

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 8월 29일 (29.08.2013)



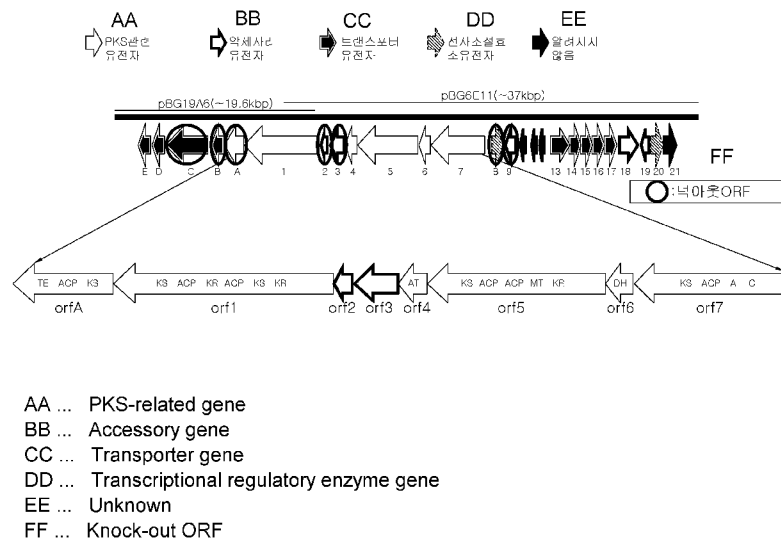
(10) 국제공개번호
WO 2013/125777 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/31 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C07D 309/38 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/010879
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 14일 (14.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0019271 2012년 2월 24일 (24.02.2012) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교내, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김범석 (KIM, Beom Seok); 140-857 서울시 용산구 회나무로 32길 45 SOD10 차 303호, Seoul (KR). 오현철 (OH, Hyuncheol); 612-785 부산시 해운대구 대천로 67번길 7 대창아파트 105동 1501호, Busan (KR). 엔지비겍 (NG, Bee-Gek); 136-072 서울특별시 성북구 보문로 26길 82-16 B101, Republic of Korea (MY). 한재우 (HAN, Jae-Woo); 131-786 서울시 중랑구 신내로 19길 42 신내 6단지신내아파트 609-402, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김선애 (KIM, Seon Ae); 137-860 서울시 서초구 강남대로 309 1813 (서초동 코리아비지니스센터) I.S.A.국제특허법률사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BIOSYNTHETIC GENE CLUSTER FOR CHEJUNOLIDE OF MARINE MICROORGANISM *HAHELLA CHEJUENSIS*

(54) 발명의 명칭 : 해양 미생물 하헬라 제주엔시스에의 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터



(57) Abstract: The present invention relates to a biosynthetic gene cluster for a chejuenolide of the marine microorganism *Haella chejuensis*, and to the function of an enzyme involving the biosynthetic pathway of a chejuenolide coded by the genes. Since the present invention can be applied to the development of a novel material as a mechanism for biosynthesis by combining of biosynthetic genes for chejuenolide, the present invention can suggest a new direction in the study of polyketide antibiotics, and is thus very useful.

(57) 요약서: 본 발명은 해양 미생물 하헬라 제주엔시스에의 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터 및 이 유전자에 의해 코딩되는 제주엔올라이드의 생합성 경로에 관여하는 효소의 기능에 관한 것이다. 상기 본 발명은 제주엔올라이드 생합성 유전자(들)를 조합생합성을 위한 기구로서 신물질 개발에 응용될 수 있어, 폴리케타이드 계열의 항생물질의 연구에 새로운 방향을 제시할 수 있는 매우 유용한 발명이다.



규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 해양 미생물 하헬라 제주엔시스(*Haehella jejuensis*)의 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터

기술분야

- [1] 본 발명은 폴리케타이드 마크로라이드계 (polyketide macrolide) 천연물 제주엔올라이드 (chejuenolide) 생합성 유전자 클러스터에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 제주엔올라이드의 생합성 경로에 관여하는 효소를 코딩하는 분리된 DNA 및 제주엔올라이드 생산에 관여하는 유전자 산물의 기능에 관한 것이다. 또한 본 발명은 제주엔올라이드 생합성에 관여하는 유전자와 효소가 파괴된 변이균주 및 상기 균주가 생합성하는 제주엔올라이드 전구체인 선형 폴리케타이드와 이의 제조 방법을 포함한다.

배경기술

- [2] 신약개발을 위한 중요한 원천으로서 해양 생물이 주목받고 있다. 특히 해양 미생물은 다양한 구조와 활성을 가지는 2차대사산물을 만들어 내는 것으로 알려져 있다. 해양 미생물의 경우 육상과 전혀 다른 해양환경 (염도, 압력, 고농도의 할로젠 등)에 체내 생화학적 대사가 적응한 결과로 육상환경에서 발견되는 종들과는 상이한 천연 생리활성물질을 생산하는 경우가 많다 (Fenical and Jensen 2006; Marris 2006).
- [3] 거제도 앞바다 조간대의 해양퇴적물에서 분리된 해양세균 하헬라 제주엔시스 MB-1084의 배양추출물로부터 새로운 17-멤버드카보사이클릭테트라엔 천연물 chejuenolide A, B, C가 발견되었다 (Choi, Sohn et al. 2008; Seo and Oh 2009). 이전에 보고된 17-멤버드카보사이클 고리를 가진 항생제는 *Streptomyces greseofuscus*, *S. violaceoniger*, *S. rochei* var. *volubilis*에서 분리된 항생제 란카사이딘 (Lankacidin)이 유일했다 (Uramoto, Otake et al. 1969; Higashide, Fugono et al. 1971). 란카사이딘은 매우 강력한 항세균제로 현재 가축에 병을 일으키는 스피로케차의 한 종류인 *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*의 감염증 치료에 사용되며, 항암활성 및 면역억제효과 또한 알려져 있다 (Oostu, Matsumoto et al. 1975; Hayashi, Suenaga et al. 1988). 란카사이딘은 여러 종류의 아날로그 (일부 아날로그는 T-2636 또는 번들린으로 불리기도 함)가 존재하는데, 구조적인 측면에서 란카사이딘 C와 제주엔올라이드는 많은 부분 닮아있다 (Harada and Kishi 1974; Harada 1975; Nakahama, Harada et al. 1975). 그러나 란카사이딘은 17-멤버드마크로사이클고리 안에 있는 6-멤버드- δ -락톤고리 구조와 3번 탄소에 2-하이드록시프로파마이드 사슬을 가진다는 점에서 제주엔올라이드와 다르다 (Harada and Kishi 1974; Harada 1975; Choi, Sohn et al. 2008). 란카사이딘 C를 쥐에 투약한 후 얻어진 대사산물인 란카사이클리놀과 란카사이클리놀 A (12-O-아세틸 란카사이클리놀)가 탈카복시기 작용을 거쳐

δ -락톤고리가 파괴되는 것으로 보고되어 있으나, 그 외에는

6-멤버드- δ -락톤고리가 없는 (에스테르 결합이 결여된)

17-멤버드카보사이클릭테트라엔을 가진 마크로라이드계 폴리케타이드

천연물은 제주엔올라이드가 유일하다 (Harada, Tanayama et al. 1973;Choi, Sohn et al. 2008).

- [4] 폴리케타이드 계열의 천연물은 의약적으로 가장 중요한 미생물 2차 대사산물 중의 하나로 항생제 (테트라사이클린, 에리스로마이신 A, 리파마이신 S), 항암제 (다우노루비신, 에포티론), 콜레스테롤 저하제 (로바스타틴), 구충제 (에버멕틴), 항균제 (엠포테라신 B), 살충제 (스피노신 A), 면역억제제 (라파마이신, FK506)이 여기에 속한다 (Staunton and Weissman 2001;Shen 2003).
- [5] 폴리케타이드는 폴리케타이드신타아제 (PKS)에 의해 여러 번의 간단한 카복시산의 축합반응에 의해 생합성되며 이 과정은 지방산의 생합성 과정과 유사하다 (Shen 2003;Muller 2004). 타입I-폴리케타이드는 여러 개의 효소 활성이 하나의 단백질에 포함되어 있는 거대한 다기능 효소인 타입I-PKS에 의해 생합성되며, 이러한 PKS 복합체는 연속적 축합반응에 관여하는 여러 개의 모듈로 구성되어 있다 (Gokhale, Tsuji et al. 1999;Muller 2004). 각각의 모듈은 카복시산의 축합 반응에 직접 관여하는 아실전이효소 (AT), 아실운반단백질 (ACP) 및 β -케토아실신타아제 (KS) 도메인과 축합반응의 결과로 생성되는 β -케톤기의 환원에 관여하는 케톤기환원효소 (KR), 탈수효소 (DH) 및 엔오일환원효소 (ER) 도메인들로 구성되어 있다 (Kennedy, Auclair et al. 1999). 따라서 각 모듈의 AT 도메인 특성에 따라 각 축합 반응에 사용되는 익스텐션 유닛인 카복시산의 종류가 다양하게 결정되며, 각 모듈에서의 환원 도메인 (KR, DH, ER)의 존재 여부에 따라 축합 반응의 결과로 생성되는 β -케톤기의 환원 정도가 다르고, 전체 모듈의 수에 따라 폴리케타이드 사슬의 길이가 결정된다 (Donadio and Katz 1992;MacNeil, Occi et al. 1992;Aparicio, Molnar et al. 1996). 즉, 각각의 모듈과 도메인의 조합에 따라 다양한 구조의 폴리케타이드가 생합성 될 수 있다. 이러한 측면에서 PKS는 NRPS (라이보솜에서 합성되지 않은 펩타이드 생합성 효소)와 더불어 조합생합성의 중요한 연구 대상이 되고 있다 (Cortes, Wiesmann et al. 1995;Hutchinson and Fujii 1995;Oliynyk, Brown et al. 1996;Jacobsen, Hutchinson et al. 1997;Katz 1997;McDaniel, Thamchaipenet et al. 1999;Menzella, Reid et al. 2005).
- [6] 해양미생물 하헬라 제주엔시스는 독특한 17-멤버드마크로사이클 구조를 가진 폴리케타이드 제주엔올라이드를 생합성 한다. 제주엔올라이드의 생합성 과정에 기여하는 효소와 효소를 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 조합생합성을 위한 기구로서 신물질 개발에 응용한다면, 폴리케타이드 계열의 항생물질의 연구에 새로운 방향을 제시할 수 있는 가능성이 크다.
- [7] 본 발명의 배경이 되는 기술로는 대한민국 등록특허 10-0661175(2006.12.22)에 프로디지오신을 함유하는 살조제제 및 프로디지오신 생합성유전자 클러스터가 개시되어 있고, 일본 특허공개공보 JP P2006-296419A (2006.11.02.)에 유전자

파괴에 의한 항생물질 생산 미생물의 생산방법 및 이를 이용한 항생물질 생산미생물, 및 항생물질 대사 중간체의 생산방법이 개시되어 있고, (Wnashi Y. and Arakawa K. (2006) Method for producing antibiotic-producing microorganism by gene disruption and the resultant antibiotic-producing microorganism and method for producing antibiotic metabolic intermediate.), 또한, 미국 특허등록 제04914206 (1900.04.03.)에는 란카사이딘 유도체 및 이들의 생산방법에 대해 개시되어 있다 (Minamida. I. and Hashimoto N. (1993) Lankacidin derivatives and production thereof. JP62240687(19871021), US04914206 (19900403), CN1014050 (19930620), EP00226896(19930915)). 그러나, 제주엔올라이드를 생합성 하는 데 필요한 분리된 유전자 클러스터 및 이에 의해 코딩되는 효소의 기능에 대해 알려진 바는 없다.

- [8] [선행기술문헌]
- [9] [특허문헌]
- [10] 대한민국 등록특허 10-0661175(2006.12.22)
- [11] 일본 특허공개공보 JP P2006-296419A (2006.11.02.)
- [12] 미국 특허등록 제04914206 (1900.04.03.)
- [13] [비특허문헌]
- [14] Arakawa, K., F. Sugino, et al. (2005). "Cyclization mechanism for the synthesis of macrocyclic antibiotic lankacidin in *Streptomyces rochei*." *Chem.Biol.*12(2): 249-256.
- [15] Choi, Y. H., J. H. Sohn, et al. (2008). "Chejuenolides A and B, new macrocyclic tetraenes from the marine bacterium *Hahella chejuensis*." *TetrahedronLett.*49(50): 7128-7131.
- [16] Dickschat, J. S., O. Vergnolle, et al. (2011). "An Additional Dehydratase-Like Activity is Required for Lankacidin Antibiotic Biosynthesis." *ChemBioChem*12(16): 2408-2412.
- [17] Seo, C. and H. Oh (2009). "Chejuenolide C: A New Macrocyclic Metabolite from the Marine Bacterium *Hahella chejuensis*." *Bull.KoreanChem.Soc.*30(5): 1181-1183.
- [18] Tatsuno, S., K. Arakawa, et al. (2007). "Analysis of modular-iterative mixed biosynthesis of lankacidin by heterologous expression and gene fusion." *J.Antibiot.*60(11): 700-708.
- [19] Tatsuno, S., K. Arakawa, et al. (2009). "Extensive mutational analysis of modular-iterative mixed polyketide biosynthesis of lankacidin in *Streptomyces rochei*." *Biosci.Biotechnol.Biochem.*73(12): 2712-2719.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 본 발명자들은 해양 미생물 하헬라 제주엔시스(*Hahella chejuensis*)의 제주엔올라이드 생합성 유전자를 클로닝하고 이의 염기서열을 확인함으로써 본 발명을 완성하게

되었다.

