

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.⁸
C12N 15/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년01월10일
(11) 등록번호 10-0540287
(24) 등록일자 2005년12월24일

(21) 출원번호	10-2000-7000041	(65) 공개번호	10-2001-0021509
(22) 출원일자	2000년01월04일	(43) 공개일자	2001년03월15일
번역문 제출일자	2000년01월04일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/014570	(87) 국제공개번호	WO 1999/02669
국제출원일자	1998년07월10일	국제공개일자	1999년01월21일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 핀란드, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 일본, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 리투아니아, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 루마니아, 싱가포르,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 60/052,211 1997년07월10일 미국(US)

(73) 특허권자 코산 바이오사이언시즈, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94010 벨링감 롤린스 로드 1450

(72) 발명자 베트라취메리씨.
미국캘리포니아94010벨링감롤린스로드1450

(74) 대리인 박장원

심사관 : 김재현

(54) 식물체 내에서 폴리케티드의 생산

요약

본 발명은 기능적인 폴리케티드 합성효소(PKS)를 발현할 수 있는 발현시스템을 포함하도록 변형된 유전적으로 변화된 식물 및 식물세포를 제공한다. 추가로 본 발명은 PKS를 제조하는 방법 및 이들 식물 및 식물세포를 사용하여 폴리케티드를 제조하는 방법을 제공한다.

명세서

기술분야

본 발명은 폴리케티드(polyketide) 합성 및 트랜스제닉 식물의 제조에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 하나 이상의 기능적인 폴리케티드 합성효소(synthase)(PKS) 및 폴리케티드를 발현하는 식물세포 및 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

폴리케티드는 크고 구조적으로 다양한 패밀리의 천연산물이다. 폴리케티드는 항생제 및 약리특성을 포함하는 광범위한 생물학적 활성을 가진다. 예컨대, 폴리케티드는 테트라사이클린 및 에리쓰로마이신과 같은 항생제 특성; 다우노마이신을 포함하는 항암제; 예컨대 FK506 및 라파마이신과 같은 면역억제제; 모네신 및 아베르멕틴과 같은 수의학산물; 및 스피노신(살충제) 및 소라펜(항곰팡이제) 등 농업에 사용되는 화합물로 나타난다. 폴리케티드는 특히 사상균인 액티노미세테스 클래스에 풍부하다.

폴리케티드 합성효소는 지방산 합성효소(FAS)에 관련된 다기능효소이다. PKS는 아실티오에스테르, 예컨대 아세틸, 프로피오닐, 말로닐 또는 메틸말로닐 사이에 반복된 (탈카르복시성) 클라이센(Claissen) 축합을 통해 폴리케티드의 생합성을 촉매한다. 각각의 축합반응 뒤에, 이들 효소는 합성되는 폴리케티드 사슬의 베타-케토상에서 케토환원, 탈수 및 에노일환원으로 이루어지는 환원사이클 중 모두 또는, 일부분을 촉매하거나, 또는 아무것도 촉매하지 않음으로써 산물에 구조적인 다양성을 도입한다. 각 구체적 산물의 길이 특성을 갖는 탄소사슬이 형성된 후에, 가티올분해(thiolysis) 또는 아실전이에 의해 합성효소로부터 유리된다. 따라서 PKS는 주어진 폴리케티드를 함께 생산하는 다수의 효소패밀리로 이루어진다. 각각의 폴리케티드로 유전적으로 프로그램화된 사슬길이, 사슬구성단위의 선택, 및 환원주기상의 조절된 다양성이 자연에 존재하는 폴리케티드에서 보여지는 다양성에 기여하게 된다. PKS에 의한 촉매 반응 결과의 폴리케티드는 항생제 활성을 제공하기 위해서 종종 추가의 변형(modification), 예컨대 글리코실화를 필요로 한다.

세가지의 일반적인 PKS 클래스가 존재한다. 유형 I로 알려진 "복합체" 또는 "모듈" PKS는 에리쓰로마이신과 같은 매크로리드(macrolide)의 PKS로 대표된다. "모듈" PKS는 탄소사슬의 조합과 변형의 각 단계에 작용하는 한 세트의 분리된 활성 자리를 가지는 수개의 커다란 다기능단백질의 조합체이다(Cortes, J., et al., Nature (1990) 348:176; Donadio, S., et al., Science (1991) 252:675; MacNeil, D.J., et al., Gene (1992) 115:119). 이들 클래스간에는 PKS의 활성자리 유형 및 수의 다양성으로부터 구조적 다양성이 생겨난다. 이 클래스의 PKS는 PKS의 1차서열의 활성자리의 클러스팅(clustering) 및 수와, 폴리케티드 골격의 구조간에 1:1 관계를 나타낸다 (도 1 참조).

유형 II 또는 "방향족" PKS라 불리우는 두번째 클래스의 PKS는 방향족 화합물의 합성효소로 대표된다. "방향족" PKS는 일반적으로 3개 이상의 분리된 오픈리딩프레임(open reading frame)에 의해 코딩되며 반복적으로 사용되는 단일세트의 활성 자리를 가진다(상기문헌, M.J., et al, EMBO J. (1989) 8:2727; Sherman, D.H., et al., EMBO J.(1989) 8:2717; Fernandez-Moreno, M.A., et al., J. Biol. Chem. (1992) 267: 19278) (도 2 참조).

"곰팡이" PKS로 알려져 있는 세번째 클래스의 PKS는 단일 리딩프레임에 의해 코딩되는 하나의 다기능단백질이다. 일반적인 "곰팡이" PKS는 페닐실릴 파툴럼에서 특성화되는 6-메틸살리실산 합성효소(MSAS)이다. 또한 상기 유전자는 아스퍼질라스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 및 콜렉트트리쿰 라게나리움(*Collectotrichum lagenarium*)로부터 분리할 수 있으며, PKS는 아스퍼질라스 니둘란스의 산물로서 노르솔로린산을 갖는다(Fujii, I., et al., Mole Gen Genet (1996) 253:1-10). 따라서 곰팡이 PKS는 방향족 및 모듈클래스에 딱 맞지 아니하여 세번째 군을 이루게 된 것이다 (도 3 참조).

스트렙토미세스는 방향족 폴리케티드의 풍부한 생산자인 액티노미세테스이다. 이제까지 연구된 각각의 스트렙토미세스 방향족 PKS에 있어서, 탄소사슬조합은 3개 오픈리딩프레임(ORFs)의 산물을 필요로 한다. ORF1은 케토합성효소(KS) 및 아실트랜스퍼라제(AT) 활성 자리를 코딩하고; ORF2는 ORF1 산물에 유사하나 KS 및 AT 모티브가 없는 단백질을 코딩하며; ORF3는 분리된 아실담체단백질(ACP)을 코딩한다.

예컨대, 스트렙토미세스 코리콜러(*Streptomyces coelicolor*)는 푸른-염료 폴리케티드, 즉 액티노르호딘을 생산한다. 액티노르호딘 유전자 집단(act)이 클로닝되었다. 상기 유전자 집단은 항생제의 분비에 관련된 단백질 및 유전자 집단의 전사를 특이적으로 활성화시키는 하나 이상의 단백질뿐만 아니라, 상기 PKS 효소, 시클라제 및 액티노르호딘을 생산하는 이후 변형반응에 관련된 일련의 재단(tailoring)효소를 코딩한다. 폴리케티드 생합성의 출발자단위(아세틸 CoA) 및 연장자단위(말로닐 CoA)의 제공을 위한 다른 유전자뿐만 아니라, 항생제 생합성의 광범위한 조절에 필요한 다른 유전자도 게놈의 다른 위치에 존재한다. 스트렙토미세스 코리콜러의 act 유전자 집단은 스트렙토미세스 파르볼루스에서 액티노르호딘을 제조하는데 사용되었다. Malpartida, F., et al., *Nature* (1984) 309:462.

Bartel 등의 *J.Bacteriol* (1990) 172:4816-4826에서, act I, act III, act IV, 및 act VII의 4개 유전자 좌위로 이루어지는 스트렙토미세스 코리콜러 act 유전자 집단으로 형질전환된 스트렙토미세스 갈리아우스(*Streptomyces galilaeus*)를 사용하여 알로에사포나린 II를 재조합적으로 생산하는 것에 대해 개시하고 있다. 기본 act 유전자 세트를 포함하면서 그라나티신, 옥시테트라시클린, 테트라세노마이신 및 프레놀리신 PKS에서 유래된 ACP 유전자를 가지는 혼성 PKS도 또한 기능적 합성효소를 발현할 수 있도록 고안되었다. Khosla, C., et al., *J Bacteriol* (1993) 175:2197-2204. Hopwood, D.A., 등의 *Nature* (1985) 314:642-644는 재조합 기술을 사용하여 혼성 폴리케티드의 생산을 기재하고 있다. Sherman, D.H. 등의 *J. Bacteriol.* (1992) 174:6184-6190은 여러가지 성분의 act PKS 유전자집단이 결핍된 스트렙토미세스 코리코러스를 스트렙토미세스 비올라세루버의 대응 그라나티신(gra) 유전자로 형질전환을 보고하고 있다.

삭제

이중 기능적 PKS, 즉 폴리케티드를 생산할 수 있는 PKS의 재조합 생산을 스트렙토미세스에서 달성하였고, 또한 혼성 형태의 방향족 PKS를 이들 숙주세포에서 발현하였다. 예컨대, Khosla, C. et al., *J Bacteriol* (1993) 175:2194:2204; Hopwood, D.A., et al., *Nature* (1985) 314:642-644; Sherman, D.H. et al., *J Bacteriol* (1992) 174:6184-6190 참조. 추가로, 모듈 PKS효소의 재조합적 생산은 WO95/08548 PCT공보에 기재된 바와 같이 스트렙토마이세스에서 달성되었다. 그러나, Roberts, G.A. 등의 *Eur J Biochem*(1993) 214:305-311는 PKS 촉매자리를 코딩하는 유전자를 운반하는 단일 벡터를 *E.coli*로 형질전환하였으나, PKS는 기능적이지 못했으며, 이는 아마도 아실운반단백질의 포스포판테테닐화의 결핍 때문인 것 같다.

스트렙토미세스 숙주에서 기능적 폴리케티드 합성효소의 재조합 생산이 또한 1998년 1월 15일에 공개된 PCT출원 공보 WO98/01546, WO98/01571에 기재되어 있다.

아베르멕틴(미국특허 제 5,252,474), 스피라마이신(미국특허 제 5,098,837); 및 실로신(1997년 2월 19일에 공개된 유럽 특허출원공보 791,655)을 생산하는 PKS를 포함하여 다수의 폴리케티드 합성효소가 클로닝되었다.

미국특허 제 5,716,849는 소라펜을 생산하는 PKS 집단을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 시퀀싱(sequencing)과 회수(recovery)를 기재하고 있다. 이는 본 명세서의 참고문헌으로 병합되며, 박테리아, 효모 및 식물에서 뉴클레오타이드 서열을 코딩하는 소라펜 PKS의 발현을 예언적으로 기재하고 있다. 이러한 기재는 생산된 PKS 단백질이 폴리케티드 합성에 기능적으로 작용함을 나타내나, 실제로 발현과 기능성에 대해서 언급하고 있지는 않다.

PKS 집단이 기능적이기 위해서는, 번역된 아포-PKS가 효소적으로 포스포판테테닐화되어 홀로(holo)-ACP 합성성분을 얻어야 한다고 알려져 있다. Carreras, C.W., et al., *Biochemistry* (1997) 36:11757-11761. 아포-PKS에서 홀로-ACP를 포함하는 PKS로의 전환에는 적절한 포스포판테테닐 트랜스퍼라제(PPT)가 필요하다. PPT 효소는 슈퍼패밀리(superfamily)에 속하지만, 서로 교환할 수 없다. 예컨대 아포-지방산 합성효소집단을 홀로-형태로 변환시킬 수 있는 PPT 효소가 일반적인 PKS 아포효소의 전환에는 효과적이지 못하다. Lambalot, R.H., et al, *Chem and Biol* (1996) 3:923-936. Cox, R.J. et al., *FEBS LETT* (1997) 405:267-272는 *E.coli*에서 재조합적으로 기능적인 PKS를 얻기 위해서는 PPT 활성의 제공이 필요하다고 기재하고 있다. 추가로, 본 명세서에 참고문헌으로 병합된 WO98/27203는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 PPT 효소(홀로-ACP 합성효소), 구체적으로 설파턴트(surfactant) 홀로-ACP 합성효소(Sfp) 및 페닐실릴 파툴럼의 6-MSAS를 포함하는 융합단백질을 사용하여 효모에서 기능적인 6-MSAS를 재조합적으로 생산하는 것에 대해 기술하고 있다. Sfp 유전자의 발현과 함께, 6-MSAS에 대한 발현시스템을 포함하도록 변형된 *E.coli*에서 6-MSAS를 생산하는 것 또한 구체화된 조건 하에서 설명되고 있다.

