

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 1월 11일 (11.01.2018) **WIPO | PCT**

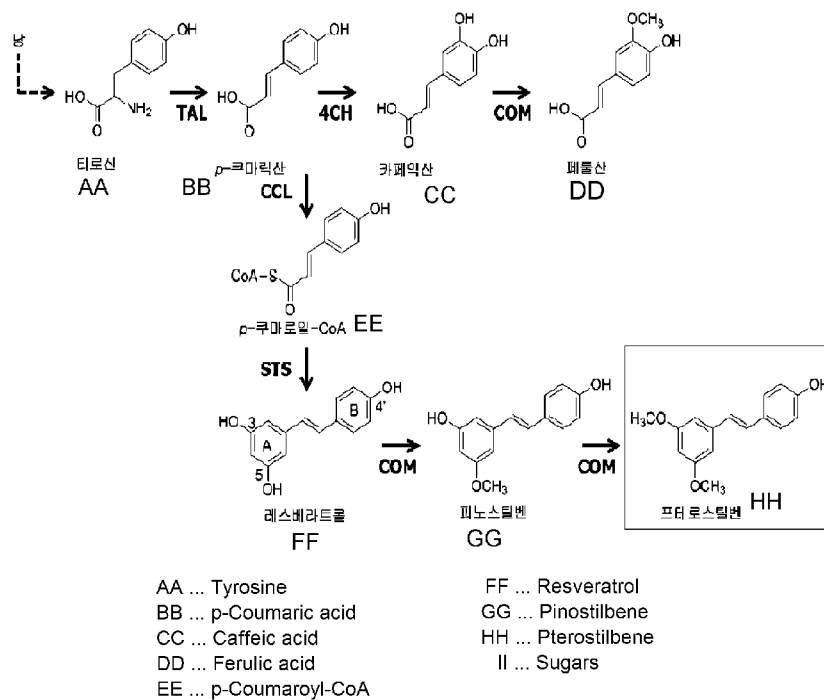


(10) 국제공개번호
WO 2018/008979 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/63* (2006.01) *C12P 7/22* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/007183
- (22) 국제출원일: 2017년 7월 5일 (05.07.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0085698 2016년 7월 6일 (06.07.2016) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 홍영수 (HONG, Young Soo); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 강선영 (KANG, Sun Young); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 허경택 (HEO, Kyung Taek); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이재경 (LEE, Jae Kyoung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: RECOMBINANT VECTOR FOR PRODUCING PINOSTILBENE OR PTEROSTILBENE

(54) 발명의 명칭: 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터



(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant vector for producing pinostilbene or pterostilbene, a transformant for producing pinostilbene or pterostilbene, and a method for producing pinostilbene or pterostilbene. The use of the recombinant vector for producing pinostilbene or pterostilbene according to the present invention allows pinostilbene or pterostilbene to be obtained through a single vector system, and is economical, since pinostilbene or pterostilbene is mass-produced even from simple sugars alone via a microbial metabolic pathway. In addition, pinostilbene or pterostilbene produced using the recombinant vector has anticancer, anti-inflammatory, antihyperlipidemic, and antioxidative effects and thus can be beneficially used in the pharmaceutical industry.

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체 및 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법에 관한 것이다. 본 발명의 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터를 이용 시, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 단일 벡터 시스템으로 수득 가능하고, 미생물 대사경로를 통하여 단순 당만으로도 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 대량생산하므로 경제적이다. 또한, 상기 재조합 벡터로 생산된 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤은 항암 효과, 항염증 효과, 항고지혈증 효과 및 항산화 효과를 가지므로, 의학 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터 기술분야

- [1] 본 발명은 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체 및 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 스틸벤은 페닐알라닌으로 시작하는 일반적인 페닐프로파노이드 경로로부터 유래된 식물 2차 대사산물의 작은 클래스이다. 스틸벤류라고도 하며, 스틸벤류에는 항곰팡이 작용, 항말라리아 작용 및 암 억제 작용을 가진 것이 있고, 이러한 점 때문에 합성 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 상기 스틸벤은 여러 종류가 있으며, 시스 및 트랜스 두 형으로 상호 변환이 가능하다. 이 중 트랜스형의 화합물이 일반적으로 녹는점이 높고, 시스형 화합물보다 안정되어 있다. 상온에서도 시스형 화합물은 브롬화수소의 작용으로 공기 및 태양 광선의 존재하에서 트랜스형으로 변화한다. 혼적의 요오드, 브롬도 똑같은 작용을 한다. 트랜스형 화합물을 자외선으로 조사(照射)하면 높은 에너지의 시스형으로 변화한다.
- [3] 그 중, 피노스틸벤(pinostilbene; 3,4'-dihydroxy-5-methoxy-transstilbene)은 SH-SY5Y 세포에서 6-하이드록시도파민-유도성 신경독성(6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity)에 대해 레스베라트롤보다 더 강한 신경보호(neuroprotective) 효과를 발휘한다는 것이 보고되었다 (Chao et al., J Nutr Biochem 21:482-489, 2010). 또한, 더 소수성인 피노스틸벤은 쉽게 세포막에 침투할 수 있기 때문에, 효과적인 세포 내 용량 (dosage) 및 향상된 생물이용성을 나타냄이 보고되어 있다.
- [4] 프테로스틸벤(pterostilbene; 3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-transstilbene)은 메틸화 스틸벤계 화합물 중 하나로, 포도와 블루베리에서 발견되었고, 식물체가 감염에 대응하여 생성해내는 물질 중 하나이다. 프테로스틸벤은 항암효과, 고중성지방혈증 또는 고콜레스테롤혈증의 감소에 효과가 있음이 입증되었고, 경구 섭취 시, 생체 이용 효율이 높고, 체내에서 다른 항산화 폴리페놀 성분보다 천천히 대사되어 항산화 활성이 오래 지속되는 효과가 있다. 그러나, 상기과 같은 우수한 효과에도 불구하고 식물 내 함유량이 적어 한정된 양만 추출 가능하여, 높은 수율과 순도로 생산할 수 있는 방법에 대한 연구가 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 이에 본 발명자는 높은 수율 및 순도로 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 생산하기 위해 연구하던 중, COM, 4CL2, TAL 및 STS의 유전자를 포함하는

제조합 벡터가 도입된 형질전환체는 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 생산함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[6] 본 발명의 목적은 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 제조합 벡터를 제공하는 것이다.

[7] 또한 본 발명의 목적은 상기 제조합 벡터로 형질전환된 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체를 제공하는 것이다.

[8] 또한 본 발명의 목적은 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시된 염기서열로 이루어진 COM(caffeic acid O-methyltransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 피노스틸벤(Pinostilbene) 또는 프테로스틸벤(Pterostilbene) 생산용 제조합 벡터를 제공한다.

[10] 또한 본 발명은 상기 제조합 벡터로 형질전환된 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체를 제공한다.

[11] 또한 본 발명은 당이 첨가된 배지에 상기 형질전환체를 배양하여 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 수득하는 단계;를 포함하는 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[12] 본 발명의 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 제조합 벡터를 이용 시, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 단일 벡터 시스템으로 수득 가능하고, 미생물 대사경로를 통하여 단순 당만으로도 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 대량 생산하므로 경제적이다. 또한, 상기 제조합 벡터로 생산된 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤은 항암 효과, 항염증 효과, 항고지혈증 효과 및 항산화 효과를 가지므로, 의약 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 COM 효소 반응에 의한 카페익산 메틸전이효소(caffeic acid O-methyltransferase) 활성을 HPLC 분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[14] 도 2는 COM 효소의 레스베라트롤 메틸전이효소(resveratrol methyltransferase) 활성을 통한 프테로스틸벤(pterostilbene) 생산을 확인한 결과를 HPLC 분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[15] 도 3은 도 2의 피노스틸벤(피크 2)를 LC/MS 및 LC/MS/MS로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

[16] 도 4는 도 2의 피노스틸벤(피크 2)를 화학식으로 나타낸 도이다.

[17] 도 5는 도 2의 프테로스틸벤(피크 3)을 LC/MS 및 LC/MS/MS로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

[18] 도 6은 도 2의 프테로스틸벤(피크 3)를 화학식으로 나타낸 도이다.

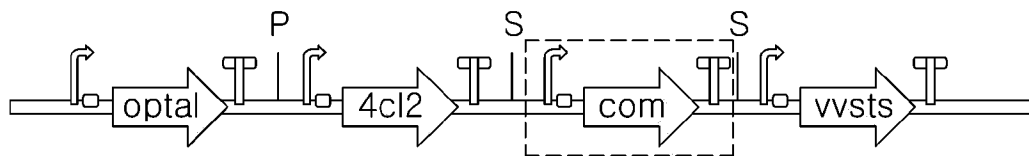
- [19] 도 7은 레스베라트롤을 생산하는 pET-opT4vS 재조합 벡터 및 프테로스틸벤을 생산하는 pET-opT4CvS 재조합 벡터에 대한 모식도를 나타낸 도이다.
- [20] 도 8은 pET-opT4CvS 벡터로 형질전환 된 대장균(C41) 배양물에서 프테로스틸벤 생산을 HPLC (320nm)로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 9는 pET-opT4CvS 벡터로 형질전환 된 대장균(C41) 배양물에서 프테로스틸벤 생산을 LC/MS를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 10은 프테로스틸벤 고 생성능을 갖는 균주(Δ COS4-A) 개량을 모식화한 도이다.
- [23] 도 11은 pET-opT4CvS 벡터로 형질전환 된 대장균(C41) 와 COS4-A 균주의 M9C 배지 배양물에서 프테로스틸벤 생산능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [24] 도 12는 pET-opT4CvS 벡터로 형질전환 된 대장균(C41) 와 COS4-A 균주의 메티오닌 첨가 배지 (M9M) 배양물에서 프테로스틸벤 생산능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [25] 도 13은 본 발명의 재조합 벡터를 이용한 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤의 생산과정을 모식화한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 본 발명은 서열번호 1로 표시된 염기서열로 이루어진 COM(caffeic acid O-methyltransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 피노스틸벤(Pinostilbene) 또는 프테로스틸벤(Pterostilbene) 생산용 재조합 벡터를 제공한다.
- [27] 본 발명에 있어서, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명에서 상기 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [29] 본 발명에서 상기 "목적 유전자의 발현"은 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체(숙주세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법일 수 있으며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.

