(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0052242
(43) 공개일자 2022년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 17/18* (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C12P 17/188 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0180109
(22) 출원일자 2020년12월21일
심사청구일자 2020년12월21일
(30) 우선권주장
1020200135879 2020년10월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
오민규
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호
박부수
경기도 하남시 위례중앙로 215, 6045동 903호
조희근
서울특별시 동작구 국사봉6길 42, 202호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

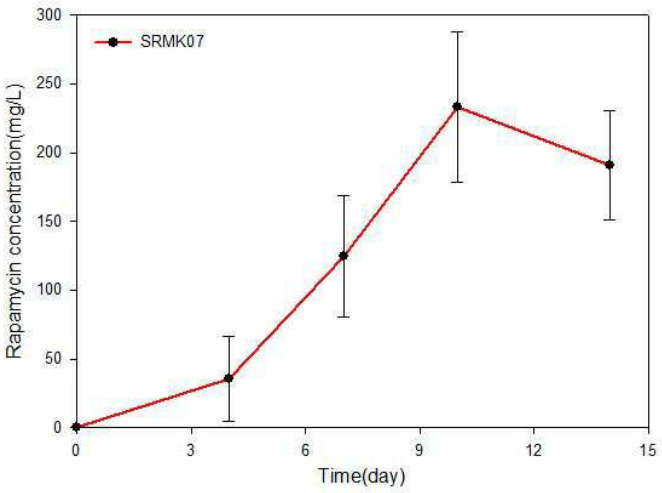
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **증가된 라파마이신 생산능을 가지는 변이주 및 이를 이용한 라파마이신 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 신규 라파마이신 고생산 변이주 및 이를 이용한 라파마이신의 생산방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12R 2001/465 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105405
과제번호	2018M3A9F3079662
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미생물 제어 및 응용 원천기술개발
연구과제명	방선균 시스템 재설계 기반 고부가 의약물질 고생산 산업균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 14310BP로 기탁된, 증가된 라파마이신 생산능을 가지는 스트렙토마이세스 라파마이시노커스 변이주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변이주는 인공돌연변이 방법으로 제조된 것인, 변이주.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 변이주를 배양하는 단계를 포함하는, 라파마이신의 생산방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 방법은 상기 변이주 또는 이의 배양물로부터 라파마이신을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 라파마이신의 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 증가된 라파마이신 생산능을 가지는 변이주 및 이를 이용한 라파마이신의 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 방선균(Streptomyces)은 유전체 내에 평균적으로 20~40개 정도의 생합성 유전자 클러스터 (biosynthetic gene cluster, BGC)를 가지고 있으며, 이들 각각의 BGC는 특정한 이차대사산물(secondary metabolite) 생산에 관여한다. 이들 이차대사산물 중 많은 수가 생리 활성을 가지고 있기 때문에 방선균은 항생제, 항진균제, 항암제 등 다양한 생리활성 물질의 생산 균주로써 잘 알려져 있으며, 현재 의학적으로 사용되는 자연계 유래의 항생제 중 2/3 이상이 방선균에서 생산된다고 알려져 있다.

[0004] 그러나, 방선균이 생산하는 생리 활성 물질 중 많은 수는 야생형 균주에서 생산되는 생산량이 매우 적다는 문제점이 존재한다. 따라서, 미생물에서 특정한 유용 물질을 대량 생산하고자 할 때 사용하는 다양한 유전자 조작 방법을 통해 필요한 유전자를 과발현 시키거나 혹은 타겟 물질과 경쟁하는 부산물 생산 경로를 제거함으로써 생산량을 증가시키는 방법을 사용하는 고려하였으나, 방선균은 유전체 내 GC (Guanine, Cytosine) 비율이 약 70% 정도로 매우 높기 때문에 PCR을 비롯한 기본적인 유전자 조작 전략을 적용하는 것이 용이하지 않았다.

[0006] 한편, 라파마이신은 시로리무스(sirolimus)로도 알려져 있으며 장기 이식 시 면역거부반응을 억제하기 위하여 사용되는데 특히, 신장 이식에 주로 사용되고 있다. 그리고 라파마이신은 최근 면역억제제로서 효과가 우수하고 관상동맥 스텐트 코팅에도 적용되면서 급격한 성장세를 보이고 있는 에베로리무스(everolimus) 합성을 위한 전구체로 사용되기 때문에 그 유용성이 높이 평가되고 있는 물질이며, 실제로 관련 시장 또한 성장 추세에

있다.

