



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0103405
(43) 공개일자 2017년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) C07K 7/64 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/0071 (2013.01)
C07K 7/645 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0026269

(22) 출원일자 2016년03월04일

심사청구일자 2016년03월04일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

칭다오 인스티튜트 오브 바이오에너지 앤드 바이오프로세스 테크놀로지, 차이니즈 아카데미 오브 사이언스

중국, 266101, 산둥, 칭다오, 라오산 디스트릭트, 쑹링 로드 189, 차이니즈 아카데미 오브 사이언스

(72) 발명자

김응수

서울특별시 강남구 언주로30길 26, G동 5006호 (도곡동, 타워팰리스)

셰잉 리

중국, 266101, 산둥, 칭다오, 라오산 디스트릭트, 쑹링 로드 189, 칭다오 인스티튜트 오브 바이오에너지 앤드 바이오프로세스 테크놀로지, 차이니즈 아카데미 오브 사이언스

(74) 대리인

특허법인태백

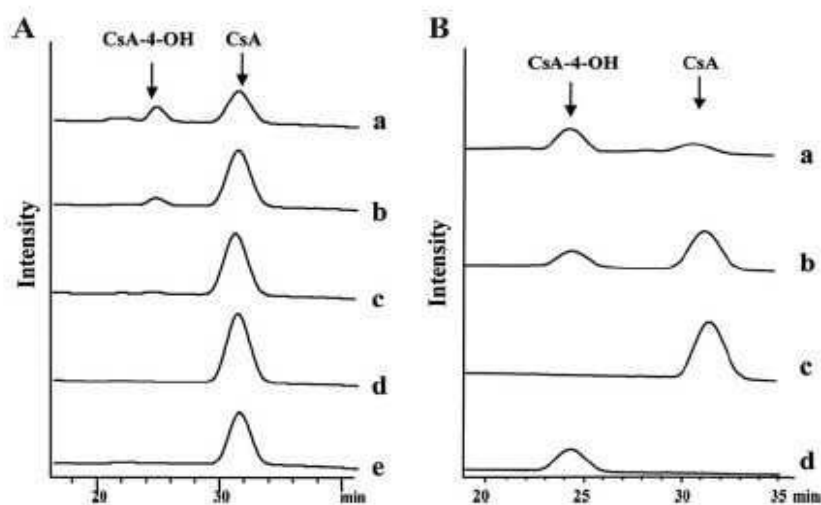
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 코돈 최적화된 사이클로스포린 특이적 P450 수산화효소 및 이를 이용한 대장균 기반의 최적화된 사이클로스포린 생전환 방법

(57) 요약

본 발명은 코돈 최적화된 사이클로스포린(cyclosporine; CsA) 특이적 P450 수산화효소(hydroxylase) 및 이를 이용한 대장균 기반의 최적화된 사이클로스포린 생전환 방법에 관한 것으로, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 코돈 최적화된 사이클로스포린 특이적인 수산화효소 유전자를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 코돈 최적화된 수산화효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 페레독신(ferredoxin) 유전자 및 페레독신-NADP⁺ 환원효소(ferredoxin-NADP⁺ reductase) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 상기 재조합 미생물을 이용하여, 비용-효과적으로 CsA-4-OH를 생산할 수 있는 전-세포 생전환 시스템을 개발하였으며, 상기 시스템은 추후 모발 성장 촉진제의 스케일-업 생산에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 예상된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/52 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

C12N 9/0095 (2013.01)

C12P 21/02 (2013.01)

C12Y 101/01047 (2013.01)

C12Y 118/01002 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 코돈 최적화된 사이클로스포린(cyclosporine; CsA) 특이적인 수산화효소(hydroxylase) 유전자.

청구항 2

제1항의 코돈 최적화된 수산화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 글루코스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase; GDH) 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 재조합 발현벡터; 및

페레독신(ferredoxin) 유전자 및 페레독신-NADP⁺ 환원효소(ferredoxin-NADP⁺ reductase) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 페레독신 유전자는 SynPcc7942_1499(*seFdx*)이고, 상기 페레독신-NADP⁺ 환원효소 유전자는 SynPcc7942_0978(*seFdxR*)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*E. coli*)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