본 발명은 PKS 생산 및 결과적인 폴리케티드를 생산하는 단일 또는 다중벡터시스템을 포함하도록 형질전환된 식물을 제공하는 것이다. 기능적 PKS를 생성하고 발현시키기 위한 식물의 용도로 PKS 및 폴리케티드의 대량 생산에 적합한 근원을 찾을 수 있고; 추가로, 생산된 폴리케티드는 이를 생산하는 식물에, 병충해 내성 등과 같은 바람직한 특성을 부여할 수 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개시

본 발명은 재조합 기술 및 식물숙주/벡터 시스템을 이용하여 새로운 PKS 및 공지의 PKS를 효율적으로 생산하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 다양한 폴리케티드의 생산을 차례대로 촉매하는 PKS를 제조하는 식물 숙주/벡터 시스템의 용도에 의존한다. 그러한 폴리케티드는 적절한 제제로 또는 그들을 생산하는 식물 자체로 항생제; 항종양제; 면역억제제; 다양한 다른 약물학적 목적; 및 농업용(예컨대, 항곰팡이제 또는 살충제) 용도로 유용하다.

일례에서, 본 발명은, 재조합 폴리케티드 합성 효소 (PKS)를 생산하도록 변형된, 유전적으로 조작된 식물 세포, 식물 및 식물 부분을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 다음으로 이루어진 유전적으로 가공된 식물세포, 식물부분 및 식물을 제공한다:

- (a) 폴리케티드 합성을 촉매할 수 있는 PKS를 코딩하는 PKS 유전자 집단과,
- (b) 유전자 집단내의 유전자가 유전적으로 가공된 식물세포, 식물의 부분 또는 식물에서 전사되고 번역되어 기능적 PKS를 생산할 수 있도록 하는, PKS 유전자 집단에 작동가능하도록 연결된 하나 이상의 조절서열.

특히 바람직한 구체예에서, 식물세포, 식물의 일부 또는 식물은 아실 운반단백질(ACP) 아포효소활성을 홀로-ACP로 전환시키는 포스포판테넬 트랜스퍼라제(PPT) 효소를 함유하도록 추가 변형된다. 이들 PPT 효소는 아래에 추가로 기재된 것과 같이 다양한 미생물원에서 얻을 수 있다.

본 발명은 추가로 PKS 유전자 집단이 발현되고 기능적으로 활성인 조건하에서 상기 식물, 식물세포 등을 배양함으로써, 선택적으로 PKS가 기능적으로 활성이며 폴리케티드를 생산하는 조건 하에서 상기 식물, 식물 세포 등을 배양함으로써 기능적인 재조합 PKS 및 폴리케티드를 생산하는 방법을 제공한다.

추가 일례에서, 본 발명은 다음으로 이루어지는 조합 폴리케티드 라이브러리를 제조하는 방법을 제공한다.

- (a) 폴리케티드 합성효소(PKS) 유전자, 모듈, 활성자리 또는 이들의 일부분의 무작위 조합 및 이들 유전자에 작동가능하도록 연결된 하나 이상의 조절서열을 포함하는 벡터의 집단을 제공하며,
- (b) 상기 벡터 집단으로 숙주식물세포 또는 식물을 형질전환시키며;
- (c) 상기 유전자 집단내에서 상기 유전자가 전사되고 번역될 수 있는 조건 하에서 상기 숙주식물세포 또는 식물의 집단을 배양함으로써, PKS 조합 라이브러리 및 결과적인 폴리케티드를 생산.

본 발명은 추가로 숙주식물에서 PKS 효소 및 상기 숙주식물에서 결과적인 폴리케티드를 생산하는 재조합 물질을 제공한다.

발명의 실시 형태

미국특허 제 5,712,146은(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨) 모듈 PKS 및 방향족 PKS의 다양한 재조합 발현시스템을 기재하고 있다. 이에 더하여, 위 문헌에서 인용하고 있는 PCT/US9723014는(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨) 홀로-ACP를 제공함으로써 아포-PKS 효소를 기능적인 것으로 전환시키는 PPT 효소 활성의 적합한 발현시스템뿐만 아니라, E.coli 및 효모에서 기능적인 PKS의 생산에 유용한 다양한 PKS의 다중 벡터시스템을 기재하고 있다.

본 발명은 식물숙주세포 또는 식물의 적합한 생장주기 단계에서, 또는 본질적으로 상당량의 PKS 및 폴리케티드를 생산하는 방법을 제공한다. 생산된 폴리케티드는 이들의 유형에 따라 다수의 질병을 치료하기 위한 치료제로서 사용될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 방법에 의해 생산된 수개의 폴리케티드는 살충제나 항곰팡이제와 같은 농업에서 사용뿐만 아니라, 면역

억제제, 항종양제, 바이러스, 박테리아 및 기생적 감염의 치료를 위해 사용될 수 있다. 또한 식물세포에서 폴리케티드를 재조합적으로 생산하는 능력은 PKS의 특징화 및 이들의 작용기작, 그외에도 식물숙주에 유용한 성질을 제공하는데 강력한 도구를 제공할 것이다.

일반적인 PKS 발현시스템

상기한 미국특허 제 5,712,146는 공지의 다양한 PKS 발현시스템과 재조합 DNA 기술을 이용하여 어떻게 유전적으로 조작하는지를 상세히 기재하고 있다. 하나이상의 PKS를 발현하는 재조합 식물 및 식물세포를 생산하기 위해서 이러한 개시를 다음에 기재한 변형과 함께 본 발명에 적용할 수 있다. 요컨대, 각각 도 1, 2, 3은 방향족, 모듈 및 곰팡이 PKS 시스템을 간단하면서도 비제한적으로 요약하여 나타내고 있으며, 이하에서 자세히 설명하겠다.

PKS 시스템의 특징은 생산된 효소에서 촉매자리의 반복적인 사용에 있다. 방향족 PKS 시스템에서, 최소 PKS의 효소는 3개 오픈리딩프레임(ORF)에 코딩된다. 도 1에서 나타내고 있는 바와 같이, 액티노르호딘 PKS는 6개의 분리된 ORF에서 코딩된다. 최소 PKS를 위해서는, 첫번째 ORF는 케토합성효소(KS), 및 아실트랜스퍼라제(AT)를 포함하고; 두번째 ORF는 사슬길이인자(CLF)를 포함하고; 세번째 리딩프레임은 아실 운반 단백질(ACP)을 코딩한다. 추가의 ORF는 아로마타제(ARO), 시클라제(CYC), 및 케토리덕타제(KR)를 코딩한다. KS/AT, ACP 및 CLF 요소는 2개의 탄소 단위의 단일 축합에 필요하기 때문에, KS/AT, ACP 및 CLF의 조합은 최소 PKS를 구성한다. 반면에, grs PKS는 5개의 분리된 ORF를 가지며, 이 때 3개의 ORF에는 KS/AT, CLF, 및 ACP, KR은 4번째에, ARO는 5번째에 존재한다.

한편, 모듈 PKS 시스템에서는, 각각의 촉매자리가 오직 한번만 사용되며 전체 PKS는 일련의 모듈로서 코딩된다. 최소 모듈은 적어도 KS, AT, 및 ACP를 포함한다. 임의의 부가적인 활성은 도 2에 나타난 것처럼 KR, DH, 에노일리덕타제(ER) 및 티오에스터라제(TE) 활성을 포함한다.

6-메틸 살리실산 합성효소(6-MSAS)를 코딩하는 곰팡이 PKS는 어느정도는 방향족 PKS와 비슷하나, 도 3에 나타난 바와 같이 촉매자리가 반복적으로 사용되기 때문에 모든 활성(KS/AT, 데히드라제(DH), KR 및 ACP)에 단지 하나의 리딩프레임만을 가진다.

본 발명은 식물세포, 식물의 부분 및 완전한 식물에서 방향족, 모듈 및 곰팡이 PKS 시스템에 관련된 효소적 활성에 대한 발현시스템을 제조하는데 사용될 수 있다.

예를 들면, 목적 PKS 서브유니트를 발현하는 생물체에서 이 유전자를 발현하는 세포에서 유래된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하는 방법, 이 유전자를 포함하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도하는 방법 등의 재조합 방법을 사용하여 목적 PKS 서브유니트를 얻을 수 있다. 그런 다음, 표준 기술을 사용하여 상기 유전자를 분리하고 다른 바람직한 PKS 서브유니트와 결합할 수 있다. 문제의 상기 유전자가 이미 적합한 발현벡터로 존재하는 것인 경우에는, 목적하는 바에 따라 그자체로 예컨대 다른 PKS 서브유니트와 결합시킬 수 있다. 또한 클로닝하기보다는 합성하여 목적 유전자를 제조할 수 있다. 원하는 특별한 아미노산 서열에 적합한 코돈을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 고안할 수 있다. 일반적으로, 상기 서열이 발현될 목적 식물숙주종으로 바람직한 코돈을 선택할 수 있다. 표준 방법으로 제조한 중첩되는(overlapping) 올리고뉴클레오타이드로부터 완전한 서열을 조합하고 식물숙주세포로 전달하기 위한 완전한 코딩 서열로 조합한다. 예컨대 Edge (1981) Nature 292:756; Nambair et al., (1984) Science 223: 1299; Jay et al., (1984) J Biol Chem 259:6311를 참조.

추가로, 생산된 PKS 단백질이 상기 아미노산 서열을 포함하여 자연에 존재하는 형태의 기질 특이성 및 활성을 가지거나, 원하는 촉매활성이 유지되는 한 이들 단백질의 변형된 형태를 사용할 수 있다. 미국특허 제 5,712,146에 기재된 바와 같이, 자연 PKS 서브유니트 서열에 변이를 도입하여, 그러한 변이가 동일여부를 확인할 수 있는(identifiable) 폴리케티드의 합성을 총체적으로 촉매할 수 있도록 다른 PKS 서브유니트와 함께 기능할 수 있다면 자연 PKS 서열 대신 그러한 변이를 사용할 수 있다. 변이를 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드를 제조하고 변형 서열을 제한효소분해법으로 PKS 서브유니트를 코딩하는 유전자로 삽입하는 등의 종래의 기술을 사용하여 천연 서열에 그러한 변이를 도입할 수 있다.(Kunkel, T.A. Proc Natl Acad Sci USA (1985) 82/448; Geisselsoder et al., BioTechniques (1987) 5:786을 참조)

또는, 잘못 짝지은(mismatched) 이중사슬의 해리온도 이하의 온도에서 천연 뉴클레오타이드 서열(일반적으로 RNA서열에 대응하는 cDNA서열)에 혼성화하는 잘못짝지은 프라이머(일반적으로 10-20 뉴클레오타이드 길이)를 사용하여 상기 변이에 영향을 미칠 수 있다. 상대적으로 좁은 제한범위 내의 염기조성 및 프라이머 길이를 유지함으로써 그리고 중앙에 변이염기를 유지함으로써 상기 프라이머를 특이적으로 제조할 수 있다(Zoller et al, Methods Enzymol 91983) 100:461). DNA 폴리머라제, 클론된 산물 및 연장된 프라이머 사슬의 분리에서 유래된 변이된 DNA를 포함하는 클론을 사

용하여 프라이머 연장을 수행하고 선택한다. 혼성 프로브로서 변이된 프라이머를 사용하여 선택한다. 또한 상기 기술은 다수의 점돌연변이의 생성에도 적용할 수 있다. 예컨대 Dalbadie-Mcfarland, et al., Proc Natl Acad Sci USA (1982) 79:6409를 참조. 또한 PCR 돌연변이 유발(mutagenesis)도 바람직한 변이를 수행하기 위해서 사용될 수 있다.

미국특허제 5,712,146은 추가로 사상균에서 발견되는 단일 및 다중벡터 혼성 방향족 또는 모듈 PKS 시스템의 구조물을 개시하고 있으며, 여기서 예를 들면 액티노르호딘의 오픈리딩프레임은 택일적 방향족 시스템의 오픈리딩프레임을 갖는 발현벡터에 포함된다. 1998년 5월 6에 출원된 미국출원번호 제 09/073,538는(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨) 순차교환(permutation), 특히 모듈 PKS 집단에서의 순차교환을 자세히 기술하여, 이로써 다수의 공지 및 신규한 폴리케티드를 재조합 숙주세포를 제조할 수 있다. 본 발명 및 본 명세서에 기재된 실시예는 기능적인 PKS 및 결과적인 폴리케티드를 생산하는 PKS 발현숙주로 작용할 수 있는 식물세포숙주 및 식물의 적합성을 설명함으로써 이들 발명의 범위를 확장한다.

PKS 집단에 존재하는 활성 외에도, 기능적인 PKS를 얻기 위한 번역후변형도 필요하다. 특히 포스포판테테닐 부분을 가지고 있는 ACP 기능은 필수적이다. 상기 홀로-ACP 합성효소가 이러한 활성화에 필요하다. 본 발명의 바람직한 일례에서, 홀로-ACP 합성효소가 재조합 발현시스템을 이용하는 식물세포, 식물의 일부분 또는 완전한 식물에 제공된다.