[0007] 라파마이신은 다양한 방법으로 생산되고 있는데, 그 중 일 방법으로 방선균인 스트렙토마이세스 라파마이시니커스 ATCC 29253 균주를 이용하여 생산되고 있다. 그러나, 그 생산량이 60~70 mg/L 수준에 불과하여 여전히 생산량을 증가시키기 위한 연구가 필요한 상황이다.

[0009] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 종래의 균주들보다 수율이 좋은 라파마이신 생산 균주를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 라파마이신 생산 균주를 이용하여 무작위 돌연변이로 얻어진 변이주가 종전 균주 대비 라파마이신을 현저히 우수하게 생산한다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 증가된 라파마이신 생산능을 가지는 신규 스트렙토마이세스 속 변이주를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 변이주를 이용하여 라파마이신을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0015] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 증가된 라파마이신 생산능을 가지는 신규 스트렙토마이세스 속 변이주를 제공한다.

[0018] 구체적으로는, 상기 변이주는 기탁번호 KCTC 14310BP로 기탁된 증가된 라파마이신 생산능을 가지는 스트렙토마이세스 라파마이시노커스 변이주이다.

[0020] 본 발명에서 용어, “라파마이신”은 1975년에 Easter Island의 토양에서 분리한 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(Streptomyces hygroscopicus)의 배양액으로부터 발견된 이차대사산물로서 마크로사이클릭 폴리케타이드 계열의 화합물이다. 1974년에 Ayerst 사가 항생제로서 라파마이신을 물질특허로 출원 및 등록하였고(미국등록특허 제3,929,992호), 이후 Wyeth(현재 Pfizer) 사가 1989년에 라파마이신을 면역억제제의 용도로 특허출원 및 등록(미국등록특허 제5,100,899호)한 다음, 1999년에 미국 FDA의 승인을 받아 ‘Rapamune’이라는 상품명으로 판매하고 있는 물질이다.

[0021] 라파마이신은 시로리무스(sirolimus)로도 알려져 있으며 장기 이식 시 면역거부반응을 억제하기 위하여 사용되는데 특히, 신장 이식에 주로 사용되고 있다. 그리고 라파마이신은 최근 면역억제제로서 효과가 우수하고 관상동맥 스텐트 코팅에도 적용되면서 급격한 성장세를 보이고 있는 에베로리무스(everolimus) 합성을 위한 전구체로 사용되기 때문에 그 유용성이 높이 평가되고 있다.

[0023] 본 발명의 라파마이신 고생산 변이주는 모균주인 스트렙토마이세스 라파마이시니커스 ATCC 29253 균주를 돌연변이시켜 원하는 변이주를 얻을 수 있다. 이때, 미생물의 돌연변이 유발은 해당 분야에서 널리 알려진 다양한 수

단에 의해 수행될 수 있으며, 물리적 혹은 화학적 돌연변이 발생 둘 중의 하나의 방법이나, 또는 DNA 재조합이나 P1 박테리오파아지를 매개로 한 형질도입 등의 방법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 화학적 돌연 변이 유발 요인으로는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(N-Methyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine, NTG), 디에폭시부탄, 에틸메탄 설폰에이트, 머스타드 화합물, 히드라진 및 아질산을 사용할 수 있으나, 이러한 화합물들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 물리적 돌연변이 유발 요인은 자외선 및 감마 방사선을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 돌연변이 유발 시에 모균주는 특정 크기의 생존 개체군을 남겨둘 정도의 농 도에서 돌연변이 유발 인자에 의해 영향을 받는다. 상기 크기는 돌연변이 유발 인 자들 종류에 따라 변화하며, 돌연변이 인자가 일정한 살생율로 생존 개체군내에 유 발하는 돌연변이의 양에 의존한다. 예를 들어, NTG의 경우 살생율은 출발 개체군의 10% 내지 50%를 대략적으로 남겨둘 수 있다. 아질산에 의한 돌연변이 발생은 출발 개체군의 0.01% 내지 0.1%를 대략적으로 남겨둘 수 있으며, 자외선에 의한 돌연변 이 발생은 대략 1.0%를 남겨둘 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 야생형 균주인 스트렙토마이세스 라파마이시니커스 ATCC 29253에 돌연변이원을 처리한 후, 액체 배양을 통해 각 균주의 라파마이신 생산량을 확인하여 라파마이신 생산량이 높은 본 발명의 신규 변이주를 선발하였다.