- 1) 제4항의 재조합 미생물을 배양하는 단계;
- 2) 상기 배양물에 *N*-세틸-*N,N,N*-트리메틸암모늄 브로마이드(*N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide; CTAB)을 처리하는 단계; 및
- 3) 상기 CTAB 처리된 배양물에 CsA 및 NADPH를 첨가하는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 3) 단계는 글루코스(glucose)를 더 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 CsA 생전환(bioconversion)은 CsA를 γ -하이드록시-*N*-메틸-L-Leu4-CsA(γ -hydroxy-*N*-methyl-L-Leu4-CsA; CsA-4-OH)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 코돈 최적화된 사이클로스포린 특이적 P450 수산화효소 및 이를 이용한 대장균 기반의 최적화된 사이클로스포린 생전환 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 사이클로스포린(cyclosporine; CsA)은 11개의 아미노산으로 구성된 친유성 고리형펩타이드(cyclopeptide)로서, 토양 곰팡이인 톨리포클라디움 인플라툼(*Tolypocladium inflatum*)에서 최초로 분리되었다. 이는 동종이식 거부(allograft rejection)를 방지하기 위하여 장기이식시 사용되고, 자가면역질환 치료에 널리 사용되는 잘 알려진 면역억제제이다. 이의 면역억제 활성화에도 불구하고, CsA는 신독성, 고혈압 및 다모증과 같은 여러 부작용을 일으킨다. 상기 부작용 중에서, CsA의 강한 발모 촉진 활성화는 탈모 치료에의 적용 가능성으로 인해 학계 및 화장품 업계 모두 상당한 관심을 가지고 있다. CsA는 모발-성장 인자에 부정적으로 작용하는 몇몇 단백질 키나제 C 이소자임의 발현 및 이동을 억제시켜, 쥐의 모발 상피세포 및 표피 케라틴형성세포(keratinocytes)의 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌다.
- [0003] CsA는 그의 강한 면역억제 활성화로 인하여 발모 촉진제로서의 용도가 실용화되지 않았다. 상기 2가지 활성을 분리하기 위해서, 아미노산이 치환된 넓은 스펙트럼을 가진 CsA를 제조하고 평가하였는데, 이중에서 γ -하이드록시-*N*-메틸-L-Leu4-CsA(γ -hydroxy-*N*-methyl-L-Leu4-CsA; CsA-4-OH) 유도체가 면역억제 활성화는 상실한 반면 모발 성장 촉진 효과는 상당히 남아있는 것으로 밝혀졌다(도 1). 제조과정에서, 화학 촉매에 의해 CsA의 위치선택적 수산화반응이 강하게 일어났다. 즉, 수천 개의 방선균(actinomycete) 균주를 스크리닝한 결과, 생전환 균주로서 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) KCTC 9610을 선별하였는데, 이는 비록 낮은 전환율이지만, CsA를 CsA-4-OH로 전환시킬 수 있었다(도 1). 이후, 상기 균주의 사이토크롬 P450 효소인 CYP-sb21이 CsA의 4번째 *N*-메틸 류신에 위치특이적 수산화반응을 담당하는 것으로 밝혀졌다. 최근 CYP-sb21은 David Nelson에 의해 개발된 명명 시스템에 의해 CYP107Z14로 명명되었다.
- [0004] 사이토크롬 P450 효소(CYP 또는 P450s)는 헴(heme)-함유 단백질의 슈퍼패밀리에 속하며, 테르펜, 스테로이드, 폴리케타이드, 펩타이드 및 다른 난분해성 화합물과 같은 여러 화합물의 산화 반응을 주로 촉매한다. 많은 P450 생촉매는 제약산업에 적용되고 있는데, 이는 고부가가치 산물을 생산하기 위한, 몇몇의 매우 특이적인 위치- 및 입체선택적 수산화 반응 또는 에폭시화 반응을 촉매할 수 있기 때문이다.
- [0005] 레독스 파트너 시스템(redox partner system)의 전달을 통해, NAD(P)H로부터 P450 효소의 헴(heme)-철(iron) 반응 중심으로 2개의 환원 당량(reducing equivalents)을 차례로 전달시키는 것은 P450 촉매 주기에 있어 중요한 단계이다. 전자 전달의 효율은 전체적인 P450-촉매 반응 비율에 직접적으로 영향을 미친다. 현재까지, 적어도 3개의 주요 레독스 파트너 시스템이 확인되었다. 대부분의 박테리아 및 미토콘드리아 CYPs에 대한 2개-인자 클래스 I (two-component class I) 레독스 시스템은 철-황(iron-sulfur) 단백질[페레독신(ferredoxin; Fdx)] 및 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드(flavin adenine dinucleotide; FAD)-함유 페레독신 환원효소(ferredoxin reductase; FdR)로 구성된다. 주로 원핵성 P450s에 대한 클래스 II 레독스 시스템은 사이토크롬 P450 환원효소(cytochrome P450 reductase; CPR)로서 FAD/플라빈 모노뉴클레오타이드(flavin mononucleotide; FMN)-함유 융합 기능성 도메인을 활용한다. 클래스 III 시스템은 "RhFRED"로 명명된 FMN/Fe₂S₂-함유 환원효소 도메인으로 구성되는데, 이는 *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 9784 유래 P450 효소와 자연적으로 융합된다. 이용할 수 있는 게놈 서열분석 데이터가 폭발적으로 증가함에 따라, 신규 P450s가 크게 부상하고 있다. 또한, P450 환원효소들에 대한 더 많은 분류 시스템이 제안되고 있다. 하지만, 가능성 있는 많은 산업적인 P450s를 발현시키는데 있어, 종종 최적의 레독스 파트너(동종 또는 이종 숙주 기반)를 알 수 없거나, P450s를 발현시키기 어려운 경우가 있다. 따라서, 원하는 촉매 공정을 얻기 위해서 대체 레독스 파트너 단백질을 이용한 하이브리드 P450 반응 시스템을 구축할 필요가 있다.
- [0006] P450 CsA 수산화효소 CYP-sb21에 대해서는, 7개의 추정적인 *fdx* 유전자 및 4개의 *fdR* 유전자를 세베키아 베니하나(*S. benihana*)의 전체 게놈으로부터 얻었다. 상기 11개 유전자는 PCR-표적 유전자 파괴 시스템을 이용하여 각각 불활성화되었다. CYP-sb21에 특이적이라고 할 만한 Fdxs 또는 FdRs은 확인되지 않았다. *in vivo*에서 CYP-sb21에 의한 위치특이적 CsA 수산화반응의 주요 레독스 파트너로서 Fdx-sb8 및 FdR-sb3이 가능성 있을 것으로 보이나, 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 레독스 단백질에 대한 발현 시스템이 아직 개발되지 않았으므로, 이를 입증할 수는 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2013-0081394(2013.07.17 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 코돈 최적화된 사이클로스포린(cyclosporine; CsA) 특이적인 수산화효소(hydroxylase) 유전자를 제공하는 데에 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 코돈 최적화된 수산화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 배양하여 CsA를 생전환(bioconversion)하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 코돈 최적화된 사이클로스포린(cyclosporine; CsA) 특이적인 수산화효소(hydroxylase) 유전자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 코돈 최적화된 수산화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 상기 재조합 발현벡터에 글루코스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase; GDH) 유전자를 더 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터; 및 페레독신(ferredoxin) 유전자 및 페레독신-NADP⁺ 환원효소(ferredoxin-NADP⁺ reductase) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 1) 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계; 2) 상기 배양물에 *N*-세틸-*N,N,N*-트리메틸암모늄 브로마이드(*N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide; CTAB)을 처리하는 단계; 및 3) 상기 CTAB 처리된 배양물에 CsA 및 NADPH를 첨가하는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 코돈 최적화된 사이클로스포린 특이적 P450 수산화효소 및 이를 이용한 대장균 기반의 최적화된 사이클로스포린 생전환 방법에 관한 것으로서, *in vitro*에서 4개의 다른 대체 레독스 파트너 시스템을 사용하였는데, 그 중 최적의 시아노박테리아 레독스 파트너를 사용하여, CsA에서 CsA-4-OH로의 전체적인 전환율을 개선시키기 위해 *in vitro*에서 공용매 및 NADPH 재생 시스템과 같은 많은 반응 인자들을 최적화시켰다. 최종적으로, 비용-효과적으로 CsA-4-OH를 생산할 수 있는 전-세포 생전환 시스템을 개발하였으며, 상기 시스템은 추후 모발 성장 촉진제의 스케일-업 생산에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 이중숙주 기반의 레독스 시스템을 통해 CYP-sb21에 의한 CsA에서 CsA-4-OH로의 생전환 모식도를 나타낸다.

