



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월30일
(11) 등록번호 10-0834257
(24) 등록일자 2008년05월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0007753

(22) 출원일자 2007년01월25일

심사청구일자 2007년01월25일

(56) 선행기술조사문헌

W01998011230 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김범석

서울 성북구 돈암동 한신아파트 106동 703호

김병철

서울 강남구 개포동 경남아파트 8동 1507호

(74) 대리인

김선에

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김지윤

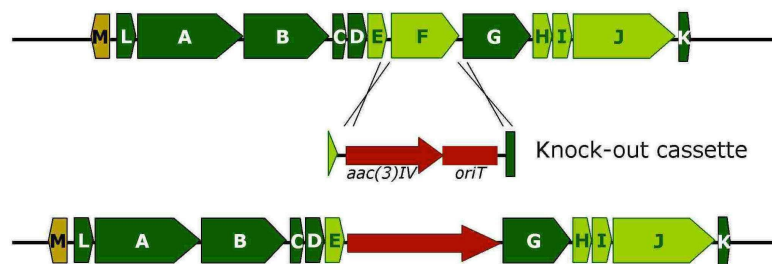
(54) 프라디마이신의 생합성효소인 O-메틸트랜스퍼라제의 유전자가 파괴된 액티노마두라 히비스카 변이균주 및 그 생성물인 디메틸프라디마이신

(57) 요약

본 발명은 프라디마이신의 생합성 유전자들 중 메틸트랜스퍼라제 (Pradimicin methyltransferases) 유전자가 파괴된 액티노마두라 히비스카 (*Actinomadura hibisca*) 변이균주 및 그 생성물인 디메틸프라디마이신에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우수한 항진균활성 물질인 프라디마이신의 구조에서 메틸화에 관여하는 효소인 O-메틸트랜스퍼라제(O-methyltransferase)의 유전자가 파괴되어 탈메틸화(demethylation)된 프라디마이신을 생산하는 액티노마두라 히비스카 변이균주 및 그의 생성물에 관한 것이다. 본 발명의 액티노마두라 히비스카 변이균주는 새로운 구조의 프라디마이신인 디메틸프라디마이신(demethylpradimicin)만을 생산함으로써 새로운 항진균 물질을 제공한다.

대표도 - 도3

Inactivation of O-methyltransferase gene *pdmF*



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

서열번호 1로 표시되는 프라디마이신의 구조에서 메틸화에 관여하는 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 (Pradimicin A O-methyltransferases)의 유전자 절편의 중간에 항생제 내성유전자가 삽입된 DNA 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항생제 내성유전자는 아프라마이신(apramycin) 항생제 내성유전자인 것을 특징으로 하는 DNA 단편.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자 절편은 시작코돈 부위와 종결코돈부위의 염기 서열 일부인 것을 특징으로 하는 DNA 단편.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항의 기재의 상기 DNA 단편을 포함하는 넥아웃카세트.

청구항 6

삭제

청구항 7

제2항 기재의 DNA 단편과 서열번호 2로 표시되는 프라디마이신 생합성유전자군을 가지는 코스미드클론 pBC3-3(미생물 기탁번호 ; KACC 95056P)을 포함하는 넥아웃벡터.

청구항 8

제7항 기재의 상기 넥아웃벡터로 형질전환되어 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 유전자 변이균주.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 변이균주는 액티노마두라 히비스카 변이균주 BC1(미생물 기탁번호 : KACC 95057P).

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 변이균주 BC1은 프라디마이신 유도체인 디메틸프라디마이신을 생성하는 것을 특징으로 하는 변이균주 BC1.

청구항 11

- 1) 액티노마두라 히비스카의 게놈DNA라이브러리를 코스미드벡터 이용하여 제작하고, 프라디마이신 생합성 유전자군을 포함하는 코스미드클론을 얻는 단계(단계 1) ;
- 2) 프라디마이신 A 생합성 유전자군에서 O-메틸트랜스퍼라제 유전자 DNA 단편에 항생제 저항성 유전자를 삽입하여 넥아웃(knock-out)카세트를 제작하는 단계(단계 2);
- 3) 상기 넥아웃카세트를 상기 프라디마이신 생합성유전자군을 포함하는 DNA 단편에 인티그레이션(integration)시켜 넥아웃벡터를 제조하는 단계 (단계 3);
- 4) 상기 넥아웃벡터를 액티노마두라 히비스카(*Actinomadura hibisca*)에 접합(conjugation)을 통해 도입시키고, 상동재조합(homologous recombination)을 통해 액티노마두라 히비스카균주를 형질전환시킴으로써 O-메틸트랜스퍼라제 유전자를 제거시키는 단계 (단계 4)를 포함하는 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 유

전자 변이균주의 제조방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

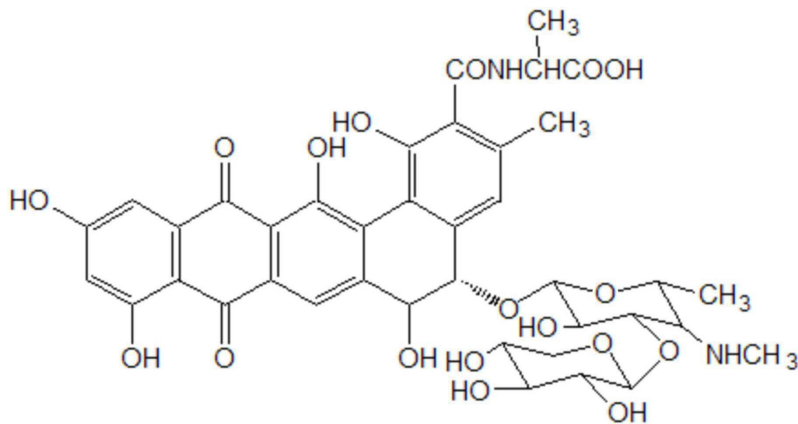
삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

