.M., et al., *Metabolic Engineering* 6:186-196, 2003).
- <46> 이에 본 발명자들은 독소루비신을 생산하는 *S. 퍼시셔스*의 야생형 균주 및 산업 균주의 발현을 *S. 코엘리칼라* 전체 게놈 마이크로어레이칩을 이용하여 분석 및 비교하여, 발현의 차이를 보이는 유전자를 선별하였다. 이후 선별한 유전자를 과발현하는 *S. 퍼시셔스* 및 *S. 코엘리칼라* 균주를 제조하여 항생물질의 생산에 영향을 미치는 유전자인 *mbIA* 유전자를 선별하여, 상기 유전자가 *S. 퍼시셔스* 뿐 아니라 *S. 코엘리칼라* 상에서도 항생물질의

생산을 저해함을 확인함으로써 스트렙토마이세스 종 전체에 영향을 미치는 억제자로 작용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<47> 본 발명의 목적은 스트렙토마이세스속 미생물의 항생제 생합성 경로에서 공통 억제자로 기능하는 것으로 규명된 유전자, 상기 유전자를 이용한 항생물질 고생산 균주 제조방법, 항생물질 생산증가 화합물 스크리닝 방법 및 상기 공통 억제자로 규명된 유전자를 결실 또는 도입시킨 스트렙토마이세스속 균주를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<48> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항생물질 고생산 스트렙토마이세스속 균주 제조방법을 제공한다.

<49> 또한, 본 발명은 *wblA* 유전자가 통상의 유전자 조작 기법에 의해 조작된 스트렙토마이세스속 균주를 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 *wblA* 유전자를 도입시킨 형질전환 스트렙토마이세스속 균주를 제공한다.

<51> 아울러, 본 발명은 스트렙토마이세스속 미생물에서 자체적으로 생산되는 항생물질의 생산을 증가시키는 화합물의 스크리닝 방법을 제공한다.

<52> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<53> 본 발명자들은 *S. 퍼시셔스*의 야생형 균주 및 산업 균주를 배양하였으며(도 1A 참조), 두 균주 사이의 동일한 OD값이 되는 시간을 측정하여 샘플을 수득하였다(도 1B-D 참조). 이후 Kang 등이 개시한 독소루비신 대사경로 칩(Kang, S.-H. *et al.*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 20:239-246, 2005)를 이용하여 *S. 퍼시셔스*의 야생형 균주 및 산업 균주 사이의 유전자 발현을 조사하였다. 상기 대사경로 칩에는 *S. 퍼시셔스* 상에서 독소루비신 대사경로 유전자로 밝혀진 40여종의 유전자를 집적하고 있다. 실험 결과, 야생형 균주 샘플에서는 대부분의 독소루비신 대사경로 유전자들이 늦게 발현되었으며, 산업 균주는 균주의 지수성장기가 시작될 때부터 독소루비신 대사경로 관련 유전자들의 발현이 높아짐이 확인되었다(도 2 참조). 이후 본 발명자들은 *S. 코엘리칼라*의 전체 게놈 마이크로어레이 칩을 이용하여 *S. 퍼시셔스*의 야생형 균주 및 산업 균주 사이의 유전자 발현을 조사하였다. 그 결과, T0 시간대에서 2배 이상의 발현 차이를 보이는 160여종의 유전자가 선별되었다. 이후 선별된 유전자들 중 두 균주에서 발현에 크게 차이를 보이지 않는 유전자들과 아직까지 기능을 알 수 없는 단백질(hypothetical protein)들은 우선 제외했다. 이 후 *S. 퍼시셔스* 야생형 균주에 비해서 *S. 퍼시셔스* 산업 균주에서 발현이 크게 증가(up regulation)하는 유전자와 반대로 크게 감소(down regulation) 하는 유전자 그룹으로 나누어 살펴보고, 이들 중에서도 발현에 있어서 특이적인 차이를 보이거나 혹은 2차 대사와 연관이 있을 것으로 추측되는 유전자들을 선별하였다(도 3).

<54> 이 후 T0, T1 및 T2 시간대에서의 야생형 균주와 산업 균주 사이의 발현 패턴을 비교한 결과, 상승 조절되는 10여종의 유전자 및 10여종의 하강 조절되는 10여종의 유전자를 선별하였다(도 3 참조). 이 후 상기 선별된 20여종의 유전자를 pSE34 벡터(도 4 참조)에 삽입하여 *S. 코엘리칼라* 및 *S. 퍼시셔스*에 형질전환하여 항생물질의 생산 정도를 확인하였다. 상기 결과를 통해 *S.코엘리칼라*의 경우 SC05147이 추정 양성 조절자로서, SC03579가 추정 음성 조절자로서 효과를 보임을 알 수 있었다. 이후 SC05147 및 SC03579 유전자를 각각 형질전환하여 과발현시킨 *S. 코엘리칼라* 및 *S. 퍼시셔스*의 항생물질 생산을 확인하였다. 그 결과, 두 균주에서 모두 SC05147 유전자를 과발현시킨 경우 항생물질의 생산에 커다란 변화가 없었으나, SC03579 유전자를 과발현시킨 경우 항생물질의 생산이 억제됨이 관찰되었다(도 6 참조). 이를 통해 SC03579 유전자가 *S. 코엘리칼라* 및 *S. 퍼시셔스*에서 항생물질 억제자로서 작용함을 알 수 있었다. 이후 공벡터를 형질전환 또는 SC03579 유전자를 도입하여 형질전환한 후 *S. 코엘리칼라*에서 생성되는 항생물질(UND, ACT, CDA)의 생산물을 측정하였다. 이 때 공벡터를 형질전환시킨 균주에서는 항생물질의 정상적으로 생산됨을 확인하였으나, SC03579 유전자를 도입한 균주의 경우 항생물질의 생산이 강력하게 억제됨을 확인할 수 있었다. SC03579 유전자가 다른 항생물질 대사경로 조절 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 SC03579 유전자를 형질전환시킨 *S. 코엘리칼라*에서는 항생물질의 대사 조절 관련 유전자의 발현을 전체적으로 감소시킴을 확인하였다(도 8 참조). 이를 통해 SC03579 유전자가 스트렙토마이세스속 미생물의 항생물질 생합성에 전체적으로 적용되는 억제자임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명자들이 동정한 상기 SC03579 유전자는 항생물질 고생산 균주 제조 및 항생물질 생산 증가 또는 촉진용 화합물을 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다.

<55> 본 발명은 항생물질 고생산 스트렙토마이세스속 균주 제조방법을 제공한다.

