(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0019334
(43) 공개일자 2012년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/76 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/465* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0082699
(22) 출원일자 2010년08월25일
심사청구일자 2010년08월25일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김응수
인천광역시 남구 소성로 71, 2남 121 (용현동, 인하대학교)
이한나
인천광역시 남구 소성로 71, 2남 121 (용현동, 인하대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

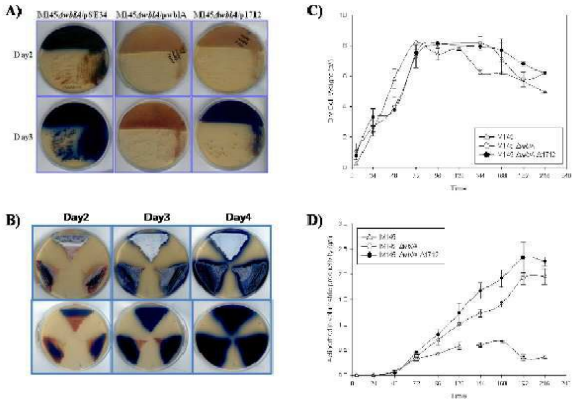
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **항생제 생산을 억제하는 방선균 조절유전자를 유전공학적으로 제어하여 항생제 생산성을 향상시키는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 유전자 조작을 통해 항생제 생산성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 스트렙토마이세스 속 미생물로부터 SCO1712유전자를 불활성화하여 항생제 생산성을 향상시키는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

임종혁

인천광역시 남구 소성로 71, 2남 121 (용현동, 인하대학교)

김선혜

인천광역시 남구 소성로 71, 2남 121 (용현동, 인하대학교)

노준희

인천광역시 남구 소성로 71, 2남 121 (용현동, 인하대학교)

스탠리 엔 코헨

미국 캘리포니아 스탠포드대학교 의학대학 유전학과

지앤치앙 황

미국 캘리포니아 스탠포드대학교 의과대학 유전학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0078663
부처명	교육과학기술부
연구사업명	핵심연구지원(개인연구)
연구과제명	방선균 유전체재설계 기반의 다기능 선형폴리케타이드 생리활성신소재 개발
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2010.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2009-0065573
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래기반기술개발사업
연구과제명	조절 네트워크 재설계 및 오믹스 시스템 최적화를 통한 폴리케타이드 고생산용 슈퍼 방선균주 개발
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2009.04.01 ~ 2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 속 미생물로부터 SCO1712 유전자를 불활성화시켜 항생제 생산성을 향상시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 미생물은 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*)인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 실리칼라는 *wblA* 유전자가 불활성화된 변종 균주인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, apr^{R}(아프라마이신 내성유전자)-*oriT* 유전자를 포함하는 벡터로 SCO1712 유전자를 치환하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 apr^{R}(아프라마이신 내성유전자)-*oriT* 유전자는 서열목록 1의 염기서열을 가지는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항생제는 액티노로딘(actinorhodin: ACT) 또는 운데실프로디지오신(undecylprodigiosin: RED)인 방법.

청구항 7

SCO1712 유전자가 불활성화된 스트렙토마이세스 속 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*)인 미생물.

청구항 9

제8항에 있어서, *wblA* 유전자가 추가로 불활성화된 미생물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자 조작을 통해 항생제 생산성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스트렙토마이세스(Streptomycetes)는 잘 알려진 그람음성 토양사상균으로 형태 분화를 하는 복잡한 생활환을 갖는 것으로 알려져 있다. 그것은 항생제, 항암제, 면역억제제 및 효소저해제와 같은 여러 가지 상업적으로 가치있는 효소와 2차 대사산물의 천연 원천으로서 널리 쓰이고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 스트렙토마이세스 종에서의 2차 대사산물 생산 조절은 복잡하게 얽혀있으며 영양적인 면과 환경적인 요소가 복합적으로 작용하는 네트워크와 관련이 있다. 스트렙토마이세스에서의 생합성 경로 유전자 그룹에 기초하여 몇 가지 경로-특이적인 항생제 생산조절 유전자가 동정되긴 했지만, 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 게놈 서열 중의 300개가 넘는 예상 조절 ORF(open reading frame) 중에서 공통적이고 총체적인 항생제 생산 조절 유전자를 찾아내는 것은 훨씬 어려우며, 대부분의 스트렙토마이세스 종에서 항생제 생산 조절 유전자가 현재까지 대부분 잘 알려지지 않았다.

[0004] 본 발명의 목적은 스트렙토마이세스 종에서 항생제 생산을 조절하는 공통적이고 총체적인 유전자를 찾아내어 궁극적으로는 항생제 생산을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명자들은 비교 트랜스트립토믹스 및 프로테오믹스와 같은 기술을 이용하여 2차 대사산물을 과다생산하는 산업적인 스트렙토마이세스 균주에서 유전자 변형된 부분을 찾아냈다. 특히 항생제를 과다 생산하는 관련 스트렙토마이세스의 산업균주를 이용한 *S. coelicolor*의 cDNA 마이크로어레이칩을 바탕으로 종간 게놈 스크리닝(interspecies genome-wide screening)을 함으로써 항생제 생산성을 낮추는 것으로 예상되는 공통적 유전자를 발견하게 되었다.

[0006] 그러므로 상기와 같은 본 발명의 목적은 항생제 생산성을 낮추는 유전자 SCO1712를 제거하여 항생제 생산성을 높이는 방법에 의해 달성된다.