하기 화학식 2로 표시되는 항균활성을 가지는 디메틸프라디마이신을 제조하는 방법에 있어서,



화학식 2

디메틸프라디마이신은 액티노마두라 히비스카 변이균주 BC1(미생물 기탁번호 : KACC 95057P)을 ISP 2 액체배지에서 배양하고 그 배양여액으로부터 분리 및 정제과정을 거쳐 수득하는 단계를 포함하여 구성되는 디메틸프라디마이신의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

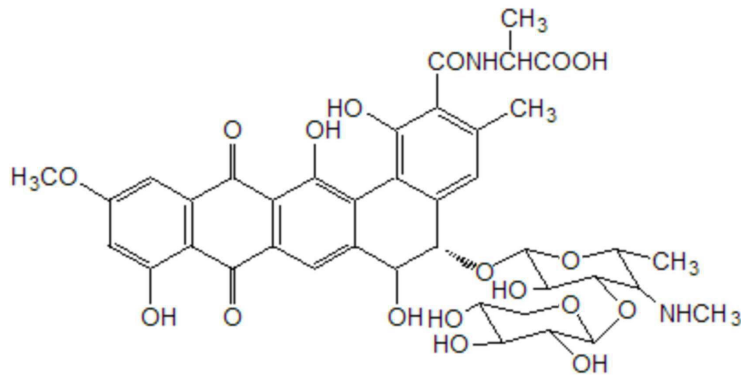
발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 프라디마이신의 생합성 유전자들 중 메틸트랜스퍼라제 (Pradimicin methyltransferases) 유전자가 파괴된 액티노마두라 히비스카 (*Actinomadura hibisca*) 변이균주 및 그 생성물인 디메틸프라디마이신에 관한 것이다. 보다 상세하게는 우수한 항진균활성 물질인 프라디마이신의 구조에서 메틸화에 관여하는 효소인 0-메틸트랜스퍼라제(0-methyltransferase)의 유전자가 파괴되어 탈메틸화 (demethylation)된 프라디마이신을 생산하는 액티노마두라 히비스카 변이균주 및 그의 항균활성을 갖는 생성물인 디메틸프라디마이신에 관한 것이다.
- <7> 프라디마이신(pradimicin)은 단일 속(genus)인 액티노마두라 (*Actinomadura*)에 속하는 계통에 의하여 생성되는 디하이드로벤조나프타신퀴논(dihydrobenzo[a]naphthacenequinone) 과(family)의 새로운 항진균 항생제이다 (Tsunakawa et al., 1989. J. Org. Chem. 54:2532-2536; Oki et al., 1988. J. Antibiotics. 41(11)1701-1704).
- <8> 이 항생제 (화학식 1)는 분자 안에 D-알라닌(D-alanine)과 디사카라이드(disaccharide)를 포함하는 벤조나프타신퀴논 화합물이다. 이 항생제는 쥐에서 곰팡이의 전신적 감염에 대해 우수한 치료적 효과를 나타내며, T-셀이 인체면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus)에의 감염을 막아주고 바이러스에 의한 신시툼

(syncytium)형성을 억제해준다 (Hoshino, et al., 1989. J. Antibiotics 42:344-346).

화학식 1



<9>

화학식 1

- <10> 또한 프라디마이신은 칸디다(*Candida*), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 아스페질러스(*Aspergillus*)를 비롯하여 여러 종류의 진균 및 식물병원진균에 대하여 *in vivo*와 *in vitro* 상태에서 우수한 활성을 나타내는 화합물이다.
- <11> 지금까지 프라디마이신의 생합성관련유전자는 폴리케타이드 부분의 생합성에 관여하는 유전자 10종만이 알려져 있고 (Dairi et al, 1997, Biosci. Biotech. Biochem.61(9):1445-1453), 나머지 생합성 유전자 특히 테일러링 (tailoring) 단계에 관여하는 유전자와 당화(glycosylation)에 관여하는 유전자들은 알려지지 않았다.
- <12> 한편, 다양한 프라디마이신이 개발 공개되어 있는데, 프라디마이신 A, B, 및 C는 유럽특허 출원 제277,621호에 기재되어 있고, 프라디마이신 D, E 및 그들의 각 데스크실로실 유도체가 1988년 6월 7일에 출원된 미국 제 203,776호에 기재되어 있다. 항균활성이 우수한 프라디마이신의 새로운 유도체 개발에 대한 계속적인 요구가 있어 왔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

