



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0101217

(43) 공개일자 2015년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0022653

(22) 출원일자 2014년02월26일

심사청구일자 2014년02월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

김용수

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

반준규

인천 서구 청라커널로 232, 415동 607호 (경서동, 청라엘에이치)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

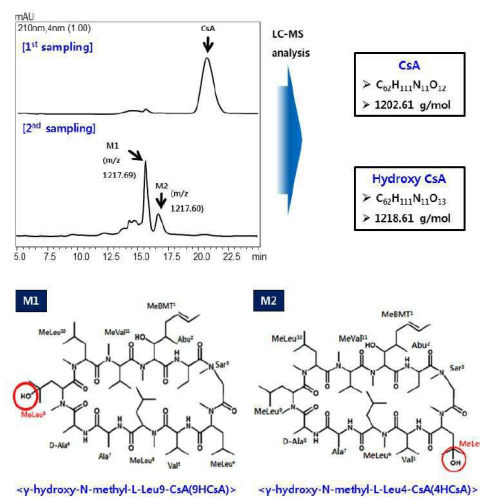
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 슈도노카디아 오토트로피카 유래의 사이클로스포린 특이적인 신규 수산화효소

(57) 요약

본 발명은 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래의 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것으로, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 사이클로스포린 A 특이적인 수산화효소(hydroxylase)를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 사이클로스포린 A를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

우민우

인천 남동구 만수로75번길 21, 1009호 (만수동, 태화아파트)

이보람

서울 강남구 양재대로55길 10, 103동 417호 (일원동, 수서1단지에스케이치빌)

이미진

인천 남구 인하로 95, 301호 (용현동)

최시선

인천 부평구 부흥로 246, 36동 407호 (부평동, 동아2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009522

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농생명바이오식의약소재개발사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 희소방선균 유전체공학 기반의 폴리엔 바이오 신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 수산화효소 (hydroxylase).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 수산화효소는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래인 것을 특징으로 하는 수산화효소.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 수산화효소는 사이클로스포린 A를 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA) 또는 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 수산화효소.

청구항 4

제 1 항의 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계;

상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및

상기 형질전환된 세포를 배양하여 사이클로스포린 A를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion)은 사이클로스포린 A를 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA) 또는 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래의 사이클로스포린(cyclosporin) 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

사이토크롬 P450 하이드록실레이즈 (Cytochrome P450, CYP)는 단백질 3차 구조 내에 헴 (heme)을 가지고 있는 헤모프로테인 (hemoprotein)으로, 다양한 종류의 생체 이물 (xenobiotics)의 산화적 대사에 관여하여 생물체에 필수적인 생촉매 역할을 하는 것으로 알려져있다. CYP는 헴 (heme)에 포함된 철 이온이 산화될 때 활성을 띄며, 활성화된 CYP가 일산화탄소와 결합 시 450nm의 특정 파장의 빛을 흡수한다는 의미에서 P450이라 불린다. CYP는 거의 모든 생물체에서 발견되며, 페러독신 (ferredoxin, FD), 페러독신 리덕테이스 (ferredoxin reductase, FDR) 등의 전자전달파트너와 함께 전자전달시스템을 이루어 특정 기질에 하이드록실기 또는, 에폭시기를 도입한다. 생체 내에서 생산되지 않는 약물이나 인공화학물질, 오염물질, 발암물질 등은 CYP의 산화적 대사작용을 통해 체내에서 분해되며, 비타민과 폴리케타이드 계열 향생물질 등의 다양한 이차대사산물의 생합성과정에도 CYP가 관여하여 해당물질의 생리적 활성, 용해도, 약품의 효력 등에 영향을 미치기도 한다.

[0003]

CYP에 의해 생전환 되는 물질로 독소루비신 (doxorubicin)을 예로 들 수 있다. *Streptomyces peucetius* 유래의 CYP인 Dox A는 다우노루비신 (daunorubicin)에 한 개의 하이드록실기를 도입하여 보다 광범위한 항생능력을 나

타내는 독소루비신을 생산한다. 또 다른 예로, 프로호르몬인 비타민 D3 (vitamin D3, VD3)는 간과 신장에 존재하는 두 개의 CYP (CYP27A1, CYP27B1)에 의해 각각 1 α 와 25번 탄소에 하이드록실기가 도입됨으로써 생리적 활성을 보인다.

[0004] 방선균은 항암제, 항생제 등의 유용한 생리활성물질을 생합성하는 그람 양성 토양미생물로써, 유용 이차대사산물들의 생합성을 위해 다양한 종류의 CYP를 보유하고 있는 대표적인 산업 미생물이다. 라파마이신(Rapamycin), 피크로마이신(pikromycin), 독소루비신(doxorubicin), 에버맥틴(ivermectin) 등 수많은 항생, 항암 물질들이 방선균에 의해 생산되고 있으며 이들의 생합성과정에 CYP가 관여하고 있음이 알려져 있다.

