



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0040385
(43) 공개일자 2016년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/74 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0133461

(22) 출원일자 2014년10월02일

심사청구일자 2014년10월02일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

호서대학교 산학협력단

충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 20 (호서대학교)

(72) 발명자

윤경식

서울특별시 성북구 화랑로 76 코업스타클래스 101동 803호

이차율

서울 서초구 강남대로83길 56-16, 201호 (반포동)

조경연

충남 천안시 서북구 쌍용17길 8, 4동 703호 (쌍용동, 쌍용모란아파트)

(74) 대리인

손민

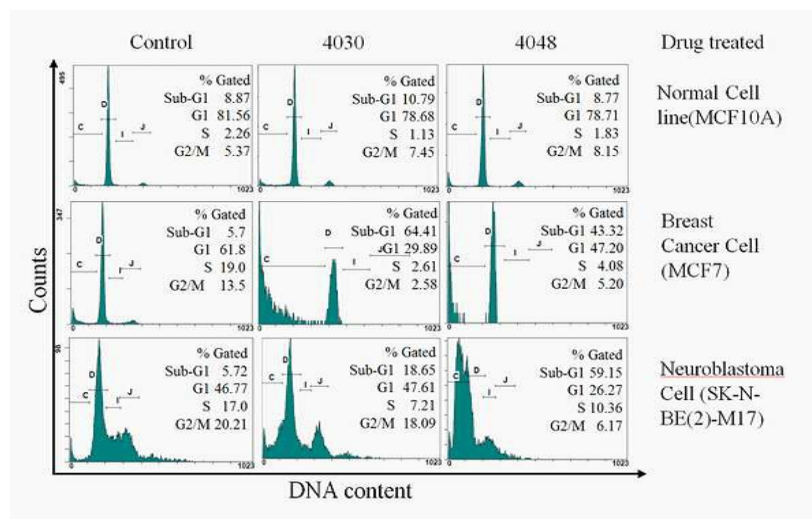
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Corallococcus exiguous*), 므소코쿠스 비레센스(*Myxococcus virescens*), 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 므소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 므소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 므소코쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로섬(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디시포미스(*Cystobacter disciformis*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0030072

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업, MRC

연구과제명 활성산소 기초의과학 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Corallococcus exiguous*), 므소코쿠스 비레센스(*Myxococcus virescens*), 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 므소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 므소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 므소코쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로솜(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디시포미스(*Cystobacter disciformis*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 점액세균은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) 또는 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 점액세균은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030, 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048, 또는 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 점액세균은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배양추출물은 상기 점액세균을 배양하여 얻어진 배양액을 아세톤으로 추출하여 수득되는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암은 피부암, 유방암, 폐암, 전립선암, 대장암, 위암, 췌장암, 신경모세포종 또는 갑상선암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 신경모세포종인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Corallococcus exiguous*), 므

소코쿠스 비레센스(*Myxococcus virescens*), 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 므소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 므소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 므소코쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로쭈(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디스포미스(*Cystobacter disciformis*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 점액세균은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) 또는 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*)인 것을 특징으로 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 점액세균은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030, 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048, 또는 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 점액세균은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 배양추출물은 상기 점액세균을 배양하여 얻어진 배양액을 아세톤으로 추출하여 수득되는 것인 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 암은 피부암, 유방암, 폐암, 전립선암, 대장암, 위암, 췌장암, 신경모세포종 또는 갑상선암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 신경모세포종인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 점액세균(myxobacteria)의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 점액세균은 그람음성 토양박테리아로써, 항생물질과 가수분해효소 등을 분비함으로써 주변의 생물체를 분해하여 영양분으로 섭취하므로, 많은 종류의 생리활성 물질과 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이에 신규 생리활성물질을 탐색하는 연구자들이 점액세균에 관심을 가지고 있으나, 점액세균의 분리와 배양이 까다로워 다른 박

테리아에 비해 상대적으로 적은 수의 점액세균만이 분리되어왔다(Reichenbach and H, 1999, Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 49: 560-563).

- [0003] 이러한 특성으로 인하여 지금까지 유효한 활성을 가지는 물질을 탐색하여 산업적으로 응용하려는 연구에 많은 제약이 있었다. 최근 들어 이들 점액세균으로부터 새로운 항생물질이 발견되기 시작하면서 이를 다양한 분야에 이용하려는 시도들이 점차 증가하는 추세에 있다.
- [0004] 점액세균을 가장 활발하게 연구하고 있는 곳 중의 하나인 독일 생명공학연구소(헬름홀츠 감염연구센터)의 연구 결과에 따르면, 약 7,500 균주에서 500여 개의 서로 다른 생리활성물질들을 분리하였고, 이들 중 100 종류는 기본 구조가 전혀 다른 새로운 물질임을 확인하였다(Gerth et al., 2003, Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotech.* 106: 233-253.) 또한 이들 물질들의 작용기작들도 전자 전달계 저해제, 핵산중합효소 저해제, 및 세포골격 표적 등 매우 다양했으며, 이 중에서 항암제로 개발되어 미국 FDA 승인을 받은 에포틸론(epothilone)이라는 물질이 있다(Gerth et al., 1996, Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 49: 560-563.)
- [0005] 점액세균은 그 서식환경에 따라 다양한 특징을 가지므로 균주마다 다양한 생리활성물질들을 분비할 것으로 여겨진다. 그러나 점액세균은 매우 느린 성장 속도와 배양 조건의 까다로움으로 인해 국내를 포함한 전세계적으로 많은 연구자들에 의해 순수 분리되거나 연구되지 못했다.
- [0006] 그러므로 본 발명자들은 국내의 다양한 지역과 환경조건의 토양시료로부터 점액세균을 분리하였고, 이렇게 분리된 점액세균의 배양추출물이 항암 활성을 가짐을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 10-2013-0011204호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Corallococcus exiguous*), 믹소코쿠스 비레센스(*Myxococcus virescens*), 믹소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 믹소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 믹소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 믹소코쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로솜(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디스포미스(*Cystobacter disciformis*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명자들은 오랜 시간 동안 항암제로 사용 가능한 새로운 생리활성물질에 대해 연구한 결과, 토양 시료로부터 점액세균을 분리·배양하는데 성공하였고, 상기 점액세균의 배양추출물이 에포토시스(apoptosis) 및 세포괴사(necrosis)를 유도하여 암세포의 성장을 저해함을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 이에 본 발명은 암 예방

