(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0017170
(43) 공개일자 2019년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/75 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/75 (2013.01)
C12P 13/001 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0101575
(22) 출원일자 2017년08월10일
심사청구일자 2017년08월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)
김별
경기도 안양시 동안구 경수대로883번길 33, 105동 1002호 (비산동, 비산한화꿈에그린아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

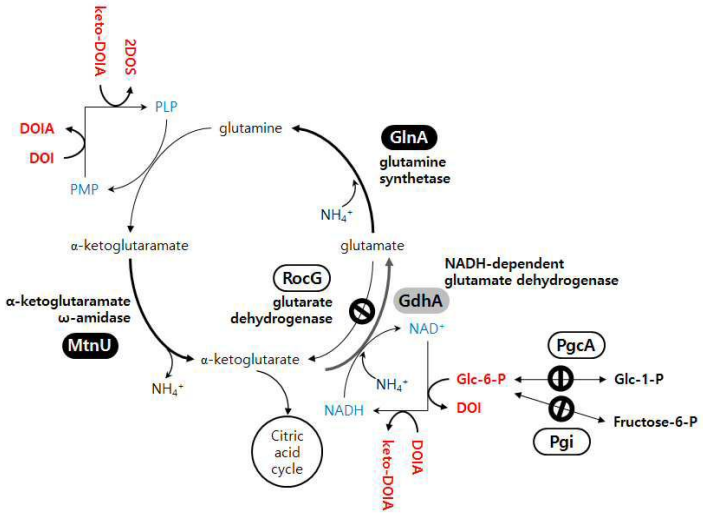
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **2-데옥시스트렙타민 생합성을 위한 재조합 균주 및 이를 이용한 2-데옥시스트렙타민의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 2-데옥시스트렙타민 생합성을 위한 재조합 균주 및 이를 이용한 2-데옥시스트렙타민의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 2-데옥시-스트렙타민 생합성 유전자와 NAD 조효소 재활용 회로를 포함하는 재조합 균주 및 이를 이용한 2-데옥시-스트렙타민의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Y 102/04002 (2013.01)
C12Y 305/01004 (2013.01)
C12Y 503/01009 (2013.01)
C12Y 504/02002 (2013.01)
C12Y 402/03124 (2015.07)

(72) 발명자
이재우
서울특별시 은평구 가좌로 344, 113동 1304호 (신사동, 현대아파트)
임주현
경기도 용인시 기흥구 구성로 470, 401동 704호 (청덕동, 물푸레마을4단지경남아너스빌)
황현하
경기도 성남시 분당구 백현로 234, 307동 303호 (정자동, 한솔마을한일아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ011066
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A2A2A01002524
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자(핵심)지원사업
연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2-데옥시스트렙타민 생합성 경로 및 NAD+ 재활용 회로가 도입되어 있는 2-데옥시스트렙타민 생합성을 위한 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 고초균(*Bacillus subtilis*)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 유래의 TobC, TobS1 및 TobE 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 핵산당 대사 경로 재설계 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 핵산당 대사 경로 재설계 유전자는 글루코오스-6-인산 이소머레이즈(Glc-6-P isomerase)를 코딩하는 *pgi*유전자 및 포스포글루코뮤테이즈(phosphoglucomutase)를 코딩하는 *pgcA* 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 NAD+ 재활용 회로는 알파케토글루타라메이트 아미데이즈를 코딩하는 유전자와 글루타민 합성효소를 코딩하는 유전자 및 NADH 의존성 글루타메이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 알파케토글루타라메이트 아미데이즈를 코딩하는 유전자는 고초균 유래 *mtnU* 유전자이고, 상기 글루타민 합성효소를 코딩하는 유전자는 고초균 유래 *glnA* 유전자이며, 상기 NADH 의존성 글루타메이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 대장균 유래 *gdhA* 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

제1항에 있어서, 글루타레이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 2-데옥시스트렙타민의 제조방법:

(a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 배양하여 2-데옥시스트렙타민을 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 생성된 2-데옥시트르렙타민을 수득하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 2-데옥시스트렙타민 생합성을 위한 재조합 균주 및 이를 이용한 2-데옥시스트렙타민의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 2-데옥시-스트렙타민 생합성 유전자와 NAD 조효소 재활용 회로를 포함하는 재조합 균주 및 이를 이용한 2-데옥시-스트렙타민의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2-데옥시스트렙타민(2-deoxystreptamine, 이하 2DOS)은 임상적 사용 중인 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계열 항생제의 핵심 구조로서, 스트렙토마이세스 프라디에(*Streptomyces fradiae*)에서 생산되는 아미노글리코사이드인 네오마이신(neomycin)의 화학적 가수분해를 통하여 그 구조가 최초로 확인되었다(비특허문헌 1). 이후, 전술한 스트렙토마이세스 프라디에의 무세포추출물(cell-free extract)를 이용하여 글루코오스-6-인산(glucose-6-phosphate, 이하 Glucose-6-P)으로부터 2DOS를 생합성하였고, 그 과정에 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(nicotinamide adenine dinucleotide, 이하 NAD+) 의존성 메카니즘이 관여함을 확인하였다(비특허문헌 2). 한편, 아미노글리코사이드의 일종인 뷰티로신(butirosin)을 생산하는 바실러스 서큘런스(*Bacillus circulans*)로부터 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소(2-deoxy-scyllo-inosose synthase, 이하 DOI synthase)로 BtrC가 분리, 정제되어 기질로서 Glc-6-P를 사용하여 2-데옥시-실로-이노소스(DOI)를 생합성하는 것을 확인하였다. 이후, BtrC 암호화 유전자인 *btrC*의 상동 유전자들이 2DOS를 핵심구조로 가지고 있는 다양한 아미노글리코사이드 생산성 미생물들(네오마이신 생산성 스트렙토마이세스 프라디에, 겐타마이신[gentamicin] 생산성 마이크로모노스포라 에키노스포라[*Micromonospora echinospora*], 카나마이신[kanamycin] 생산성 스트렙토마이세스 카나마이세티커스[*Streptomyces kanamyceticus*], 그리고 토브라마이신[tobramycin] 생산성 스트렙토마이세스 테네브라리우스[*Streptomyces tenebrarius*])에서 분리되어 각각의 아미노글리코사이드 항생제 생합성 유전자 집단(biosynthetic gene cluster)들이 보고된 바 있다(비특허문헌 3, 비특허문헌 4).

[0003] 현재, 글루코오스-6-인산으로부터 아미노글리코사이드의 핵심구조인 2DOS까지의 생합성 경로는 다음과 같이 3가지 효소들이 관여하는 4가지 순차적인 메카니즘이 보편화 되어있다: 첫째, Glc-6-P를 기질로 하여 DOI를 생합성하는 DOI 합성효소(DOI synthase); 둘째, DOI를 기질로하여 3번 탄소위치에 있는 카보닐(carbonyl)기를 아미노(amino)기로 전환하는 DOI 아미노전이효소(DOI aminotransferase); 셋째, 2-데옥시-실로-이노사민(2-deoxy-scyllo-inosamine, 이하 DOIA)의 1번 탄소위치에 있는 수산(hydroxyl)기를 카보닐기로 산화시키는 DOIA 탈수소효소(DOIA dehydrogenase); 마지막으로, 케토-2-데옥시-실로-이노사민(keto-2-deoxy-scyllo-inosamine; 이하 keto-DOIA)를 기질로하여 전술한 아미노전이효소가 1번 탄소위치의 카보닐기에 아미노기를 다시 한번 치환시켜

2DOS를 생합성하는 단계로 구성된다. 즉, 아미노전이효소의 경우엔 이중의 효소 반응에 각각 작용하여 일명 DOI:keto-DOIA 아미노전이효소(DOI:keto-DOIA aminotransferase)로 불리어진다(비특허문헌 3). 2DOS 생합성 단계 중, DOI 합성효소와 DOIA 탈수소효소는 산화반응에 참여하면서 NAD+를 조효소(cofactor)로 사용하여 환원형인 NADH를 부산물로 만드는데 비하여, DOI:keto-DOIA 아미노전이효소는 아미노 공여(amino donor) 조효소인 피리독사민 인산(pyridoxamine phosphate, 이하 PMP)의 피리독살 인산(pyridoxal 5'-phosphate, 이하 PLP)화를 통하여 아미노기를 기질인 DOI와 keto-DOIA에 각각 제공한다(도 1). 따라서, 미생물 내 Glc-6-P에서 2DOS로의 생합성의 효율 및 생산성을 향상시키기 위하여는 각 효소반응 단계에 필수적인 조효소 NAD+와 PMP의 지속적인 공급이 필수적이다. PMP의 경우엔 세포 내 아미노산인 글루타민(glutamine) 혹은 알라닌(alanine)의 탈아미노화와 짝 반응(coupling reaction)으로 자가 재활용(self-recycling)이 가능하나, NAD+의 경우엔 생성된 NADH의 재산화를 통한 NAD+ 재활용 회로(recycling circuit)의 도입이 요구된다(도 1).

[0004] 2-데옥시스트렙타민 및 그 구조적 변형 유도체 혹은 모방체의 화학적 합성법은 신규한 아미노글리코사이드 항생제 개발을 위하여 지속적으로 보고되고 있다(비특허문헌 5-14). 또한, 전술한 DOI 합성효소, DOI:keto-DOIA 아미노전이효소 및 DOIA 탈수소효소 암호화 유전자들을 대장균에 발현한 재조합 효소들의 순차적 반응을 통한 2DOS의 생합성 혹은 그 관련 유전자 세트를 이종 숙주(heterologous host)에 발현하여 미생물로부터 2DOS를 생산하는 방법들이 최근까지 보고된 바 있다(비특허문헌 15, 비특허문헌 16, 비특허문헌 17, 비특허문헌 18, 특허문헌 1, 특허번호 2). 하지만, 상기 미생물을 이용한 2DOS 생산 방법들의 경우 그 생산성이 최소 6 ug/L(대장균 내 뷰티로신 생합성 관련 유전자인 *btrC*, *btrS* 및 *btrN*을 발현한 경우)에서부터 2.5 mg/L(스트렙토마이세스 베네주엘라이 내 카나마이신 생합성 관련 유전자인 *kanA*, *kanB* 및 kanK를 발현한 경우) 사이로 2DOS의 산업화 수준에 미치지 못하고 있는 실정이다.