[0005] 회소방선균 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)는 비타민 D₃, 모네신, 나이저리신 등의 다양한 이차대사산물의 특정 위치에 하이드록실기를 도입하는 CYP들을 보유하고 있다. 면역억제제 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 또한 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)에 의해 생전환되는 물질 중 하나로서, 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 4번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기가 도입된다(γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA, 4HCsA). 4HCsA는 기존에 가지고 있던 면역억제능은 제거되고, 부작용인 모발성장촉진효과만 남아 차세대 발모제로서의 가능성을 가지고 있다. 본 발명자들은 이전의 연구를 통하여, 회소방선균 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*)에 존재하는 21개의 CYP들 중 하나의 CYP가 CsA에 특이적으로 하이드록실기를 도입함을 확인하고, 이를 CYP-sb21이라 명명하였다.

[0006] 본 발명자들은 또 다른 회소방선균 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)가 생전환시키는 생리활성 물질에 대해 연구하던 중, 문헌 자료를 통해 해당 미생물이 CsA의 9번째 아미노산, 메틸 류신에도 하이드록실기를 도입함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)에 존재하는 CYP 중 CsA의 수산화 작용에 관여하는 CYP를 확인하기 위해 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 전체 유전체 서열분석(whole genome sequencing)을 통하여 31개의 CYP를 확보하였다. 분류된 CYP들 중, 이전에 밝혀진 CsA 특이적인 세베키아 베니하나(*Sebekia benihana*) 유래의 CYP, CYP-sb21과의 아미노산 서열 비교를 통해 가장 유사성을 보이는 3개의 CYP를 선별하였다. 이들을 유전적으로 불활성화하는 실험을 진행함으로써, 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*)에 존재하는 신규 CsA 특이적인 하이드록실레이즈를 찾고 이를 기존에 연구된 CYP-sb21과의 비교를 통하여 CYP의 기질 특이성 및 위치 특이성에 대한 정보를 얻고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2002-0066834(2002.08.21 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 수산화효소(hydroxylase)를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 사이클로스포린 A를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA) 특이적인 수산화효소(hydroxylase) 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

[0011] 상세하게는 상기 사이클로스포린 A 특이적 수산화효소는 사이클로스포린 A를 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-

CsA(4HCsA) 또는 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 한다.

- [0012] 본 발명의 "사이클로스포린 A (cyclosporine A, CsA)"는 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.
- [0013] 상기 " γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA)"는 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 4번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기가 도입된 화합물이다.
- [0014] 상기 " γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)"는 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 9번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기가 도입된 화합물이다.
- [0015] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 1의 수산화효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 효소 기능을 유지하는 것 모두를 포함한다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산 (Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산 (Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산 (Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산 (Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 수산화효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 수산화효소를 암호화하는 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 재조합 발현벡터를 제작하는 단계; 상기 재조합 발현벡터로 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 세포를 배양하여 사이클로스포린 A를 수산화(hydroxylation)시키는 단계를 포함하는 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion) 방법을 제공한다. 상세하게는, 상기 사이클로스포린 A 생전환(bioconversion)은 사이클로스포린 A를 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA) 또는 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 전환시키는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되지만, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 서열에 등가의 핵산서열들을 제공한다.
- [0018] "등가의 핵산서열"에는 상기 수산화효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다. "코돈 축퇴성 서열"이란 상기 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 수산화효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 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 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0021] 본 발명에서 사용한 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브록 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌 (Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0022]

본 발명은 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) 유래의 사이클로스포린(cyclosporin) 특이적인 신규 수산화효소(hydroxylase)에 관한 것으로서, 사이클로스포린 A를 구성하는 11개의 아미노산 중 4번째 또는 9번째 아미노산인 메틸 류신의 위치 특이적 수산화반응(hydroxylation)을 통하여, 화학적 방법에 의한 일반적 합성보다 수산화된 사이클로스포린을 더 효과적으로 합성할 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에서의 CsA 및 수산화된 CsA의 구조 및 HPLC 프로파일을 나타낸다. M1 및 M2 화합물을 포함하는 분획은 각각 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA (9HCsA) 및 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA (4HCsA)인 것으로 나타났다. 상기 구조는 LC-MS 분석에 의해 확인되었다.

도 2는 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA (9HCsA)(A) 및 γ -hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA (4HCsA)(B)의 LC-MS 분석 결과를 나타낸다.

도 3a는 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 유래 CYP-sb21 및 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 31 CYPs의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸다. 3개의 CYPs (contig00107_orf00017, contig00867_orf00001 및 contig00867_orf00009)는 CYP-pa1, CYP-pa2 및 CYP-pa3으로 명명되었다.