따라서, 본 발명을 실시하는 바람직한 형태는 PKS 효소와 함께 아포-PKS를 생체내에서 활성을 갖는 홀로-PKS로 전환하는 이중 홀로-ACP를 발현하는 것이다. Kealey et al., Proc Natl Acad Sci USA(1998) 95:505-509(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)에 기재된 바대로, 이중 홀로-ACP 합성효소가 제공되지 않는다면, 효모숙주에서 P. 팔투럼의 6-MSAS에 의한 폴리케티드 산물을 거의 없거나 완전히 없다. 홀로-ACP 합성효소를 발현하는 별개의 벡터를 도입함으로써, 홀로-ACP 합성효소 및 PKS 모두를 발현하는 단일벡터를 도입함으로써, 또는 홀로 ACP-합성효소 및 PKS 간에 융합된 단백질을 코딩하는 단일 유전자를 도입함으로써 상기 기능이 제공된다.

본 발명을 실행하는 바람직한 일례는 바실러스 서브틸리스의 Sfp효소, 즉 서파신(surfacin)의 생산에 필요한 포스포판테테닐 트랜스퍼라제(PPTase)의 용도이다. PKS 유전자를 포함하는 별개의 벡터 또는 PKS 유전자를 포함하는 동일벡터에서 재조합 Sfp 유전자를 병합할 수 있다. 추가로, Sfp 단백질의 코딩서열을 PKS 코딩서열에 융합하여 PKS 및 Sfp의 두가지 기능을 단일 키메라(chimeric) 단백질의 일부로 할 수 있다.

본 발명의 용도를 갖는 다른 PPTase는 엔테로백틴 합성에 필요한 E.coli의 EntD(Gehring, et al., Biochem (1997) 36:8495-8503) 및 그라미시딘 합성에 필요한 바실러스 브레비스의 Gsp(Borchert et al., J Bacteriol (1994) 176:2458-2462)이다. 특별한 PPTase가 개별 PKS에 필요하도록 개별 PPTase는 다수의 PKS를 충분히 번역후변형시킬 수 있고, 다른 PPTase는 기질특이성이 제한될 수 있다. E.coli에서 적어도 3 개의 다른 PPTase가 동정되었다. entD-코딩 PPTase는 엔테로백틴 합성효소에 특이적인 반면, ACPS는 지방산 합성효소에 특이적이다(Lambalot, et al., 상기문헌).

본 방법에 사용된 PKS 발현시스템은 단일벡터에 존재하거나 다수의 벡터에서 제공될 수 있다. 다수의 벡터를 사용할 경우에, 상기 벡터는 변형된 세포에서 기능적인 PKS 발현시스템을 형성하도록 결합하거나, 폴리케티드 합성에 필요한 각각의 효소활성을 제공하기 위해서 PKS 시스템의 각 요소를 별개로 발현하도록 제조할 수도 있다. 이러한 두 접근은 모두 미국특허 제 5,712,146 및 PCT출원 US97/23014에 기재되어 있다. 단일 벡터 시스템에서, 단일벡터는 PKS의 모든 효소적 요소를 포함한다. 다수 벡터 시스템에서, PKS 발현시스템의 촉매활성은 다른 벡터로 분리되어져서, 식물숙주세포로 도입된 후에 단일 PKS발현시스템을 형성하도록 재조합되거나, PKS를 형성하도록 별개의 발현조절요소를 사용하여 발현될 수도 있다. 단일 벡터 접근이 기능적으로 활성인 PKS의 생산에 더욱 효과적이기는 하지만, 다수 벡터 접근은 다른 효소적 활성을 갖는 각각 하나, PKS 라이브러리를 생산하는데 사용될 수 있는 잇점을 가진다. 다수 벡터가 사용될 경우에, 몇몇예에서 완전한 발현시스템을 얻기 위해서 교차배양(cross-bred)될 수 있는 다른 식물에서 다양한 부분의 집단을 위해 벡터를 제공할 수 있다. 추가로, 상기 집단의 성분들 및 번역후 효소는 융합 단백질을 얻도록 하나의 리딩프레임에서 코딩될 수 있다. 홀로-ACP 합성효소뿐만 아니라 모듈 PKS 집단을 제공하는 융합은 상기 참고문헌 PCT 출원에 기재되어 있다.

방향족 PKS 시스템을 제조하는 벡터를 제조함에 있어서, 예컨대 도 2에서 나타난 바와 같이, 별개의 리딩프레임을 단일의 벡터에 도입하거나, 적합하게 제조된다면, 각각의 리딩프레임 중 재조합 또는 식물숙주세포에서 발현의 조절에 영향을 미치는 적합한 서열로 함께 각각의 리딩프레임을 하나 이상의 발현벡터에 분포시킬 수 있다. 모듈 시스템의 경우에, 단일모듈 또는 하나 이상의 모듈이 단일 벡터 또는 다수 벡터의 발현시스템의 일부분으로 존재하여, 상기 식물세포가 바람직한 전체 PKS 시스템을 포함하도록 변형되는데 사용될 수 있다.

PKS 코딩서열 외에도, 포스포판테테닐화를 위해서 다른 단백질 발현시스템을 식물숙주에 도입하는 것이 바람직하다. 상기한 바와 같이, PKS 집단 발현시스템 또는 PPT 효소를 운반하는 벡터를 PKS의 모든 부분 또는 일부분과 융합단백질로 생산할 수 있기 때문에, 적합한 PPT 효소에 대한 발현시스템은 동일하거나 상이한 벡터상에 존재할 수 있다.

식물내에서 발현시키기 위해서, 구체적으로 PKS 및 번역후 가공효소 발현시스템을 변형하여 식물에 바람직한 코돈을 활용하거나, 숨겨진 (cryptic) 스플라이싱 자리를 제거하거나, GC/AT함량 등을 변화시킬 수 있다. 코딩된 아미노산 서열을 변화시키지 않는 적합한 뉴클레오타이드 서열의 변화는 당해 기술분야에서 이해된다.

폴리케티드에 번역후변형을 야기하는 글리코실화 효소와 같은 추가적인 효소는 또한 적합한 재조합 발현시스템을 통해 숙주에 도입될 수 있다.

일례에서, 별개의 3 개의 벡터를 사용하여 모듈 PKS를 생산한다. 각 벡터는 두 연장자(extendor) AT(하나는 메틸말로닐 CoA에서 유래한 것이고, 다른 하나는 말로닐 CoA에서 유래한 것임) 및 상기한 KR, DH 및 ER의 4 가지 조합을 사용하여 64 개의 상이한 오픈리딩프레임을 제조할 수 있다. 따라서, 모듈 NO.1은 연장자 유니트로서 말로닐 CoA를 사용할 수 있다; 모듈 NO.2는 메틸말로닐 CoA를 사용할 수 있고; 반대 서열을 사용하거나 두 연장자는 말로닐 CoA를 사용하거나, 메틸말로닐 CoA를 사용할 수 있다. 이 결과 4 가지 별개 유형의 연장자 조합이 생기며, 그들 각각은 4 종의 KR/DH/ER 변이체에 의해서 늘어난다(multiply). 각각 별개의 벡터는 동일한 세트가 될 가능성이 있고; 하나의 플라스미드는 로딩기능을 수행하고 하나는 티오에스터라제 기능을 가져야 한다. 따라서, 192 개의 플라스미드를 제조함으로써, 신규 폴리케티드 합성의 상한은 $64 \times 64 \times 64$ 또는 262,144개의 분자이고, 이는 다수의 신규 폴리케티드를 얻는데 효과적인 방법을 제공한다.

식물에서 외부 DNA 발현을 위한 발현유니트

상기에서 제공된 바와 같이, 본 발명은 외부에서 제공된 PKS 코딩 DNA 분자를 식물세포 또는 이로부터 재생된 식물에서 발현하기 위해서 발현유니트(또는 발현벡터, 시스템 또는 모듈)를 사용한다. 식물용 발현유니트/시스템/벡터를 제조하는 방법은 당해 기술분야에서 알려져 있고 PKS 코딩서열을 발현시키는 용도로 쉽게 바꿀 수 있다. 일반적으로 상기한 바와 같이, 그러한 유니트는 PKS 코딩 모듈 및 하나 이상의 발현조절요소를 사용한다. 사용된 조절요소의 선택은 변형시킬 식물, 원하는 발현에 대한 조절수준, 또는 사용될 형질전환시스템에 의존적일 것이다. 당업계의 숙련가는 공지의 방법 및 본 명세서에서 제공된 예시에 따라 본 방법에 따른 적합한 식물/벡터/발현 시스템을 쉽게 사용할 것이다. 실시예에서, 수개의 적합한 식물발현 벡터의 제조를 기술할 것이다.

PKS 코딩서열의 발현을 조절하기 위해서 사용된 발현 조절 요소는 일반적으로 이중 발현조절요소일 것이며, 이는 정상적으로 PKS 코딩서열과 관련이 없다. 그러나, 정상적으로 PKS 코딩서열과 관련된 동종 조절요소가 선택된 식물숙주에서 활성을 가진다면 사용될 수도 있다. 다양한 이중 발현조절요소가 당해 기술분야에 알려져 있으며, 본 발명에서 사용하는 발현유니트를 제조하는데 사용할 수 있다. 예컨대, 전사개시영역은 아그로박테리움 투메파시엔스의 Ti 플라스미드에서 발견되는 다양한 오픈(opine)개시영역, 이를테면 옥토펜, 만노핀, 노팔린 등을 포함할 수 있다. 다른 방편으로 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터 등의 식물 바이러스 프로모터를 사용하여 식물 내의 유전자 발현을 조절할 수 있다. 마지막으로, 프로리페라(prolifera) 프로모터, 열매-특이적 프로모터, Ap3 프로모터, 열쇼크 프로모터, 종자-특이적 프로모터와 같은 식물 프로모터를 사용할 수 있다. PKS 생산이 조직이나 식물기관, 예컨대 잎조직, 종자 또는 자실체에 특이적일 수 있도록 식물세포성장 또는 발달 단계에서 활성적인 프로모터가 가장 바람직할 것이다.

일반적으로 구성(constitutive) 프로모터(예컨대, CaMV 또는 Nos 프로모터), 기관 특이적 프로모터(예컨대 토마토의 E8 프로모터), 또는 유도성 프로모터를 당해 기술분야에서 알려진 표준기술을 사용하여 PKS 코딩영역에 접합할 수 있다. 추가로 보충요소, 예컨대 전사종결인자 및/또는 인핸서 요소를 사용함으로써 발현유니트를 최적화할 수 있다.

따라서 식물에서 발현을 위해서, 발현유니트는 일반적으로 PKS 코딩서열뿐만 아니라 식물프로모터 영역, 전사개시자리 및 전사종료서열을 포함할 것이다. 실시예에서 나타난 바와 같이, 이미 존재하는 벡터에 쉽게 삽입시키기 위해서는 일반적으로 발현유니트의 5' 및 3' 말단에 유일한(unique) 제한효소자리를 도입한다.

이중 프로모터 유도 발현시스템의 제조에 있어서, 상기 프로모터를 이중 전사개시자리와 동일한 거리에 두는 것이 바람직하다. 왜냐하면 그것이 전사개시자리로부터 자연 세팅이기 때문이다. 그러나 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이, 이 거리 내에서의 약간의 변화는 프로모터 기능의 손실없이 조절할 수 있다.

프로모터 서열 외에도, 발현시스템/유니트는 또한 효과적인 종료를 위해서 구조유전자의 하류(downstream)에 전사종료 영역을 포함할 수 있다. 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 종료 영역을 얻거나, 다른 유전자로부터 얻을 수 있다. 만약 PKS 코딩서열에 의해서 코딩되는 mRNA가 효과적으로 가공된다면, RNA의 폴리아데닐화를 지시하는 DNA가 일반적으로

벡터구조물에 추가된다. 폴리아테닐화 서열은 아그로박테리움 옥토펜 합성효소 신호(Gielen et al., EMBO J 3:835-846) 또는 노팔린 합성효소 신호(Depicker et al., Mol and Appl Genet 1:561-573 (1982)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

결과적인 발현 유닛을 고등식물 형질전환에 적합한 벡터에 포함되도록 접합시키거나 제조한다. 또한 상기 벡터는 일반적으로 배양물에서 형질전환된 식물세포를 동정할 수 있도록 선택표지 유전자를 포함할 수 있다. 보통, 표지유전자는 항생제 내성을 코딩할 것이다. 이들 표지는 G418, 히그로마이신, 블레오마이신, 카나마이신, 및 젠타마이신에 대한 내성을 포함한다. 식물세포를 형질전환시킨 후에, 벡터를 가진 이들 세포를 구체적인 항생제를 함유하는 배지에서의 성장여부로 동정할 것이다. 박테리아 또는 과지숙주에서 벡터가 클로닝될 수 있도록 박테리아 또는 바이러스 기원의 복제서열은 일반적으로 또한 벡터에 포함될 것이며, 광범위한 숙주범위를 갖는 원핵세포의 복제기원이 포함되는 것이 바람직하다. 또한 박테리아에 대한 선택표지가 원하는 구조물을 갖는 박테리아 세포를 선택하기 위해서 포함되어야 한다. 적합한 원핵생물의 선택표지는 카나마이신 또는 테트라마이신과 같은 항생제에 대한 내성을 포함할 것이다.