- [30] 본 발명에서 사용될 수 있는 발현 벡터는 원핵세포 또는 진핵세포에서 외래단백질을 발현시키기 위해 사용되는 것이라면 어떤 것이라도 사용가능하다. 바람직하게는 원핵세포용 재조합 벡터이고, 진핵세포용 재조합 벡터의 경우, 효모용 곤충용 또는 포유 동물 세포용 재조합 벡터의 사용이 가능하나 효모용 재조합 벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 상업적으로 이용 가능한 원핵세포용 벡터로는 pET 벡터(Novagen, Inc., USA), pQE 벡터(Qiagen, USA) 및 pGEX(Pharmacia Biotech Inc., USA) 등이 존재하나 이에 제한되는 것은 아니고, 상업적으로 이용가능한 진핵세포용 발현벡터로는 pCI Neo(Promega, USA), pMAMneo(Clontech, USA), pcDNA3(InVitrogen, USA), pMCLneo(Stratagene, USA), pXT1(Stratagene, USA), pSG5(Stratagene, USA), EBO-pSV2-neo(ATCC 37593), pBPV-1(8-2)(ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12)(ATCC 37224), pRSVgpt(ATCC 37199), pRSVneo(ATCC 37198), pSV2-dhfr(ATCC 37146), pUCTag(ATCC 37460) 및 IZD35(ATCC 37565) 등 일 수 있으며, 독립적으로 발현 조절을 받을 수 있도록 프로모터 및 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [31] 또한 본 발명은 COM을 코딩하는 유전자에 더하여, 추가적으로 서열번호 2로 표시되는 opTAL(optimized tyrosine ammonia lyase)를 코딩하는 유전자; 서열번호 3으로 표시되는 4CL2(cinnamate/4-coumarate: CoA ligase)를 코딩하는 유전자; 및 서열번호 4로 표시되는 STS(stilbene synthases)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 생산할 수 있는 벡터를 제공하며, 상기 유전자가 모두 도입된 형질전환체의 경우 미생물 대사경로를 통하여 쿠마릭 산 등을 첨가하지 않고도 단순 당으로부터 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 생산할 수 있다.
- [32] 상기 재조합 벡터는 하기의 개열 지도를 갖으며, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 생산하도록 하는 벡터의 종류 및 삽입 유전자 등은 이에 제한되지 않는다.
- [33] [도]

pET-opT4CvS



- [34] 상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 COM, TAL, 4CL2 및 STS를 코딩하는 유전자로서 사용될 수 있는 COM, opTAL, 4CL2nt 및 vvSTS 핵산 분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, COM, opTAL, 4CL2nt 및 vvSTS 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, COM, opTAL,

4CL2nt 및 vvSTS 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 내지 4의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

- [35] 본 발명의 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터를 이용하면, 유전자 재조합에 따른 인공대사 경로를 이용한 대사과정을 거침으로써 쿠마릭 산 등을 첨가하지 않고도 단순 당을 기질로 하여 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 대량으로 생산할 수 있다.
- [36] 상기 COM을 코딩하는 유전자는 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래되고, 상기 TAL를 코딩하는 유전자는 사카로트릭스 에스파넨시스(*Saccharothrix espanaensis*)에서 유래되며, 상기 4CL2를 코딩하는 유전자는 담배(*Nicotiana tabacum*)에서 유래되고, 상기 STS를 코딩하는 유전자는 포도(*Vitis vinifera*)에서 유래된 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체를 제공한다.
- [38] 상기 형질전환체는 *tyrA^{fbr}* 유전자[코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, *tyrA*)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, *fbr*) 유전자]; *aroG^{fbr}* 유전자[3-디옥시-D-아라비노-헵툴로소나이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, *aroG*)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, *fbr*) 유전자]; *accBC*(acetyl-CoA carboxylase BC) 유전자; 및 *accDA*(acetyl-CoA carboxylase DA) 유전자;가 더 삽입된 형질전환체일 수 있으며, 이 경우 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤이 우수한 특징이 있다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 "accBC 유전자" 또는 "accDA 유전자"는 acetyl-CoA carboxylase A, B, C 또는 D 코딩 유전자 중에서, 상기 accBC 유전자는 acetyl-CoA carboxylase B 및 C 코딩 유전자를 함께 합성한 유전자를 의미한다. 또한, 상기 accDA 유전자는 acetyl-CoA carboxylase D 및 A 코딩 유전자를 함께 합성한 유전자를 의미한다.
- [40] 상기 accBC 유전자 및 accDA 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에서 유래되고, 상기 *tyrA^{fbr}* 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열, 상기 *aroG^{fbr}* 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열, 상기 accBC 유전자는 서열번호 7로 표시되는 염기서열, 및 상기 accDA 유전자는

서열번호 8로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 이에 제한되지 않는다.

- [41] 본 발명에 있어서 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 형질전환은 핵산 분자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당업계에 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘 (CaCl_2) 침전, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE(diethylaminoethyl)-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 포함될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [42] 상기 형질전환체는 대장균, 박테리아, 효모 및 곰팡이로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이나, 이에 제한되지 않는다.
- [43] 본 발명에 있어서, "형질전환체"는 외부로부터 도입된 DNA에 의해 생물의 유전형질이 변화된 것을 의미한다. 대장균 등 미생물, 동물 및 식물에서 볼수 있는 현상이며, 인위적으로 외부 DNA를 삽입하여 새로운 유전자를 지닌 미생물, 동물, 식물 등의 형질전환 생물체가 만들어진다. 유전자의 변화를 통해 생물의 특정 기능을 조절할 수 있다.
- [44] 본 발명의 형질전환체는 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터를 발현시킬 수 있는 시스템이라면 어느 것이라도 무방하며, 바람직하게는 대장균 발현 시스템을 사용한다. 본 발명에 있어서 재조합 벡터를 이용한 형질전환은 당업계에 알려진 어떠한 방법이라도 사용하여도 무방하며, 바람직하게는 대장균에 화학적 처리를 하여 만든 활성화 세포에 열충격을 가하는 방법을 이용하여 재조합 벡터를 대장균에 삽입함에 따라 제조한다.
- [45] 본 발명에 있어서, "피드백 저해"는 효소계에서 대사 조절의 한 양식으로, 효소계의 종산물이 그 효소계의 처음 쪽에 있는 특정한 효소(다른자리 입체성 효소)를 저해하는 것을 의미한다.
- [46] 또한 본 발명은 당이 첨가된 배지에 상기 형질전환체를 배양하여 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 수득하는 단계;를 포함하는 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법을 제공한다.
- [47] 상기 배지는 메티오닌(methionine)을 더 첨가하나, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤의 생산량을 높일 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않고 사용할 수 있다.
- [48] 본 발명에 있어서, "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.
- [49] 상기 미생물은 통상의 배지에서 생육 가능하며, 일 예로 뉴트리엔트 브로스(Nutrient broth) 배지에서 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는

선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

- [50] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 미생물의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장 물질이 사용될 수 있다. 바람직한 배양배지는 예컨대 LB, YT 또는 M9 배지일 수 있으며, 이는 형질전환체의 성장을 위한 배지이다.
- [51] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [52] 본 발명에서 배양된 형질 전환체의 단백질 발현은 IPTG 처리 등의 발현벡터 종류에 따른 각각의 단백질 유도방법으로 유도할 수 있으며, 단백질 발현이 유도된 후에, 추가로 배양을 수행함으로써 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생성을 유도한다. 추가 배양은 예컨대 3 g/L KH_2PO_4 , 7.3 g/L K_2HPO_4 , 8.4 g/L MOPS, 2 g/L NH_4Cl , 0.5 g/L NaCl, 0.1 ml/L 미량 원소, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L MgSO_4 , 15 g/L 글루코스를 포함하는 SM(modified synthetic medium) 배지 조건 하에 배양하는 것이 바람직하다.
- [53] 본 발명에서 목적 물질인 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤의 수득은 HPLC 등을 통해 화합물을 분리하거나 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 화합물을 분리하여 수득할 수 있다.
- [54] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 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.

- [55] 실시예 1. 레스베라트롤(resveratrol)을 기질로 이용하고 COM(caffeic acid O-methyltransferase) 효소 반응에 의한 프테로스티벤(pterostilbene) 생성
- [56] 실시예 1-1. COM 효소 반응에 의한 카페익산 메틸전이효소(caffeic acid methyltransferase) 활성 확인
- [57] in vitro 상에서, 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래한 COM 효소를 이용하여 카페익산(Caffeic acid)을 기질로 페룰산(ferulic acid)을 생성하는 것으로, 상기 COM 효소의 카페익산 메틸전이효소 활성을 확인하였다.
- [58] 보다 구체적으로, 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래한 COM 효소(Kang SY et al., Microb Cell Fact 2012, 11:153)를 코딩하는 합성 유전자(서열번호 1)를 NdeI 및 Hind III 제한효소로 절단하고 pET-28a(+) 벡터와 연결하여 pET-COM 벡터를 제작하였다. 상기 pET-COM 벡터를 이용하여 대장균에서 COM 유전자를 N-terminal His-tag된 수용성 단백질 상태로 발현시켰고, 정제한 COM 효소를 사용하여 in vitro에서 카페익산(caffeic acid)에 대한 메틸전이 활성을 확인하였다. Sigma(USA)에서 구입한 카페익산 표준품은 기질로서 사용하였고, SAM(S-adenosyl methionine)은 기질에 메틸기를 제공하기 위한 보조인자로서 사용하였다. 상기 COM 효소의 카페익산 메틸전이효소 활성 측정 반응 조건은 하기 표 1에 기재된 반응 조건으로 30도에서 4시간 동안 반응시켰다.

[59] **【 표 1 】**

반응조건 (Total 500ul)	30℃, 4hr
	Final Conc.
Tris-HCl(pH7.4)	100mM
SAM	0.2mM
Caffeic acid	0.4mM
COM 효소	10uM

- [60] 상기 반응액을 일부를 필터링(Sartorius Minisart RC 4, 0.2um)하여 그 용액 20ul를 YMC J'sphere ODS-H80, 150x4.6 mm I.D.,(YMC, 일본) 컬럼을 이용하여 CH₃CN-H₂O(J.T.Baker,USA)(0.05%TFA;Sigma-Aldrich,USA) 이동상을 1 ml/min의 속도로 10%에서 100%까지 20분간 조건으로 HPLC 분석을 수행하였다. 카페익산 표준품은 Sigma(USA)에서 구입하여 분석하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [61] 도 1에 나타낸 바와 같이, RT. 7분 상에서, 대조군의 카페익산 표준품과 동일하게 효소반응 후에 남아있는 기질인 카페익산(caffeic acid)이 나타남을 확인하였다(피크 1). 또한, RT. 8.5분 상에서, 카페익산의 메틸전이효소인 본 발명의 COM 효소의 활성으로 합성된 페룰린산(ferulic acid)이 나타남을 확인하였다(피크 2).
- [62] 실시에 1-2. COM 효소의 레스베라트롤 메틸전이효소(resveratrol methyltransferase) 활성을 통한 프테로스틸벤(pterostilbene) 생산 확인
- [63] in vitro 상에서, 카페익산 메틸전이효소(Caffeic acid methyltransferase) 활성을 나타내는 COM 효소가 레스베라트롤(resveratrol)을 기질로 하여 일차 메틸화된 피노스틸벤(pinostilbene)을 거쳐 이차 메틸화된 프테로스틸벤(pterostilbene)을 생산하는지 확인하였다.
- [64] 구체적으로, 상기 실시예 1-1에서 정제한 COM 효소를 사용하여 in vitro에서 레스베라트롤에 대한 메틸전이 활성을 확인하였다. Sigma(USA)에서 구입한 레스베라트롤 표준품은 기질로서 이용하였고, SAM (S-adenosyl methionine)은 기질에 메틸기를 제공하기 위한 보조인자로서 사용하였다. 본 발명의 COM 효소는 하기 표 2에 기재한 반응조건으로 30도에서 하루 동안 반응시켰다.

[65] **【표 2】**

반응조건 (Total 500ul)	30℃, O/N
	Final Conc.
Tris-HCl(pH7.4)	100mM
SAM	0.4mM
Resveratrol	0.2mM
COM 효소	40uM

- [66] 상기 생성된 반응액과 동일한 양의 에틸아세테이트를 넣어서 추출하고 12000 rpm에서 2분간 원심분리를 수행하여 상등액 에틸아세테이트 층을 농축하였다. 상기 농축한 추출물을 메탄올에 녹인 후 용액 20ul를 YMC J'sphere ODS-H80, 150x4.6 mm I.D. 컬럼을 이용하여 CH₃CN-H₂O(0.05%TFA) 이동상을 1 ml/min의 속도로 10%에서 100%까지 20분동안 HPLC 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [67] 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 레스베라트롤을 기질로 사용한 반응액에서 대조군의 레스베라트롤 표준품과 동일하게 레스베라트롤이 나타남을 확인하였다(피크 1). 또한, 본 발명의 COM 효소의 활성으로, RT. 13.9분 상에서, 일차 메틸화된 피노스틸벤(pinostilbene, 피크 2)이 생성되고, RT. 17.8분 상에서, 이차 메틸화된 프테로스틸벤(pterostilbene, 피크 3)이 생산됨을 확인하였다.

