(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 12 월 12 일 (12.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/183961 A1

(51) 국제특허분류:
*C12N 15/29* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
*C07K 14/415* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/005033

(22) 국제출원일: 2013 년 6 월 7 일 (07.06.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0061070 2012 년 6 월 7 일 (07.06.2012) KR

(71) 출원인: **강원대학교산학협력단 (KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 200-701 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동), Gangwon-do (KR).

(72) 발명자: **최용의 (CHOI, Yong Eui)**; 200-765 강원도 춘천시 우석로 101 번길 86, 102 동 302 호 (석사동, 대우아파트), Gangwon-do (KR). **한정연 (HAN, Jung Yeon)**; 200-765 강원도 춘천시 우석로 101 번길 86, 102 동 302 호 (석사동, 대우아파트), Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 충정 (HWANG MOK PARK IP GROUP)**; 100-764 서울시 중구 서소문동 120-23 부영빌딩 6 층, Seoul (KR).

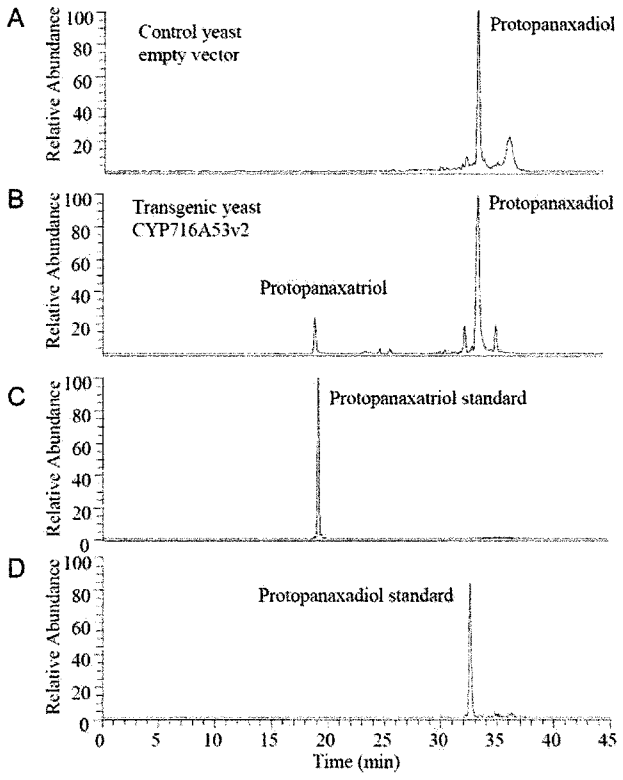
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, 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.

[다음 쪽 계속]

WO 2013/183961 A1

(54) **Title**: PROTOPANAXATRIOL BIOSYNTHESIS GENE AND PROMOTING COMPOSITION

(54) **발명의 명칭** : 프로토파낙사트리올 생합성 유전자 및 촉진용 조성물




(57) **Abstract**: The present invention relates to a ginseng-derived cytochrome P450 enzyme CYP716A53v2 gene which is involved in protopanaxatriol biosynthesis, and more specifically relates to, *inter alia*: a protopanaxatriol biosynthesis promoting composition comprising ginseng-derived CYP716A53v2 protein or a CYP716A53v2 gene coding therefor; a recombinant vector or plasmid comprising the CYP716A53v2 gene; and a method for increasing protopanaxatriol production by increasing expression of the CYP716A53v2 gene or the direct production of protopanaxatriol from a transformant resulting from genetic alteration by means of the composition. The ginseng-derived CYP716A53v2 gene according to the present invention, which is involved in protopanaxatriol biosynthesis, can be used advantageously in a method for synthesising protopanaxatriol in volume or increasing the biosynthesis of protopanaxatriol-based ginseng saponins.

(57) **요약서**: 본 발명은 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)

[다음 쪽 계속]

(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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개**:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

생합성에 관여하는 인삼 유래의 시토크롬 P450 효소 CYP716A53v2 유전자에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인삼 유래의 CYP716A53v2 단백질 또는 이를 코딩(coding)하는 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물, CYP716A53v2 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 플라스미드, 상기 조성물로 형질전환된 형질전환체에서 프로토파낙사디트리올을 직접 생산하거나 상기 CYP716A53v2 유전자의 발현을 증가시켜 프로토파낙사디트리올 생산을 증가시키는 방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 프로토파낙사트리올 생합성에 관여하는 인삼 유래의 CYP716A53v2 유전자는 프로토파낙사트리올을 대량 합성하거나 프로토파낙사트리올 계열의 인삼 사포닌 생합성을 증가시키기 위한 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

# 명세서

# 발명의 명칭: 프로토파낙사트리올 생합성 유전자 및 촉진용 조성물

## 기술분야

[1] 본 발명은 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 유전자 및 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성에 관여하는 CYP716A53v2 단백질 또는 이를 코딩하는 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

## 배경기술

[2] 인삼의 사포닌은 거의 트리테르페노이드계의 다마란(dammarane)계 사포닌이다. 이는 인삼(panax) 속 식물에만 존재하는 특유의 사포닌으로서 인삼이 다른 사포닌 함유 식물과 차별되는 약리 효능을 갖게 한다. 지금까지 수십 종의 인삼 사포닌이 밝혀졌고, 이들은 인삼에 함유된 배당체라 해서 진세노사이드(ginsenoside)라 불린다.

[3] 트리테르페노이드계 사포닌(triterpenoid saponin)은 이소프렌계 화합물(isoprenoidal compounds)의 2차 대사산물이며 많은 고등식물에서 발견된다. 그들은 식물 종들 사이에서 광범위한 구조적 다양성 및 생물학적 활성들을 나타낸다. 또한 이 분자들은 상당한 상업적 가치를 가지며 약물로 이용된다(Hostettmann, K.A., Marston, A. (1995) Saponins. Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Cambridge University Press, Cambridge; Vogler, B.K. 등 (1999), *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 55: 567575; Shibata, S. (2001) *J. Korean Med. Sci.* 16: S28S37). 트리테르페노이드 사포닌의 핵심적인 구성분들은 올레아난(oleanane) (β-amyrin), 우르세인(ursane) (α-amyrin), 루페올(lupeol) 또는 다마렌(dammarene)-타입 트리테르페노이드 골격이다.

[4] 인삼(*Panax ginseng*)은 특히 암, 당뇨병, 신경퇴행성 질환 등에서 뛰어난 약리효과를 나타내는 것으로 소비자들 사이에서 잘 알려져 있는데, 진세노사이드(ginsenosides)는 그 생물활성을 나타내는 인삼 뿌리의 주된 구성분인 것으로 알려져 있다. *P. ginseng* 뿌리는 건조중량으로 적어도 4%의 진세노사이드를 함유한다(Shibata, 2001). 7개의 다마렌-타입 테트라사이클릭(tetracyclic) 트리테르펜(진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, 및 Rg1)은 주요한 진세노사이드 구성분으로 알려져 있고, 진세노사이드 Ro만이 올레아난-타입 펜타사이클릭(pentacyclic) 트리테르펜으로 *P. ginseng*에서 아주 적게 발견된다. 상기 다마렌-타입 진세노사이드들은 아글리콘(aglycone) 구조에 따라 파낙사디올(panaxadiol) (Rb1, Rb2, Rc 및 Rd) 과 파낙사트리올(panaxatriol) 그룹(Rg1, Re, Rf, 및 Rg2)의 두 개의 그룹으로 나누어진다. 다마렌-타입 트리테르펜은 *Panax* (Kushiro, T. 등 (1997), *Biol. Pharm. Bull.* 20: 292-294) 및

*Gynostemma* (Cui, J.F. 등 (1999), Eur. J. Pharm. Sci. 8: 187-191) 속에서 주요한 화합물로 잘 알려져 있다.

[5] 다마렌-타입 진세노사이드 생합성의 첫 번째 단계는 2, 3-옥시도스쿨렌(oxidosqualene)을 담마레네디올(dammarenediol)에 사이클링(cycling)시키는 것이며, 이 반응은 담마레네디올 합성효소(dammarenediol synthase)에 의해 촉매되는데(도 1), *P. ginseng*의 두 개의 동족(homologous) 담마레네디올 합성효소인 *DDS* 및 *PNA*가알려져 있다(Tansakul, P. 등 (2006), *FEBS Lett.* 580:5143-5149.; Han, J.Y. 등 (2006) *Plant Cell Physiol.* 47:1653-1662). 담마레네디올-II 는 시토크롬(cytochrome) P450 (CYP) 효소의 히드록실화(hydroxylation) (Shibuya, M. 등 (2006), *FEBS J.* 273:948-959) 및 뒤따르는 글리코실 전달효소(glycosyl transferase) (GT)의 글리코실화(glycosylation) (Kushiro, T. 등 (1997), *Biol. Pharm. Bull.* 20: 292~294; Shibuya et al., 2006; Choi, D.W. 등 (2005), *Plant Cell Rep.* 23:557-566)에 의해 진세노사이드로 변환되는 것으로 보이며, 진세노사이드 Ro는 베타-아미린(β-amyrin)의 산물인 올레아놀릭산(oleanolic acid)으로부터 합성되는 것으로 생각된다(Shibata, S. (1977) Saponins with biological and pharmacological activity. In: H. Wagner and P. Wolff (Eds.), New natural products and plant drugs with pharmacological or therapeutical activity. Springer-Verlag, NewYork pp.177-196).