당해 기술분야에서 알려진 바와 같이, 부가적인 기능을 코딩하는 다른 DNA 서열이 벡터에 존재한다. 예를 들면, 아그로박테리움의 경우에, 식물염색체로의 전달을 위해서 T-DNA 서열이 또한 포함될 것이다.

본 발명의 특히 바람직한 일례에서, 폴리케티드를 생산하는 식물숙주세포의 표면에서 나타나거나 또는 내부에 존재하는 폴리케티드-반응성 수용체를 도입함으로써 식물세포 또는 식물을 자가-선별할 수 있다. 이러한 "오토크라인(autocrine)" 시스템은 상기 수용체를 활성화하는 것에 대해 콜로니가 자가선별되도록 하는 것이다. 그러한 시스템은 예컨대 Broach, J.R., et al, Nature(1996) 384: 본문헌 7:14-16에 기재되어 있다.

그러나, 오토크라인 시스템은 수용체에 한정될 필요는 없으며, 형질전환된 식물세포의 내부에서 발현되고 Fields의 미국 특허 제 5,283,173에서 기재된 효모의 2 하이브리드 시스템과 유사한 방식으로 그의 상호작용을 생산된 폴리케티드와 관련하여 측정가능한 단백질을 포함한다.

따라서, "폴리케티드 기능의 식물세포-기재 탐지시스템"을 만들기 위해서 식물세포를 변형할 수 있다. 폴리케티드의 기능은 세포표면 또는 세포내부에서 생산된 수용체에 관한 작용(agonist) 및 길항(antagonist) 활성을 포함하거나, 또는 상기 폴리케티드는 라파마이신 및 FK506과 유사하게 단백질-단백질 상호작용 저해제 또는 교차-결합 인자를 선택할 수 있도록 두 하이브리드 상호작용 선별에 대한 작용제 또는 길항제일 수 있다.

효소적 활성의 분획화

폴리케티드 합성효소는 폴리케티드 산물의 합성에서 다양한 아실 CoA 전구체를 이용할 수 있다. 이들은 많은 생합성 경로에서 일반적으로 사용되는 아세틸 CoA, 말로닐 CoA, 프로피오닐 CoA 및 메틸말로닐 CoA를 포함한다. 추가로, 합성의 개시 전구체로서 또는 합성주기의 후기에 연장자 전구체로서 더욱 특이적인 아실 CoA를 사용할 수 있다. 일반적으로 사용되는 다수의 전구체는 식물에서 잘 이해되지 않는다. 그러나, 이들 전구체 수준은 여러가지 세포분획간에 다양하게 나타나리라 기대된다. 어떠한 특이적인 PKS를 이용한 폴리케티드 산물의 합성은 분획마다 다양할 것으로 예상된다. 분해기능과 합성기능의 일반적인 자리인 어떠한 하위세포 분획은 폴리케티드 합성을 위한 자리로 사용될 수 있으며, 예컨대 세포질, 색소체, 퍼옥시좀, 미토콘드리아 등을 포함한다.

어떠한 분획이 PKS와 함께 사용될더라도, PKS와 함께 발현될 수 있는 다른 기능에 따라, 몇몇 분획은 특이적 전구체로 합성하는데 더욱 바람직할 수 있다. 예를 들면, 아세틸 CoA 및 말로닐 CoA만을 전구체로서 요구하는 PKS-촉매반응에 있어서(예, 곰팡이 PKS), 바람직한 분획은 세포질 및 색소체이고, 가장 바람직한 분획은 색소체이다. 색소체는 지방산 합성의 자리이고, 세포의 어떠한 분획의 아세틸 CoA 및 말로닐 CoA를 최고농도로 함유하는 것으로 예상된다. Nawrath, et al., Proc Natl Acad Sci USA(1994) 91:12760-12764는 세포질 활성이 아니라 색소체-표적화 효소활성을 사용하여 식물세포에서 폴리히드록시부틸레이트의 이중합성의 속도가 5 내지 10배 증가한다고 보고하고 있다. 폴리히드록시부틸레이트 이중합성에 필요한 단 하나의 전구체는 아세틸 CoA이다.

다른 분획에서 프로피오닐 CoA 및 메틸말로닐 CoA의 활용은 식물세포에서 현재 알려져 있지 아니하다. 메틸말로닐 CoA가 피너스 스트로버스에서 C-메틸화 칼콘의 합성에 필요하다는 것에 기초하여, 몇몇 식물세포에 존재한다는 보고가 있다(Schr der J., et al. Biochemistry (1998) 37:8417-8425, 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨). 홀수 사슬길이 지방산 및 어떠한 아미노산의 분해대사 동안 생성되는 프로피오닐 CoA는 산화성 분획, 예컨대 미토콘드리아 또는 퍼옥시좀에 존재할 것이다. 식물발달의 몇몇 단계 동안에, 이들 분획은 지방산 대사를 통해 아세틸 CoA를 높은 수준으로 포함할 것이다. 이러한 분획은 생합성에 관련되지 않기 때문에, 말로닐 CoA가 상당한 수준으로 존재하지 않을 것으로 예상된다.

진핵생물, 구체적으로 식물세포에서 유전자 산물을 특정 하위세포분획으로 표적화하는 연구가 광범위하게 행하여져 왔다. 예를 들면, 미국특허 제 5,728,925 및 5,717,084(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)은 단백질이 엽록체로 표적화시키는 방법을 기재하고 있다. 세포질 단백질의 N-말단에 운반(transit)펩티드를 부착함으로써 일반적으로 엽록체로의 표적화가 이루어질 수 있다. 색소체의 운반펩티드로 기능하는 다른 서열의 범위 및 이들 서열의 일반적인 특징은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다.

또한, 퍼옥시좀으로 단백질을 표적화하는 방법도 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 세포질에서 합성된 단백질의 특이적 서열을 이용한다. 두 개의 다른 유형의 표적화 신호, 즉 유형 1 또는 유형 2의 PTS를 사용하여 퍼옥시좀성 매트릭스-표적화 단백질이 퍼옥시좀으로 된다. PTS1은 극말단 C-말단에 존재하는 비절단 트리펩티드 모티프 예컨대, SKL(단일아미노산 명명)이며, 작은 염기성-소수성 아미노산 모티프를 사용하는 다른 트리펩티드를 가지고 있다(Gietl. C. Physiol Plant (1996) 97:599-608; Olsen, et al., Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol (1995) 46:123-46). PTS2는 몇몇 퍼옥시좀성 매트릭스-목적화 단백질의 N-말단 영역에서 발견되며, R-L/I/Q-X₅-H/Q-L 형태의 노나펩티드(nonapeptide)이다.

단백질을 미토콘드리아로 표적화하는 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 미토콘드리아성-표적화 단백질이 N-말단 프리서열을 갖는 세포질 전구체로 합성된다. 이 프리서열이 수용체 단백질과 상호작용하여 외막, 아마도 내막 및 다양한 미토콘드리아의 하위분획으로 상기 단백질을 인도하는 과정이 개시된다. 전구체 폴리펩티드를 미토콘드리아 및 엽록체로 표적화하도록 기능하는 서열이 또한 당해 기술분야에 알려져 있다(WO95/08633). 미토콘드리아 및 다른 분획으로 들어가기 위해서는, 거대한 단백질은 폴립(unfolding)을 위한 부가 기능의 발현이 향상되어질 필요가 있다(예, 샤페로닌(chaperonins)). 예를 들면, mhsp 70은 미토콘드리아의 내부에 존재하여 단백질이 미토콘드리아의 외막을 통과하는 것을 돕는다(Matousschek, et al., EMBO J (1997) 16:6727-6736). 미토콘드리아성-입수 자극인자(MSF)와 같은 기능은 미토콘드리아성 단백질 입수 수용체와 관련되기 전에 세포질에서 단백질의 폴립 과정에 관련된다(Komiya et al., EMBO J (1997) 16:4267-4275).

전구체 생성

전구체 이용가능성은 폴리케티드 산물의 합성에 제한적일 수 있다. 구체적인 폴리케티드 산물의 생산수준을 증가시키기 위해서는, 구체적인 전구체의 합성을 증가시키는데 필요한 효소를 코딩하는 부가적인 유전자 구조물이 필요하다. 예를 들면, 말로닐 CoA의 양을 증가시키기 위해서는, 아세틸 CoA에서 메틸말로닐 CoA로의 전환을 촉매하는 효소인 아세틸 CoA 카르복실라제(ACCase)가 적합한 분획에서 발현되어야 한다. 식물에서 ACCase는 또한 프로피오닐 CoA에서 메틸말로닐 CoA로의 전환에도 관여한다는 것이 보고되었다. ACCase 활성의 이용은 적합한 기질, 아세틸 CoA 및 말로닐 CoA의 이용가능성에 의존적이다. 아세틸 CoA가 생성되는 분획(및 조직)에서 적합한 수준으로 ACCase가 발현될 때, ACCase는 적합한 폴리케티드의 기질로서 아세틸 CoA와 말로닐 CoA를 균형있는 양으로 제공할 수 있다. 혹은, 아세틸 CoA 및 프로피오닐 CoA가 모두 존재할 때, ACCase의 적절한 발현은 적합한 양의 아세틸 CoA, 프로피오닐 CoA, 말로닐 CoA 및 메틸말로닐 CoA의 합성을 제공할 수 있다.

메틸말로닐CoA의 합성을 특이적으로 향상시키기 위해서는, 원하는 분획에서 프로피오닐 CoA 카르복실라제 활성이 발현될 수 있다. 프로피오닐 CoA 특이-카르복실라제 활성을 갖는 효소가 스트렙토미세스 코리콜러 A3(2)(Bramwell, et al. Microbiology (1996) 142(Pt3):649-655)에서 확인되었으며, 이중다이머 효소의 서브유닛 중 하나가 클로닝되었다. 다른 두종의 카르복실라제의 적합한 발현수준을 통해, 다양한 범위의 폴리케티드 생합성 경로에 적합한 전구체 수준을 다른 분획에서 확립할 수 있다.

식물은 일반적으로 아미노산을 에너지원으로 사용하지 않기 때문에, 프로피오닐 CoA의 수준이 폴리케티드 합성을 위해서 향상될 필요가 있다. 프로피오닐 CoA는 아미노산의 분해대사에서 생성되기 때문에, 세포내 아미노산 수준을 향상시키는 특정 아미노산 합성의 증가는 아미노산 분해대사경로를 통한 흐름의 증가로 보여질 것이다. 생합성 경로는 종종 피드백 조절하에 있기 때문에, 생합성 효소의 피드백 조절자리의 파괴는 세포내의 아미노산 농도를 증가시킨다. 식물세포에서 증가된 아미노산은 피드백 저해를 경감시키는 아세토락테이트 합성요소를 변이시킴으로써 설명된다.

Schroder, et al., Biochemistry (1998) 37:8417-8425는 기질로서 메틸말로닐 CoA가 필요하고 세포질 분획에서 일어나는 피너스 스트로버스에서의 생합성반응을 설명한다. 이 반응은 C-메틸플라본 생합성의 일부이다. 다른 몇몇 식물에서 C-메틸플라본을 생산하며, 상기 C-메틸플라본은 박테리아 및 곰팡이의 PKS과 무관한 PKS에 의해 생산되는 칼콘의 유도체이다. 구조적 분석에 기초하여, 메틸말로닐 CoA는 이들 상이한 C-메틸플라본의 합성에서 기질이다. 분명히, 어떤 식물

은 메틸말로닐 CoA를 합성할 수 있다. 당해 기술분야에서 알려진 방법에 기초하여, 메틸말로닐 CoA를 생합성하는 유전자를 확인할 수 있으며, 메틸말로닐 CoA를 합성하기 위해 이들을 바람직한 숙주식물 내로 도입할 수 있다. 게다가 C-메틸 플라본 생산자로부터 프로피오닐 CoA를 합성하는 유전자를 얻을 수도 있다.