- [21] 따라서 본 발명의 주된 목적은 하헬라 제주엔시스에의 제주엔올라이드 생합성에 관여하는 각각의 단백질을 코딩하는 유전자의 염기서열을 제공하는 데 있다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은 상기 염기서열 중 하나 이상의 유전자를 결실시키나 불활성화시킨 변이주를 이용하여 제주엔올라이드 변이체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [23] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

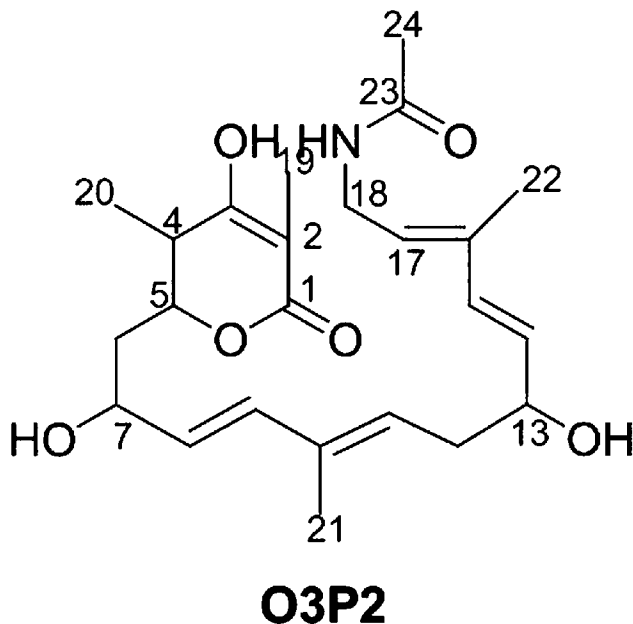
과제 해결 수단

- [24] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 분리된 제주엔올라이드의 생합성 유전자 클러스터를 제공한다.
- [25] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 상기 유전자 클러스터에 의해 코딩되는 서열번호 2 ~ 서열번호 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 제공한다.
- [26] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2 ~ 서열번호 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자를 제공한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 아래와 같이 구성된 그룹에서 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 유전자:
 - [28] (a) 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 서열번호 13의 아미노산 서열로 표시되는 폴리케타이드 합성 모듈 단백질;
 - [29] (b) 서열번호 9의 아미노산 서열로 표시되는 아민옥시다아제;
 - [30] (c) 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5, 서열번호 19, 서열번호, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 또는 서열번호 23의 아미노산 서열로 표시되는 ABC 트랜스포터 막투과효소, 막관통단백질, ABC 트랜스포터 주변세포질 단백질, 또는 ABC 트랜스포터 ATP 분해효소;
 - [31] (d) 서열번호 14 또는 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시되는 전사조절효소; 또는
 - [32] (e) 서열번호 8, 서열번호 15, 서열번호 24 또는 서열번호 25의 아미노산 서열로 표시되는 아이소코리스마타아제, 할로산 탈할로겐효소, 아미노펩티다아제, 또는 NADPH-퀴논 환원효소를 제공한다.
- [33]
- [34] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자들 중 하나의 유전자를 함유하는 벡터를 제공한다.
- [35] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다.
- [36] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 제주엔올라이드의 제조방법을 제공한다.
- [37] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 게놈 내에 서열번호 1의

제주엔올라이드 생합성 유전자를 포함하며, 서열번호 2 ~ 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 유전자들 중 하나 이상이 파괴된 제주엔올라이드 또는 그 전구체 생산 형질전환 미생물을 제공한다.

[38] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 제주엔올라이드 전구체 O3P2를 제공한다.

[39] 화학식 1



[40]

[41] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 아민옥시다아제를 코딩하는 20900-19482 영역(orf3)을 삭제하거나 불활성시킨 하헬라 제주엔시스 변이균주를 배양하는 단계를 포함하는 제주엔올라이드의 전구체의 제조방법을 제공한다.

[42]

[43] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[44] 본 발명은 제주엔올라이드를 생합성 하는데 필요한 한 세트의 단리된 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 한 형태에서, 핵산 분자는 하헬라 제주엔시스 중 MB-1084로부터 단리된 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터를 나타내고, 제주엔올라이드 형성에 필요한 효소를 코딩하는 26개의 ORF (Open Reading Frame)로 구성되는 인접한 DNA 서열 (서열번호 1)로부터 선택된다(도 1 참조). 상기 26개 ORF에 의해 코딩되는 효소의 아미노산 서열이 서열번호 2 ~ 27에서 제공된다.

[45] 따라서, 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 분리된 제주엔올라이드의 생합성 유전자 클러스터를 제공한다.

[46] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 상기 유전자 클러스터에 의해 코딩되는

- 서열번호 2 ~ 서열번호 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 제공한다.
- [47] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2 ~ 서열번호 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자를 제공한다.
- [48] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 아래와 같이 구성된 그룹에서 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 유전자:
- [49] (a) 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 서열번호 13의 아미노산 서열로 표시되는 폴리케타이드 합성 모듈 단백질;
- [50] (b) 서열번호 9의 아미노산 서열로 표시되는 아민옥시다아제;
- [51] (c) 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 또는 서열번호 23의 아미노산 서열로 표시되는 ABC 트랜스포터 막투과효소, 막관통단백질, ABC 트랜스포터 주변세포질 단백질, 또는 ABC 트랜스포터 ATP 분해효소;
- [52] (d) 서열번호 14 또는 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시되는 전사조절효소; 또는
- [53] (e) 서열번호 8, 서열번호 15, 서열번호 24 또는 서열번호 25의 아미노산 서열로 표시되는 아이소코리스마타아제, 할로산 탈할로젠효소, 아미노펩티다아제, 또는 NADPH-퀴논 환원효소를 제공한다.
- [54] 한 실시양태에 의하면, 상기 그룹 (a)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 11776-8576 영역(orfA), 서열번호 1의 18803-11766 영역(orf1), 서열번호 1의 21800-20919 영역(orf4), 서열번호 1의 27598-21863 영역(orf5), 서열번호 1의 28462-27605 영역(orf6), 및 서열번호 1의 33473-28431 영역(orf7)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [55] 상기 그룹 (b)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 20900-19482 영역(orf3)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [56] 상기 그룹 (c)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 8507-7212 영역(orfB), 서열번호 1의 6300-2431 영역(orfC), 서열번호 1의 2082- 1327 영역(orfD), 서열번호 1의 1071-307 영역(orfE), 서열번호 1의 39788-41404 영역(orf13), 서열번호 1의 41488-42408 영역(orf14), 서열번호 1의 42517-43350 영역(orf15), 서열번호 1의 43445-44410 영역(orf16), 및 서열번호 1의 44435-45430 영역(orf17)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [57] 상기 그룹 (d)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 34641-35405 영역(orf8), 및 서열번호 1의 48357-49250 영역(orf20)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [58] 상기 그룹 (e)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 19469-18915 영역(orf2), 서열번호 1의 36205-35576영역 (orf9), 서열번호 1의 45557-47344 영역(orf18), 및 서열번호 1의 48233-47682 영역(orf19)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [59] 한 실시양태에서, 본 발명의 분리된 핵산은 제주엔올라이드의 폴리케타이드

사슬을 생합성 하는데 필요한 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열 2에서 27)로부터 선택되는 ORF의 조합을 포함한다.

- [60] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 제주엔올라이드의 폴리케타이드 사슬을 신장할 때 필요한 효소를 코딩하는 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27)로부터 선택되는 ORF의 조합을 포함한다.
- [61] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 핵산은, 제주엔올라이드의 폴리케타이드 사슬의 신장을 종결시키고 사이클라이제이션 (cyclization) 하는데 필요한 효소를 코딩하는 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27)로부터 선택되는 ORF의 조합을 포함한다.
- [62] 또 다른 실시양태에 따라, 제주엔올라이드의 외부수송 및 제주엔올라이드에 대한 내성에 필요한 효소를 코딩하는 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27)로부터 선택되는 ORF의 조합을 포함한다.
- [63] 또 다른 실시양태에서, 제주엔올라이드의 생합성 효소의 발현을 조절하는데 필요한 효소를 코딩하는 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27)로부터 선택되는 ORF의 조합을 포함한다.
- [64] 또 다른 실시양태에서, orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27)로부터 선택되는 ORF의 발현 수준을 증진시키는, 서열번호 1로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 세그먼트를 포함하는 핵산이 제공된다.
- [65] 본 발명자들은 제주엔올라이드 생합성에 관여하는 효소를 코딩하는 핵산염기서열을 제공하는 본 발명은 또한, 그러한 효소로부터 유도되는 단편을 코딩하는 핵산염기도 제공한다는 것을 이해한다. 부가적으로, 본 발명자들은 유전 코드가 퇴화됨에 따라, 서열번호 2에서 27에 특정된 동일한 효소가 orfA에서 E 및 1에서 21의 천연 또는 인공 변종체, 즉 동일한 효소를 코딩하지만 orfA에서 E 및 1에서 21에 의해 특정된 계놈의 핵산염기서열은 아닌 핵산염기서열에 의해 코딩될 수 있다는 것을 이해한다. 또한, 서열번호 2 내지 27에 특정된 효소의 자연 발생되거나 인공적으로 제조된 변종체로서, 상기 원래의 효소와 동일한 기능(들)을 가지나, 폴딩 (folding) 또는 기능에 필수적이지 않은 아미노산의 첨가, 결실 또는 치환, 또는 필수 아미노산의 보존적 치환을 포함하는 변종체가 발생할 수 있다는 것을 이해한다.
- [66] 본 발명자들은 또한, 제주엔올라이드 생합성에 필요한 전체 클러스터의 핵산염기서열을 제공하는 본 발명은 또한 상기 클러스터에 존재하는 유전자의 발현에 필요한 핵산염기서열도 제공한다는 것을 이해한다. 그러한 조절 서열은 비제한적으로, 프로모터 (promoter) 및 인핸서 (enhancer) 서열, 안티센스 (antisense) 서열, 전사 종결자 (terminator) 및 반종결자 (semi-terminator) 서열을 포함한다. 이 서열은 제주엔올라이드 유전자 클러스터에 존재하는 유전자의 발현을 조절하는데 유용하다. 단독이거나 다른 뉴클레오티드 서열에 융합된 상기 뉴클레오티드 서열을 가지고 있는 세포도 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다.