또는 치료를 위한 조성물에 대한 것으로 점액세균 배양추출물을 유효성분으로 함유한다.

- [0012] 본 발명의 용어 "점액세균(myxobacteria)"은 점액세균목(*Myxococcales*)에 속하는 세균의 총칭으로, 두께 0.6~1.2 μm , 길이 3~15 μm 의 간균으로 활주운동에 의해 이동한다. 또한, 상기 점액세균들은 집단(swarm)으로 함께 모여서 생활하는 특성이 있는데, 영양분이 결핍된 상황에서 수십만 마리의 세포들이 한 점으로 모여서 다세포 자실체를 형성하며, 간균 형태의 세포들은 자실체 내에서 구형 또는 타원형의 포자로 변형된다. 반면, 영양분이 이용 가능하게 되면 자실체를 구성한 수십만 개의 포자들이 동시에 발아하여 다시 세포의 집단을 형성한다. 점액세균은 주로 토양에서 서식하며, 다른 미생물 또는 유기물질들을 소화함으로써 영양분을 얻는다.
- [0013] 본 발명에서는 토양 시료로부터 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Corallococcus exiguous*), 므소코쿠스 비레센스(*Myxococcus virescens*), 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 므소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 므소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 므소코쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로솜(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디시포미스(*Cystobacter disciformis*) 균주를 분리 및 동정하였다(실시예 1 및 실시예 6).
- [0014] 본 발명에서, 상기 점액세균은 바람직하게는 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) 또는 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*)이며, 보다 바람직하게는 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030, 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048, 또는 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081이다.
- [0015] 본 발명의 용어 "배양추출물"은 점액세균을 배지에 접종하여 배양한 배양액을 유기용매로 추출하여 얻어진 추출물을 의미한다. 먼저 본 발명의 배양추출물을 얻기 위하여 상기 점액세균을 고체배지에 접종하여, 일정기간, 바람직하게는 3~10일간 배양한 후, 성장된 점액세균을 점액세균 배양용 액체 배지에 접종하여 다시 5~10일간 진탕배양하여 배양액을 얻는다. 이 때, 점액세균을 소량 생산하기 위해서는 플라스크를 이용한 진탕 배양법이 바람직하나, 점액세균을 대량 생산하기 위하여 대형 용기를 사용하여 배양하는 경우에는 먼저 소량 배지에 상기 균주를 접종하여 배양한 다음 그 배양액을 대형 용기로 옮겨 배양 생산하는 것이 바람직하다. 상기 배지는 점액세균 배양을 위해 당업계에서 사용되는 배지를 사용할 수 있다.
- [0016] 상기 점액세균을 배양하여 얻어진 배양액을 유기용매로 추출하여 배양추출물을 수득할 수 있으며, 상기 용매는 바람직하게는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출할 수 있다. 유기용매를 사용하여 추출하는 경우, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올 등의 C1 내지 C4의 알코올을 포함한 수용성 용매; 또는 벤젠, 톨루엔, 아세톤, 사염화탄소, 헥산, 디클로로메탄, 클로로포름, 에테르, 메틸렌, 에틸아세테이트 등을 포함하는 지용성 용매를 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 배양추출물은 아세톤에 의해 추출되는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에서는, 상기 배양추출물은 상기 점액세균을 고체배지에 접종하여 배양한 후, 성장된 점액세균을 레진이 포함된 액체배지에 접종하여 진탕배양하였다. 이 후, 50% 아세톤과 100% 아세톤으로 추출하고 감압농축하여 배양추출물을 수득하였다(실시예 2).
- [0018] 본 발명의 일실시예에서는 유방암 세포주에, 상기 점액세균들의 배양추출물을 처리한 경우, 대조군과 비교하여 유방암 세포의 성장이 저해됨을 확인하였다(실시예 3 및 표 1).
- [0019] 또한, 정상세포주(MCF10A)에 대해서도 MTT 방법을 실시하여 정상세포주에 상대적으로 영향을 미치지 않는 점액세균을 선별하였는데, 점액세균들의 배양추출물을 정상세포에 처리한 경우, KYC4048은 98%, KYC4066은 7%, KYC4081은 92%, KYC4102은 21%, KYC3522은 5%, KYC4011은 34%, KYC4019은 68%, KYC4030은 97%, KYC4105은 32% 그리고 KYC4134는 5%의 생존율을 나타내었다. 따라서, 점액세균 중에서 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030와 KYC4048 그리고 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081의 배양추출물은 정상세포주의 세포성장에는 영향을 주지 않으면서 암세포의 성장만을 억제함을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 일실시예에서는 정상세포주의 세포 성장에는 영향을 주지 않는 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030와 KYC4048의 배양추출물을 이용하여, 정상세포, 유방암세포 그리고 신경모세포종 세포에 처리한 경우, 정상세포에 비해 유방암과 신경모세포종에서 sub-G1의 세포가 크게 증가하여 세포가 사멸하는 것을 확인하였으며(실시예 4), 이들 세포의 사멸이 에포토시스(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)를 통해 유도됨을 확인하였다(실시예 5).
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 점액세균을 동정하기 위하여, 이들 점액세균의 성장 특성을 분석하였으며, 자실체와 세포모양을 현미경으로 관찰하였다. 또한, 분자생물학적으로 균주를 동정하기 위하여, 프라이머를 이용하여 점액세균의 16S rDNA를 증폭한 후, 염기서열을 분석하였다. 상기와 같은 성장특성, 자실체, 세포모양, 그리고 16S