[0007] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 상세한 설명 및 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 의해 유전자 조작을 통해 항생제 생산성을 향상시키는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 pSE34, SCO3579, 및 SCO1712 유전자를 탑재한 *S. coelicolor* 변형균주에서의 항생제 생산 변화를 나타내는 도면이다. (A) 상단 사진은 위쪽부터 시계방향으로 각각 pSE34, SCO3579, 및 SCO1712 유전자를 탑재한 *S. coelicolor* 변형균주를 배양한 후의 독소루비신 검출 사진이다. 하단 사진은 pSE34를 탑재한 스트렙토마이세스 푸세티우스(*Streptomyces peucetius*)의 항생제 과생산 변이균주(왼쪽) 및 SCO1712를 과발현시킨 *S. peucetius*의 변이균주(오른쪽)이다. (B) 독소루비신(DXR) 생산량 그래프이다. □: pSE34를 탑재한 *S. peucetius* 변이주의 생산량, ■: SCO1712가 과발현된 *S. peucetius* 변이균주의 생산량. (C) SCO1712와 아프라마이신 내성 유전자(apr^R)/*oriT*를 대체하여 SCO1712 유전자를 제거하는 모식도이다. (D) 구축된 ΔSCO1712 변이균주를 PCR로 확인한 도면이다. M 레인: 100bp DNA 사다리, 1 레인: *S. coelicolor* M145Δ1712 변이균주 게놈 DNA, 2 레인: StI11Δ1712 제거 코스미드, 3 레인: *S. coelicolor* M145 야생형 게놈 DNA. (E) 구축된 ΔSCO1712 변이균주를 프로브 1(SCO1712 부분) 및 프로브 2(*oriT* 부분)를 이용하여 서던 하이브리다이제이션으로 확인한 도면이다. 1 레인: *S. coelicolor* M145 야생형 게놈 DNA, 2 레인: *S. coelicolor* M145Δ1712 변이균주 게놈 DNA.

도 2는 야생형 및 변형 *S. coelicolor* 균주에서의 항생제 생산을 보여주는 도면이다. (A) *S. coelicolor* M145 (왼쪽) 및 M145Δ1712(오른쪽) 균주의 시간에 따른 항생제 생산. (B) 야생형(*S. coelicolor* M145), ΔSCO1712(*S. coelicolor* M145ΔSCO1712) 및 p1712(SCO1712를 포함하는 pSET152를 탑재한 *S. coelicolor* M145ΔSCO1712)의 액티노로딘(왼쪽) 및 운데실프로디지오신(오른쪽)의 4일간의 생산량(부피)을 보여주는 도면이다. (C) 경로특이적 유전자 및 다면발현성 조절 유전자인 *wblA* 및 SCO1712의 RT-PCR 분석 도면이다. 상단 패널은 39시간(상단) 및 78시간(하단)에 채취한 시료로 분석하였다. 1-2 레인: *actII*-ORF4, 3-4 레인: *redD*, 5-6 레인: *redZ*, 7-8 레인: *cdaR*, 9-10 레인 *wblA*, 11-12 레인: SCO1712, 13-14 레인: rDNA. 홀수번 레인은 w로 표시했으며, *S. coelicolor* M145의 전체 RNA로 RT-PCR했다. 짝수번 레인은 로 표시했으며, *S. coelicolor* M145Δ1712의 전체 RNA로 RT-PCR했다. 아래쪽 패널은 78시간에 채취한 시료로 수행한 RT-PCR 도면이다. 홀수번 레인은 w로 표시했으며, *S. coelicolor* M145의 전체 RNA로 RT-PCR했다. 짝수번 레인은 +로 표시했으며, SCO1712-과발현 *S. coelicolor* M145 변이균주의 전체 RNA로 RT-PCR했다.

도 3은 *S. coelicolor* 변이 균주에서의 항생제 생산을 보여주는 도면이다. (A) pSE34만을 탑재한 *S. coelicolor* Δ*wblA* 변이 균주(왼쪽), *wblA*를 포함하는 pSE34를 탑재한 균주(가운데) 및 SCO1712를 포함하는 pSE34를 탑재한 균주의 시간에 따른 항생제 생산을 나타내는 도면이다. (B) 야생형 *S. coelicolor* M145(상단), *S. coelicolor* Δ*wblA*(왼쪽) 및 *S. coelicolor* Δ*wblA*ΔSCO1712(오른쪽)의 시간에 따른 항생제 생산을 나타내는 도면이다. *S. coelicolor* Δ*wblA*에서 SCO1712를 대체 제거한 방법은 도 1에 도시한 바와 같다. (c) 9일간의 야생형 *S. coelicolor* M145(△), *S. coelicolor* Δ*wblA*(○) 및 *S. coelicolor* Δ*wblA*ΔSCO1712(●)의 시간에 따른 성장 곡선이다. (D) 9일간의 야생형 *S. coelicolor* M145(△), *S. coelicolor* Δ*wblA*(○) 및 *S. coelicolor* Δ*wblA*ΔSCO1712(●)의 시간에 따른 액티노로딘(actinorhodin: ACT) 생산(부피) 그래프이다.

도 4는 본 발명의 *S. coelicolor* 변이 균주에서의 항생제 생산을 보여주는 도면이다. 50ml의 변형 R2YE 액체배지에서 4일간 배양 후 측정된 *S. coelicolor* M145(야생형), *S. coelicolor* M145ΔSCO1712(Δ1712), *S. coelicolor* M145Δ*wblA*(Δ*wblA*) 및 *S. coelicolor* M145ΔSCO1712Δ*wblA*(Δ1712Δ*wblA*)의 액티노로딘의 생산량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 스트렙토마이세스 속 미생물로부터 유전자 SCO1712를 불활성화하여 항생제 생산성을 높이는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 스트렙토마이세스는 *S. coelicolor*이다. 스트렙토마이세스 속 미생물로부터 특정 유전자를 불활성화 하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면 본 발명의 실시예에서와 같이 PCR-타겟팅 방법으로 유전자 조작을 할 수 있다. 예를 들면 본 발명의 일 실시예에서와 같이 상동 유전자 재조합방법으로 apr^R (아프라마이신 내성유전자)-*oriT* 유전자로 SCO1712 유전자를 치환/결실시켜 불활성화할 수 있다. 상동 유전자 재조합을 위한 단편 은 일부 SCO1712유전자 서열과 apr^R(아프라마이신 내성유전자)-*oriT* 서열이 포함된 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 유전자 치환을 위한 프라이머 서열은 표 1의 1712dis-F, 1712dis-R과 같다. 한편 증폭된 단편에 포함된 전체 서열은 서열목록 1과 같다.