[6] CYP 및 GT 는 식물 유전체의 슈퍼유전자 패밀리(supergene families)에 위치한다. 식물에서, CYP는 다양한 식물의 2차 대사산물들, 리그닌, 테르페노이드, 스테롤, 지방산, 호르몬, 색소, 및 방어 관련 파이토알렉신(phytoalexins)의 생합성 동안 산화반응에서 중요한 역할을 담당한다(Schuler, M. (1996) Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:235-284). *P. ginseng*에서, 두 개의 CYP 유전자들은 다마렌-타입 진세노사이드 생합성에 관여할 것으로 생각된다. 이 유전자들 중 하나는 프로토파낙사디올(protopanaxadiol) 합성을 위해 C-12 위치에서 담마레네디올 히드록실화에 관여할 수 있다. 이 유전자는 CYP716A47 유전자로, 본 발명자들이 세계 최초로 밝혀냈으며 (Han et al. 2011), 특허출원도 하였다 (대한민국 특허출원번호: 제10-2011-0113784호, PCT 국제출원번호: PCT/KR2012/003246). 또 다른 유전자는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 합성을 위해 C-6 위치에서 프로토파낙사디올(protopanaxadiol) 히드록실화에 관여할 수 있으며, 이 두 개의 화합물들은 다마렌-타입 진세노사이드를 위한 골격(backbones)으로 사용된다. 이에 본 발명자들은 CYP716A47이 진세노사이드 생합성에 매우 중요한 역할을 하는 프로토파낙사디올 합성효소라는 것을 실험을 통해 증명하였다 (Han et al. 2011, Plant and Cell Physiology, 52: 2062-2073). 그렇지만 프로토파낙사디올에서 프로토파낙사트리올을 합성하게 하는 효소는 밝혀지지 않았다.

[7] 본 발명에서는 프로토파낙사디올로부터 프로토파낙사트리올 생합성에

관여하는 새로운 유전자를 동정하였으며, 이 유전자는 CYP716A53v2로 밝혀졌다.

## 발명의 상세한 설명

## 기술적 과제

[8] 이에 본 발명자들은 인삼 부정근(adventitious roots)의 EST 서열들로부터 얻어진 CYP 유전자 서열들(putative full CYP gene sequences) 중 CYP716A계열의 유전자의 하나인 CYP716A53v2이 진세노사이드 생합성에 매우 중요한 역할을 하는 프로토파낙사트리올 합성효소라는 것을 실험을 통해 증명하였다.

[9] 본 발명의 목적은 프로토파낙사디올 생합성 촉진 유전자인 CYP71653v2유전자 또는 이로부터 코딩되는 CYP716A53v2단백질을 포함하는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.

[11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물로 형질전환된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[12] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 CYP716A53v2프로토파낙사트리올 생합성 촉진 유전자의 발현을 증가시켜 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

## 과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CYP716A53v2 단백질 또는 이를 코딩하는 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 촉진용 조성물을 제공한다.

[14] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성될 수 있고, 상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[15] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 CYP716A53v2 단백질을 코딩하는 CYP716A53v2유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 플라스미드를 포함할 수 있다.

[16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 CYP716A53v2 단백질은 프로토파낙사디올 6-히드록실라아제(protopanaxadiol 6-hydroxylase)인 것을 특징으로 한다. 따라서 본 발명의 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 촉진용 조성물은 프로토파낙사디올의 활성화를 통해 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)에서 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)의 합성을 증가시킬 수 있다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터 또는 플라스미드로 형질전환되어 프로토파낙사트리올의 합성이 가능한 숙주세포를 제공한다.

[18] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 숙주세포는 효모 또는 대장균일 수 있다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터 또는 플라스미드로 형질전환된 형질전환

식물을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성된 CYP716A53v2 유전자 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 CYP716A53v2 단백질의 발현을 증가시켜 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.

[21] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 방법은 재조합 벡터 또는 플라스미드로 숙주를 형질전환시켜 CYP716A53v2 유전자 또는 단백질을 과발현시키는 단계를 포함할 수 있다.

[22] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 숙주는 효모, 대장균 또는 인삼(*Panax ginseng*)을 포함한 식물일 수 있다.

## 발명의 효과

[23] 본 발명에 따른 프로토파낙사트리올 생합성에 관여하는 인삼 유래의 CYP716A53v2 유전자를 숙주에 형질전환시킬 경우 프로토파낙사트리올 생합성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명은 프로토파낙사트리올을 대량 합성하거나 프로토파낙사트리올 계열의 인삼 사포닌 생합성을 증가시키기 위한 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 인삼(*P. ginseng*)에서 예상되는 진세노사이드의 생합성 경로를 나타낸다. 스퀄렌 에폭시다아제(squalene epoxidase)는 squalene을 2,3-oxidosquane로 변환하고, 이것은 담마레네디올 합성효소 또는 베타-아미린 합성효소에 의해 트리테르펜 아글리콘(triterpene aglycones) (담마레네디올 또는 베타-아미린)으로 변환된다. 트리테르펜 아글리콘은 연속적으로 산화 및 글리코실화를 거쳐 종국적으로 트리테르펜 사포닌(진세노사이드)이 된다.

[25] 도 2는 *P. ginseng* CYPs(볼드체) 및 다른 식물 CYPs에 대해 유추된 아미노산 서열로부터 파악한 계통관계를 보여준다. *Gm*, *Glycine max*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Gu*, *Glycyrrhizauralensis*; *Mt, Medicago truncatula*; *Pg. Panax ginseng;Sb*, *Sorghum bicolor*; *Vv, Vitis vinifera*. Bar = 0.1 amino acid substitutions/site.

[26] 도 3은 효모에서 CYP716A53v2 산물에 대한 LC/APCIMS 분석의 총 이온 크로마토그램이다. (A) 대조군으로서 빈 벡터를 가진 효모 세포 추출물의 LC 크로마토그램. (B) pYES2-CYP716A53v2 벡터를 가진 효모 세포 추출물의 LC 크로마토그램. (C) 프로토파낙사트리올 표준 LC 크로마토그램. (D) 프로토파낙사디올 표준 LC 크로마토그램.

[27] 도 4는 CYP716A53v2을 가진 효모에서 검출된 피크의 LC/APCIMS 스펙트럼이다. (A) 프로토파낙사트리올 표준에서 검출된 피크의 MS 스펙트럼. (B) CYP716A53v2을 가진 효모에서 검출된 피크의 MS 스펙트럼.

## 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] 본 발명은 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성에 관여하는 인삼 유래의 시토크롬 P450 효소인 CYP716A53v2 단백질 및 이를 코딩하는

CYP716A53v2유전자의 용도에 관한 것으로서, 상기 CYP716A53v2 유전자 및 그의 단백질을 이용하여 프로토파낙사트리올의 생산을 증가시킬 수 있는 방법을 제공한다.

[29] CYP 슈퍼패밀리(superfamily)는 크고 다양한 효소 그룹이다. *A. thaliana*에서는 246개의 CYP 유전자들이 보고된 바 있다(Nelson, D. (2006) Plant cytochrome P450s from moss to poplar. *Phytochem. Rev.* 5:193-204).

[30] 본 발명자들은 진세노사이드 생합성과 관련된 CYP 유전자를 찾기 위해, MeJA-처리된 인삼 부정근 뿌리의 EST 서열에서 CYP716A53v2 를 성공적으로 분리하였고, CYP716A53v2를 신규한 프로토파낙사트리올 합성효소(protopanaxatriol synthase)로 동정하였다.

[31] 인삼사포닌은 타 식물계 사포닌과 구별하기 위해서 인삼(ginseng) 배당체(glycoside)란 의미로 "진세노사이드(ginsenoside)"라고 부르며, 이러한 진세노이드는 도 1에서와 같이 스퀄렌(squualene)에서부터 담마레네디올 II 및 프로토파낙사디올을 거쳐 생성된다. 이에 본 발명에서는 상기 진세노이드 생합성 과정에서의 중간체인 프로토파낙사트리올의 합성을 탁월하게 증대시킬 수 있는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물을 제공한다.

[32]

[33] *또한 본 발명자들은 효모 발현 분석을 이용하여, CYP716A53v2을 프로토파낙사다이올 6-히드록실화 효소(protopanaxadiol 6-hydroxylase) 활성화 능력을 갖는 프로토파낙사트리올 합성효소(protopanaxatriol synthase)로 동정하였다. 즉, 재조합 CYP716A53v2 발현 효모를 제작하고, 효모에 프로토파낙사다이올을 섭식시킨 후에 프로토파낙사다이올로부터 프로토파낙사트리올을 생성하는 것을 확인하였으며, 더불어 효모에 프로토파낙사트리올 합성효소를 발현시킨 후 이 효소만을 추출하고 프로토파낙사다이올과 반응시켜 프로토파낙사트리올 생성됨을 확인하였다.