rDNA 염기서열 등을 종합하여, KYC4030과 KYC4048은 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*)로 동정되었으며, KYC4081은 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*)로 동정되었다(도 4).

- [0021] 이에, 본 발명은 상기 점액세균들로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 점액세균을 배양하여 추출한 배양추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고, 상기 배양추출물은 암세포의 에프토키스(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)를 유도하여 암세포의 성장을 억제하는 효과를 가지므로 항암제로 활용될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 암은 피부암, 유방암, 폐암, 전립선암, 대장암, 위암, 췌장암, 신경모세포종 또는 갑상선암이며, 바람직하게는 유방암 또는 신경모세포종이다.
- [0023] 상기와 같은 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0024] 상기 약학조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0025] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0027] 본원의 조성물의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 목적하는 방법에 따라 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우 피부에 붙이는 패치형, 코/호흡기를 통해 투여할 수 있으며, 신속한 치료효과를 얻기 위하여 정맥내 주사에 의한 투여가 바람직할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 조성물의 보다 바람직한 효과를 위한 투여량은, 바람직하게는 1일 0.01 mg/kg 내지 1000 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여는 하루에 1 회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0029] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Corallococcus exiguous*), 므소코쿠스 비레센스(*Myxococcus virescens*), 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 므소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 므소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 므소코

쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로솜(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디스포미스(*Cystobacter disciformis*)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 점액세균의 배양추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 점액세균의 배양추출물에 관해서는 전술한 바와 같으며, 본 발명의 추출물은 항암 효과를 갖기 때문에 항암을 위한 건강기능식품 조성물에 첨가할 수 있다.

[0030] 상기 건강기능식품 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 위생)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 건강기능식품의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없으며, 건강기능식품의 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있고, 건강기능식품의 종류는 버터, 요구르트, 치즈를 포함한 유제품, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 유산균 제제, 발효유, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.

[0032] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 건강기능식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0033] 상기한 것 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 상기 점액세균 배양추출물을 유효성분으로 함유함으로써, 암세포의 에포토시스(apoptosis)와 괴사(necrosis)를 유도하여 암세포의 성장을 억제시키므로 암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 점액세균 배양추출물이 정상세포와 암세포의 세포주기에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 2는 점액세균 배양추출물이 정상세포와 암세포의 에포토시스(apoptosis) 및 괴사(necrosis)를 유도함을 나타낸 것이다.

도 3은 점액세균 균주의 자실체와 세포사진을 나타낸 것이다.

도 4는 점액세균 균주의 16S rDNA 서열에 의한 분자생물학적 계통수 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0037] 실시예 1: 토양시료로부터 점액세균의 분리 및 동정

[0038] 전국의 토양시료를 채취하여 점액세균을 순수 분리하였다. 이후, 상기 점액세균은 배지상에서의 생육상태와 자실체 모양, 세포모양 및 생리적 특성 등을 분석하여, 속과 종을 분류하였으며, 최종적으로 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Coralloccoccus coralloides*), 코랄로코쿠스 엑시구우스(*Coralloccoccus exiguus*), 므소코쿠스 비레스센스(*Myxococcus virescens*), 므소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*), 므소코쿠스 산투스(*Myxococcus xanthus*), 므소코쿠스 스티피타투스(*Myxococcus stipitatus*), 므소코쿠스 마크로스포루스(*Myxococcus macrosporus*), 소란지움 셀룰로솜(*Sorangium cellulosum*) 및 시스토박터 디스포미스(*Cystobacter disciformis*) 인 것을 확인하고 이

를 표 1에 나타내었다. 또한, 일부 점액세균 균주 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030, 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC 4048, 및 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081의 자실체와 세포사진을 도 3에 나타내었다.