[0011] 바람직하게는 *wblA* 유전자가 불활성화된 *S. coelicolor*에서 SCO1712를 치환/결실시켜 항생제 생산성을 높인다. 이 경우 *wblA* 유전자나 SCO1712 유전자만 불활성화한 경우에 비해 항생제 생산성이 상승적으로 향상된다. *wblA* 유전자가 제거된 *S. coelicolor*는 종래 알려진 유전자 제거 기술을 사용하여 *S. coelicolor*의 야생균주를 조작하거나 본 발명의 일 실시예에서처럼 John Innes Centre(영국)의 Keith Chater 교수로부터 제공받을 수 있다.

[0012] 바람직하게는 본 발명에서 생산성이 향상되는 항생제는 액티노로딘(actinorhodin: ACT) 또는 운데실프로디지오신(undecylprodigiosin: RED)이다.

[0013] 또한 본 발명은 SCO1712 유전자가 제거된 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*)균주를 제공한다. 바람직하게는 상기 균주는 *wblA* 유전자가 제거된 변종 *S. coelicolor*균주이다.

[0014] 본 발명자들은 *wblA* 유전자를 과발현시킨 경우 *S. peucetius*에서 독소루비신(doxorubicin: DXR)의 생합성이 억제될 뿐만 아니라 *S. coelicolor*에서 액티노로딘, 운데실프로디지오신(undecylprodigiosin: RED) 및 칼슘 의존성 항생제(calcium-dependent antibiotic: CDA)의 생합성도 역시 억제되는 것을 발견하였다. 이것은 *wblA* 유전자와 그것의 상동유전자(ortholog)가 공통적으로 스트렙토마이세스종에서의 항생제 생합성을 억제한다는 것을 암시한다.

[0015] 또한 본 발명자들은 *S. coelicolor*의 *tetR*-패밀리 전사 조절 유전자 중 하나인 SCO1712가 또 다른 항생제 생산

저하 유전자라는 것을 발견했다. 본 발명자들은 SCO1712를 과발현시킨 경우에 액티노로딘 생산 *S. coelicolor* 및 DXR-생산 *S. peucetius*에서 모두 항생제 생산이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 *S. coelicolor*에서 SCO1712를 없애자 *wblA*가 존재하는 균주든 *wblA*를 없앤 재조합 균주든 항생제 생합성이 증가하는 것을 발견하였다. 그것은 SCO1712가 *wblA*와는 독립적인 항생제 생산 저하 유전자라는 것을 암시한다.

[0016] 본 발명자들은 *S. peucetius*의 DXR-과생산 변이균주에서 SCO1712의 상동유전자가 4배 이상 발현이 감소하였음을 발견하였으며, ACT를 많이 생산하는 균주인 *S. coelicolor* M145에서 거의 ACT 생산을 안 하는 균주인 *S. coelicolor* J1501에 비해 이 유전자의 발현이 현저하게 낮다는 것도 알아냈다.

[0017] SCO1712는 N-말단 TetR-패밀리 HTH(helix-turn-helix) DNA 결합 도메인을 포함하는 205-aa 단백질을 암호화한다. 본 발명자들은 그것의 인 비보(*in vivo*) 생물학적 중요성을 확인하기 위해서 *Streptomyces-E. coli* 셔틀 발현 벡터, pSE34에 *ermE**-프로모터로 그것을 복제한 후에 *S. coelicolor* M145 및 *S. peucetius*의 변이주에 삽입했다. 도 1A에서 볼 수 있는 바와 같이 파란색으로 염색된 항생제 ACT가 SCO1712-발현 *S. coelicolor*의 배지에서 현저히 감소했음을 알 수 있으며, SCO3579(*wblA*)도 역시 강력한 항생제 생산 억제 효과를 가진다는 것을 알 수 있다. SCO1712-발현 *S. peucetius* 산업 변이주에서도 역시 붉은 색의 DXR 생산이 3배 감소했다(도 1B). 이것은 SCO1712가 스트렙토마이세스에서 폭넓게 항생제 생합성을 억제하는 또 다른 항생제 생산 억제자라는 것을 의미한다. SCO1712가 예측 전사 3-유전자 오페론의 세 번째 ORF이기 때문에, 다른 2개의 상위 ORF인 SCO1713(34-aa 이론적 단백질을 암호화) 및/또는 SCO1714(기능이 알려지지 않은 189-aa 잠재 분비 단백질을 암호화)도 역시 항생제 생산 조절에 관련되었을 것이라고 생각되었다. 그렇지만, SCO1713 및/또는 SCO1714을 과발현시켰을 때는 *S. coelicolor*에서 청색의 ACT 생합성이 감소하지 않았는데, SCO1712가 항생제 합성 저해자로서의 인 비보 생물학적 영향면에서는 직접적으로 SCO1713 및/또는 SCO1714와 연관되지는 않은 것으로 보인다.

[0018] 본 발명의 일실시예에서는 SCO1712 불활성화 실험을 수행했다. StI11 코스미드에 의해 옮겨지는 SCO1712를 아프라마이신 내성/*oriT* 카세트로 대체하여 pStI11Δ1712를 만들고 *S. coelicolor* M145에 도입하였다(도 1C). SCO1712 변이체(*S. coelicolor* M145-ΔSCO1712)가 구축되었는지 PCR로 확인하였다. *S. coelicolor* M145에서 분리한 게놈 DNA 시료에서 예측 크기인 0.6 kb의 PCR-증폭 밴드가 확인되었고, 한편 *S. coelicolor* M145-ΔSCO1712의 시료에서도 예측 크기(1.9 kb)의 밴드가 확인되었다(도 1D). 또한, 2개의 이론적으로 계산된 서로 다른 *NcoI* 분해 패턴이 *S. coelicolor* M145 및 *S. coelicolor* M145 ΔSCO1712의 서던 하이브리다이제이션에서 관찰되었는데(도 1E), 그것은 SCO1712가 예상대로 제거되었음을 나타낸다.