도 2는 (A) 정제 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내고, (B) 정제된 CYP-sb21의 CO-결합 환원 차이 스펙트럼(CO-bound reduced difference spectrum) 결과를 나타낸다.

도 3은 여러 CYP-sb21 반응 혼합물의 HPLC 분석결과를 나타낸다. (A) 여러 대체 전자 전달 시스템을 사용한 CYP-sb21에 의한 CsA 수산화반응을 나타낸다. (a) *S. elongatus* 유래 seFdx 및 seFdxR; (b) *Rhodococcus* sp. RhFRED; (c) RhFRED 융합된 CYPsb21; (d) RhFRED-Fdx 융합된 CYP-sb21; (e) 시금치 유래 spFdx 및 spFdxR. (B) NADPH 재생 시스템이 CsA에서 CsA-4-OH로의 생전환을 증가시킨다는 것을 나타낸다. (a) GDH 및 glucose 추가; (b) GDH 및 글루코스(glucose) 미포함 대조군; (c) 표준 CsA; (d) 표준 CsA-4-OH. 모든 반응은 30°C에서 16시간 동안 수행하였다.

도 4는 W1(pET-28b-cyp-sb21 및 pCDFDuet-sefdR-sefdx를 가진 *E. coli* 세포) 및 W2(pET-28b-gdh-cyp-sb21 및 pCDFDuet-sefdR-sefdx를 가진 *E. coli* 세포)에 의한 CsA에서 CsA-4-OH로의 전-세포 생전환 결과를 나타낸다.

분석은 독립적으로 3번 반복하였다. 별표는 통계적 유의성을 나타낸다($P < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이에, 본 발명자들은 *in vitro*에서 4개의 다른 대체 레독스 파트너 시스템[1) 시금치 페레독신(spinach ferredoxin) 및 시금치 페레독신-NADP⁺ 환원효소(spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase) (각각 *spFdx* 및 *spFdR*), 2) 시아노박테리움(cyanobacterium) *Synechococcus elongatus* PCC 7942 유래 페레독신(*seFdx*) (SynPcc7942_1499) 및 페레독신 NADP⁺ 환원효소(*seFdR*) (SynPcc7942_0978), 3) *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784 유래 RhFRED 및 4) 하이브리드 *Rhodococcus*-spinach 환원효소인 RhFRED-Fdx]을 이용하여 CYP-sb21이 CsA-4-OH 합성효소(synthase)라는 것을 확인하였다. 최적의 시아노박테리아 레독스 파트너를 사용하여, CsA에서 CsA-4-OH로의 전체적인 전환율을 개선시키기 위해 *in vitro*에서 공용매 및 NADPH 재생 시스템과 같은 많은 반응 인자들을 최적화시켰다. 최종적으로, 비용-효과적으로 CsA-4-OH를 생산할 수 있는 전-세포 생전환 시스템을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 코돈 최적화된 사이클로스포린(cyclosporine; CsA) 특이적인 수산화효소(hydroxylase) 유전자를 제공한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, “코돈 최적화”는 CsA 특이적인 수산화효소 유전자의 코돈에 대해 *E. coli*에서의 발현을 보다 효율적으로 하기 위하여 *E. coli* 유전자에서 높은 빈도로 사용되는 코돈으로 치환하는 것을 의미한다. 상기 서열번호 1의 CsA 특이적인 수산화효소 유전자는 *E. coli*에서 이중 단백질의 발현을 개선시키기 위해 코돈최적화 된 염기서열이다.
- [0020] 본 발명에 있어서 “사이클로스포린(cyclosporine; CsA)”은 우리 몸의 T림프구가 이식된 장기에 대하여 거부반응을 일으킬 때 분비되는 활성 세포물질(cytokine)을 억제하며, 주로 인터류킨-2, 감마인터페론(gamma interferon) 등을 억제하는 용도로 사용되는 면역억제제이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 코돈 최적화된 수산화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다. 상기 재조합 발현백터는 글루코스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase; GDH) 유전자를 더 포함할 수도 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, “백터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 있어서, “발현 백터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 백터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현백터; 및 페레독신(ferredoxin) 유전자 및 페레독신-NADP⁺ 환원효소(ferredoxin-NADP⁺ reductase) 유전자를 포함하는 재조합 발현백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 미생물은 대장균(*E. coli*)일 수 있다.
- [0025] 바람직하게는, 상기 페레독신 유전자는 SynPcc7942_1499(*seFdx*)이고, 상기 페레독신-NADP⁺ 환원효소 유전자는 SynPcc7942_0978(*seFdR*)로서, 시아노박테리움(cyanobacterium) *Synechococcus elongatus* PCC 7942 유래의 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 본 발명은 1) 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계; 2) 상기 배양물에 *N*-세틸-*N,N,N*-트리메틸암모늄 브로마이드(*N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide; CTAB)을 처리하는 단계; 및 3) 상기 CTAB 처리된 배양물에 CsA 및 NADPH를 첨가하는 단계를 포함하는 CsA 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.
- [0027] 상세하게는, 상기 3) 단계는 글루코스(glucose)를 더 첨가하는 단계를 포함할 수도 있다.
- [0028] 상세하게는, 상기 CsA 생전환(bioconversion)은 CsA를 γ -하이드록시-*N*-메틸-L-Leu4-CsA(γ -hydroxy-*N*-methyl-L-Leu4-CsA; CsA-4-OH)로 전환시키는 것이다.