[0005] 본 발명자들은 토브라마이신 생산성 스트렙토마이세스 테네브라리우스 유래의 DOI 합성효소를 암호화하는 *tobC* 유전자를 고초균(Bacillus subtilis) 숙주의 코돈(codon) 선호도에 맞춘 코돈 최적화된 인공 유전자($tobC_{opt}$)를 고초균에 도입하는 동시에, 그 기질인 Glc-6-P의 세포농도를 높이기 위하여 고초균 내 핵산당 대사 경로 중 Glc-6-P isomerase와 phosphoglucomutase 암호화 유전자인 *pgi*와 *pgcA*를 고초균 유전체에서 제거한 재조합 균주의 제작 방법을 특허출원한 바 있으며(대한민국 등록특허 제 1,718,508 호), 상기 재조합 균주를 포도당과 글리세롤을 탄소원으로 활용한 유가 배양을 통하여 발효 50시간 내로 1 리터 당 약 38 g의 DOI를 대량 생산하였다.

[0006] 합성 생물학에 기반을 둔 화학적 합성 인공 유전자들의 추가 발현 및 대사공학적 접근을 통하여 핵산당 대사경로를 재설계한 고초균 재조합 균주의 제작, 나아가 인공 유전자의 발현산물인 효소들의 효율적 반응에 필수적인 조효소 재활용 회로의 추가적인 도입은 결과적으로 목적화합물인 2DOS를 핵심구조로 하는 다양한 아미노글리코사이드의 신규 구조 생합성 및 진보된 약리효과를 기대할 수 있으므로 의약품으로서의 산업적 활용도를 넓히는 동시에 전 세계 의료 이슈라 할 수 있는 항생제 내성균주인 슈퍼버그(superbug)에 대응할 수 있는 사회적 파급효과를 제공할 수 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 2-데옥시스트렙타민(2DOS)의 대사경로를 재설계한 재조합 균주를 제작하고자 예의 노력한 결과, DOI 합성효소를 코딩하는 유전자, DOI:keto-DOIA 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 DOIA 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2-데옥시스트렙타민 생합성 경로 및 NAD+ 재활용 회로가 도입되어 있는 재조합 고초균을 제작하고, 상기 재조합 고초균이 기존에 알려진 균주보다 월등히 높은 2-데옥시스트렙타민 생산성을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌1: WO 2011132830 A1

(특허문헌 0002) 특허문헌2: 한국등록특허 제1,477,235호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌1: Hichens M, Rinehart KL Jr (1963) Chemistry of the neomycins. XII. The absolute configuration of deoxystreptamine in the neomycins, paromomycins and kanamycins. J Am Chem

Soc 85:1547-1548

(비특허문헌 0002) 비특허문헌2: Yamauchi N, Kakinuma K (1995) Enzymic carbocycle formation in microbial secondary metabolism. The mechanism of the 2-deoxy-scyllo-inososе synthase reaction as a crucial step in the 2-deoxystreptamine biosynthesis in Streptomyces fradiae. J Org Chem 60:5614-5619

(비특허문헌 0003) 비특허문헌3: Llewellyn NM, Spencer JB (2006) Biosynthesis of 2-deoxystreptamine containing aminoglycoside antibiotics. Nat Prod Rep 23:864-874

(비특허문헌 0004) 비특허문헌4: Park SR, Park JW, Ban YH, Sohng JK, Yoon YJ (2013) 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: Recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. Nat Prod Rep 30:11-20

(비특허문헌 0005) 비특허문헌5: Blond A, Moumne R, Begis G, Pasco M, Lecourt T, Micouin L (2011) Rhodium(II) carbene-mediated modification of 2-deoxystreptamine surrogates. Tetrahed Lett 52:3201-3203

(비특허문헌 0006) 비특허문헌6: Roberts S, Chittapragada M, Pendem K, Leavitt BJ, Mahler JW, Ham YW (2010) Synthesis of 2,4,5-triaminocyclohexanecarboxylic acid as a novel 2-deoxystreptamine mimic. Tetrahed Lett 51:1779-1781

(비특허문헌 0007) 비특허문헌7: Tan Q, Hayashi M (2009) Asymmetric desymmetrization of 4,5-epoxycyclohex-1-ene by enantioselective allylic oxidation. Org Lett 11:3314-3317

(비특허문헌 0008) 비특허문헌8: Roberts SE (2009) Modification of 2-deoxystreptamine for RNA recognition. Abstracts of Papers, 237th ACS National Meeting, Salt Lake City, UT, United States, March 22-26, CARB-056

(비특허문헌 0009) 비특허문헌9: Aslam MW, Busscher GF, Weiner DP, de Gelder R, Rutjes FPJT, van Delft FL (2008) Fully Orthogonally Protected 2-Deoxystreptamine from Kanamycin. J Org Chem 73:5131-5134

(비특허문헌 0010) 비특허문헌10: Chen Y-L, Pyplo-Schnieders J, Redlich H, Luftmann H, Froehlich R (2007) Preparation of 2-deoxystreptamine derivatives with all-axial substituents for de-symmetrization. Tetrahed Lett 48(46):8145-8148

(비특허문헌 0011) 비특허문헌11: Busscher GF, van Delft FL, Rutjes FPJT (2005) Novel syntheses of 2-deoxystreptamine. Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, March 13-17, ORGN-371

(비특허문헌 0012) 비특허문헌12: Busscher GF, Groothuys S, De Gelder R, Rutjes FPJT, Van Delft FL (2004) Efficient preparation of a 1,3-diazidocyclitol as a versatile 2-deoxystreptamine precursor. J Org Chem 69(13):4477-4481

(비특허문헌 0013) 비특허문헌13: Busscher GF, Rutjes FPJT, Van Delft FL (2004) Synthesis of a protected enantiomerically pure 2-deoxystreptamine derivative from D-allylglycine. Tetrahed Lett 45(18):3629-3632

(비특허문헌 0014) 비특허문헌14: De Almeida MV, Da Silva ET, Le Hyaric M, Machado AS, De Souza MVN, Santiago RM (2003) Synthesis of protected EPI-2-deoxystreptamine and analogs. J Carbohyd Chem 22(7&8):733-742

(비특허문헌 0015) 비특허문헌15: Kudo F, Yamamoto Y, Yokoyama K, Eguchi T, Kakinuma K (2005) Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in Streptomyces fradiae NBRC 12773. J Antibiot 58:766-774

(비특허문헌 0016) 비특허문헌16: Park JW, Hong JS, Parajuli N, Jung WS, Park SR, Lim SK, Sohng JK, Yoon YJ (2008) Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set. Proc Natl Acad Sci USA 105(24):8399-8404

(비특허문헌 0017) 비특허문헌17: Kurumbang NP, Oh TJ, Liou K, Sohng JK (2008) Heterologous production and detection of recombinant directing 2-deoxystreptamine (DOS) in the non-aminoglycoside-producing

host Streptomyces venezuelae YJ003. J Microbiol Biotechnol 18(5):866-73

(비특허문헌 0018) 비특허문헌18: Park JW, Park SR, Nepal KK, Han AR, Ban YH, Yoo YJ, Kim EJ, Kim EM, Kim D, Sohng JK, Yoon YJ (2011) Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation. Nat Chem Biol 7(11):843-852

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 2-데옥시스트렙타민의 생산성이 향상된 재조합 균주를 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 2-데옥시스트렙타민의 생산성이 향상된 재조합 균주를 이용한 2-데옥시스트렙타민의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2-데옥시스트렙타민 생합성 경로 및 NAD+ 재활용 회로가 도입되어 있는 2-데옥시스트렙타민 생합성을 위한 재조합 미생물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 글루코스 함유 배지에서 배양하여 2-데옥시스트렙타민을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 2-데옥시트르렙타민을 수득하는 단계를 포함하는 2-데옥시스트렙타민의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 본 발명의 고초균 재조합 균주 발효를 통하여 2DOS의 고효율 생산이 가능하며, 향후 상기 재조합 균주를 이용하거나 유용 유전자의 추가적인 도입을 통하여 신규한 아미노글리코사이드(aminoglycoside) 계열 항생제들의 발효 생산 공정을 개발에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 3가지 효소, 즉 DOI 합성효소, DOI:keto-DOIA 아미노전이효소 및 DOIA 탈수소효소들의 연속적인 반응을 통한 2DOS의 생합성 과정과 각 효소반응에 필요한 조효소들의 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명에 기재된 대사공학을 기반으로 한 핵산당 대사회로 재설계 및 NAD+ 재활용 회로의 설계 도식화한 것이다.

도 3은 재조합 균주들에서 생산되는 2DOS 생산성 확인을 위한 대표적인 (A) 2-데옥시스트렙타민의 ESI-MS/MS 스펙트럼과 (B) UPLC-ESI-MS/MS 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 기재된 고초균 재조합 균주들 중 2-데옥시스트렙타민(2DOS) 최고 생산성을 나타내는 BS2DOS-8의 총 60시간 동안의 유가배양(fed-batch culture) 중 균체량, 포도당 및 글리세롤 탄소원들의 소비 정도, 그리고 생산되는 목적물질 2DOS 농도의 추이를 정량한 그래프이다.

도 5는 본 발명에 기재된 고초균 재조합 균주들 중 인공 합성 유전자들이 발현된 고초균 재조합 BS2DOS-1 균주와 인공 합성 유전자들이 발현되는 동시에 조효소 NAD+ 재활용 회로가 도입된 BS2DOS-8 균주들의 발효과정 중 (A) 세포 내 NAD+, (B) 세포 내 NADH 농도 및 (C) NAD+/NADH 농도 비율 추이를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 2-데옥시스트렙타민의 생합성을 위하여, 기존에 보고되어온 DOI 합성효소, DOI:keto-DOIA 아미노전이효소 및 DOIA 탈수소효소를 암호화하는 인공 유전자들을 화학합성하고, 다음으로 이들 인공 합성 유전자들이 도입되는 고초균 숙주 내 핵산당 대사 경로 및 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(nicotinamide

adenine dinucleotide) 조효소 재활용 회로를 공학화함으로서 재조합 고초균 내 2DOS 생합성 경로를 재설계하였다. 상기 2DOS 생합성 경로 재설계를 통하여 최종적으로 제작된 재조합 균주를 발효시켜 2-데옥시스트렙타민(2DOS)을 생산하는 경우, 기존 선행기술의 재조합 균주보다 현저히 우수한 생산성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 2-데옥시스트렙타민 생합성 경로 및 NAD+ 재활용 회로가 도입되어 있는 2-데옥시스트렙타민 생합성을 위한 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 고초균(*Bacillus subtilis*)인 것을 특징으로 하는 할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소를 코딩하는 유전자는 스트렙토마이세스 카나마이세티커스(*Streptomyces kanamyceticus*) 유래의 *kanC*유전자, 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 유래 *tobC* 유전자 또는 바실러스 실큘란스(*Bacillus circulans*)유래 *BtrC* 유전자인 것이 바람직하다.