[0019] ACT 및 RED 생산을 위해 *S. coelicolor* M145 및 *S. coelicolor* M145ΔSCO1712 변이균주를 변형 R5 평판배지 및 액상 배지에 배양했다. 그 다음 UV 분광광도 정량법을 이용하여 평판배지 및 액상 배지의 항생제의 양을 측정했다. SCO1712는 형태형성에 영향을 미치는 것으로 보이는데, SCO1712를 제거한 균주에서 야생 균주에 비해 기균사(aerial hyphae)가 초기에 먼저 형성되었다. SCO1712 제거 균주와 비교했을 때 야생균주의 배지에서는 항생제 색깔이 적게, 늦게 나타났으며, *S. coelicolor* M145ΔSCO1712 변이 균주에서 야생 균주에 비해 같은 배양 조건에서 ACT는 약 62% 더, RED는 22% 더 생산되었다(도 2A 및 도 2B).

[0020] *S. coelicolor*에서 SCO1712 유전자를 제거함으로 인한 항생제 생산 변화가 경로-특이적인 활성자에 의해 제어되는지 확인하기 위해서, 본 발명의 일 실시예에서는 배양 39시간(RED 생산 기간) 후 및 78시간(ACT 생산 기간) 후에 *S. coelicolor* M145 및 M145ΔSCO1712의 전체 RNA 시료를 제조하고, RT-PCR로 유전자 발현 분석을 하였다. RT-PCR의 프라이머는 경로-특이적 활성 유전자(표 1 참조)의 서열에 특이적이고, 약 200bp의 cDNA를 생산하도록 디자인되었다. rRNA로부터 cDNA를 증폭하도록 디자인된 프라이머쌍을 내부 대조군으로 사용하였다. 세 개의 주된 *S. coelicolor* 항생제의 경로-특이적 활성자(즉, ACT에 대해서는 *actII-ORF4*, RED에 대해서는 *redD/Z*, 그리고 CDA에 대해서는 *cdaR*)로부터의 전사를 분석했다. 각 프라이머 쌍에 대해 적어도 3번씩 분석했다. *S. coelicolor* M145ΔSCO1712에서 *actII-ORF4*, *redD/Z*, *cdaR*와 같은 경로-특이적 활성자에 의해 암호화되는 전사가 두 시점에서 모두 증가했다(도 2C). SCO1712-과발현 *S. coelicolor* M145 균주에서는 역전사패턴이 관찰되었다(도 2C). 이러한 결과로 볼 때, SCO1712가 항생제 생합성에 있어 공통적인 억제 효능을 가지며, 그것은 경로-특이적인 활성자를 직간접적으로 제어하기 때문이라고 생각된다. 한편 M145ΔSCO1712 변이체에서 *wblA* 전사 프로파일이 증가했는데(도 2C), 그것은 *wblA* 과발현에 의해 항생제 생산이 상당히 감소한다는 종래의 연구결과와 다르다는 점에서 흥미롭다. 이것은 *wblA* 및 SCO1712 유전자 모두가 유사한 항생제 생산 감소 기능을 가지는 것 같으며, *tetR*-형 SCO1712 단백질이 아직 알려지지 않은 조절 기전으로 *wblA* 유전자의 발현을 억제하는 것에 의한 것으로 생각된다. *wblA* 유전자의 전사에도 불구하고 경로-특이적인 조절자 유전자의 전사가 SCO1712 파괴에 의해 증가하기 때문에 이러한 결과는 *S. coelicolor*에서 SCO1712가 *actII*-ORF4, *redD/Z*, 및

*cdaR*에 간접적으로 영향을 미치며, *wblA*의 존재를 필요로 하지 않는다는 것을 암시한다.

[0021] *wblA* 뿐만 아니라 SCO1712가 발현됨으로써 배양 초기 단계에서의 ACT 생합성이 지연되게 하는데(도 3A), 그것은 *wblA*가 SCO1712가 항생제 생산 감소자로서 역할을 하는데 필수적인 것은 아니라는 것을 암시한다. *wblA*-독립적 표현형을 밝히기 위해서 *S. coelicolor* M145Δ*wblA* 변이 균주에서 SCO1712를 추가로 치환/제거하여 *S. coelicolor* M145Δ*wblA*ΔSCO1712 돌연변이주를 만들었다. *S. coelicolor* M145Δ*wblA* 및 M145Δ*wblA*ΔSCO1712 돌연변이주 사이에 유의적인 표현형의 차이는 없었으며, 두 가지 모두 평판 배지에서 야생형에 비해 포자형성은 덜 되었지만 ACT 생산은 더 많이 되었다(도 3B). 9일간의 액상 배지 배양에서 두 돌연변이주에서 유도기가 약간 길어진 것을 빼고는 세 균주 모두 비슷한 성장 패턴을 보였다(도 3C). *S. coelicolor* M145Δ*wblA*ΔSCO1712 돌연변이주가 가장 높은 ACT 생산을 했고(192시간 동안 2.32 g/L), 그것은 야생형 및 M145Δ*wblA* 돌연변이주의 것에 비해 각각 6.8 및 1.2배 높은 것이다(도 3D). 이것은 SCO1712가 직접 *wblA* 기능과 연관되어 있지 않을 뿐 아니라 *wblA*-독립적 항생제 생산 감소자를 암호화할 것이라는 것을 의미한다.

[0022] 한편 본 발명자들은 *wblA* 및 SCO1712가 함께 치환/제거된 *S. coelicolor* M145Δ*wblA*ΔSCO1712 돌연변이주에서 Δ*wblA* 및 ΔSCO1712 돌연변이주 각각의 경우보다 액티노로딘의 생산량이 상승적으로 증가함을 확인하였다(도 4).