- [67] 또한, 본 발명은 폴리케타이드 사슬을 축합반응을 통해 신장시키고 신장된 사슬을 가수분해 또는 사이클라이제이션 과정을 통해 방출하는 케토신타아제-아실운반단백질-티오에스터라아제 (KS-ACP-TE) 도메인들을 포함하는 폴리케타이드 합성모듈을 코딩하는 orfA (서열번호 6), 또는 폴리케타이드 사슬을 축합반응을 통해 신장시키고 신장된 사슬의 β -케톤을 환원시키는 케톤기환원효소-케토신타아제-아실운반단백질 (KR-KS-ACP) 도메인들 2쌍을 가지는 폴리케타이드 합성모듈을 코딩하는 orf1 (서열번호 7), 또한 본 발명은 아이소코리스메이트를 가수분해하여 2,3-다이하이드록시-2,3-다이하이드로벤조에이트로 축매하는 효소인 아이소코리스마타아제를 코딩하는 orf2 (서열번호 8), 또한 본 발명은 아민기를 산화시키는 아민옥시다아제를 코딩하는 orf3 (서열번호 9), 또한 본 발명은 폴리케타이드의 신장하는데 필요한 말로닐-코엔자임에이 (malonyl-CoA)을 제공하는 아실전이효소 (AT) 도메인 하나를 가지는 폴리케타이드 합성모듈을 코딩하는 orf4 (서열번호 10), 또는 폴리케타이드 사슬을 축합하고 축합된 사슬을 환원시키고 메티오닌에서 유래한 메틸 한분자를 사슬에 부가하는 케톤기환원효소-메틸기전이효소-아실운반단백질1-아실운반단백질2-케토신타아제 (KR-MT-ACP1-ACP2-KS) 도메인들을 가지는 폴리케타이드 합성모듈을 코딩하는 orf5 (서열번호 11), 또는 폴리케타이드의 신장 과정에서 β -수산화 (β -hydroxy)로부터 한분자의 물을 제거하여 α -, β - 탄소 사이에 이중결합을 생성시키는데 유용한 탈수효소 (DH, dehydratase) 도메인 하나를 가지는 폴리케타이드 합성모듈을 코딩하는 orf6 (서열번호 12), 또는 폴리케타이드 생합성에서 글라이신 한분자를 말로닐-코엔자임에이 한 분자와 축합시키는 축합효소-아데닐화효소-펩티딜전이효소-케토신타아제 (C-A-PCP-KS) 도메인들을 코딩하는 NRPS-PKS 하이브리드 모듈을 코딩하는 orf7 (서열번호 13), 또는 상기 효소의 천연 발생 변종체 또는 유도체를 코딩하는 핵산염기서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [68] 또한, 본 발명은 제주엔올라이드 또는 제주엔올라이드 전구체의 세포로부터의 외수출 및 내성 부여에 유용한 orfB에서 E 및 13에서 17 (서열번호 2에서 5 및 19에서 23)에 의해 코딩되는 효소, 제주엔올라이드 제조 중에 생합성 및 내성 유전자의 발현을 직접적으로 또는 간접적으로 가능하게 하거나 활성화하는 orf8 및 20 (서열번호 14 및 26)에 의해 코딩되는 효소, 제주엔올라이드의 생합성 과정에 간접적으로 관여할 것으로 여겨지는 orf9, 18 및 19 (서열번호 15, 24 및 25)에 의해 코딩되는 효소 또는 상기 효소의 천연 발생 또는 인공 발생 변종체 또는 유도체를 코딩하는 핵산염기서열을 포함하는 핵산을 제공한다.
- [69]
- [70] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자를 함유하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 미생물, 및 상기 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 제주엔올라이드의 제조방법을 제공한다.

- [71] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 게놈 내에 서열번호 1의 제주엔올라이드 생합성 유전자를 포함하며, 서열번호 2 ~ 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 유전자들 중 하나 이상이 파괴된 제주엔올라이드 또는 그 전구체 생산 형질전환 미생물을 제공한다. 바람직하게 상기 미생물은 서열번호 1의 염기서열 중 아민옥시다아제를 코딩하는 유전자가 파괴된 변이균주 하헬라 제주엔시스 O3KO (국제기탁번호 KCTC 12315BP; 국내기탁번호 KACC91712P)이다.
- [72] 한 실시양태에서, 본 발명은 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27) 중 임의의 것으로부터 선택된 하나 이상의 ORF를 특징하는 핵산염기서열의 여분 카피(extra copy)를 가지고 있는 제주엔올라이드 생산 균주를 제공할 수 있다.
- [73] 한 바람직한 실시양태에서, 그러한 제주엔올라이드 생산 균주는 오서노스피리탈레스 (Oceanospirillales) 목에 속하는 임의의 균주이다. 다른 한 바람직한 실시양태에서, 그러한 제주엔올라이드 생산 균주는 하헬라 (Hahella) 속의 한 원이다. 한 추가적 측면에서, 본 발명은 orfA에서 E 및 1에서 21 (서열번호 2에서 27) 중 하나 이상의 증가 또는 감소된 발현을 초래하는, 서열번호 1에 특정된 핵산염기서열에서의 하나 이상의 변형을 갖는 하헬라 균주를 제공한다.
- [74] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 제주엔올라이드, 그의 전구체 중 하나 이상 또는 또 다른 세포에 의한 그의 유도체의 제조에 유용한, 하나 이상의 벡터에 가지고 있는 서열번호 1에 의해 특정된 핵산염기서열 또는 그의 일부분을 포함하는 핵산을 제공한다. 한 바람직한 실시양태에서, 상기 핵산염기서열 또는 그의 부분은 단일 벡터에 가지게 된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 그러한 벡터는 세균 인공 염색체이다.
- [75]
- [76] 또한 본 발명은 상기의 26개의 ORF 중 폴리케타이드합성효소 클러스터의 말단에 위치하는 티오에스터라아제 도메인을 가지고 있는 orfA와, 그리고 막투과효소를 코딩하는 유전자 orfB와, orfB의 다운스트림 (downstream) 유전자인 orfC와 orfD, 그리고 폴리케타이드/펩타이드하이드라이드합성모듈을 코딩하는 유전자인 orf7의 업스트림 (upstream) 유전자인 orf8과 orf9와 orf19, 그리고 제주엔올라이드의 골격을 형성하는 PKS 관련 유전자 클러스터 내부에 동반된 유전자인 orf2와 orf3의 넥아웃카세트와 넥아웃 벡터를 제공한다.
- [77] 상세하게는 폴리케타이드합성효소 클러스터의 말단에 위치하는 orfA로 명기된 폴리케타이드합성모듈 중 티오에스터라아제 도메인과, 그리고 폴리케타이드합성효소 클러스터의 다운스트림에 위치하는 orfB로 명기된 막투과효소와, 그리고 orfC로 명기된 막관통단백질과, 그리고 폴리케타이드합성효소 클러스터의 내부에 위치하는 orf2로 명기된 아이소코리스마타아제와, 그리고 orf3으로 명기된 아민옥시다아제와, 그리고 폴리케타이드합성효소 클러스터의 업스트림에 위치하는 orf8로 명기된

전사조절효소와, 그리고 orf9로 명기된 할로산탈할로젠효소와, 그리고 orf19로 명기된 NADPH-퀴논환원효소가 각각 항생제 아프라마이신 내성 유전자로 치환된 DNA 녀아웃카세트 여러 쌍을 제공한다 (표 2 참조). 상기한 유전자의 시작 코돈과 종결 코돈 바로 전후의 핵산 염기 서열이 36개씩 테일링 (tailing)된 PCR 프라이머 (primer)를 각각 제작하여 항생제 내성 유전자와 OriT (origin of transfer) 유전자로 구성된 아프라마이신 저항성 유전자 카세트를 증폭하였다 (도 2). 증폭된 DNA 단편은 녀아웃카세트로서 역할을 한다. 상기 녀아웃카세트를 이용하여 항생제 저항성 유전자와 ORF가 선택적으로 치환된 녀아웃벡터가 제작되었다 (도 2). 이를 위해 PCR 타겟팅 기술 (Gust, Challis et al. 2003)을 사용하였으나, 다양한 기술이 적용될 수 있다.

[78] 본 발명은 상기 티오에스터라아제 도메인 또는 막투과효소 또는 막관통단백질 또는 아이소코리스마타아제 또는 아민옥시다아제 또는 전사조절자 또는 탈할로젠화효소 또는 NADPH-퀴논리덕타제 유전자 각각의 녀아웃카세트를 제공한다.

[79] 구체적인 실시태양에서 본 발명은 상기 녀아웃카세트로 제작된 전사조절자 또는 탈할로젠효소 또는 NADPH-퀴논리덕타제 또는 아이소코리스마타아제 또는 아민옥시다아제 유전자가 항생제 저항성 유전자로 치환된 각각의 pBG6E11 유래의 녀아웃벡터와, 티오에스터라아제 또는 막투과효소 또는 막관통단백질 유전자가 항생제 저항성 유전자로 치환된 pBG19A6 유래의 녀아웃벡터를 제공한다.

[80] 또한 본 발명은 상기 녀아웃벡터들을 사용하여 대장균과 이중 세균 간의 접합 방법으로 형질전환된 티오에스터라아제 도메인 또는 막투과효소 또는 막관통단백질 또는 아이소코리스마타아제 또는 아민옥시다아제 또는 전사조절자 또는 탈할로젠화효소 또는 NADPH-퀴논리덕타제가 파괴된 유전자 변이균주들을 제공한다 (도 2).

[81] 본 발명의 녀아웃벡터를 이용하여 하헬라 제주엔시스를 형질전환시키면 녀아웃벡터 내에 항생제 저항성 유전자로 치환된 ORF 전후의 염기서열이 염색체 DNA의 염기서열이 동일하기 때문에 상동재조합현상이 유도된다. 상기 상동 재조합 과정을 통해 ORF가 선택적으로 파괴된 변이균주가 제조된다 (도 2).

[82]

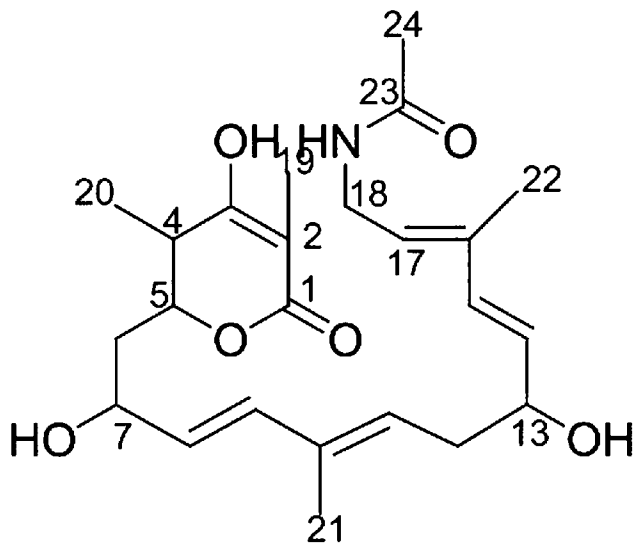
[83] 본 발명자들은 액체-액체 크로마토그래피 기법을 사용하여 하헬라 제주엔시스 변이 균주로부터 2차대사산물을 추출하였고, 최종적으로 HPLC와 MS를 이용하여 파괴된 유전자 및 효소가 제주엔올라이드 생합성에 미치는 영향을 조사했다.

[84] 일련의 과정을 통해 제작된 변이균주 중 아민옥시다아제가 파괴된 하헬라 제주엔시스 변이균주 O3KO가 균주기탁되었고 (국제기탁번호 KCTC 12315BP; 국내기탁번호 KACC91712P), 상기 변이균주 O3KO가 생산하는 것은 하기 화학식 1로 표시되는 제주엔올라이드 전구체인 선형 폴리케타이드 O3P2

(화학식 C₂₄H₃₅NO₆)이다.

[85] [화학식 1]

[86]



O3P2

[87]

[88] 나아가 본 발명은 상기 유전자 변이균주의 제조방법과 변이균주로부터 선형 폴리케타이드를 생산하는 방법과 생산된 선형 폴리케타이드를 제공한다.

[89] 보다 구체적으로 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 중 아민옥시다아제를 코딩하는 20900-19482 영역(orf3)을 삭제하거나 불활성시킨 하헬라 제주엔시스 변이균주를 배양하는 단계를 포함하는 제주엔올라이드의 전구체의 제조방법을 제공한다 (Gust, B., G. L. Challis, et al. (2003). "PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(4): 1541.)

[90]

[91] 가. 하헬라 제주엔시스로부터의 제주엔올라이드 생합성 유전자

[92] 제주엔올라이드는 해양미생물 하헬라 제주엔시스 MB-1084에 의해 생산되는 폴리케타이드 마크로라이드 계의 천연대사물이다. 본 발명은 제주엔올라이드의 생합성을 위한 유전자 클러스터의 핵산 서열 및 효소를 제공한다. 인접한 DNA 서열과 함께, 제주엔올라이드 유전자 클러스터의 물리적 조직이 도 1에 나와 있으며, 도 1은 하헬라 제주엔시스의 염색체 DNA로부터의 51.4kb의 핵산분자의 물리적 지도 및 그러한 세그먼트를 특징하는 한 세트의 포스미드를 도시한다. 제주엔올라이드 생합성을 지배하는 DNA 세그먼트의 유전 조직이 도 1에 나와 있고, 이의 핵산염기서열은 서열번호 1로 기재되어 있다.

[93] 클러스터의 정확한 경계는 다른 폴리케타이드 생합성 유전자 클러스터와의 비교, 상세하게는 다른 17-멤버드카보사이클릭테트라엔 (17-membered

carbocyclic tetraene) 항생제 란카사이딘 (lankacidin) 생합성 유전자 클러스터와의 비교 및 그의 유전자 산물의 기능으로부터 구축될 수 있다. 그러므로 좌측 끝 (도 1)에서, 제주엔올라이드 클러스터는 서열번호 1의 핵산염기서열 1071에서 307의 폭을 가지는 아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질을 코딩하는 유전자 orfE (서열번호 2)의 의해 구분된다. 우측에서는, 제주엔올라이드 클러스터는 서열번호 1의 핵산염기서열 49530에서 50609의 폭을 가지는 기능이 알려지지 않은 ORF의 나머지에 의해 구분된다. 제주엔올라이드 클러스터는 대략 51,400여개의 염기쌍의 폭을 가지고, orfA에서 E 및 1에서 21으로 표시되는 26개 ORF를 포함한다.