표 1

Strain No.	Genus	Species	암세포 생장율(%)	분리지역
KYC4081	<i>Corallococcus</i>	<i>coralloides</i>	17	충북 충주시
KYC4105	<i>Myxococcus</i>	<i>virescens</i>	23	충북 음성군
KYC4134	<i>Corallococcus</i>	<i>coralloides</i>	33	경남 진주시
KYC4048	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	36	경남 창원시
KYC4102	<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>	39	충북 진천군
KYC4106	<i>Myxococcus</i>	<i>virescens</i>	42	충북 음성군
KYC4075	<i>Myxococcus</i>	<i>stipitatus</i>	42	경기 성남시
KYC4013	<i>Myxococcus</i>	<i>stipitatus</i>	45	제주 제주시
KYC4107	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	46	충북 음성군
KYC4103	<i>Myxococcus</i>	<i>virescens</i>	48	충북 음성군
KYC3524	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	56	전남 해남군
KYC3528	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	56	충남 청양군
KYC4159	<i>Corallococcus</i>	<i>coralloides</i>	56	경기 안산시
KYC4077	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	56	서울시
KYC4014	<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>	58	경북 봉화군
KYC3526	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	59	경북 청도군
KYC4041	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	59	경남 진주시
KYC4065	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	61	서울시
KYC4019	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	61	경기 용인시
KYC3520	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	61	충남 공주시
KYC3522	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	62	충남 천안시
KYC3527	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	63	충남 서산시
KYC4009	<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>	64	강원 태백시
KYC4050	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	66	서울시
KYC3521	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	70	전남 완도군
KYC4066	<i>Cystobacter</i>	<i>disciformis</i>	70	경기 안산시
KYC4095	<i>Corallococcus</i>	<i>coralloides</i>	71	경기 파주시
KYC4030	<i>Myxococcus</i>	<i>fulvus</i>	72	경남 산청군
KYC4060	<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>	72	경남 창원시
KYC4028	<i>Corallococcus</i>	<i>coralloides</i>	73	경남 창원시
KYC3523	<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	77	충남 예산시
KYC4011	<i>Myxococcus</i>	<i>macrosporus</i>	81	충북 제천시
KYC4032	<i>Corallococcus</i>	<i>exiguus</i>	81	서울시

실시예 2: 점액세균 균주의 배양 및 배양추출물 제조

실시예 1에서 순수 분리되고, 동정되어진 점액세균을 VY/2 고체배지 (0.5% baker's yeast, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5% agar)에 접종하여 5~7일 정도 32℃에서 배양한 후, 성장된 점액세균을 Amberlite XAD16(Sigma, USA) 레진이 포함된 CYS(0.5% 카시톤(casitone), 0.1% 효모 추출물, 0.3% 가용성 전분, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% CaCl_2 , 50mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.6), 0.1% 미량원소용액, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 시아노코발라민) 액체배지에 접종하여 약 7일간 진탕배양하였다.

배양후 50% 아세톤과 100% 아세톤 2 ml으로 각각 2회씩 추출하고 감압건조 방법으로 농축하여 배양추출물을 얻

었다.

[0043] 실시예 3: 점액세균 배양추출물의 암세포 성장억제 활성조사

[0044] 상기 실시예 2를 통해 제조된 각각의 점액세균 배양추출물을 MTT 방법(Mosmann 등, 1983)을 통해 유방암 세포주(MCF-7)의 성장율을 조사하였다. MCF-7 세포주는 10% FBS(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI-1640 배지에서 약 1×10^5 cells/mL로 배양한 후 12-well plate에 옮겨, DMSO(대조군)와 각각의 점액세균 배양추출물 3 μ l/mL의 농도로 처리하였다. 37°C, 5% CO₂의 조건에서 72시간 동안 배양된 후 MTT 방법을 통해 성장율을 조사하였다. 대조군을 100%로 보았을 때, 각각의 배양추출물을 처리한 유방암 세포 성장율을 상기 표 1에 나타내었다.

[0045] 실시예 4: 점액세균 배양추출물의 세포주기에 대한 영향 조사

[0046] 상기 실시예 3의 결과를 토대로 정상세포주(MCF10A)에 대해서도 MTT 방법을 실시하여 정상세포주에 상대적으로 영향을 미치지 않는 군주를 선별하였다. 점액세균들의 배양추출물을 정상세포에 처리한 경우, KYC4048은 98%, KYC4066은 7%, KYC4081은 92%, KYC4102은 21%, KYC3522은 5%, KYC4011은 34%, KYC4019은 68%, KYC4030은 97%, KYC4105은 32% 그리고 KYC4134는 5%의 생존율을 나타내었다. 따라서, 점액세균 중에서 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030와 KYC4048 그리고 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081의 배양추출물은 정상세포주의 세포성장에는 영향을 주지 않으면서 암세포의 성장만을 억제하였다.

[0047] 따라서, 정상세포주의 세포 성장에는 영향을 주지 않는 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030와 KYC4048의 배양추출물을 정상세포, 유방암세포 그리고 신경모세포종 세포에 처리하여 이들 배양추출물이 세포주기에 대해 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

[0048] 먼저 1×10^5 cells/mL의 유방암세포(MCF-7), 신경모세포종(SK-N-BE(2)-M17)와 정상세포(MCF10A)를 100-mm plate에 분주하고, 대조군으로 DMSO와 점액세균 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030 및 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048의 배양추출물 3 μ l/mL을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 72시간 동안 배양한 후 세포주들을 각각 회수하여 PBS로 씻어주고, 75% 에탄올로 4°C에서 24시간 동안 고정한 후, 0.5 μ g/ml RNase A를 포함한 PI buffer(50 mg/mL)를 30분 동안 처리하고 Kaluza 유동세포계수(flow cytometry) software(Beckman Coulter, Orange County, CA, USA)를 사용하여 DNA 함량(content)을 분석하였다(도 1).