[0027] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 신규 변이주는 라파마이신 고생산능을 가지며, 야생형 균주인 스트렙토마이세스 라파마이시니커스 ATCC 29253과 비교하여 증가된 라파마이신 생산능을 나타낸다.

[0029] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 변이주를 배양하는 단계를 포함하는 라파마이신 생산방법을 제공한다.

[0030] 또한, 상기 방법은 상기 변이주 또는 이의 배양물로부터 라파마이신을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어, “변이주” 및 “라파마이신”은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0033] 본 발명의 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 미생물을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알 려져 있는 스트렙토마이세스 라파마이시니커스의 배양 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양방법의 예에는, 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture) 및 유가식 배양(fed-batch culture)이 포함되나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 이러한 다양한 방법은, 예를 들면, "Biochemical Engineering" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991) 등에 개시되어 있다.

[0034] 본 발명의 용어 "배양물"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건하에 생육 중이거나 생육 완료된 배지를 포함하는 물질을 의미한다. 협소한 의미로 상기 배양물에는 생육된 미생물은 포함되지 않으나, 광의 의미에는 포함될 수 있다. 상기 “배양물”은 미생물 배양을 위해 조성된 배지 성분과 함께 미생물이 생육 중에 배지 내로 배출시킨 다양한 물질을 포함하고, 구체적으로 목적 물질인 라파마이신이 포함되어 있다.

[0035] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 스트렙토마이세스 속 균주에 대한 배양 배지는 공지되어 있다. 또한, 사용될 수 있는 당원으로는 글루코스, 사카로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

[0036] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함될 수 있으나, 이에 제 한되지 않는다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다.

[0037] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함 유 염이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에

의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.

[0038] 한편, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기 체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 45℃일 수 있다. 배양 은 원하는 라파마이신의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 160 시간에서 달성될 수 있다. 라파마이신은 배양 배지 중으로 배출되거나, 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용할 수 있는 라파마이신의 회수 방법은 당업계에서 알려진 방법, 예컨대 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 또는 HPLC 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0041] 본 발명의 신규 균주는 라파마이신을 종래의 야생형 균주 대비 현저히 우수하게 생산할 수 있어, 라파마이신 생산에 효과적으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 라파마이신 고생산 균주의 구축 방법을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 라파마이신 고생산 균주의 라파마이신 생산량을 확인한 도이다.

도 3은 야생형 균주와 본 발명의 라파마이신 고생산 균주의 유전체 분석을 위한 gDNA 퀄리티를 확인한 도이다.

도 4는 야생형 균주와 본 발명의 라파마이신 고생산 균주의 유전체 서열을 확인한 도이다.

도 5는 야생형 균주와 본 발명의 라파마이신 고생산 균주의 일루미나 데이터를 야생형 균주 유전체에 맵핑한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 라파마이신 고생산 균주의 유전체 소실을 확인하여 그 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1: 인공변이법을 통한 변이주 선별**

[0047] 라파마이신 생산능을 가지는 미생물 변이주를 얻기 위해 하기와 같은 방법을 사용하여 미생물의 변이를 유도하였다.

[0048] 구체적으로, 야생형 스트렙토마이세스 라파마이시니커스(S. rapamycinicus) 균주의 포자를 TM 버퍼를 이용하여 1×10^{-6} /ml 수준으로 희석한 뒤, 이를 3mg/mL NTG와 9:1 (포자 용액 9, NTG 용액 1) 비율로 섞고, 28° C 쉐이킹 인큐베이터(shaking incubator)에서 30분 ~ 1시간 정도 인큐베이션하였다. 이후, 상기 혼합액 100ul를 페트리 접시 상의 고체 배지에 고르게 도말하고, 40W, 254nm 파장, 25~30cm 거리의 UV에 30초간 노출시켜 사멸률이 약 99%가 되도록 하였다. 이후, 이를 28° C에서 약 7일간 배양하여 NTG 및 UV에 의해 돌연변이가 유발된 균주들을 수득하고, 액체 배양을 통해 각 균주의 라파마이신 생산량을 확인함으로써 라파마이신 생산량이 높은 균주를 선별하였다.

[0050] 상기의 방법으로 얻어진 변이주를 스트렙토마이세스 라파마이시니커스 SRMK07 (Streptomyces rapamycinicus SRMK07)이라 명명하였고, 2020년 9월 15일자로 부다페스트 조약하의 국제 기탁기관인 한국생명공학연구원에 기탁하여 수탁번호 KCTC14310BP를 부여받았다.