[34] 인삼*(P. ginseng)*에서 30개 이상의 진세노사이드가 동정되었고, 이들은 아글리콘 구조에 따라 파낙사디올(panaxadiol) (Rb1, Rb2, Rc, 및 Rd) 및 파낙사트리올(panaxatriol) (Rg1, Re, Rf, 및 Rg2) 그룹의 두 개의 그룹으로 나뉜다. 각각의 진세노사이드는 항-스트레스, 항-당뇨, 항-염증, 항-산화, 항암 뿐만 아니라 면역시스템 이상과 같은 약리 효과들이 상이한 것으로 밝혀졌다(Briskin, D.P. (2000) *Plant Physiol.* 124: 50714; Shibata, 2001).

[35] 또한, 최근의 연구들은 진세노사이드 대사산물들이 진세노사이드 보다 더 큰 생물학적 효과를 갖는다는 것을 보고하였다(Jia, W. 등, (2004) J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). 22:9663). 더불어 다양한 진세노사이드로부터 가수분해된 트리테르펜 아글리콘인 프로토파낙사디올이 암 세포에서 다양한 신호전달 경로를 통해 세포사멸 효과를 나타낸다는 것과 멀티드럭-저항성 종양에 대한 세포독성이 보고되었다(Jia et al. 2004; Popovich and Kitts 2004 Li et al. 2006). 이에 따라, 일부 제약회사(PanaGin Pharmaceuticals

(British Columbia, Canada))는 프로토파낙사디올(Pandimex)을 함유한 암 치료제를 개발하고 있는 실정이다.

[36] 현실적으로 유기합성법으로는 트리테르펜의 합성에 어려움이 있으므로, 이 화합물은 자연에서 분리되거나 진세노사이드 가수분해에 의해 얻어야 한다.

[37] 그리하여 본 발명에 따른 프로토파낙사트리올 생성하는 유전자 및 효소의 발견은 효모나 인삼 및 기타 식물에 도입하여 프로토파낙사트리올의 생합성을 유도할 수 있고 대사공학적인 방법을 통하여 프로토파낙사트리올의 생합성을 획기적으로 높일 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있다.

[38] 따라서 본 발명은 CYP716A53v2 단백질 또는 이를 코딩하는 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 촉진용 조성물을 제공할 수 있다. 상기 CYP716A53v2 단백질의 범위는 인삼으로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.

[39] 여기에서 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 여기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 프로토파낙사트리올 생합성에 관여하는 활성을 의미한다.

[40] 또한, 본 발명에 따른 상기 CYP716A53v2 유전자는 CYP716A53v2 단백질을 코딩하는 게놈 DNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자, 즉 CYP716A53v2의 cDNA는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성될 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.

[41] 여기에서 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(gap)를 포함할 수 있다.

[42] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 플라스미드를 포함하는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물을 제공할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 효모 발현 벡터 또는 재조합 식물 발현 벡터이다.

[43] 여기에서 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 것을 지칭하는 것이다. 상기 벡터로 형질전환된 재조합

세포는 상기 세포의 자연 형태에서는 발현되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 자연 상태의 세포에서 발현되는 유전자를 발현할 수 있으나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[44] 여기에서 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[45] 효모 발현 벡터는 프로모터 유전자, 해독개시 및 종결코돈이 제거된 목적 단백질을 코딩하는 유전자 및 터미네이터를 포함할 수 있으며, 프로모터 유전자는 GAPDH, PGK, ADH, PHO5, GAL1 및 GAL10으로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[46] 한편, 본 발명의 CYP716A53v2 유전자는 신호 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 이것은 발현된 단백질의 배출(export)을 가능하게 한다. 여기에서 신호 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 발현되는 이형 유전자의 5'에 직접적으로 결합되는 것이 바람직하다. 많은 진핵 세포 단백질의 분비 및 변형에 있어서, 폴리펩타이드를 분비 기구(secretion apparatus) 속으로 배출하기(steer) 위해서는 N-말단에 신호 서열을 가지는 단백질 서열과의 융합이 필요하다. 상기 벡터는 조합 효모 플라스미드(YIp : integrative yeast plasmid) 및 염색체외 플라스미드 벡터(extrachromosomal plasmid vector)가 모두 가능하다. 상기 염색체외 플라스미드 벡터는 에피솜 효모 플라스미드(YEp : episomal yeast plasmid), 복제 효모 플라스미드(YRp : replicative yeast plasmid) 및 효모 중심체 플라스미드(YCp : yeast centromer plasmid)로 나뉘어진다. 더 나아가, 인위적 효모 염색체들(YACs : artificial yeast chromosomes)도 본 발명에 따른 발현 벡터로서 가능하다.

[47] 또한, 특히 바람직한 효모 벡터는 복제 원점 ori 및 항생물질 저항성 카세트(antibiotic resistance cassette)를 함유하여 *E. coli* 에서 증식되고 선택될 수 있는 효모 복제 플라스미드(yeast replication plasmid)이다. 더 나아가, 이들은 H. polymorpha로부터의 HARS1과 같이 효모 세포에서 염색체와 관계없이 독립적 복제를 할 수 있는 ARS 서열, 그리고 URA3 또는 HLEU2와 같은 대사성 효모 선택 마커(metabolic yeast selection marker)를 가진다.

[48] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0116718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게

삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0120516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다.

[49] 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[50] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[51] 본 발명의 일실시예에 있어서, 식물 발현 벡터의 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[52] 상기 터미네이터는, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[53] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 재조합 벡터 또는 플라스미드로 형질전환되어 프로토파낙사트리올 생합성이 가능한 숙주세포를 제공할 수 있다. 이에 제한되지는 않으나, 상기 숙주세포는 효모, 대장균일 수 있다.

[54] 구체적으로, 본 발명은 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 재조합 효모 벡터가 형질전환된 형질전환 효모를 제공할 수 있다. 바람직하게는, 상기 효모가 Pichia, Hansenula, Candida, Torulopsis, Saccharomyces, Schizosaccharomyces,

Kluyveromyces 및 Yarrowia 중에서 선택되는 속(genus)일 수 있다. 특히 바람직하게는, 상기 미생물이 Hansenula polymorpha, Saccharomyces Cervisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis 및 Yarrowia lipolytica 중에서 선택되는 종에 속하는 것일 수 있다.

[55] 효모의 형질전환은 핵산 분자 또는 벡터를 당업자에게 공지된 표준 방법, 바람직하게는 전기천공, 화학적 형질 전환, 원형질 융합에 의한 형질전환, 또는 입자 봄바드먼트 (bombardment)에 의해 세포내로 도입되게 할 수 있다(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Edited by: Fred M. Ausubel et al.;Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) , J. Sambrook and D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[56] 또한, 본 발명은 본 발명의 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 플라스미드로 형질전환되어 프로토파낙사트리올 생합성이 가능한 형질전환 식물을 제공할 수 있다.

[57] 이에 제한되지는 않으나 상기 식물은 담배, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 바람직하게는 애기장대이다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다.

[58] 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등 으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[59] 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EPA 120516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[60] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진

않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[61] 따라서, 본 발명은 CYP716A53v2 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩된 CYP716A53v2 단백질의 발현을 증가시켜 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법을 제공할 수 있다. 또한 상기 방법은 본 발명에 따른 상기 재조합 벡터 또는 플라스미드로 숙주를 형질전환시켜 CYP716A53v2 유전자 또는 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하게 된다. 이에 제한되지는 않으나, 상기 숙주는 효모, 대장균, 식물, 특히 인삼 일 수 있다.

[62] 본 발명의 CYP716A53v2 유전자는 프로토파낙사디올 6-히드록실라아제(hydroxylase)의 활성화를 통해 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)에서 프로토파낙사트리올의 합성을 촉진시키므로, 상기와 같은 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 프로토파낙사트리올이 과다 생성된 형질전환된 식물을 제공할 수 있으며, 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법 또한 제공한다.

## 발명의 실시를 위한 형태

[63] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[64]

[65] **<실시예 1>**

[66] ***P. ginseng* EST 라이브러리로부터의 CYP 유전자의 분리(isolation)**

[67]

[68] **<1-1> 식물재료 및 EST 라이브러리 제작**

[69] 시험관 내 배양한 인삼의 부정근(adventitious roots)에서 총 RNA를 추출하였다. Poly (A) quick mRNA isolation kit (Stratagene)를 사용하여 Poly(A)+RNA를 추출하였다. Creator SMART cDNA library construction kit (Clontech)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 만들었다. 숙주 균주로 DH10B를 사용하였고, 클로닝 벡터로 pDNR-LIB을 사용하였다.

[70] 자동 DNA 시퀀서(ABI Prism 3700, Applied Biosystems)를 사용하여 싱글패스(single-pass) 부분 서열을 측정하였다. 총 4,226 cDNA 가닥들(NCBI GenBank dbEST accession Nos. HS076062HS080287)을 임의로 추출하고 ABI 3730 XL 자동 DNA 시퀀서(Applied Biosystems)를 사용하여 5' 말단에서부터 시퀀싱하였다. ESTs 결과물을 NCBI 웹사이트 상의 BLASTX 알고리즘을 사용하여 GenBank 및 dbEST 서열들과 비교하였다.