- [68] 따라서, 본 발명의 COM 효소는 레스베라트롤을 기질로 이용하여 피노스틸벤을 생산하고, 결과적으로 프테로스틸벤을 생산함을 확인하였다.
- [69] 실시예 1-3. COM 효소의 레스베라트롤 메틸전이효소(resveratrol methyltransferase) 활성을 통한 프테로스틸벤(pterostilbene) 생산 확인
- [70] 상기 실시예 1-2에 기재된 바와 같이, 본 발명의 COM 효소가 레스베라트롤을 기질로 생산한 반응 산물인 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤에 대하여, 이의 정확한 메틸화 위치를 확인하기 위하여, LC/MS를 분석을 수행하였다.
- [71] 구체적으로, 상기 실시예 1-2에 따른 도 2의 피노스틸벤(피크 2) 및 프테로스틸벤(피크 3)을 LC/MS 및 LC/MS/MS로 분석하였다. LC-MS(Liquid chromatography-mass spectrometry)는 전기분무 이온화 질량 분광기(Electrospray Ionization mass spectrometer)를 이용하였고, ESI(electrospray ionization)을 장착한 LTQ XL linear ion trap(Thermo Fisher Scientific, USA) 장비를 이용하였다. 또한 LC/MS에 사용된 고속분리 HPLC는(RSLC; ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) system을 사용하였다. 분석용 컬럼은 HSS T3 column (Waters, UK) (2.1 × 150 mm; 2.5 µm particle size)을 사용하였고 유속은 0.3ml/min으로 분석하였다. 그 결과를 도 3 내지 도 6에 나타내었다.
- [72] 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1-2에 따른 도 2의 피노스틸벤(피크 2)를 분석한 결과, 레스베라트롤에 하나의 메틸 잔기가 삽입된 분자량(m/z 243.09 [M+H]⁺)을 확인하였다. 또한, LC/MS/MS 분자량 절단 패턴 (mass fragmentation pattern) 분석을 통하여, 도 4로 표시되는 화합물인 피노스틸벤을 확인하였다.
- [73] 또한, 도 5에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1-2에 따른 도 2의 프테로스틸벤(피크 3)을 분석한 결과, 레스베라트롤에 두 개의 메틸 잔기가 삽입된 분자량(m/z 257.08 [M+H]⁺)을 확인하였다. 또한, LC/MS/MS 분자량 절단 패턴 분석을 통하여, 도 6으로 표시되는 화합물인 프테로스틸벤을 확인하였다.
- [74] 상기 분석 결과를 통하여, 본 발명의 COM 효소가 레스베라트롤을 기질로 생산한 반응 산물인 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤은 구체적으로 레스베라트롤의 A ring의 3번 및 5번 하이드록시기가 메틸화된 것임을 확인하였다.
- [75] 실시예 2. 프테로스틸벤 생성을 위한 인공대사 경로 개발
- [76] 실시예 2-1. TAL(tyrosine ammonia-lyase), 4CL2(cinnamate/4-coumarate: CoA ligase), COM(caffeic acid O-methyltransferase) 및 STS(stilbene synthases)를 코딩하는 유전자를 포함하는 프테로스틸벤 생성 재조합 벡터 제작
- [77] 레스베라트롤을 기질로 생산한 반응 산물인 프테로스틸벤을 생산하기 위하여, 먼저 레스베라트롤의 모듈화된 인공경로 구축하였다. 보다 구체적으로, 레스베라트롤을 생산하기 위하여, TAL을 코딩하는 opTAL 유전자, 4CL2를 코딩하는 4CL2nt 유전자 및 STS를 코딩하는 vvSTS 유전자가 연결된 벡터를 제작하였다(pETopT4vS). 또한, 프테로스틸벤을 생산하기 위하여, opTAL, 4CL2nt, vvSTS 및 COM의 네 유전자가 연결된 벡터를

제작하였다(pET-opT4CvS).

- [78] 구체적으로, TAL 효소는 티로신(Tyrosine)을 4-쿠마릭산(4-coumaric acid)으로 변환하는 효소이다. 상기 TAL 효소는 방선균인 사카로트릭스 에스파내시스(*Saccharothrix espanaensis*)(KCTC9392)에서 확인된 티로신 암모니아리아제(TAL)의 아미노산 서열을 토대로, 대장균에서 각각의 TAL 아미노산에 대한 tRNA 비율에 따른 최적의 코돈 사용빈도(codon usage)를 사용하여, TAL을 코딩하는 opTAL 염기서열을 합성하여 본 발명에서 사용하였다.
- [79] 또한, 4CL2 효소는 4-쿠마릭산을 4-쿠마로일 코엔자임 A(4-coumaroyl Coenzyme A)로 변환하는 효소이다. 담배(*Nicotiana tabacum*)에서 확인된 코엔자임 에이 라이게이즈 효소(cinnamate/4-coumarate: CoA ligase)의 염기서열 중 4CL2를 코딩하는 유전자인 4CL2nt를 합성하여 본 발명에 이용하였다.
- [80] 또한, STS 유전자는 4-쿠마로일 코엔자임 A에서 3분자의 malonyl-CoA를 응축하여 스틸벤 화합물로 변환하는 효소인 스틸벤 합성효소(stilbene synthase; STS)로 발현시키기 위하여, 포도(*Vitis vinifera*)의 아미노산 서열을 바탕으로 하고, 대장균에서 각각의 아미노산에 대한 tRNA 비율에 따른 최적의 코돈 사용빈도(codon usage)를 사용하여, STS를 코딩하는 vvSTS 유전자의 염기서열을 합성한 것을 사용하였다.
- [81] 구체적으로, 하기 표 3의 opTAL-F 및 pET-CPac 프라이머 쌍으로 pET-opTAL 벡터를 주형 DNA로 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 TOYOBO사의 KOD-Plus- DNA 폴리머라제를 이용하여 PCR을 수행하여 PCR 산물을 확보하였다. 또한, pET-NPac 및 pET-CSpe 프라이머 쌍으로 pET-4CL2nt 벡터를 주형 DNA로 이용하여 PCR 반응을 수행하여 pET-4CL2nt PCR 산물을 획득하였다. 또한, pET-NSpe 및 pET-CSpe 프라이머 쌍으로 pET-COM을 주형 DNA로 이용하여 PCR 반응을 수행한 후, pET-COM PCR 산물을 획득하였다. 또한, pET-NSpe 및 vvSTS-R 프라이머 쌍으로 pET22-vvSTS 벡터를 주형 DNA로 이용하여 PCR 반응을 수행하여 pET-vvSTS PCR 산물을 획득하였다. 상기 pET-opTAL PCR 산물은 제한효소 NdeI 및 PacI으로 절단하였고, 상기 pET-4CL2nt PCR 산물은 제한효소 PacI 및 SpeI으로 절단하였다. 또한, 상기 pET-COM PCR 산물은 제한효소 SpeI으로 절단하였고, 상기 pET-vvSTS PCR 산물은 제한효소 SpeI 및 XhoI로 절단하였다. 또한, pET-28a(+) 벡터를 제한효소 NdeI 및 XhoI로 절단한 후, 준비된 상기 네 유전자의 PCR 산물을 벡터와 연결하여 대장균에 형질전환 하였다. 이때, 절단된 pET-28a(+) 벡터의 NdeI 자리에 pETopTAL PCR 산물의 NdeI 자리를 연결하였고 pET-opTAL PCR 산물의 PacI 자리와 pET-4CL2nt PCR 산물의 PacI 자리를 연결하였으며, pET-4CL2nt PCR 산물의 SpeI 자리와 pET-COM PCR 산물의 SpeI 자리를 연결하였다. 또한, pET-COM의 PCR 산물의 다른 SpeI 자리와 pET-vvSTS PCR 산물의 SpeI 자리를 연결하였고 pET-vvSTS PCR 산물의 XhoI 자리와 pET-28a(+) 벡터의 XhoI 자리를 연결함으로써 합성한 네 유전자를 하나의 발현 벡터 pET-28a(+)에

삽입하였다(도 7).

- [82] 상기 제작된 pET-opT4CvS의 opTAL, 4CL2nt, COM 및 vvSTS 유전자는 각각의 T7 프로모터와 T7 터미네이터를 가져 독립적으로 발현 조절을 받도록 제작하였다.

- [83] 【표 3】

프라이머	염기서열
opTAL-F(서열번호 9)	CATATGACCC AGGTGGTTGA ACGCC
pET-Cpac(서열번호 10)	TTAATTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCC
pET-Npac(서열번호 11)	TTAATTAATGCGCGGACAATTGCGACGG
pET-Cspe(서열번호 12)	ACTAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTC
pET-Nspe(서열번호 13)	ACTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCC
vvSTS-R(서열번호 14)	CTCGAGTTAGTTGGTGACCATCGGG

- [84] 실시예 2-2. pET-opT4CvS 벡터로 형질전환된 대장균의 프테로스틸벤 생합성 확인

- [85] 상기 실시예 2-1의 재조합 벡터 pET-opT4CvS를 대장균 균주(C41)에 형질전환하였고, 상기 균주를 LB 배지(50 μ g/l 카나마이신) 50 ml에 접종하여 37도에서 OD600 0.6까지 배양하였고, 10 분 저온 충격(cold shock) 이후 1 mM IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 그 후, 26도에서 6시간 동안 추가로 배양하고, 세포를 수득하여 30 ml 3 g/L KH₂PO₄, 7.3 g/L K₂HPO₄, 8.4 g/L MOPS, 2 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L NaCl, 0.1 ml/L 미량 원소, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 5 g/L MgSO₄, 15 g/L 글루코스를 포함하는 변형된 SM(modified synthetic medium)에 50 μ g/l 카나마이신, 1 mM IPTG를 26도에서 24시간 배양하였다.

- [86] 상기 배양액과 동일한 양의 에틸아세테이트(ethylacetate)를 넣어서 추출한 후, 3000 rpm에서 5분간 원심분리를 수행하여, 상등액 에틸아세테이트 층을 농축하였다. 상기 농축한 추출물을 400 μ l 메탄올(Merck, USA)에 녹인 후, 그 용액 20 μ l를 아래의 HPLC 조건으로 분석하였다. YMC J'sphere ODS-H80, 150x4.6 mm I.D.(YMC, 일본) 컬럼을 이용하여 CH₃CN-H₂O(J.T.Baker, USA)(0.05% TFA; ACROS, USA) 이동상을 1 ml/min의 속도로 10%에서 100%까지 20분간 HPLC 분석을 수행하였다. 이때, 레스베라트롤, 프테로스틸벤 표준품은 Sigma(USA)에서 구입하여 분석하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 또한, 각 생성된 피크에 대한 LC/MS 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

- [87] 또한, 도 8에 나타낸 바와 같이, 재조합 벡터 pET-opT4CvS로 형질전환된 대장균 균주의 배양액으로부터 미량의 레스베라트롤과 피노스틸벤이 검출되고 중요산물로는 프테로스틸벤(pterostilbene, RT. 13.8분)이 생산된 것을 확인할 수 있다.

- [88] 또한, 도 9에 나타낸 바와 같이, 각 생성된 피크에 LC/MS 분석 결과 레스베라트롤에 두 개의 메틸 잔기가 삽입된 분자량(m/z 257.16 [M+H]⁺)이 나타남을 확인하였고, 화합물의 LC/MS/MS 분자량 절단 패턴(mass fragmentation

pattern) 분석 결과, 생성된 피크에 대응되는 화합물이 프테로스티벤임을 확인하였다.