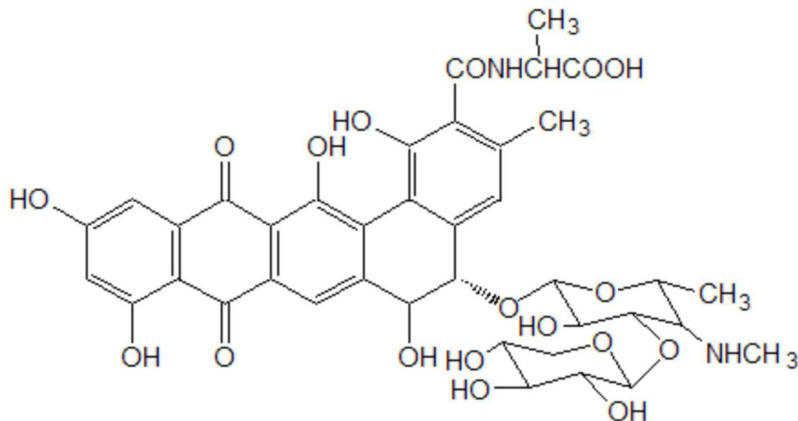
- <13> 본 발명은 종래 기술의 문제점 및 상기 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 뛰어난 항진균 활성 물질인 프라디마이신의 새로운 유도체를 만들기 위하여 프라디마이신의 생합성에 관련된 유전자들을 분자 생물학적인 방법으로 탐색하고, 그 중 프라디마이신의 구조에서 메틸화에 관여하는 *O*-메틸트랜스퍼라제 (Pradimicin methyltransferases)의 유전자를 파괴하여, 이렇게 제작된 새로운 액티노마두라 히비스카 (*Actinomadura hibisca*) 변이균주로 하여금 새로운 프라디마이신 유도체인 디메틸프라디마이신을 생성하도록 하는 것이다. 본 발명은 이러한 생합성유전자의 조작을 통하여 항균활성을 지닌 새로운 구조의 프라디마이신 유도체를 생성함으로써 새로운 항진균물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

- <14> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 새로운 프라디마이신 유도체를 개발하기 위하여, 프라디마이신 화합물의 생합성유전자 중 테일러링(tailoring)에 관여하는 유전자를 상기 액티노마두라 히비스카 균주의 게놈DNA 라이브러리를 제작하여 확인, 확보하였고, 이들 유전자 중 메틸레이션에 관여하는 유전자를 조작함으로써 새로운 구조의 프라디마이신 유도체를 생산하는 변이균주를 개발하고 이 물질의 항균활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <15> 따라서 본 발명은 프라디마이신의 구조에서 메틸화에 관여하는 *O*-메틸트랜스퍼라제 (Pradimicin methyltransferases)의 유전자(서열번호 1) 및 상기 프라디마이신 A *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자 절편의 중간에 항생제 내성유전자가 삽입된 DNA 단편을 제공한다.
- <16> 바람직하게는 상기 항생제 내성유전자는 아프라마이신(apramycin) 항생제 내성유전자이다.
- <17> 또한 본 발명은 상기 DNA 단편을 포함하는 벡터카세트를 제공한다.
- <18> 본 발명은 상기 DNA 단편으로 형질전환되어 프라디마이신 A *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 유전자 변이균주를 제공한다. 바람직하게는 상기 변이균주는 액티노마두라 히비스카 변이균주 BC1(미생물 기탁번호 : KACC

95057P)이고, 상기 변이균주 BC1이 생산하는 것은 신규 프라디마이신 유도체인 디메틸프라디마이신(화학식 2)이다.

화학식 2



<19>

화학식 2

<20>

나아가 본 발명은 상기 유전자 변이균주의 제조방법과 변이균주로부터 신규의 디메틸프라디마이신을 생산하는 방법과 그로부터 생산되는 신규의 항진균 활성물질을 제공한다.

<21>

이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

<22>

본 발명은 프라디마이신의 구조에서 메틸화에 관여하는 O-메틸트랜스퍼라제 (Pradimicin methyltransferases)의 유전자(서열번호 1, 도 2 참조) 및 상기 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자 절편의 중간에 항생제 내성 유전자가 삽입된 DNA 단편을 제공한다. 상기에서 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자의 시작코돈부위와 종결코돈부위의 염기서열이 각각 36개 뉴클레오타이드씩 포함되는 PCR primer를 제작하여 아프라마이신 항생제 내성유전자와 *OriT* 유전자를 동시에 증폭하여 상기 유전자의 일부를 포함하는 DNA 단편을 분리하였다 (도 2 참조). 상기 DNA 단편은 넥아웃카세트로서 역할을 한다. 상기 DNA 절편이 포함된 넥아웃카세트를 이용하여 아프라마이신 항생제 저항성유전자와 방선균과 대장균의 접합에 관여하는 유전자를 상기 O-methyltransferase를 제거하고 대신에 삽입하였다. 이를 위하여 PCR 타겟팅 기술 (Gust *et al.* 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. 100(4):1541-1546)을 사용하였으나, 다양한 기술이 적용될 수 있다.

<23>

본 발명은 프라마이신 생합성유전자군을 가지는 코스미드백터를 제공한다. 염기서열 2로 표시되는 상기 코스미드백터는 전체 37.1kb의 전체 염기서열이 총33개의 ORF(Open Reading Frame)로 구성된다(도 1 참조). 이들 유전자군내에는 폴리케타이드의 생성에 관여하는 유전자 외에도 각종 유전자 즉, O-메틸트랜스퍼라제, 아미도트랜스퍼라제, 사이클라제 등과 당화(glycosylation)에 관여하는 유전자등이 발견되었다. 상기 코스미드백터는 pBC3-3' 이라 명명하고, 상기의 pBC3-3 코스미드 클론은 농업생명공학연구원내 농업생물자원센터에 균주기탁하였다 (미생물 기탁번호: KACC 95056P)다.