[71]

[72] **<1-2> CYP716 패밀리의 동정 및 분석**

[73] 인삼 MeJA-처리 부정근(adventitious roots)에서 EST 서열 중에 CYP716A47은 프로토파낙사디올 (Protopanaxadiol) 합성 유전자임(본 발명자의 특허출원 제10-2011-0113784호 참조)이 이미 밝혀졌기 때문에 CYP716A 동일 계열의 유전자인 CYP716A53v2 유전자의 전장을 얻고 GenBank에 등록하였으며, 접근번호(accession numbers)는 CYP716A53v2 *JX036031*이다.

[74] 표 1

[Table 1]

| CYP450 family | Typical EST ID | GenBank 접근번호 | EST 수 | CYPs 명명 | Homology to(species name) | Description | Accession No. | E-Value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CYP71 | KYERRC00146-A08 | JN604540 | 7 | CYP71D312 | CYP71D55 (*Hyoscyamus muticus*) | Premnaspirodiene Oxygenase | EF569601 | $2e^{-09}$ |
| | KYERRC00136-B03 | JN604541 | 5 | CYP71D313 | | | | |
| | KYERRC00126-F07 | | 1 | CYP71D314 | | | | |
| | KYERRC00118-F12 | | 1 | CYP71D315v2 | | | | |
| | KYERRC00117-H02 | | 2 | CYP71D315v1 | | | | |
| | KYERRC00110-D12 | | 1 | CYP71D316 | | | | |
| | KYERRC00119-G01 | | 1 | CYP71D317 | | | | |
| | KYERRC00143-F04 | | 1 | CYP71D318v1 | | | | |
| | KYERRC00145-G06 | | 1 | CYP71D318v2 | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CYP72 | KYERRC00139-E08 | JN604542 | 2 | CYP72A129 | CYP72A57 (*Nicotianatabacum*) | Unknown | DQ350360 | $3e^{-64}$ |
| | KYERRC00142-H03 | | 1 | CYP72A220 | | | | |
| | KYERRC00131-H09 | | 1 | CYP72A221 | | | | |
| CYP73 | KYERRC001_19-F10 | JN604543 | 5 | CYP73A100 | CYP73A5(*Arabidopsisthaliana*) | Cinnamic acid 4-hydroxylase | D78596 | $3e^{-166}$ |
| CYP82 | KYERRC00142-G11 | JN604544 | 3 | CYP82H23 | CYP82A1(*Pisumsativum*) | UnknownWound-inducible P450 hydroxylase | AF175278 | $2e^{-09}$ |
| | KYERRC00119-F02 | | 1 | CYP82H24 | | | | |
| | KYERRC00101-H12 | JN604545 | 1 | CYP82D47 | | | | |
| CYP90 | KYERRC001_12-D12 | | 3 | CYP90A29 | CYP90 A2(*Pisumsativum*) | Putativebrassinosteroid C-23 hydroxylase | AB218762 | $9e^{-122}$ |
| CYP94 | KYERRC001_27-A10 | | 1 | CYP94A33 | CYP94A1(*Viciasativa*) | Fatty acidomega-hydroxylase | 081117 | 0.0 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CYP98 | KYERRC00126-B07 | | 1 | CYP98A58 | CYP98A13 (*Ocimumbasilicum*) | p-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase | AY082612 | 1x10-141 |
| | KYERRC00108-H05 | | 1 | CYP98A59 | | | | |
| CYP716 | KYERRC001_23-C09 | JN604536 | 7 | CYP716A47 | CYP716A2 (*Medicagotruncatula*) | Oxidation of β-amyrin and erythrodiol at the C-28 position | FN995112 | 6e-169 |
| CYP734 | KYERRC001_09-G04 | | 1 | CYP734A23 | CYP734A7(*Lycopersiconesculentum*) | Brassinosteroid C-26 hydroxylase | AB223042 | 5e-49 |
| CYP736 | KYERRC001_22-F01 | JN604539 | 3 | CYP736A12 | CYP736B(*Vitisarizonicax Vitisrupestris*) | UnknowmDisease Responsive | FJ828518 | 5e-24 |
| CYP749 | KYERRC001_20-C10 | JN604538 | 2 | CYP749A20 | CYP86A22 (*Petuniaxhybrida*) | Fatty acyl-CoA-Hydroxylase | DQ099540 | 2e-17 |

[75] (*P. ginseng*의 부정근으로부터 얻은 CYP 유전자에 상동성이 있는 EST 서열)

[76]

[77] CYP716A53v2 유전자가 CYP716A 계열에 속할지라도 아미노산 염기서열은 이전에 밝혀진 프로토파낙사디올 합성 관련 유전자인 CYP716A47 유전자와는 오직 49%만의 유사성을 갖기 때문에 프로토파낙사디올 합성 관련 유전자와는 전혀 다른 유전자임을 알수 있다. 한편 *Medicago truncatula* 식물에서 밝혀진 CYP716A12는 베타-아밀린(β-amyrin 과 에리트리오다이올 (erythrodiol)로부터 올레아놀릭에시드 (oleanolic acid)를 만들게 하는 다기능성 유전자인데 이 유전자와는 53%의 아미노산 염기서열 상동성을 갖기 때문에 전혀 다른 유전자이다.

[78]

[79] **<실시예 2>**

[80] **<2-1> 시토크롬 P450 단백질 서열의 분리 및 비교**

[81] DNASIS 프로그램(Hitachi Software Engineering Co.)을 사용하여 그들의 뉴클레오티드 및 예상되는 아미노산 서열들을 분석하였다. 이 유전자 서열들 사이의 계통관계를 분석하기 위하여, EMBL, GenBank 및 DDBJ 서열 데이터로부터 아미노산 서열들을 얻었다. CLUSTAL W 프로그램을 사용하여 멀티플 시퀀스 얼라인먼트(multiple sequence alignments)를 만들었다(Thompson, J.D. 등 (1994) *Nucl. Acids Res.* 22: 46734680). 추론된 아미노산 얼라인먼트의 계통발생적 분석은 트리뷰(TreeView) 소프트웨어를 이용한 네이버-조이닝(neighbor-joining) 방법을 사용하여 수행하였다(Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357358). 트리(tree)에서 노드(nodes)의 강도 측정은 1000 레플리케이트(replicates)의 부트스트랩(bootstrap) 분석을 사용하였다(Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783791).

[82]

[83] **<2-2> 계통분석 결과**

[84] *P. ginseng*의 9개의 잠재적인 CYP 유전자들(예를 들어, CYP72A219, CYP73A100, CYP736A12, CYP82H23, CYP82D47, CYP71D312, CYP71D313, CYP749A22 및 CYP716A47)과 다른 식물의 CYP 유전자들 사이의 유연관계를 분석하였으며(도 2 참조), CYP716A53v2에서 추론된 아미노산 서열은 CYP716A47유전자와는 44%, *Medicago truncatula*유래인CYP716A12의 것과 53%에 불과한 상동성을 나타내었다.

[85]

[86] **<실시예 3>**

[87] **WAT21 효모에서 CYP716A53v2 cDNA의 ectopic 발현**

[88] **<3-1> 효모에서 CYP716A53v2의 발현**

[89] 효모에 대한 발현 플라스미드 벡터를 제작하기 위하여, CYP716A53v2의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 오픈 리딩 프레임(ORFs)을 증폭하였다. PCR은 94℃ 40초, 55℃ 40초 및 72℃ 2분의 25 사이클을 수행하였고, *Pfu* DNA 중합효소(Stratagene)를 사용하였다. 위 PCR 산물을 TOPO TA expression kit (Invitrogen)를 사용하여 pYES2.1에 클로닝하였다. cDNAs를 분리하는데 사용한 프라이머 쌍은 다음과 같다:

[90] CYP716A53v2 합성효소에 대하여,

[91] 5′-ATG GAT CTC TTT ATC TCA TCT CAA-3′(서열번호 3) 및

[92] 5′-TTA AAG CGT ACA AGG TGA TAG ACG-3′(서열번호 4)

[93] PCR 산물을 pYES2.1/V5-His-TOPO 벡터에 클로닝하고, *Escherichia coli*를 형질전환시켰다. 그 후 ORFs를 GAL1 프로모터에 작동가능하게 접합시켰다. 삽입된 DNA의 뉴클레오티드 서열을 시퀀싱을 통해 확인하였다. CYP716A53v2

및 빈 벡터를 *Arabidopsis thaliana* NADPH-CYP 환원효소(reductase)를 보유하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*strain WAT21에서 발현시켰다(Urban, P. 등 (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 19176~19186).

[94] WAT21 효모 세포들을 공지되어 있는 변형된 리튬 아세테이트 방법으로 형질전환시켰다(Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20: 1425). SC-U (우라실(uracil) 결핍 SC 최소배지)로 형질전환 세포들을 선별하고, 3일 간 배양한 뒤 YPG 배지에 계대배양하였다(Kribii et al., 1997).