조직 유형 및 발달단계

어떠한 발달단계 동안 또는 특정 조직유형에서, 식물은 분화된 대사기능을 이용한다. 어떤 경우에, 대사적 로드(metabolic load)를 제공하기 위해서 기질 농도가 증가된다. 예를 들면, 기름종자가 발달 및 성숙하는 동안, 지방산은 매우 높은 속도로 합성되고, 아세틸 CoA 및 말로닐 CoA가 증가된다. 그 목적이 약학적 또는 농업적 용도의 폴리케티드의 정제에 있는 경우, 기름종자가 폴리케티드 합성의 바람직한 표적자리가 될 수 있다. 원하는 표적조직에서 특이적으로 높게 발현되는 적합한 프로모터를 사용하여 번역후변형에 필요한 PKS 효소 및 폴리케티드 합성에 필요한 다른 효소를 프로그램화할 수 있다. 그러한 조직 및 발달단계-특이적 프로모터는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다.

보조기능

적합한 수준의 생합성 기질을 갖는 식물 하위세포 분획의 기능적인 PKS는 폴리케티드 산물의 합성을 제공할 것이다. 대부분의 1차적인 폴리케티드 산물은 생물학적으로 활성이 아니다. 일반적으로 부가적인 생합성 효소가 1차 폴리케티드를 생물학적 활성 분자로 전환하는데 필요하다.

1차 폴리케티드를 생물학적 활성 분자로 전환하는데 필요한 광범위한 보조기능이 기술되어왔다. 이는 고리화반응, 산화반응, 환원반응, 메틸화반응(산소 또는 탄소원자에서), 탈카르복시화반응, 탈수반응, 불포화반응 및 접합반응을 포함한다. 필요한 단계수는 예컨대 10 단계 반응 이상이 1차 폴리케티드 산물을 잠재적인 미코톡신 아플라톡신으로 전환하는데 필요하다(Brown, et al., Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93:1418-1422).

일례로서, 밀베마이신(milbemycin) 및 아베르멕틴(ivermectin)은 살진드기성, 살선충류성(nematocidal) 활성을 갖는 폴리케티드이다. 이들 화합물은 스트렙토미세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 및 스트렙토미세스 히그로스 코피쿠스 subsp(*Streptomyces hygroscopicus* subsp.). 오레올라크리모수스(*aureolacrimosus*)의 모듈 PKS에 의해서 생성된다. 밀베마이신 및 아베르멕틴의 1차 폴리케티드 산물은 예상 분자량이 450, 700, 610 및 540 kDa인 4개의 다른 단백질에 위치하는 12 개의 모듈을 필요로 한다(Ikeda, H., et al., Chem Rev (1997) 97(7):2591-2609). 이들 모듈은 개시자 아실 CoA 특이성과 아베르멕틴의 C22-C23에 이중결합이 있다는 점에만 차이가 있다. 이들 클래스의 폴리케티드 산물간에 주요한 차이로는, 밀베마이신 합성이 아베르멕틴(아세틸 CoA 및 프로피오닐 CoA)보다 아실 CoA에서 더 자주 시작하며, 밀베마이신은 아베르멕틴 아글리콘의 C13 히드록시에 부착된 이당류 부분이 없다는 것이다. 밀베마이신의 합성은 푸란고리를 형성하거나 C5 케토기의 환원을 위한 부가적인 기능을 필요로 한다. 아베르멕틴의 합성은 이당류의 합성과 폴리케티드 핵에의 부착에 필요한 부가 기능을 필요로 한다. 밀베마이신의 합성에 필요한 모든 유전자들은 그것들을 만들어내는 생물체로부터 분리하여 이중 발현 식물세포에 사용하기 위해 가공된다.

두번째 일례에서, 스트로빌루린 A는 특정 바시디오미세테스(예, 스트로빌루리스 테나셀러스)가 생산하는 곰팡이성 폴리케티드 산물이다. 비록 완전한 생합성 경로가 밝혀지지 않았지만, 수개의 부가적 효소가 PKS 핵에 더하여 필요하다: 출발 분자로서 시나밀 CoA에서 벤조일 CoA로 전환하는 한두종류의 효소, C1 COOH에서 C3로 재배열하는 효소, 하나의 C-메틸트랜스퍼라제 및 두종의 O-메틸트랜스퍼라제.

박테리아 및 곰팡이 폴리케티드 산물의 합성에 필요한 생합성 유전자는 일반적으로 생성 생물체의 게놈에 모여있다. 이는 스트렙토미세테스의 폴리케티드 산물(Chater, K., et al., EMBO J (1985) 4:1893), 이외에도 사상균의 폴리케티드 산물(예, 아플라톡신, Brown et al., 이전에 인용한 책)에 대해 잘 문헌화되어 있다. 특성화되지 않은 생산자 생물체로부터 PKS를 포함하는 게놈 클론을 동정하기 위해서 이중 PKS 프로브를 사용한다. PKS 집단은 이들의 뉴클레오타이드 서열이 매우 다양하기 때문에, 때때로 PKS 유전자의 보존된 영역으로 표적화된 변성 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR)를 통해 동종 PKS 프로브를 제조하는 것이 필요하다. 큰 게놈클론(람다 파지, 코스미드, BACs 또는 당해 기술분야에서 알려진 그밖의 벡터를 사용)은 혼성화에 의해서 직접적으로 탐지된 PKS 외에도 보조유전자를 포함할 것이다.

식물세포의 형질전환

예컨대 상기에서 언급한 것과 같이 적합한 벡터를 얻은 경우, 바람직한 발현 유닛을 포함하는 트랜스제닉 식물을 제조한다. 실시예에서 기재된 바와 같이, 한가지 형질전환방법은 진공침입법(vacuum infiltration)에 따라 PKS를 코딩하는 DNA 벡터를 종자형성기관을 포함하는 식물세포로 도입한다(Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993) C.R. Acad. Sci.,

Paris/Life Science 316:1194-1199). 진공침입법에 있어서, 진공하에서 형질전환된 아그로박테리움을 함유하는 용액에 전체 식물을 접촉시킨다. 그런다음 상기 식물을 추가로 성장시켜 종자를 형성하도록 한다. 그후 상기 종자를 모아서 도입된 벡터의 존재를 확인한다. 이 방법의 장점은 배양된 식물세포로부터 식물체를 재생시키기 위한 체세포 배발생을 필요로 하지 않는다는 것이다.

또다른 형질전환 방법에서, 마이크로피펫을 사용하여 벡터를 직접 식물세포로 미세주입하여 기계적으로 재조합 DNA를 식물세포에 전이시킨다(Crossway, Mol Gen Genetics (1985) 202:179-185). 또다른 방법에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하거나(Krens, et al, Nature (1982) 296:72-74) 또는 작은 입자나 비드 내의 매트릭스 내부에 또는 표면에 핵산을 갖는 소입자로 고속탄도 관통을 사용하여 식물세포로 유전물질을 전이시킨다(Klein et al., Nature (1987) 327:70-73). 또다른 방법에 있어서, 도입코자 하는 DNA를 갖는 다른 것과 원형질체(protoplast)를 융합한다. 이러한 것들은 미니셀, 셀, 리소좀, 또는 다른 융합가능한 지질-표면체일 수 있다(Fraley, et al., Proc Natl Acad Sci USA (1982) 79:1859-1863).

또한, 전기천공법(electroporation)으로 DNA를 식물세포로 도입할 수 있다(Fromm et al., Proc Natl Aca Sci USA (1985) 82:5824). 이 기술에서, 발현벡터를 포함하는 플라스미드의 존재하에서 식물원형질체를 전기천공한다. 강한 전계강도의 전기충격은 생체막을 가역적으로 통과하여 플라스미드를 도입할 수 있게 한다. 전기천공된 식물 원형질체는 세포벽을 재생하고 분열하고 재생산한다.

박테리아 감염-매개 형질전환을 위해서는, 미리 DNA로 형질전환된 아그로박테리움 투메파시엔스 또는 아그로박테리움 리조젠으로 식물세포를 감염시켜야 한다. 아그로박테리움은 그램 음성 리조비아시에 패밀리의 대표적인 속이다. 그 종은 근두암종(아그로박테리움 투메파시엔스) 및 털이 있는 뿌리질병(아그로박테리움 리조젠)의 원인으로 작용한다. 근두암종 및 털뿌리에서 상기 식물세포는 오직 박테리아에 의해서 대사되는 오피(opine)으로 알려진 아미노산 유도체를 생성하도록 유도된다. 오피 발현의 원인인 박테리아 유전자는 키메릭 발현 카세트의 조절요소의 편리한 근원이다. 또한 오피의 존재여부의 분석을 사용하여 형질전환된 조직인지를 확인할 수 있다.

아그로박테리움 투메파시엔스의 Ti 플라스미드 또는 아그로박테리움 리조젠의 Ri 플라스미드를 사용하여 적합한 식물세포에 PKS 코딩 유전자 서열을 도입할 수 있다. Ti 또는 Ri 플라스미드는 아그로박테리움의 감염에 의해 식물세포로 도입되고 식물체내로 안정적으로 병합된다(St., J., Science (1987) 237:1176-1183). Ti 및 Ri 플라스미드는 형질전환된 세포를 생산하는데 필수적인 두 영역을 포함한다. 이들 중 하나는 전이 DNA(T-DNA)로서 식물의 핵으로 전이되어 종양이나 뿌리 형성을 유도한다. 다른 하나는 병원성(virulence)(vir) 영역으로서 T-DNA의 전이에 필수적이지만 그 자체는 전이되지 않는다. vir 영역이 다른 플라스미드상에 존재한다 해도 상기 T-DNA가 식물세포로 전이될 수 있다(Hoekema, et al., Nature (1983) 303:179-180). 그의 전이능력에 영향없이 이중 DNA를 삽입함으로써 전이된 DNA영역의 크기를 증가시킬 수 있다. 따라서 질병을 야기하는 유전자가 결실되도록 변형된 Ti 또는 Ri 플라스미드를 벡터로 사용하여 본 발명의 유전자 구조물을 적합한 식물세포로 전이시킬 수 있다.

재조합 Ti 및 Ri 플라스미드의 제조는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 일반적으로 공통 박테리아 벡터, 예컨대 pBR322를 사용하는 방법에 의한다(예컨대, Koncz, C., and Schell, J. (1986), Molecular and General Genetics 204:383-396). 천연 플라스미드 및 때때로 외부 서열로부터 제조된 보조 유전자 요소를 부가적으로 사용할 수 있다. 이들은 "서플 벡터"(Fruvkm and Ausubel, Nature (1981) 298:85-88), 프로모터(Lawton et al., Plant Mol Biol (1987) 9:315-324) 및 선택인자로서 항생제 내성의 구조유전자(Fraley et al., Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80:4803-4807)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

현재 사용되는 재조합 Ti 및 Ri 플라스미드는 두 클래스가 있다. 한 클래스는 "공동병합(cointegrate)"라고 불리는 것으로서, 목적 유전자를 함유하는 서플벡터를 유전적 재조합 방법으로 식물형질전환에 필요한 시스-작용성 요소 및 트랜스-작용성 요소를 모두 포함하고 있는 비종양성 Ti 플라스미드로 삽입하는 것이며, 예로는 Block et al., EMBO J (1984) 3:1681-1689에 기재된 pMLJ1 서플벡터 및 Zambryski et al., EMBO J (1983) 2:2143-2150에 기재된 비종양성 Ti 플라스미드 pGV3850이 있다. 두번째 클래스는 "이성분(binary) 시스템"으로서 식물형질전환에 필요한 시스-작용성 요소를 포함하는 서플벡터에 목적 유전자가 삽입된다. 다른 필요한 기능은 비종양성 Ti 플라스미드, 예컨대 Bevan, Nucleic acid Research (1984) 12:8711-8721 에 기재된 pBIN19 서플벡터 및 Hoekma, et al. Nature (1983) 303: 179-180에 기재된 비종양성 Ti 플라스미드 PAL4404에 의해 트랜스로(in trans) 제공된다. 이들 벡터의 일부는 시판되고 있다.

아그로박테리움으로 식물세포를 형질전환하는 일반적인 방법은 두가지가 있다: 배양하여 분리한 원형질체와 함께 아그로박테리움을 공동배양, 또는 아그로박테리움으로 완전한 세포 또는 조직의 형질전환. 첫번째는 원형질체의 배양과 후속적

으로 배양된 원형질체로부터 식물의 재생이 가능한 확립된 배양시스템이 필요하다. 두번째 방법은 (a)완전한 식물조직, 예컨대 떡잎을 아그로박테리움으로 형질전환시키고, (b) 형질전환된 세포 또는 조직을 완전한 식물로 재생하는 것이 필요하다.

대부분 쌍떡잎식물종은 아그로박테리움에 대한 천연 식물숙주로서 아그로박테리움에 의해 시험관내에서 형질전환가능하다. 외떡잎식물, 특히 곡류는 아그로박테리움에 대한 천연 숙주가 아니다. 아그로박테리움으로 이들을 형질전환시키려는 시도는 최근까지 성공적이지 못하였다(Hooykas-Van Slogteren et al., Nature (1984) 311:763-764). 그러나, 아그로박테리움에 의해 어떠한 외떡잎식물도 형질전환될 수 있는 증거가 현재 있다. 신규한 시험적 접근을 사용하여, 곡류종, 예컨대 호밀(De la Peza, et al., Nature (1987) 325:274-276), 옥수수(Rhodes et al, Science (1988) 240: 204-207), 및 벼(Shimamoto,et al., Nature (1989) 338:274-276)는 현재 형질전환될 수 있다.