- [94] 서열번호 1의 핵산염기서열은 서열번호 2에서 27에 열거된 26개의 효소를 코딩한다. orfE (서열번호 2)는 상보적 나선 상의 핵산염기서열 1071에서 307을 번역함으로써 유래된 254개의 아미노산을 나타낸다. orfD (서열번호 3)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 2082에서 1327을 번역함으로써 유래된 251개의 아미노산을 나타낸다. orfC (서열번호 4)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 6300에서 2431을 번역함으로써 유래된 1269개 아미노산을 나타낸다. orfB (서열번호 5)는 상보적 나선 상의 핵산염기서열 8507에서 7212를 번역함으로써 유래된 431개의 아미노산을 나타낸다. orfA (서열번호 6)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 11776에서 8576을 번역함으로써 유래된 1066개의 아미노산을 나타낸다. orf1 (서열번호 7)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 18803에서 11766을 번역함으로써 유래된 2345개의 아미노산을 나타낸다. orf2 (서열번호 8)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 19469에서 18915를 번역함으로써 유래된 184개 아미노산을 나타낸다. orf3 (서열번호 9)는 상보적 나선 상의 핵산염기서열 20900에서 19482를 번역함으로써 유래된 472개의 아미노산을 나타낸다. orf4 (서열번호 10)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 21800에서 20919를 번역함으로써 유래된 293개의 아미노산을 나타낸다. orf5 (서열번호 11)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 27598에서 21863을 번역함으로써 유래된 1911개의 아미노산을 나타낸다. orf6 (서열번호 12)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 28462에서 27605을 번역함으로써 유래된 285개의 아미노산을 나타낸다. orf7 (서열번호 13)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 33473에서 28431을 번역함으로써 유래된 1680개의 아미노산을 나타낸다. orf8 (서열번호 14)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 34641에서 35405을 번역함으로써 유래된 254개의 아미노산을 나타낸다. orf9 (서열번호 15)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 36205에서 35576을 번역함으로써 유래된 209개의 아미노산을 나타낸다. orf10 (서열번호 16)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 37230에서 36787을 번역함으로써 유래된 147개의 아미노산을 나타낸다. orf11 (서열번호 17)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 38496에서 38020을 번역함으로써 유래된 158개의 아미노산을 나타낸다. orf12 (서열번호 18)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 38963에서

38583을 번역함으로써 유래된 126개의 아미노산을 나타낸다. orf13 (서열번호 19)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 39788에서 41404를 번역함으로써 유래된 538개의 아미노산을 나타낸다. orf14 (서열번호 20)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 41488에서 42408을 번역함으로써 유래된 306개의 아미노산을 나타낸다. orf15 (서열번호 21)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 42517에서 43350을 번역함으로써 유래된 277개의 아미노산을 나타낸다. orf16 (서열번호 22)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 43445에서 44410을 번역함으로써 유래된 321개의 아미노산을 나타낸다. orf17 (서열번호 23)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 44435에서 45430을 번역함으로써 유래된 331개의 아미노산을 나타낸다. orf18 (서열번호 24)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 45557에서 47344를 번역함으로써 유래된 595개의 아미노산을 나타낸다. orf19 (서열번호 25)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 48233에서 47682를 번역함으로써 유래된 183개의 아미노산을 나타낸다. orf20 (서열번호 26)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 48357에서 49250을 번역함으로써 유래된 297개의 아미노산을 나타낸다. orf21 (서열번호 27)는 상보적 이중 나선 상의 핵산염기서열 49530에서 50609을 번역함으로써 유래된 359개의 아미노산을 나타낸다.

[95] 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터는 표 1에 요약되어 있다.

[96] 표 1

[Table 1]

제주엔올라이드 클러스터			Lkc 클러스터 ^a		진뱅크 ^b		제인된 기능 ^c		CD ^d
ORF ^e	시작	종	크기 (bp)	유전자	좌	엔드 ^f	오차율 ^g	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orfE	1071	307	765			YP_434645.1	3e-170	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orfD	2082	1327	755			YP_434646.1	2e-174	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orfC	6300	2431	3870			YP_434646.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orfB	8507	7212	1296	orf20	53%	YP_434654.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orfA	11776	8576	3201	LkcG	51%	YP_434655.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf1	18803	11766	7038	LkcF	49%	YP_434656.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf2	19463	18915	555	LkcH	61%	YP_434657.1	6e-131	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf3	20900	19482	1419	LkcE	63%	YP_434658.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf4	21800	20919	882	LkcD	50%	YP_434659.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf5	27598	21863	5736	LkcC	54%	YP_434660.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf6	28462	27605	853	LkcB	50%	YP_434661.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf7	33473	28431	5043	LkcA	49%	YP_434662.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf8	34641	35405	765			YP_869119.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf9	36205	35576	630			YP_3807586.1	2e-70	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf10	37230	36787	444			YP_1518378.1	0.001	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf11	38496	38029	477			YP_434319.1	2e-103	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf12	39363	38583	381			YP_434318.1	2e-77	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf13	39788	41404	1617			YP_434316.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf14	41488	42408	921			YP_434315.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf15	42517	43350	834			YP_434314.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf16	43445	44410	966			YP_434313.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf17	44435	45430	996			YP_434312.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf18	45557	47344	1788			YP_434311.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf19	48253	47682	552			YP_434310.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf20	48357	49259	894			YP_434308.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	
orf21	49530	50609	1080			YP_350605.1	0.0	아미노산 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질	

^a단키지이인 생합성 유전자 클러스터.

^b진뱅크에서의 클러스터 연구에 대한 결과.

^c오른쪽의 클러스터, 아미노산 배열로서 반복되는 핵산염기배열을 가리키는 말임. 즉, 번역 개시 코돈에서 종지 코돈에 이르는 염기배열.

^d이 칼럼은 편카사이인 생합성 유전자 클러스터로부터의 효소의 배치와 서열 동일성 (%)을 보고함.

^e최고 점수를 갖는 진뱅크 엔트리의 등록 번호.

^f클러스터 연구로부터 수득된 오차율을 정수.

^g단키지이인 클러스터 및 진뱅크에서의 클러스터 연구로부터의 조합된 결과를 기초로 한 제주엔올라이드 유전자 클러스터의 제안 기능.

^h클러스터 연구에 의해 보고된 보존 도메인

[97]

[98]

실제로, 폴리케타이드 사슬을 중합하는데 관련된 폴리케타이드합성효소 (PKS)를 코딩하는 유전자는 24.9-kb 세그먼트에 의해 분리 전사된 영역으로서 조직화된다고 (도 1). 이는 PKS 유전자 모듈들이 조밀한 지역에 집중되어 있다는 것을 의미하며, 이것은 PKS나 NRPS 생합성에서 필요한 대부분의 유전자들이

클러스터를 이룬다는 일반론과도 합치한다.

- [99] 다른 알려진 타입1 폴리케타이드 생합성 효소와 달리 제주엔올라이드 클러스터의 모든 PKS의 모듈은 아실전이효소 (AT) 도메인과 탈수효소 (DH) 도메인을 orf4 (서열번호 10)과 orf6 (서열번호 12)의 각각 독립된 ORF로 코딩하고 있다. 또한 orf7 (서열번호 13)이 코딩하는 PKS 모듈은 NPRS의 축합 도메인 (C), 아데닐리에이션 도메인 (A) 및 펩타이드운반효소 (PCP)와 하이브리드되어 있다.
- [100] 이러한 특징은 다른 알려진 17-멤버드카보사이클릭테트라엔 생합성 클러스터에서도 나타나는데, 대표적으로 란카사이딘의 생합성 유전자 클러스터는 제주엔올라이드의 생합성 유전자 클러스터의 PKS 모듈과 그 모듈을 구성하는 도메인의 구성과 배치가 비슷하고, PKS 유전자 모듈을 구성하는 아미노산 염기서열이 49-63% 유사성을 나타낸다는 점에서 닮아 있다. 그러나 란카사이딘과 달리 제주엔올라이드의 아이소코리스마타아제를 코딩하는 orf2 (서열번호 8)의 클러스터 상의 위치가 란카사이딘 클러스터의 아이소코리스마타아제를 코딩하는 LkcH와 차이를 나타낸다는 점에서 상이하며, 실질적으로 생합성되는 란카사이딘과 제주엔올라이드는 티오에스터라아제에 의해서 형성된 에스테르 결합으로 연결된 6-멤버드- δ -락톤링이 결여되어 있다는 점과 3번 탄소에 2-하이드록시프로판아마이드 사슬 대신에 아세틸아마이드 사슬을 가진다는 점에서 구조적으로 많은 차이를 나타낸다 (Arakawa et al. 2007; Choi, Sohn et al. 2008).
- [101] 결론적으로, 본원에 기재한 제주엔올라이드 클러스터의 유전 조직은 다른 폴리케타이드 마크로라이드 합성에 관여하는 다른 클러스터의 조직과 구별되며, 이와 유사한 구조를 나타내는 란카사이딘 클러스터와 구성과 내용면에서 실질적으로 상이하다. 그러므로 본 발명에 의한 유전자 클러스트는 새로운 유전 조직을 갖는 클러스터의 첫 번째 예를 나타낸다.
- [102]
- [103] 나. 제주엔올라이드 생합성 유전자의 역할
- [104] 본 발명은 특히 하헬라 제주엔시스 MB-1084의 17-멤버드카보사이클릭테트라엔 폴리케타이드 전구체 합성을 초래하는 PKS를 코딩하는 DNA 서열을 개시한다. 제주엔올라이드의 PKS는 각기 1개 및 2개 모듈을 함유하는 6개의 효소로 구성된다. 이는 orfA, orf1, orf4, orf5, orf6, orf7 (서열번호 6, 7, 10, 11, 12, 13)로 표시된다. PKS에 의한 폴리케타이드 합성이, 로딩 모듈 후에 일련의 신장 모듈이 이어지는 모듈적 시스템에 의해 수행된다.
- [105] 일반적으로 PKS의 로딩 모듈은 아실전이효소 (AT)와 아실운반단백질 (ACP)로 구성된다. 각 모듈은 케토신타아제 (KS), AT, ACP 그리고 신장되는 폴리케타이드 사슬의 β -케톤기를 변화시키는 효소 도메인인 케톤기환원효소 (KR), 탈수효소 (DH) 및 메틸전이효소 (MT)로 구성된다. 마지막 모듈은 완성된

폴리케타이드 사슬을 PKS에서 분리시켜 신장을 종료하는 티오에스터라아제 (TE) 도메인을 포함한다.

- [106] 제주엔올라이드의 PKS는 총 5개의 KS 도메인, 5개의 ACP 도메인, 3개의 KR 도메인, 1개의 DH 도메인, 1개의 AT 도메인, 1개의 MT 도메인 및 1개의 C 도메인과 1개의 A 도메인과 1개의 PCP 도메인에 대한 6개의 모듈로 구성된다. 구체적으로 orf7 (서열번호 13)은 NRPS-PKS 하이브리드 모듈로 C-A-PCP-KS의 서열을 특징하며, 제주엔올라이드의 로딩 모듈로서 아미노산 한분자를 출발 물질로 제공하며; orf6 (서열번호 12)는 DH 도메인 하나로 구성된 모듈로 신장과정에서 β -탄소의 수산기 하나를 물분자의 형태로 제거하여 α 탄소과 β 탄소 사이에 불포화 결합을 형성하게 하며; orf5 (서열번호 11)는 PKS 신장 모듈로 KR-MT-ACP1-ACP2-KS로 특징하며, 타입 1 PKS로는 드물게 반복적으로 폴리케타이드 사슬을 중합하는데 관여하며; orf4 (서열번호 10)은 AT 도메인 하나로 구성된 모듈로 신장과정에서 필요한 말로네이트를 공급하며; orf3 (서열번호 9)는 아민옥시다아제를 코딩하며 포스트 PKS 과정에서 신장된 사슬의 매크로사이클라이제이션에 관여하며; orf2 (서열번호 8)는 아이소코리스마타아제를 코딩하며 역시 포스트 PKS 과정에서 역할하는 것으로 추측되며; orf1 (서열번호 7)은 PKS 신장 모듈로 KR1-ACP-KS1-KR2-ACP2-KS2로 특징하며, 축합되는 β -탄소의 케톤기가 수산화기로 환원된 폴리케타이드 사슬을 중합하며; orfA (서열번호 6)는 PKS 신장종료 모듈로 KS-ACP-TE로 특징하며, 가수분해를 통해 모듈로부터 신장된 사슬을 분리한다.