[95] 갈락토오스에 의한 유도 및 트리테르펜 모노알콜 분획(triterpene monoalcohol fraction)의 준비를 위한 배양조건 및 방법은, 프로토파낙사디올 (50 mg $L^{-1}$)를 기질로서 배지에 첨가한 것을 제외하고는, 공지의 방법을 따랐다(Kushiro, T., Ohno, Y., Shibuya, Y., Ebizuka, Y. (1997) *In vitro* conversion of 2,3-oxidosqualene into dammarenediol by *Panax ginseng* microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* 20: 292294). 하루 동안 갈락토오스 유도를 한 후에, 500 g 로 5분간 원심분리하여 세포들을 모으고, 2 ml 20% KOH/ 50% EtOH 로 5분간 환류(reflux)시켰다. 같은 부피의 헥산으로 추출한 후에, 추출물을 LC/APCIMS로 분석하였다.

[96]

[97] **<3-2> 재조합 효모의 LC/APCIMS 분석**

[98] Surveyor LC system (Thermo Finnigan Co., San Jose, CA, USA)에서 LC-APCIMS 분석을 수행하였다. 이는 4개의 용매 펌프(solvent pumps), Rheodyne injector (5 ml loop) 및 HTP Pal autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland)로 구성되어 있다. 분석 칼럼은 408℃에서 보관된 YMC pack-pro C18 RS (5 mm, 2.0×150 mm, YMC Co. LTD. Japan)를 사용하였다. 물 및 아세토나이트릴(acetonitrile) 구배(gradient) 적용 시간 및 구성비율은 다음과 같다: 0분, 80% 아세토나이트릴 및 20% 물; 30분, 10% 아세토나이트릴 및 90% 물; 32분, 5% 아세토나이트릴 및 95% 물; 34분, 5% 아세토나이트릴 및 95% 물; 36분, 80% 아세토나이트릴 및 20% 물; 및 45분, 80% 아세토나이트릴 및 20% 물, 0.2 ml $min^{-1}$의 유량(flow rate).

[99] APCI (atmospheric pressure chemical ionization) 시스템이 설치된, 삼단계 사중극자형 질량분석기(triple quadrupole mass spectrometer)인 Finnigan TSQ Quantum Ultra (Thermo Electron Co., San Jose, CA, USA)를 검출에 사용하였다. 분석조건은 다음과 같다: 5.0 mA 방전류(discharge current)의 positive mode, 320℃의 vaporizer 온도 및 320℃의 ion-transfer capillary 온도. 질소를 sheath (15 psi) 및 보조가스(auxiliary gas) (10 psi)로 사용하였다. HPLC-UV 검출을 위해, 202 nm 파장에서 진세노사이드를 관찰하였다. 본래의 프로토파낙사디올(protopanaxadiol) 및 프로토파낙사트리올 (protopanaxatriol)을 같은 조건에서 실험하였으며, 이 두 물질을 LC/APCIMS 분석의 표준(standard)으로 사용하였다.

[100]

[101] **<3-3> 프로토파낙사트리올 생합성 여부 분석**

[102] CYP716A53v2(JX036031)의 전장 cDNA 클론은 1,560 bp 의 크기이며, 470-아미노산의 오픈 리딩 프레임(open reading frame) (ORF)을 가지고 있으며, 분자량이 55.3 kDa으로 예측되는 단백질을 생산한다. 프로토파낙사트리올 생산에 있어서 CYP716A53v2의 히드록실화(hydroxylation) 활성을 측정하기 위하여, CYP716A53v2cDNA의 ORF 영역을 pYES2.1 발현 벡터에 삽입하여, WAT21 효모(yeast)에서 GAL1 프로모터의 조절 하에 발현시켰다. LC/APCIMS (liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry)로부터 총 이온 크로마토그램(total ion chromatograms)을 사용하여 효모추출물을 분석하였다.

[103] 프로토파낙사디올 (protopanaxadiol)은 외인적으로(exogenously) 효모에 적용되었기 때문에, 프로토파낙사디올(protopanaxadiol) 및 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 모두 LC/APCIMS로부터 총 이온 크로마토그램에서 측정하였다(도 3B). 표준 프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올 피크(peak)의 보존시간(retention time)은 각각 33.6분 및 19.2분이었다(도 3C, 3D). 프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올 모두 LC/APCI-MS를 사용하여 CYP716A53v2-발현 효모에서 확인하였다(도 3B). 빈 벡터를 가진 대조군 효모 추출물에서는, 외인적으로 첨가한 프로토파낙사디올의 피크는 검출되었으나, 프로토파낙사트리올 신호는 검출되지 않았다(도 3A).

[104] CYP716A53v2 유전자를 발현하는 효모에서 19.2분의 보존시간(retention time)에서 프로토파낙사트리올 신호를 MS 단편화(fragmentation) 패턴을 이용하여 분석하였다(도 4). CYP716A53v2 유전자를 발현하는 효모에서 LC/APCIMS 단편화 패턴은 405 $[M-3H_2O+H]^+$, 423 $[M-2H_2O+H]^+$, 및 441 $[M-H_2O+H]^+$의 m/z 비율을 포함하였으며, 이는 원래의 프로토파낙사트리올에 대한 것과 동일하였다(도 4). 이러한 결과는 CYP716A53v2가 프로토파낙사디올 6-히드록실화 효소(protopanaxadiol 6-hydroxylase) 유전자이며 프로토파낙사디올을 프로토파낙사트리올로 변환시킨다는 것을 보여준다.

[105]

[106] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[107]

## 서열목록 Free Text

[108] <110> KNU-Industry Cooperation Foundation

[109]

[110] <120> Genes for the Biosynthesis of Protopanaxatriol and Composition

[111] for Promoting and Activating Biosynthesis of Protopanaxatriol

[112]

[113] <130> OP13-1014

[114]

[115] <150> KR 12/061070

[116] <151> 2012-06-07

[117]

[118] <160> 4

[119]

[120] <170> KopatentIn 2.0

[121]

[122] <210> 1

[123] <211> 1560

[124] <212> DNA

[125] <213> Panax ginseng

[126]

[127] <400> 1

[128] gaccactcac caccttcatt ttcatttctg aattttgggc aaaatcacag aattcttgat 60

[129]

[130] ccatggatct ctttatctca tctcaactac ttcttctact agtcttttgc ttattcctct 120

[131]

[132] tttggaattt caaaccaagt agccaaaaca aactgcctcc gggcaaaaca ggatggccca 180

[133]

[134] taattggaga aacactagaa ttcatctcct gtggccaaaa aggcaaccct gaaaagttcg 240

[135]

[136] taacacaaag aatgaacaaa tactcccctg atgtcttcac aacatcctta gcaggcgaga 300

[137]

[138] aaatggtagt tttctgcggt gcctcgggga acaaattcat tttctccaac gaaaacaagc 360

[139]

[140] ttgttgtgtc ctggtggccc cctgccatat ccaaaatcct aactgcaaca ataccttcgg 420

[141]

[142] tagagaaaag caaagccttg cggagtctaa ttgttgaatt cttaaaaccc gaagcgctcc 480

[143]

[144] acaagtttat ttctgtcatg gatcggacaa cgaggcagca ctttgaagac aaatggaacg 540

[145]

[146] ggagtacaga agtgaaagct ttcgctatgt cagagtcgct gacttttgag ttggcctgtt 600

[147]

[148] ggctgctctt tagcataaat gatccggtgc aggtgcagaa gctttctcat ctttttgaga 660

[149]

[150] aggttaaagc gggattattg tctttacctt taaattttcc gggcacggct tttaaccgtg 720

[151]

[152] ggatcaaggc cgccaatctt attagaaaag agctttcggt ggtgataaaa cagaggagaa 780

[153]

[154] gtgataaatt acagactcga aaggatcttt tgtcccacgt tatgctttcc aatggcgagg 840

[155]

[156] gcgagaaatt tttcagcgaa atggatattg cggacgttgt tcttaattta ctgattgcta 900

[157]

[158] gccatgatac cactagcagt gccatgggct ctgtggtcta ctttcttgca gatcatcctc 960

[159]

[160] acatctatgc taaagttctc acagaacaaa tggagatcgc aaagtcgaaa ggggcagaag 1020

[161]

[162] aacttttgag ctgggaggac ataaagagga tgaagtattc ccgcaatgtt ataaatgaag 1080

[163]

[164] ctatgagatt agtacctcct tctcaaggag gttttaaagt agttacaagt aaattcagtt 1140

[165]

[166] acgcaaactt catcattccc aaaggatgga agatcttttg gagcgtatac tcgacacata 1200

[167]

[168] aagatcccaa atactttaaa aatccagagg agtttgatcc ttcaagattt gaaggagatg 1260

[169]

[170] gacctatgcc attcacattt ataccatttg gaggaggacc aaggatgtgc cctgggagtg 1320

[171]

[172] agtttgctcg tctggaggta ctaatattca tgcaccattt ggttaccaat tttaagtggg 1380

[173]

[174] agaaggtgtt tcccaatgaa aagattattt atactccatt tcccttcccg gagaatggtc 1440

[175]

[176] ttcctattcg tctatcacct tgtacgcttt aatttttgg cttttgttaa ggtgaacatt 1500

[177]

[178] ttctaatttg tattaatggt gttcatgttt gtgtgatgta ttcaawttat aatgtttcac 1560

[179]

[180] 1560

[181]

[182]

[183] <210> 2

[184] <211> 469

[185] <212> PRT

[186] <213> Panax ginseng

[187]