[0049] 그 결과, 정상세포주(MCF10A)의 경우, DMSO(대조군, control)과 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030와 KYC4048의 배양추출물을 처리했을 때의 DNA 함량(content)에 차이가 거의 없었다. 그러나, 유방암세포(MCF-7)와 신경모세포종(SK-N-BE(2)-M17)의 경우, 대조군에 비해 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030와 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048의 배양추출물을 처리했을 때, 이들 세포주의 DNA 함량(content)이 크게 변화하였고, sub-G1 phase DNA의 함량이 크게 증가하는 것으로 보여 세포가 사멸하는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[0050] 실시예 5: 점액세균 배양추출물의 에프토시스(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis) 조사

[0051] 세포사멸에 대한 보다 구체적인 조사를 위해 annexin V-FITC/PI double-labeling 방법을 통해 유동세포계수(flow cytometry)를 실시하였다. 유방암세포(MCF-7), 신경모세포종(SK-N-BE(2)-M17)와 정상세포(MCF10A)를 annexin V-FITC 결합 버퍼(binding buffer)에서 현탁하고, annexin V-FITC(1 μ g/ml)와 PI(10 μ g/ml)와 함께 15분 동안 실온에서 배양한 후, Kaluza 유동세포계수(flow cytometry)를 사용하여 분석하였다(도 2).

[0052] 정상세포(MCF10A)의 경우, DMSO 처리한 대조군(control)과 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030 및 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048의 배양추출물 3 μ l/mL을 처리한 경우 이들 세포들이 모두 정상구역(좌하단)에 분포하는 것으로 나타났다. 그러나, 신경모세포종(SK-N-BE(2)-M17)의 경우, 대조군에 비해 세포

들이 우상단 구역 방향으로 이동하는 경향을 나타내어, 세포들이 에토포시스와 함께 세포괴사를 일으킨 것을 알 수 있었다.

[0053] 실시예 6: 점액세균의 동정

[0054] 상기 실시예에서 사용된 KYC4030, KYC4048, KYC4081의 점액세균을 동정하기 위해, 자실체와 세포모양을 현미경으로 관찰하였다. 각각의 점액세균을 VY/2 고체배지상에서 5~7일 정도 배양하였을 때, 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4030, 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*) KYC4048 및 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*) KYC4081는 도 3의 상단에서 보여지는 것과 같이 자실체를 형성하였으며, 또한 위상차 현미경으로 관찰하였을 때에도 도 3의 하단과 같은 세포모양을 나타내었다(도 3).

[0055] 다른 한편으로, KYC4030 균주의 분자생물학적 동정을 위해 두 primer(27F: AgAgTTTgATCMTGGCTCag(서열번호 4)와 1429R: TACggYTACCTTgTTACgACTT(서열번호 5))를 이용하여 94℃ 30 초, 55℃ 30 초, 72℃ 2분의 조건으로 PCR을 시행하여, 점액세균의 16S rDNA를 증폭한 후, 염기서열을 분석하였다.

[0056] 그 결과 서열번호 1과 같이, 1467bp로 분석되었으며, 분석된 염기서열을 기초로 하여, 점액세균 표준 균주들의 16S rDNA들과 정렬하여 도 4와 같은 계통 모식도를 얻을 수 있었다.

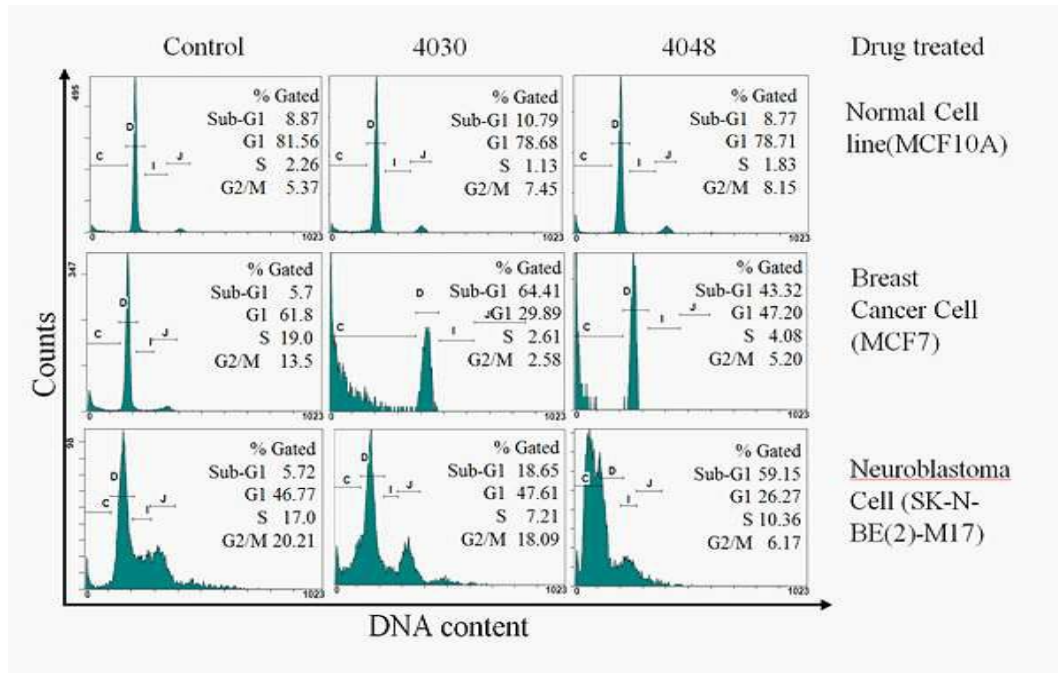
[0057] 또한, KYC4048 균주의 분자생물학적 동정을 위해 두 primer(27F: AgAgTTTgATCMTGGCTCag(서열번호 6)와 1429R: TACggYTACCTTgTTACgACTT(서열번호 7))를 이용하여 94℃ 30 초, 55℃ 30 초, 72℃ 2분의 조건으로 PCR을 시행하여, 점액세균의 16S rDNA를 증폭한 후, 염기서열을 분석하였다. 그 결과 서열번호 2와 같이, 1428bp로 분석되었으며, 분석된 염기서열을 기초로 하여, 점액세균 표준 균주들의 16S rDNA들과 정렬하여 도 4와 같은 계통 모식도를 얻을 수 있었다.