표 1

본 발명에서 사용한 프라이머

이름	프라이머서열(5'→3')	목적
1712 (XbaI)-F	TCTAGACGGAGACCACGGTTCACCC	Cloning to pSE34
1712 (HindIII)-R	AAGCTTCGCCGGGTCAGTCGAGCAC	Cloning to pSE34
1712 (BglII)-F	AGATCTAGACCACGGTTCAC	Cloning to pSET152E*
1712 (XbaI)-R	TCTAGATCAGTCGAGCACGCG	Cloning to pSET152E*
1712 dis-F	TGTACCGCTTCTTCGGCAACAAGCGCCAGATGGCCGA CGCATTCCGGGGATCCGTCGACC	Gene disruption
1712 dis-R	AGCAGTTCGGTGAGCCGCTCGGCGACGCGGTGGTTGGG GATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Gene disruption
1712 check-F	CCGGAGACCACGGTTCACC	Disruption confirmation
1712 check-R	TCCTCGATGA TCTTCTCGTCC	Disruption confirmation
actII-ORF4-F	TCCCTGGTAATTTCGCATCC	RT-PCR
actII-ORF4-R	CCATGTGCATACGCTGGATT	RT-PCR
redD-F	CCCTGGAGGATCTCATCAGC	RT-PCR
redD-R	GTACGACTCCAGGGCGTCTC	RT-PCR
redZ-F	ACGTCGGTCGAAGAACTGGT	RT-PCR
redZ-R	GAGGAGGACTTCCGTTTCCC	RT-PCR
cdaR-F	CCATCGAAGAGATCGGTCTTG	RT-PCR
cdaR-R	GCTACGCCCGATGAAGTAGG	RT-PCR
wblA-1-F*	ATGGGCTGGGTAACCGACTG	RT-PCR
wblA-1-R*	TCAGCCCACGGCCGCGTA	RT-PCR
wblA-RT-F	CGACAACCGTGTCGAGTTC	RT-PCR
wblA-RT-R	CGCGTAGTTCTCGTACACCTC	RT-PCR
1712-RT-F	GTCGGTGTACCGCTTCTT	RT-PCR
1712-RT-R	CTTCATCGCCAGGTACTC	RT-PCR
rDNA-F	GACTCCTACGGGAGGCAGCA	RT-PCR
rDNA-R	CGCCCAATAATTCCGGACAA	RT-PCR

[0023]

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0025] **<실시예 1>**

[0026] **변이 균주 생산**

[0027] **1.1 SCO1712 발현 균주 생산**

[0028] *Streptomyces-E. coli* 셔틀 발현 벡터, pSE34에 *ermE**-프로모터로 SCO1712를 클로닝한 후에 *S. coelicolor* M145 및 *S. peucetius*에 삽입해서 SCO1712 발현 균주를 만들었다.

[0029] **1.2 치환용 유전자 단편 생산**

[0030] 아프라마이신 내성유전자/oriT 단편을 포함하는 벡터 pIJ773을 *EcoR*I 과 *Hind*III 처리하여 1382bp 크기의 단편을 얻었다. 표 1의 1712 dis-F 및 1712 dis-R 서열의 프라이머를 제작해서 apr/oriT 단편을 주형으로 하여 PCR로 증폭시켰다. 증폭된 단편의 양끝은 SCO1712 유전자 서열과 일치하고 가운데는 apr/oriT 서열을 포함하는 약 1.5kb 크기의 단편이 만들어졌는지 확인했다.

[0031] **1.3 SCO1712 제거용 코스미드 생산**

[0032] *E. coli* BW25113/pIJ790 균주를 클로람페니콜이 함유(25㎍/ml)된 LB 액체배지에서 30℃에서 배양하였다. 일렉트로포레션(electrophoression) 방법으로 SCO1712 유전자를 포함하는 pStI11 코스미드를 넣고 암피실린(50㎍/ml), 카나마이신(50㎍/ml) 및 클로람페니콜(25㎍/ml)을 함유하는 LB에서 30℃에서 밤새 배양하였다. pStI11 코스미드를 포함하는 *E. coli* BW25113/pIJ790 균주를 50ml의 SOB 배지(2M $MgSO_4$ 1ml, 1M L-아라비노즈 500㎕, 암피실린(50㎍/ml), 카나마이신(25㎍/ml) 및 클로람페니콜(50㎍/ml) 함유)에 1% 농도로 접종하고 30℃의 교반 배양기에서 OD_{600}이 0.4가 될 때까지 배양하였다. 배양된 균주를 50ml의 차가운 글리세롤로 두 번 세척하고 실시예 1.2에서 만들어진 2㎕의 PCR 산물과 혼합하여 일렉트로포레션하였다. 1ml의 차가운 LB를 즉시 넣고 LB 아가 평판배지(암피실린, 카나마이신, 아프라마이신 각 50㎍/ml씩 함유)에 심어 37℃에서 배양하였다. PCR로 SCO1712 유전자가 아프라마이신 내성/oriT 단편 유전자로 치환되었는지를 확인하였다.

[0033] **1.4 Δ1712 균주 생산**

[0034] pUZ8002를 포함하는 *E. coli* ET12567 균주에 일렉트로포레션으로 실시예 1.3에서 만들어진 pStI11Δ1712 코스미드를 삽입했다. 코스미드가 삽입된 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 밤새 배양하고 50ml의 LB 배지(암피실린, 카나마이신, 아프라마이신 각 50㎍/ml씩 함유)에 1%가 되도록 접종한 다음 37℃에서 흔들어주면서 배양하였다. OD_{600}가 0.4가 되면 50ml의 LB 배지로 두 번 세척하였다. *S. coelicolor* M145 포자 스톡 1ml을 2X YT 배지로 두 번 세척하고 1ml의 2X YT 배지를 넣고 50℃에서 10분간 열을 가했다. 상기 *E. coli*와 포자를 섞어 변형 ISP4 배지에 200㎕씩 심고 30℃에서 16~18시간 배양한 후에 50㎍/ml의 아프라마이신과 50㎍/ml의 날리딕스산(nalidixic acid)을 함께 넣어 방선균이 자랄 때까지 배양하였다. SCO1712 변이체(*S. coelicolor* M145-ΔSCO1712)가 구축되었는지 게놈 DNA를 추출하여 PCR로 확인하였다.