<24>

또한 본 발명은 상기 DNA 단편을 포함하는 넥아웃카세트로 형질전환된 프라디마이신 생합성유전자군을 가지고 있는 코스미드백터(도 3 참조)를 이용하여 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 유전자 변이균주를 제공한다. 본 발명자들은 상기에서 제조된 넥아웃백터를 프라디마이신 생산 균주인 액티노마누라 히비스카에 형질전환시켜 액티노마누라 히비스카의 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자를 파괴함으로써 디메틸프라디마이신을 생성하는 변이균주를 제조하여 액티노마누라 히비스카 BC1 균주로 명명하였고 농업생명공학연구원내 농업생물자원센터에 균주기탁하였다(미생물기탁번호: KACC 95057P).

<25>

본 발명의 넥아웃백터를 이용하여 액티노마누라 히비스카를 형질전환시키면 넥아웃백터세트내 O-메틸트랜스퍼라제 유전자의 일부 염기서열과 염색체내 O-메틸트랜스퍼라제 유전자 염기서열이 동일하여 염기서열간의 상동 재조합현상이 유도된다. 상기 상동 재조합 현상으로 O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 변이균주가 제조된다.

<26>

본 발명자들은 HPLC를 이용하여 상기 변이균주가 디메틸프라디마이신을 생산함을 확인하였고(도 4 참조), 박막 크로마토그래피를 이용하여 상기 디메틸프라디마이신의 항균활성도 확인하였다(도 5 참조).

<27>

본 발명에 의한 프라디마이신 A O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 유전자 변이균주의 제조방법 및 그 변이균

주로부터 신규의 디메틸프라디마이신을 생산하는 방법은,

- <28> 1) 액티노마누라 히비스카의 게놈DNA라이브러리를 코스미드벡터 이용하여 제작하고, 프라디마이신 생합성 유전자군을 포함하는 코스미드클론을 얻는 단계(단계 1) ;
- <29> 2) 프라디마이신 A 생합성 유전자군에서 *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자를 DNA 단편에 항생제 저항성 유전자를 삽입하여 닉아웃(knock-out)카세트를 제작하는 단계(단계 2);
- <30> 3) 상기 닉아웃카세트를 상기 프라디마이신 생합성유전자군을 포함하는 DNA 단편에 인티그레이션(integration)시키는 단계 (단계 3);
- <31> 4) 상기 형질전환된 DNA단편을 액티노마두라 히비스카(*Actinomadura hibisca*)에 접합(conjugation)을 통해 도입시키고, 다시 상동재조합(homologous recombination)을 통해 액티노마두라 히비스카균주를 형질전환시킴으로써 *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자를 제거시키는 단계 (단계 4);
- <32> 5) 항생제를 이용하여 상기 *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 변이균주를 선발하는 단계(단계 5);
- <33> 6) 상기 선발된 *O*-메틸트랜스퍼라제가 제거된 변이균주를 ISP 2 액체배지에서 배양하고 그 배양여액으로부터 분리 및 정제과정을 거쳐 디메틸프라디마이신을 생산하는 단계(단계 6)로 구성된다.

<34> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<35> **<실시예 1> 프라디마이신 생합성유전자의 검출 및 확인**

<36> 상기 단계 1을 구체적으로 설명하면, 프라디마이신 생산균주인 액티노마두라 히비스카 ATCC 53557로부터 염색체 라이브러리 (Chromosomal DNA library)를 제조한 후 이 라이브러리를 코스미드 벡터 pCC2FOS를 이용하여 구축한 후 상기 라이브러리에서 케토신세이즈(ketosynthase)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)를 이용하여 (Dairi et al., Biosci. Biotech. Biochem. 1997, 61(9):1445~1453) PKS(polyketide synthase) 유전자가 포함된 클론을 PCR기법을 이용하여 선발하였다.

<37> 상기 선발된 코스미드클론이 프라디마이신 생합성유전자군을 포함하고 있는지를 확인하기 위하여, 케토신세이즈 유전자를 하기 실시예 2와 3의 방법을 통해 닉아웃(knock-out)하였다. 그 결과 액티노마두라 히비스카에서 생성되던 붉은색의 프라디마이신이 더 이상 생산되고 있지 않음을 HPLC를 통해 확인하였다.

<38> 상기 프라디마이신 생합성유전자군을 가지고 있는 코스미드벡터를 ‘pBC3-3’ 이라 명명하였다. 상기 클론을 (주)제노텍에 변형된 샷건 전체 지놈 해독(modified shotgun whole genome sequencing)을 이용하여 전체 염기 서열을 분석하였다(서열번호 2).

<39> 다음에, 전체 37.1kb의 전체 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST기능을 이용하여 총33개의 ORF(Open Reading Frame)로 세분하였다(도 1). 이들 유전자군내에는 폴리케타이드의 생성에 관여하는 유전자 외에도 각종 유전자 즉, *O*-메틸트랜스퍼라제, 아미도트랜스퍼라제, 싸이클라제 등과 당화(glycosylation)에 관여하는 유전자 등이 발견되었다. 상기의 pBC3-3 코스미드 클론은 농업생명공학연구원내 농업생물자원센터에 균주기탁하였다 (기탁번호: KACC 95056P)

<40> **<실시예 2> 프라디마이신 생합성유전자 중 하나인 *O*-메틸트랜스퍼라제(*O*-methyltransferase) 유전자의 닉아웃(knock-out)카세트의 제작 및 대장균에서의 상동재조합(homologous recombination)에 의한 상기 생합성유전자의 제거법**

<41> 상기 실시예 1에서 얻은 코스미드클론(pBC3-3)에서 *O*-메틸트랜스퍼라제만을 제거하기 위하여 항생제저항성 유전자 카세트를 제작하였다. *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자(도 2)를 닉아웃시키기 위해서 아프라마이신 항생제 저항성 유전자와 방선균과 대장균의 접합에 관여하는 유전자인 *OriT* 유전자를 이용하는 PCR 타겟팅 기술 (Gust et al. 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. 100(4):1541~1546)을 사용하였다.