[0020] 더욱 바람직하게는 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*) 유래의 TobC, TobS1 및 TobE 유전자 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 본 발명의 2-데옥시-실로-이노소스(DOI) 합성효소를 코딩하는 유전자, 2-데옥시-실로-이노소스(DOI):케토-2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 아미노전이효소를 코딩하는 유전자 및 2-데옥시-실로-이노사민(DOIA) 탈수소효소를 코딩하는 유전자는는고초균 숙주에 맞추어 코돈 최적화된 것임을 특징으로 할 수 있으며, 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 핵산당 대사 경로 재설계 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 핵산당 대사 경로 재설계 유전자는 글루코오스-6-인산 이소머레이즈(Glc-6-P isomerase)를 코딩하는 *pgi*유전자 및 포스포글루코뮤테이즈(phosphoglucomutase)를 코딩하는 *pgcA* 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 본 발명에서는 추가적으로 상기 합성 유전자 발현산물들인 DOI 합성효소와 DOIA 탈수소효소들의 효소반응에 필수적인 조효소 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD+)의 재활용 회로(recycling circuit)를 공학화하기 위하여, 대장균(*Escherichia coli*) 유래의 NADH 의존적 글루타메이트 탈수소효소(NADH-dependent glutamate dehydrogeanse)를 암호화하고 있는 gdhA의 상기 고초균 재조합 발현 균주 제작하였다.

[0024] 또한, 고초균 내 NAD+ 재활용 회로를 위하여, 고초균 내 NAD+ 특이적 글루타레이트 탈수소효소(NAD-specific glutarate dehydrogenase)를 암호화하고 있는 rocG 유전자를 상기 고초균으로부터 결손화된 재조합 균주의 제작하였다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 NAD+ 재활용 회로는 알파케토글루타라메이트 아미데이즈를 코딩하는 유전자와 글루타민 합성효소를 코딩하는 유전자 및 NADH 의존성 글루타메이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 도입되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 알파케토글루타라메이트 아미데이즈를 코딩하는 유전자는 고초균 유래 *mtnU* 유전자이고, 상기 글루타민 합성효소를 코딩하는 유전자는 고초균 유래 *glnA* 유전자이며, 상기 NADH 의존성 글루타메이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자는 대장균 유래 *gdhA* 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 글루타레이트 탈수소효소를 코딩하는 유전자가 추가로 결실되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명에의 2DOS 생합성을 위한 대사공학을 기반으로 한 핵산당 대사회로 재설계 및 NAD+ 재활용 회로의 설계를 도 2에 나타내었다. 핵산당 대사와 관련해서는 고초균 내 PgcA와 Pgi 효소 암호화 유전자들의 결손화를, 그리고 NAD+ 재활용 회로 설계를 위해서는 고초균 유전체 내 글루타레이트 탈수소효소(glutarate dehydrogenase)로 작용하는 RocG 암호화 유전자의 결손화 및 각각 알파케토글루타라메이트 아미다아제(α-ketoglutaramate ω-amidase)와 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)로 작용하는 MtnU와 GlnA 유전자의 추가적인 발현, 그리고 대장균 유래의 NADH 의존적 글루타메이트 탈수소효소(NADH-dependent glutamate dehydrogeanse)인 GdhA 암

호화 유전자의 고초균 내 형질전환을 나타내었다.

[0029] 본 발명에 따른 합성 생물학에 기반을 둔 2DOS 생합성에 관여하는 유전자들의 인공 화학합성, 대사공학을 통한 핵산당 대사회로 재설계 및 NAD+ 재활용 회로를 새로이 발현한 고초균 재조합균주의 개발은, 2DOS의 고 생산을 가능케 하며, 향후 본 발명의 재조합 균주를 이용하거나 유용 유전자의 추가적인 도입을 통하여 신규한 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계열 항생제들의 발효 생산 공정개발에 유용하다.

[0030] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 2-데옥시스트렙타민을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 2-데옥시트르렙타민을 수득하는 단계를 포함하는 2-데옥시스트렙타민의 제조방법에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명에 따른 재조합 균주인 BS2DOS-8 균주를 발효시켜, 2DOS를 생산한 결과 24.5g/L의 생산성을 나타내었으며, 이러한 결과를 기존의 2DOS 생산능을 가지는 것으로 알려진 균주들과 2DOS의 생산성을 비교해 본 결과, 대장균 내 뷰티로신 생합성 관련 유전자인 *btrC*, *btrS* 및 *btrN*을 발현한 선행 연구에서는 6 μg/L의 2DOS 생산성을 나타내었으며(한국등록특허 제1,477,235호), 스트렙토마이세스 베네주엘라이 내 카나마이신 생합성 관련 유전자인 *kanA*, *kanB* 및 kanK를 발현한 경우에는 2.5mg/L의 2DOS 생산성을 나타내어(Park JW *et al.*, Nat Chem Biol 7:843, 2011), 본 발명의 균주가 적어도 1000배 이상으로 나타내 현저히 증가된 2DOS 생산성을 나타내었다.

[0032] 본 발명에서, "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0033] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5α, *E. col* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* B21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(speices) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(*bacilli*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르게센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

[0034] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그날 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SRα 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기

포스파타제의 프로모터들, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 프로모터는 대장균에서 본 발명의 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0036] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결 (operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0037] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[0038] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다.

[0039] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질감염"은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

[0040] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0041] **실시예 1: 2DOS 합성능을 가지는 고초균 재조합 균주의 제작**

[0042] 고초균인 *Bacillus subtilis* 168 균주(유전형: *trpC2,* 표현형: Kan^r [카나마이신 내성], ATCC 23857, USA)를 재조합 균주 제작의 원 균주로 사용하였다. 선발 마커(selection marker)가 필요 없는 유전자 결손방법을 이용하여, 고초균 체내 핵산당 대사경로에서 작동하는 Glc-6-P isomerase와 phosphoglucomutase를 암호화하는 *pgi*와 *pgcA* 유전자를 각각 결손 혹은 둘 다 결손화 시킨 고초균 재조합 균주들을 제작하였다.

[0043] 삽입 플라스미드(integration plasmid) pCU-pgiFB(표현형: Cm^r [클로람페니콜{chloramphenicol} 내성])를 고초균 168 균주 내로 도입한 후, 첫 단일 교차 재조합(single-crossover recombination)으로 고초균 유전체 내 삽입한다. 형질 전환된 재조합 고초균 BS△pgi(유전형: *trpC2△pgi*) 균주는 5 ug/mL 수준의 클로람페니콜이 부가된 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 고체평판 배지에서 선발한 후, 18 시간동안 루리아-베르타니 액체 배지에서 배양한다. 이후, 5FU 고체 평판 배지에 도말한다. 한편, 삽입 플라스미드 pCU-pgcAFB(표현형: Cm^r)를 재조합 고초균 BS△pgi(유전형: *trpC2△pgi*) 균주 내로 도입하여 pgi와 pgcA 유전자가 동시에 결실된 재조합 고초균 BS△pgi△pgcA(유전형: *trpC2△pgi△pgcA*) 균주를 제작하였다. 마찬가지로, 삽입 플라스미드 pCU-rocGFB(표현형: Cm^r)를 상기 고초균 BS△pgi△pgcA(유전형: *trpC2△pgi△pgcA*) 균주 내로 도입하여 핵산당 대사경로가 재설계된 동시에 글루타레이트 탈수소효소를 암호화하는 rocG 유전자가 결손화된 재조합 고초균 BS△pgi△pgcA△rocG(유전형: *trpC2△pgi△pgcA△rocG*) 균주를 제작하였다.

[0044] 유전자 조작은 표준 기법을 통하여 수행하며, 대장균 및 고초균의 형질전환은 열 충격(heat shock) 형질전환법 및 수용 세포(competent cell)법으로 수행하였다. 항생제들은 적절한 수준으로 재조합 균주 배지에 첨가하였다

(카나마이신 5ug/mL, 암피실린[ampicillin] 100 ug/mL, 클로람페니콜[chloramphenicol] 5 ug/mL).

[0045] 한편, 구성적(constitutive) 유전자 발현 벡터인 pHP13-P43을 다음과 같이 제작한다. 우선, 고초균의 프로모터 중 하나인 P_{43}을 정방향 프라이머 P43-F(5'GGTAGGATCCGCGGCTTCCTTGTAGAGCTCAG3', 밑줄은 *Bam*H1 제한효소 절단부위: 서열번호 4)와 역방향 프라이머 P43-B(5'CTCTACTAGTCATGTGTACATTCCTCTC3: 서열번호 5, 밑줄은 *Spe*I 제한효소 절단부위) 쌍을 이용하여 PCR로 증폭한다. PCR 산물을 *Bam*H1-*Spe*I로 절단한 후, 동일한 제한효소들로 처리한 고초균 발현 플라스미드 pHP13(표현형: Cm^r, EM^r[에리스로마신 내성])에 클로닝함으로서 pHP13-P43(유전형: P_{43}, 표현형: Cm^r, EM^r)를 제작하였다.