[0053] **실시예 2: 신규 변이주 SRMK07의 라파마이신 생산량 확인**

[0054] 상기 실시예 1에서 수득한 본 발명의 신규 균주 SRMK07의 라파마이신 생산량을 하기의 방법으로 확인하였다.

[0055] 구체적으로, 본 발명의 신규 균주 배양액과 에틸 아세테이트를 1:1 비율로 섞어 약 30분간 볼텍싱한 뒤 원심 분리하여 상등액을 채취하고, 상기 상등액을 Speed Vacuum을 이용해 증발시킨 뒤, 남아 있는 침전물을 메탄올에 녹여서 라파마이신 생산량을 분석하였다. 분석에는 HPLC를 사용하였으며, 이 때 컬럼은 C18, 이동상은 증류수와 아세토나이트릴을 사용하였고, 증류수와 아세토나이트릴의 비율을 80:20에서 20:80으로 점차적으로 변화시키는 방법으로 물에 녹는 염(salt)들이 먼저 컬럼을 빠져나간 뒤 라파마이신 생산량을 분석하였다.

[0057] 한편, 라파마이신 생산량을 확인하기 위해 사용된 배지 조성은 하기 표 1과 같으며, 균주는 28° C, 250RPM의 조건에서 약 2주간 진탕 배양하였다.

표 1

[0059]

성분	농도 (g/L)
M100 (maltodextrin)	10
Glycerol	50
Cotton Seed Meal	10
Soybean Meal	10
Yeast Extract	6.5
$(NH_4)_2SO_2$	5
L-lysine	20
L-tyrosine	4
KH_2PO_4	0.7
K_2HPO_4	1.14
NaCl	5
$FeSO_4$-$7H_2O$	0.05
MES	42.6
pH	5.5

[0061] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 신규 균주 SRMK07은 플라스크 배양 시 약 200mg/L 이상의 라파마이신을 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이는 종래 알려진 라파마이신 생산 균주 스트렙토마이세스 라파마이시니커스 야생형 균주가 최적화 배지에서 플라스크 배양을 진행했을 때 70mg/L 수준으로 라파마이신을 생산하는 것 대비, 3배 가까운 생산량으로 현저히 우수하게 라파마이신을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[0063] **실시예 3: 본 발명의 신규 균주 SRMK07의 특성 분석**

[0064] **3-1: 야생형 균주 및 신규 균주 SRMK07의 유전체 분석**

[0065] 본 발명의 신규 균주 SRMK07의 특성을 분석하기 위해, 야생형 균주와 본 발명의 신규 균주 SRMK07에 대해 PacBio 및 Illumina 시퀀싱 방법으로 유전체 분석을 진행하고 그 결과를 비교하였다.

[0066] 구체적으로, 유전체 분석 진행을 위한 gDNA 확보를 위해 S. rapamycinicus 야생형 균주와 본 발명의 신규 균주 SRMK07를 TSB 배지 상에서 약 4~5일간 액체 배양한 뒤, 프로메가의 Genomic DNA isolation kit를 이용해 gDNA를 확보하였다. 유전체 분석을 위해서는 gDNA의 퀄리티(quality)가 중요하기 때문에, 아가로스 겔에서 gDNA 퀄리티를 먼저 확인 후, ㈜DNA 링크에 의뢰하여 추가적인 clean up 후 유전체 분석을 진행하였다.

[0068] 한편, 유전체 분석 결과 본 발명의 신규 균주 SRMK07는 하나의 콘티그로 이루어진 데이터를 수득하였지만, S. rapamycinicus 야생형 균주의 경우 유전체 데이터가 7개의 콘티그로 나뉘어져 있는 것을 확인하였다.

[0069] 추가적인 분석을 진행하기 위해서는, 야생형 균주와 본 발명의 신규 균주 모두 하나의 콘티그로 이루어진 유전체 데이터를 확보해야 하므로, NCBI에 등록되어 있는 S. ramapmycinicus 야생형 균주 유전체 데이터를 기반으로, 본 발명에서 확인된 야생형 균주 유전체 데이터 콘티그들을 연결하는 작업을 수행하였다. 이 때 콘티그들 사이의 순서를 파악할 때에는 하나의 콘티그로 이루어져 있지만 다수의 ambiguous sequence를 포함한 NCBI GCF_000418455 (chromosome : CP006567) 서열을, 이후 콘티그들 사이의 갭을 채워 넣을 때에는 4개의 콘티그로 이루어져 있지만 본 연구에서 보유하고 있는 유전체 데이터의 갭 부분 서열은 온전히 보전되어 있는 NCBI GCF_003675955 서열을 참조하였다.