- <56> 본 발명은 하기의 단계로 구성된 항생물질 고생산 균주 제조방법을 제공한다: 1) 스트렙토마이세스속 항생물질 고생산 균주 및 이의 야생형 균주로부터 각각 전체 RNA를 수득하는 단계; 2) 단계 1)의 수득된 전체 RNA를 이용하여 스트렙토마이세스속 항생물질 고생산 균주와 이의 야생형 균주간의 유전자 발현 정도를 비교하는 단계; 3) 단계 2)의 비교된 유전자 발현 결과에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 선별하는 단계; 4) 단계 3)의 선별된 유전자를 스트렙토마이세스속 항생물질 생산균주에 도입하여 과발현시키는 단계; 5) 단계 4)의 선별된 유전자가 도입되어 과발현된 균주에서 생산되는 항생물질의 양을 측정하는 단계; 6) 단계 5)의 측정된 항생물질 생산량과 선별된 유전자 도입전 스트렙토마이세스속 항생물질 생산균주에서의 항생물질 생산량을 비교하여 항생물질 생산 경로와 관련된 유전자를 선별하는 단계; 7) 스트렙토마이세스속 항생물질 생산균주에서 상기 선별된 유전자를 조작하여 돌연변이 균주를 제작하는 단계; 및 8) 단계 7)의 돌연변이 균주에서 항생물질 고생산 균주를 선별하는 단계.
- <57> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 스트렙토마이세스속(*Streptomyces*) 미생물은 스트렙토마이세스 퍼시셔스(*Streptomyces peucetius*), 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuela*), 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*S. hygroscopicus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하다. 상기 항생물질 고생산 균주는 독소루비신 대량 생산을 위하여 반복 돌연변이 방법에 의해 제조된 산업용 스트렙토마이세스 균주인 것이 바람직하며, 특히 *S. 퍼시셔스* 산업용 돌연변이 균주인 것이 더욱 바람직하다.
- <58> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 항생물질은 독소루비신(doxorubicin), 액티노로딘(actinorhodin), 피크로마이신(picromycin), 겔다나마이신(geldanamycin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니며, 스트렙토마이세스속 미생물이 생산하는 항생물질은 모두 본 발명에 포함될 수 있다.
- <59> 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 유전자 발현을 측정하는 방법은 마이크로어레이 칩을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 당해업계의 당업자에게 알려진 대량 유전자 발현 측정 방법이라면 본 발명에 모두 이용가능하다. 본 발명에서는 *S. 코엘리칼라* 전체 게놈 마이크로어레이 칩을 이용하였으나 이에 한정되는 것은 아니며, 스트렙토마이세스속 미생물 중 전체 게놈 서열이 밝혀진 균주의 전체 유전자가 집적된 마이크로어레이 칩이라면 본 발명에 사용 가능하다.
- <60> 상기 방법에 있어서, 단계 3)에서는 유전자 발현의 차이를 2배 이상 발현이 증가 또는 감소하는 유전자를 선별하는 것이 바람직하다.
- <61> 상기 방법에 있어서, 단계 6)의 선별된 유전자는 *wblA*(*whiB*-like putative transcription factor gene: SC03579)인 것이 바람직하며, 상기 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 가지나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 유전자의 서열로부터 60 ~ 99%의 상동성을 보이는 서열을 가지는 유전자는 본 발명에서 이용 가능하다.
- <62> 상기 방법에 있어서, 단계 7)의 유전자 조작 방법은 선별된 유전자의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 치환 또는 결실 방법인 것이 바람직하며, 상기 방법은 통상의 유전자 조작기법이 모두 적용가능하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <63> 또한, 본 발명은 *wblA* 유전자가 통상의 유전자 조작 기법에 의해 조작된 스트렙토마이세스속 균주를 제공한다.
- <64> 상기 선별 유전자인 *wblA*(SC03579)는 서열번호 1로 나타내어지나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열과 70 ~ 99%의 상동성을 보이는 서열을 가지는 유전자는 본 발명에서 이용 가능하다. 또한, 상기 항생물질은 독소루비신 또는 액티노로딘인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 균주는 스트렙토마이세스 퍼시셔스 또는 스트렙토마이세스 코엘리칼라인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 결실 방법은 당해업계의 당업자에게 공지된 일반적인 방법을 사용하는 것이 바람직하며, 일반적으로 PCR targeting 시스템에 기초한 상동체 재조합(homologous recombination)을 통한 유전자 결실방법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- <65> 본 발명의 상기 균주는 항생물질을 생산하는 스트렙토마이세스 속 미생물의 항생물질 생합성 경로의 공통 억제자로 작용하는 유전자인 *wblA*가 결실된 균주로서, 종래 반복 돌연변이 방법에 의해 제조된 산업용 균주에 비해 간편하고 활용적으로 제조될 수 있다.
- <66> 상기 통상의 유전자 조작 기법은 *wblA* 유전자의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 치환 또는 결실 방법인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- <67> 또한, 본 발명은 *wbIA* 유전자를 도입시킨 스트렙토마이세스속 균주를 제공한다.
- <68> 상기 선별 유전자인 *wbIA*(SC03579)는 서열번호 1로 기재된 염기서열을 가지나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열과 70 ~ 99%의 상동성을 보이는 서열을 가지는 유전자는 본 발명에서 이용 가능하다. 또한, 상기 항생물질은 독소루비신 또는 액티노로딘인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 균주는 스트렙토마이세스 퍼시셔스 또는 스트렙토마이세스 코엘리칼라인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- <69> 아울러, 본 발명은 항생물질의 생산을 증가시키는 화합물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- <70> 본 발명은 하기의 단계로 구성된 스크리닝 방법을 제공한다: 1) *wbIA* 유전자를 도입하여 스트렙토마이세스속 균주에서 과발현시키는 단계; 2) 단계 1)의 균주에 피검화합물을 처리하는 단계; 3) 단계 2)의 피검화합물을 처리한 스트렙토마이세스속 균주의 항생물질 생산을 측정하는 단계; 4) 단계 3)의 측정 결과를 피검화합물 처리 전 스트렙토마이세스속 균주의 항생물질 생산 측정과 비교하여 항생물질 생산 증가 효과를 가지는 피검화합물을 선별하는 단계.
- <71> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 *wbIA* 유전자는 서열번호 1로 기재된 염기서열을 가지나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 서열과 70 ~ 99%의 상동성을 보이는 서열을 가지는 유전자라면 본 발명의 방법에서 유용하게 이용될 수 있다.
- <72> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 스트렙토마이세스속 균주는 스트렙토마이세스 퍼시셔스 또는 스트렙토마이세스 코엘리칼라인 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- <73> 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 피검화합물은 인공화합물 또는 천연 화합물 또는 이들의 유도체인 것을 특징으로 한다.
- <74> 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 항생물질은 독소루비신 또는 액티노로딘인 것을 특징으로 한다.
- <75> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- <76> 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <77> <실시예 1> 산업용 *S. 퍼시셔스* 균주 및 야생형 *S. 퍼시셔스* 균주 배양
- <78> 반복적으로 돌연변이된 독소루비신 과발현 *S. 퍼시셔스* 산업용 돌연변이 균주(보령제약에서 제공, 대한민국) 및 야생형 *S. 퍼시셔스* 균주[*S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952, 미국 미생물보존센터(American Type Cell Collection)에서 구매]를 NDYE 배지를 이용하여 웨이크 플라스크 배양을 통해 배양하였다(Hopwood, D.A., et al., Practical Streptomyces Genetics, The John Innes Foundation, Norwich, UK, 2000). 10일 동안 배양하면서 상층액 및 세포 펠렛(pellet) 샘플을 수득하였고, 독소루비신 타이터(titer) 및 세포 성장의 농도 측정을 위해서 HPLC 분석을 수행하였다(Kang, S. -H., et al., Korean J. Biotechnol. Bioeng. 20:239-246, 2005; Park, H. -S., et al., J. Microbiol. Biotechnol. 15:66-71, 2005). 독소루비신은 C-18 역상(reverse phase)(250× 4.6 mm) 컬럼(Waters, Ireland)을 사용하였으며, 추출은 배양액의 일정량을 취하여 1vol.의 추출액(Iso-propyl alcohol : 30% HCl = 50 : 1)을 혼합하고 30분 교반한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 필터링하였다. HPLC 분석을 위한 이동상(mobil phase)은 아세토니트릴/물(acetonitrile/water)(1 : 1 v/v) 혼합액에 SDS(1.327 g/ℓ)와 인산(phosphoric acid)(0.68 ml/ℓ)을 혼합하여 사용하였고, 유속은 1 ml/min, 컬럼 온도는 상온으로 유지하여 UV 검출기(detector)로 254 nm에서 독소루비신의 생산량을 정량분석하였다. 야생형 균주 및 돌연변이 *S. 퍼시셔스* 균주는 유사한 속도로 배양하여 측정하였다.
- <79> 그 결과, 산업용 돌연변이 균주는 대략 20-30 mg/L 독소루비신을 생산하였으나, 야생형 균주에서 독소루비신이 검출되지 않았다(도 1A).
- <80> 야생형 및 돌연변이 균주 사이의 가능한 전사 차이를 동정하기 위하여, 5회의 다른 성장기별로 배양시 샘플을 채취하여 전체 RNA를 분리하였다(도 1B-D). 전체 RNA는 RNeasy 미니 키트를 이용하여 추출되었다(Ambion Inc., USA).
- <81> <실시예 2> 마이크로어레이 분석을 통한 산업용 *S. 퍼시셔스* 균주 및 야생형 *S. 퍼시셔스* 균주의 유전자 발현 변화
- <82> *S. 퍼시셔스* 유전자의 유전적 서열은 공개되어 입수할 수 있으므로, *S. 코엘리칼라* cDNA 마이크로어레이 및 *S.*