[188] <400> 2

[189] Met Asp Leu Phe Ile Ser Ser Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Phe Cys

[190] 1 5 10 15

[191]

[192] Leu Phe Leu Phe Trp Asn Phe Lys Pro Ser Ser Gln Asn Lys Leu Pro

[193] 20 25 30

[194]

[195] Pro Gly Lys Thr Gly Trp Pro Ile Ile Gly Glu Thr Leu Glu Phe Ile

[196] 35 40 45

[197]

[198] Ser Cys Gly Gln Lys Gly Asn Pro Glu Lys Phe Val Thr Gln Arg Met

[199] 50 55 60

[200]

[201] Asn Lys Tyr Ser Pro Asp Val Phe Thr Thr Ser Leu Ala Gly Glu Lys

[202] 65 70 75 80

[203]

[204] Met Val Val Phe Cys Gly Ala Ser Gly Asn Lys Phe Ile Phe Ser Asn

[205] 85 90 95

[206]

[207] Glu Asn Lys Leu Val Val Ser Trp Trp Pro Pro Ala Ile Ser Lys Ile

[208] 100 105 110

[209]

[210] Leu Thr Ala Thr Ile Pro Ser Val Glu Lys Ser Lys Ala Leu Arg Ser

[211] 115 120 125

[212]

[213] Leu Ile Val Glu Phe Leu Lys Pro Glu Ala Leu His Lys Phe Ile Ser

[214] 130 135 140

[215]

[216] Val Met Asp Arg Thr Thr Arg Gln His Phe Glu Asp Lys Trp Asn Gly

[217] 145 150 155 160

[218]

[219] Ser Thr Glu Val Lys Ala Phe Ala Met Ser Glu Ser Leu Thr Phe Glu

[220] 165 170 175

[221]

[222] Leu Ala Cys Trp Leu Leu Phe Ser Ile Asn Asp Pro Val Gln Val Gln

[223] 180 185 190

[224]

[225] Lys Leu Ser His Leu Phe Glu Lys Val Lys Ala Gly Leu Leu Ser Leu

[226] 195 200 205

[227]

[228] Pro Leu Asn Phe Pro Gly Thr Ala Phe Asn Arg Gly Ile Lys Ala Ala

[229] 210 215 220

[230]

[231] Asn Leu Ile Arg Lys Glu Leu Ser Val Val Ile Lys Gln Arg Arg Ser

[232] 225 230 235 240

[233]

[234] Asp Lys Leu Gln Thr Arg Lys Asp Leu Leu Ser His Val Met Leu Ser

[235] 245 250 255

[236]

[237] Asn Gly Glu Gly Glu Lys Phe Phe Ser Glu Met Asp Ile Ala Asp Val

[238] 260 265 270

[239]

[240] Val Leu Asn Leu Leu Ile Ala Ser His Asp Thr Thr Ser Ser Ala Met

[241] 275 280 285

[242]

[243] Gly Ser Val Val Tyr Phe Leu Ala Asp His Pro His Ile Tyr Ala Lys

[244] 290 295 300

[245]

[246] Val Leu Thr Glu Gln Met Glu Ile Ala Lys Ser Lys Gly Ala Glu Glu

[247] 305 310 315 320

[248]

[249] Leu Leu Ser Trp Glu Asp Ile Lys Arg Met Lys Tyr Ser Arg Asn Val

[250] 325 330 335

[251]

[252] Ile Asn Glu Ala Met Arg Leu Val Pro Pro Ser Gln Gly Gly Phe Lys

[253] 340 345 350

[254]

[255] Val Val Thr Ser Lys Phe Ser Tyr Ala Asn Phe Ile Ile Pro Lys Gly

[256] 355 360 365

[257]

[258] Trp Lys Ile Phe Trp Ser Val Tyr Ser Thr His Lys Asp Pro Lys Tyr
[259] 370 375 380
[260]
[261] Phe Lys Asn Pro Glu Glu Phe Asp Pro Ser Arg Phe Glu Gly Asp Gly
[262] 385 390 395 400
[263]
[264] Pro Met Pro Phe Thr Phe Ile Pro Phe Gly Gly Gly Pro Arg Met Cys
[265] 405 410 415
[266]
[267] Pro Gly Ser Glu Phe Ala Arg Leu Glu Val Leu Ile Phe Met His His
[268] 420 425 430
[269]
[270] Leu Val Thr Asn Phe Lys Trp Glu Lys Val Phe Pro Asn Glu Lys Ile
[271] 435 440 445
[272]
[273] Ile Tyr Thr Pro Phe Pro Phe Pro Glu Asn Gly Leu Pro Ile Arg Leu
[274] 450 455 460
[275]
[276] Ser Pro Cys Thr Leu
[277] 465
[278]
[279]
[280] <210> 3
[281] <211> 24
[282] <212> DNA
[283] <213> Artificial Sequence
[284]
[285] <220>
[286] <223> CYP716A53v2 forward primer
[287]
[288]
[289] <400> 3
[290] atggatctct ttatctcatc tcaa 24
[291]
[292]
[293] <210> 4
[294] <211> 24
[295] <212> DNA

[296] <213> Artificial Sequence

[297]

[298] <220>

[299] <223> CYP716A53v2 reverse primer

[300]

[301]

[302] <400> 4

[303] ttaaagcgta caaggtgata gacg 24

[304]

# 청구범위

[청구항 1] CYP716A53v2 단백질 또는 이를 코딩하는 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 생합성 촉진용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 CYP716A53v2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 CYP716A53v2단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 CYP716A53v2 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 플라스미드를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 CYP716A53v2 단백질은 프로토파낙사디올 6-히드록실라아제(protopanaxadiol 6-hydroxylase)인 것을 특징으로 하는 프로토파낙사트리올 생합성 촉진용 조성물.

[청구항 6] 제4항의 재조합 벡터 또는 플라스미드로 형질전환된 숙주세포.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 숙주세포는 효모 또는 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환된 숙주 세포.

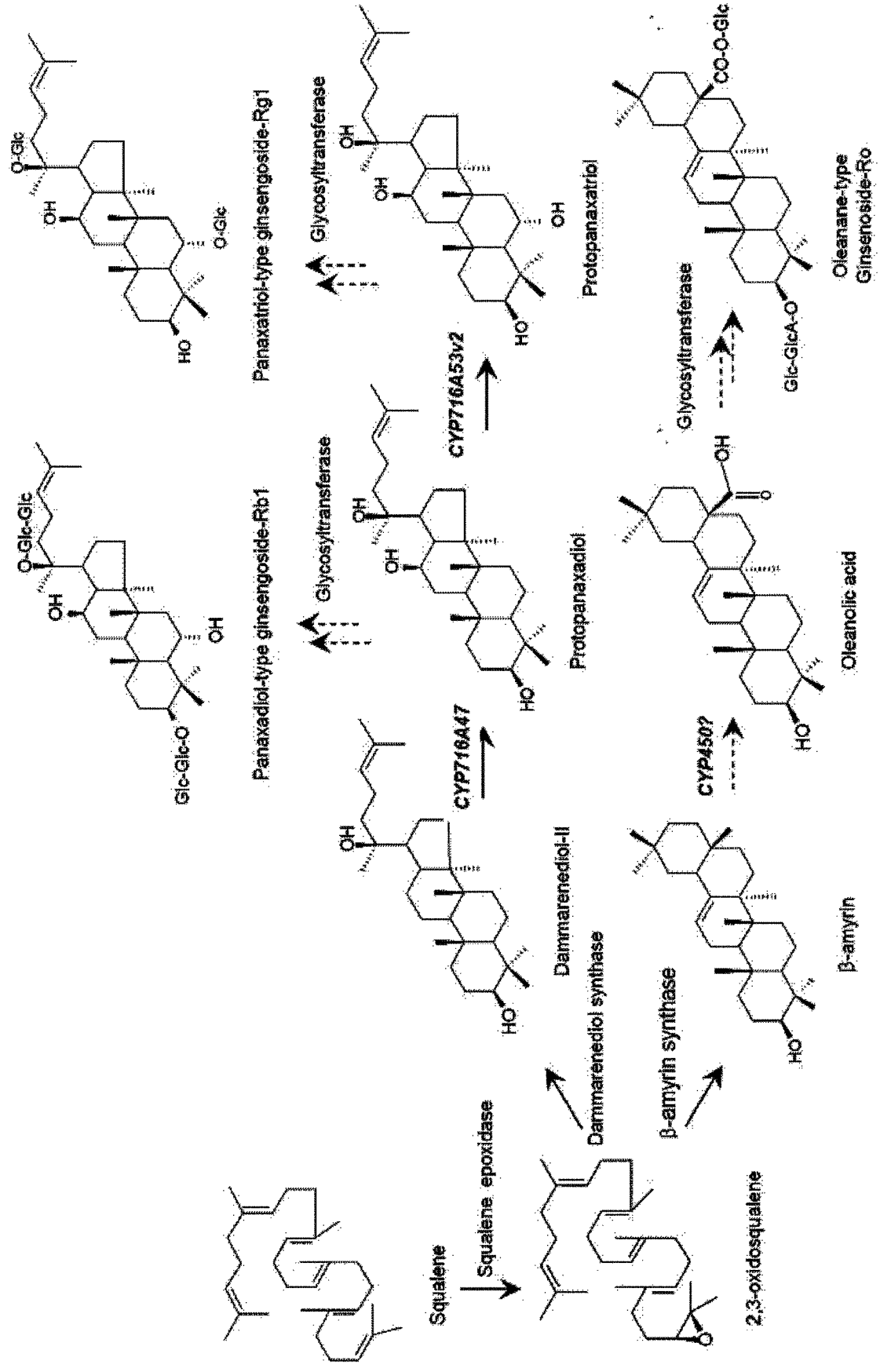
[청구항 8] 제4항의 재조합 벡터 또는 플라스미드로 형질전환된 형질전환 식물.