도 3b는 CYP-sb21, CYP-pa1, CYP-pa2 및 CYP-pa3의 서열 비교 결과이다. 상자는 CYP-특이 모티프(motif)를 구성하는 보존된 아미노산 잔기를 나타낸다: I-helix (oxygen-binding motif), K-helix (ferredoxin-binding motif) 및 cysteine heme-iron ligand (heme-binding motif).

도 4는 아프라마이신 (apr^R)/oriT로 CYPs (CYP-pa1, CYP-pa2 및 CYP-pa3)의 PCR-표적 유전자 대체 파괴에 대한 모식도(A) 및 CYP 녹아웃(knock-out) 돌연변이의 HPLC 프로파일(B)을 나타낸다.

도 5는 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 균주에서 CYP-pa1에 대한 유전학적 과발현 및 보상(genetic complementation)을 나타낸다. (A) pMML005 플라스미드를 이용한 재조합 플라스미드 pCYP-pa1 및 pCYP-pa2의 제작. (B) 전환 수율 및 (C) 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)/pMML005, 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)/pCYP-pa1, 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) Δ CYP-pa1, 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) Δ CYP-pa1/pCYP-pa1 및 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) Δ CYP-pa1/pCYP-pa2 균주에서의 CsA 생전환 HPLC 프로파일.

도 6은 pHSEV-1에서 파생된, pHE-pa1 플라스미드의 맵(A)을 나타내고, 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145/pHE-pa1 및 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) Δ SCO5426/pHE-pa1에서 CYP-pa1을 이종발현(heterologous expression)시킨 CsA 대사체의 HPLC 프로파일(B)을 나타낸다.

도 7은 상호-보상 균주들에 대한 HPLC 프로파일을 나타낸다. (A) 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) Δ CYP-pa1 돌연변이에서 pCYP-sb21, (B) 세베키아 베니하나(*S. benihana*) Δ CYP-sb21 돌연변이에서 pCYP-pa1.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

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.

[0025]

<실험예>

[0026]

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

[0027]

1. 균주, 배양 조건

[0028]

최소 방선균 슈도노카디아 오토트로피카(*Pseudonocardia autotrophica*) KCTC 9441은 한국세포주은행(Korean Collection for Type Cultures; KCTC, Korea)으로부터 구입하였고, CsA 수산화반응을 확인하기 위해 GSMY 배지(glucose 0.7%, yeast extract 0.45%, malt extract 0.5%, soluble starch 0.75% 및 calcium carbonate

0.005%)에서 배양하였다. 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145는 CsA 수산화반응을 확인하기 위해 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에서 배양되었고, 원형질체(protoplast) 형질전환을 위해서 YEME 배지(yeast extract 0.3%, peptone 0.5%, malt extract 0.3%, glucose 1%, sucrose 34% 및 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5mM, 별도로 멸균된 glycine 0.5%)에서 30℃로 더 배양되었다.

[0029] 2. CsA-특이적 수산화반응에 대한 생전환 분석 및 HPLC 분석

[0030] 선별된 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 균주는 GSMY 배지에서 30℃로 72 hr 동안 배양되었고, 수산화반응 기질로서 CsA (50 mg/L)로 처리되었으며, 추가적으로 48 hr 동안 더 배양되었다. 미정제(crude) 화합물은 에틸아세테이트(ethylacetate)를 사용하여 배양 용액으로부터 추출하였고, 에틸아세테이트는 증발시켰으며, 미정제 화합물은 메틸 알콜로 재현탁하였다. 샘플들은 광다이오드 어레이(photodiode array) 검출기가 장착된 HPLC 및 Vydac 218TP C₁₈ Column (250X4.6mm, 5 μ m, GRACE, USA)를 사용하여 25% 메탄올(완충액 A) 및 100% 아세토니트릴(acetonitrile) (완충액 B)로 구성된 이중 완충액(two-buffer) gradient system에서 분석되었다. 컬럼 온도(column temperature)는 60℃였다. 완충액 B gradient의 한 사이클(cycle)은 다음과 같이 프로그래밍화되었다: 40%로 4분, 61%로 15분 및 40%로 10분. CsA 및 이의 유도체들은 210 nm에서 모니터링하였다. 유량(flow rate), 1.0mL/min였고, 주입 부피는 20 μ L이었다.

[0031] 3. CYPome 동정을 위한 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 유전체 서열분석

[0032] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 유전체 서열분석은 Genotech Korea에서 수행하였다. 전체 크기는 9,977,725bp였고, contig의 길이는 3,279,418bp였으며, ORFs의 수는 10,581개 였고, GC 함량은 69.9 %이었다. 예측되는 단백질-코딩 유전자의 기능은 UniRef, NCBI-NR, COG 및 KEGG로 비교하여 분석하였다. 아미노산 서열 비교는 Clustal W2 Multiple Sequence Alignment (EMBL-EBI)를 이용하여 수행하였다.