- [89] 이와 같은 결과를 통하여, 대장균의 인공 생합성경로를 이용하여 쿠마릭산이나 레스베라트롤을 첨가하지 않고도 단순 당을 첨가한 배지에서 프테로스티벤이 생산될 수 있음을 확인하였다.
- [90] 실시예 3. 메틸화 스틸벤 화합물(피노스티벤 또는 프테로스티벤) 고농도 생산 방법
- [91] 3-1. 메틸화 스틸벤 화합물(피노스티벤 또는 프테로스티벤) 고 생산을 위한 균주개발
- [92] 타이로신 고생산 균주(COS1)를 제작 방법을 이용하여(Kang SY et al., Microb Cell Fact 2015, 14:78), malonyl-CoA를 지질합성에 사용하는 대사경로의 methyl transferase(bioC) 유전자를 제거하였고, 동시에 새로운 acetyl-CoA carboxylase(Acc) 유전자가 삽입되어 malonyl-CoA 및 타이로신을 함께 고생산 할 수 있는 균주(Δ COS4-A)를 제작 하였다 (도 10). BioC 효소는 지방산 생합성 초기단계인 malonyl-acyl carrier protein(ACP) 의 카복시기를 메틸 아세테르로 메틸화 반응을 촉매한다. 상기 반응 단계를 제거하면 지방산의 생합성에 사용되는 malonyl-CoA 또는 malonyl-ACP 소비를 억제하는 것으로 알려져 있다. 우선 대장균 Δ COS1 균주의 게놈 시퀀스를 토대로 BioC 유전자를 확인하였고, BioC 유전자를 제거한 변이주 제작은 Red/ET 재조합 시스템을 사용하였다. 먼저 도 10에 나타낸 바와 같이 BioC 유전자의 5' 과 3'말단의 유전자 염기서열을 사용하여 게놈 절단 프라이머를 (BioC-FRT-F1, BioC-FRT-R1) 제작하고 구체적인 서열은 표 4에 나타내었다. 상기 프라이머 set (BioC-FRT-F1 와 BioC-FRT-R1)을 사용하고 FRT-neo-FRT 카세트를 주형으로 EX Taq polymerase을 이용하여 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 산물을 Red/ET 재조합 효소를 발현하는 pRedET vector가 형질전환된 Δ COS1 균주에 전기천공법(electroporation)으로 형질전환한 후 카나마이신 저항성 균주 COS1 Δ BioC::neo 를 선발하였다. COS1 Δ BioC::neo 균주에서 FRT-neo-FRT 카세트 영역을 제거한 균주 제작을 위해 FLPe 재조합 효소 발현 벡터(707-FLPe)를 이용하여 카나마이신 내성이 제거된 균주 (Δ COS4)를 선별하였다(도 10).
- [93] 상기 제작한 Δ COS4 균주에 acetyl-CoA 을 malonyl-CoA 로 전하는 효소들을 추가로 삽입하는 실험을 진행하였다. Acetyl-CoA을 malonyl-CoA로 변환시키는 유전자로서, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 acetyl-CoA carboxylase 유전자 accA, B, C, D 유전자를 사용하였고, 이들 유전자들은 각각의 T7 프로모터를 갖도록 제작되었다. 상기 accD, A 유전자와 T7 프로모터를 포함한 부위의 5'및 3'말단의 유전자 염기서열을 사용한 프라이머를(pETNpac와 pET-Cspe) 제작하였다. 상기 프라이머 세트(pET-Npac 와 pET-Cspe)을 사용하고 pET22-accDA을 주형으로 EX Taq polymerase을 이용하여 PCR을 수행하였다. accB,C 유전자와 T7 프로모터를 포함한 부위의 프라이머는

pET-Nspe 및 pET-Cpac을 사용하였고, pET22-accBC을 주형으로 EX Taq polymerase을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 후, PCR 산물은 T-blunt PCR cloning Kit를 이용하여 클로닝 한 뒤 EcoRI으로 절단된 벡터에 클로닝하여 pN-accDABC을 제작하였다. 상기 Δ COS4 균주에 pRedET 벡터 및 pN-accDABC를 형질전환하였다. 형질전환 균주를 L-아라비노스를 이용하여 30에서 3시간 가량 pRedET 벡터의 발현을 유도시키고, 그 이후 37도에서 재조합이 일어날 수 있도록 배양시켰다. 그 후 카나마이신이 들어간 LB 플레이트에 배양액을 도말 한 후 42도에서 추가 배양 시 자라는 콜로니를 1차 선별하고 LacZ 유전자 부위에 유전자가 삽입되어 있는지를 PCR을 이용하여 확인하였다. 삽입된 부분에 인접한 chromosomal DNA와 상보적인 서열을 가진 프라이머, 삽입유전자와 상보적인 서열을 가진 프라이머(ptaclacZY-F 및 P4)를 이용하면 PCR 방법을 통해 재조합된 균주를 선별하였다. 제작된 accDA 및 accBC 유전자가 삽입된 균주(Δ COS4-AK)는 카나마이신 내성 유전자를 포함하고 있어 FRT 서열을 활용하여 카나마이신 내성 유전자와 불필요한 부분을 제거하였다. 상기 Δ COS4-AK 균주에 707-FLPe 벡터를 형질전환 시킨 뒤 30에서 3시간 발현시켜 707-FLPe 벡터가 발현이 되도록 한 후 37도에서 배양하여 유전자 제거 반응이 일어나도록 하였다. 카나마이신 내성 유전자가 제거를 확인하기 위하여 카나마이신을 포함한 LB 플레이트와 카나마이신을 포함하지 않는 LB 플레이트 레플리카하여 LB 플레이트에서만 자라는 균주(Δ COS4-A)를 선별하고 PCR을 이용하여 최종 확인하였다.

- [94] 도 10에 나타낸 바와 같이, 최종 확인된 Δ COS4-A (Δ LacZ::accDA+accBC, Δ BioC, Δ tryR:: tryA^{fbr} + aroG^{fbr}) 균주는 염색체 내 타이로신 고생산 모듈 (tryA^{fbr} + aroG^{fbr})이 삽입되고 BioC 유전자 제거되었으며, acetyl-CoA carboxylase(accBC 및 accDA) 유전자가 삽입된 균주이다.

- [95] 【표 4】

프라이머	염기서열
BioC-FRT-F1 (서열번호 15)	cgcatgaaatgcaggatcgaccgtctgctggaggtgctgcatggcaacAATTAACCCCTCACTAAAGGGCG
BioC-FRT-R1 (서열번호 16)	cagttttccccacttcggtatccgttccggtgacaaaataacgtttactcTAATACGACTCACTATAGGGCTC
ptaclacZY-F (서열번호 17)	CAATTTCACACAGGAGATATCATATGACCATGATTACGGATTAC
P4R (서열번호 18)	CAATTTCACACAGGAGATATCATATGACCATGATTACGGATTAC

- [96] 3-2. pET-opT4vS 형질전환 미생물의 메틸화 스틸벤 화합물(피노스틸벤 또는 프테로스틸벤) 합성 생산량 비교

- [97] 상기 실시예 2-1의 재조합 벡터 pET-opT4CvS로 형질전환된 대장균 균주(C41)와, 상기 실시예 3-1에서 pET-opT4CvS로 재조합 벡터가 도입된 개량된 균주(Δ COS4-A)를 LB 배지(50 μ g/l kanamycin) 50 ml에 접종하여 37 도에서 OD600

0.6까지 배양하였고, 10 분 저온 충격(cold shock) 이후 1 mM IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 그 후, 26 도에서 6시간 동안 추가로 배양하고, 세포를 수득하여 30 ml M9C(변형된 M9 최소 배지; CaCO₃ 25 g/l, 글루코스 15 g/l; 50 µg/l 카나마이신, 1 mM IPTG 첨가) 배지에 옮기고 26도에서 48시간, 72시간 동안 각각 배양하였다. 상기 배양액을 상기한 방법과 동일한 방법으로 HPLC를 수행하였고 피노스틸벤, 프테로스틸벤 표준품과 비교하여 생산량을 정량하였다. 그 결과를 도 11 및 표 5에 나타내었다.

[98] 도 11 및 표 5에 나타낸 바와 같이, 피노스틸벤 및 프테로스틸벤을 생산하였음을 확인하였으며, 특히, C41 대장균주보다 개량된 ΔCOS4-A 균주에서 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산량이 더 증가됨을 확인하였다.

[99] 3-2. 아미노산인 메티오닌 첨가 배지에서 메틸화 스틸벤 화합물(피노스틸벤 또는 프테로스틸벤) 생산량 증가 효과 확인

[100] 메틸화에 필요한 아미노산인 메티오닌 첨가에 의한 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생성량 효과를 확인하기 위하여, 상기 기술한 배지에 메티오닌을 첨가한 후 그 효과를 검증하였다. M9C 배지에 메티오닌 1mM을 추가한 M9M 배지를 이용하여 실시예 2-2 와 3-2에 상기한 배양 조건과 동일하게 배양하고 동일 분석 조건으로 생산량을 측정하였으며 그 결과를 도 12에 나타내었다. 메티오닌을 첨가배지에서 배양한 각각의 대장균은 빠른 시간내에 피노스틸벤에서 프테로스틸벤으로 전환되고 생산량이 향상됨을 확인하였다. 또한, 메티오닌을 첨가 배지에서 개량된 ΔCOS4-A 균주는 도 11와 표 5에서 나타낸 바와 같이 C41 대장균주의 프테로스틸벤 생산량보다 207% 증가한 것을 확인하였다. 또한, 피노스틸벤 생산량 또한 C41 대장균주보다 개량된 ΔCOS4-A 균주에서 생산량이 더 증가됨을 확인하였다. 이는 세포 내 메티오닌 농도 증가를 통해 메틸화 조효소인 SAM 대사경로를 활성화하여 피노스틸벤 및 프테로스틸벤 생산성을 증가함을 확인한 것을 나타낸다.

[101] 【표 5】

균주	배양시간	배양배지 M9C		배양배지 M9M	
		Pinostilbene	Pterostilbene	Pinostilbene	Pterostilbene
pET-opT4CvS /C41	48hr	0.6 ± 0.8	10.3 ± 1.8	0.0 ± 0.0	25.7 ± 0.5
	72hr	0.0 ± 0.0	35.4 ± 1.5	0.0 ± 0.0	22.9 ± 0.1
pET-opT4CvS /COS4-A	48hr	10.9 ± 2.2	19.1 ± 5.8	2.6 ± 3.6	53.4 ± 3.6
	72hr	1.84 ± 2.6	46.8 ± 4.1	1.8 ± 2.6	52.3 ± 3.7

[102] 상기와 같은 일련의 실험 결과를 통하여, COM를 코딩하는 유전자; TAL를 코딩하는 유전자; 4CL2를 코딩하는 유전자; 및 STS를 코딩하는 유전자로 이루어진 재조합 벡터를 제작하였다. 그 후, tyrA^{fbr} 유전자, aroG^{fbr} 유전자, accBC 유전자 및 accDA 유전자가 삽입된 형질전환체 균주인 개량된 ΔCOS4-A 균주에

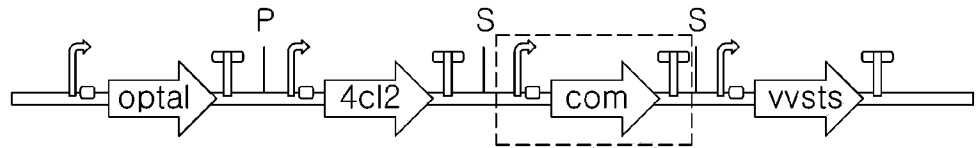
상기 재조합 벡터를 도입하여 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 생산한 결과, 도 13에 나타낸 바와 같은 일련의 과정을 통하여 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤이 생산됨을 확인하고, 단일 벡터 시스템으로 상기 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤의 대량 생산이 용이함을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 표시된 염기서열로 이루어진 COM(caffeic acid O-methyltransferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 피노스틸벤(Pinostilbene) 또는 프테로스틸벤(Pterostilbene) 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 2로 표시된 염기서열로 이루어진 TAL(tyrosine ammonia-lyase)를 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 3으로 표시된 염기서열로 이루어진 4CL2(cinnamate/4-coumarate: CoA ligase)를 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4로 표시된 염기서열로 이루어진 STS(stilbene synthases)를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 피노스틸벤(Pinostilbene) 또는 프테로스틸벤(Pterostilbene) 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 COM을 코딩하는 유전자는 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래된 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 TAL를 코딩하는 유전자는 사카로트릭스 에스파넨시스(*Saccharothrix espanaensis*)에서 유래된 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 4CL2를 코딩하는 유전자는 담배(*Nicotiana tabacum*)에서 유래된 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 8] 제4항에 있어서, 상기 STS를 코딩하는 유전자는 포도 (*Vitis vinifera*)에서 유래된 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 하기의 개열 지도를 갖는 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 재조합 벡터.