[0046] 삽입 플라스미드인 pCU-pgiFB는 다음과 같이 제작하였다. 고초균 유전체 내 *pgi* 유전자의 상부 염기조각인 pgi-F와 하부 염기조각 pgi-B을 각각 D-pgi-FU/L(5'CTAAACATGAACTGACAATTGAGGAAG3': 서열번호 6)와

[0047] D-pgi-BU/L(5'GAAGAAATATACAAGGTATCCAAAAGTATATG3': 서열번호 7) 프라이머 쌍을 이용하여 고초균 168 균주의 유전체 템플레이트로부터 증폭하였다. 이후 두 종의 염기조각을 융합하여 D-pgi-FsnU/L 프라이머로 퓨전 PCR을 실시한다. PCR 산물을 *Sph*I-*Kpn*I 제한효소로 절단한 후 동일한 제한효소들로 처리한 pCU(표현형: Cm^r)에 연결함으로서 pCU-pgiFB(유전형: pgi-FB, 표현형: Cm^r)를 제작하였다. 또 다른 삽입 플라스미드(integration plasmid) pCU-pgcAFB(유전형: pgcA-FB, 표현형: Cm^r)도 그 상응하는 프라이머들(D-pgcA-FU/L: 5'TTAAGTTTATCGGTGAAAAGATTAAGGAATAC3': 서열번호 8,

[0048] D-pgcA-BU/L: 5'AAAACCATATTCGTTAAAGAGATTGATGAG3': 서열번호 9)을 이용한 퓨전 PCR과 동일한 제한효소 부위를 이용하여 제작하는 한편, 삽입 플라스미드 pCU-rocGFB(유전형: rocG-FB, 표현형: Cm^r)도 그에 상응하는 프라이머들(D-rocG-FU/L: 5'CTTATTTCTGTCTACCCAAACAATCAT3': 서열번호 10,

[0049] D-rocG-BU/L: 5'TTTACTTCCTCTTCATTAACTTCTGGA3'서열번호 11)을 이용한 퓨전 PCR과 동일한 제한효소 부위를 이용하여 제작하였다.

[0050] 아미노글리코사이드계열 토브라마이신을 생산하는 스트렙토마이세스 테네브라리우스(Streptomyces *sp.* DSM 40477T, GenBank AJ810851) 유래의 DOI 합성효소, DOI:keto-DOIA 아미노전이효소 및 DOIA 탈수소효소들을 각각 암호화하는 *tobC*, *tobS1* 및 *tobE* 유전자를 바탕으로하여 고초균 숙주의 코돈(codon) 선호도에 맞춘 코돈 최적화된 인공 유전자 조각들($tobC_{opt}$: 서열번호 1, $tobS1_{opt}$: 서열번호 2 및 $tobE_{opt}$: 서열번호 3)을 제노텍(대전, 대한민국)에 주문하여 합성하였다 인공 제작한 DOI 합성효소 암호화 $tobC_{opt}$ 유전자 조각은 리보솜 결합 부위의 상부에 *Xba*I 제한 부위를 그리고 종결코돈 아래쪽에 *Hind*III 제한부위를 인위적으로 삽입시켰다. 한편, 인공 제작 DOI:keto-DOIA 아미노전이효소 암호화 $tobS1_{opt}$ 유전자 조각과 DOIA 탈수소효소 암호화 $tobE_{opt}$ 유전자 조각은 리보솜 결합 부위의 상부에 *Xba*I 제한 부위를 그리고 종결코돈 아래쪽에 *Spe*I/*Hin*dIII 이중 제한부위를 인위적으로 삽입시켰다.

[0051] 상기 2DOS 생합성 관련 총 3가지 인공 합성 유전자 조각들은 다음과 같이 pHP13-P43 발현벡터에 순차적으로 클로닝한다; DOI 합성효소 암호화 $tobC_{opt}$ 유전자 조각을 *Xba*I-*Hind*III로 절단하고 동일한 제한효소들로 처리한 pHP13-P43(유전형: P_{43}, 표현형: Cm^r, EM^r)에 연결, 이후 *Spe*I과 *Xba*I의 상보적 접착말단(compatible cohesive end)을 이용한 바이오브릭 어셈블리(BioBrick assembly)기법으로 상기 3종의 2DOS 생합성 관련 인공 유전자세트를 pHP13-P43에 순차적으로 연결하여 pHP13-P43-$TobC_{opt}$-$TobS1_{opt}$-$TobE_{opt}$(유전형: P_{43}-$tobC_{opt}$ -$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$, 표현형: Cm^r, EM^r)를 제작하였다.

[0052] NAD+ 재활용 회로의 고초균 내 발현을 위하여, 알파케토글루타라메이트 아미다아제(α-ketoglutaramate ω-amidase)와 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)로 작용하는 MtnU와 GlnA 유전자의 추가적인 발현 및 대장균 유래의 NADH 의존적 글루타메이트 탈수소효소(NADH-dependent glutamate dehydrogeanse)인 GdhA 암호화 유전자의 고초균 내 이종 형질전환을 실시하였다. 알파케토글루타라메이트 아미다아제(α-ketoglutaramate ω-amidase)와 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)를 각각 암호화하는 *mtnU* 유전자(서열번호 12), *glnA* 유전자(서열번호 13),는 고초균 168균주 유전체를 템플레이트로하며, NADH 의존적 글루타메이트 탈수소효소 암호화 *gdhA* 유전자(서열번호 14)는 대장균 K-12균주 유전체를 템플레이트로하여 다음과 같이 PCR 증폭한다; 고초균

168균주 유전체를 템플레이트로하여 정방향 프라이머 MtnU-F(5'TAATCTAGATACAATGTACATCGCGGATAAG3': 서열번호 15, 밑줄은 *Xba*I 제한효소 절단부위)와 역방향 프라이머 MtnU-B(5'-ATATACGTATCACTAGTGTAACAGATCAATCCAGAGC3': 서열번호 16, 밑줄은 *Spe*I/*Sna*B1 이중 제한효소 절단부위) 쌍을 이용하여 PCR로 증폭하며, 동일한 템플레이트에 정방향 프라이머 GlnA-F(5'ATATCTAGAAAGTCATGTTTGACGGTTCTTC3': 서열번호 17, 밑줄은 *Xba*I 제한효소 절단부위)와 역방향 프라이머 GlnA-B(5'-TTCTACGTATTACTAGTTCAGAATCCGTTTTAAGTTG3': 서열번호 18, 밑줄은 *Spe*I/*Sna*B1 이중 제한효소 절단부위) 쌍을 이용하여 PCR로 증폭하였다. 한편, 대장균 K-12균주 유전체를 템플레이트로 하여 정방향 프라이머 GdhA-F(5'GCTTCTAGAAAAGAATTTGGCCTAACCTATC3': 서열번호 19, 밑줄은 *Xba*I 제한효소 절단부위)와 역방향 프라이머 GdhA-B(5'-AATTACGTAAAACTAGTTACACCTGCTTCAAGGAACA3': 서열번호 20, 밑줄은 *Spe*I/*Sna*B1 이중 제한효소 절단부위) 쌍을 이용하여 PCR로 증폭하였다.

[0053] 각각의 PCR 산물을 *Xba*I-*Sna*B1으로 절단한 후, *Spe*I-*Sna*B1 제한효소들로 처리한 pHP13-P43(유전형: P_{43}, 표현형: Cm^r, EM^r)에 연결하여 pHP13-P43-MtnU(유전형: P_{43}-*mtnU*, 표현형: Cm^r, EM^r), pHP13-P43-GlnA(유전형: P_{43}-*glnA*, 표현형: Cm^r, EM^r) 및 pHP13-P43-GdhA(유전형: P_{43}-*gdhA*, 표현형: Cm^r, EM^r)를 제작한다. 한편, MtnU PCR 산물을 우선 *Xba*I-*Spe*I으로 절단하고 *Spe*I-*Sna*B1 제한효소들로 처리한 pHP13-P43에 연결한 후, 이어서 *Xba*I-*SnaB*I으로 절단한 GdhA PCR 산물을 동일 제한효소로 처리한 벡터에 연결함으로서 pHP13-P43-MtnU-GdhA(유전형: P_{43}-*mtnU*-*gdhA*, 표현형: Cm^r, EM^r) 발현벡터를 제작하였다. 마찬가지로, pHP13-P43-GlnA-GdhA(유전형: P_{43}-*glnA*-*gdhA*, 표현형: Cm^r, EM^r) 및 pHP13-P43-MtnU-GlnA-GdhA(유전형: P_{43}-*mtnU*-*glnA*-*gdhA*, 표현형: Cm^r, EM^r) 역시 상기와 같은 상보적 접착말단을 통한 바이오브릭 어셈블리기법으로 제작하였다.

[0054] 2DOS 생합성 유전자 3종 세트들과 상기 제작된 총 6종의 NAD+ 재활용 회로 도입용 유전자 조합들을 각각 단일벡터 내 이중의 P_{43} 프로모터로 발현하고자, 6종의 발현벡터 즉, pHP13-P43-MtnU, pHP13-P43-GlnA, pHP13-P43-GdhA, pHP13-P43-MtnU-GdhA, pHP13-P43-GlnA-GdhA, pHP13-P43-MtnU-GlnA-GdhA를 템플레이트로하여 유전자(들)의 상부에 위치한 P_{43}을 포함한 영역을 정방향 프라이머 NAD-F(5'GTGGCATGCGCGGCTTCCTTGTAGAGCTCAG3': 서열번호 21, 밑줄은 *Sph*I 제한효소 절단부위)와 역방향 프라이머NAD-B(5'-CTCACGCGTTTGTTACGTGGATTATATTG3': 서열번호 22, 밑줄은 *Mlu*I 제한효소 절단부위) 쌍을 활용하여 PCR 증폭하였다. 최종적으로 상기 확보하는 총 6종의 PCR 산물을 *Sph*I-*Mlu*I으로 절단한 후, 동일한 제한효소들로 처리한 pHP13-P43-$TobC_{opt}$-$TobS1_{opt}$-$TobE_{opt}$ 벡터에 연결하여 6종의 NAD+ 재활용 회로를 재설계하는 발현벡터를 완성하였다.

[0055] 모든 PCR 산물과 인공 합성 유전자들은 염기서열을 분석하여 확인하고, 상기 발현 벡터들을 핵산당 대사경로가 재설계된 동시에 글루타레이트 탈수소효소를 암호화하는 rocG 유전자가 결손화된 재조합 고초균 BS△pgi△pgcA△rocG(유전형: *trpC2*△*pgi*△*pgcA*△*rocG*) 균주에 도입함으로서 2DOS 생산을 위한 고초균 재조합 균주들을 확보하였다.