퍼시셔스의 독소루비신 대사경로 유전자인 40여개의 유전자를 포함하는 미니 cDNA 칩을 *S. 퍼시셔스* 전사체의 평가에 이용하였다(huang, J. *et al.*, *Genes Dev.* 15:3183-3192, 2001; Kang, S. -H., *et al.*, *Joran J. Biotechnol. Bioeng.* 20:239-246, 2005; Lum, A.M. *et al.*, *Metabolic Engineering* 6:186-196, 2003).

<83> 성장기-의존 마이크로어레이 혼성화를 위해 OD₆₀₀이 1로서 독소루비신 생산의 초기 시점인 “제로” 샘플은 Cy3 형광 다이(녹색)로 표지하였으며, 모든 이후의 시간 포인트의 샘플을 Cy5 형광 다이(빨간색)로 표지하였고, 같은 균주의 “제로” 샘플과 함께 혼성화하였다(도 2 첫 번째 및 두 번째 컬럼). Cy3로 표지된 야생형 균주 cDNA 샘플과 Cy5로 표지된 산업적으로 이용하는 돌연변이 시료는 같은 시간 때에 분리하였으며, 직접 비교하였다(도 2 세 번째 컬럼).

<84> 그 결과, 야생형 균주 샘플에서는 대부분의 독소루비신 대사경로 유전자들이 늦게 유도됨이 관찰되는 것과는 대조적으로, 돌연변이 균주 샘플에서는 돌연변이의 지수 성장기가 시작할 때부터 독소루비신 대사경로 관련 유전자들이 높게 발현됨이 관찰되었다(도 2).

<85> 이후 *S. 퍼시셔스* 상의 독소루비신 과발현과 관련된 다량의 mRNA의 전체적인 변화를 검출하기 위하여, *S. 퍼시셔스* 야생형 균주 및 돌연변이 균주 상의 비교 전사체 분석은 공지된 서열을 포함하는 *S. 코엘리칼라* cDNA 마이크로어레이(Huang, J. *et al.*, *Genes Dev.* 15:2183-3192, 2001)를 이용하여 수행하였다.

<86> 그 결과, 처음 T0 시간 포인트에서 야생형 균주 및 돌연변이 균주 사이의 전사 중 최소 2배 차이를 보이는 유전자로 대략 160여개의 *S. 코엘리칼라* 잠재적인 후보 유전자가 동정되었다. 이후 상기 잠재적 후보 유전자의 성장기 전사 프로파일의 분석을 수행하였는데, 20여개의 유전자들이 두 균주들 사이의 커다란 전사 변화를 보여 선택되었다(도 3A, B). 그 결과, *S. 퍼시셔스* 산업용 돌연변이 균주에서 SC05147의 *S. 퍼시셔스* 상동체의 발현은 T3 시간 포인트에서 *S. 퍼시셔스* 야생형 균주보다 4배 증가하였고(도 3A), SC03579의 *S. 퍼시셔스* 상동체는 50% 정도 산업용 돌연변이 균주에서 억제되었다(도 3B). *S. 퍼시셔스* 상의 상기 두 개의 가능한 조절 유전자를 표적으로 하는 Real-time RT-PCR로 마이크로어레이 분석에 의해 관찰되어진 전사 변화를 확인하였다(테이타 미제시).