[0070] 그 결과, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 야생형 균주와 본 발명의 신규 균주 SRMK07모두에 대해 하나의 콘티그로 이루어진 온전한 유전체 서열을 확보할 수 있었다 (도 4).

[0071] 갭 파일링까지 완료한 야생형 균주의 유전체 길이는 12,466,108bp이고, 본 발명의 신규 균주 SRMK07의 유전체 길이는 9,558,963bp로서 신규 균주 SRMK07의 유전체가 약 3Mbp 짧은 것을 확인할 수 있었으며, 야생형 균주와 비교했을 때 유전체의 양 끝 부분이 소실되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0073] **3-2: 야생형 균주 및 신규 균주 SRMK07의 유전체 데이터 맵핑**

[0074] 상기 실시예 3-1에서 확인한 유전체의 양 끝 부분 소실에 대해 좀 더 자세히 확인하기 위해, 야생형 균주의 일루미나 리드(illumina read)와 신규 균주 SRMK07의 일루미나 리드 각각을 야생형 균주 유전체 데이터에 맵핑해 보았다.

[0075] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 야생형 균주의 일루미나 리드를 야생형 균주 유전체 데이터에 맵핑할 경우 거의 모든 서열에 대해 맵핑이 이루어졌지만, 이와 달리 신규 균주 균주 SRMK07의 일루미나 리드를 야생형 균주 데이터에 맵핑할 경우에는, 양 끝 부분에 맵핑이 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[0076] 또한, 야생형 균주와 신규 균주 SRMK07의 gDNA를 이용하여 야생형 균주 유전체 양 끝 부분을 타겟으로 하는 8세트의 프라이머로 PCR을 진행해 본 결과에서도, 상기 도 5에서 확인한 결과와 마찬가지로, 신규 균주 SRMK07의 유전체 소실을 확인할 수 있었다(도 6).

[0078] 아울러, 유전체 상에 일어난 돌연변이들을 뉴클레오타이드 수준에서 분석한 결과에서도, 대부분의 변이는 유전체 양 끝 부분의 소실에 의한 결실 돌연변이였으며, 라파마이신 생합성에 관여하는 BGC (biosynthetic gene cluster/생합성 유전자 클러스터 : 특정 2차 대사산물 생합성에 관여하는 유전자들이 지놈 내에서 모여 있는 형태) 내에서는 두 개의 변이밖에 발견되지 않았다.

[0079] 결국, 이러한 결과를 방선규 유전체 양 끝 부분에 다수의 이차대사산물 유전자 클러스터가 밀집되어 존재한다는 사실이 알려져 있음을 토대로 생각하면, 양 말단에서의 유전체 소실에 의한 변화가 라파마이신 고생산에 주요한 영향을 주었을 것임을 시사한다.

[0081] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0083]

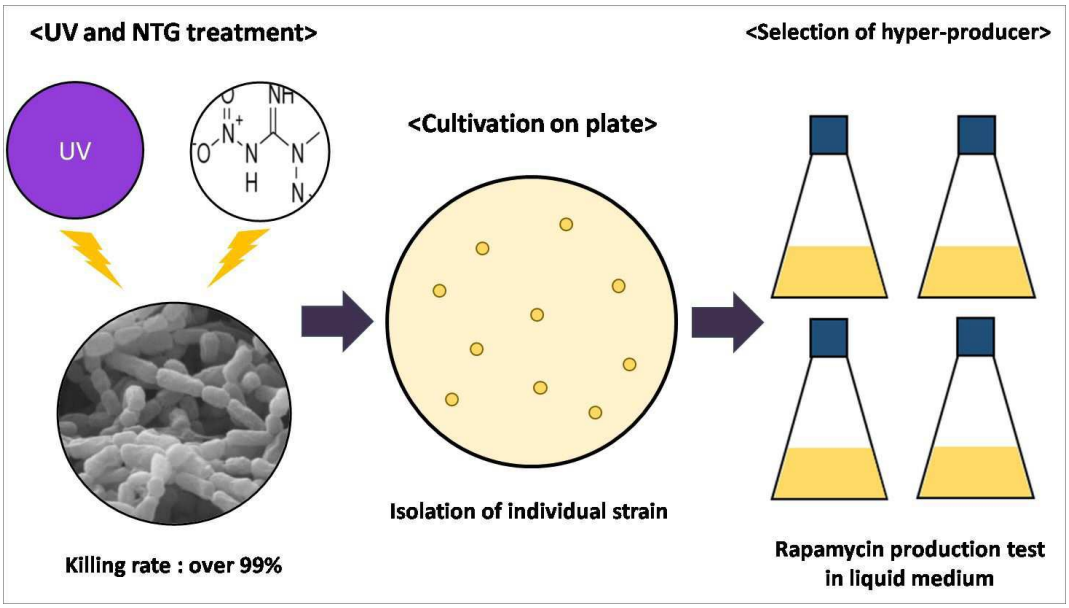
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14310BP