[0056] **실시예 2: 고초균 재조합 균주의 발효에 의한 2DOS의 생산**

[0057] 별도로 기재하지 않는 한, 대장균 및 고초균 재조합 균주들은 37 ℃에서 200 rpm으로 LB 배지로 진탕 배양을 실시하였다. 2-데옥시스트렙타민(2DOS)의 생산성 및 그 재조합 균주의 생장을 비교하기 위하여, 우선 2YTG 액체배지(1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 3% glucose) 20 mL을 엘른마이어 플라스크(Erlenmyer flask) 250 mL에 넣고 재조합 균주들을 각각 접종하여 상기 조건으로 12시간 배양한 것을 발효 접종원으로 사용하였다. 핵산당 대사 경로가 재설계된 재조합 균주들의 경우, 배지 내 탄소원인 포도당(glucose)만으로는 탄소이화 억제(carbon catabolite repression) 현상이 나타날 수 있는 바, 본 발효에서는 포도당 외에 글리세롤(glycerol)이 2%로 부가된 본 발효 배지(1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 3% glucose, 2% glycerol)를 이용하였다. 상기 발효 접종원을 1 L의 엘른마이어 플라스크 내 본 발효 배지 250 mL에 접종하여 37 ℃에서 200 rpm으로 60시간 배양하였다. 한편, 본 발효 30시간 후, 별도로 준비한 포도당 용액(0.5 g/mL) 5 mL를 발효 배지에 추가적으로 주입하여 2DOS의 생산성 향상 가능성을 조사하였다.

[0058] 총 60시간의 발효과정을 거친 고초균 재조합 균주들 중에서, 핵산당 대사 경로를 재설계하고 인공 합성된 2DOS 생합성 유전자 3종만이 발현시킨 재조합 균주 BS2DOS-1의 경우 2DOS의 생산이 6.2 g/L 수준으로 나타났다. 한편, 고초균 유전체에서 NAD+ 특이적 글루타레이드 탈수소효소를 암호화하는 *rocG* 유전자의 결손화(BS2DOS-2)와 알파케토글루타라메이트 아미다아제 암호화 유전자 *mtnU*의 추가적 발현(BS2DOS-3)은 상기 대조구인

BS2DOS-1과 비교 시 통계적으로 유의한 수준으로 그 생산성 향상을 확인하지 못하였다(표 1).

[0059] 즉 상기 유전자들의 결손 혹은 발현으로는 2DOS 생합성에 필수적인 NAD+ 재활용 회로의 설계에 부족함을 알 수 있었다. 반면, 글루타레이드 탈수소효소를 암호화하는 *rocG* 유전자를 결손화하는 동시에 글루타민 합성효소 암호화 *glnA* 유전자를 추가 발현한 경우(BS2DOS-4) 대조군 대비 약 1.7배를, 그리고 대장균 유래의 NADH 의존성 글루타메이트 탈수소효소 암호화 *gdhA* 유전자의 추가발현(BS2DOS-5)은 대조군 대비 약 2.8배로 2DOS 생산성이 향상됨을 확인하였다(표 1). 이는 NAD+ 재활용 회로 내 주요 요소들인 MtnU, GlnA 및 GdhA 중 GlnA의 추가도입을 통한 반응 산물인 glutamine과 조효소 피리독살 인산(PLP)의 보조적 역할로 2DOS 생합성 전체 4단계 효소 반응 중 가장 마지막 단계인 keto-DOIA 아미노전이효소 반응을 통한 목적산물 2DOS의 생산이 향상되는 것을 확인하였다. 반면, MtnU의 단순한 추가도입은 반응 산물인 알파케토글루타라메이트로의 축적을 야기시키어 2DOS 생산성 향상에는 기여치 않았다. 동일한 결과를 BS2DOS-6과 BS2DOS-7 재조합 고초균의 2DOS 생산성으로 확인할 수 있었다. 즉 *rocG* 유전자의 결손화, *gdhA* 유전자의 추가발현과 동시에 상기 두 가지 유전자들(*mtnU*와 *glnA*의 경우)의 개별적 발현 결과는 MtnU의 발현보다는 GlnA의 발현이 2DOS 생산성 향상에 효과가 있음을 알 수 있다.

[0060] 끝으로, NAD+ 재활용 회로 완성형인 BS2DOS-8 재조합 균주를 통한 2DOS 생산은 약 24.5 g/L로 나타났으며, 이는 대조군 대비 약 4배의 생산성 향상을 보여주었다(도 3). 이상의 결과는 동일한 반응에 관여하는 동일 기능의 효소라도 고초균 내 발현 시에는 상이한 2DOS 생산성을 보이고 있음을 시사하고 있는 동시에, 재조합 균주의 코돈 선호도를 고려한 합성 생물학 기반 인공 합성 유전자들의 발현과 함께 핵산당 대사경로의 재설계 및 조효소 NAD+ 재활용 회로의 고초균 내 도입은 기존 선행문헌들(특허문헌 1, 특허문헌2, 비특허문헌 16, 비특허문헌 18 참조)보다 현저히 향상된 2DOS 생산성을 제시하였다.

표 1

[0061] 각 재조합 균주의 2DOS 생산량 비교

균주명	세부사항	2DOS (g/L)
BS2DOS-1	고초균 168 (△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$)	6.2 ± 0.5
BS2DOS-2	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*	5.9 ± 0.6
BS2DOS-3	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*mtnU*	6.8 ± 0.8
BS2DOS-4	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*glnA*	10.8 ± 0.8
BS2DOS-5	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*gdhA*	17.2 ± 0.9
BS2DOS-6	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*mtnU*:*gdhA*	16.3 ± 0.8
BS2DOS-7	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*glnA*:*gdhA*	19.6 ± 0.9
BS2DOS-8	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*mtnU*:*glnA*:*gdhA*	24.5 ± 1.1

[0062] 총 60시간의 발효 과정 중 포도당은 초기에 1 L 당 30 g으로, 30시간 후 주가식으로 첨가된 1 L당 10 g을 고려할 경우, 총 40 g의 발효 탄소원인 포도당이 24.5 g의 2DOS로 전환되었으므로 약 61%의 수득율을 얻는다. 본 발명자는(대한민국 등록특허 제1,718,508호(발명의 명칭: 인공 2-데옥시-실로-이노소스 합성효소 암호화 유전자를 포함하는 대사 공학화된 고초균 재조합 균주 및 2-데옥시-실로-이노소스의 생합성)에서 고초균 재조합 균주(*Bacillus subtilis* 168 [△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$])를 이용하여 동일한 발효조건으로 1 리터 당 약 37.2 g의 DOI를 대량 생산하였다. 즉 본 발명과 동일하게 핵산당 대사 경로를 재설계한 고초균 재조합 균주의 경우에는 2DOS 생합성 경로 중 첫 단계인 DOI 합성효소 반응으로는 약 93%의 수득율을 얻었는데 비하여, 총 4단계의 효소반응과 조효소 재활용 회로 도입을 통하여서는 61%의 수득율을 얻는데 그쳤다. 이와 같은 결과는 직렬적(tandem)인 효소반응을 통한 목적물질의 수득에는 한계가 있음을 시사하고 있는 바, 향후 NAD+ 재활용 회로 내 알파케토글루타라메이트 등 생합성 중간 대사체들의 세포 내 농도를 증대할 수 있는 병렬적(parallel) 회로의 추가적 도입이 필요할 것으로 예상된다.

[0063] **실시예 3: 고초균 재조합 균주의 생장곡선 및 2DOS 생산성 분석**

[0064] 본 발효 전체 60시간 배양과정 중 10시간 간격으로 발효액 2 mL을 채취하여 다음과 같이 생장곡선을 측정하였다. 흡광도 680nm로 고정된 자외선-가시선 스펙트로포토미터(UV-Vis spectrophotometer, Shimadzu, 일본)에 계단희석(serial dilution)시킨 발효액 시료 1 mL을 넣고 그 흡광도를 측정하며, 바탕용액은 균체를 접종

하지 않은 본 배지액으로 하였다. 동일한 시료를 5000 rpm에서 3분간 냉장 원심분리한 후, 상등액을 버리고 동결건조를 수행하였다. 이후 건조된 시료 중량을 측정한 후 흡광도와 건조 균체량과의 상관곡선을 작성함으로서 흡광도 측정을 통한 발효 과정 중 재조합 균주의 건조 균체량을 환산하였다.

[0065] 한편, 발효액 내 2DOS의 생산량을 확인하기 위하여 다음과 같이 정량하였다. 상기 냉장 원심분리 후 수득한 발효액 시료 상등액 200㎕에 10mM 염산 용액 1.8mL을 섞어 혼합하였다. 3분간 5000rpm에서 원심분리한 후, 전체 상등액을 미리 메탄올과 10mM의 염산용액 3mL로 순차적으로 컨디셔닝하여 둔 OASIS MCX(Waters, Milford, MA, 미국) 고체상추출 컬럼에 적하하였다. 이후, 컬럼을 10mM 염산용액 6mL로 세척하고 약 30초간 진공감압시켜 컬럼을 건조하였다. 고체상 추출컬럼 내 2DOS를 최종 0.7 mL의 5% 암모니아수용액(농축 암모니아수/메탄올 = 5:95, v/v)으로 두 번에 걸쳐 추출한 후 상온에서 진공 원심분리하여 건조추출물을 얻었다. 분석 시, 건조된 추출물을 100㎕의 증류수에 용해한 후 이중 25㎕를 별도로 취하여 양이온 모드에서 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, 미국)가 장착된 UPLC-ESI-MS/MS 기기분석을 실시하였다. UPLC 시스템은 Spectra system P1000XR 펌프(ThermoFinnigan)와 Spectra 시리즈 AS3000 자동시료주입기(ThermoFinnigan, 20㎕ 루프)로 구성된다. 분석 컬럼은 Acquity CSH C18(Waters, 미국) 역상 컬럼을 이용하고, 등용리 용매로 아세토나이트릴/메탄올/물/개미산(1:1.5:8:0.002, v/v/v/v)을 120㎕/min의 속도로 흐리게 한다. 발효액 내 2DOS의 농도는 진켐(대전, 대한민국)에서 구입한 2DOS 표준품의 농도에 대한 크로마토그램 상 검량면적의 검량 직선식을 이용하여 측정하였다.