[0035] **1.5 Δ*wblA*Δ1712 균주 생산**

[0036] *S. coelicolor* M145Δ*wblA* 변이 균주는 John Innes Centre의 K. Chater 교수님께서 제공해 주신 것을 이용하였고, 실시예 1.4와 같은 방법으로 *S. coelicolor* M145Δ*wblA* 변이 균주에서 SCO1712를 추가로 제거하여 *S. coelicolor* M145Δ*wblA*ΔSCO1712 돌연변이주를 만들었다.

[0037] **<실시예 2>**

[0038] **균주 배양**

[0039] *S. coelicolor* M145 야생형 및 변이 균주는 30℃에서 항생제 생산용 R2YE 배지 및 변형 R5 액체 배지에 배양했다. *S. peucetius* BRdox는 이스트 추출물이 함유된 질소 배지(nitrogen defined medium containing yeast extract: NDYE)에서 배양했다. *E. coli* 및 *ermE** 프로모터를 포함하는 Streptomyces 전체 발현 벡터 pSET152를 복제 및 발현 실험에 사용하였다. *E. coli* ET12567/pUZ8002를 *E. coliStreptomyces* 접합을 위한 단기 숙주로 사용했다. 모든 *E. coli* 균주는 LB 브로스 또는 LB 아가에서 37℃에서 배양했다.

[0040] **<실시예 3>**

[0041] **항생제 생산 확인**

[0042] *S. coelicolor* M145, SCO1712 변이주, *wblA* 변이주 및 pSCO1712 균주를 50㎍/ml의 아프라마이신(또는 필요시에 50㎍/ml의 타이오스트렙톤)을 함유하는 50 ml의 변형 R5 액체 배지(pH 7.5, NaOH, $CaCl_2$, KH_2PO_4 및 L-프롤린 없음)에 접종하고 30℃에서 5-6일간 배양하였다. *S. coelicolor* M145, *wblA* 변이주, M145*wblA*SCO1712 변이주는 2ℓ의 변형 R5 액체 배지(pH7.5)에서 30℃에서 배양하였다. 균사와 상층액을 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 분리하였다. 해당 항생제를 추출하고 UV가시광선 분광광도계(Shimazu, Japan)를 이용하여 항생제의 양을 정량분석하였다.

[0043] **<실시예 4>**

[0044] **독소루비신 HPLC**

[0045] pSE34 및 pSCO1712를 포함하는 *S. peucetius* 변이 균주를 50ml의 NDYE 액체 배지에서 30℃에서 7일간 배양했다. 배양액을 같은 양의 혼합액(이소프로필알코올: 30% HCl= 50:1)으로 추출한 다음 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액을 평형(isocratic) 이동상으로는 라우릴황산나트륨(1.327 g/l)과 인산(0.68 ml/l)을 함유하는 아세토니트릴/물(1:1 v/v) 완충액을 사용하고, C18 칼럼(5 μm, 250 mm×4.6 mm, Symmetry, Waters, Ireland)을 이용하여 HPLC 장치(Shimazu, Japan)에 넣어 독소루비신(DXR)에 대한 HPLC 분석을 했다. 칼럼의 온도는 상온으로 유지했고, 유속은 HPLC 분석 내내 1 ml/분으로 유지시켰으며, DXR/도노루비신(Daunorubicin: DNR) 및 아클라비논(aklavinone)을 480 nm에서 관찰했다.