<87> <실시에 3> 선별 유전자 형질전환을 통한 항생물질 생산 변화 조사

<88> 상기 유전자들은 pSE34 스트렙토마이세스 발현 벡터(도 4)의 강한 *ermE*-프로모터의 조절 하의 *S. 코엘리칼라*에서 과발현시켰다.

<89> 각각의 유전자들은 이미 밝혀진 스트렙토마이세스 전체 게놈 시퀀스(<http://streptomyces.org.uk/>)를 바탕으로 프라이머를 제작하였으며, 유전자의 앞쪽에는 리보솜 결합 자리(ribosomal binding site)와 양끝에 효소 절단 자리(enzyme site)를 포함하도록 하였다. 이후 PCR 생성물은 pMD18 T-vector(Takara, Japan)에 클로닝하였고, 해당 제한효소를 이용하여 pSE34로 클로닝하여 *E. coli*에 형질전환하여 얻었다. 이후 상기 형질전환된 *S. 코엘리칼라*를 R2YE(Kieser *et al.* 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. A laboratory manual Norwich, UK: John Innes Foundation) 배지 플레이트에서 배양하였다.

<90> 그 결과, 이중 파란색 염료 항생물질 액티노로딘(blue pigment antibiotic actinorhodin)의 생산을 대부분 증가시키는 상기 유전자는 추정 양성 조절자인 SC05147에 의해 유도되었다. 액티노르딘 발현의 커다란 감소는 SC03579의 발현되는 세포에서 관찰되었다(도 5).

<91> 이 중 선별된 유전자로서 추정 양성 조절 유전자인 SC05147는 50 ECF-서브패밀리 시그마 팩터(sigma factor) 유전자의 하나로서 분류되며, *S. 코엘리칼라*에서의 게놈에 존재한다. 상기 유전자의 생물학적 규칙은 밝혀진바 없으나, *S. 코엘리칼라*에서 결실하면 불활성을 보임으로 세균 생존에 중요한 기능을 가짐을 알 수 있다. 추정 음성 조절자인 SC03579는 *S. 코엘리칼라*에서 *wblA(whiB-like putative transcription factor gene)*라 명명되었다(<http://streptomyces.org.uk/>; Soliveri, J.A. *et al.*, *Microbiology* 146:333-343, 2000).

<92> 상기 선별 유전자인 SC05147 및 SC03579 유전자를 pSE34 발현벡터에 삽입하여 클로닝한 후, *S. 퍼시셔스* 및 *S. 코엘리칼라*에 각각 형질전환하였으며, 상기 형질전환된 균주들 각각의 항생물질의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

<93> 형질전환된 *S. 코엘리칼라* 균주는 R2YE 배지 플레이트 상에서 배양하였으며, 형질전환된 *S. 퍼시셔스* 균주는 NDYE 배지 플레이트 상에서 배양하였다.

<94> 그 결과, 형질전환된 *S. 코엘리칼라* 균주에서는 SC03579 유전자가 과발현된 균주에서 액티노로딘의 생성을 억제

하였으며(왼쪽 적색 별표), *S. 퍼시셔스* 균주에서도 역시 SC03579 유전자가 과발현된 균주(오른쪽 적색 별표)에서 독소루비신의 생산이 효과적으로 저해됨이 관찰되었다(도 6).

<95> 이후, 상기 선별 유전자를 도입하여 형질전환된 *S. 코엘리칼라* 상에서 생산하는 항생물질[ACT(Actinorhodin), UND(운데실프로디지오신-undecylprodigiosin) 및 CDA(칼슘 의존성 항생제-calcium dependent antibiotics)]을 Hopwood 등의 방법으로 측정하여 비교하였다(Hopwood, D.A. *et al.*, Practical *Streptomyces* Genetics. The Jone Innes Foundation, Norwichm UK, 2000). 이때 형질전환 배지는 YEME 배지에서 배양하였으며, ACT 및 UND 생산은 흡광도로 측정하였으며(도 7A), CDA의 생산 분석을 위해서는 대조균 균주, SC03579 유전자가 도입된 형질전환 균주의 동량의 포자를 영양 아가 배지(nutrient agar medium)에서 3일간 배양하였다. 배양된 두장의 배지에 15 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 가 존재 또는 부재하는 영양 소프트아가 배지를 만들어, 대수기 상태의 바실러스 마이코이데스(*Bacillus mycoides*) 세포를 0.5 ml/ml이 되도록 혼합하고 이 배지 5 ml을 덮어 말린 뒤 하룻밤동안 배양하였다.

<96> 그 결과, SC03579 유전자를 도입하지 않은 형질전환 균주와 비교했을 때 SC03579 유전자를 도입한 형질전환 균주의 ACT, UND 및 CDA 생산량을 크게 억제됨을 확인할 수 있었다(도 7A, B).

<97> <실시예 4> *wbIA*가 항생물질 관련 유전자 발현에 미치는 영향 조사

<98> *wbIA* 유전자의 과발현으로 인해 *S. 코엘리칼라* 균주 내에서 항생물질 생산과 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여, *S. 코엘리칼라*의 SC03579 유전자를 pSE34 벡터에 삽입하였고, 형질전환에 의해 SC03579를 과발현하는 *S. 코엘리칼라* 균주를 실시예 3과 같은 방법으로 제조하였다. 이후 RT-PCR 방법으로 항생물질 생산 관련 유전자의 발현을 조사하였다. 이 때 사용한 프라이머쌍의 서열은 하기와 같다: rDNA(정방향 프라이머: 5' -GAC TCC TAC GGG AGG CAG CA-3' : 서열번호 2; 역방향 프라이머: 5' -CGC CCA ATA ATT CCG GAC AA-3' : 서열번호 3), *actII-ORF4*(정방향 프라이머: 5' -TCC CTG GTA ATT TCG CAT CC-3' : 서열번호 4; 역방향 프라이머: 5' -CCA TGT GCA TAC GCT GGA TT-3' : 서열번호 5), *redD*(정방향 프라이머: 5' -CCC TGG AGG ATC TCA TCA GC-3' : 서열번호 6; 역방향 프라이머: 5' -GTA CGA CTC CAG GGC GTC TC-3' : 서열번호 7), *redZ*(정방향 프라이머: 5' -ACG TCG GTC GAA GAA CTG GT-3' : 서열번호 8; 역방향 프라이머: 5' -GAG GAG GAC TTC CGT TTC CC-3' : 서열번호 9), 및 *cdaR*(정방향 프라이머: 5' -CCA TCG AAG AGA TCG GTC TTG-3' : 서열번호 10; 역방향 프라이머: 5' -GCT ACG CCC GAT GAA GTA GG-3' : 서열번호 11). 3일간 R2YE 플레이트에서 배양된 SC03579를 포함하는 *S. 코엘리칼라*와 공벡터 pSE34를 포함하는 *S. 코엘리칼라* 균주로부터 전체 RNA를 추출하였다. Dnase가 처리된 RNA 샘플은 같은 농도로 AMV reverse transcriptase(Takara, Japan)와 random hexamer, dNTP를 포함하는 cDNA 합성에 이용되었다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 실시하였고 조건은 95℃ 1분, 50℃ 1분, 68℃ 1분으로 35회 반복하였다.