[0066] 다음으로, 발효 중 잔존 포도당과 글리세롤 농도를 측정하기 위하여, 발효액을 원심분리한 후의 상층액을 시료로 하여 상용 분석 키트인 D-glucose HK assay kit(Megazyme, 아일랜드)와 Glycerol determination kit(Sigma-aldrich, 미국)를 활용하였다.

[0067] 또한, 고초균 재조합 균체 내 NAD+와 NADH 세포 내 농도를 측정하고자, Amplite Fluorimetric NAD/NADH Ratio Assay Kit(AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, 미국)를 사용하여 제조사 설명에 맞추어 분석을 실시하며, 흡광도 576 nm로 고정된 흡광도 마이크로플레이트 리더(SpectraMax 340 microplate reader, MolecularDevices, Palo Alto, CA, 미국)를 통하여 분석결과를 정량화하였다.

[0068] 고초균 재조합 균주의 생장곡선과 2DOS 생산성, 발효 과정 중 포도당 및 글리세롤 함량의 잔존 정도, 그리고 재조합 균주 내 NAD+/NADH 정량은 모두 세 번에 걸친 본 배양의 결과를 평균하여 측정하였다.

[0069] 2DOS 생산성은 모두 60시간 배양 후 발효액으로부터 2DOS 농도를 분석한 결과인 바, 그 생산성이 가장 높이 나타난 BS2DOS-8 재조합 고초균의 발효 과정 중 배양 10시간대 별로 배양액을 분취하여 재조합 균주의 생장 및 포도당/글리세롤의 소비 경향, 2DOS 농도의 변화 추이를 정량 분석하였다. 균체의 생장은 전형적인 유가배양(fed-batch culture)의 양상을 보이고 있어 포도당 외 글리세롤이 탄소원으로서 고초균 생장에 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 포도당의 농도는 30시간 전후로 포도당 추가에 따른 변동 폭 외에는 뚜렷한 감소 양상을 확인 가능하였으며, 나아가 2DOS 산물의 농도는 50시간에서 약 26.1 g/L로 최고치를 보이며 발효 완료시점인 60시간에서는 다소 감소된 2DOS 농도를 제공하고 있는 바, 목적산물 2DOS가 배양시간이 50시간을 넘어갈 경우 그 안정성에 문제가 있음을 시사한다(도 4).

[0070] 한편, 상기 기재한 BS2DOS-1 및 BS2DOS-8 고초균 재조합 균주들의 발효 과정 중 세포 내 NAD+와 환원형 NADH의 농도 변화를 비교하여 보았다(도 5). 두 재조합 균주들의 세포 내 NAD+와 NADH 농도의 총합은 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. BS2DOS-8 균주의 경우 세포 내 NAD+의 농도가 배양 시간에 따라 양의 곡선을 보여주고 있는데 비하여, NAD+ 재활용 회로가 도입되지 않은 대조군 BS2DOS-1의 경우엔 세포 내 NAD+ 농도가 상대적으로 낮은 농도에서 일정하게 유지되고 있음을 알 수 있었다. 상기 결과와 상응하게, BS2DOS-8 균주의 세포 내 NADH 농도는 음의 곡선을 반면 BS2DOS-1 균주의 경우에는 상대적으로 높은 농도임을 보여주었다. 또한, NAD+ 재활용 회로가 도입된 BS2DOS-8 재조합 균주는 그 대조군인 BS2DOS-1에 비하여 향상된 NAD+/NADH 비율을 보여주고 있는 바, NAD+ 조효소 재활용 회로의 고초균 내 도입은 재조합 균체 내 2DOS 생합성 과정에 중요하게 관여함을 시사하는 동시에 생산성 향상에 주요 인자임을 제시하였다. 이상의 결과로, 합성 생물학 및 대사공학을 기반으로 하는 고초균 재조합 균주로부터 기존 선행문헌 대비 2DOS의 생산성을 극대화 할 수 있었다.

[0071] 특히, 기존의 2DOS 생산능을 가지는 것으로 알려진 균주들과 2DOS의 생산성을 비교해 본 결과, 표 2에 나타난 바와같이, 대장균 내 뷰티로신 생합성 관련 유전자인 *btrC*, *btrS* 및 *btrN*을 발현한 선행 연구에서는 6㎍/L의 2DOS 생산성을 나타내었으며, 스트렙토마이세스 베네주엘라이 내 카나마이신 생합성 관련 유전자인 *kanA*, *kanB* 및 kanK를 발현한 경우에는 2.5mg/L의 2DOS 생산성을 나타내어, 24.5g/L의 생산성을 나타내는 본 발명의 BS2DOS-8 균주의 2DOS 생산성은 상기 선행균주들에 비하여 적어도 1000배 이상으로 나타내 현저히 증가된 것이

라 할 수 있다.

표 2

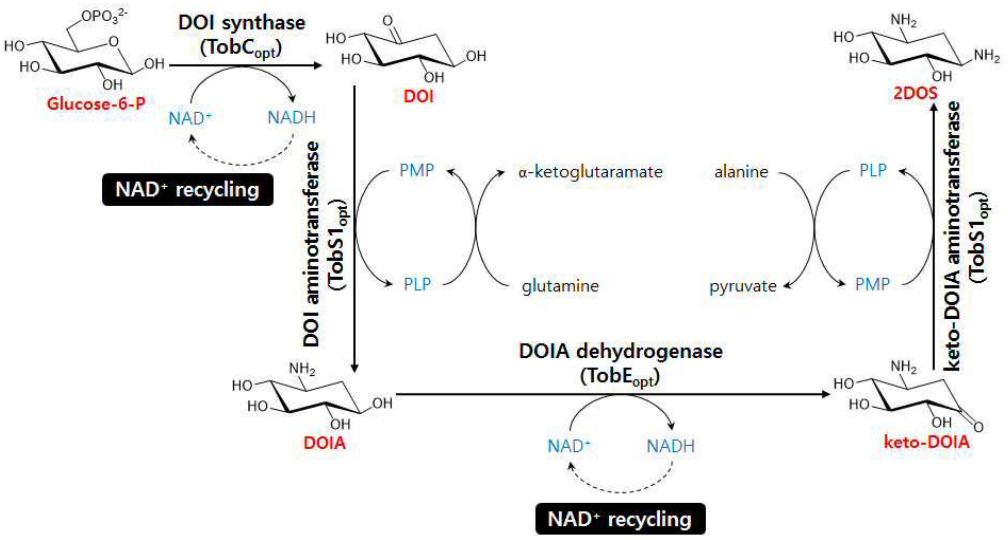
[0072] 기존 재조합 균주와 본 발명의 균주의 2DOS 생산성 비교

균주속명	세부사항	선행기술문헌	2DOS 생산성
대장균	*btrC-btrS-btrN*	한국등록특허 제1,477,235호 (특허문헌2)	6㎍/L
스트렙토마이세스	*kanA-kanB-kanK*	Park JW *et al.* (비특허문헌18)	2.5mg/L
BS2DOS-8	△*pgcA*△*pgi*:$tobC_{opt}$-$tobS1_{opt}$-$tobE_{opt}$:△*rocG*:*mtnU*:*glnA*:*gdhA*	본 발명	24.5g/L

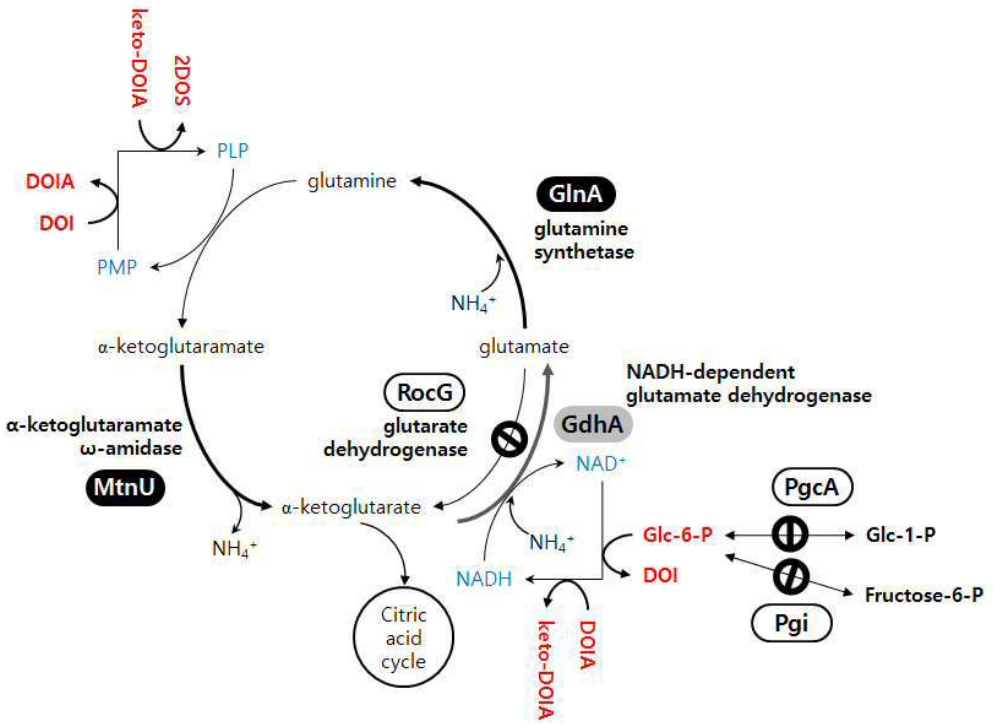
[0073] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