[0046] **<실시예 5>**

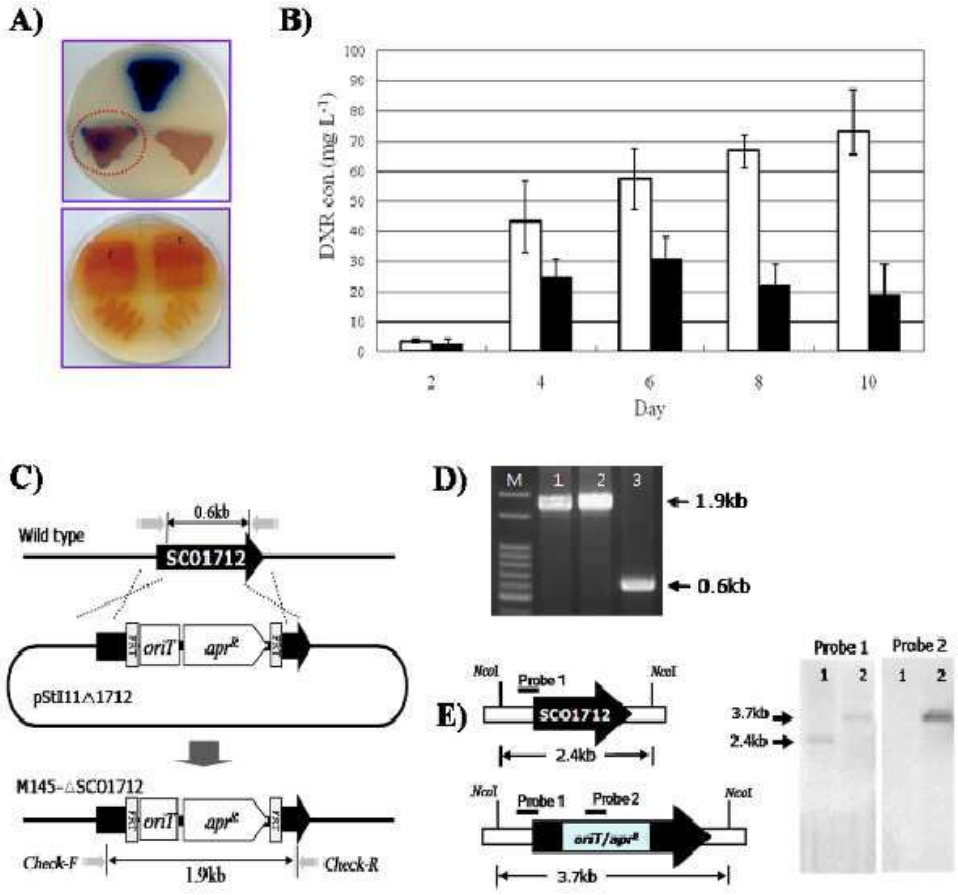
[0047] **RT-PCR**

[0048] *S. coelicolor* M145, SCO1712 변이균주, *wblA*SCO1712 변이균주를 변형 R5 액체 배지 50ml에서 키운 뒤, 39시간과 78시간에 시료를 채취하였다. pSE34를 포함하는 *S. coelicolor* M145와 SCO1712-과발현 변이 균주도 변형 R5 액체 배지 50ml에서 키운 뒤 78시간에 시료 채취하였다. 전체 RNA는 RNeasy mini kit(QIAGEN)를 이용하여 추출하였다. DNase I (QIAGEN)을 처리한 전체 RNA(7㎍)를 이용하여 AMV 역전사효소 XL(TaKaRa)로 역전사시켜서 같은 양의 cDNA가 합성되도록 하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 조건에 따라 PCR 증폭에 이용하였다: 95℃ 변성, 60회 어닐링, 72회 연장, 30 주기 반복.

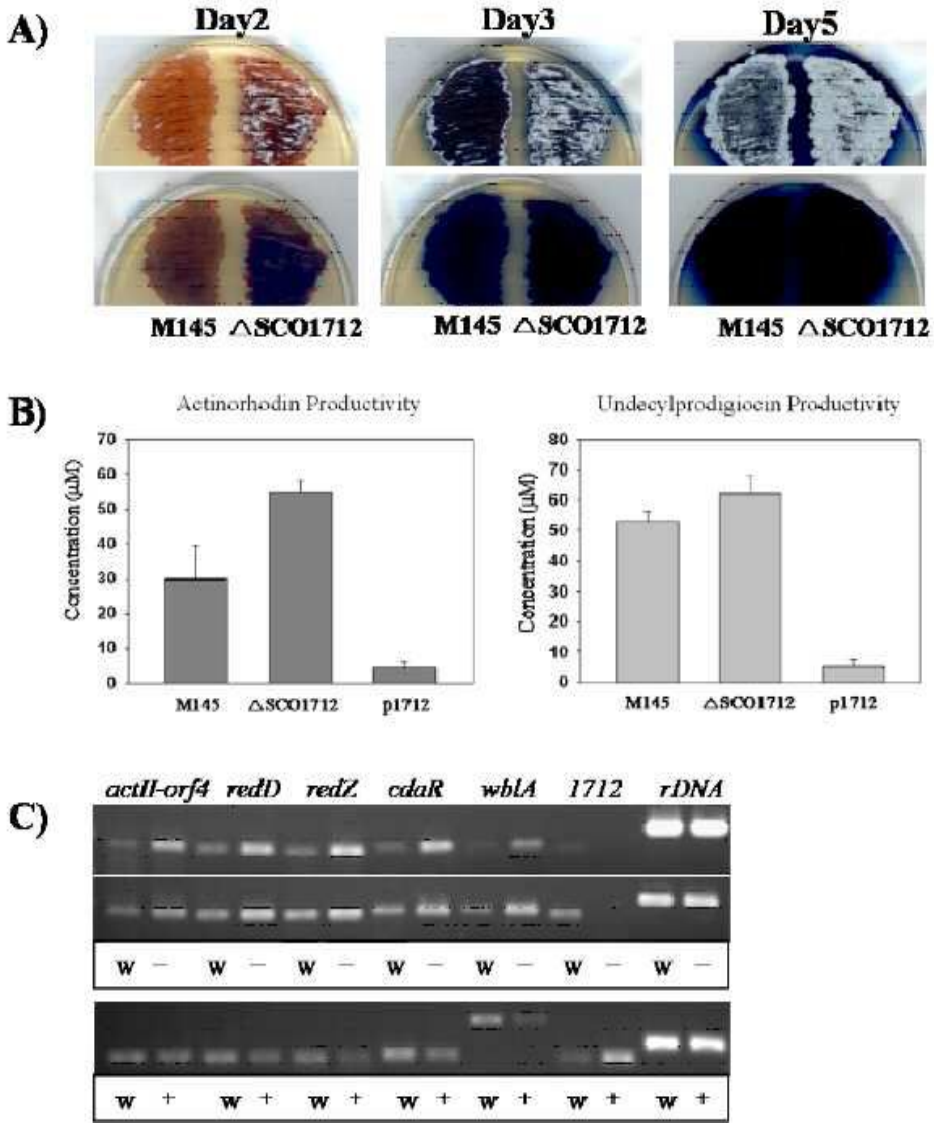
[0049] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