[0033] 4. 재조합 대장균(*E. coli*)

[0034] 재조합 플라스미드를 형질전환 및 전기충격(electroporation)을 통해 대장균(*E. coli*) 균주로 도입하였다. DNA 클로닝을 위해 대장균(*E. coli*) DH5 α 을 사용하였고, 단백질 발현을 위해 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3)를 사용하였다. 플라스미드의 메틸기를 제거하기 위해서 ET12567을 사용하였고, 대장균-스트렙토마이세스(*E. coli*-*Streptomyces*) 접합을 위해서 pUZ8002를 가진 대장균(*E. coli*) ET12567을 사용하였다.

[0035] 5. PCR-표적 유전자 파괴 돌연변이

[0036] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 돌연변이 균주는 일반적인 방법인 PCR-표적 유전자 파괴-보상 시스템을 이용하여 제작되었다. CYP 유전자들의 교체를 위한 아프라마이신(apramycin)-내성 유전자/*oriT* 카세트는 주형으로 pIJ773 및 파괴 프라이머들을 이용하여 증폭되었다(표 1).

표 1

Oligonucleotide	Primer sequence (5'-3')	Purpose
CYP-pa1	dis F TACACCGCTACGGGCGGATGCGCGAGCAGGCGCCACCAATTCGGGG ATCCGTCGACC	Disruption
	dis R AAGCGTTCGAACAGCGTCCGGAAGGCCACCTCGCCCTCCTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	
	comp (chk) F GGATCCCCTCGGAGGTCG	Overexpression & Complementation
	comp (chk) R TCTAGAACGACGCGGGCA	
	HE F CATATGGGCGTCGCCGGTCTGTA	Heterologous expression
	HE R GAATTCAGTCTCACCCTGTACGA	
	EX F CATATGGAGACCTCTCGTCCG	Protein expression (His-tagging)
	EX R CTCGAGGCCGGTCAGAAC	
	GEX F GGATCCATGGAGACCTCTCGTCCG	Protein expression (GST-tagging)
	GEX R CTCGAGTCAGCCGGTCAGAACCGG	
CYP-pa2	dis F TCATGGGCACGCTCTTGACGGGCTCGGGCTGCCCGGAATTCGGGG ATCCGTCGACC	Disruption
	dis R TCGATCTCCTGACGGGCCAGCGGCCCCAGGCAGTAGTTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	
	comp F GGATCCCGCCATCGTCAA	Identification by PCR & Complementation
	comp R TCTAGAGCAACACCGGCG	
CYP-pa3	dis F ACACCGTGACCCGTCGGACCCGGTCGCCGGCTTCTCCGATTCCGGGG ATCCGTCGACC	Disruption
	dis R TGACCAGCGCCGACAGCAGCAGCTCGACCTCCTGGCGGGCTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	
	chk F GGATCCACGGGACCGAAC	Identification by PCR
	chk R TCTAGAACGAGACCCGCG	
CYP-sb13	Comp. F,R J. Microbiol. Biotechnol.(2011) 21, 14-19	Complementation
CYP-sb21	Comp. F,R Appl. Environ. Microbiol.(2013) 79, 2253-2262	Complementation
	EX F CATATGGACACCGTTAATCTG	Protein expression (His-tagging)
	EX R CTCGAGGCGCAGCAGAAC	
	GEX F GGATCCATGGACACCGTTAATCTGATG	Protein expression (GST-tagging)
	GEX R CTCGAGTCAGCGCAGCAGAACCGG	

6. 재조합 삽입 플라스미드 pCYP-pa1 및 pCYP-pa2의 제조

슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에서 pCYP-pa1 및 pCYP-pa2 유전자의 기능적 과발현 및 보상 실험을 위해서, *Bam*HI (GGATCC) 및 *Xba*II (TCTAGA) 사이트를 가진 전체 CYP-pa1 유전자를 포함하는 DNA 단편을 CYP-pa1 및 CYP-pa2 보상 프라이머(표 1)를 이용하여 얻었다. PCR은 각 프라이머 0.4 M, 4 dNTPs 각각 0.25 mM, 추출 DNA 1uL, 적절한 반응 완충액에 녹인 1U Ex *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 및 10% 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)가 포함된 최종 부피 20uL로 수행하였다. 다음의 프로파일에 따라, thermal cycler (BioRad, USA)로 증폭을 수행하였다: 95℃에서 60 s, 58℃에서 60 s, 및 75℃에서 60 s로 30 회. 증폭된 PCR 산물은 1% (w/v) 아가로스 젤 전기영동에 의해 분석되었고, DNA extraction kit (COSMO, Korea)를 이용하여 정제하였다. PCR 산물은 RBC T&A Cloning vector (Real Biotech Corporation, Taiwan)에 라이게이션하였다. 라이게이션된 벡터는 완전성(integrity)을 확인하기 위해서 완전히 서열분석되었다(MacroGen, Seoul, Korea). PCR 산물은 최종적으로 항시발현(constitutive) 프로모터(constitutive promoter) *ermE** 및 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자를 포함하는 삽입 플라스미드 pSET152에 서브클로닝되었다(도 5A). 결과적인 프라이머는 각각 pCYP-pa1 및 pCYP-pa2로 제작되었다. pCYP-pa1는 접합을 통해 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 야생형 및 CYP-pa1 파괴균주 내로 도입되었고, 그 후 *attB* 사이트에 삽입하고 하이그로마이신

(hygromycin)으로 선별하였다. pCYP-pa2는 CYP-pa1 파괴균주 내로 도입되었다.