[청구항 9] 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 CYP716A53v2 단백질 또는 이를 코딩하는 CYP716A53v2 유전자의 발현을 증가시켜 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법.

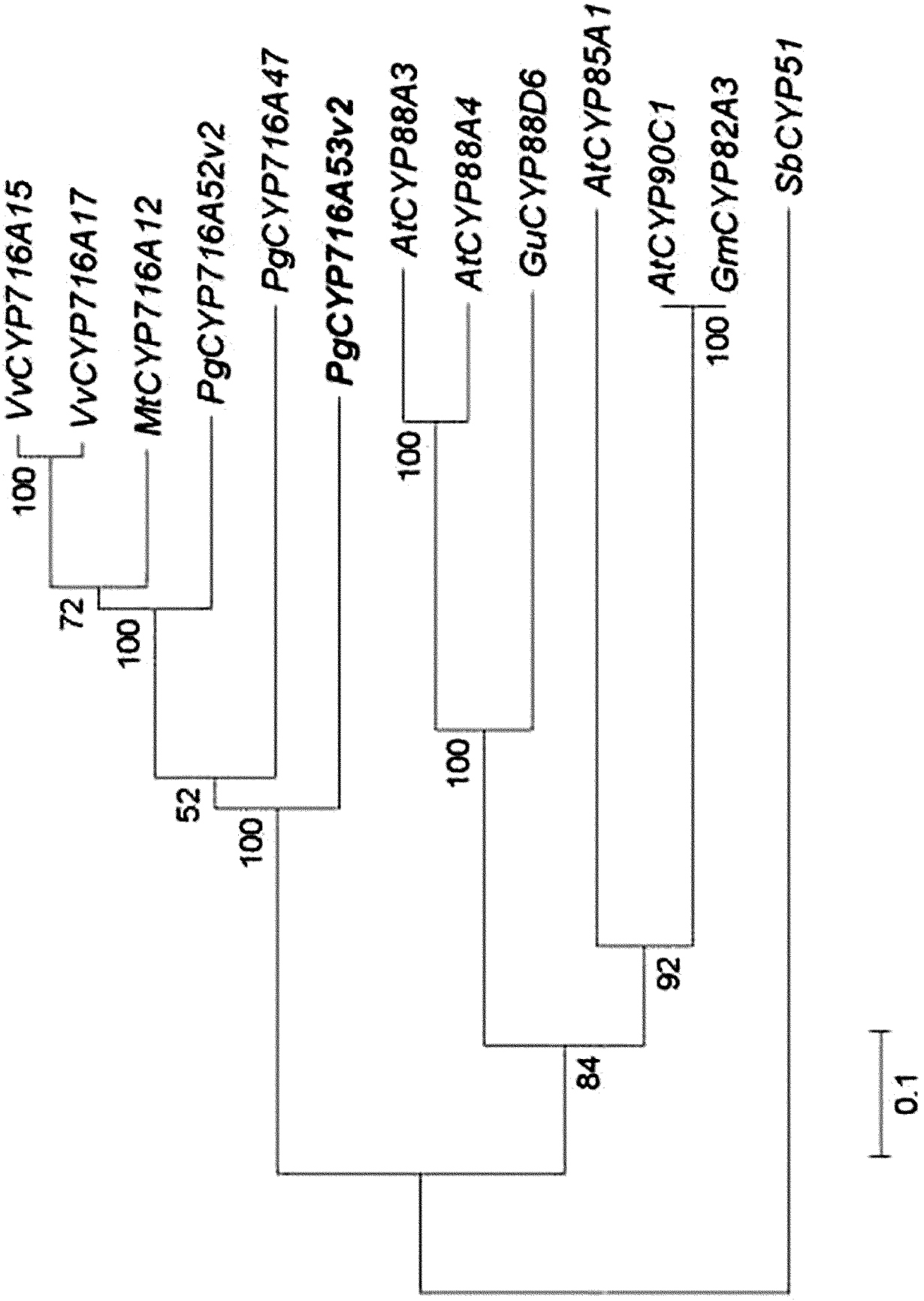
[청구항 10] 제9에 있어서,
상기 방법은 제4항의 재조합 벡터 또는 플라스미드로 숙주를 형질전환시켜 CYP716A53v2 유전자 또는 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 숙주는 효모, 대장균 또는 식물인 것을 특징으로 하는 프로토파낙사트리올 생산을 증가시키는 방법.

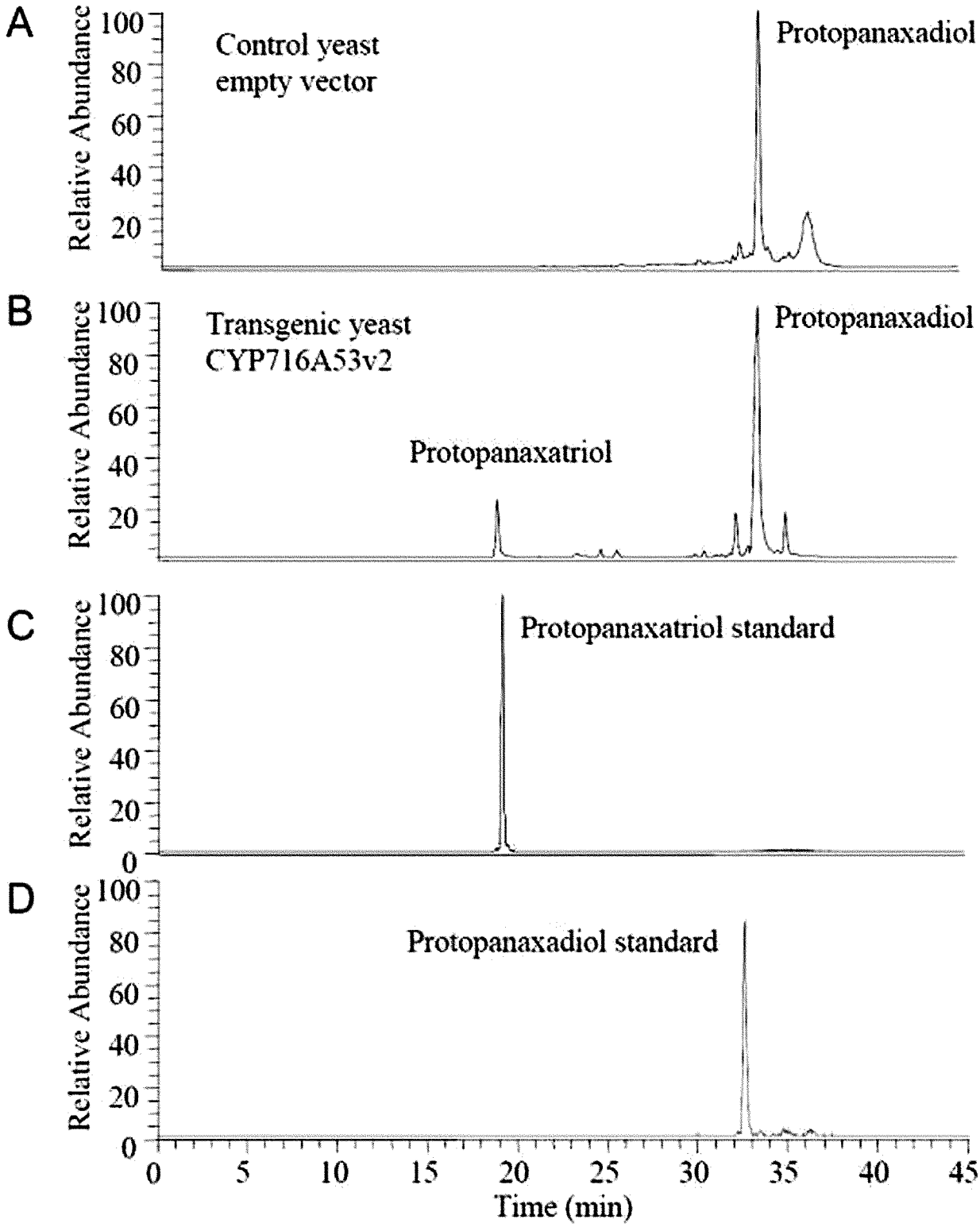
[Fig. 1]