- [107] 제주엔올라이드 클러스터에 존재하는 다른 유전자는 신규 대사산물을 합성하는데 유용한 신규 유전 요소를 나타낸다. 이들 중에서 orf3 (서열번호 9)는 아민의 산화작용에 관여하는 효소인 아민옥시다아제를 코딩하며, 제주엔올라이드의 매크로사이클라이제이션 과정에서 중요한 역할을 한다. 이 유전자는 이중성 숙주에서 클로닝되고 발현되어, 제주엔올라이드 전구체와 유사한 특징을 갖는 다른 종류의 폴리케타이드 사슬을 사이클라이제이션 하는데 이용될 수 있다. 대안적으로 orf3은 생산균주내에서 불활성화됨으로써 제주엔올라이드 전구체인 선형 폴리케타이드 사슬을 생성할 수 있다. 이 선형 폴리케타이드는 화학적 수단에 의해 수득될 수 있으나, 화학적으로 개입할 필요없이, 단일발효공정으로 이를 제조하는 것이 바람직할 수 있다.

- [108] 제주엔올라이드 클러스터는 또한 세포질로부터 제주엔올라이드 중간체 또는 최종 생성물을 외수송하거나, 생산자 세포에의 내성 부여를 초래하는 수많은 유전자들을 포함한다. 이 유전자는 orfB에서 E 및 13에서 17 (서열번호 2에서 5 및 19에서 23)을 포함한다. orfB, 14 및 15는 ABC 트랜스포터 막투과효소를 orfC는 막관통단백질을 orfD, E, 13은 ABC 트랜스포터 주변세포질단백질을 orf16, 17은 ABC 트랜스포터 ATP분해효소를 각기 코딩한다. 이 유전자는 또다른 폴리케타이드 생산자 균주에서, 개별적으로 또는 임의의 조합으로 클로닝되어

발현되어, 형성된 생성물의 수율을 증가시킬 수 있다. 대안적으로 이 유전자는 제주엔올라이드 생산균주에서 개별적으로 또는 임의 조합으로 과다발현되어, 제주엔올라이드의 수율을 증가시킬 수 있다.

[109] 제주엔올라이드 클러스터는 또한 제주엔올라이드 제조 중에 생합성 및 내성 유전자의 발현을 직접적으로 또는 간접적으로 가능하게 하거나 활성화하는 여러 조절유전자를 포함한다. 이 유전자는 또한 orf8 및 20 (서열번호 14 및 26)을 포함한다. 이 3개의 유전자는 또다른 폴리카타이드 생산 균주에서 개별적으로 또는 임의의 조합으로 클로닝되어 발현되어, 형성된 생성물의 수율을 증가시킬 수 있다. 대안적으로 이 유전자는 제주엔올라이드 생산균주에서 개별적으로 또는 임의 조합으로 과다발현되어, 제주엔올라이드의 수율을 증가시킬 수 있다.

[110] 제주엔올라이드 클러스터는 또한 제주엔올라이드 생합성에 간접적으로 기여를 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함한다. 이 유전자는 또한 orf2, 9, 18 및 19 (서열번호 8, 15, 24, 25)을 포함한다. orf2는 아이소코리스메이트를 가수분해하여 2,3-다이하이드록시-2,3-다이하이드로벤조에이트로 촉매하는 효소인 아이소코리스마타아제를, orf9는 가수분해과정을 통해 탈할로젠화시키는 할로산탈할로젠효소를, orf18은 아미노산말단펩타이드가수분해효소인 아미노펩티다아제를, orf19는 퀴논을 하이드로퀴논으로 전환하는 NADPH-퀴논 환원효소를 코딩한다. 이 4개의 유전자는 또다른 폴리카타이드 생산 균주에서 개별적으로 또는 임의의 조합으로 클로닝되어 발현되어, 형성된 생성물의 수율을 증가시킬 수 있다. 대안적으로 이 유전자는 제주엔올라이드 생산균주에서 개별적으로 또는 임의 조합으로 과다발현되어, 제주엔올라이드의 수율을 증가시킬 수 있다.

[111]

[112] 다. 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터의 사용

[113] 본 발명은 또한 전체 제주엔올라이드 분자, 그의 전구체 중 임의의 하나 또는 그의 유도체의 발현을 위한 핵산도 제공한다. 그러한 핵산은 제주엔올라이드의 어셈블리를 지시하는데 충분한 폴리카타이드를 코딩하는 ORF를 포함하는 단리된 유전자 클러스터(들)를 포함한다. 한 예에서, 전체 제주엔올라이드 클러스터 (서열번호 1)는 적당한 벡터에 도입되어, 원하는 생산 숙주를 형질전환하는데 사용될 수 있다. 한 측면에서, 이 DNA 세그먼트는 큰 DNA 세그먼트를 다룰 수 있는 적당한 벡터에 도입된다. 그러한 벡터의 예는 비제한적으로 세균 인공 염색체 (BAC) 벡터 또는 분화된 유도체를 포함한다. 또다른 측면에서, 제주엔올라이드 클러스터가 원하는 생산 숙주에서 상용성을 가질 수 있는, 2개의 구별되는 벡터로의 2개의 분리된 세그먼트로서 클로닝된다. 또다른 측면에서, 제주엔올라이드 클러스터는 3개의 세그먼트로 하위 분할되어, 각기 분리된 상용성 벡터에 클로닝될 수 있다. 1-, 2- 또는 3-벡터 시스템의 사용예가 문헌에 기재되었다 (Tatsuno, Arakawa et al. 2007; Tatsuno, Arakawa et al. 2009; Dickschat, Vergnolle et al. 2011). 일단 제주엔올라이드

클러스터가 적당히 하나 이상의 벡터에 클로닝되면, 이것은 천연 숙주에서보다 더욱 효율적으로 제주엔올라이드가 생산될 수 있는 수많은 적당한 생산 숙주에 도입될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는 본 유전자를 효율적으로 발현할 수 있는 종 또는 균주의 숙주 세포이다. 대안적으로, 하나 이상의 적당한 벡터에 클로닝된 제주엔올라이드 클러스터의 두 번째 카피는 제주엔올라이드 생산 균주에 도입될 수 있고, 거기에서 제주엔올라이드 생합성 유전자의 두 번째 카피가 제주엔올라이드의 수율을 증가시키게 된다.

- [114] 잘 특징화된 숙주에 대한 생산 능력의 부여는, 최적화 및 발달을 가져오는 공정의 여러 부분을 실질적으로 향상시킬 수 있다. 즉, 생산 균주에서의 천연 생성물의 적정 농도가 효과적으로 증가될 수 있으며; 천연 생성물의 정제가 가능한 간접활성의 공지된 배경에서 수행될 수 있으며; 착체의 조성이 더욱 효과적으로 조절될 수 있고; 천연 생성물의 변경된 유도체가 발효 조건의 조작을 통해, 또는 경로 공학처리에 의해 더욱 효과적으로 생산될 수 있다.
- [115] 대안적으로, 생합성 유전자 클러스터가 변형되어, 숙주 세포에 삽입되어, 광범위하게 다양한 대사산물들을 합성하거나 화학적으로 변형시키는데 사용될 수 있다. 즉, 예를 들어 개방 해독 프레임이 다시 정렬되고, 변형되어, 다른 항생제 생합성 유전자 클러스터와 조합될 수 있다. 여기에 제공된 정보를 이용하여, 통상적이고 공지된 방법을 이용하여, 제주엔올라이드 핵산의 클로닝 및 발현을 달성할 수 있다.
- [116] 또 다른 가능한 용도로서, 제주엔올라이드 유전자 클러스터로부터 선택된 ORF는 통상적인 분자생물학 기술을 이용하여 단리되어 불활성화될 수 있다. MB-1804 염색체에서 상기 ORF를 플랭킹(flanking)하는 DNA 세그먼트를 포함하는 적당한 벡터에 클로닝된 항생제 마커로 치환된 ORF가 상기 균주에 도입되며, 거기에서 동종성 조합의 2가지 이중 교차 이벤트는 생산자 균주에서 상기 ORF의 불활성화를 초래한다. 이 절차는 효율적인 방식으로 제주엔올라이드의 전구체 또는 유도체를 생산하는데 유용하다.
- [117] 또 다른 가능한 용도로서, 제주엔올라이드 유전자 클러스터로부터 선택된 ORF는 단리되어 바람직한 프로모터의 조절 하에 놓인다. 이어서, 적당한 벡터에 클로닝된, 공학처리된 ORF는, 상기한 바와 같이 원래의 ORF를 대체하거나, 또는 상기 ORF의 부가적 카피로서, 하헬라 제주엔시스에 도입된다. 이 절차는 제주엔올라이드 분자, 그의 전구체 또는 유도체를 생산하는데 중요한 ORF의 발현 수준을 증가 또는 감소시키는데 유용하다.

[118]

[119] 라. 변이 균주의 제조 및 전구체의 생산

[120] 본 발명에 의한 아민옥시다제 유전자가 파괴된 유전자 변이균주의 제조방법 및 그 변이 균주로부터 신규 선행 폴리케타이드를 생산하는 방법은,

- [121] 1) 하헬라 제주엔시스의 염색체 DNA 라이브러리를 포스미드벡터를 이용하여 제작하고, 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터를 포함하는 포스미드

- 클론을 얻는 단계 (단계 1);
- [122] 2) 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터에서 아민옥시다제를 코딩하는 ORF 전후의 염기서열을 포함하는 넥아웃카세트 (항생제 저항성 유전자 카세트)를 제작하는 단계 (단계 2);
- [123] 3) 상기 넥아웃카세트를 이용하여 상기 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터를 포함하는 포스미드에 아민옥시다제 유전자를 항생제 저항성 유전자로 치환하여 넥아웃벡터를 제조하는 단계 (단계 3);
- [124] 4) 상기 넥아웃벡터를 대장균-하헬라 간의 접합을 통해 하헬라 제주엔시스에 도입하는 단계 (단계 4);
- [125] 5) 항생제를 사용하여 상동재조합을 통해 상기 아민옥시다제 유전자가 항생제 저항성 유전자로 치환되어 파괴된 하헬라 제주엔시스 변이균주를 선발하는 단계 (단계 5);
- [126] 6) 상기 선발된 아민옥시다제가 파괴된 변이균주를 조별 액체 배지에서 배양하고 배양여액을 얻는 단계 (단계 6)
- [127] 7) 일련의 크로마토그래피 과정을 거쳐 배양여액으로부터 신규 선행 폴리케타이드를 분리 정제하는 단계 (단계 7)로 구성된다.

[128]

발명의 효과

- [129] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 해양미생물 하헬라 제주엔시스 MB-1084가 생산하는 독특한 17-멤버드마크로사이클테트라엔 구조를 가진 폴리케타이드계 천연물 제주엔올라이드를 생합성하는 유전자 클러스터의 핵산분자와 염기서열이 제공되며, 상기 핵산분자가 코딩하는 유전자 산물 (효소)의 기능이 제시되게 된다.
- [130] 상세하게는, 제주엔올라이드 클러스터의 유전자를 분자생물학적인 방법을 사용해서 선택적으로 파괴하여, 선택된 유전자가 코딩하는 효소가 제주엔올라이드 생합성에 미치는 영향이 제시되고, 상기 유전자를 파괴하는 넥아웃카세트와 넥아웃벡터가 제공되며, 상기 넥아웃벡터로 제조된 변이 균주 그리고 변이 균주가 생산하는 제주엔올라이드 전구물질이 제시된다.
- [131] 더 나아가서, 제주엔올라이드 생합성 유전자(들)를 조합생합성을 위한 기구로서 신물질 개발에 응용할 수 있어, 폴리케타이드 계열의 항생물질의 연구에 새로운 방향을 제시할 수 있는 매우 유용한 발명이다.