[0029] 상기 "γ-하이드록시-N-메틸-L-Leu4-CsA(γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA; CsA-4-OH)"는 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 4번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기가 도입된 화합물이다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] <실험예>

[0032] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0033] 1. 실험재료

[0034] 항생제는 SolarBio (Beijing, China)로부터 구입하였다. 다른 화합물들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US A)로부터 구입하였다. 코돈 최적화된 *cyp-sb21* 유전자는 Cosmo Genetech (Seoul, South Korea)을 통해 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드는 Sangon Biotech (Shanghai, China)을 통해 합성하였고, 이들의 서열은 표 1에 나타났다. *Pfu* 고-충실도 DNA 폴리머라제(polymerase), 모든 제한효소 엔도뉴클레아제(endonucleases) 및 T4 DNA 리가제(ligase)는 Fermentas (Vilnius, Lithuania) 또는 TaKaRa (Dalian, China)에서 구입하였다. 플라스미드 추출 및 DNA 정제 키트는 Omega Bio-Tek (Jinan, China) 및 Promega (Madison, WI, USA)에서 각각 구입하였다. His-표지된 단백질 정제는 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) resin (Qiagen, Valencia, CA, USA), Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore, Billerica, MA, USA) 및 PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 수행하였다. CsA 및 CsA-4-OH는 이전에 보고된 바와 같이 준비하였다(Appl Environ Microbiol 79:2253-2262, 2013).

표 1

Oligonucleotide	Primer sequence (5'-3')	Function of underlined bases
CYP-sb21-F	GGAATTCATATGGACACCGTTAATCTG	NdeI
CYP-sb21-R1	CGGAATTCGCGCAGCAGAACCGGCAG	EcoRI
Fdx-F	GGAATTCATATGATGGCAACCTACAAGG	NdeI
Fdx-R	CCGCTCGAGTTAGTAGAGGTCTTCTTC	XhoI
FdR-F	CGGGATCCATGTTGAATGCGAGTGTG	BamHI
FdR-R	CCCAAGCTTCTAGTAGGTTCAACATGCC	HindIII
RhFRED-F	CAGATTCCATATGGTGCTGCACCGCCATCAA	NdeI
RhFRED-R	CCCAAGCTTGGAGTCGACGGGCCAGCG	HindIII
CYP-sb21-R2	TTGATGCCGGTGCAGGCGCAGCAGAACC	<i>cyp-sb21</i> overhang
RhFRED-Fdx-F	GGTTCGTCTGCGCTGCACCGGCATCAAC	FMN domain overhang
RhFRED-Fdx-R	CCCAAGCTTTTATGCCGTCAGTTCTTC	HindIII
GDH-F	GGAATTCATATGTATAAAGATTAAAGG	NdeI
GDH-R	CGCGGATCCATTATCCGCTCCTGCTTG	BamHI
CYP-sb21-Duet-F	GGAATTCATATGGACACCGTTAATCTG	NdeI
CYP-sb21-Duet-R	CCGCTCGAGTCAGCGCAGCAGAACCGGCAG	XhoI

[0035]

[0036] 2. 제조합 플라스미드 구축

[0037] 제조합 플라스미드를 구축하기 위하여 표준 분자 클로닝 기술을 사용하였다. 본 발명에 사용한 프라이머들은 표 1에 나타났다. pET-28b-*cyp-sb21*을 제작하기 위해, 코돈-최적화된 *cyp-sb21* 유전자는 pET-28b의 NdeI 및 EcoRI 제한효소 사이트 사이에 삽입되었다. *cyp-sb21-RhFRED* 융합 유전자를 구축하기 위해서, pET-28b-*cyp-sb21* 및 미리 구축된 플라스미드 pET28b-*pikC-RhFRED*을 각각 주형으로 하고, CYP-sb21-F/CYP-sb21-R1 및 RhFRED-F/RhFRED-R을 각각의 프라이머 세트에 사용하여 *cyp-sb21* 단편 및 RhFRED 유전자 단편을 PCR로 증폭시켰다. 그 후, *cyp-sb21* 및 RhFRED 유전자는 NdeI/EcoRI 및 EcoRI/HindIII로 각각 이중 절단하였고, pET28b-*cyp-sb21-RhFRED*을 제작하기 위해서 NdeI/HindIII-전처리된 pET28b에 삽입하였다. *cyp-sb21-RhFRED-fdx* 하이브리드 유전자는 중첩 연장 PCR(overlap extension PCR)에 의해 제작되었다. CYP-sb21을 코딩하는 유전자는 CYP-sb21-F/CYP-sb21-R2 프라이머 세트를 이용하여 pET28b-*cypsb21-RhFRED*로부터 증폭시켰다. RhFRED-*fdx* 유전자 단편은 RhFRED-Fdx-F/RhFRED-Fdx-R 프라이머 세트를 사용하여 pET28b-*RhFRED-fdx*로부터 증폭되었다. 설계된 중첩 서열을 가진 2개의 PCR 산물을 혼합하여 결합시켰고 연장시켰으며, 최종적으로 CYP-sb21-F2/RhFREDfdx-R 프라이머 세트에 증폭시켜 융합된 *cyp-sb21-RhFRED-fdx* 유전자를 제작하였는데, 이는 pET-28b의 NdeI 및 HindIII 제한효소 사이트에 서브클로닝되어, pET-28b-*cyp-sb21-RhFRED-fdx*를 얻어냈다. *S. elongatus* PCC 7942의 Fdx 및 FdR 발현을 위한 pET28b-*sefdx* 및 pET28b-*sefdR* 벡터는 Xuefeng Lu(Qingdao Institute of Bioenergy and

Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences)로부터 제공받았다. pCDFDuet-*sef*dR-*sef*dx 공발현 벡터의 구축을 위해, 필요한 제한효소 사이트를 가진 *sef*dx 및 *sef*dR 유전자는 PCR 증폭되었고, 그 후 pCDFDuet-1의 NdeI-XhoI 및 BamHI-HindIII 사이트에 삽입되었다. 전-세포 형질전환 균주 W1을 얻기 위해서, 플라스미드 pET-28b-*cyp*-*sb21* 및 pCDFDuet-*sef*dR-*sef*dx는 *Escherichia coli* BL21(DE3) 세포로 공동형질전환되었다. pET-28b-*gdh*-*cyp*-*sb21*은 다음과 같이 구축되었다. 우선, *Bacillus subtilis* 유래 *gdh* 유전자는 pET-28b에 삽입되었고, *cyp*-*sb21*은 pCDFDuet-1에 삽입되었다. 그 후, T7 프로모터 서열을 포함하는 단편을 얻기 위해서, 상기 플라스미드를 EcoRI/XhoI으로 절단하였다. pET-28b-*gdh*-*cyp*-*sb21*을 얻기 위해서, 최종 DNA 단편을 pET28b-*cyp*-*sb21* 내로 삽입하였다. 플라스미드 pET-28b-*gdh*-*cyp*-*sb21* 및 pCDFDuet-*sef*dR-*sef*dx는 *E. coli*로 공동형질전환시켰고, 그 결과 균주 W2를 얻었다. 상기에 설명한 구조체들은 Sangon Biotech (Shanghai, China)의 DNA 서열분석을 통해 확인되었다.