<42> 이를 위하여, 아프라마이신 항생제 저항성 유전자와 *OriT* 유전자를 안쪽에 지니고 이들 유전자의 바깥쪽 5' 말단과 3' 말단에 각각의 *O*-메틸트랜스퍼라제 유전자의 시작코돈부위와 종결코돈부위의 염기서열이 각각 36개 뉴클레오타이드씩 포함되어 있는 닉아웃(knock-out)카세트를 제작하여 사용하였다.

<43> 선발된 코스미드클론 (pBC3-3)에 인코딩되어 있는 프라디마이신 생합성유전자군 내에 존재하는 *O*-메틸트랜스퍼

라제를 제거하기 위하여, 첫번째로 pBC3-3 벡터를 균주 BW25113에 전기천공법(electroporation)을 이용하여 형질전환시켜주고 50 μ g/ml의 엠페실린(ampicillin)과 50 μ g/ml의 클로람페니콜(chloramphenicol)을 함유하는 LB(Luria-Bertani) 한천배지에서 배양하여 형질전환체를 선별하였다.

<44> 다음에, pBC3-3이 들어간 대장균 균주 BW25113을 원형질체(competent cell)로 키워서 상기 넥아웃카세트를 전기천공법을 이용하여 대장균 균주 BW25113에 넣어서 그 안에 존재하는 람다 레드 재조합 벡터(λ Red recombination vector)인 pIJ790에 의해서 재조합(recombination)되어 pBC3-3에 인티그레이션(integration)되도록 유도하였다.

<45> 그 후 50 μ g/ml의 엠페실린(ampicillin)과 50 μ g/ml의 아프라마이신 항생제를 함유하는 LB(Luria-Bertani) 한천배지에서 배양하여 재조합(recombination)된 형질전환체를 선별하였다 (Bertolt G. *et al.*, John Innes Centre, England).

<46> 이렇게 선발된 대장균 균주(pBC3-3M/BW25113)에서 O-메틸트랜스퍼라제 제거 여부를 확인해보기 위하여 넥아웃에 사용된 양 프라이머의 바깥쪽으로 약 100bp 떨어진 염기서열을 프라이머로 제작하고 재조합후 선발된 군체(colony)를 템플레이트로 하는 PCR을 시행한 결과, O-메틸트랜스퍼라제 대신에 약 1.6kb 크기의 넥아웃카세트가 인티그레이션(integration)되었음을 확인하였다. 따라서 이 대장균 균주가 가지고 있는 코스미드벡터 (pBC3-3M)는 프라디마이신 생합성 유전자 중에 O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 제거된 생합성 유전자 DNA단편을 가지고 있음이 확인되었다.

<47> 상기 제작된 O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 넥아웃된 코스미드벡터 pBC3-3M의 방선균으로의 도입을 위하여, 방선균의 강력한 메틸특이적인 제한 기작(methyl-specific restriction system)을 피할 목적으로, pBC3-3M을 대장균 균주 BW25113로부터 분리하여, 메틸화가 결여된 대장균(methylation-deficient *E.coli*) ET12567/pUZ8002에 전기천공법을 이용하여 도입하고, 50 μ g/ml의 아프라마이신(apramycin)과 50 μ g/ml의 카나마이신이 들어있는 LB 한천배지에서 형질전환된 군체를 선별하였다.

<48> <실시예 3> 프라디마이신 O-메틸트랜스퍼라제의 유전자가 파괴된 액티노마두라 히비스카 변이 균주의 제조

<49> 본 발명의 액티노마두라 히비스카의 프라디마이신생합성 유전자 중 O-메틸트랜스퍼라제 유전자가 파괴된 변이균주를 얻기 위하여 상기 실시예 2에서 만들어진 O-메틸트랜스퍼라제가 넥아웃된 프라디마이신 생합성 유전자균을 가지고 있는 코스미드벡터 (pBC3-3M)를 접합(conjugation)을 통해 대장균 균주 ET12567로부터 액티노마두라 히비스카균주로 도입시켰다.

<50> 이를 위하여, ET12567/pBC3-3M 균주를 50 μ g/ml의 아프라마이신(apramycin)과 50 μ g/ml의 카나마이신이 들어있는 액체배지 LB에서 5ml만 전배양 후 다시 동일한 50 μ g/ml의 아프라마이신(apramycin)과 50 μ g/ml의 카나마이신이 들어있는 LB 액체배지 20ml에 1%의 상기 전배양을 접종한 후 37℃에서 4시간 동안 OD₆₀₀값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 상기 배양액을 동일량의 액체배지 LB로 2번 워싱(washing)해준다.