<99> 그 결과, *actII-ORF4*, *redD/Z* 및 *cdaR*을 포함하는 *S. 코엘리칼라*의 항생물질 특이적 대사경로 조절 유전자는 *wbIA* 과발현 균주에서 그 발현이 감소되었다(도 8). 이를 통해 *wbIA*가 스트렙토마이세스 종 중에서 항생물질 합성에 전체적인 억제자임을 알 수 있었다.

발명의 효과

<100> 본 발명은 항생물질 대량생산을 위해 반복 돌연변이 기법에 의해 제조된 산업용 돌연변이 스트렙토마이세스속 균주와 그의 야생형 균주에서 발현 양상 차이를 나타내는 유전자를 다른 야생형 균주의 게놈 cDNA가 집적된 마이크로어레이 칩을 이용하여 검색하고, 검색된 유전자 중 스트렙토마이세스속 미생물의 항생물질 생산생로에 공통 억제자로 작용하는 유전자를 규명함으로써 완성되었다. 상기 규명된 유전자를 통상의 유전자 조작 기법으로 조작하여 항생물질 대량생산 균주를 제조하는 방법 및 이에 의해 제조된 균주는 종래 반복 돌연변이 기법을 적용하는 경우에 비해 간편하고 효율적이며, 저비용으로 항생물질 대량생산이 가능하게 하며, 또한 상기 규명된 유전자가 도입된 형질전환 균주를 이용하면 스트렙토마이세스속 미생물에서 생산되는 항생물질의 생산을 촉진 또는 증가시키는 신규한 물질을 간편하게 스크리닝 할 수 있을 것으로 전망된다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 *S. 퍼시셔스*(*S. peucetius*)의 야생형 균주 및 산업 균주 상의 독소루비신 생산을 측정한 결과이다:

<2> A : 플레이트 사진;

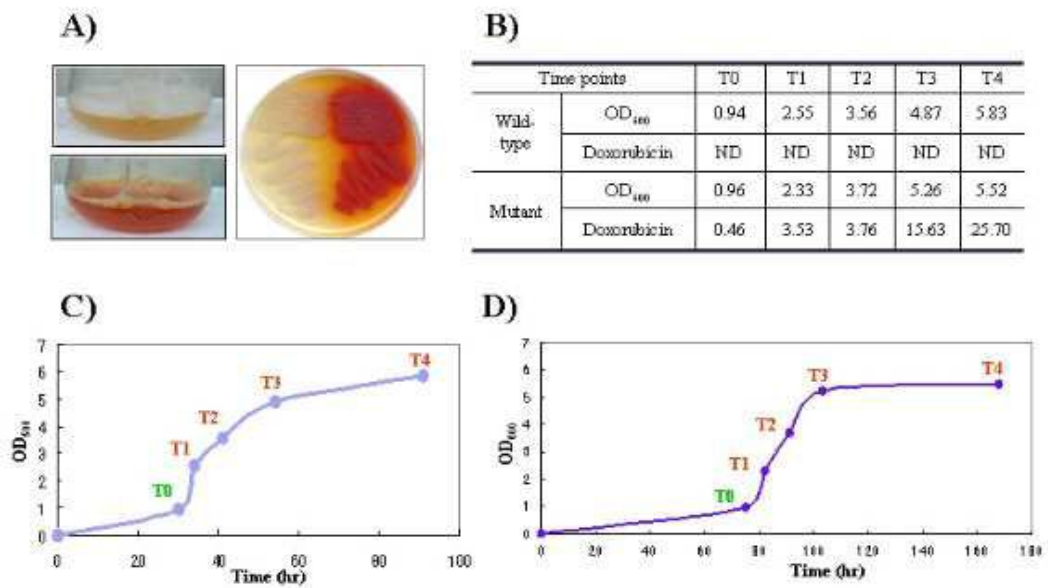
<3> 왼쪽 상단 플레이트: NDYE 액상 배지에서 6일간 배양한 *S. 퍼시셔스* 야생형 균주;

- <4> 왼쪽 하단 플레이트: NDYE 액상 배지에서 6일간 배양한 *S. 퍼시셔스* 산업 균주;
- <5> 오른쪽의 플레이트: NDYE 플레이트 상에서 *S. 퍼시셔스* 야생형 균주 및 *S. 퍼시셔스* 산업 균주 배양;
- <6> 플레이트의 왼쪽 : *S. 퍼시셔스* 야생형 균주; 및
- <7> 플레이트의 오른쪽 : *S. 퍼시셔스* 산업 균주.
- <8> B : *S. 퍼시셔스* 야생형 균주 및 *S. 퍼시셔스* 산업 균주의 시간대별 독소루비신의 용적 생산성;
- <9> C : *S. 퍼시셔스* 야생형 균주의 성장 커브 및 전체 RNA 수득 시간대; 및
- <10> D : *S. 퍼시셔스* 산업 균주의 성장 커브 및 전체 RNA 수득 시간대.
- <11> 도 2는 *S. 퍼시셔스* 야생형 및 *S. 퍼시셔스* 산업 균주 사이에서 발현양상 차이를 나타내는 유전자 검색을 위한 *S. 퍼시셔스* 독소루비신 대사경로 칩을 이용한 마이크로어레이 분석 결과이다.
- <12> 도 3은 *S. 코엘리칼라*(*S. coelicolor*) 전체 게놈 마이크로어레이를 이용하여 비교 분석한 유전자 중 발현 차이를 보이는 유전자 결과이다:
- <13> A : 상승 조절된 유전자;
- <14> B : 하강 조절된 유전자;
- <15> 청색 별표 : SC05147; 및
- <16> 적색 별표 : SC03579.
- <17> 도 4는 pSE34 벡터 지도이다.
- <18> 도 5는 선별 유전자를 과발현시킨 *S.코엘리칼라* 형질전환 균주의 항생물질 생합성 유전자의 발현 정도를 나타낸 젤 사진이다:
- <19> - : 청색 염료 없음;
- <20> + : 야생형 균주와 유사함;
- <21> ++ : 야생형 균주보다 조금 더 생산함;
- <22> +++ : 유의적으로 야생형 균주보다 많음; 및
- <23> # : 어떤 형질전환체 의해 보여지는 두 개의 다른 표현형.
- <24> 도 6은 선별 유전자 중 SC05147 및 SC03579 유전자를 과발현시킨 *S. 코엘리칼라* 및 *S.퍼시셔스* 상의 항생물질 생산 정도를 측정된 플레이트 결과이다:
- <25> A : *S. 코엘리칼라*;
- <26> B : *S. 퍼시셔스*;
- <27> 흰색 별표 : 공벡터 형질전환;
- <28> 적색 별표 : SC03579 유전자 형질전환; 및
- <29> 청색 별표 : SC05147 유전자 형질전환.
- <30> 도 7은 SC03579 유전자를 과발현시킨 *S. 코엘리칼라* 상에서 항생물질 생산을 측정한 결과이다:
- <31> A : UND 및 ACT 생산량 측정 결과 그래프; 및
- <32> B : CDA 생산량 측정 결과.
- <33> 도 8은 *S. 코엘리칼라* 상의 항생물질 대사경로 관련 조절 유전자의 발현을 RT-PCR로 조사한 젤사진이다:
- <34> M: 100bp 사이즈 마커;
- <35> 레인 1-2: *actII-ORF4*;
- <36> 레인 3-4: *redD*;