[0040] 7. 이종(heterologous) 발현 플라스미드 pHE-pa1의 제작

[0041] 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 내에서 CYP-pa1 유전자를 이종 발현시키기 위해서, 전체 CYP-pa1 유전자를 포함하는 DNA 단편은 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 유래 게놈 DNA를 주형으로 사용하고, *NdeI* (CATATG) 및 *EcoRI* (GAATTC) 제한효소 사이트를 각각 포함하는 CYP-pa1 HE 프라이머를 이용하여 증폭하였다(표 1). PCR은 각 프라이머 0.4 M, 4 dNTPs 각각 0.25 mM, 추출 DNA(500 ng/μL) 1μL, 적절한 반응 완충액에 녹인 1U Ex *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 및 10% DMSO가 포함된 최종 부피 20μL로 수행하였다. 다음의 프로파일에 따라, thermal cycler (Bio-Rad)로 증폭을 수행하였다: 95°C에서 60 s, 58°C에서 60 s, 및 75°C에서 60 s로 30 회. 증폭된 PCR 산물은 1% (w/v) 아가로스 젤 전기영동에 의해 분석되었고, DNA extraction kit (COSMO, Korea)를 이용하여 정제하였다. 그 후, PCR 산물은 RBC T&A cloning vector (Real Biotech Corporation, Taiwan)에 라이게이션하였다. 라이게이션된 벡터는 완전성(integrity)을 확인하기 위해서 완전히 서열분석되었다(Macrogen, Seoul, Korea). PCR 산물은 유도성 *tipA* 프로모터를 포함하는 pHSEV-1 플라스미드에 최종적으로 서브클로닝하였고, 결과적인 플라스미드는 pHE-pa1로 명명하였다. pHE-pa1 플라스미드는 원형질(protooplast) 형질전환 방법을 통해 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 내로 도입한 후, 카나마이신(kanamycin; kan)에 의해 선별되었다.

[0042] 8. 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) 내에서 CYP-pa1 유전자의 이종 발현

[0043] 재조합 플라스미드 pHE-pa1은 원형질(protooplasts) 형질전환을 위해 사용되었다. 원형질(protooplasts) 형질전환을 준비하기 위해서, YEME 배지에서 배양한 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145 및 ΔSC05426 돌연변이에 라이소자임(lysozyme) (1 mg/mL)을 처리하였다. 형질전환은 pHE-pa1 및 P 완충액(sucrose 10.3%, K₂SO₄ 0.025%, MgCl₂ · 6H₂O 0.202%, trace element solution 0.2%)에 녹인 25% PEG 1000 용액으로 수행하였다. 형질전환된 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145 및 ΔSC05426 돌연변이는 R2YE 아가 플레이트(sucrose 10.3%, K₂SO₄ 0.025%, MgCl₂ · 6H₂O 1.012%, glucose 1%, casamino acids 0.01%, agar 1.1%, KH₂PO₄ (0.5%) 0.1%, CaCl₂ · 2H₂O (3.68%) 0.8%, L-proline (20%) 0.15%, TES buffer (5.73%, pH 7.2로 조정) 1%, trace element solution 0.02%, 별도로 준비된 NaOH (1N) 0.05%)에 30°C로 배양하였고, 재조합 균주의 선별을 위해서 카나마이신(kanamycin; kan)을 사용하였다.