<51> 동시에, ISP 2 한천배지 [효모 추출액(Yeast extract) 4g, 맥아 추출액(Malt extract) 10g, 포도당(Dextrose) 4g]에서 21일간 28℃에서 키운 액티노마두라 히비스카의 기중균사(aerial hypha)를 루프를 이용하여 잘 끊어서 500 μ l의 2 X YT 액체배지 [트립톤(Tryptone) 16g, 효모 추출액(Yeast extract) 10g, 염화나트륨(Sodium chloride) 5g]에 현탁시킨다. 상기 현탁액을 동일한 500 μ l의 2 X YT 액체배지에서 한번 워싱해 준다. 다음에, 상기 현탁액을 50℃에서 10분간 열충격(heat-shock)을 가해주고 상온에서 5분간 식혀준다.

<52> 다음에, 상기의 대장균 균주 ET12567/pBC3-3M과 방선균 액티노마두라 히비스카를 각각 500 μ l씩 섞고 30초간 13,000rpm에서 원심분리한 후 대부분의 상등액을 버리고 남아있는 현탁액을 10mM의 MgCl₂가 포함된 MS 한천배지 [만니톨(Mannitol) 20g, 콩가루(Soybean meal) 20g]에 도말하고 28℃에서 20시간 배양하고 25 μ g/ml농도의 0.5mg 날리디식 엑시드(nalidixic acid)와 50 μ g/ml농도의 1.25mg 아프라마이신(apramycin)이 들어있는 멸균수 1ml을 덮어주었다.

<53> 다음에, 28℃에서 5일간 배양 후 균총이 형성되면 이를 25 μ g/ml의 날리디식 엑시드(nalidixic acid)와 50 μ g/ml의 아프라마이신(apramycin)이 들어있는 MS 한천배지에 옮겨주었다. 형성된 변이균주는 O-메틸트랜스퍼라제가 제거되고 그 자리에 넥아웃카세트가 도입된 프라디마이신 생합성유전자균 (도 3 참조)을 가지고 있음을 PCR과 서던혼성화(southern hybridization)를 통해 확인하였다. 상기의 O-메틸트랜스퍼라제가 제거된 변이균주는 액티노마두라 히비스카 BC1 균주로 명명하였고 농업생명공학연구원내 농업생물자원센터에 균주기탁하였다 (기탁번호: KACC 95057P).

<54> <실시예 4> 프라디마이신 O-메틸트랜스퍼라제의 유전자가 파괴된 변이균주 BC1 으로부터 생산되는 디메틸프라디마이신의 순화 및 항균활성

<55> 넥아웃 실험이 끝난 변이균주 BC1을 1L크기의 플라스크에 담긴 100ml의 ISP 2 액체배지에서 7일간 28℃에서 170rpm으로 회전진탕 배양하였다.

<56> ISP 2 배지 조성

<57> 효모 추출액 (Yeast extract) 4g

<58> 맥아 추출액 (Malt extract) 10g

<59> 포도당 (Dextrose) 4g

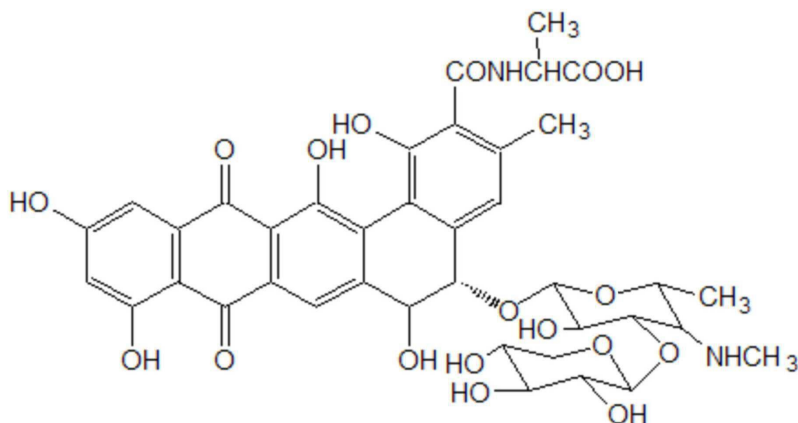
<60> 상기에서 얻은 배양액의 pH를 2.0으로 맞추고, 분획여주를 이용하여 부탄올과 메탄올로 추출이 가능하며 동량의 부탄올과 1%의 메탄올로 방선균 균체로부터 추출하였다.

<61> 추출액을 8,000rpm에서 30분간 원심분리(centrifuge)하여, 배양여액과 균사체를 분리하였다.

<62> 분리한 배양여액을 감압농축기(evaporator)를 이용하여 1 mL의 메탄올에 최종적으로 녹이고 보관하였다.

<63> 상기의 메탄올을 유속 2 mL/min, UV 검출 210nm, 용매 0.1% 포믹엑시드를 포함한 20%-95% 메탄올을 이용하는 조건으로, HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)를 수행하여 분획함으로써 순화하였다 (도 4).

<64> 순화된 디메틸프라디마이신을 수소핵자기공명기로 그 구조를 확인한 결과 액티노마주라 히비스카 균주가 생성하는 프라디마이신구조에서 발견되는 화학적 이동(chemical shift) 3.96 ppm에서의 메톡시 프로톤들이 제거된 것을 확인함으로써, 상기의 변이균주가 생성하는 물질은 프라디마이신구조의 메톡시 그룹에서 메틸그룹이 제거된 하기 화학식 2의 디메틸프라디마이신임을 확인하였다.