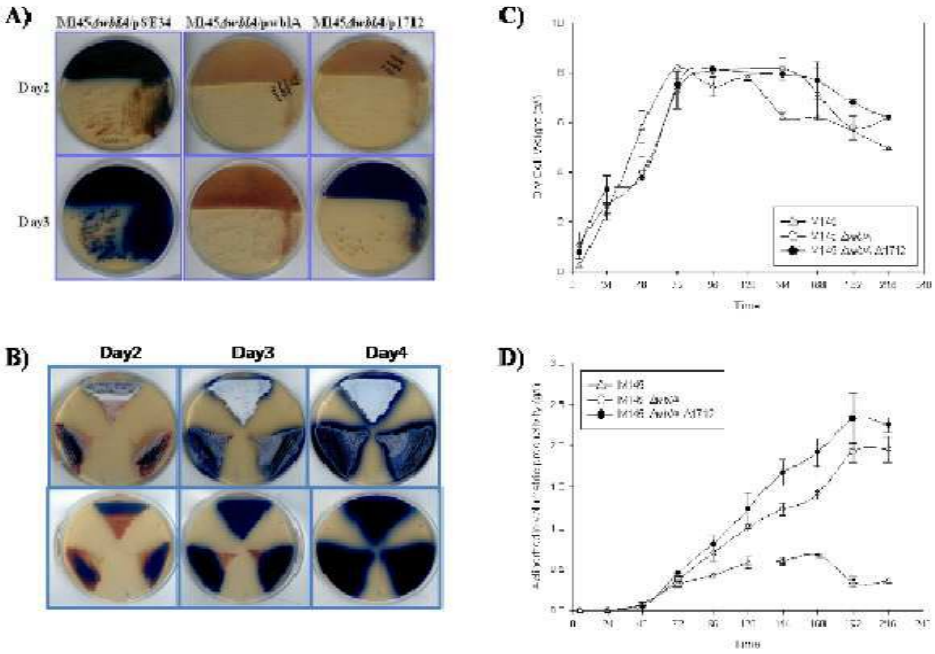
도면1


A)
B)
DXR con.(mg L-1)
Day
C)
Wild type
0.6kb
SCO1712
oriT
aprR
pStI11△1712
M145-△SCO1712
Check-F
1.9kb
Check-R
D)
M
1
2
3
1.9kb
0.6kb
E)
NcoI
Probe 1
SCO1712
2.4kb
Probe 2
oriT/aprR
3.7kb
Probe 1
Probe 2
3.7kb
2.4kb

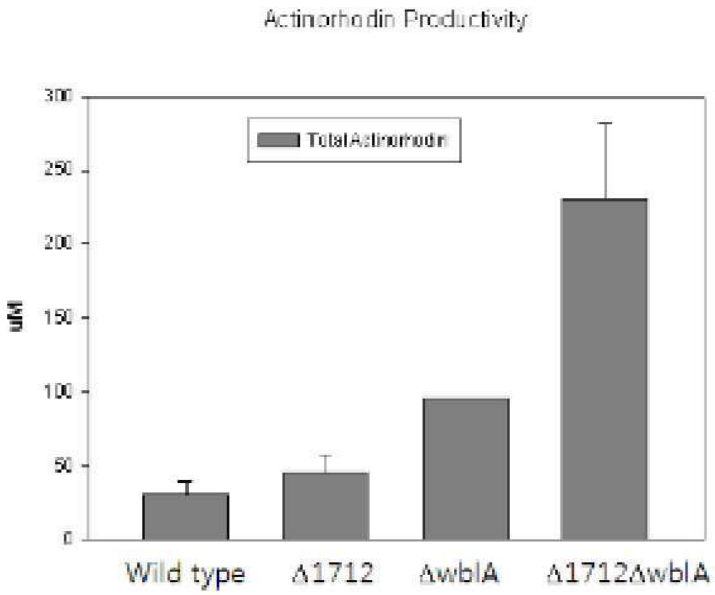
도면2


A)
Day2
Day3
Day5
M145
△SCO1712
M145
△SCO1712
M145
△SCO1712
B)
Actinorhodin Productivity
Undecylprodigiosin Productivity
Concentration (μM)
M145
△SCO1712
p1712
C)
actII-orf4
redD
redZ
cdaR
wblA
1712
rDNA
W
+

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Antibiotics-Productivity Enhancing Method by Genetically Controlling Antibiotic Down-regulator Genes of Streptomyces sp.

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aprR/oriT sequence with two part of SCO1712 sequence

<400> 1

tgtaccgctt cttcggcaac aagcgccaga tggccgacgc attccgggga tccgtcgacc 60

tgcagttcga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcgaagttcc cgccagcctc 120

gcagagcagg attcccgttg agcaccgcca ggtgcgaata agggacagtg aagaaggaac 180

acccgctcgc gggtgggcct acttcaccta tcctgcccgg ctgacgccgt tggatacacc 240

aaggaaagtc tacacgaacc ctttggcaaa atcctgtata tcgtgcgaaa aaggatggat 300

ataccgaaaa aatcgctata atgaccccga agcagggtta tgcagcggaa aatgcagctc 360

acggtaactg atgccgtatt tgcagtacca gcgtacggcc cacagaatga tgtcacgctg 420

aaaatgccgg cctttgaatg ggttcatgtg cagctccatc agcaaaaggg gatgataagt 480

ttatcaccac cgactatttg caacagtgcc gttgatcgtg ctatgatcga ctgatgtcat 540

cagcggtgga gtgcaatgtc gtgcaatacg aatggcgaaa agccgagctc atcggtcagc 600

ttctcaacct tggggttacc cccggcggtg tgctgctggt ccacagctcc ttccgtagcg 660

tccggcccct cgaagatggg ccacttggac tgatcgaggc cctgcgtgct gcgctgggtc 720

cgggagggac gctcgtcatg ccctcgtggt caggtctgga cgacgagccg ttcgatcctg 780

ccacgtcgcc cgttacaccg gaccttggag ttgtctctga cacattctgg cgcctgccaa 840

atgtaaagcg cagcgcccat ccatttgcct ttgcggcagc ggggccacag gcagagcaga 900

tcatctctga tccattgccc ctgccacctc actcgcctgc aagcccggtc gcccgtgtcc 960

atgaactcga tgggcaggta cttctcctcg gcgtgggaca cgatgccaac acgacgctgc 1020

atcttgccga gttgatggca aaggttccct atggggtgcc gagacactgc accattcttc 1080

aggatggcaa gttggtacgc gtcgattatc tcgagaatga ccactgctgt gagcgctttg 1140

ccttggcgga caggtggctc aaggagaaga gccttcagaa ggaaggtcca gtcggtcatg 1200

cctttgctcg gttgatccgc tcccgcgaca ttgtggcgac agccctgggt caactgggcc 1260

gagatccgtt gatcttcctg catccgccag aggcgggatg cgaagaatgc gatgccgctc 1320

gccagtcgat tggctgagct cataagttcc tattccgaag ttcctattct ctagaaagta 1380

taggaacttc gaagcagctc cagcctacat ccccaaccac cgcgtcgccg agcggctcac 1440

cgaactgct 1449