[0044] <실시예 1> 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에서 CsA의 생전환

[0045] 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)는 CsA를 기질로 하여, CYP에 의한 산화적 대사과정을 거쳐 9번째 아미노산인 메틸 류신에 하이드록실기를 도입한다는 연구 결과가 국내 연구진에 의해 밝혀진 바 있다. 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 수산화반응에 의한 CsA의 생전환을 확인하기 위해 본 발명자들은 해당 균주의 야생형(wild type) 배양액에 CsA를 첨가한 후, 최종적으로 생산된 화합물을 추출하여 HPLC 프로파일에서 2개의 CsA 유도체를 확인하였다(도. 1). 두 가지 화합물을 LC-MS 분석을 통하여 분석한 결과 M1의 mass값 m/z 1218.6 (M1+H), M2의 값 m/z 1218.7 (M2+H)을 확인하였다(도 2). 이는 기질인 CsA의 이론적인 mass값인 1202.61 g/mol에 한 개의 하이드록실기가 도입되었을 경우의 이론적인 mass값 (1218.61 g/mol)과 매우 유사하여, M1과 M2 유도체가 CsA에 하나의 하이드록실기가 도입된 화합물임을 예상할 수 있었다. 기존에 연구되었던 세베키아 베니하나(*S. benihana*)에 의해 생전환된 γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu4-CsA(4HCsA)의 스팅킹(spiking) 실험을 통하여 HPLC 프로파일 상에서 소수 산물(minor product)인 M2 유도체의 체류시간(retention time)이 4HCsA와 동일함을 확인하였고, M2 유도체가 4HCsA와 동일 물질임이 예상되었다. 따라서 주요 산물(major product)인 M1이 γ-hydroxy-N-methyl-L-Leu9-CsA(9HCsA)로 예상된다.

[0046] <실시예 2> 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 전체 유전체 서열분석 및 CYPome에 대한 생물정보학적 분석

[0047]

슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에서의 CsA 특이적인 수산화반응에 관여하는 CYP를 찾기 위해 전체 유전체 서열분석을 수행하였고, 31개의 CYP로 예상되는 ORF를 분류하였다. 이들 유전자를 이전에 연구된 세베키아 베니하나(*S. benihana*) 유래의 CsA 특이적인 CYP인 CYP-sb21과의 아미노산 서열 비교 분석(amino acid sequence alignment)을 통해 서열 유사성이 높은 3개의 ORF를 선별하였고, 이를 각각 CYP-pa1, CYP-pa2 및 CYP-pa3라 명명하였다. 각각의 유전자는 계통수(phylogenetic tree) 분석을 통해 CYP-sb21과 계통적으로 매우 가까움을 확인할 수 있었다 (도 3a 및 표 2). 또한, CYP 단백질의 구조적 특징인 3가지 모티프(motif)를 보유하고 있어 해당 유전자들이 CYP 패밀리(family)에 속함을 확인하였다 (도 3b).

표 2

[0048]

Name		Identities
CYP-sb21	CYP-pa1	55%
CYP-sb21	CYP-pa2	47%
CYP-sb21	CYP-pa3	46%

[0049]

<실시예 3> 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에서의 표적 CYP 유전자들의 파괴

[0050]

선별된 3개의 CYP 유전자 중 CsA에 기질 특이적으로 하이드록실기를 도입하는 효소를 찾기 위해 PCR-표적 유전자 파괴 시스템(PCR-targeted gene disruption system)을 통하여 각 유전자를 불활성화하는 실험을 수행하였다 (도 4A). 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 유전자 라이브러리(gene library)에서 해당 유전자가 포함된 코스미드를 선별하여 목적 유전자를 아프라마이신(apramycin)-내성 유전자/*oriT* 카세트에 치환한 후, 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 야생형 균주의 유전체에 접합(conjugation)을 통해 도입하였다. 이들 돌연변이 균주의 CsA 생전환을 확인한 결과, 다른 불활성 돌연변이 균주의 경우 야생형과 동일하게 9HCsA와 4HCsA가 생산됨을 확인하였지만 ΔCYP-pa1 mutant의 경우 두 가지 화합물의 생산이 90 % 이상 현저하게 줄어들었다 (도 4B).

[0051]

<실시예 4> 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에서 CYP-pa1 유전자의 보상(complementation) 및 과발현

[0052]

슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)의 CsA 특이적인 수산화 반응에 CYP-pa1이 실질적으로 영향을 미치는지 확인하기 위하여 CYP-pa1 유전자의 보상 및 과발현 실험을 진행하였다. CYP-pa1 유전자를 항시발현(constitutive) 프로모터(promoter)인 *PerME**가 포함된 플라스미드 pMMBL005에 삽입하여 pCYP-pa1을 제작하였고 (도 5A), 이를 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 야생형과 ΔCYP-pa1 돌연변이에 접합(conjugation)을 통해 도입하여 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)/pCYP-pa1 (과발현균주)와 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) ΔCYP-pa1/pCYP-pa1 (보상균주)를 제작하였다. 생전환 분석(Bioconversion assay)을 통하여 CsA를 생전환 시킨 후 생산된 화합물을 HPLC 분석한 결과, 과발현 균주의 경우 9HCsA와 4HCsA 생산량이 약 1.4배 증가함을 확인하였고, 보상 균주의 경우 생전환 능력이 거의 100 % 보상됨을 확인하였다 (도 5B). 반면, CYP-sb21과의 유사성이 높은 또 다른 CYP인 CYP-pa2 유전자를 ΔCYP-pa1 돌연변이에 도입한 경우에는 생전환 능력이 회복되지 않았다 (도 5C). 따라서 CYP-pa1이 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에 존재하는 CsA에 특이적인 하이드록실레이즈임을 확인할 수 있었다.