표 2

<i>E. coli</i> strain or plasmid	Characteristic(s)	Source or reference
Strains		
DH5α	Cloning host	Life Technologies
BL21(DE3)	Expression host	Life Technologies
W1	Recombinant <i>E. coli</i> strain coexpressing CYP-sb21, seFdx, and seFdR	This work
W2	Recombinant <i>E. coli</i> strain coexpressing GDH, CYP-sb21, seFdx, and seFdR	This work
Plasmids		
pET28b- <i>cyp</i> - <i>sb21</i>	Vector for heterologous expression of CYP-sb21	This work
pET28b- <i>cyp</i> - <i>sb21</i> -RhFRED	Vector for expression of the CYP-sb21-RhFRED fusion protein	This work
pET28b- <i>cyp</i> - <i>sb21</i> -RhFRED-Fdx	Vector for expression of the CYP-sb21-RhFRED-Fdx fusion protein	This work
pCDFDuet-1-seFdx/seFdR	Vector for coexpression of seFdx and seFdR	This work
pET28b- <i>gdh</i> - <i>cyp</i> - <i>sb21</i>	Vector for coexpression of GDH and CYP-sb21	This work

3. 단백질 정제

구축된 플라스미드는 *Escherichia coli* BL21(DE3)로 형질전환되었다. 형질전환체의 단일 콜로니를 50 mg/liter 카나마이신이 포함된 LB 배지에 접종하였다. 37℃에서 밤새도록 키운 종균 배양(seed culture)은 50 mg/liter 카나마이신, 1 mM 티아민(thiamine), 10% 글리세롤(glycerol) 및 약간의 염 용액이 포함된 LB 배지 1 리터에 1:100으로 접종하여 사용하였다. 단백질 발현은 0.2 mM 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; IPTG)로 유도되었고, 600 nm에서의 광학 밀도(OD₆₀₀)가 0.6 내지 1.0에 도달하면, 1 mM δ-아미노레불린산(δ-aminolevulinic acid)을 헴(heme) 합성 전구체로서 첨가하였다. 그 후, 세포는 18℃에서 20시간 동안 진탕 배양하였다. 이후의 단백질 정제 과정은 이전에 보고된 방법에 따라 수행하였다(Chem Biol 5:661-667, 1998). SDS-PAGE를 통해 측정된 결과, 모든 정제 효소는 >95%인 것으로 검증되었고(도 2A), 상기 정제된 효소는 -80℃에서 보관되었다. UV-가시성 스펙트럼은 DU 800 spectrophotometer (Beckman Coulter)로 얻었다. CYP-sb21의 기능적 농도는 91,000M⁻¹·cm⁻¹의 흡광 계수(extinction coefficient)(ε₄₅₀₋₄₉₀)를 이용하여 CO-결합 환원 차이 스펙트럼(CO-bound reduced difference spectrum)으로 계산하였다. 레독스 파트너 단백질의 농도는 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)을 사용한 표준 Bradford assay를 통해 측정하였다.

4. CYP-sb21 활성에 대한 In vitro 효소 분석

표준 반응 혼합물은 10 μM CYP-sb21, 10 μM RhFRED (또는 10 μM Fdx + 10 μM FdR), 200 μM CsA (메탄올에 녹인 20 mM 스톡 용액으로부터 희석) 및 100 μl 반응 완충액(50 mM NaH₂PO₄, 10% glycerol [pH 7.4])에 녹인 1 mM NADPH를 함유하고 있다. NADPH 재생 시스템에 따라 선택적으로, 5 U 글루코스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase; GDH) 및 20 mM 글루코스가 첨가되었다. CYP-sb21 효소의 자가 공급 버전에 있어, 상기 언급한 표준 반응 혼합물에서 10 μM CYP-sb21-RhFRED 또는 CYP-sb21-RhFRED-Fdx가 분리된 P450 및 레독스 파트너 단백질의 대체물로 사용되었다. H₂O₂ 섀트 경로(H₂O₂ shunt pathway)를 통한 P450 촉매 반응은 단일 산소 및 전자 공여자로 H₂O₂를 사용하는데, 이때 P450 환원효소 및 NADPH는 필요하지 않다. 상기 가능성을 시험하기 위해서, CYP-sb21 반응 혼합물에 P450 환원효소 및 NADPH를 대체하기 위한 200 μM H₂O₂를 첨가하였다. 30℃에서 16시간 동안 혼합물을 반응시킨 후, 100 μl 메탄올을 첨가하여 상기 반응을 중단시켰다. 침전된 단백질을 제거하기 위해서 샘플을 원심분리하였고, 탈이온화된 물에 녹인 25.0% 메탄올(용매 A) 및 100% 아세토니트릴(용매 B)로 구성

된 구배 시스템(gradient system)에서 SB-C₁₈ column(3.5 μ m, 4.6 by 150 mm; Agilent)을 가진 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography; HPLC)로 상등액을 분석하였다. 완충액 B 구배의 1 사이클은 다음과 같이 프로그램되어 있다: 40% 완충액 B로 4분 동안, 40 내지 61% 완충액 B로 20분 동안, 61 내지 100% 완충액 B로 40분 동안 및 40% 완충액 B로 45분 동안 반응. 검출은 210 nm에서 수행하였다. 유량은 1.0 ml/min였고, 주입 부피는 60 μ l였다.

[0043] 5. NADPH 커플링(coupling) 효율

[0044] NADPH 커플링 효율은 다음과 같이 측정하였다. NADPH 소비는 Synergy HT plate reader (BioTek)를 사용하여 340 nm에서 관측하였고, 6.22 mM⁻¹ · cm⁻¹의 흡광 계수(extinction coefficient)로 계산하였다. 기질 소비율은 HPLC에 의해 측정하였다. 모든 측정은 2번 반복하여 수행하였다. 커플링 효율은 전체 소비된 NADPH 당 산물 형성에 사용된 NADPH의 백분율로 계산하였다.