Squalene
Squalene epoxidase
2,3-oxidosqualene
Dammarenediol synthase
Dammarenediol-II
CYP716A47
Protopanaxadiol
CYP716A53v2
Protopanaxatriol
β-amyrin synthase
β-amyrin
CYP450?
Oleanolic acid
Glycosyltransferase
Glycosyltransferase
Glycosyltransferase
Panaxadiol-type ginsengoside-Rb1
Panaxatriol-type ginsengoside-Rg1
Glc-GlcA-O
Oleanane-type Ginsenoside-Ro
O-Glc-Glc
Glc-Glc-O
O-Glc
HO
OH
CO-O-Glc

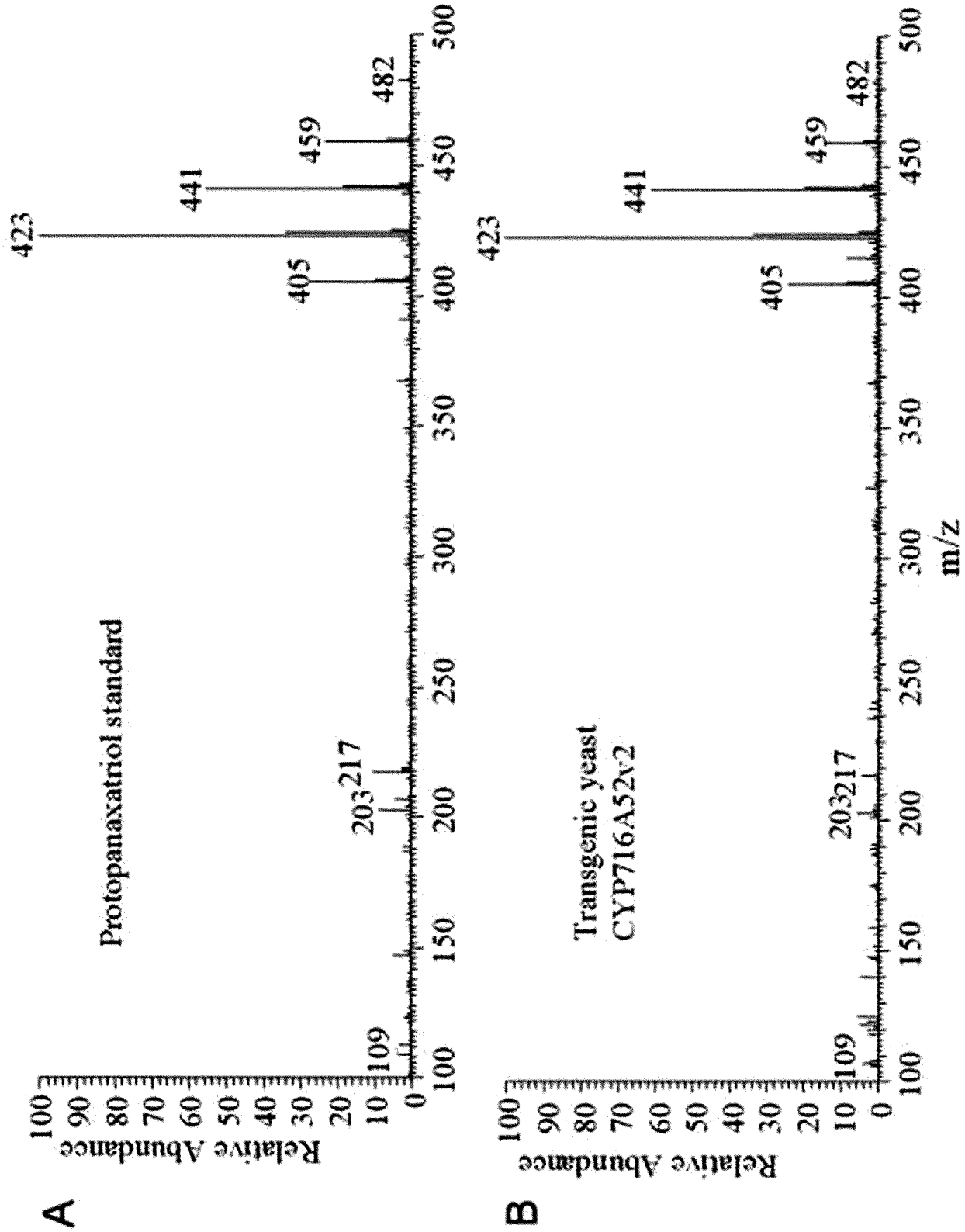
[Fig. 2]


VvCYP716A15
VvCYP716A17
MtCYP716A12
PgCYP716A52v2
PgCYP716A47
PgCYP716A53v2
AtCYP88A3
AtCYP88A4
GuCYP88D6
AtCYP85A1
AtCYP90C1
GmCYP82A3
SbCYP51
100
72
100
52
100
100
100
84
92
100
0.1

[Fig. 3]


A
Relative Abundance
100
80
60
40
20
Control yeast
empty vector
Protopanaxadiol
B
Relative Abundance
100
80
60
40
20
Transgenic yeast
CYP716A53v2
Protopanaxatriol
Protopanaxadiol
C
Relative Abundance
100
80
60
40
20
0
Protopanaxatriol standard
D
Relative Abundance
100
80
60
40
20
0
Protopanaxadiol standard
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Time (min)

[Fig. 4]


A
Protopanaxatriol standard
Relative Abundance
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100
150
200
250
300
350
400
450
500
109
203
217
405
423
441
459
482
B
Transgenic yeast
CYP716A52v2
Relative Abundance
m/z

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/KR2013/005033**

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***C12N 15/29(2006.01)i, C07K 14/415(2006.01)i, C12N 15/63(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 15/29; C07K 14/415; C12N 15/63

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: protopanaxatriol, protp[anaxadiol 6-hydroxylase, CYP716A53v2, ginsenoside

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | YUE, C-J. et al., "Protopanaxadiol 6-hydroxylase and its role in regulating the ginsenoside heterogeneity in Panax notoginseng cells", Biotechnology and Bioengineering, 01 August 2008, vol. 100, no. 5, pages 933-940 (05 February 2008, Published on online).<br>See abstract. | 1-11 |
| A | YUE, C-J. & ZHONG, J-J., "Manipulation of ginsenoside heterogeneity of Panax notoginseng cells in flask and bioreactor cultivations with addition of phenobarbital", Bioprocess Biosyst Eng., 2008, vol. 31, pages 95-100 (16 August 2007, Published on online).<br>See abstract. | 1-11 |
| PX | HAN, J-Y. et al., "Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in Panax ginseng", Plant Cell Physiology, September 2012, vol. 53, no. 9, pages 1535-1545 (07 August 2012, Published on online).<br>See the entire document. | 1-11 |
| PA | GenBank: JX036031.1 Panax ginseng cytochrome P450 CYP716A53v2 mRNA, complete cds (31 July 2012, Published on online).<br>See the entire document. | 1-11 |

☒ 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
"T" 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 17 SEPTEMBER 2013 (17.09.2013) | **23 SEPTEMBER 2013 (23.09.2013)** |

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/KR2013/005033**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| PA | GenBank: AFO63031.1 Cytochrome P450 CYP716A53v2[Panax ginseng] (31 July 2012, Published on online).<br>See the entire document. | 1-11 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
**PCT/KR2013/005033**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member | Publication date |
|---|---|---|---|
| NONE | | | |

# 국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
**PCT/KR2013/005033**

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

**C12N 15/29(2006.01)i, C07K 14/415(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i**

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/29; C07K 14/415; C12N 15/63

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: protopanaxatriol, protp[anaxadiol 6-hydroxylase, CYP716A53v2, ginsenoside

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| A | YUE, C-J. et al., 'Protopanaxadiol 6-hydroxylase and its role in regulating the ginsenoside heterogeneity in Panax notoginseng cells', Biotechnology and Bioengineering, 2008년8월1일, 100권, 5호, 933-940면 (2008.2.5. 온라인 공개).<br>초록 참조. | 1-11 |
| A | YUE, C-J.& ZHONG, J-J., 'Manipulation of ginsenoside heterogeneity of Panax notoginseng cells in flask and bioreactor cultivations with addition of phenobarbital', Bioprocess Biosyst Eng., 2008년, 31권, 95-100면 (2007.8.16. 온라인 공개).<br>초록 참조. | 1-11 |
| PX | HAN, J-Y. et al., 'Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in Panax ginseng', Plant Cell Physiology, 2012년9월, 53권, 9호, 1535-1545면 (2012.8.7. 온라인 공개).<br>전문 참조. | 1-11 |
| PA | GenBank: JX036031.1 Panax ginseng cytochrome P450 CYP716A53v2 mRNA, complete cds (2012.7.31. 공개).<br>전문 참조. | 1-11 |

☒ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

| 국제조사의 실제 완료일 | 국제조사보고서 발송일 |
|---|---|
| 2013년 09월 17일 (17.09.2013) | 2013년 09월 23일 (23.09.2013) |

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
이효진
전화번호 +82-42-481-8743

# 국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
**PCT/KR2013/005033**

C (계속). 관련 문헌

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
|---|---|---|
| PA | GenBank: AFO63031.1 Cytochrome P450 CYP716A53v2[Panax ginseng] (2012.7.31. 공개).<br>전문 참조. | 1-11 |

# 국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
**PCT/KR2013/005033**

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 |
|---|---|---|---|

없음