[도]

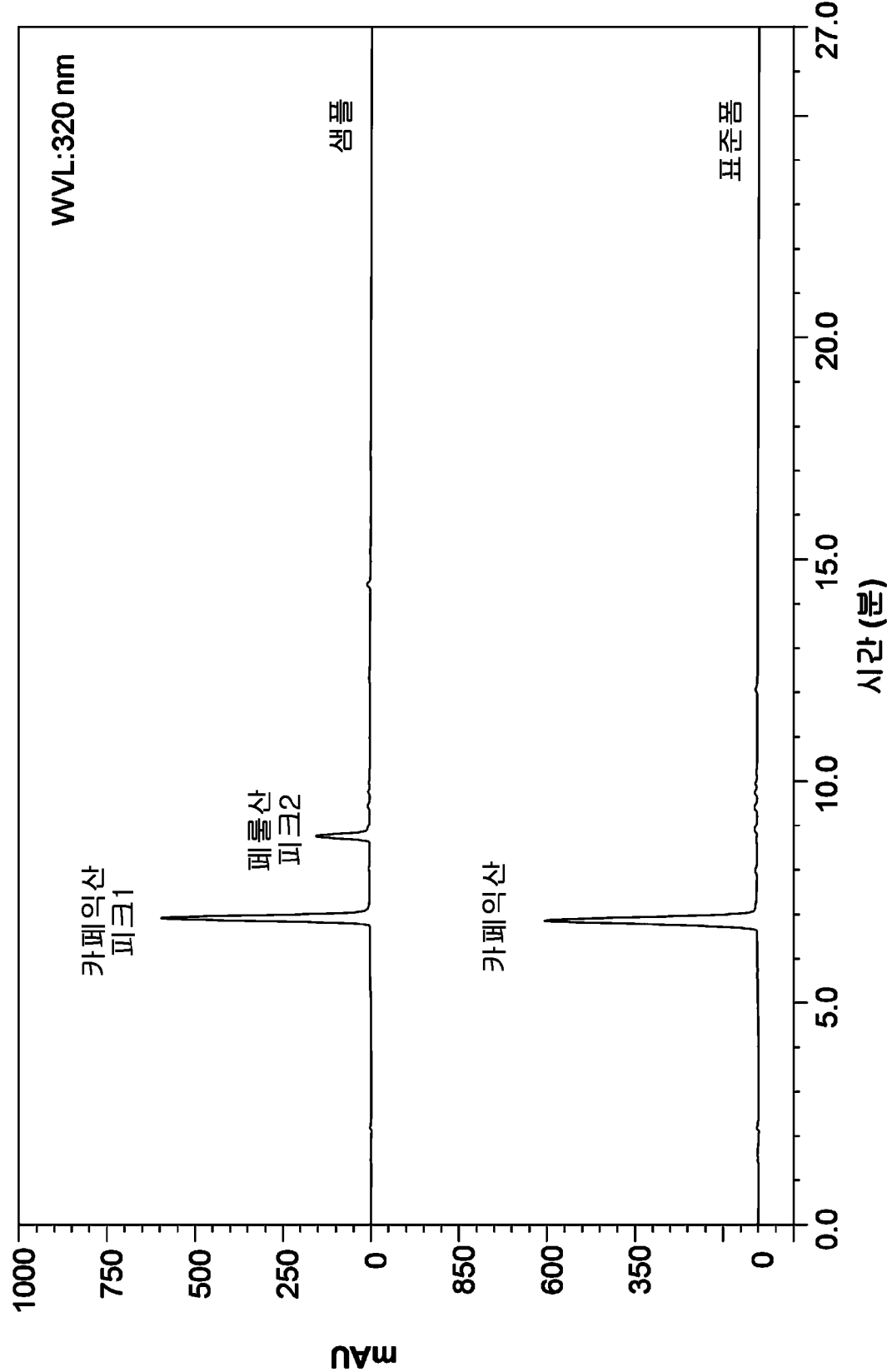
pET-opT4CvS



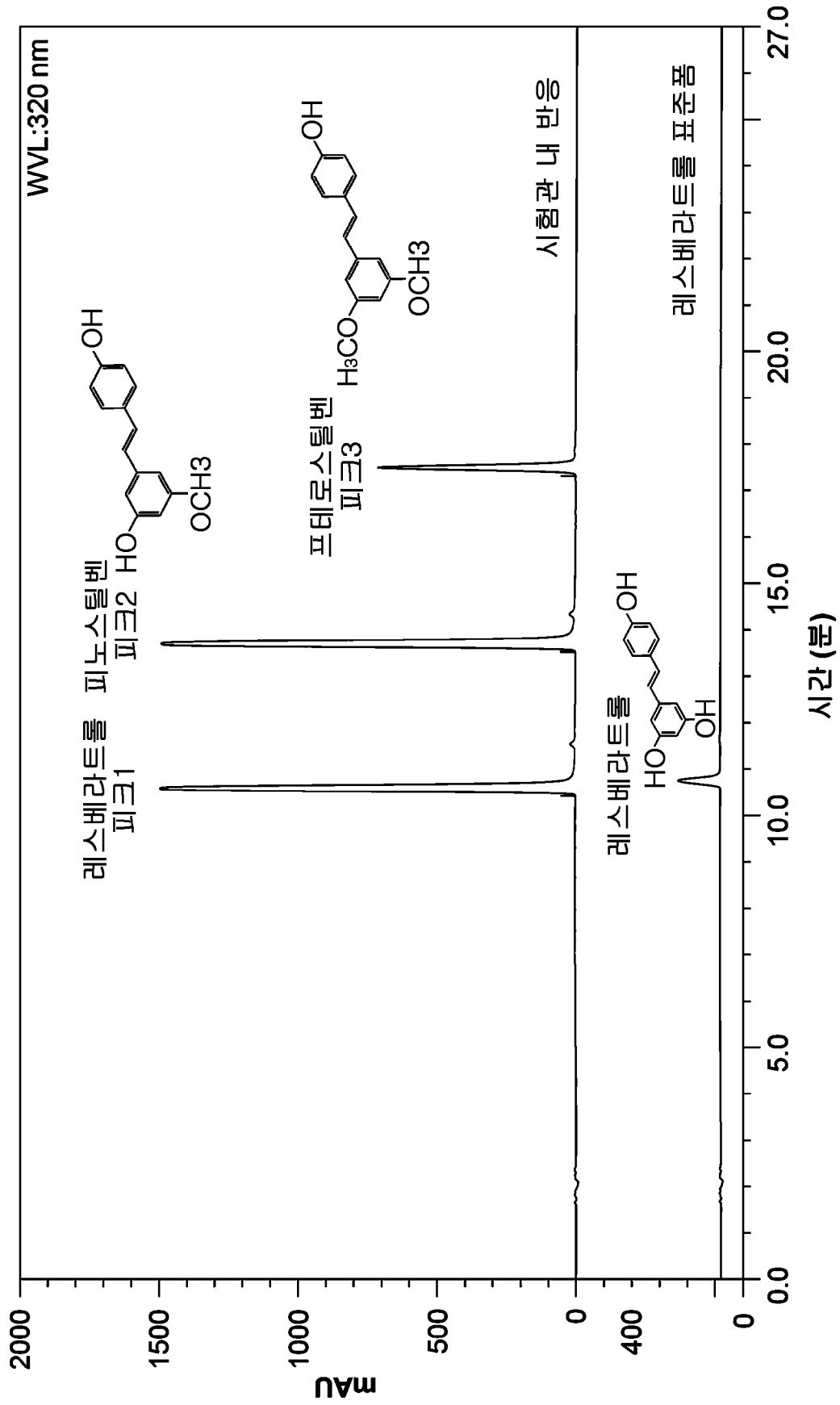
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 형질전환체는 *tyrA^{fbr}* 유전자[코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, *tyrA*)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, *fbr*) 유전자]; *aroG^{fbr}* 유전자[3-디옥시-D-아라비노-헵툴로소나이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, *aroG*)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, *fbr*) 유전자]; *accBC*(acetyl-CoA carboxylase BC) 유전자; 및 *accDA*(acetyl-CoA carboxylase DA) 유전자;가 삽입된 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 형질전환체는 대장균, 박테리아, 효모 및 곰팡이로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 *accBC* 유전자 및 *accDA* 유전자는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에서 유래된 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 *tyrA^{fbr}* 유전자는 서열번호 5로 표시되는 염기서열, 상기 *aroG^{fbr}* 유전자는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열, 상기 *accBC* 유전자는 서열번호 7로 표시되는 염기서열, 및 상기 *accDA* 유전자는 서열번호 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산용 형질전환체.
- [청구항 15] 당이 첨가된 배지에 제10항의 형질전환체를 배양하여 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤을 수득하는 단계;를 포함하는 피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,

상기 배지는 메티오닌(methionine)을 더 첨가하는 것을 특징으로 하는,
피노스틸벤 또는 프테로스틸벤 생산방법.

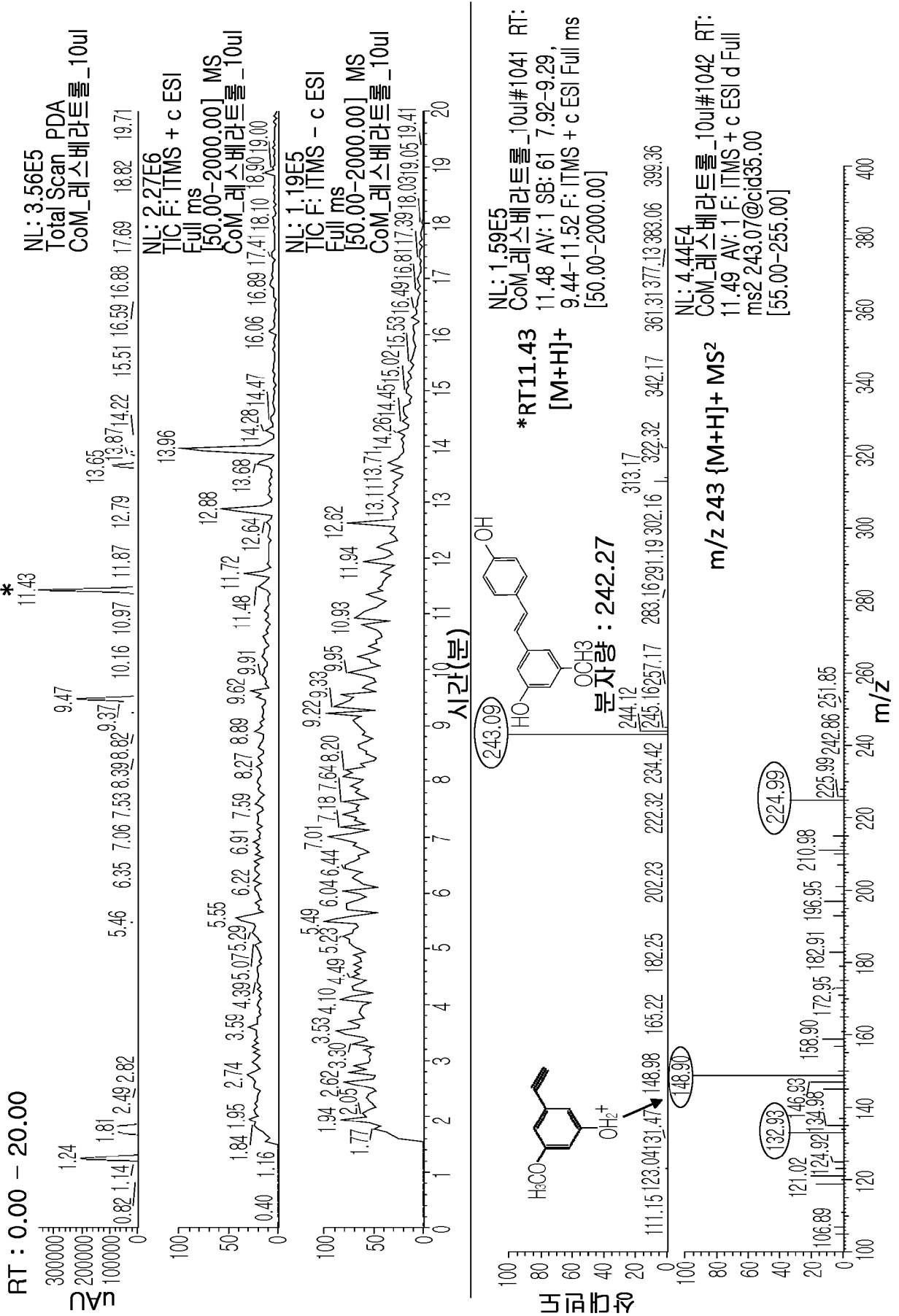
[도1]