[0058] 또한, KYC4081 균주의 분자생물학적 동정을 위해 두 primer(27F: AgAgTTTgATCMTGGCTCag(서열번호 8)와 1429R: TACggYTACCTTgTTACgACTT(서열번호 9))를 이용하여 94℃ 30 초, 55℃ 30 초, 72℃ 2분의 조건으로 PCR을 시행하여, 점액세균의 16S rDNA를 증폭한 후, 염기서열을 분석하였다. 그 결과 서열번호 3과 같이, 1468bp로 분석되었으며, 분석된 염기서열을 기초로 하여, 점액세균 표준 균주들의 16S rDNA들과 정렬하여 도 4와 같은 계통 모식도를 얻을 수 있었다.

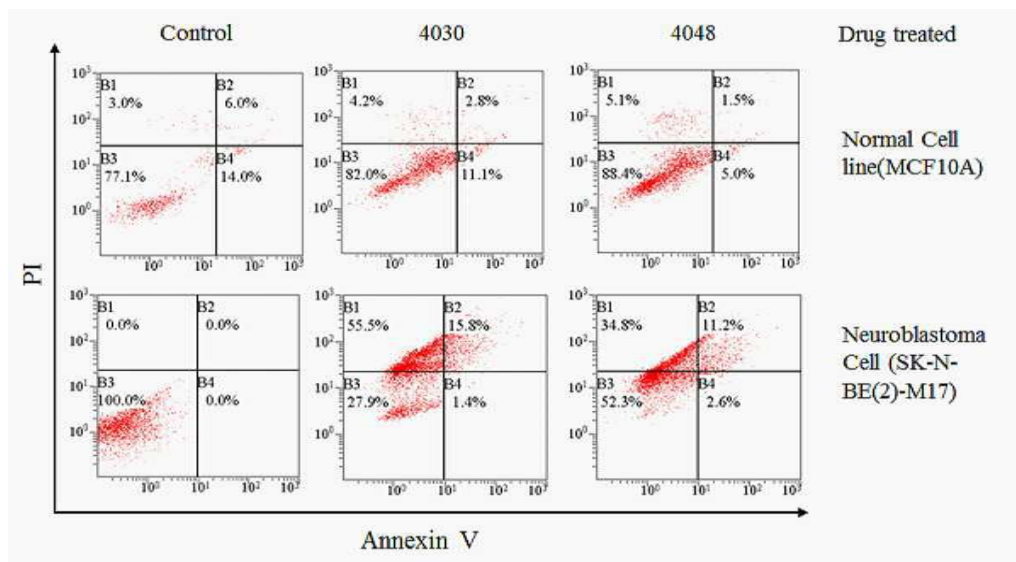
[0059] 생장특성, 자실체 및 세포모양, 그리고 16S rDNA 염기서열 등을 종합하여, KYC4030과 KYC4048은 미소코쿠스 풀부스(*Myxococcus fulvus*)로 동정되었으며, KYC4081은 코랄로코쿠스 코랄로이드(*Corallococcus coralloides*)로 동정되었다(도 4).