[0053]

<실시예 5> 이중 숙주에서의 CYP-pa1의 기능적 발현

[0054]

CYP-pa1의 명확한 기능 확인을 위하여, CsA를 생전환 시키지 못하는 또 다른 방선균인 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*)에 이중 숙주 발현 실험을 진행하였다. 티오스트렙톤(Thiostrepton)에 의해 유도되는 *tipA* promoter를 포함한 pHSEV-1 플라스미드에 CYP-pa1을 삽입하여 pHE-pa1을 제작하였고, 이를 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) M145 (야생형)과 스트렙토마이세스 실리칼라(*Streptomyces coelicolor*) ΔSC05426 돌연변이 (NAD(P)H flux enhanced mutant)에 도입하였다 (도 6A). 생전환 결과 CYP-pa1이 도입된 균주의 HPLC 프로파일에서 9HCsA와 4HCsA가 생산됨을 확인하였다. 스트렙토마이세스 실리칼라

(*Streptomyces coelicolor*) ΔSC05426/pHE-pa1 균주의 경우 야생형에 CYP-pa1을 도입한 균주에 비해 비교적 높은 생전환율을 나타내었다 (도 6B). 그러나 두 균주 모두 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) 균주와 비교했을 때, 현저하게 낮은 생전환율을 보여주고 있다. 이는 CYP와 전자전달 시스템을 구성하는 전자 전달 파트너인 FD와 FDR의 중 특이성 때문으로 생각된다. 따라서 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*)에 존재하는 FD, FDR 중, CYP-pa1와 상호 관련성을 보이는 전자 전달 파트너를 선별하여 함께 이중숙주 발현시키는 방법을 통해 CsA 생전환율을 회복할 수 있을 것으로 예상된다.

[0055]

<실시예 6> CYP-pa1 및 CYP-sb21 사이의 위치 특이적 수산화반응 비교

[0056]

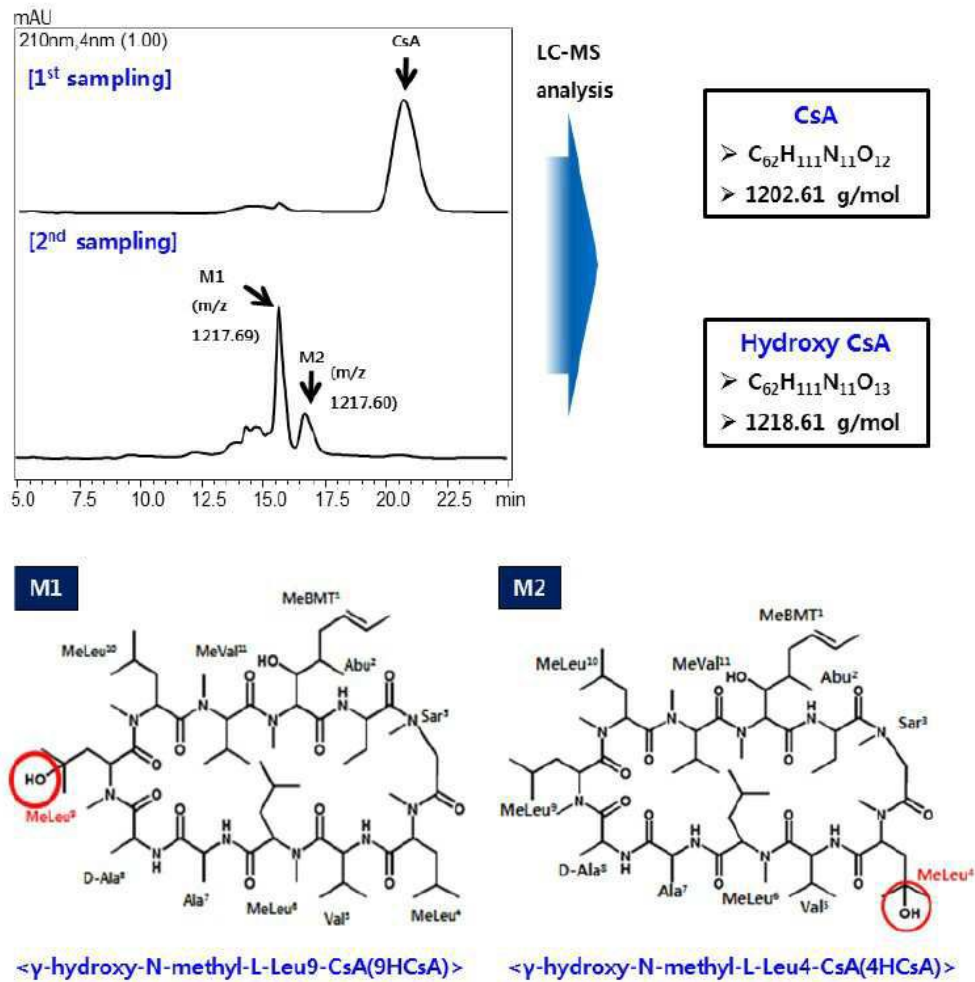
세베키아 베니하나(*S. benihana*)는 CsA를 4HCsA로 생전환 시키고, 이러한 작용에 CsA 특이적인 하이드록실레이즈 CYP-sb21이 관여함이 이전 연구를 통해 확인된 바 있다. 슈도노카디아 오토트로피카(*P. autotrophica*) ΔCYP-pa1 균주에 pCYP-sb21 (pMMBL302)을 도입하여 CsA의 생전환을 살펴본 결과, CYP-pa1을 보살한 균주와는 다르게 9HCsA보다 4HCsA가 더 많이 생산됨을 확인할 수 있었다 (도 7A). 또한, 반대로 세베키아 베니하나(*S. benihana*)에서 CYP-sb21을 불활성화시킨 균주에서의 실험도 같은 경향을 보였다 (도 7B). 이는 CYP-pa1과 CYP-sb21이 각각 CsA의 9번째, 4번째 메틸 류신에 하이드록실기를 도입하는 것을 더 선호하기 때문으로 볼 수 있다. 이후 연구에서, CYP-pa1과 CYP-sb1의 아미노산 서열의 특이점을 비교하고, 단백질 발현을 통한 효소의 3차 구조를 규명하여 두 효소의 구조적 차이를 확인할 수 있다면, 같은 기질을 대상으로 하는 효소들의 위치 특이적인 선호도에 대한 원인을 파악할 수 있을 것으로 예상된다.