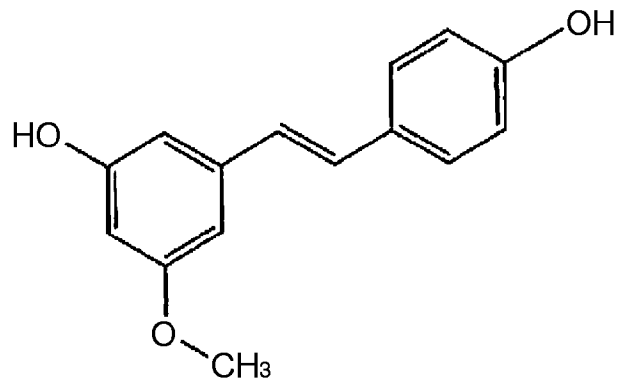
[도2]



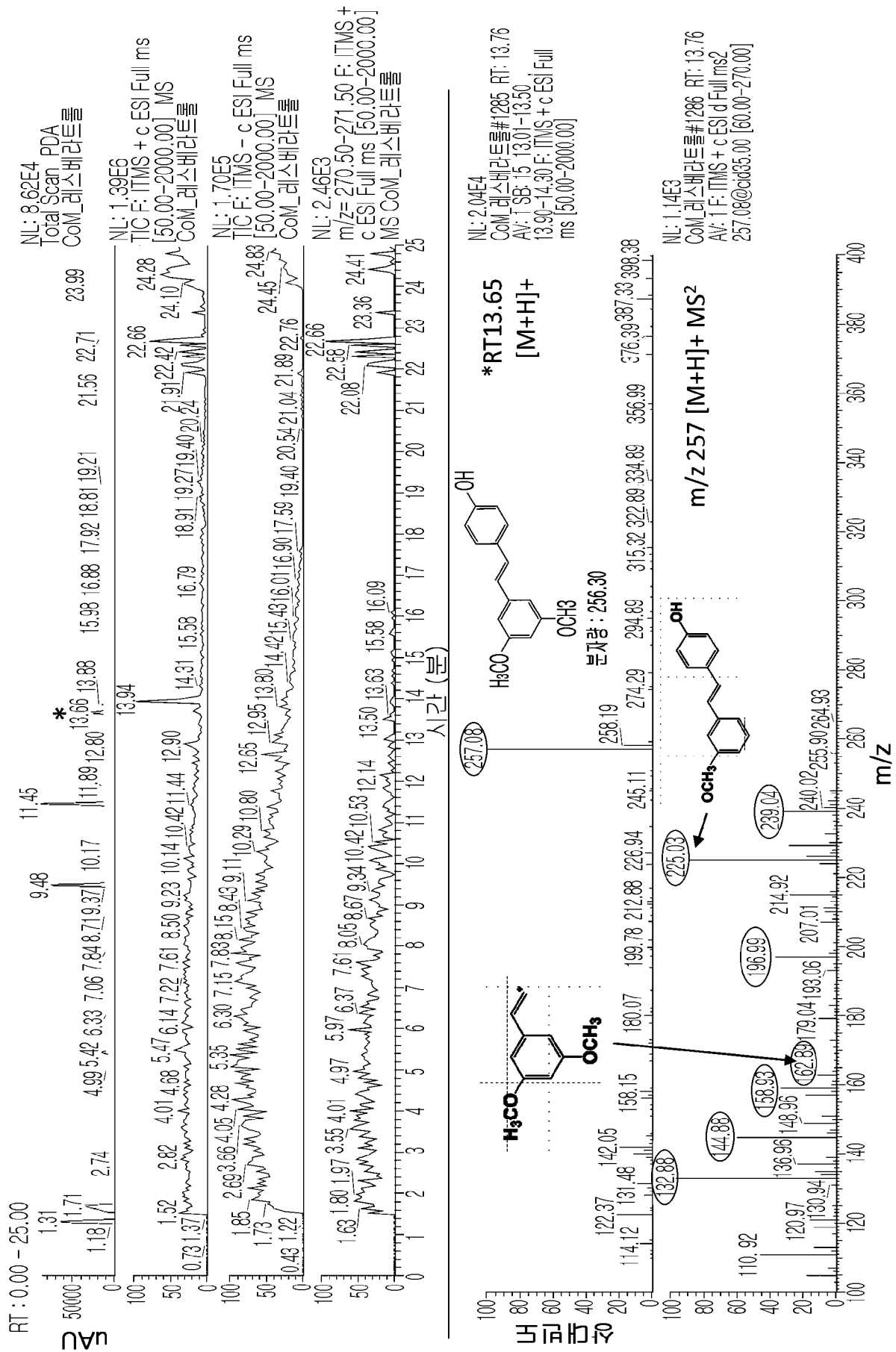
[도3]



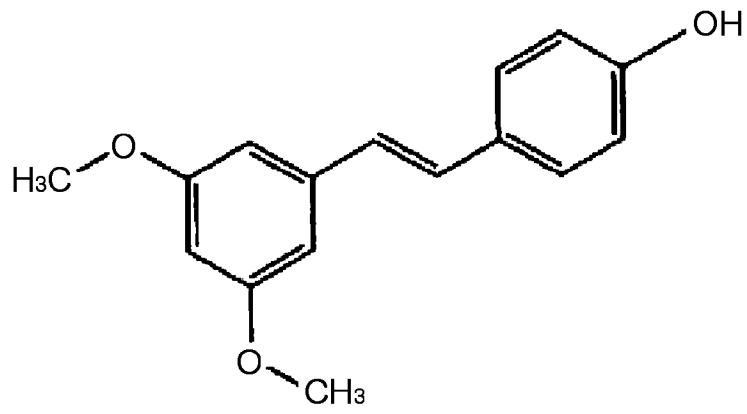
[도4]



[도5]



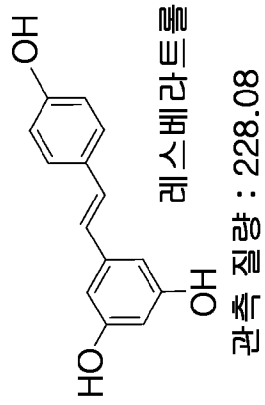
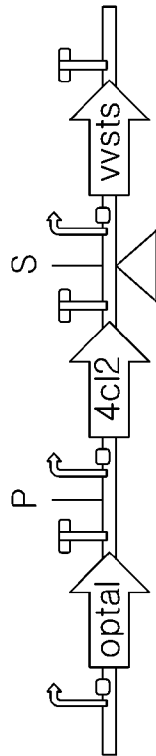
[도6]



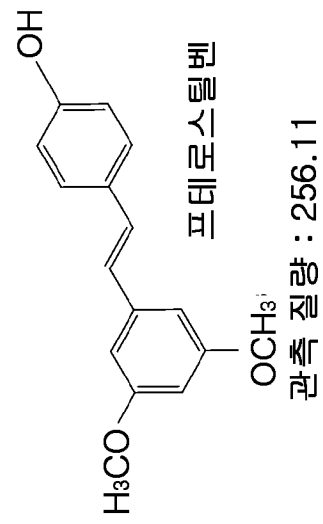
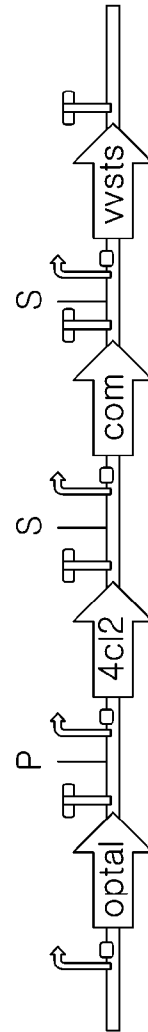
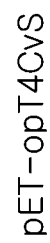
[57]