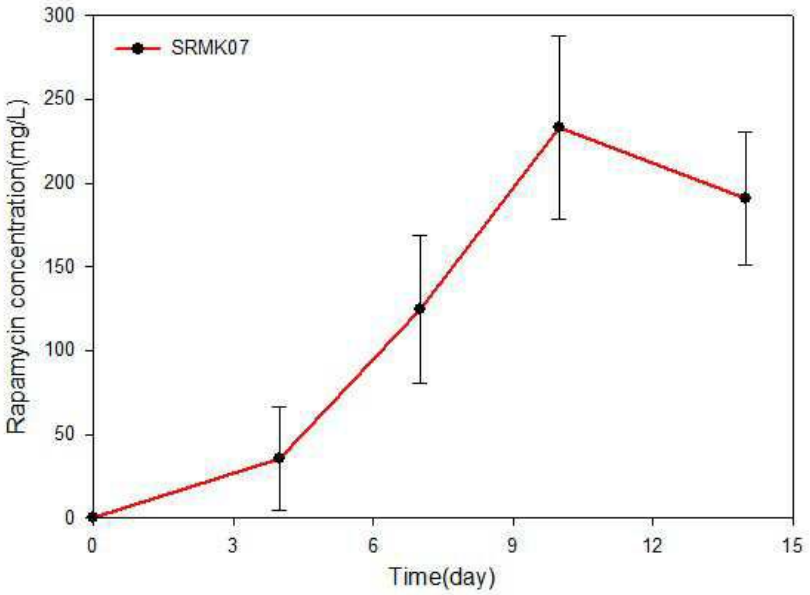
수탁일자 : 20200915

도면

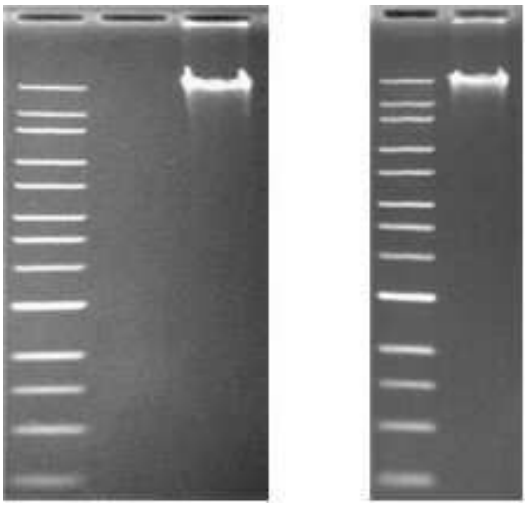
도면1



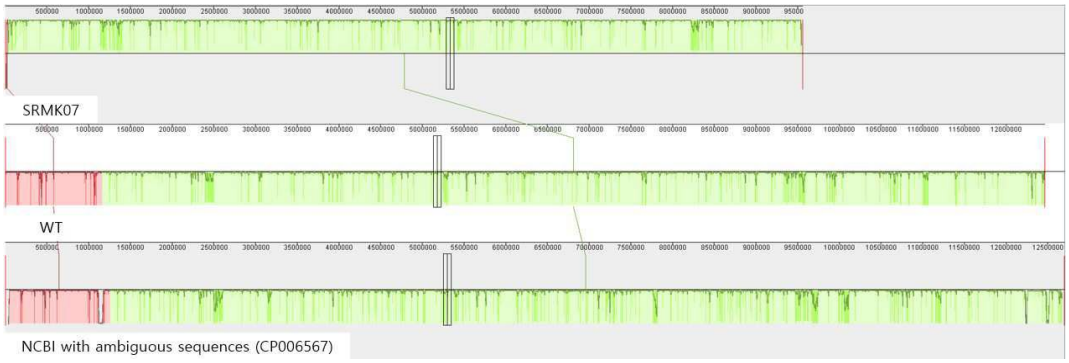
도면2



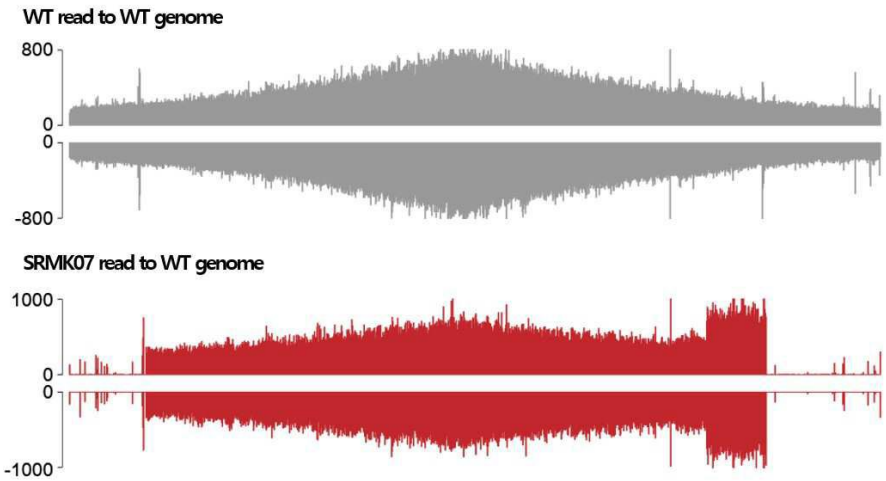
도면3



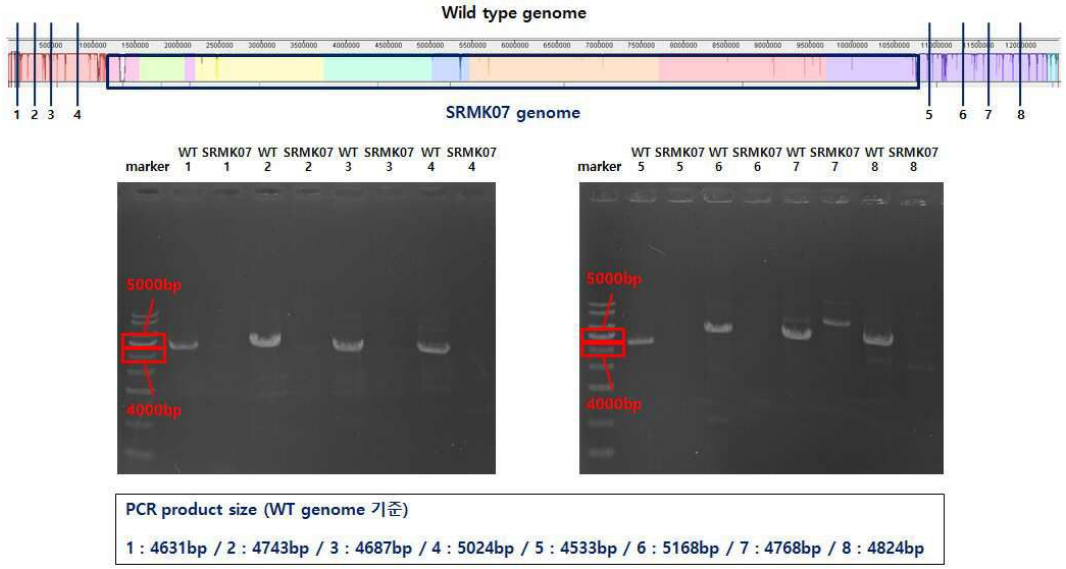
도면4


SRMK07
WT
NCBI with ambiguous sequences (CP006567)

도면5


WT read to WT genome
800
0
0
-800
SRMK07 read to WT genome
1000
0
0
-1000

도면6



PCR product size (WT genome 기준)

1 : 4631bp / 2 : 4743bp / 3 : 4687bp / 4 : 5024bp / 5 : 4533bp / 6 : 5168bp / 7 : 4768bp / 8 : 4824bp