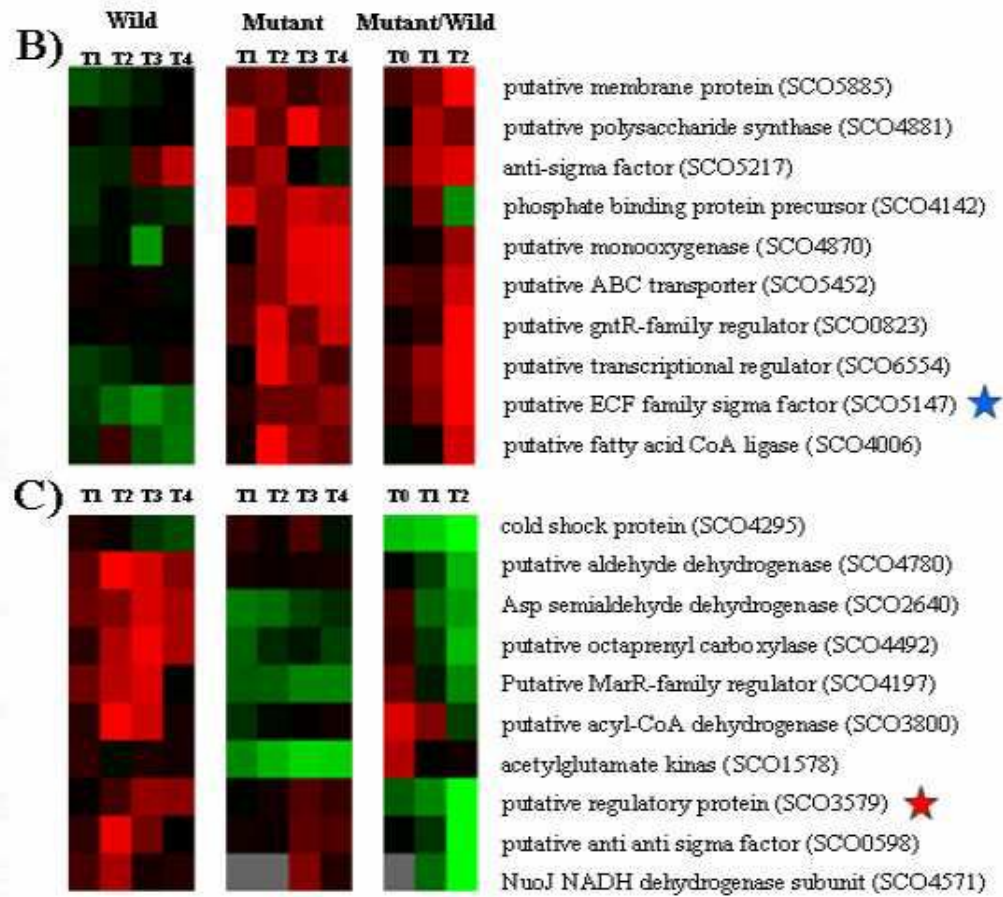
- <37> 라인 5-6: *redZ*;
- <38> 라인 7-8: *cdaR*;
- <39> 라인 9-10: *w1bA*;
- <40> 라인 11-12: rDNA 유전자;
- <41> 홀수 숫자 라인 및 백색 별표: pSE34 벡터를 형질전환한 *S. 코엘리칼라*; 및
- <42> 짝수 숫자 라인 및 적색 별표: SC05147 과별현된 형질전환 *S. 코엘리칼라*의 전체 RNA로 RT-PCR.