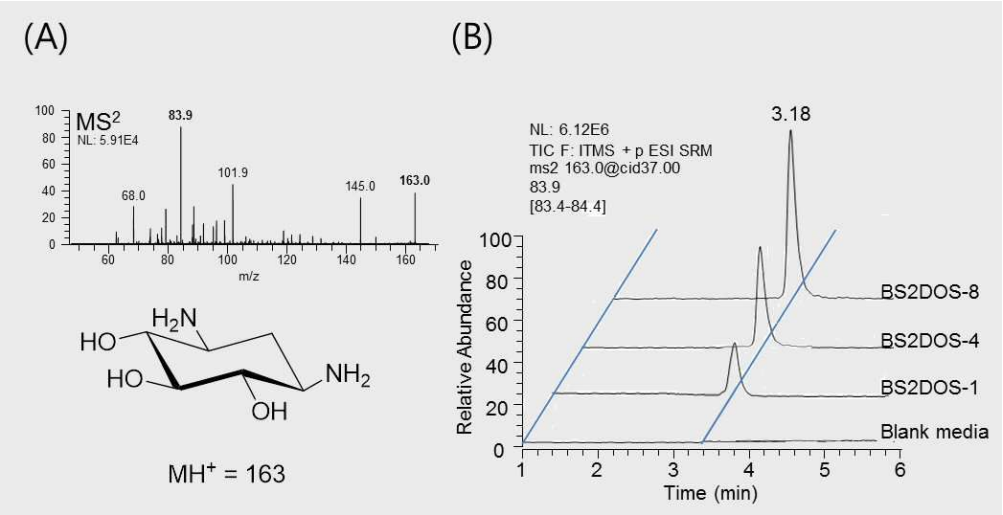
도면1



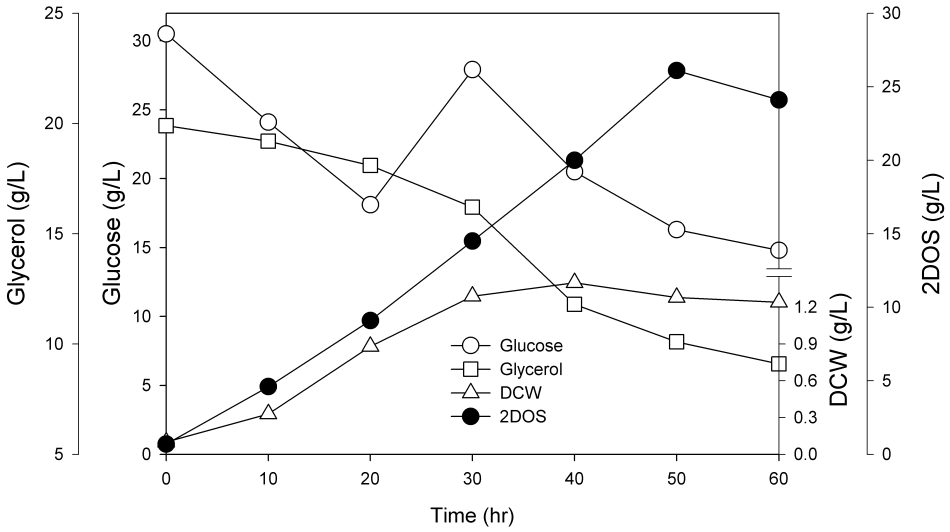
도면2


keto-DOIA
2DOS
PLP
DOIA
DOI
PMP
glutamine
GlnA
glutamine synthetase
NH4+
α-ketoglutaramate
glutamate
RocG
glutarate dehydrogenase
NADH-dependent glutamate dehydrogenase
GdhA
α-ketoglutaramate ω-amidase
MtnU
NAD+
α-ketoglutarate
NH4+
Glc-6-P
PgcA
Glc-1-P
NADH
DOI
Fructose-6-P
Pgi
Citric acid cycle
keto-DOIA
DOIA

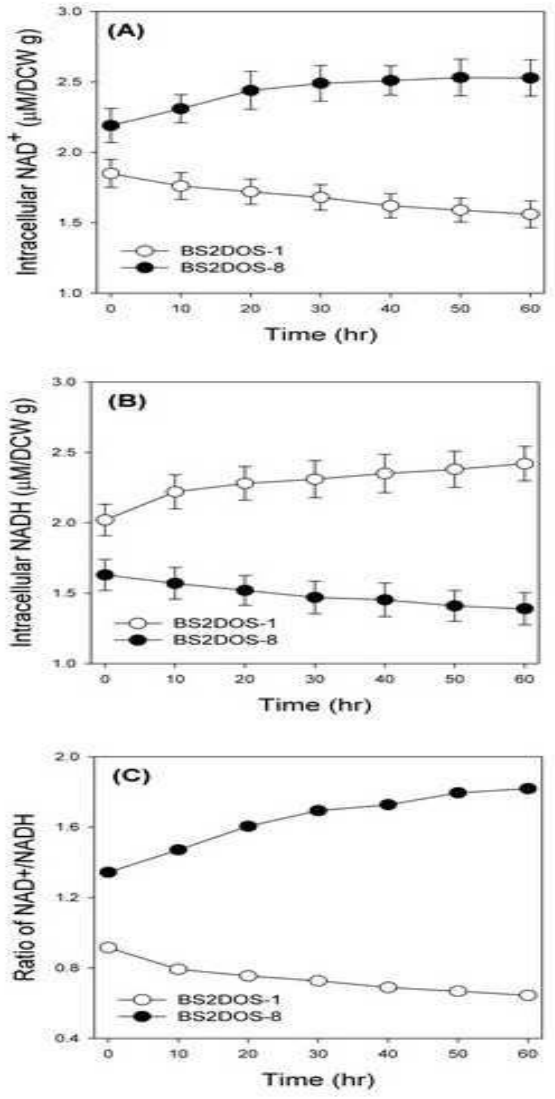
도면3


(A)
(B)
MS2
NL: 5.91E4
83.9
101.9
68.0
145.0
163.0
m/z
H2N
HO
HO
NH2
OH
MH+ = 163
NL: 6.12E6
TIC F: ITMS + p ESI SRM
ms2 163.0@cid37.00
83.9
[83.4-84.4]
3.18
Relative Abundance
Time (min)
BS2DOS-8
BS2DOS-4
BS2DOS-1
Blank media

도면4


Glycerol (g/L)
Glucose (g/L)
DCW (g/L)
2DOS (g/L)
Time (hr)
Glucose
Glycerol
DCW
2DOS

도면5


(A)
Intracellular NAD+ (μM/DCW g)
BS2DOS-1
BS2DOS-8
Time (hr)
(B)
Intracellular NADH (μM/DCW g)
BS2DOS-1
BS2DOS-8
Time (hr)
(C)
Ratio of NAD+/NADH
BS2DOS-1
BS2DOS-8
Time (hr)

서 열 목 록

<110> Korea University Research & Business Foundation

<120> Recombinat Strain for Biosynthesis of 2-Deoxystreptamine and Method for Preparing 2-Deoxystreptamine Using thereof

<130> P17-B154

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DOI synthase-TobCopt

<400> 1

tggggagcac aaatgcaaac aacgacaata acgatgggcg acgttcaata tccttaccgt 60

ctgggcacgg gatgtgttga tggcattgtt acacgcctcg gagaacttga agcgtctcat 120

tatcttgtcc tttgcgatgc gacagttgct gaattatatg gacatgactt ggcagcgaga 180

ctgcgtcggt ccgccggacc tgcttctgtg cttacccatc cagcagggga agaacacaag 240

ggattgggca ctctggatac gcttgctgat gctgcgttgc atgcaggagt tgacagacgc 300

ggagttgttg tcgcactcgg cggtggtgta accggaaata ttgctggcct tctcgcagct 360

ctccttttta gaggcatccg cctggtacac gtcccgacga cggtggtagc tatgcttgat 420

tctgtgctgt cattaaaaca agctgtaaac gcgcaagtgg gcaagaacct tgttggtacc 480

ttttatccgc cggtagaggt cttagcggac accgcaatgc tgggcactct cccagttcgg 540

gaaattcgct ctgggttgtg tgaagtagta aaaaatgctt tagctatccg tccttcaatg 600

attgattttc tcgcagcaga actgcggcca gatggcagat acgcggatga cgtattgaga 660

tggatgatcg acgaatctgt cgctgcaaag gcccaagtta cagaacacga taaatatgaa 720

cggcgtgaag ggcttgtcct tgagtacggc catacggttg gccacgcact tgaacacgct 780

tcacatggtg cagtcagtca tggagctggt gtaggcgtgg gcatggtagc tgccgcggag 840

gtcgctcgaa gacttggcca tgtagacgca gatctggtgg aactgcatag agagttggtc 900

ggtaaagtag gagtggcaac cacgcttcct gcagacgtcc cgacagagga aatcacttat 960

cgactggggt ttgacaataa aagaggatat caacctctcc cggccgatca ttatgcaatg 1020

gtcctcctgg ctgatgtagg acagcctctg taccaagacg gccttccgtt aacgcctgca 1080

cctagagcat tagtggacga agtcgtgcga gagttggcgg acgccccttc aagaattggc 1140

gctagcgttg gaagcgccgg tggcgcttca taa 1173

<210> 2

<211> 1278

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DOI:keto-DOIA aminotransferase-TobSlopt