pET-optT4vS

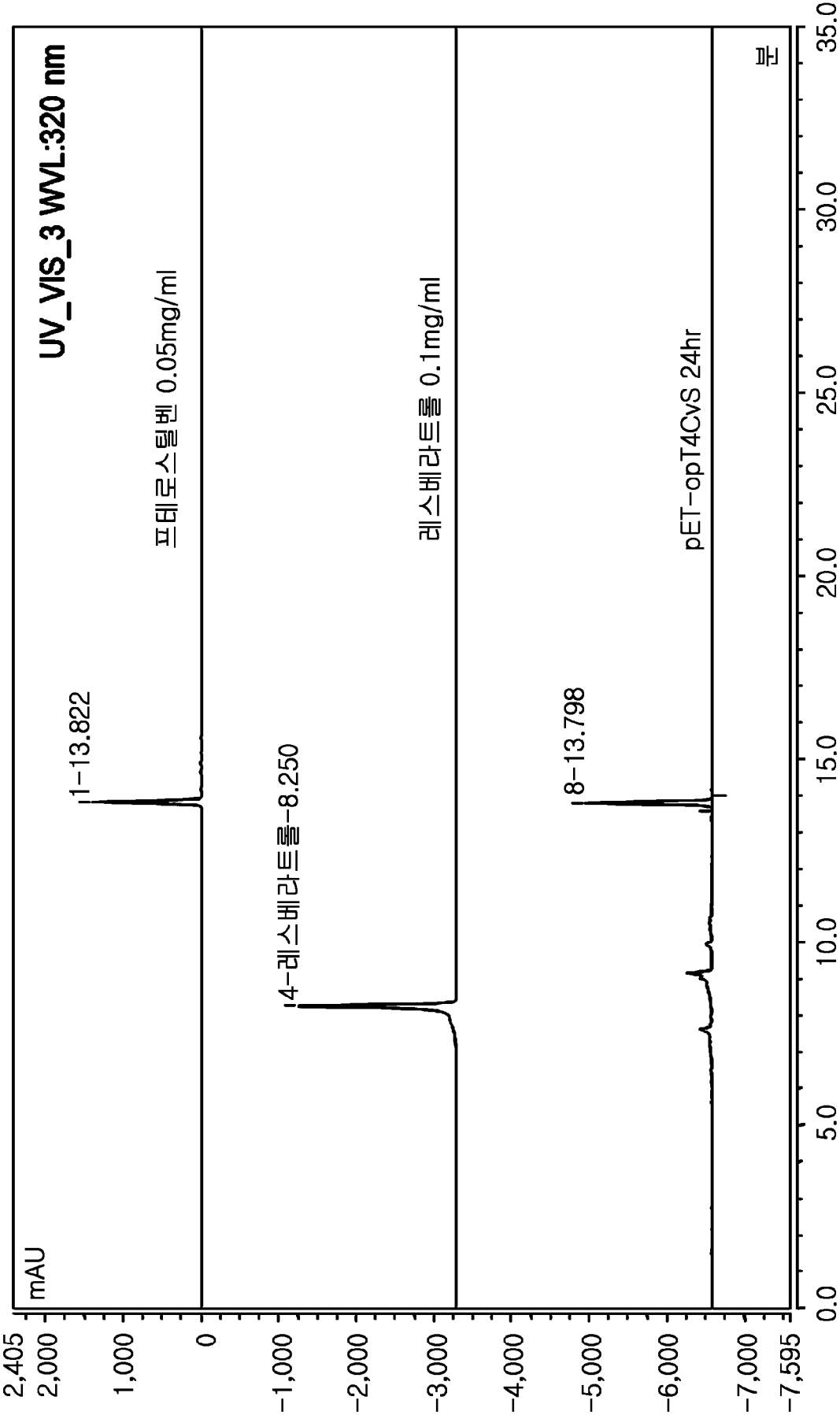


관측지점 : 228.08

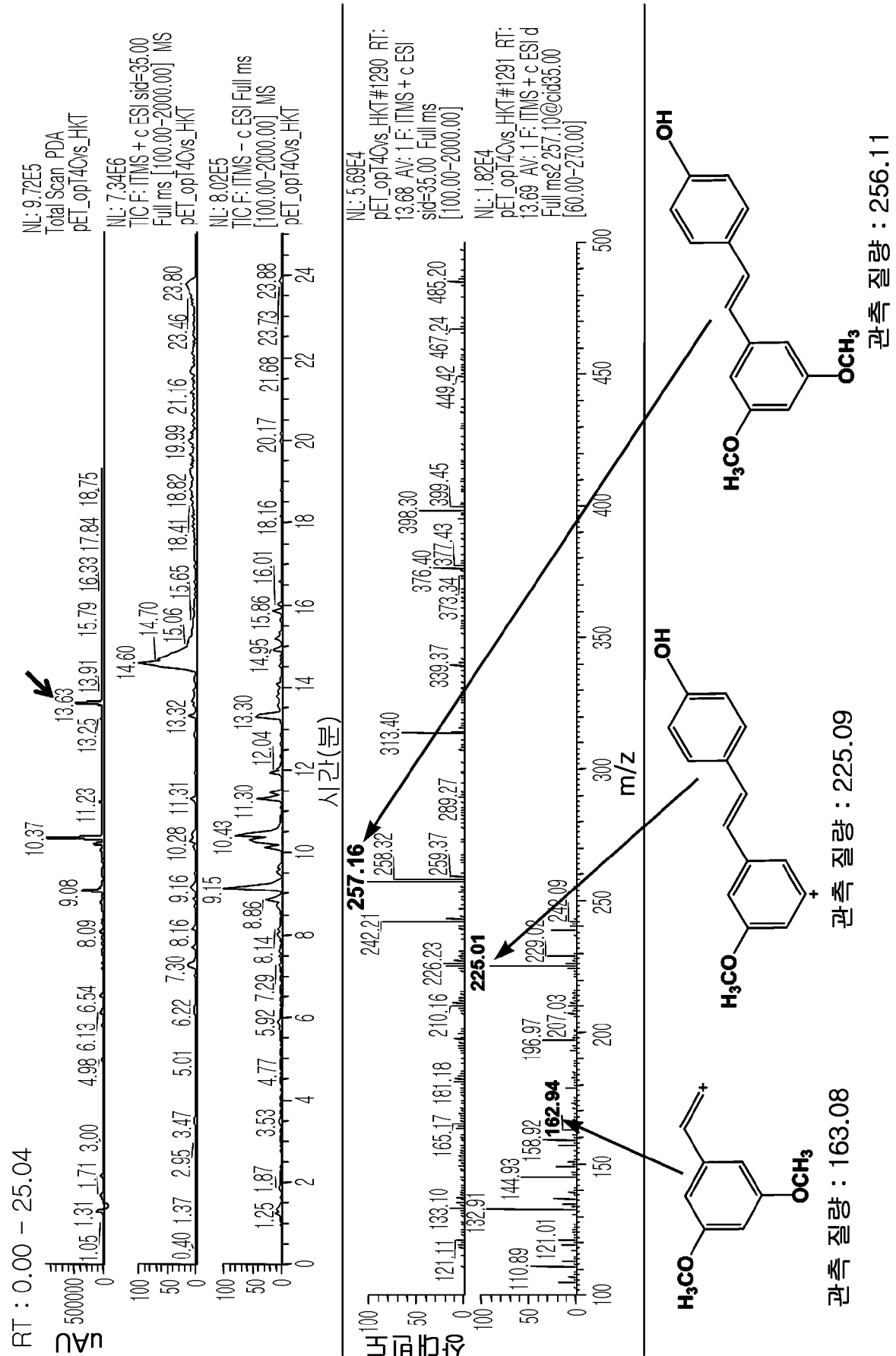


관측 길이 : 256.11

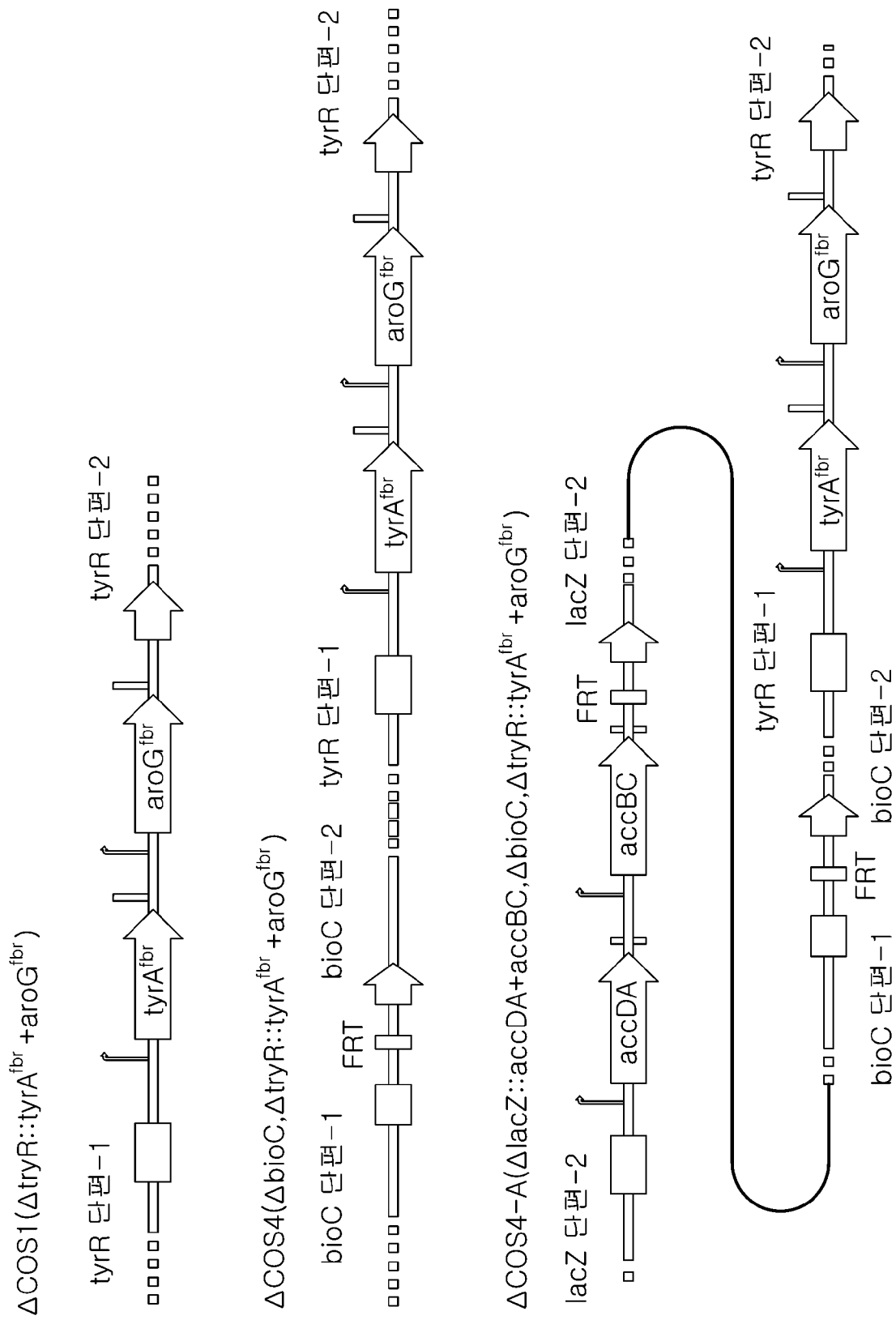
[도8]



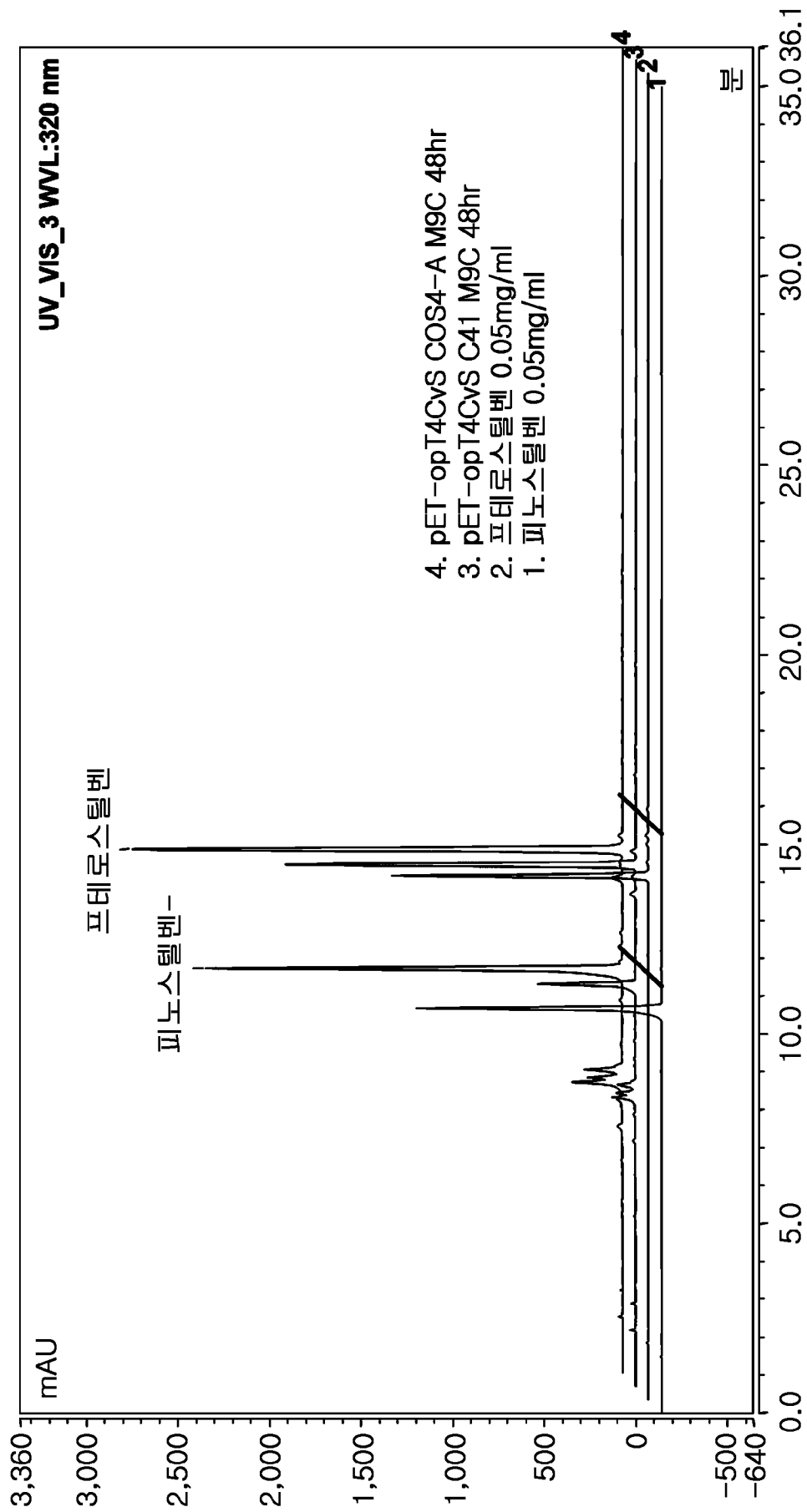
[도9]