도면

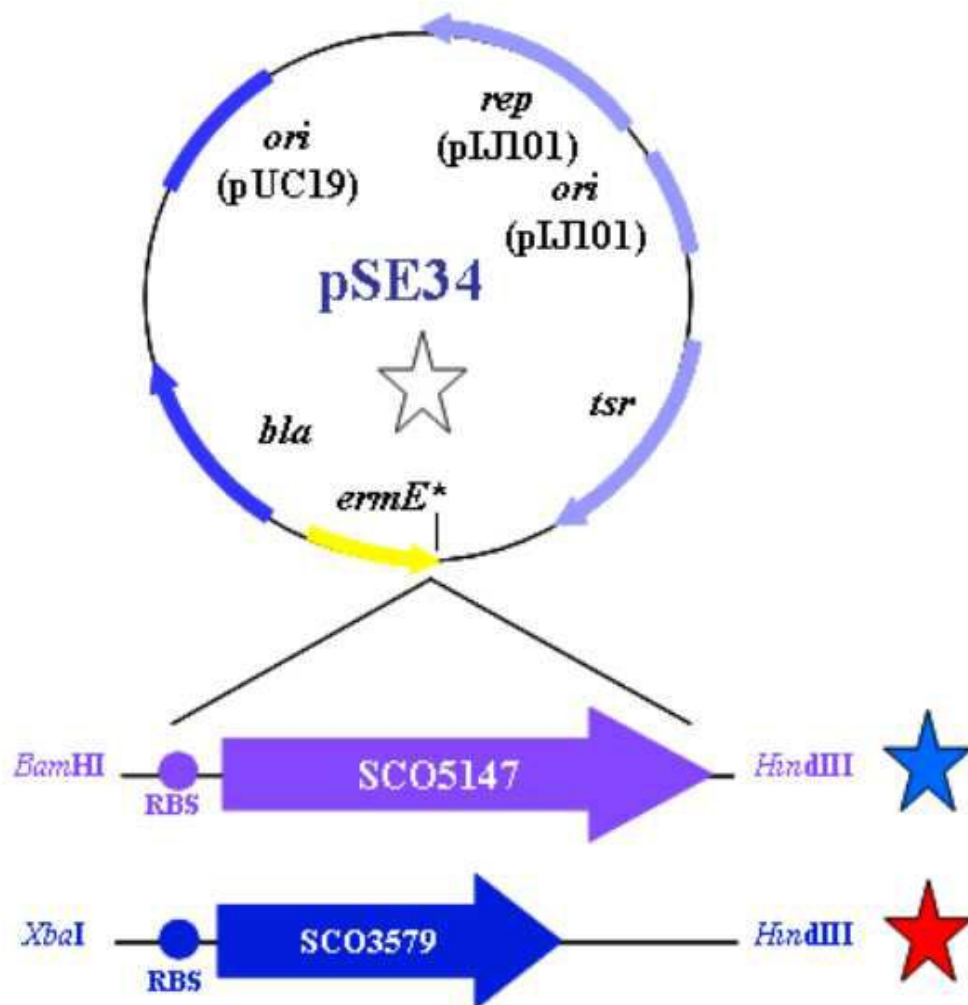
도면1



도면3



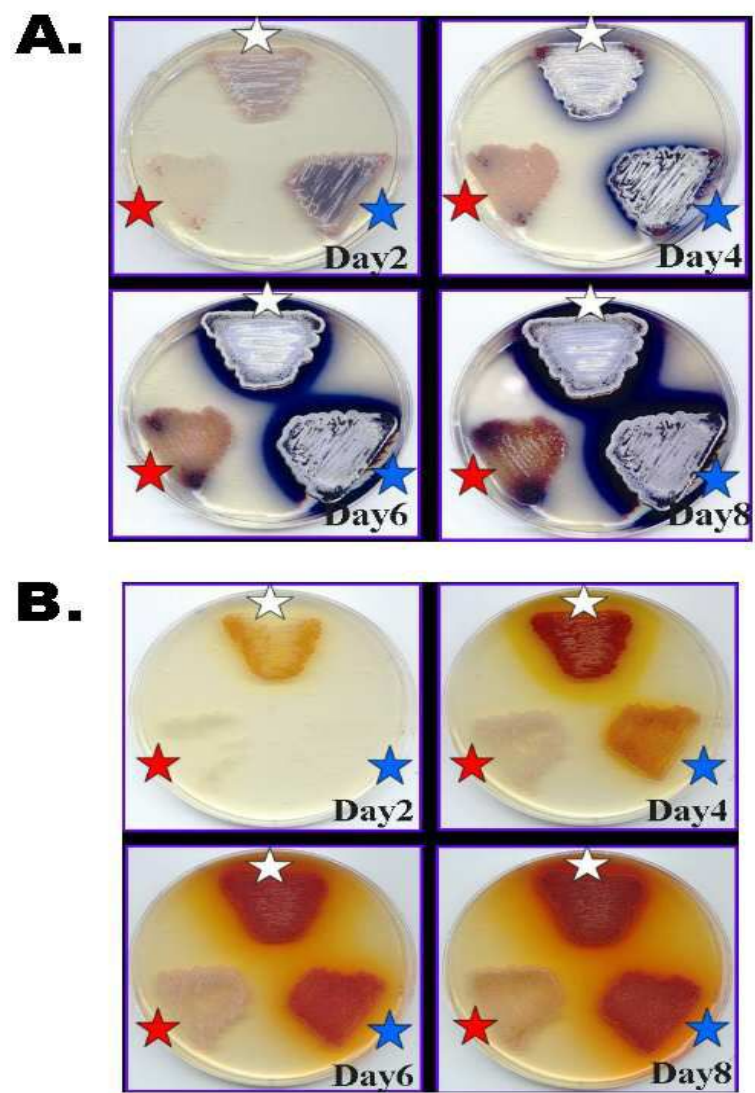
도면4



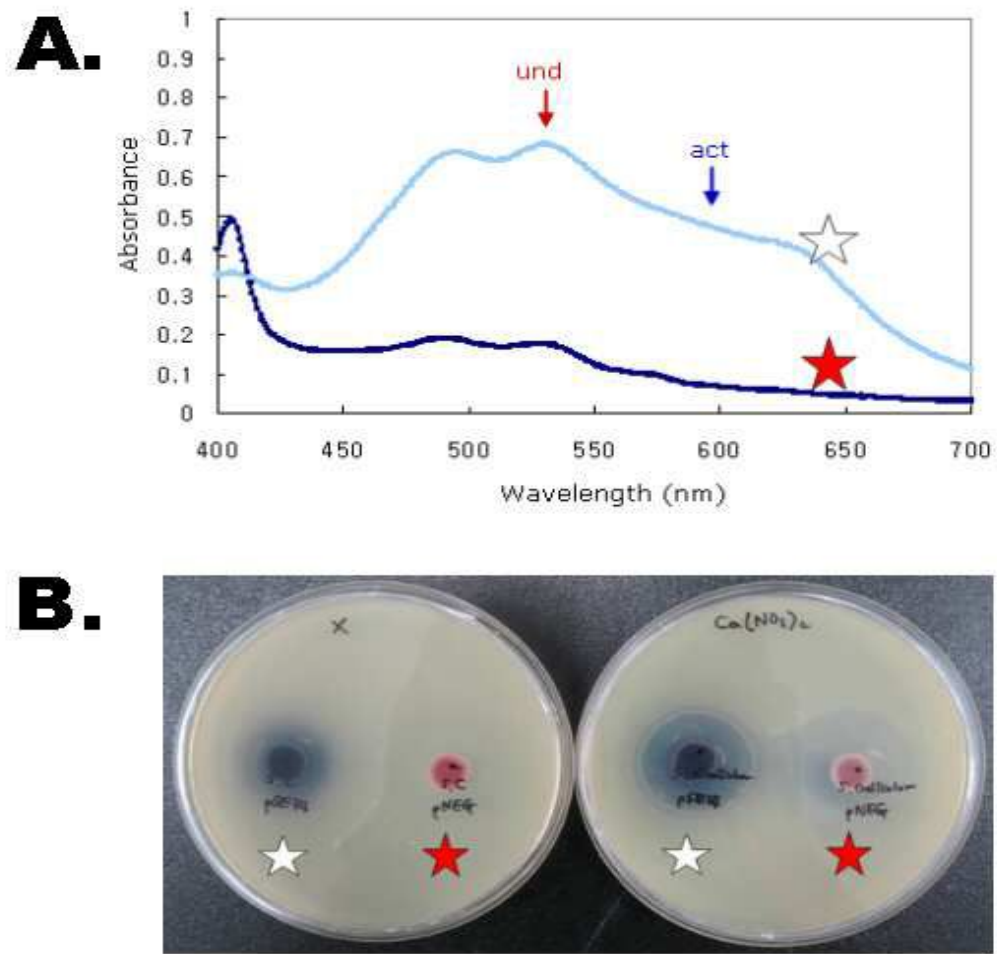
도면5

	Name	Identification	SCO	Actinorhodin	
1	POS1	Putative ECF-subfamily sigma factor	SCO5147	+++	
2	POS2	Putative polysaccharide synthesis gene	SCO4881	++	
3	POS3	Putative monooxygenase	SCO4870	+++/-	
4	POS4	Putative gntR-family regulator	SCO0823	+++ / +	
5	POS5	Phosphate binding protein precursor	SCO4142	+ / +	
6	POS6	Putative transcriptional regulator	SCO6554	++	
7	POS7	Anti sigma factor	SCO5217	+	
8	POS8	Putative ABC transporter	SCO5452	+ / ++	
9	POS9	Putative membrane protein	SCO5885	-	
10	POS10	Putative fatty acid acyl CoA ligase	SCO4006	-	
11	NEG1	Putative regulatory protein	SCO3579	-	
12	NEG2	Cold shock protein	SCO4295	+	
13	NEG4	Putative semialdehyde dehydrogenase	SCO2640	++	
14	NEG5	Putative MarR-family regulator	SCO4197	++ / +	
15	NEG6	Putative anti anti sigma factor	SCO0598	+ / ++	
16	NEG7	Putative aldehyde dehydrogenase	SCO4780	+	
17	NEG8	Acetylglutamate kinase	SCO1578	+++	
18	NEG9	Putative acyl-CoA dehydrogenase	SCO3800	+	
19	NEG13	Putative expression carboxylase	SCO4492	++	
20	NEG15	NuoJ NADH dehydrogenase subunit	SCO4571	+	

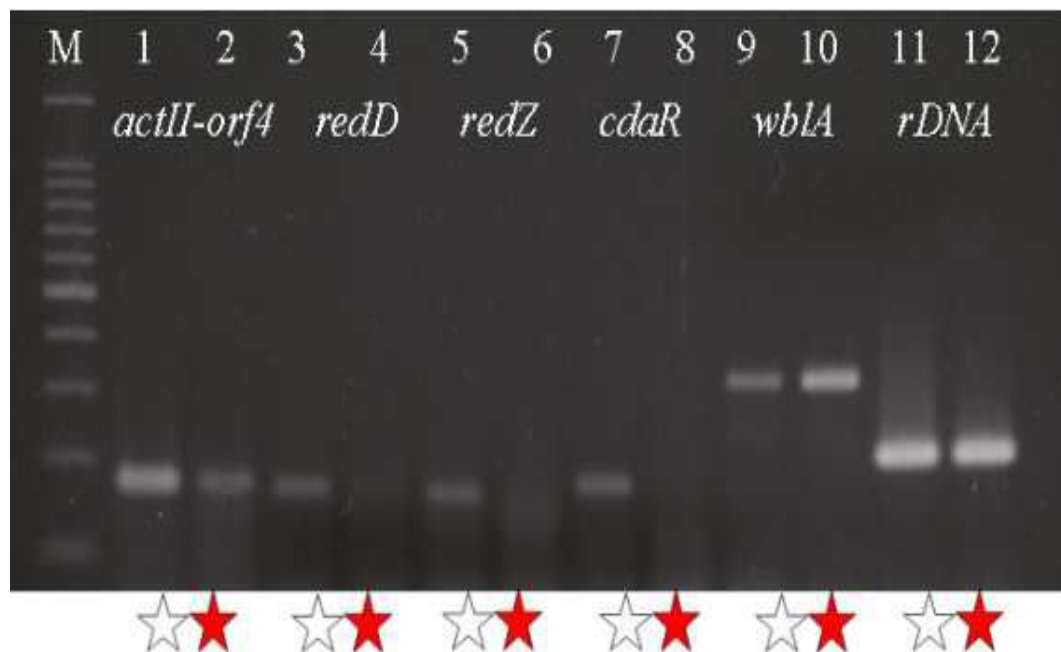
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> INHA UNIVERSITY INDUSTRY PARTHNERSHIP INSTITUTE
 <120> The production method of microorganism for overexpression of antibiotics using wblA gene

<130> 7p-03-06

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> wblA