[0045] 6. 산물의 LC-Q-TOF/MS 분석

[0046] Thermo Scientific Hypersil Gold column (5 μ m, 2.1 mm by 100 mm)을 사용하여, maXis ultrahigh-resolution TOF system (Bruker Daltonik, Germany)으로 액체 크로마토그래피-사중극자 비행시간형 질량분석기(Liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry; LC-Q-TOF/MS) 분석을 수행하였는데, 용매 A로는 H₂O + 25% 메탄올(methanol; MeOH) 및 용매 B로는 아세토니트릴(acetonitrile)로 하여 30℃에서 수행하였다. 구배 용출 프로파일은 다음과 같다. 40% 용매 B로 0 내지 4분 동안, 40 내지 61% 용매 B로 4 내지 15분 동안, 61 내지 100% 용매 B로 15 내지 32분 동안 및 40% 용매 B로 32 내지 35 분 동안 반응. 유량은 0.2 ml/min였고, 주입 부피는 1 μ l였다.

[0047] 7. 공용매 시스템의 최적화

[0048] CsA는 물에 거의 용해되지 않는데, 최대 수성 용해도는 ~ 5 내지 10 μ M를 측정되었다(<http://www.lclabs.com/products/37-c-6000-cyclosporin-a/sds>). 전환율을 개선시켜 CsA를 좀 더 물과 섞일 수 있게 하기 위해서, 에탄올, 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO) 및 메탄올과 같은 공용매를 1%, 10% 또는 20% (vol/vol)으로 CYP-sb21 효소 분석 혼합물에 첨가하였다. CsA 수산화반응에 있어서, 공용매의 형태 및 백분율에 대한 영향을 HPLC를 통해 비교하여 평가하였다.

[0049] 8. 전-세포 생전환(Whole-cell biotransformation)

[0050] pET28b-cypsb21/pCDFDuet-sefdR-sefdx (W1) 또는 pET28b-gdh-cyp-sb21/pCDFDuet-sefdR-sefdx (W2)를 가진 *E. coli* 세포는 50 mg/liter 카나마이신 및 스트렙토마이신이 함유된 LB 배지에서 37℃로 배양하였다. 단백질 발현은 상기에 언급한 바와 같이 수행하였다. 원심분리에 의해 세포를 수확하였고, 0.3% (wt/vol) *N*-세틸-*N,N,N*-트리메틸암모늄 브로마이드(*N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide; CTAB)가 포함된 50 mM 포타슘 포스페이트 완충액(potassium phosphate buffer; pH 7.5)에 재현탁시켜, ml 당 200 mg의 세포(건조중량)가 포함된 부유액을 제조하였다. 다음으로, CsA 및 NADPH를 최종 농도 100 μ M로 각각 첨가하였고, 오비탈 셰이커(orbital shaker)에서 150 rpm으로 12시간 동안 30℃에서 동시배양하였다. W2에 의한 생전환을 위해, 100mM 글루코스를 추가로 첨가하였다. 5 ml의 반응 슬러리(slurry)를 포함한 50-ml 진탕 플라스크에서 생전환을 수행하였다. 반응 혼합물은 동량의 에틸 아세테이트로 완전히 2번 추출하였다. 혼합된 유기 용매 추출물은 질소 유입에 의해 건조되었고, 실험 샘플로서 100 μ l MeOH에 재현탁시켰다. 모든 샘플은 HPLC로 분석하였다.

[0051] 9. 통계분석

[0052] 그룹 간 유의적 차이를 평가하기 위해서, *t* test를 사용하였다. 각각의 실험 수치는 평균±표준편차(standard deviation; SD)로서 표시하였다. *P* 수치 0.05는 통계적 유의성을 나타낸다.

[0053] <실시예 1> *E. coli*에서 *S. benihana* CYP-sb21 및 대체 레독스 파트너의 발현

[0054] 원래 CYP-sb21은 *E. coli*에서 낮은 수준으로 발현되었기 때문에, *E. coli* 코돈 선호도에 따라 cyp-sb21 서열은 최적화되었다. 코돈-최적화된 cyp-sb21 및 관련 융합 유전자들은 성공적으로 발현되었고, 동질성(homogeneity)을 갖고 정제되었다(도 2A). 다른 버전의 CYP-sb21 단백질에 대한 CO-결합 환원 차이 스펙트럼(CO-bound reduced difference spectrum)은 450 nm에서 특징적인 피크를 나타내는데, 이는 기능성 P450 효소가 발현된다는 것을 나타낸다(도 2B). 또한, sefdx, sefdR 및 RhFRED와 같은 대체 레독스 파트너 단백질을 발현시켰고, SDS-PAGE에 의해 정제하였다(도 2A).

[0055] <실시예 2> 다른 버전의 CYP-sb21 효소에 의한 *in vitro*에서 CsA로부터 CsA-4-OH로의 전환

[0056] CYP-sb21의 *in vitro* 활성에 대한 재구성은 상업적으로 구할 수 있는 시금치 레독스 파트너 단백질 spFdx 및 spFdR을 사용하면서 시작되었다. 아쉽게도, 상기의 흔히 사용되는 레독스 시스템은 CYP-sb21 활성을 나타내는데 실패하였다(도 3A). 이전 *in vivo* 연구에서 CYP-sb21이 CsA의 CsA-4-OH로의 전환을 담당하는 것으로 명백히 확인되었기 때문에, 상기 결과는 P450 효소와 레독스 파트너의 불일치로 인한 것으로 여겨진다.

[0057] 다음으로, 본 발명자들은 시아노박테리아 시스템 seFdx/seFdR 및 *Rhodococcus* sp. 유래 RhFRED를 포함하는 다른 2개의 레독스 시스템을 시험하였다. 그 결과, seFdx/seFdR 및 RhFRED 모두 동일한 극성 산물을 생산하는 CYP-sb21 활성을 뒷받침하는 것을 확인할 수 있었다. 고-분해능 질량 분석(High-resolution mass spectrometric analysis) 결과, 상기 산물에 대해 1,240.8254의 *m/z* 수치(분자식 $C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}Na$ [산출 *m/z* 1,240.8261])를 나타냈는데, 이는 $[CsA + Na]^+$ 의 분자량보다 16 Da 크다(관측 *m/z* 1,224.8305; 산출 *m/z* 1,224.8311). 실제 표준 CsA-4-OH와 동일한 체류 시간(retention time) 및 공용리(coelution)를 보이는데, 이는 CsA의 *N*-methyl-L-Leu4의 γ 위치에 수산화반응이 일어나는 것으로 확인되었다. 정량적으로, seFdx/seFdR 및 RhFRED를 이용한 CYPsb21 반응에 대한 전환율은 각각 25.0% 및 17.3%였다.