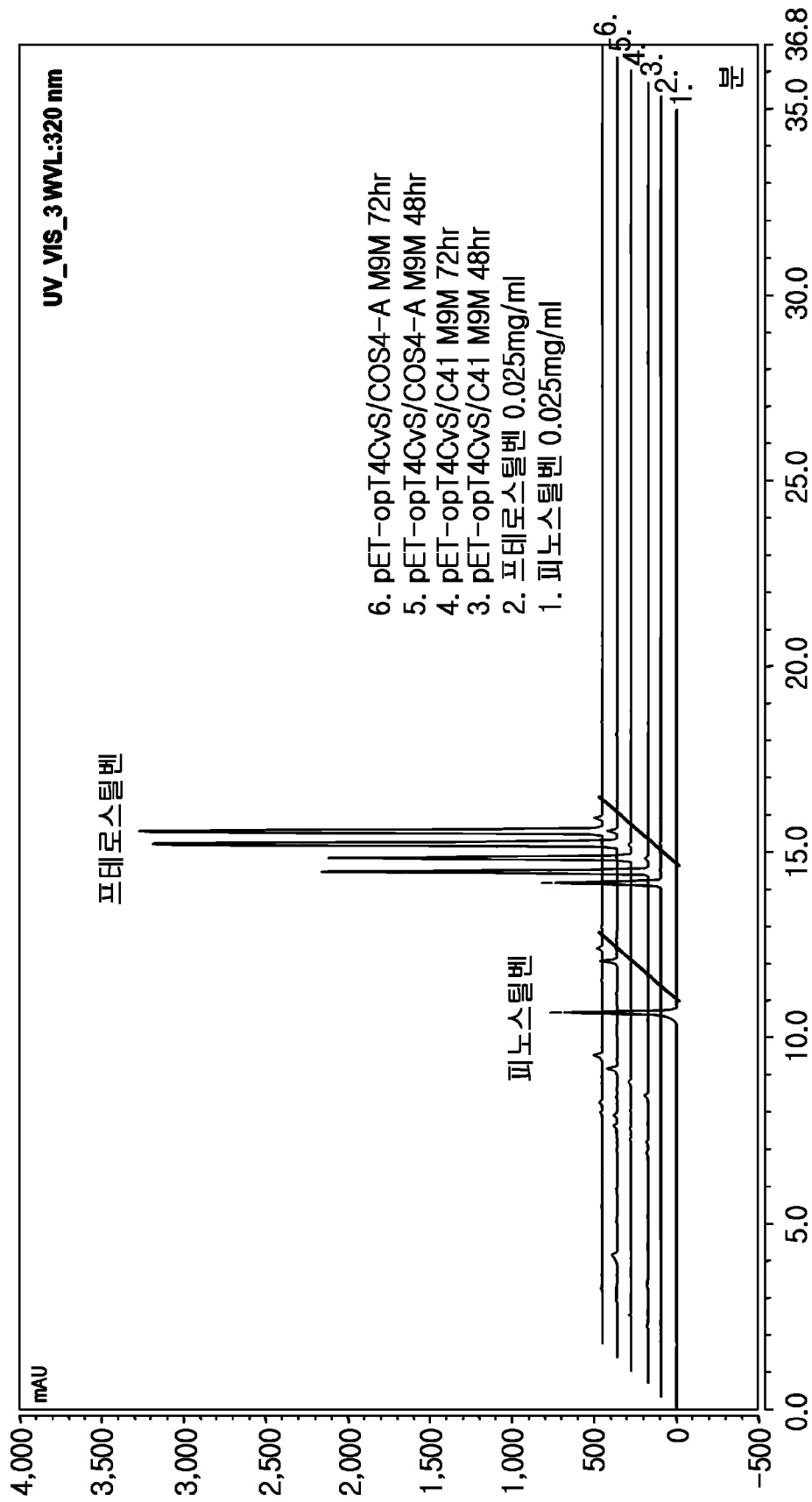
[도10]



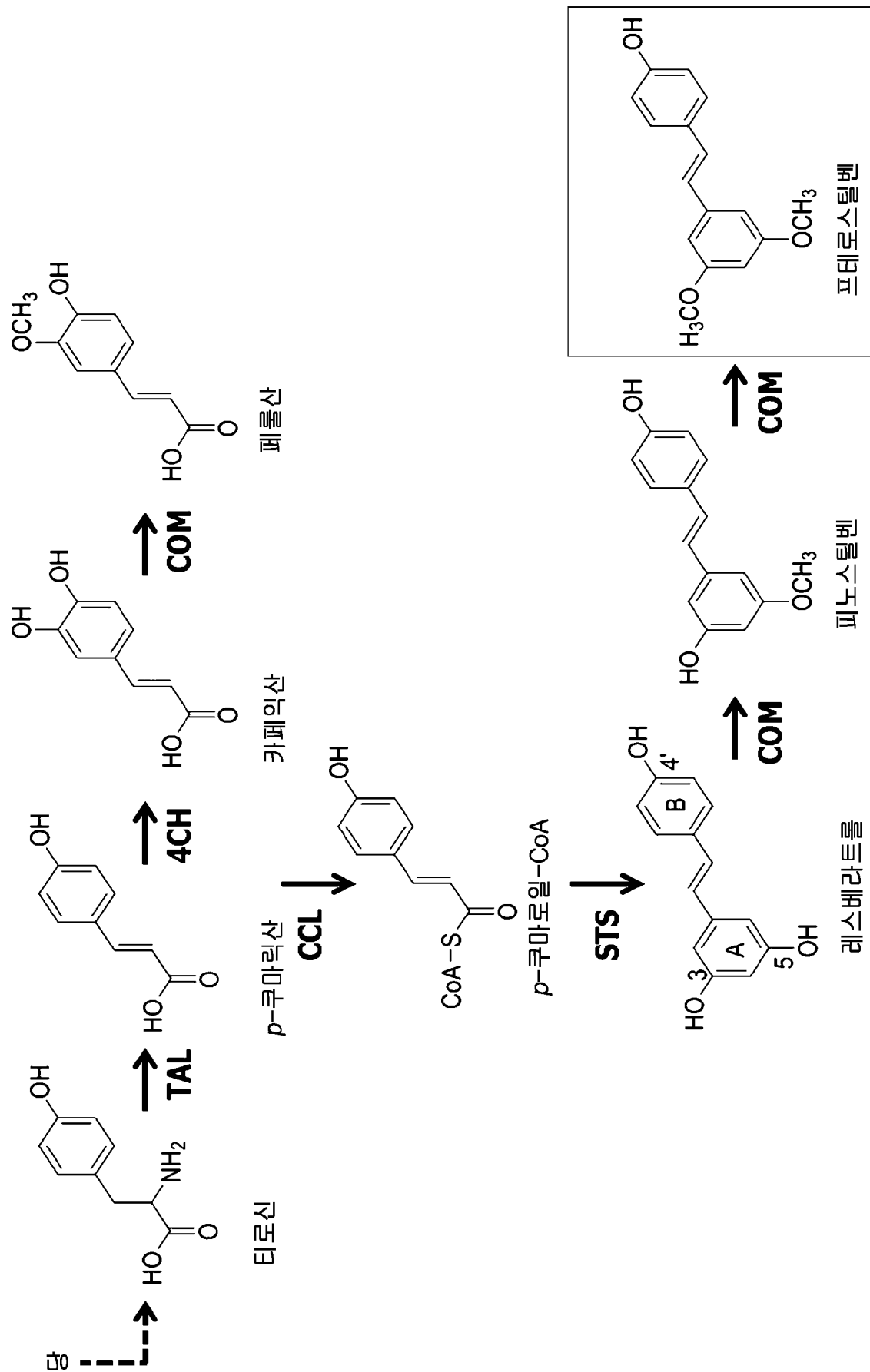
[도11]



[도12]



[도 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12P 7/22(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/63; A01H 5/00; A01H 5/10; C12N 9/10; C12P 7/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: COM, TAL, 4CL2, Pinostilbene, Pterostilbene, recombination vector

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Yechun et al., "Pterostilbene Production by Microorganisms Expressing Resveratrol O-methyltransferase", <i>Annals of Microbiology</i> , 2015, vol. 65, pages 817-826 See abstract; pages 819-820.	1-16
A	KR 10-1566692 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 09 November 2015 See the entire document.	1-16
A	JEONG, Yu Jeong et al., "Metabolic Engineering for Resveratrol Derivative Biosynthesis in <i>Escherichia Coli</i> ", <i>Molecules and Cells</i> , 2015, vol. 38, no. 4, pages 318-326 See the entire document.	1-16
A	CHOI, Ok Sik et al., "Biosynthesis of Plant-specific Phenylpropanoids by Construction of an Artificial Biosynthetic Pathway in <i>Escherichia Coli</i> ", <i>Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology</i> , 2011, vol. 38, pages 1657-1665 See the entire document.	1-16
A	NCBI, GenBank accession no. AY081565.1 (14 April 2002) See the entire document.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 26 OCTOBER 2017 (26.10.2017)	Date of mailing of the international search report 26 OCTOBER 2017 (26.10.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007183

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	HEO, Kyung Taek et al., "De Novo Biosynthesis of Pterostilbene in an Escherichia Coli Strain using a New Resveratrol O-methyltransferase from Arabidopsis", Microbial Cell Factories, 15 February 2017, vol. 16, thesis no. 30 (internal pages 1-8) See abstract; figure 3.	1-16

Information on patent family members

PCT/KR2017/007183

30/12/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12P 7/22(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/63; A01H 5/00; A01H 5/10; C12N 9/10; C12P 7/22

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: COM, TAL, 4CL2, 피노스틸벤, 프테로스틸벤, 재조합 벡터

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WANG, YECHUN 등, 'Pterostilbene production by microorganisms expressing resveratrol O-methyltransferase' Annals of microbiology, 2015, 65권, 페이지 817-826 요약; 페이지 819-820 참조.	1-16
A	KR 10-1566692 B1 (한국생명공학연구원) 2015.11.09 전체 문헌 참조.	1-16
A	JEONG, YU JEONG 등, 'Metabolic engineering for resveratrol derivative biosynthesis in Escherichia coli' Molecules and Cells, 2015, 38권, 4호, 페이지 318-326 전체 문헌 참조.	1-16
A	CHOI, OKSIK 등, 'Biosynthesis of plant-specific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in Escherichia coli' Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38권, 페이지 1657-1665 전체 문헌 참조.	1-16
A	NCBI, GenBank accession no. AY081565.1 (2002.04.14) 전체 문헌 참조.	1-16

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 10월 26일 (26.10.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 10월 26일 (26.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

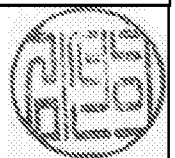
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	HEO, KYUNG TAEK 등, 'De novo biosynthesis of pterostilbene in an Escherichia coli strain using a new resveratrol O-methyltransferase from Arabidopsis' Microbial Cell Factories, 2017.02.15, 16권, 논문번호 30(내부 페이지 1-8) 요약; 도 3 참조.	1-16

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1566692 B1

2015/11/09

WO 2015-199435 A1

2015/12/30