[132]

도면의 간단한 설명

- [133] 도 1은 본 발명에 의한 하헬라 제주엔시스 MB-1804의 염색체로부터 유도된 단리된 DNA 세그먼트와 제주엔올라이드 생합성 클러스터의 유전자 조직도를 나타낸다. 굵은 선은 서열번호 1에 기재된 세그먼트를 나타내고 상기 단리된 DNA 세그먼트를 가지고 있는 포스미드는 pBG6E11 및 pBG19A6로 표시된다. 각

- ORF는 화살표로 표시되고, 표 1에서 넘버링된다. 방향은 도 1에서와 같다.
- [134] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 상동제조합을 이용한 넥아웃시스템의 개략적으로 나타낸 도면이다. 아민옥시다아제를 코딩하고 있는 orf3의 넥아웃카세트를 PCR을 통해 제작하고 상동제조합을 이용 포스미드 pBG6E11의 orf3이 아프라마이신저항성 유전자 카세트 (AprR + OriT)로 치환된 제조합 벡터를 제조하고, 이를 제주엔올라이드 생산균주에 대장균-이종세균 간의 접합을 통해 도입하고 상동제조합이 된 넥아웃 변이균주를 선발한다.
- [135] 도 3은 제주엔올라이드 전구체의 분자량을 분석한 결과를 나타내는 도면이다. 전구체 O3P2의 ESI-MS+ 모드에서 검출된 이온은 m/z 434 [M+H]⁺ 및 867 [2M+H]⁺이며, ESI-MS- 모드에서 검출된 이온은 m/z 432 [M-H]⁻ 및 865 [2M-H]⁻였다. 따라서 제주엔올라이드 전구체 O3P2의 분자량은 433이다.
- [136] 도 4는 제주엔올라이드 전구체 O3P2의 구조를 나타낸다. 좌측부터 순서대로 제주엔올라이드 전구체 O3P2의 구조, 제주엔올라이드 A의 구조, 란카사이딘 C의 구조를 비교해두었다.

[137]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [138] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예만 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[139]

[140] <실시예 1> 제주엔올라이드 생합성유전자의 검출 및 확인

- [141] 본 발명자들은 하헬라 제주엔시스(*Halorubrum jejuense*)의 염색체 DNA 라이브러리를 제작하였고, PKS (polyketide synthase) 생합성 유전자 클러스터를 포함하고 있는 클론을 선발하였다. 두 클론의 DNA 정보를 조합하여 하나의 contig가 제작되었고, 데이터베이스 BLASTP (basic local alignment search tool for protein)을 사용하여 DNA가 코딩하고 있는 단백질 기능이 분석되었다.

- [142] 보다 구체적으로는 제주엔올라이드 생산균주인 하헬라 제주엔시스 MB-1084로부터 염색체 DNA 라이브러리를 포스미드 벡터 pCC2FOS (Epicentre, USA)를 사용하여 구축하고, 상기 라이브러리에서 케토신타아제 (ketosynthase)를 코딩하는 핵산 분자를 가지고 있는 클론을 PCR-based 스크리닝 방법으로 선발하였다.

- [143] 상기 선발된 포스미드클론을 포함하고 있는지를 확인하기 위해서 케토신타아제를 넥아웃시스템을 사용하여 파괴하였고, 그 결과 하헬라 제주엔시스의 배양여액에서 추출되던 제주엔올라이드가 더 이상 생산되지 않음을 HPLC와 MS를 통해 확인하였다.

- [144] 라이브러리로부터 상기 생합성 유전자군을 가지고 있는 포스미드 2개를

선발하였고 'pBG6E11'와 'pBG19A6'이라 각기 명명하였다. 마크로젠에 상기 클론의 샷건홀지놈시퀀싱 (shotgun whole genome sequencing)과 프라이머워킹 (primer walking)을 의뢰하여 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터의 전체 염기 서열을 분석하였다 (서열번호 1).

- [145] 다음에 전체 54.9kb의 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLASTp 데이터베이스를 참조하여 총 26개의 ORF (open reading frame)로 세분하였다 (표 1).
- [146] 따라서 본 발명은 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터를 가지는 1개의 contig와 이를 포함하는 2개의 포스미드를 제공한다. 서열번호 1로 표시되는 상기 contig는 전체 54.9 kb의 전체 염기서열이 총 26개의 ORF (Open Reading Frame)로 구성된다 (도 1 참조). 이들 유전자 클러스터 내에는 폴리케타이드의 생합성에 직접적으로 관여하는 유전자 외에도 아이소코리스마타아제, 아민옥시다아제, 탈할로겐효소, 각종 환원효소, 트랜스포터, 전사조절효소 등이 발견되었다. pBG6E11 (국제기탁번호 KCTC 12316BP; 국내기탁번호 KACC91713P)과 pBG19A6 (국제기탁번호 KCTC 12317BP; 국내기탁번호 KACC91714P)로 명명된 상기 2개의 포스미드를 가지고 있는 클론은 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행 (KCTC; Korean Collection for Type Cultures) 및 국내기탁기관인 농업생명공학연구원내 농업생물자원센터 (KACC; Korean Agricultural Culture Collection)에 기탁되었다.
- [147]
- [148] <실시예 2> 제주엔올라이드 생합성 유전자 중 하나인 아민옥시다제 유전자 **orf3**의 넥아웃카세트의 제작 및 아민옥시다제 유전자가 항생제 저항성 유전자로 치환된 넥아웃포스미드벡터의 제작방법
- [149] 상기 실시예 1에서 얻은 포스미드클론 (pBG6E11)에서 아민옥시다제만을 제거하기 위해서 항생제 저항성 유전자 카세트를 이용한 넥아웃카세트를 제작하였다. 아민옥시다제 유전자 (도 2)를 넥아웃시키기 위해서 아프라마이신 항생제 저항성 유전자와 방선균과 대장균의 접합에 관여하는 유전자인 OriT 유전자를 이용하는 PCR 타겟팅 기술 (Gust, Challis et al. 2003)을 사용하였다.
- [150] 이를 위하여 아프라마이신 항생제 저항성 유전자와 OriT 유전자를 안쪽에 지니고 이들 유전자의 바깥쪽 5' 말단과 3' 말단에 각각의 아민옥시다제 유전자의 시작코돈과 종결코돈 전후의 염기서열이 각각 36개 뉴클레오타이드씩 포함되는 넥아웃카세트를 제작하여 사용하였다 (표 2).
- [151] 제주엔올라이드 생합성 유전자군을 가지고 있는 포스미드클론 pBG6E11의 아민옥시다제 유전자를 아프라마이신 저항성 유전자-OriT 카세트에 치환시키기 위해서, 첫 번째로 pBG6E11 벡터를 대장균 BW25113/pHS8에 전기천공법 (electrophoration)을 이용하여 형질전환 시켜주고, 두 번째로 PCR 방법으로 얻어진 넥아웃카세트를 전기천공법으로 BW25113/pHS8/pBG6E11에 넣고 람다 레드 재조합 벡터 (Red recombination vector)인 pHS8에 의해서 pBG6E11에

제조합되도록 유도한 다음, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 앰피실린 (ampicillin)과 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 클로람페니콜 (chloramphenicol)과 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 아프라마이신을 함유하는 LB (Luria-Bertani) 한천배지에서 배양하여 아민옥시다제 유전자가 녀아웃카세트로 제조합된 형질전환체를 선발하였다.

[152] 이렇게 선발된 대장균 균주 (BW25113/pHS8/pBG6E11:: Δorf3)에서 아민옥시다제 유전자가 녀아웃카세트로 치환되었는지 확인하기 위하여 녀아웃에 사용된 양 프라이머의 바깥쪽 약 100 bp 정도 떨어진 핵산 염기서열로부터 녀아웃 확인용 프라이머를 제작하여, 아민옥시다제가 아프라마이신-OriT 카세트로 치환되었음을 재확인하였다. 이렇게 제조된 제조합 포스미드는 아민옥시다제 녀아웃벡터로 하헬라 제주엔시스의 형질전환에 이용된다.

[153] 상기 제작된 아민옥시다제 녀아웃벡터 pBG6E11:: Δorf3 를 하헬라 제주엔시스에 도입하기 위해서, 이중 균주의 강력한 메틸특이적인 제한기작 (methyl-specific restriction system)을 피하기 위해서 녀아웃벡터를 대장균 BW25113으로부터 분리하여 DNA의 메틸화 효소가 결여된 대장균 (dam-/dcm- E. coli) ET12567/pUZ8002에 전기천공하였고, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 아프라마이신과 50 $\mu\text{g/ml}$ 카나마이신이 들어있는 LB 한천배지에서 형질전환된 균체 (ET12567/pUZ8002/pBG6E11:: Δorf3)를 선발하였다. 표2에 녀아웃카세트 제조용 프라이머 목록을 나타내었다.

[154]

[155] 표 2

[Table 2]

프라이머	염기서열 (5'-3')
CheORF2_F	CACAAATTCATCAAGGACTTAATGGTTTAAAGGAGTCGAATGattccggggatccgtcgacc(서열번호 28)
CheORF2_R	TGCTCCGGGAGGGATTGCGCCTGCGCTCAGACAGGGTCAtgtaggctggagctgcttc(서열번호 29)
CheORF3_F3	CACGCACAGGCTTAACCCATAGAGGTAATCAAAATGAAAATGattccggggatccgtcgacc(서열번호 30)
CheORF3_R3	CGCTTTTTCTTTTGTAGCAACATTGTTTCGACTCCTTTATCAtgtaggctggagctgcttc(서열번호 31)
CheORF8_F	AGCATCCTAACAACAAAATCACGGAGTCTGGCGAGATGattccgggatccgtcgacc(서열번호 32)
CheORF8_R	TCCCTGCACGATCACGCCAAATCATCCCCACTAAGCCTTTCAgtaggctggagctgcttc(서열번호 33)
CheORF9_F	GGGGAGAGGACGTGCATCTAGTCATGTTTGACATAGACATGattccggggatccgtcgacc(서열번호 34)
CheORF9_R	TTATTTTAATCCAATAAACCTAAAGGCCTTATCAGATTCAtgtaggctggagctgcttc(서열번호 35)
CheORF19_F	ACGCACTGAAAACCGAACTGAAAAGGACCGCCCGACATGattccgggatccgtcgacc(서열번호 36)
CheORF19_R	GATAACGCTCACAGGCGATATCCAGTTCCGCATCCATCAtgtaggctggagctgcttc(서열번호 37)
CheORFA_F	TGTTGCTGTGTCTGGGCGGTCTGGCGATGAGCTATGTCTATGattccggggatccgtcgacc(서열번호 38)
CheORFA_R	ACCGCAAACGGGACAGCGTTGTTTATTTTGCTAATCCGCTCAgtaggctggagctgcttc(서열번호 39)
CheORFB_F	TGTTGCTGTGTCTGGGCGGTCTGGCGATGAGCTATGTCTATGattccggggatccgtcgacc(서열번호 40)
CheORFB_R	ACCGCAAACGGGACAGCGTTGTTTATTTTGCTAATCCGCTCAgtaggctggagctgcttc(서열번호 41)
CheORFC_F	TGCACTGTGGAAGACTATAAAATGAACTTGGGTGAAACGATGattccggggatccgtcgacc(서열번호 42)
CheORFC_R	TCCGGCGCATAAGAAAGACTAGCGGTCGCTAATCAGATATCAgttaggctggagctgcttc(서열번호 43)

[156]

[157] <실시예 3> 제주엔올라이드 아민옥시다제 유전자가 파괴된 하헬라 제주엔시스 변이 균주의 제조

[158] 본 발명의 하헬라 제주엔시스의 제주엔올라이드 생합성 유전자 클러스터 중 아민옥시다제 유전자가 파괴된 변이균주를 얻기 위하여 상기 실시예 2에서 만들어진 아민옥시다제 녹아웃백터를 대장균 ET12567/pUZ8002/pBG6E11:: Δ orf3과 하헬라 제주엔시스 간의 접합을 통해 도입하였다.

[159] 이를 위해서, ET12567/pUZ8002/pBG6E11:: Δ orf3 균주를 50 μ g/ml의 아프라마이신과 50 μ g/ml 카나마이신이 들어있는 LB 액체배지에서 5 ml 하룻밤 동안 전배양한 후 다시 동일한 농도의 항생제가 들어있는 LB 액체배지 10 ml에 1% 상기 전배양을 접종한 후 37°C에서 4-5시간 정도 배양하여, OD600(Optical Density)이 0.4가 될 때까지 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 얻어진 펠렛 (pellet)을 동일량의 LB로 항생제가 완전히 제거될 수 있도록 2번 워싱(washing) 하고 0.5 ml LB에 현탁하였다.

[160] 동시에 5 ml 조벨 (zobell) 배지 (5g peptone, 1g yeast extract, 10mg FePO₄, 30g seawater salt, 15g Agar, 1L distilled water)에서 하룻밤 동안 28°C에서 진탕배양한 하헬라 제주엔시스를 원심분리하여 얻은 펠렛을 동일량의 LB로 2번 워싱하고 0.5 ml LB에 현탁하였다.