[0058] 또한, 본 발명자들은 CsA를 수산화시키기 위해, 자가-공급 P450 효소 CYP-sb21-RhFRED 및 CYP-sb21-RhFRED-Fdx를 사용하였다. CYPsb21-RhFRED는 CsA를 CsA-4-OH로 9.4% 전환시켰으나, CYP-sb21-RhFRED-Fdx는 동일한 반응을 거의 촉매하지 않았다(도 3A).

[0059] <실시예 3> *in vitro*에서 CYP-sb21/seFdx/seFdR 반응 시스템의 최적화

[0060] CsA는 물에 거의 용해되지 않는다. 잠재적인 생적합성 유기 용매가 소수성 화합물에 대한 생촉매 활성을 개선시킨다는 보고가 있다. 따라서, CsA를 좀 더 물에 섞일 수 있게 하여 전환율을 개선시키기 위해서, 에탄올, DMSO 및 메탄올을 포함하는 다른 공용매를 시험하였다. 시험한 유기 공용매 시스템 중, 10% 메탄올이 가장 높은 생전환율인 53.0%를 나타냈다(표 3). 하지만, 상기 조건 하에서 NADPH 커플링 효율은 단지 7.9%였다. 특히, 모든 공용매의 농도가 > 10%이면, CsA-4-OH의 양은 감소하였다. 이는 고농도의 유기 용매에 의한 효소 변성에 의한 것으로 보인다. 표 3은 CYP-sb21/seFdx/seFdR 반응 시스템으로 30℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 모든 실험은 2번 반복하였고, 표준 편차는 모두 < 10% 였다.

표 3

Cosolvent	Concn (%)	Conversion rate (%)
Ethanol	1	19.2
	10	32.3
	20	26.8
DMSO	1	20.1
	10	39.6
	20	29.0
Methanol	1	25.0
	10	53.0
	20	44.9

[0061]

[0062] NADPH는 P450 촉매반응에 필요한 보조 인자이다. NADPH 재생 시스템이 P450 촉매 효율을 상당히 증가시킨다는 것은 잘 알려졌다. 몇몇 케이스에서, 상기 시스템은 중요 화합물의 합성에도 필요한 것으로 알려졌다. 이에, 본 발명자들은 GDH/glucose NADPH 재생 시스템을 사용하여 CYP-sb21 반응을 좀 더 최적화시켰고, 83.5%의 CsA 전환율을 얻을 수 있었다(도 3B).

[0063] <실시예 4> 전-세포 생전환

[0064] 전-세포 시스템은 산업에 있어 크게 중요시되고 있다. 이는 효소 정제를 위한 비싼 공정을 피할 수 있고, 불활성화로부터 효소를 보호할 수 있다. 전-세포 촉매로서, CYP-sb21, seFdx 및 seFdR을 동시 발현하는 재조합 *E.*

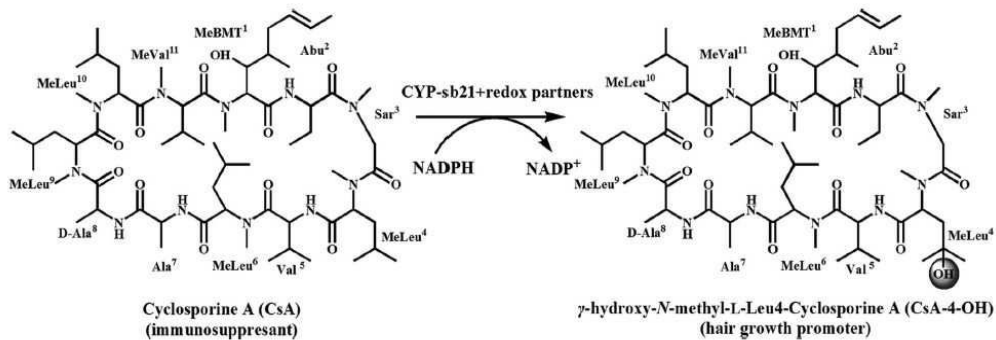
coli 균주 W1을 구축하였고, 배양하였으며, 수확하였다. 본 발명자들은 *in vitro* 효소 분석 과정에서 10% 메탄올, 10% DMSO 또는 10% 에탄올을 포함하는 공용매를 첨가하여, 기질 용해도 및 흡수를 향상시키기 위한 시도를 하였다. 아쉽게도, 아무런 산물도 검출할 수 없었다. 이는 CsA에 대한 박테리아 외막의 불투과성 때문인 것으로 보인다.

[0065] 상기 문제를 해결하기 위해서, 200 mg (건조 중량) cells/ml, 100 μ M NADPH 및 100 μ M CsA로 이루어진 전-세포 생전환 시스템에 흔하게 사용되는 계명활성제인 CTAB을 첨가하였다. CTAB 농도의 최적화에 따라, 0.3% (wt/vol) CTAB을 처리시 전환율은 $45.4\% \pm 4.2\%$ 로 증가하였다(도 4). 또한, GDH를 동시발현하는 재조합 *E. coli* 균주 W2는 CsA 생전환율을 $53.5\% \pm 5.2\%$ 로 더 증가시켰다. W1에 비해 W2에 의한 전환 백분율은 통계적으로 유의성이 있었다 ($P < 0.05$).