상기한 바와 같이, 일반적으로 형질전환 벡터에서 선택표지를 포함시키거나 성공적인 박테리아 감염의 증거로서 형질전환된 세포 또는 식물을 확인할 수 있다.

형질전환된 식물의 재생

또한 알려진 기술을 사용하여 PKS 코딩서열을 포함하도록 형질전환된 식물세포를 재생할 수 있다. 예를 들면, 배양된 원형질체로부터 식물재생은 Evans et al., Handbook of Plant Cell Cultures, Vol.A:(MacMillans Publishing Co. New Your, 1983); and Vasil I.R.(ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Acad, Press, Orlando, Vol. 1, 1984 and Vol. II, 1986에 기재되어 있다. 실질적으로 모든 식물종을 배양된 세포 또는 조직에서 부터 재생할 수 있으며, 이는 사탕수수, 사탕무, 면화, 과수 및 콩과식물을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

재생방법은 식물종마다 다양하나, 일반적으로 형질전환된 이식체를 포함하는 페트리 플레이트 또는 형질전환된 원형질체 현탁액을 먼저 제공한다. 유합(callus) 조직을 형성하고 유합조직으로부터 슈트(shoot)를 유도하고 뿌리를 형성한다. 혹은, 유합조직에서 체세포 배형성을 유도한다. 체세포배는 천연 배아로서 발아하여 식물을 형성한다. 배양배지는 일반적으로 다양한 아미노산과 옥신 및 사이토키닌과 같은 식물호르몬을 포함한다. 특히 옥수수나 자주개자리(alfalfa)와 같은 종의 경우에 배지에 글루탐산 및 프롤린을 첨가하는 것이 효과적이다. 효과적인 재생은 배지, 유전형 및 배양경과에 의존적이다. 이러한 변수가 조절된다면, 재생과정은 반복가능하고 재현가능하다.

상기 절차를 사용하여, 다양한 식물을 형질전환시키고 재생할 수 있다. 이하, 아라비도시스(arabidopsis)와 담배를 예로 들어 설명한다. 다른 유용한 종으로는 완두콩, 후추, 피튜니아, 밀 및 면화이다. 이 열거는 비제한적이며, 어떠한 원하는 고등식물도 숙주로서 이용할 수 있다.

다음의 실시예는 단지 예시적이며 본 발명이 이에 한정하려는 의도는 아니다.

도면의 간단한 설명

도 1은 모듈 PKS의 전형으로서 에리쓰로마이신 PKS의 조직을 나타내는 개략도이다.

도 2는 수개의 전형적인 방향족 PKS의 조성물을 나타내는 개략도이다.

도 3은 곰팡이 6-MSAS의 조직을 나타내는 개략도이다.

실시예

실시예 1: 6-MSAS의 발현벡터의 제조

발현벡터 pBI121로 폴리케티드 합성효소 유전자의 클로닝을 용이하게 하기 위해서 합성 폴리링커를 고안하였다. 이 폴리링커는 SacI, BamHI, NdeI, XbaI, EcoRI, AvrII, SpeI, SnaBI 및 Asp718 제한자리를 포함한다:

5'-CGGATCCATATGAACCTCTAGAGAATTCATAGACTAGTCCTAGGTACGTAG-3'

3'-TCGAGCCTAGGTATACTTGGAGATCTCTTAAGTATCTGATCAGGATCCATGCATCCATG-5'

이 폴리링커는 pBlueScript (Stratagene)의 SacI/Asp718 자리로 클로닝되어 클로닝벡터 131a를 제조하였다.

BamHI, AvrII, SpeI 및 SnaBI 제한자리를 포함하는 합성폴리링커를 고안하였다:

5'-GATCCATCCACTAGTCCTAGGTAC-3'

3'-GTAGGTGATCAGGATCCATG-5'

이 폴리링커는 pBI121(Clontech)의 BamHI/SnaBI 자리로 클로닝되어 클로닝벡터 131b를 제조하였다.

페니실룸 파툴럼 6-메틸살리실산 합성효소의 유전자를 포함하는 5.5-kbp NdeI/XbaI 단편을 pDB102(E.coli SCS 110으로부터 분리됨)로부터 분리하여 131a의 NdeI/XbaI 자리로 클로닝시켰다. 이 중간체 플라스미드의 BamHI/SpeI 단편을 131b의 BamHI/SpeI 자리로 클로닝하여 6-MSAS의 발현시스템을 함유하는 발현벡터 131c를 생산하였다.

실시예 2: ery A-1의 발현벡터의 제조

DEBS 티오에스테르와 융합된 사카로폴리스포라 에리쓰라에아의 eryAI 유전자를 포함하는 11.2kbp NdeI/EcoRI 단편을 pCJT75로부터 분리하여 벡터 131a의 NdeI/EcoRI 자리로 클로닝하였다(Kao, C.M., et al., J Am Chem Soc (1995) 117:9105-06). 이 중간체 플라스미드의 BamHI/AvrII 단편을 131b의 BamHI/AvrII 자리로 클로닝하여 eryA-1의 발현 벡터 131b를 생산하였다.

실시예 3: grsA의 발현벡터의 제조

바실러스 브레비스의 grsA 유전자를 포함하는 2-kbp NcoI/HindIII 단편을 pQE60-PheAT로부터 분리하여 131a의 NcoI/HindIII 자리로 클로닝하였다. 이 중간체 플라스미드의 XbaI/SpeI 단편을 131b의 XbaI/SpeI 자리로 클로닝하여 grsA의 발현벡터 131e를 제조하였다.

실시예 4: 진공침입 식물성장을 이용한 아라비도시스(Arabidopsis)의 형질전환

1. 볼트가 막 나타나는 단계에서 적합한 유전자형의 식물의 성장

바람직하게도, 3.5" 포트에서 12-15 개체의 식물을 성장시켰다. 파종후 이 포트를 나일론 위도우 스크린으로 덮을 수 있다. 식물은 스크린을 통해 자랄 것이므로 침입을 위해 포트를 뒤집었을 때에 먼지가 덜 떨어진다.

2. 생성되는 볼트(bolt)를 절단하여 다수의 두번째 볼트의 성장 촉진

예를 들면 가위를 사용하여 생성되는 볼트를 절단하여 다수의 두번째 볼트의 성장을 촉진시킨다.

진공침입

3. 적합한 PKS 발현벡터, 131c, 131d 또는 131e를 운반하는 아그로박테리움의 액체배양물은 하룻밤동안 배양하였다. 진공침입 절차를 수행하기 2일 또는 3일전에 25ml를 하룻밤(LB + 항생제) 배양하기 시작하였고 이를 접종배양물로 사용하였다. 그런다음 침입 전날 이 배양물을 400ml의 LB + 항생제에 첨가하였다..

4. 약 24 시간 배양후에, 원심분리(예를들면, GSA 로터에서 5K rpm 10분간, 바람직하게는 실온에서)하여 세포를 수확하고 3 배 부피의 침입배지에 재현탁하였다(OD 600 약 0.8).[바람직하게는, 먼저 세포를 작은 부피로 재현탁하고 OD 600 0.8 이하가 되게 희석한다]. Arabidopsis 판을 형질전환시키는 준비가 된 진공탱크를 충전하기 위해서 약 2 리터의 박테리아가 필요하다.

5. 접시 또는 비커에 아그로박테리움(침입배지: 1/2 X Murashige & Skoog 염, 또는 MS 염 + 유기물; 1 X B5 비타민; 5.0% 수크로스; 0.44μM 벤질아미노푸린(DMSO에 1 mg/ml 스톡리터당 10μL))을 첨가하고 식물(포트, 흙 등 전부)을 액체용액으로 뒤집는다 (침입 배지에 볼트와 로우제트(rosette) 전체를 빠뜨린다).

6. 벨자(bell jar)속에 비커를 둔다. 잎 및 줄기의 표면에 거품이 생기고 용액에 거품이 일기 시작할 때까지 진공을 유도한 후에, 빠르게 진공을 방출한다.
필요한 시간 및 진공압력은 실험실마다 다양할 것이다. 침입이 잘 이루어졌는지는 일정하게 어둡고 물을 먹은 조직으로 분명히 알 수 있다.

7. 비커에서 식물을 제거하고 플라스틱 랩이나 돔으로 덮어 수분을 유지한다. 그 다음날, 덮개를 제거한다.

침입한 직후에 직접광으로부터 식물을 보호하기 위해서 저녁까지 습기찬 돔으로 덮어둔다. 가능한한 부생식물(saprophytes)의 성장을 최소화하기 위해서 습기있는 돔을 제거한다.

8. 각각의 포트와 함께 및 이웃 포트와 별개로 볼트를 유지하면서 약 4주간 성장시킨다.

형질전환체의 선택

9. 식물상의 장각과(silique)가 매우 건조할 때, 종자를 수확한다(모든 종자를 하나의 포트에서 유래됨)

카나마이신의 선택

10. 선별플레이트에 붓는다((1/2 X Murashige & Skoog; 0.8% 아가; 오토클레이브, 냉각후에 첨가: 1 X B5 비타민; 항생제(예컨대 Km 50µg/ml); 플라스틱 150 X 15 mm 페트리디쉬가 편리함(Murashige, T. et al, (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497)).

11. 종자를 멸균한다. 다양한 멸균방법을 사용할 수 있다. 예를 들면; 에탄올 또는 이소프로판올에서 1분처리후에 50% 블리치/50%물/0.05% 트윈스에서 5분간처리한 다음, 멸균수로 3회 행균.

12. 실온 멸균 0.1% 아가로즈에서 재현탁하고 선별플레이트에 퍼서 종자를 플레이팅한다. 플레이트를 뒤집을 경우 종자가 더이상 흐르지 않을 때까지 라미나 흐름 후드에서 플레이트를 건조한다. 매 500-1000 개체의 종자마다 1 ml의 아가로스를 사용한다.

150 X 15 mm 플레이트당 2000 내지 4000 개체의 종자를 플레이팅한다. 더 높은 밀도는 항생제 선택의 효과가 적게 한다.

13. 냉실에서 이틀밤 동안 플레이트를 춘화처리한다. 성장 챔버로 플레이트를 이동시킨다.

14. 약 7 일 후에, 연장되고 선택배지로 건강한 녹색의 두번째 잎과 뿌리를 갖는 진녹색 식물로서의 형질전환체를 분명히 확인할 수 있어야 한다.

15. 묘목을 토양에 이식, 성장 및 종자를 모은다. 잡아당기기 전에 뿌리둘레의 아가를 파괴함으로써, 심기전에 뿌리로부터 부착된 아가를 제거함으로써, 이식후에 물로 토양을 포화시킴으로써, 그리고 첫날 또는 이틀날을 돔(고습도를 위함)존재하에 식물을 성장시킴으로써 이식성공율을 높일 수 있다. 만약 뿌리가 부서진다면, 이식전 며칠동안 묘목을 새로운 선택배지에 두도록 한다.

실시예 5: 부가적인 발현벡터의 제조

바실러스 서브틸리스의 Sfp에 대한 코딩서열을 포함하는 700bp NcoI/XbaI단편을 pKOS 018-88A로부터 분리하였다. 이 단편을 pUC 레플리콘, 암피실린 내성 유전자, e35S 프로모터(Kay, R., et al., Science (1987) 236:1299-1302) 및 NcoI 자리에서 종료되는 Cab22L 리더 및 XbaI 자리에서 시작하는 노팔린 합성효소 3' 단편을 포함하는 4.1kbp NcoI-XbaI 단편과 접합하였다. 얻어진 발현벡터 pBH 1000은 키메릭 e35S-Sfp-nos3' 유전자를 포함한다.

키메릭 e35S-Sfp-nos3' 유전자를 포함하는 1.7kbp BamHI/BglII 단편을 pBH1000으로부터 분리하였다. 이 단편을 pACYC184 레플리콘(Chang, A.C.Y. et al., J Bacteriol (1979) 134:1141-1156), pVS1 레플리콘(Itoch, Y., et al., Plasmid (1984) 11:206-220), Tn 1721의 tetA 유전자(Waters, S.H., et al., Nucleic Acid Research (1983) 11:6089-6105) 및 담배의 아세토락테이트 합성효소의 변형된 형태(surB, Lee, K., et al., EMBO J (1988) 7:1241-1248)를 둘러

싼 T-DNA 경계단편(van den Elzen, P., et al., Plant Mol Biol (1985) 5:149-154), 클로닝 자리 및 lacZalpha 유전자 단편을 포함하는 pAR4741의 BamHI 자리에 삽입시켰다. 얻어진 이성분 벡터 pBH1001은 키메릭 e35S-Sfp-nos3' 유전자를 함유하고 추가의 DNA 단편 삽입에 필요한 단일 BamHI 자리를 보유하고 있다.