<400> 2

atgcctgtgc acttggctat taacaatggc acacctgttc ggacgcggcc ttggccggta 60

tggccacaac cagcacgtgg agcgttggac gctcttgagc gggtattacg cagtggtcgt 120

tgggcgattt caggccctta cagagggatt gaatccgcgg aacgcagatt cgccagagac 180

tttgcagcat ataacggcgt cgcgcattgt gtgccagctg cctctggaac tgcttccctg 240

atgttagcgt tagaatcttg cggcgtcgga gtgggcgatg aagtgattgc tcctggcctt 300

tcatgggtgg ccagtgcttc cacgatagtg ggagtgaatg cggtaccggt cttagtggat 360

attgatcctc ggacattatg cttagacccg gcggctgtcg aagcagcaat tacacctgct 420

acgaaagccg tcgtagttgt acacctttat agtgctgtcg ctgatctcga tgcgttgcga 480

gctgtcgccg accggcacgg attacctctg attgaagact gtgcccaagc gcatggagcc 540

gaacatcgtg gcagaaaagt tggatctgtt ggggacgtcg ggactttctc aatgcagcat 600

agcaaagtat taacatccgg cgaaggggggg gcggcgataa cgaactcggc cgaactggct 660

cgaagaatgg aacaccttcg ggccgacggc cgttgctatc cggacacggc accggcaccg 720

gggcggatgg aattggtaga aacaggtgag ttgatggggt caaatcgctg tctttctgaa 780

tttcaagctg cggtgcttgt tgaacagctt cgggaactgg atgaacagaa tgcacttaga 840

cgacgcaacg ctgagctctt gaacacgctc ctggcggaac agggattgag accgcaagct 900

acatcgccgg ggacaacatc aagaacttac tatgtttatg cggccgaatt gccggatgac 960

gcatttgttg gcctccctat cacgacggtg acagaggctt taacggcaga actgggtttt 1020

ccaatcagcc cggcgtacgc tcctctgcat accaaccggc tctacgcacc ggcctcacgt 1080

cgtcgattcg cactgggaga agaacacgaa aagcgtattg atccggcgcg ttttcactta 1140

ccggtttgcg aacgattgac gcgtcggctt atcactttcc atcatgcagc cttactcggc 1200

gatgaatcag acatgcacga cattgcagct gccgtcgcta aggttttgcg gcaccatgga 1260

gaattacggg cctaagcc 1278

<210> 3

<211> 1020

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DOIA dehydrogenase-TobEopt

<400> 3

gtgaaggcat taagctttga agcacctggc gaggcggtat ttgggacgcg tgaagttcct 60

gtcccagcac caggtgaggc tctgatccac cttggctata attcaatatg cggaagcgat 120

ctttcgctct atcgtggcgt ttggcatgga ttctcttatc cggtcgttcc gggtcatgaa 180

tggagtggta ccgtggtaga agttaatgga cctggagctg aacttgtcgg cagagacgtc 240

gtgggcgacc tgacgtgcgc gtgcggatcg tgtgcagcgt gcggacgcgg tactcctgtg 300

ttgtgtgaaa atttgcagga actggggttt acacgcgatg gagcctgtgc tgaatatatg 360

acgatcccga cagggaattt gcacgtctta ccggagggcc ttagcctgcg ggcagcgtgc 420

caggtagaac ctgtcgcagt ggctcttcac gccgtttcta ctgtcggcgt cgaaccgggt 480

gagcgcgtcg ccgttttggg cgcaggtggc attggcttaa tgttaatgca ggtggctcgc 540

cagcgtggcg gtgtaattac cacagttggc gagcctgtgg cggaacgacg cgcagttgct 600

gcacaattag gtgcacgcac agtcaccaca ggtcgacctg gagaactggc ggagctggtc 660

gctaaacatc cagatcttac tccagatgta gttctggaag cctcaggtta tcctgtcgca 720

gtacaagaag ctattgaggt agtccgtccg ggaggtcgga ttggattagt tggctataga 780

gtagaggagg tgggaccaat ggcgactcat catgtagctg taaaggcatt aacgatacgg 840

ggctctcttg ggcctggtgg gcgtttccct gaagccatcg atttacttgc ccggggtgag 900

attgaagtcg aaccgctttt aagccacgag tttgctcttg atgaccatgc ccgcgccctc 960

gatctggcgt tgcggcgtgc ggaaggtaac gttagatcat tctttaattt acgagcgtga 1020

1020

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ggtaggatcc gcggcttcct tgtagagctc ag 32

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ctctactagt catgtgtaca ttcctctc 28

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ctaaacatga actgacaatt gaggaag 27

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gaagaaatat acaaggtatc caaaagtata tg 32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ttaagtttat cggtgaaaag attaaggaat ac 32

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aaaaccatat tcgttaaaga gattgatgag 30

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

cttatttctg tctacccaaa caatcat 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tttacttcct cttcattaac ttctgga 27

<210> 12

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mtnU from Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168

<400> 12

atgaaatgga cgatatcttg tcttcaattt gatatttcat acggaaaacc ttcggaaaat 60

ataaaaaagg ctgaattttt catcgaaaaa gaaagcaaac atgctgatgt tcttgttctg 120

cctgaattat ggacgaccgg atatgatctg gccaatcttg atgaactcgc tgacgaagac 180

ggccgctccg ctcagagctg gctgaagaaa acggcaaaaa aacatggtgt tcatattgtc 240

gccggatcgg tcgctgtcag gaagaattct gatgtttata atacaatgta catcgcggat 300

aaggaagggc aaatcattaa agagtacaga aaagcccatc tttttcagct gatggatgag 360

catctgtatt tatcagccgg ttccgaagac ggatactttg agcttgacgg cgtcaaaagc 420

tctggattga tctgttacga tatccgtttt ccggaatgga tcagaaaaca tacgacaaaa 480

ggcgccaacg tgctgtttat ttctgcggaa tggcctcttc cccgccttga tcattggaaa 540

agcctgctta ttgcgcgggc cattgaaaac caatgctttg tcgcagcctg caattgtacc 600

ggttcaaatc cggataatga atttgcagga catagcctga ttattgatcc atggggacgt 660

gtacttgctg aaggcggccg ggaagaaggc atagtccgag cggaaatcga ccttcaagaa 720

agcgcagaag ttcgggagag cattcctgtt ttcgatgata tcagaaaaga tttatattaa 780

780

<210> 13

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> glnA from Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168

<400> 13

atggcaaagt acactagaga agatatcgaa aaattagtaa aagaagaaaa cgtgaagtat 60

atccgccttc aatttactga cattcttgga acaatcaaga atgttgagat tcctgtaagc 120

cagcttggaa aagcgcttga taataaagtc atgtttgacg gttcttctat tgagggattc 180

gttcgtatcg aagagtcaga catgtacctg tatccagatc taaatacatt tgttatcttc 240

ccatggacag ctgaaaaagg taaagtagca cgtttcatct gtgatattta caatccggat 300

ggcacacctt ttgaaggtga cccgcgaaac aacttaaaac ggattctgaa agaaatggaa 360

gacctcggct tcagtgattt taaccttggg cctgagcctg aattcttctt attcaaattg 420

gacgaaaaag gcgagccgac gcttgaacta aacgacaaag gcggatattt cgacttagct 480

ccaactgatt taggagaaaa ctgccgccgc gatatcgtac ttgagcttga agagatgggc 540

tttgaaatcg aagcgtctca ccacgaagta gcacctggtc agcacgaaat cgactttaaa 600

tatgctggag cagtccgctc ttgtgatgac atccaaacat ttaaactagt tgtcaaaaca 660

attgcccgta aacacggcct gcatgcgaca tttatgccaa aaccattgtt cggtgtaaac 720

ggttcaggta tgcactgcaa tctatcactc ttcaaaaatg gtgttaacgc attctttgac 780

gaaaacgcag atcttcagtt aagtgaaaca gcgaagcact tcattgcagg tatcgtgaag 840

cacgcaacaa gctttacagc agtaacaaac ccgacagtaa actcttacaa acgtcttgtt 900

cctggctatg aagcaccttg ttatgtagca tggagcgcgc aaaacagaag cccgcttatc 960

cgtatcccgg cttctcgcgg catcagcaca cgtgttgaag tacgcagtgt agacccagct 1020

gcaaacccat accttgcact tagcgtattg cttgctgcag gattagacgg aatcaaaaac 1080

aaactggaag cgccggctcc aatcgaccgc aacatctatg tgatgagcaa agaagagcgc 1140

atggaaaacg gaatcgttga ccttccagca acacttgcgg aagcactaga agaattcaaa 1200

tcaaacgaag tcatggtcaa agcgctgggc gagcacctat tcgaacactt catcgaagca 1260

aaagaaatcg aatgggatat gttccgcacg caagtacatc cttgggaacg cgaacagtat 1320

atgtctcagt attaa 1335

<210> 14

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gdhA from Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655

<400> 14

atggatcaga catattctct ggagtcattc ctcaaccatg tccaaaagcg cgacccgaat 60

caaaccgagt tcgcgcaagc cgttcgtgaa gtaatgacca cactctggcc ttttcttgaa 120

caaaatccaa aatatcgcca gatgtcatta ctggagcgtc tggttgaacc ggagcgcgtg 180

atccagtttc gcgtggtatg ggttgatgat cgcaaccaga tacaggtcaa ccgtgcatgg 240

cgtgtgcagt tcagctctgc catcggcccg tacaaaggcg gtatgcgctt ccatccgtca 300

gttaaccttt ccattctcaa attcctcggc tttgaacaaa ccttcaaaaa tgccctgact 360

actctgccga tgggcggtgg taaaggcggc agcgatttcg atccgaaagg aaaaagcgaa 420

ggtgaagtga tgcgtttttg ccaggcgctg atgactgaac tgtatcgcca cctgggcgcg 480

gataccgacg ttccggcagg tgatatcggg gttggtggtc gtgaagtcgg ctttatggcg 540

gggatgatga aaaagctctc caacaatacc gcctgcgtct tcaccggtaa gggcctttca 600

tttggcggca gtcttattcg cccggaagct accggctacg gtctggttta tttcacagaa 660

gcaatgctaa aacgccacgg tatgggtttt gaagggatgc gcgtttccgt ttctggctcc 720

ggcaacgtcg cccagtacgc tatcgaaaaa gcgatggaat ttggtgctcg tgtgatcact 780

gcgtcagact ccagcggcac tgtagttgat gaaagcggat tcacgaaaga gaaactggca 840

cgtcttatcg aaatcaaagc cagccgcgat ggtcgagtgg cagattacgc caaagaattt 900

ggtctggtct atctcgaagg ccaacagccg tggtctctac cggttgatat cgccctgcct 960

tgcgccaccc agaatgaact ggatgttgac gccgcgcatc agcttatcgc taatggcgtt 1020

aaagccgtcg ccgaaggggc aaatatgccg accaccatcg aagcgactga actgttccag 1080

caggcaggcg tactatttgc accgggtaaa gcggctaatg ctggtggcgt cgctacatcg 1140

ggcctggaaa tggcacaaaa cgctgcgcgc ctgggctgga aagccgagaa agttgacgca 1200

cgtttgcatc acatcatgct ggatatccac catgcctgtg ttgagcatgg tggtgaaggt 1260

gagcaaacca actacgtgca gggcgcgaac attgccggtt ttgtgaaggt tgccgatgcg 1320

atgctggcgc agggtgtgat ttaa 1344

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

taatctagat acaatgtaca tcgcggataa g 31

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

atatacgtat cactagtgta acagatcaat ccagagc 37

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

atatctagaa agtcatgttt gacggttctt c 31

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

ttctacgtat tactagttca gaatccgttt taagttg 37

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

gcttctagaa aagaatttgg cctaacctat c 31

<210> 20

<211

> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

aattacgtaa aactagttac acctgcttca aggaaca 37

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

gtggcatgcg cggcttcctt gtagagctca g 31

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

ctcacgcgtt tgttacgtgg attatattg 29