<400> 1
 atgggctggg taaccgactg gagtgcgcag gccgcctgcc gcactaccga tccggacgaa 60

 ctgttcgttc agggagcagc gcagaacagg gccaaaggcg tgtgcaccgg atgtccggtg 120

 cggaccgagt gcctggccga cgcgctcgac aaccgtgtcg agttcggcgt gtggggaggc 180

 atgacggagc gggaacgccg cgcgctgctg cgcaggcgcc ccaccgtgac ctcttggcgc 240

 cggctcctcg agacggcgcg gacggagtac gaacgagggg tcggcatcgt cccctcgac 300

 gacgacgagg tgtacagaa ctacgggcc gtgggctga 339

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> rDNA forward primer

<400> 2
gactcctacg ggaggcagca 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rRNA reverse primer

<400> 3
cgccaataa ttccgacaa 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> actII-ORF4 forward primer

<400> 4
tccttgtaa ttcgcatcc 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> actII-ORF4 reverse primer

<400> 5
ccatgtgcat acgctggatt 20

<210> 6

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> redD forward primer

<400> 6
 ccctggagga tctcatcagc 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> redD reverse primer

<400> 7
 gtacgactcc agggcgtctc 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> redZ froward primer

<400> 8
 acgtcggtcg aagaactggt 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> redZ reverse primer

<400> 9
gaggaggact tccgtttccc 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cdaR forward primer

<400> 10
ccatcgaaga gatcgtctt g 21

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cdaR reverse primer

<400> 11
gctacgcccg atgaagtagg 20