도면

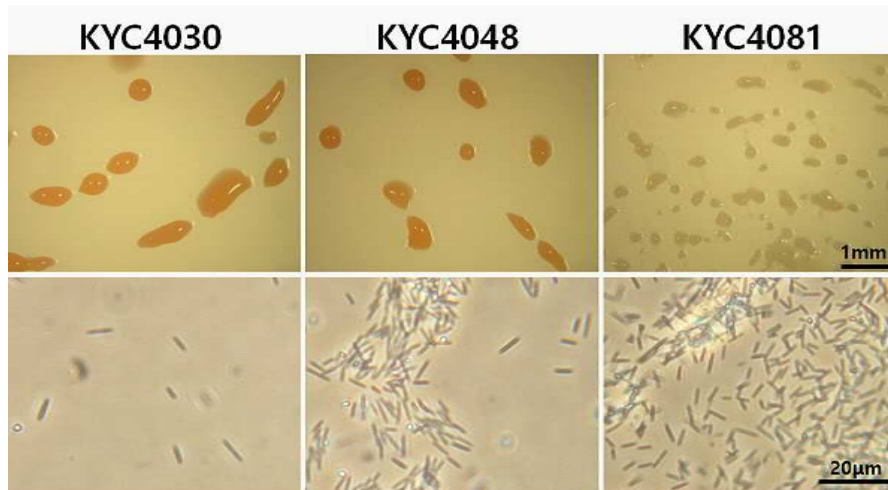
도면1



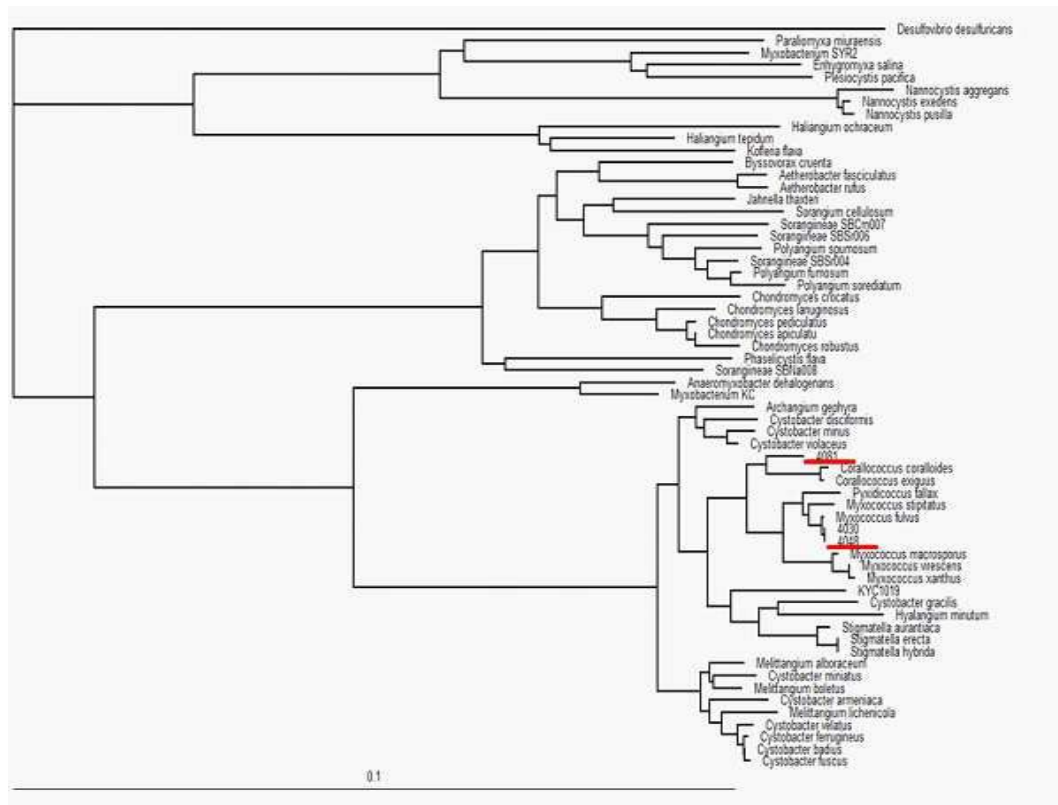
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
Hoseo University Academic Cooperation Foundation
- <120> COMPOSITION AND HEALTH FUNCTIONAL FOOD FOR PREVENTION OR
TREATMENT OF CANCER COMPRISING EXTRACTION OF MYCOBACTERIA
CULTURES
- <130> KPA140695KR