<65> 화학식 2

<66> 순화된 디메틸프라디마이신의 항균활성을 검정하기 위하여, 시료를 박막실리카에 부착한 후, 부탄올과 아세트익시드와 증류수를 각각 3 : 0.5 : 1의 비율로 섞은 전개용매를 이용하여 박층크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. 이렇게 전개한 실리카겔(silica gel)판으로 생물학적 검정(bioassay)을 실시하여 항균활성을 조사하였다. 생물학적 검정 결과, 푸자리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)에 대해 균사생장 억제효과를 나타내었다 (도 5 참조).

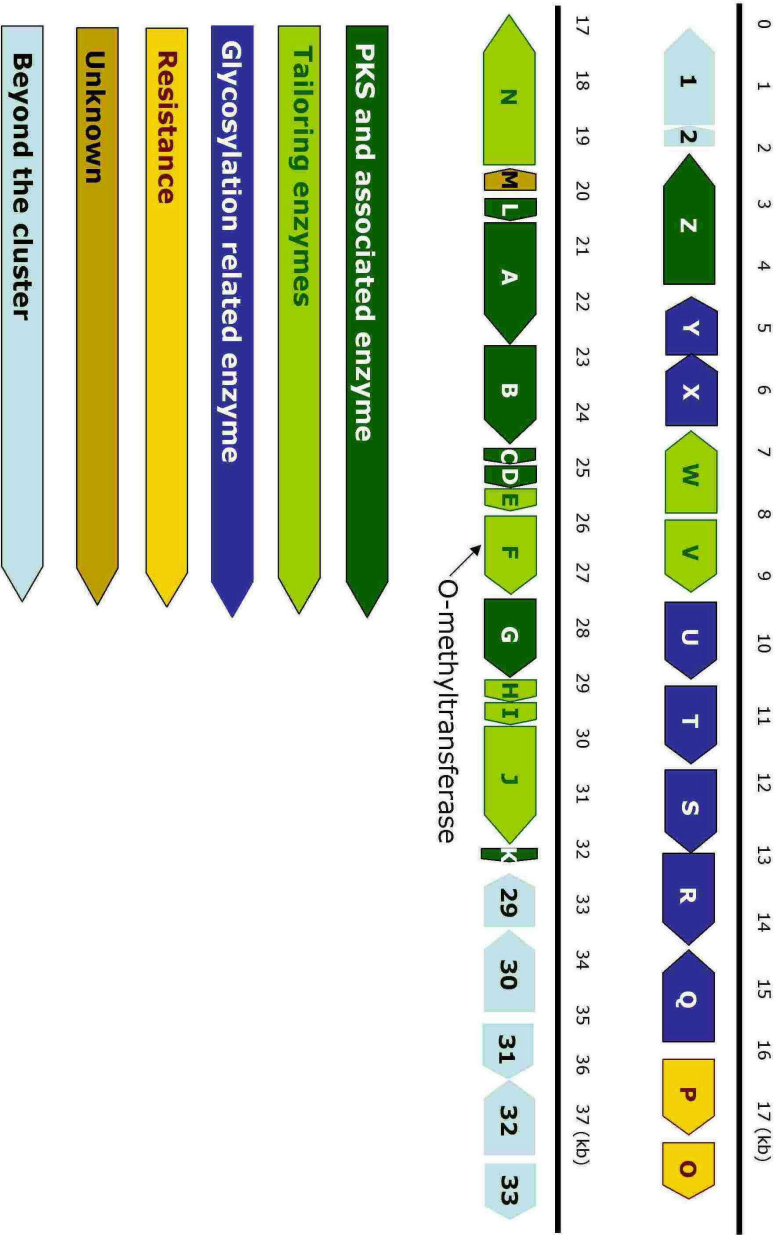
발명의 효과

<67> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 항진균 항생제인 프라디마이신을 생성하는 액티노마주라 히비스카로부터 프라디마이신의 생합성에 관여하는 유전자군을 확보하고, 이들 생합성 유전자 중 O-메틸트랜스퍼라제를 제거한 변이균주를 제작함으로써, 기존에 알려져 있지 않은 신규의 프라디마이신 유도체인 디메틸프라디마이신(demethylpradimicin)을 제공하였다. 상기의 신규의 프라디마이신 유도체는 식물병원진균의 푸자리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)에 대해 항균활성이 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명은 항생물질의 생합성유전자의 조작을 통한 신규의 항균활성물질을 생산한 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 프라디마이신 생합성 유전자를 포함하는 코스미드 클론 중에 프라디마이신의 구조 생성에 관여하는 각종 테일러링(tailoring) 유전자들과 프라디마이신 아글리콘(aglycon)의 당화(glycosylation)에 관여하는 유전자들을 포함하는 DNA 단편의 개열지도를 나타낸 도면이고,
- <2> 도 2는 프라디마이신 생합성유전자 중 하나인 서열번호 1로 표시되는 O-메틸트랜스퍼라제의 DNA 염기서열과 다크아웃카세트 제작에 사용된 염기서열 부분을 막대로 표시한 도면이고,
- <3> 도 3은 상기 도 1의 DNA 단편을 이용하여 프라디마이신 생합성유전자 중 O-메틸트랜스퍼라제의 유전자를 제거하는 과정을 나타낸 모식도이고,
- <4> 도 4는 액티노마두라 히비스카 변이균주 BC1의 배양액 추출물 내 프라디마이신 화합물을 고속 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, 이하 HPLC로 약칭함)로 분석한 결과를 나타낸 그래프이고,
- <5> 도 5는 본 발명의 액티노마두라 히비스카 변이균주 BC1이 생성하는 디메틸프라디마이신의 항균활성을 박막크로마토그래피 판에서 식물병원진균에 대한 항균활성으로 검정한 결과를 나타낸 사진으로, 좌측은 곰팡이포자를 덮어 항균활성 저지원을 확인한 사진이고 우측은 곰팡이포자를 덮기 전의 박막크로마토그램의 전개양상을 보여주는 사진이다.