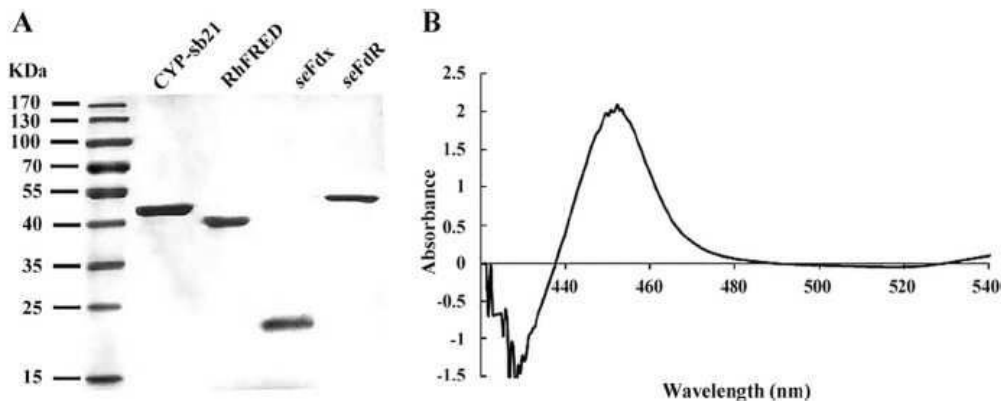
[0066] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

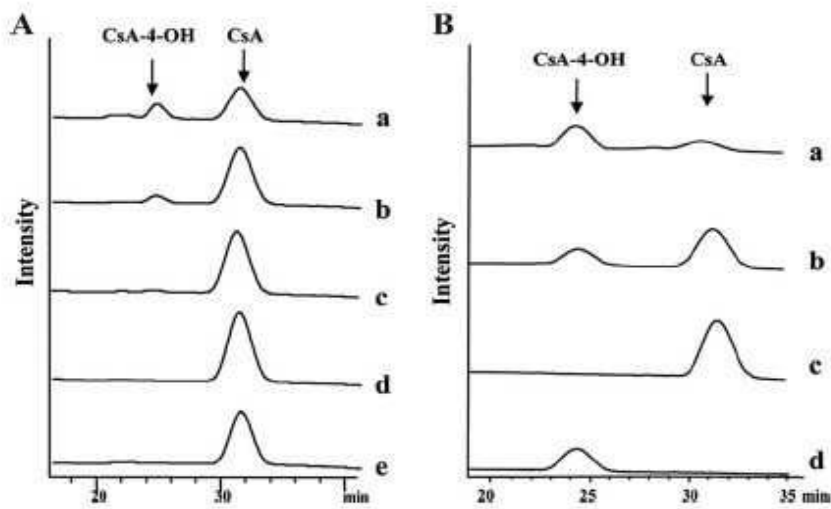
도면1



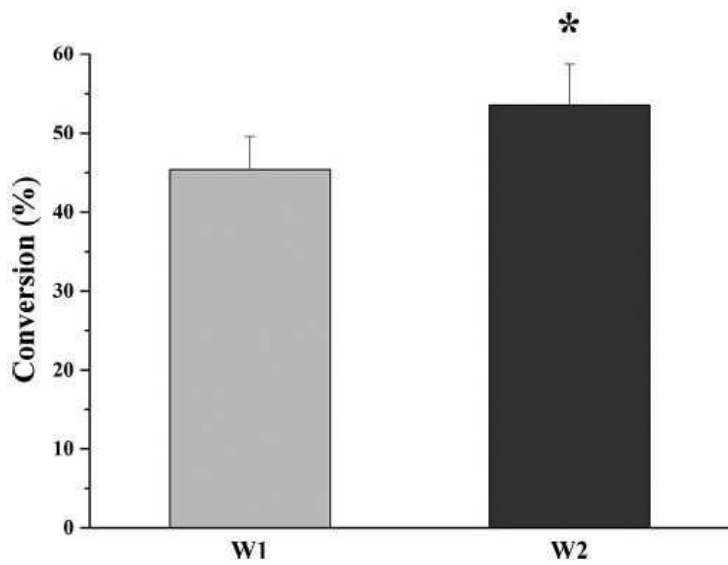
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Codon optimized cyclosporine specific P450 hydroxylase and whole cell biotransformation of cyclosporine in E. coli using thereof
- <130> ADP-2015-0456
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1236
- <212> DNA

<213> Sebekia benihana

<400> 1

atggacaccg ttaatctgat ggaccacgct ctgatgaccg atccattccg tggtttcagc	60
cgtattcgcg aagaagcgcc tattgcccgc gcttgcttcc ctggccaaga taccgccgac	120
tggctggtga cgcgctacga tgatgtaaaa actgtcctgg gcgagcaccg ttctgttaac	180
aaccggcggt ccatccctgg cggcgacatt cctgatctgc gtgagaaact gatgaaagcg	240
cgtggcattc cggatgacta cgttgtttac ctgaccgatg gcatcctgga cctggatggt	300
gacgaccatc tgcgtctcgc tcgtctggtg tcccgctcgt tcaccgctcg ccgtgtaatg	360
gaaatgcgtc cgcgcgtaga agaaatctct ggtcgcctgc tggacgctct gccgggtgac	420
cgtgtcgtcg acctggttga agagtacgcc taccactgc cgatcacctg gatctgtgaa	480
ctggtgggca tcccggaag cgaccgtccg ctgtggcgcg aatggggtgc taaaatggtg	540
tccctgtctc cgggtgcaat ggccgagccg gttatcagca tggttgatta catccacgat	600
ctgattccac gtcgccgcgc cgccccggcg gatgatctgc tgactggcct gatcaaagcg	660
cacgacgacg acggcgaccg ctttactgac acggagctga ttacgatggt actgaccctg	720
gttctggcag gtcacgaaac cactgctcac ctgatcggtg acggtaccgc tgcgtgctg	780
actcatccgg gtcagctggc aatgctgcgt gcgcgtcctg aactgatgcc gcgtgcggtg	840
cacgagctga tgcgttggtg tggccgggtg cagggtactc gtgttcgtta tgcagcagag	900
gatgtcgaac tgggtggcat gaccgttaag cgtggcgaag cagtgatggc agtactggtg	960
tctgcgaact atgateccgc tcgctttgaa cgtccggacc gtctggacct gaccctgaa	1020
gaagatggcc gtcgcgaagt tcatgtgggt ttcggccacg gtctgcacta ttgcctgggc	1080
gctgcactgg ctgccagga aggtgaagtg gcttttctg gtctgctgtc tcgtttcccg	1140
aaactgcgtc tggctgttgc gccggaagaa ctggaacgtc agctgatgcc ggcctcttgg	1200
cgcttgccat ccctgccggt tctgtctgcgc ctcgag	1236