<160> 9

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1467

<212> DNA

<213> Myxococcus fulvus

<400> 1

ttcacccag ttaccgacca ctccctgggc atctcttggg gagatgactt ctggagcaat 60

cgactcccca tgggtgtgacg ggcggtgtgt acaaggcccg ggaacgtatt caccgcagcg 120

tgctgatctg cgattactag cgattccgcc ttcattggagt cgagtgcag actccaatct 180

gaactgagac cggttttatg cgattagctc cccctcggg gttggcaacg ctctgtaccg 240

gccattgtag cactgtgtga gccctgggtca taaaggccat gaggacttga cgtcatcccc 300

accttctcc ggtttaacac cggcagtcct tctagagatc cacttgcgtg gcaactaaag 360

gcgaggggtg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag 420

ccatgcagca cctgtctctc ggttccttgc cgggcactcc ctcatctctg agagattccg 480

aggatgtcaa gaccaggtaa gggtctgcgc gttgcgtcga attaaaccac atgtccacc 540

gcttgtgcgg gccccgtca attcctttga gttttagtct tgcgaccgta cttcccaggc 600

ggagaactta atgcgttagc tacggcaccg cgggggtcaa ctcccacgac acctagtctt 660

catcgtttac ggctgtgact accagggtat ctaatctgt ttgttccca cgctttcgcg 720

tctcagctc agttaccgtc cagggtggcg ccttcgccac cgggtttcct ccccatatct 780

acgaatttca cctctacttg gggaattccg ccacctctc cggcactcaa gcacgacagt 840

ttcgggcgca ctctctcagt tgagctgagg gctttcacac ccgacttgc acgccccta 900

cacgcgttt acgccaata attccgaaca acgcttgac cctctgtatt accgcggctg 960

ctggcacaga gttagccgtt gcttcttctc ccggtaccgt caagccgtag cgtgttgggc 1020

tacgggtttt cgtcccgtc gaaagtgtt tacaatccga agaccttcat cacacacgcg 1080

gcgttgctgc gtcaggcttt cgccattgc gcaaaattcc ccactgctgc ctcccgtagg 1140

agtctggacc gtgtctcagt tccagtgtgg ctgacgtcc tctcagacca gctaccgtc 1200

gtcgccttgg tgggccatta ccccgcaac tagctgatgg gccgcggact catctggttg 1260

tgatagcttg tatacagagg ccacctttc cctcagctc cgaagaaacc gtgggcttat 1320

ccggtattag ccaatcttcc gactggttat cccgagcatc caggcagatt atccacgtgt 1380

tacgcaccg tgcgccgtc tactaagggt tgcccctatt cgcgctcgac ttgcatgtgt 1440

taggcacgcc gccagcgttc gttctga 1467

<210> 2

<211> 1428

<212> DNA

<213> Myxococcus fulvus

<400> 2

tgagatgact tctggagcaa tgcactccca tgggtgtgacg ggcgggtgtgt acaaggcccg 60

ggaacgtatt caccgcagcg tgctgatctg cgattactag cgattccgcc ttcattggagt 120

cgagttgcag actccaatct gaactgagac cggttttatg cgattagctc cccctcgcg 180

gttggcaacg ctctgtaccg gccattgtag cacgtgtgta gccctgggtca taaaggccat 240

gaggacttga cgtcatcccc accttcctcc ggtttaacac cggcagtcctc tctagagatc 300

cacttgcgtg gcaactaaag gcgagggttg cgtcgtgtgc gggacttaac ccaacatctc 360

acgacacgag ctgacgacag ccatgcagca cctgtctctc ggttcccttg cgggcactcc 420

ctcatctctg agagattccg aggatgtcaa gaccaggtaa ggttctgcgc gttgcgtcga 480

attaaaccac atgctccacc gcttgtgcgg gccccgtca attcctttga gttttagtct 540

tgcgaccgta cttcccagcg ggagaactta atgcgttagc tacggcaccg cgggggtcaa 600

ctcccacgac acctagtctc catcgtttac ggcgtggact accagggtat ctaatcctgt 660

ttgtcctcca cgcttttcg ctcagcgtc agttaccgtc caggtaggcg ccttcgccac 720

cgggtgttct ccccatatct acgaatttca cctctacttg gggaaattccg ccacctctc 780

cggcactcaa gcacgacagt ttccggcgca cttctcagt tgagctgagg gctttcacac 840

ccgacttgtc acgccgcta cagcgcttt acgccaata attccgaaca acgcttgac 900

cctctgtatt accgcggtg ctggcacaga gttagccggg gcttcttctc ccggtaccgt 960

caagccgtag cgtgttgggc tacgggtttt cgtcccggtc gaaagtgtt tacaatccga 1020

agaccttcat cacacacgcg gcgttgctgc gtcaggcttt cgccattgc gcaaaattcc 1080

ccactgctgc ctcccgtagg agtctggacc gtgtctcagt tccagtgtgg ctgatcgtec 1140

tctcagacca gctaccgtc gtcgccttg tgggccatta ccccgccaac tagctgatgg 1200

gccgcggact catctggttg tgatagcttg tatacagagg ccaccttttc cctcagtctc 1260

cgaagaaacc gtgggcttat ccggtattag ccaatctttc gactgggtat cccgagcatc 1320

caggcagatt atccacgtgt tacgcacccg tgcgcgctc tactaagggt tgcccctatt 1380

cgcgctcgac ttgcatgtgt taggcacgcc gccagcgttc gttctgag 1428

<210> 3

<211> 1468

<212> DNA

<213> *Corallococcus coralloides*

<400> 3

ttcacccag ttaccgagca ctcttgggc acctcttggg gaggtagctt ctggagcaat	60
cgactcccca tgggtgtgacg ggcggtgtgt acaaggcccg ggaacgtatt caccgcagcg	120
tgctgatctg cgattactag cgattccgcc ttcattggagt cgagttgcag actccaatct	180
gaactgagac cggttttctg cgattagctc ccctcgcgg gtttcagcg ctctgtaccg	240
gccattgtag cactgtgtga gccctgggtca taaaggccat gaggacttga cgtcatcccc	300
accttctcc gggttaacac cggcagtcct tctagagatc cacttgcgtg gcaactaaag	360
gcgagggttg cgctcgttg gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag	420
ccatgcagca cctgtctctc ggttcccttg cgggcactcc ctcatctctg aaggattccg	480
aggatgtcaa gaccaggtaa ggttctgcgc gttgcgtcga attaaaccac atgtccacc	540
gcttgtgcgg gccccgtca attcctttga gttttagtct tgcgaccgta ctccaggc	600
ggagaactta atgcgttagc tacggcaccg cgggggtcaa ctccacgac acctagtctt	660
catcgtttac ggctggact accagggtat ctaatcctgt ttgtaccca cgctttcgcg	720
tctcagctc agttaccgtc cagggtggcg ccttcgccac cgggtttcct ccccatatct	780
acgaatttca cctctacttg gggaattccg ccacctctc cggcactcaa gctctgcagt	840
ttcgggcgca cttcctcagt tgagctgagg gctttcacac ccgacttgca aagccgccta	900
cacgcgcttt acgccaata attccgaaca acgcttgac cctctgtatt accgcggctg	960
ctggcacaga gttagccgtt gcttctctc ccggtaccgt caagccggag gatgttagcc	1020
tccgggtttt cgtcccgtc gaaagtgtt tacaatcaa agaccttcat cacacacgcg	1080
gcgttgctgc gtcaggcttt cgccattgc gaaaattcc cactgctgc ctccgtagg	1140
agtctggacc gtgtctcagt tccagtgtgg ctgategtcc tctcagacca gctaccgtc	1200
gttgccttgg tgggccatta ccccgccaac tagctgatgg gccgcggact catctggttg	1260
tgatagcttg tatacagagg ccacctttc cctcagctc cgaagaggcc gtgggttat	1320
ccgtatttag ccaattttc gactgggtat ccaggcatc caggcagatt atccacgtgt	1380
tacgcaccg tgcgcgctc tactagggtt tccccattcg cgctcgactt gcatgtgtta	1440
ggcacgccg cagcgttcgt tctgagcc	1468

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

agagtttgat cmtggctcag

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

tacggytacc ttgttacgac tt

22

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

agagtttgat cmtggctcag

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

tacggytacc ttgttacgac tt

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

agagtttgat cmtggctcag

20

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

tacggytacc ttgttacgac tt

22