The biosynthetic gene cluster of pradimicin (PDM)



도면1

도면2

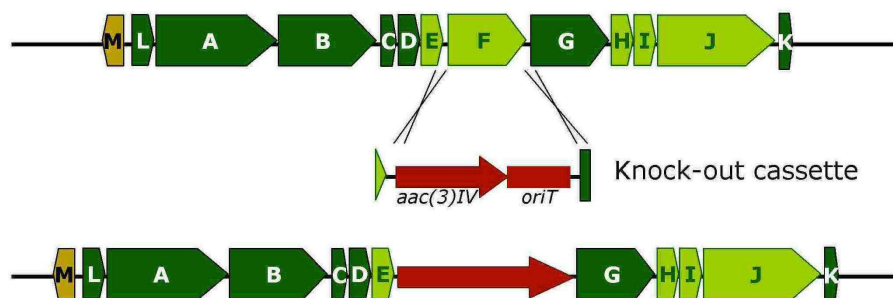
```

5'- CGGCGTGCTGCTGTGACCGATCGGGAAGGGAGGGAC
   O-methyltransferase ORF start
   ATGACCGAACC GGAAGGACCGCACGCCGCGAGCCTGCGGC
   TCGAATCTCTGCTGGACGGCATGCGCGTCGCCAAGGTCGT
   GCAGGTGCTCGCCGAACCTCAGGTGGCCGACGCGTCCGCC
   GACGGCCCCTGCAAGCCCGCCGAGATCGCCGCCGACGTCG
   GCGCCGACCCCGACGCGCTGTACCGGGTGCTGCGCTGCGC
   CGCCTCGTTCGGGGTGTTACCGAGGACGAGGACGGCCGG
   TTCGGGCTCACCCCGATGGCCGCGCTGCTGCGCACCGGCA
   CCGACGACAGCCACCGCGACCTGTTATGATGGCGGCGGG
   CGACCTGTGGTGCGGCCGTACGGCGAGCTGCTGGAGACG
   GTGCGGACCGGCCGCCCGCCGCCGAGCTGGCGTTCGGGA
   TGCCGTTCTACGACTACCTCGGCACCGACCCGGCCGCCGCC
   GGGCTCTTCGACCGCGCGATGACGCAGGTCAGCAAGGGC
   CAGGCGAAGGCGATCCTCGGCCGCTGCTCGTTCGAGCGGT
   ACGCGCGGATCGCCGACGTGGGCGGCGGCCACGGTACTT
   CCTCGCGCAGGTGTTGCGCAGCAGCCCGCGCACCGAGGGC
   GTGCTGTGGACCTGCCGCACGTGGTGCCGGAGCCCCGG
   CGGTGCTGGAGAAGCACGAGGTCGCCGACCGCGTCCAGGT
   CGTCCCGGGCAGCTTCTTCGACGCGCTGCCACCGGCTGC
   GACGCCTACCTGCTGAAAGCGATCCTCATCAACTGGCCGA
   CGCCGACGCCGAACGCATCCTGCACCGGGTGCGCGAGGC
   GATCGGCACCGACCGCGACGCGCGGCTGCTGGTGGTCGAG
   CCCGTCGTCCCGCCCGCGACGTCCGCGACTACAGCAAGG
   CCACCGACATCGACATGCTCGCCATCATCGGCGGGCGGCA
   GCGCACCGTCGCCGAGTGGCGGCGGCTGCTGCGCGCGGG
   CGGCTTCGAGCTGGTGGGCGAGCCACGCCGGGCCGCCGC

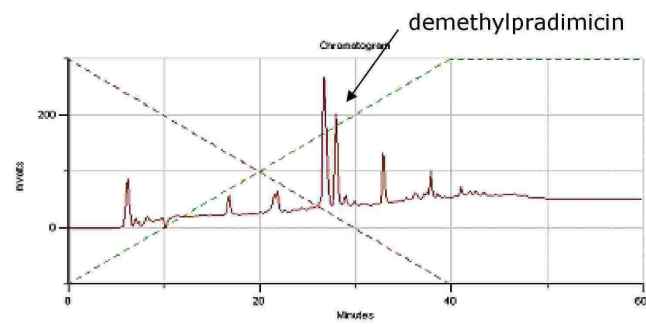
   GAGGTCATGGAGTGCCGCCCATCTGACCCGTCCCACCCGT
   CGCCCACATCCAGGGAGAACGCATG -3'
  
```

도면3

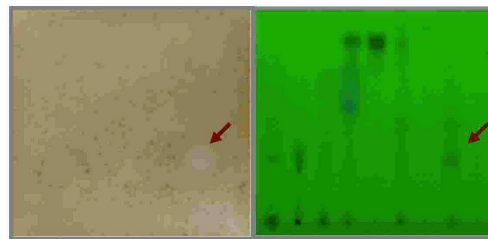
Inactivation of *O*-methyltransferase gene *pdmF*



도면4



도면5



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)