[161] 다음에 상기의 대장균 균주 ET12567/pUZ8002/pBG6E11:: Δ orf3과 하헬라 제주엔시스 세포 현탁액을 0.5 ml 씩 1.5ml 마이크로튜브 (microcentrifuge tube 또는 ependorf tube)에 옮겨서 섞고 30초간 13,000 rpm에서 원심분리 한 후 대부분의 상등액을 버리고 남아있는 현탁액을 10mM MgCl₂가 포함된 조벨한천배지에서 도말하고 28°C에서 16-20시간 배양한 다음 0.5 mg의 날리디식 액시드 (Nalidixic acid)와 1.25 mg의 아프라마이신이 들어있는 멸균수 1 ml을 넣고 다시 골고루 도말해주었다.

[162] 28°C에서 2-3일 정도 기다리면 균총이 형성되는데 이를 25 μ g/ml의 날리디식액시드과 50 μ g/ml 아프라마이신이 들어있는 조벨한천배지에 옮겨주었다. 형성된 변이균주가 아민옥시다아제가 녹아웃 카세트에 치환된 것을 PCR을 통해 제 확인 하였다. 상기의 아민옥시다제가 제거된 변이균주는 하헬라 제주엔시스 O3KO로 명명하였고, 농업생명공학연구원내 농업생물자원센터에 균주기탁하였다 (국제기탁번호 KCTC 12315BP; 국내기탁번호 KACC91712P).

[163]

[164] <실시예 4> 제주엔올라이드 아민옥시다아제 유전자가 파괴된 변이균주 O3KO로부터 생산되는 신규 선행 폴리케타이드의 정제

[165] 1L 크기의 진탕배양플라스크에 200ml 조벨액체 배지를 넣고 여기에 아민옥시다제 변이균주의 신선한 균총 하나를 접종하여 28°C 1-2일간 200

- rpm으로 전배양하였다. 전배양액을 전배양과 동일한 조건으로 준비된 1L 조별배지에 1%씩 접종하여 다시 28°C에서 1일간 200rpm으로 진탕배양하였다.
- [166] 상기에서 얻은 배양액을 10,000g로 30분간 원심분리하여 펠렛을 수확하였다.
- [167] 수확한 펠렛을 메탄올 500 ml에 현탁한 다음 2시간 동안 초음파세척기 (ultrasonicator)에서 추출하였다.
- [168] 상기의 메탄올 추출물을 감압농축 (evaporation)하고 최종적으로 소량의 메탄올로 회수하였다.
- [169] 상기의 메탄올 추출물은 Diaion HP-20 (미츠비시사, 일본) 컬럼 크로마토그래피를 통해 0-100% 메탄올 수용액으로 분획되었다.
- [170] 상기의 분획물 중 40% 메탄올 수용액을 감압 농축하여 소량의 메탄올로 회수한 다음 HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)에서 0.1% 개미산 (formic acid)가 포함된 20%-50% 아세트나이트릴 수용액을 유속 2ml/min으로 흘려주면서 UV254nm에서 관측했을 때 나타나는 피크를 ESI-MS로 분석하여, 분자량 433의 대사산물 2 mg을 얻었다 (도 3).
- [171] 정제된 대사산물은 CD3OD (Cambridge Isotope Laboratories, USA)에 녹였고, 500MHz NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 장치 (Varian, USA)를 사용하여 ¹H-, ¹³C-, 2D-NMR (COSY, HMBC, HSQC) 실험을 수행하였다. 그 결과 전반적인 스펙트럼 (spectrum)의 양상이 제주엔올라이드의 NMR 데이터와 닮아 있음을 확인할 수 있었고, 이것이 제주엔올라이드 생합성 과정의 중간대사물임을 확인하였다. 상기의 화합물은 제주엔올라이드의 NMR 데이터에서는 찾아볼 수 없는 δ C 169.5 ppm의 탄소 시그널이 새로 관측됨을 확인할 수 있었는데, 이것은 락톤링 (lactone ring)의 카보닐 그룹 (carbonyl group)의 탄소로 란카사이딘의 6-membered d-lactone ring 구조의 카보닐 카본과 같다.
- [172] 또한 제주놀라이드의 3번 탄소에 연결된 δ H 4.98ppm에서 수소 1개 분량의 트리플렛(triplet)으로 나타나던 수소가 업필드 (upfield) 쪽으로 이동하여 δ H 3.90 ppm에서 수소 2개 분량의 더블렛(doublet)으로 나타나는 것을 확인할 수 있었는데 이는 2번과 3번 탄소 사이에 결합이 사라지면서 생긴 결과로 볼 수 있다. 또한 1번 탄소와 2번 탄소사이에 새로 2중결합이 형성되어 있음을 δ H 1.72 ppm의 18번 메틸이 싱글렛 (singlet)으로 나타나고, δ C 49.9 ppm의 2번 탄소가 δ C 96.0 ppm의 다운필드 (downfield)로 이동하고 δ C 205.6 ppm에서 나타나던 카보닐 그룹의 3번 탄소가 δ C 169.5 ppm의 업필드로 이동하였음을 통해 확인할 수 있었다. 아민옥시다제가 파괴된 하헬라 제주엔시스가 생합성하는 분자량 433의 2차 대사산물은 제주엔올라이드의 생합성 전구물질로써 축적된 선형 폴리케타이드임을 확인할 수 있었고 구조적으로 아직까지 보고된 적이 없는 신규 화합물이다 (표 3, 및 도 4 참조).
- [173] 표 3

[Table 3]

탄소번호	δ H	δ C	COSY	HMBC
1		169.5		
2		96.0		
3		171.2		
4	2.48(1H, m)	37.0	20	3,20
5	4.15(1H, m)	78.0	6a,6b	7
6a	1.77(1H, m)	40.6	5,6b,7	4,5
6b	2.08(1H,m),		5,6a,7	4,5,7,8
7	4.29(1H, d, 7.0)	69.4	6a,6b,8	5,6,7,8
8	5.57(1H, dd, 15.5, 7.0)	128.3	7,9	7,10
9	6.30(1H, d, 15.5)	136.0	8	7,10,11,21
10		134.5		
11	5.55 (1H, t, 7.3)	128.2	12a	10,12,13,21
12a	2.39(1H, m)	36.2	11	10,11,13,14
12b	2.43(1H, m)		13	10,11,13,14
13	4.17(1H, m)	71.9	12b,14	11,12,14,15
14	5.70(1H, dd, 6.7, 15.7)	130.9	13,15	13,16
15	6.23(1H, d, 15.5J)	133.8	14	13,16,17,22
16		135.5		
17	5.46(1H, t, 6.8)	126.9	18	15,18,22
18	3.9(2H, d, 7.0)	37.0	17	16,17,23
19	1.72(3H, s)	7.2		1,2,3
20	1.25(3H, d, 7.5)	15.2	4	3,4,5
21	1.77(3H, s)	11.2		9,10,11
22	1.80(3H, s)	11.2		15,16,17
23		171.6		
24	1.94(3H, s)	21.0		23
N-H	8.45(1H, br s)			

[174]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

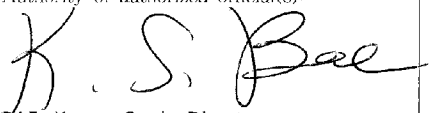
issued pursuant to Rule 7.1

TO : **KIM, Beom Seok**

Korea University

145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 136-701

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Hahella chejuensis</i> O3KO	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12315BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on November 16, 2012 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  BAE, Kyung Sook, Director Date: November 26 2012

Form BP/4 (KCTC Form 17)

sole page

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

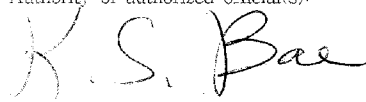
issued pursuant to Rule 7.1

TO : **KIM, Beom Seok**

Korea University

145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 136-701

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Escherichia coli</i> EPI300/pEG6E11	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12316BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on November 16, 2012 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIIBB) 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  BAE, Kyung Sook, Director Date: November 26 2012

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

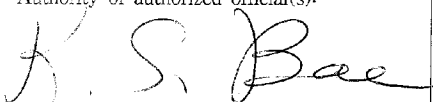
issued pursuant to Rule 7.1

TO : **KIM, Beom Seok**

Korea University

145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 136-701

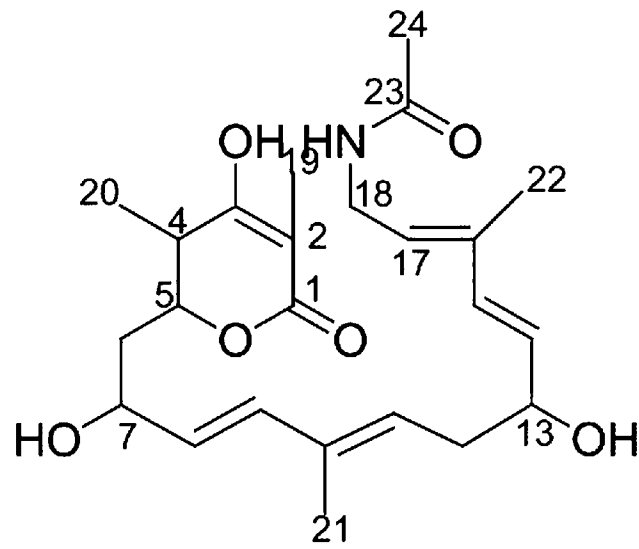
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Escherichia coli</i> EPI300/pBG19A6	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12317BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on November 16, 2012 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 125 Gwahak-ro, Yuseong gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  BAE, Kyung Sook, Director Date: November 26 2012

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 분리된 제주엔올라이드의 생합성 유전자 클러스터.
- [청구항 2] 제1항 기재의 유전자 클러스터에 의해 코딩되는 서열번호 2 ~ 서열번호 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질.
- [청구항 3] 서열번호 2 ~ 서열번호 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자.
- [청구항 4] 아래와 같이 구성된 그룹에서 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 유전자:
- (a) 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 서열번호 13의 아미노산 서열로 표시되는 폴리케타이드 합성 모듈 단백질;
 - (b) 서열번호 9의 아미노산 서열로 표시되는 아민옥시다아제;
 - (c) 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5, 서열번호 19, 서열번호, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 또는 서열번호 23의 아미노산 서열로 표시되는 ABC 트랜스포터 막투과효소, 막관통단백질, ABC 트랜스포터 주변세포질 단백질, 또는 ABC 트랜스포터 ATP 분해효소;
 - (d) 서열번호 14 또는 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시되는 전사조절효소; 또는
 - (e) 서열번호 8, 서열번호 15, 서열번호 24 또는 서열번호 25의 아미노산 서열로 표시되는 아이소코리스마타아제, 할로산 탈할로겐효소, 아미노펩티다아제, 또는 NADPH-퀴논 환원효소.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 그룹 (a)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 11776-8576 영역(orfA), 서열번호 1의 18803-11766 영역(orf1), 서열번호 1의 21800-20919 영역(orf4), 서열번호 1의 27598-21863 영역(orf5), 서열번호 1의 28462-27605 영역(orf6), 및 서열번호 1의 33473-28431 영역(orf7)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 그룹 (b)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 20900-19482 영역(orf3)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 그룹 (c)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 8507-7212 영역(orfB), 서열번호 1의 6300-2431 영역(orfC), 서열번호 1의 2082- 1327 영역(orfD), 서열번호 1의 1071-307 영역(orfE), 서열번호 1의 39788-41404 영역(orf13), 서열번호 1의 41488-42408 영역(orf14), 서열번호 1의 42517-43350 영역(orf15),

- 서열번호 1의 43445-44410 영역(orf16), 및 서열번호 1의 44435-45430 영역(orf17)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 8] 제4항에 있어서, 그룹 (d)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 34641-35405 영역(orf8), 및 서열번호 1의 48357-49250 영역(orf20)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 9] 제4항에 있어서, 그룹 (e)의 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 19469-18915 영역(orf2), 서열번호 1의 36205-35576영역 (orf9), 서열번호 1의 45557-47344 영역(orf18), 및 서열번호 1의 48233-47682 영역(orf19)의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 10] 제1항, 및 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 유전자를 함유하는 벡터.
- [청구항 11] 제10항의 벡터로 형질전환된 미생물.
- [청구항 12] 제11항의 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 제주엔올라이드의 제조방법.
- [청구항 13] 게놈 내에 서열번호 1의 제주엔올라이드 생합성 유전자를 포함하며, 서열번호 2 ~ 27의 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 코딩하는 유전자들 중 하나 이상이 파괴된 제주엔올라이드 또는 그 전구체 생산 형질전환 미생물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 미생물은 서열번호 1의 염기서열 중 아민옥시다아제를 코딩하는 유전자가 파괴된 변이균주 하헬라 제주엔시스 O3KO (국제기탁번호 KCTC 12315BP)인 제주엔올라이드 또는 그 전구체 생산 미생물.
- [청구항 15] 화학식 1로 표시되는 제주엔올라이드 전구체 O3P2.
[화학식 1]