DEBS1 + TE(DEBS 티오에스터라제(Kao, C.M., et al., (1995)상기문헌)의 코딩서열과 융합된 eryAI 코딩서열)의 전체 코딩서열을 포함하는 11.2kbp NdeI/AvrII 단편을 pKOS018-97로부터 분리하였다. 이 단편을 pUC 레플리콘, 암피실린 내성 유전자, e35S 프로모터 및 NdeI 자리에서 종료되는 Cab22L 리더 및 XbaI 자리에서 시작되는 오토핀 합성효소 3' 단편(DeGrever H., et al, J Mol Appl Genet (1983) 1:499-511)을 포함하는 4.2kbp NdeI/XbaI 단편과 접합시켰다. 얻어진 플라스미드 pBH1006은 키메릭 e35S-DEBS1+ TE-ocs3' 유전자를 포함한다.

키메릭 e35S-DEBS1+ TE-ocs3' 유전자를 포함하는 12.6kbp BamHI/BglII 단편을 pBH1006으로부터 분리하였다. 이 단편을 T-DNA 경계부위에 이미 키메릭 e35S-Sfp-nos3' 유전자를 포함하는 pBH1006의 BamHI 자리에 삽입하였다. 얻어진 이성분 벡터 pBH 1008은 e35S-Sfp-nos3'과 e35S-DEBS1+ TE-ocs3' 키메릭 유전자를 모두 포함한다.

pUC 레플리콘과 BglII 자리에서 종료되는 암피실린 내성 유전자 및 NdeI 자리에서 시작되는 ocs3' 말단에 연결된 DEBS1+ TE 코딩유전자를 포함하는 14.2kbp의 NdeI(블린트말단)/BglII 단편을 pBH1006으로부터 분리하였다. 이 단편을 pER 5526에서 분리된 e35S-Cab22L 리더-엽록체 운송 펩티드(ctp) 서열을 포함하는 1kbp SphI(블린트말단)/BglII 단편에 연결하였다. 얻어진 플라스미드 pBH1009는 키메릭 e35S-ctp-DEBS1+ TE-ocs3' 유전자를 포함한다.

e35S-ctp-DEBS1+ TE-ocs3' 키메릭 유전자를 포함하는 12.9kbp BamHI/BglII 단편을 pBH1009로부터 분리하였다. 이 단편을 pAR4741의 BamHI 자리에 삽입하였다. 얻어진 이성분 벡터 pBH1011은 키메릭 e35S-ctp-DEBS1+ TE-ocs3' 유전자를 포함하고 추가의 단편삽입에 필요한 BamHI 자리를 보유한다.

pUC 레플리콘 및 암피실린 내성 유전자 및 NcoI 자리에서 시작하는 nos3'에 연결된 Sfp 코딩서열을 포함하는 3.9kbp NcoI(블린트말단)/BglII 단편을 pBH1000에서 분리하였다. 이 단편을 pER5526에서부터 분리된 e35S-Cab22L 리더-ctp 서열을 포함하는 1kbp SphI(블린트 말단)/BglII 단편에 연결하였다. 얻어진 플라스미드 pBH1010은 키메릭 e35S-ctp-Sfp-nos3' 유전자를 포함한다.

키메릭 e35S-ctp-Sfp-nos3' 유전자를 포함하는 2.0kbp BamHI/BglII 단편을 pBH1010에서 분리하였다. 이 단편을 pAR4741의 BamHI자리에 삽입하였다. 얻어진 이성분 벡터 pSG5578은 키메릭 e35S-ctp-Sfp-ocs3' 유전자를 포함하고 추가 단편 삽입을 위한 BamHI 자리를 보유한다.

키메릭 e35S-ctp-Sfp-nos3' 유전자를 포함하는 2.0kbp BamHI/BglII 단편을 pBH1010에서 분리하였다. 이 단편을 pBH1011의 BamHI 자리에 삽입하였다. 얻어진 이성분 벡터 pBH1012는 e35S-ctp-DEBS1+ TE-ocs3'와 e35S-ctp-Sfp-ocs3' 키메릭 유전자를 포함하고 추가 단편 삽입을 위한 BamHI 자리를 보유한다.

페닐실록 파툴럼의 MSAS 코딩유전자를 포함하는 5.5kbp NdeI/XbaI 단편을 pKOS12-71d로부터 분리하였다. 이 단편을 pUC 레플리콘, 암피실린 내성 유전자, NdeI 자리에서 종료하는 e35S-cab22L 리더 및 XbaI 자리에서 시작하는 ocs3' 말단을 포함하는 NdeI/XbaI 단편에 연결하였다. 얻어진 플라스미드 pSG5540은 키메릭 e35S-MSAS-ocs3'을 포함한다.

페닐실록 파툴럼의 MSAS 단백질과 바실러스 서브틸리스의 Sfp 단백질의 융합단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 6kbp NdeI/XbaI 단편을 pKOS14-69로부터 분리하였다. 이 단편을 pUC 레플리콘 및 암피실린 내성 유전자, NdeI 자리에서 종료하는 e35S-cab22L 및 XbaI 자리에서 시작하는 ocs3' 말단을 포함하는 NdeI/XbaI 단편에 연결하였다. 얻어진 플라스미드 pSG5541는 키메릭 e35S-MSASSfp-ocs3' 유전자를 포함한다.

e35S-MSAS-ocs3' 키메릭 유전자를 이성분 벡터 pWTT2144의 HindIII 및 KpnI 자리 사이에 삽입하였다. 별개의 두 단편을 pSG5540으로부터 분리하였다; 하나는 5.1kbp HindIII/AatII 단편이고, 다른 하나는 1.95kbp AatII/KpnI 단편이었다. 이들 단편을 HindIII/KpnI 절단 pWTT2144으로 연결되었다. 얻어진 이성분 벡터 pSG5574는 키메릭 e35S-MSAS-ocs3' 유전자를 포함한다.

e35S-MSASSfp-ocs3' 키메릭 유전자를 이성분 벡터 pWTT2144의 HindIII 및 KpnI 자리 사이에 삽입하였다. 별개의 두 단편을 pSG5541로부터 분리하였다; 하나는 5.1kbp HindIII/AatII 단편이고, 다른 하나는 2.5kbp AatII/KpnI 단편이었다. 이들 단편을 HindIII/KpnI 절단 pWTT2144와 연결하였다. 얻어진 이성분 벡터 pSG5575는 키메릭 e35S-MSASSfp-ocs3' 유전자를 포함한다.

MSAS 코딩서열을 포함하는 5.5kbp NdeI(블런트말단)/XbaI 단편을 pSG5540으로부터 분리하였다. 이 단편을 pUC 레플리콘, 암피실린 내성 유전자, SphI 자리에서 종료하는 e35S-cab22L 리더-ctp 서열 및 XbaI 자리에서 시작하는 ocs3' 말단을 포함하는 SphI(블런트말단)/XbaI 단편에 연결하였다. 얻어진 플라스미드 pSG5581는 키메릭 e35S-ctp-MSAS-ocs3' 유전자를 포함한다.

MSASSfp 코딩서열을 포함하는 6.0kbp NdeI(블런트말단)/XbaI 단편을 pSG5541로부터 분리하였다. 이 단편을 pUC 레플리콘, 암피실린 내성 유전자, SphI 자리에서 종료하는 e35S-cab22L 리더-ctp 서열 및 XbaI 자리에서 시작하는 ocs3' 말단을 포함하는 SphI(블런트말단)/XbaI 단편에 연결하였다. 얻어진 플라스미드 pSG5582은 키메릭 e35S-ctp-MSASSfp-ocs3' 유전자를 포함한다.

상기 e35S-ctp-MSAS-ocs3' 키메릭 유전자를 이성분 벡터 pWTT2144의 HindIII 및 KpnI 자리 사이에 삽입하였다. 별개의 두 단편을 pSG5581로부터 분리하였다; 하나는 5.1kbp HindIII/AatII 단편이고, 다른 하나는 1.90kbp AatII/KpnI 단편이었다. 이들 단편을 HindIII/KpnI 절단 pWTT2144와 연결하였다. 얻어진 이성분 벡터 pSG5583는 키메릭 e35S-ctp-MSAS-ocs3' 유전자를 포함한다.

상기 e35S-ctp-MSASSfp-ocs3' 키메릭 유전자를 이성분 벡터 pWTT2214의 HindIII 및 KpnI 자리 사이에 삽입하였다. 별개의 두 단편을 pSG5582로부터 분리하였다; 하나는 5.1kbp HindIII/AatII 단편이고, 다른 하나는 2.5kbp AatII/KpnI 단편이었다. 이들 단편을 HindIII/KpnI 절단 pWTT2144와 연결하였다. 얻어진 이성분 벡터 pSG5584는 키메릭 e35S-ctp-MSASSfp-ocs3' 유전자를 포함한다.

실시예 6: 담배 현탁배양의 형질전환

배양의 확립

호르몬이 없는 Murashige 및 Skoog(MS) 배지상에서 경정배양으로 멸균 담배식물(변종 Petite Havana)를 배양하였다. 이들 식물에서 잎디스크를 취하고 2mg/l 인돌아세트산(IAA) 및 0.5mg/l 벤질아미노푸린(BA)가 보충된 아가-고형화된 MS 배지(1% 아가)에서 배양하였다. 잎디스크가 놓인 페트리 디쉬를 28 °C에서 3 주간 16시간 광기간으로 빛을 쬔 배양하였으며, 그 기간 동안 미분화세포(유엽)가 절단가장자리에서 형성되었다. 상기 유엽을 디스크에서 제거하여 유일한 식물 호르몬으로서 0.2mg/l 2,4-D를 포함하는 액상 MS 배지로 옮겼다.

이들 세포현탁 배양물을 130 rpm으로 흔들면서 상기 잎디스크와 동일한 조건하에서 배양하였다. 이 조건하에서, 배양물은 약 2 일의 배증시간(doubling time)으로 단일세포 및 작은 세포집단으로 자랐으며, 50ml의 액체배지에 대해 침전된 세포부피(SCV) 약 2ml의 세포를 첨가함으로써 매주(weekly) 이동시켰다. 배양물은 또한 2mg/l IAA 및 0.5mg/l BA와 함께 배양되었다.그러나, 이 조건하에서는 현탁액은 매우 천천히 증식하였으며 대부분 거대 세포집합체를 이루었다.

현탁배양물의 형질전환

현탁배양법은 화학적 전구체를 주입하고 식물세포에서 효소가 어떻게 전구체를 전환하는 가를 이해하는데 이상적인 시스템이다.

예컨대, DEBS1-티오에스테라제를 코딩하는 유전자 등, PKS의 발현시스템 유전자를 포함하고, 바람직하게는 홀로-ACP 합성효소의 발현시스템과 제초제 클로로설푸론에 대한 내성을 제공하는 ALS유전자 등의 선택표지 유전자를 함께 포함하는 이원자 플라스미드를 운반하는 아그로박테리움 투메파시엔스 균주를 공동배양함으로써 상기 현탁액을 형질전환시켰다.

액상배지에서 아그로박테리움 세포와 현탁액 세포를 혼합함으로써 형질전환이 이루어졌다. 이전과 동일하나 24°C의 암조건하에서 아그로박테리움/담배 세포 혼합물을 계속해서 흔들거나, 또는 여과지상에 상기 혼합물을 모으고 공동배양한 담배세포를 함유한 여과지를 담배 잎디스크에 사용된 것과 동일한 조성물의 고체배지로 이동시킴으로써 액체배지에서 공동배양 및 선별을 행한다. 이러한 모든 경우에, 100μM의 아세토시링론을 공동배양 배지에 첨가하였다.

공동배양에 사용된 액체 또는 고체배지와 동일한 조성물에 50μg/l의 클로로설푸론과 500mg/l의 카르베니실린을 첨가함으로써, 아그로박테리움의 배양물을 제거하기 위한 역선택(counterselection) 및 형질전환된 세포의 선택을 행한다. 액상

형질전환의 경우에, 제초제 및 항생제 함유 배지에 재현탁하기 전에 신선한 배지로 행구어 대부분의 박테리아를 제거한다. 고체 형질전환의 경우에, 형질전환된 유업을 현탁배양을 재확립하기 위한 선택 및 역선택이 있거나 없는 액체배지로 이동시킨다.

목적 유전자를 갖는 형질전환된 (제초제 내성)세포현탁액은 분석 및/또는 주입연구를 위한 준비를 하여 4 - 5 주간의 선택 및 역선택을 행하였다. 형질전환된 현탁액은 T-DNA가 다수의 상이한 무작위 좌위에서 병합되는 형질전환의 혼합물로 구성된다. 이들 형질전환된 현탁액을 사용하여 폴리케티드를 생산할 수 있다.