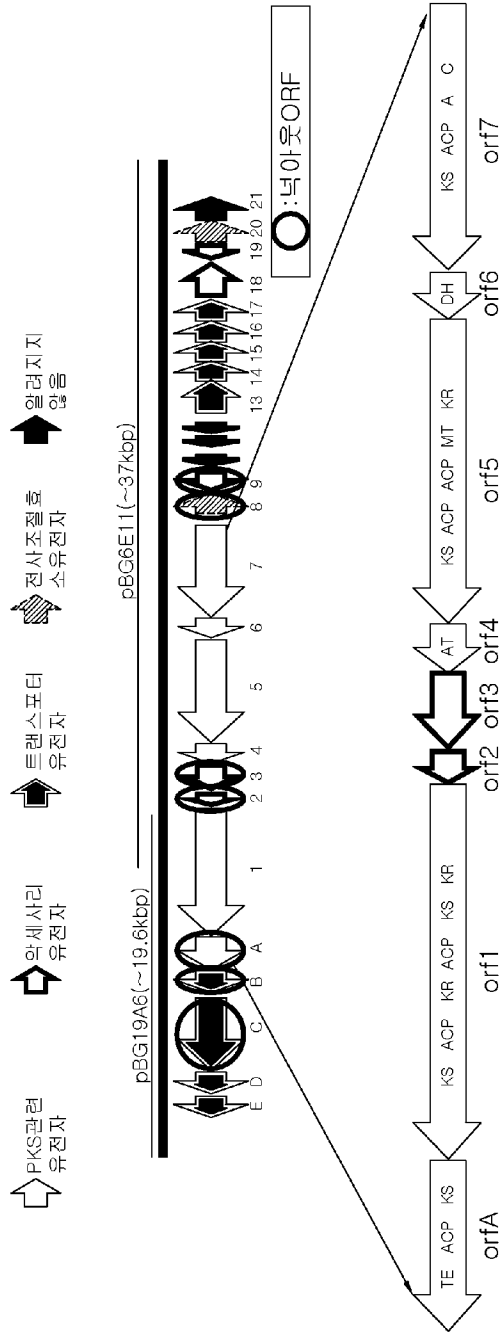


O3P2

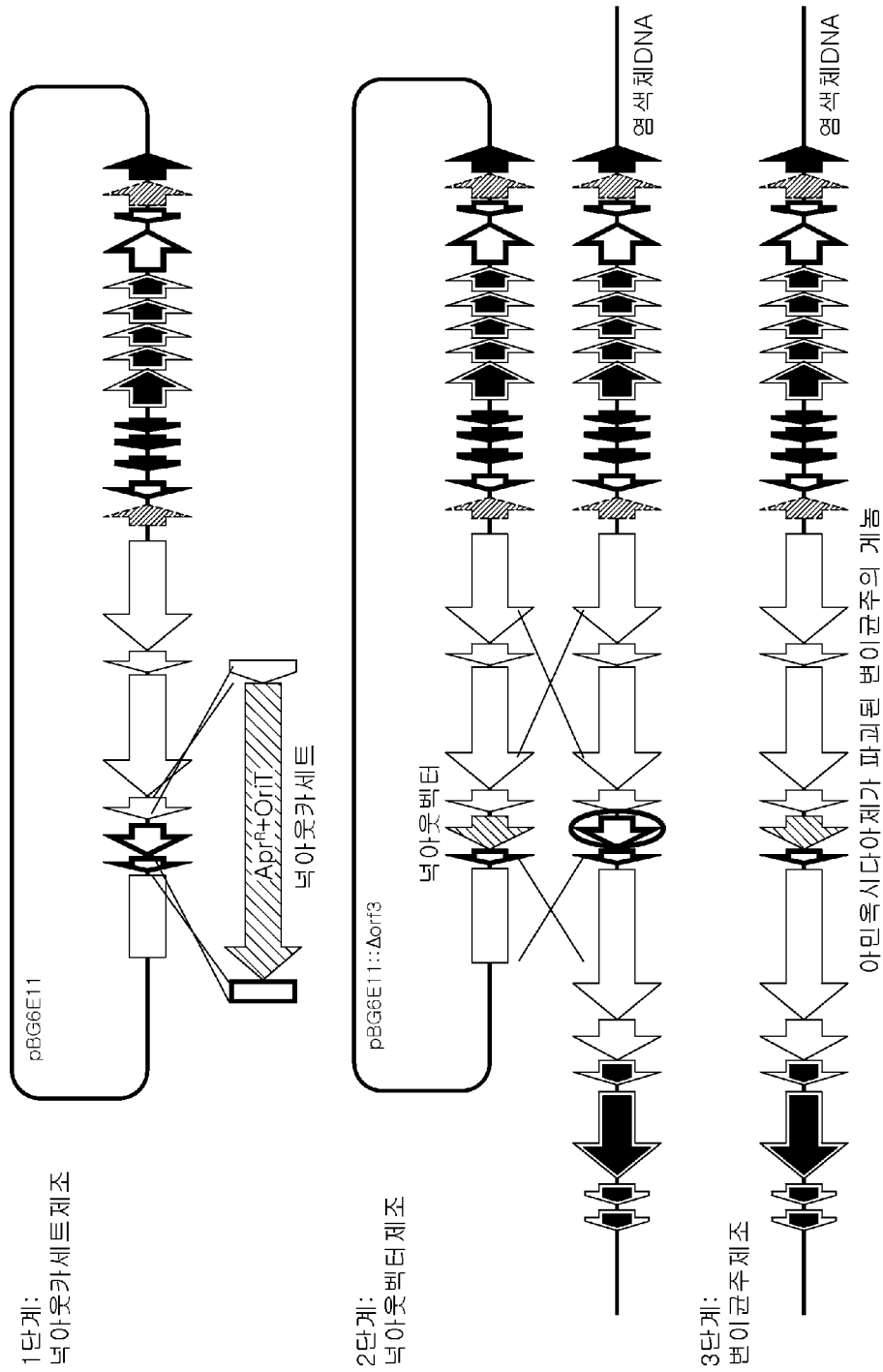
[청구항 16]

서열번호 1의 염기서열 중 아민옥시다아제를 코딩하는 20900-19482 영역(orf3)을 삭제하거나 불활성시킨 하헬라 제주엔시스 변이균주를 배양하는 단계를 포함하는 제주엔올라이드의 전구체의 제조방법.

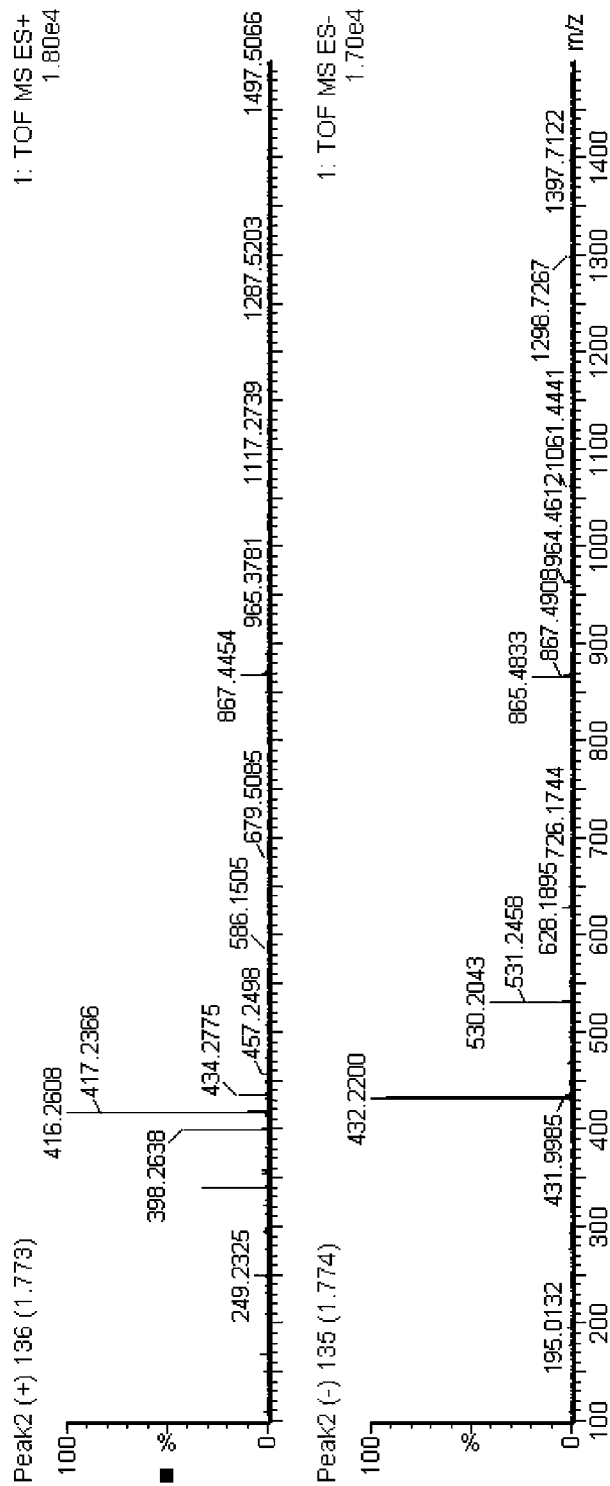
[Fig. 1]



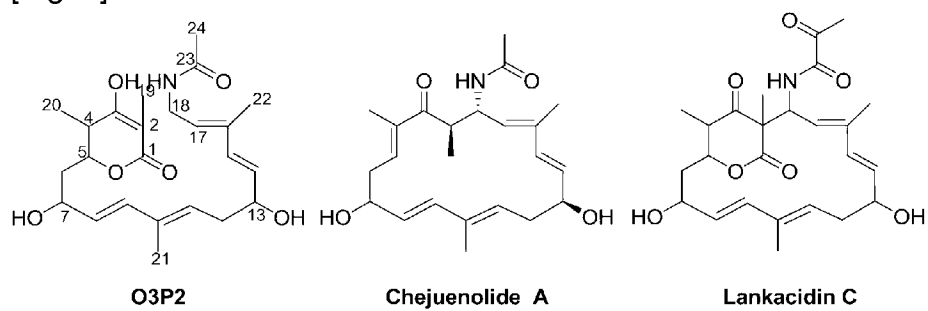
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/010879**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/31(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C07D 309/38(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/31

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: chejuenolide, biosynthesis, gene, cluster, Polyketide, amine oxidase, transformation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	GenBank YP_434661.1 (24 January 2012) See sequence.	4-11 12 1-3,13-15
X Y A	GenBank YP_434646.1 (24 January 2012) See sequence.	4-11 12 1-3,13-15
X Y A	GenBank YP_434654.1 (24 January 2012) See sequence.	4-11 12 1-3,13-15
X Y A	GenBank YP_434309.1 (24 January 2012) See sequence.	4-11 12 1-3,13-15
X	GenBank YP_434311.1 (24 January 2012) See sequence.	4-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 APRIL 2013 (10.04.2013)

Date of mailing of the international search report

12 APRIL 2013 (12.04.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/010879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A		12 1-3,13-15
A	GenBank CP000155.1 (06 October 2010) See sequence.	1-15
Y A	CHOI, Y. H. et al., Tetrahedron Letters (2008) vol. 49, pages 7128-7131 See the entire document.	12 1-11,13-15
Y A	SEO, C. and OH, H., Bull. Korean Chem. Soc. (2009) vol. 30, no. 5, pages 1181-1183 See the entire document.	12 1-11,13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/010879

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/31(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C07D 309/38(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/31

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 제주엔올라이드, 생합성, 유전자, 클러스터, 폴리케타이드, 아민옥시다아제, 형질전환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	GenBank YP_434661.1 (2012.01.24.) 서열 참조.	4-11 12 1-3, 13-15
X Y A	GenBank YP_434646.1 (2012.01.24.) 서열 참조.	4-11 12 1-3, 13-15
X Y A	GenBank YP_434654.1 (2012.01.24.) 서열 참조.	4-11 12 1-3, 13-15
X Y A	GenBank YP_434309.1 (2012.01.24.) 서열 참조.	4-11 12 1-3, 13-15
X	GenBank YP_434311.1 (2012.01.24.) 서열 참조.	4-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 04월 10일 (10.04.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 04월 12일 (12.04.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

정재철

전화번호 82-42-481-3479



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A		12 1-3, 13-15
A	GenBank CP000155.1 (2010.10.06.) 서열 참조.	1-15
Y A	CHOI, Y. H. 외 6명, Tetrahedron Letters (2008) 49권, 페이지 7128-7131 전문 참조.	12 1-11, 13-15
Y A	SEO, C. 및 OH, H., Bull. Korean Chem. Soc. (2009) 30권, 5호, 페이지 1181-1183 전문 참조.	12 1-11, 13-15

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음