상기 방법을 사용하여, 실시예 5의 pBH1008 발현시스템을 포함하도록 변형된 식물세포를 얻었다. pBH1008은 각기 35S 프로모터의 조절하에 있는 DEBS1+ TE에 대한 발현시스템과 Sfp의 발현시스템을 별개로 포함한다.

유사하게, 동일한 방법을 사용하나 pBH1008 대신에 pBH1012로 식물세포를 형질전환시켜 엽록체에 표적화된 Sfp 및 DEBS1 + TE에 대한 발현시스템을 포함하게 한다.

실시예 7: 폴리케티드 합성효소 유전자를 담배로 도입시키는 형질전환방법

16 시간동안 빛조사하면서, 27 °C에서 TCMA 배지(1/2 MS염, B5 비타민, 100mg/l m-이노시톨, 600mg/l MES, 20g/l의 수크로스, pH 5.6 및 7g/l TC 아가로 고형화)에서 시험관내에서 배양한 증식담배식물이 잎외식편의 근원이다. 잎에서 주맥을 제거한 후에, 이들은 2 x 2 mm로 절단하여 외식편을 제조하였다. 5×10^7 세포/ml로 희석한 LBA4404 세포를 하룻밤동안 배양한 배양물과 적합한 이성분 벡터를 포함하는 minAsuc 배지상에 외식편을 표류시켰다. 수분후에, 0.5mg/l BAP, 2mg/l IAA 100μM 아세토시링곤이 보충된 TCMA기초 배지를 포함하는 플레이트에 외식편을 이동시켰다. 외식편을 여과지 디스크가 놓여있는 배지상에서 24 °C 암조건하에서 2 일간 공동배양하였다. 그런다음, 0.5mg/l BAP, 2mg/l IAA, 25μM 아클로로설푸론(또는 25mg/l의 젠티신)과 250mg/l 카베니실린이 보충된 TCMA 기초 배지에 외식편을 이동하였다. 시험관내의 슈트(shoot)와 동일한 조건하에서 상기 외식편을 배양하고 3주후에 대부분의 외식편에서 트랜스제닉 슈트가 형성되었다.

상기 방법을 사용하여, 실시예 5의 pSG5574, pSG5575, 및 pBH1008의 발현시스템을 포함하도록 변형된 식물을 얻었다. pSG5574는 35S 프로모터의 조절하에서 MSAS의 발현시스템을 포함한다. pSG5575는 35S 프로모터의 조절하에서 MSAS 및 Sfp의 사이에 융합단백질에 대한 발현시스템을 포함한다.

동일한 방법을 사용하나 상기 명명된 플라스미드 대신, ctp 서열과 함께 35S 프로모터의 조절하에 있는 MSAS-Sfp 융합체의 발현시스템을 포함하는 pSG5584로 치환하여, 융합 단백질이 엽록체를 나타내는 식물을 얻는다. 유사하게도, pSG5578(Sfp의 발현시스템 포함) 및 pSG5583(MSAS의 발현시스템 포함)의 공동형질전환은 엽록체 내에 이들 단백질을 포함하는 식물을 제공하여, 폴리케티드 생성을 가능하게 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

방향족 폴리케티드 합성 효소(PKS)를 유효하게 생산할 수 있는 발현 시스템을 하나 이상 포함하도록 변형된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물로서,

상기 방향족 폴리케티드 합성 효소는 케토합성효소/아실 전이 효소 (KS/AT) 촉매 영역, 사슬 길이인자 (CLF) 촉매 영역 및 아실 운반 단백질 (ACP) 활성을 포함하고, 상기 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물에서 방향족 폴리케티드를 생산하는 것이고,

상기 식물은 배양 세포 또는 배양 조직으로부터 재생 가능한 것인,

식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 홀로-아실 운반 단백질 (ACP) 합성 효소를 유효하게 생산할 수 있는 발현 시스템을 하나 이상 포함하도록 추가로 변형된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 3.

제2항에 있어서, 폴리케티드 합성 효소의 발현 시스템과 홀로-ACP 합성 효소의 발현 시스템이 별개의 벡터상에 존재하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 4.

제2항에 있어서, 폴리케티드 합성 효소의 발현 시스템과 홀로-ACP 합성 효소의 발현 시스템이 동일한 벡터상에 존재하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 5.

제2항에 있어서, 폴리케티드 합성 효소의 발현 시스템과 홀로-ACP 합성 효소의 발현 시스템이 상기 폴리케티드 합성 효소와 상기 홀로-ACP 합성 효소를 포함하는 융합 단백질의 발현 시스템을 포함하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 KS/AT 코딩 뉴클레오타이드 서열, CLF 코딩 뉴클레오타이드 서열, 및 ACP 코딩 뉴클레오타이드 서열이 동일한 방향족 폴리케티드 합성 효소(PKS)에서 유래된 것인, 식물세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 KS/AT 코딩 뉴클레오타이드 서열, CLF 코딩 뉴클레오타이드 서열 및 ACP-코딩 뉴클레오타이드 서열 중 하나 이상이 상이한 방향족 폴리케티드 합성 효소(PKS)에서 유래된 것인, 식물세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 8.

제1항에 있어서, 폴리케티드의 세포 기재 탐지 시스템에 대한 발현 시스템을 추가로 포함하는, 식물세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 9.

제2항에 있어서, 폴리케티드의 세포 기재 탐지 시스템에 대한 발현시스템을 추가로 포함하는, 식물세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 10.

균류 방향족 폴리케티드 합성 효소(PKS)를 유효하게 생산할 수 있는 발현 시스템을 하나 이상 포함하도록 변형된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물로서,

상기 균류 방향족 폴리케티드 합성 효소는 케토 합성 효소/아실 전이 효소 (KS/AT) 촉매 영역 및 아실 운반 단백질 (ACP) 활성을 포함하고, 상기 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물에서 균류 방향족 폴리케티드를 생산하는 것이고,

상기 식물은 배양 세포 또는 배양 조직으로부터 재생 가능한 것인,

식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 11.

제10항에 있어서, 홀로-아실 운반 단백질 (ACP) 합성 효소를 유효하게 생산할 수 있는 발현 시스템을 하나 이상 포함하도록 추가 변형된, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 12.

제11항에 있어서, 폴리케티드 합성 효소의 발현시스템과 홀로-ACP 합성 효소의 발현 시스템이 별개의 벡터상에 존재하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 13.

제11항에 있어서, 폴리케티드 합성 효소의 발현 시스템과 홀로-ACP 합성 효소의 발현 시스템이 동일한 벡터상에 존재하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 14.

제11항에 있어서, 폴리케티드 합성 효소의 발현 시스템 및 홀로-ACP 합성 효소의 발현 시스템이 상기 폴리케티드 합성 효소와 상기 홀로-ACP 합성 효소를 포함하는 융합 단백질의 발현 시스템을 포함하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 15.

제10항에 있어서, 상기 KS/AT 코딩 뉴클레오타이드 서열과 ACP 코딩 뉴클레오타이드 서열이 동일한 균류 폴리케티드 합성 효소로부터 유래된 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 16.

제10항에 있어서, 상기 KS/AT 코딩 뉴클레오타이드 서열 및 ACP 코딩 뉴클레오타이드 서열이 상이한 균류 폴리케티드 합성 효소로부터 유래된 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 17.

제10항에 있어서, 폴리케티드의 세포 기재 탐지 시스템에 대한 발현 시스템을 추가로 포함하는, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 18.

제11항에 있어서, 폴리케티드의 세포 기재 탐지 시스템에 대한 발현 시스템을 추가로 포함하는, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 19.

기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 방법으로서,

제2항에 기재된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물을 상기 기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 20.

기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 방법으로서,

제11항에 기재된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물을 상기 기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 21.

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 발현 시스템이 생산된 폴리케티드 합성 효소단백질을 세포 분획으로 표적화시키는 수단을 추가로 포함하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 세포 분획이 색소체인 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 23.

제21항에 있어서, 상기 수단이 표적화될 단백질의 N-말단에 결합되어 있는 운반 펩타이드 서열을 포함하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 24.

제1항에 있어서, 상기 폴리케티드 합성 효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 식물에서 유리한 코돈의 사용, 숨겨진 스플라이스 부위의 제거 및 GC/AT 함량의 변화 중에서 선택된 중 한 가지 이상으로 변형된 것인 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 25.

제10항에 있어서, 상기 하나 이상의 발현 시스템이 생산된 폴리케티드 합성 효소 단백질을 식물 분획으로 표적화시키는 수단을 추가로 포함하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 26.

제25항에 있어서, 상기 식물 분획이 색소체인 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 27.

제25항에 있어서, 상기 수단이 표적화될 단백질의 N-말단에 결합되어 있는 운반 펩타이드 서열을 포함하는 것인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 28.

제10항에 있어서, 상기 폴리케티드 합성 효소를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 식물에서 유리한 코돈의 사용, 숨겨진 스플라이스 부위의 제거 및 GC/AT 함량의 변화 중에서 선택된 중 한 가지 이상으로 변형된 것인 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 29.

기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 방법으로서,

제21항에 기재된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물을 상기 기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30.

기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 방법으로서,

제24항에 기재된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물을 상기 기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 31.

기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 방법으로서,

제25항에 기재된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물을 상기 기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 32.

기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 방법으로서,

제28항에 기재된 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물을 상기 기능성 폴리케티드 합성 효소의 생산 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 33.

제10항 내지 제18항 및 제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균류 폴리케티드 합성 효소가 6-메틸살리실산 합성 효소 (MSAS)인, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 34.

제20항, 제31항 및 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균류 폴리케티드 합성 효소가 6-메틸살리실산 합성 효소 (MSAS)인 방법.

청구항 35.

제1항 내지 제18항 및 제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 담배(tabacco) 세포, 담배 잎 또는 담배인 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 36.

제33항에 있어서, 담배 세포, 담배 잎 또는 담배인 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물.

청구항 37.

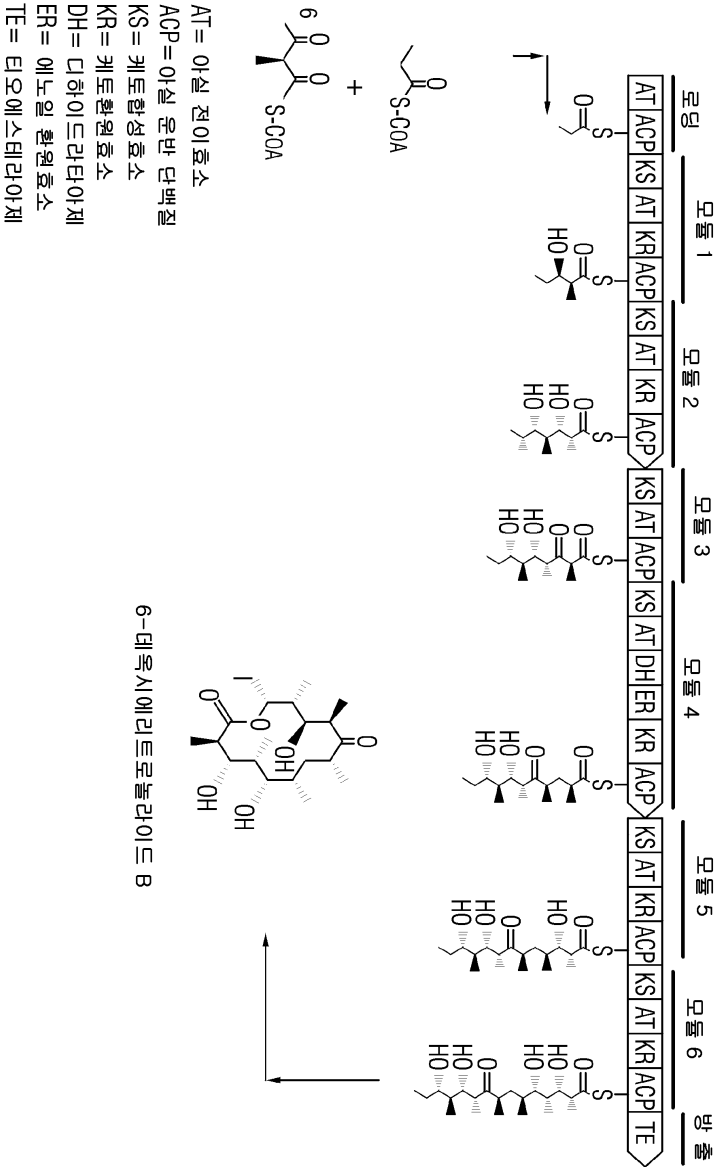
제19항, 제20항, 제29항 내지 제32항에 있어서, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물이 담배 세포, 담배 잎 또는 담배인 방법.

청구항 38.

제34항에 있어서, 식물 세포, 식물의 잎 또는 식물이 담배 세포, 담배 잎 또는 담배인 방법.

도면

도면1



도면2