[0057]

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.

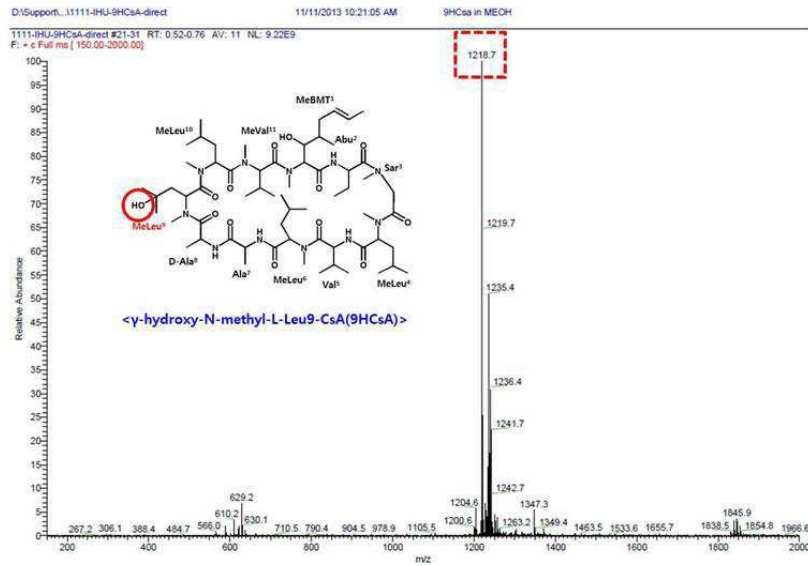
도면

도면1

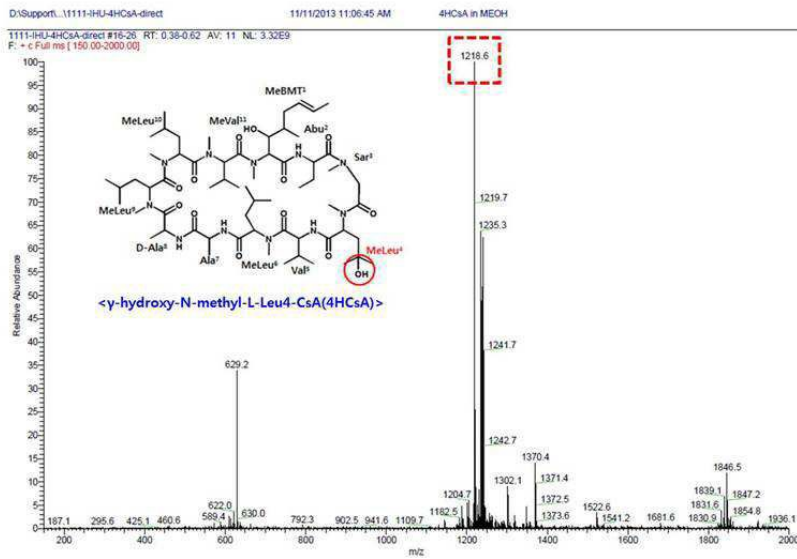


도면2

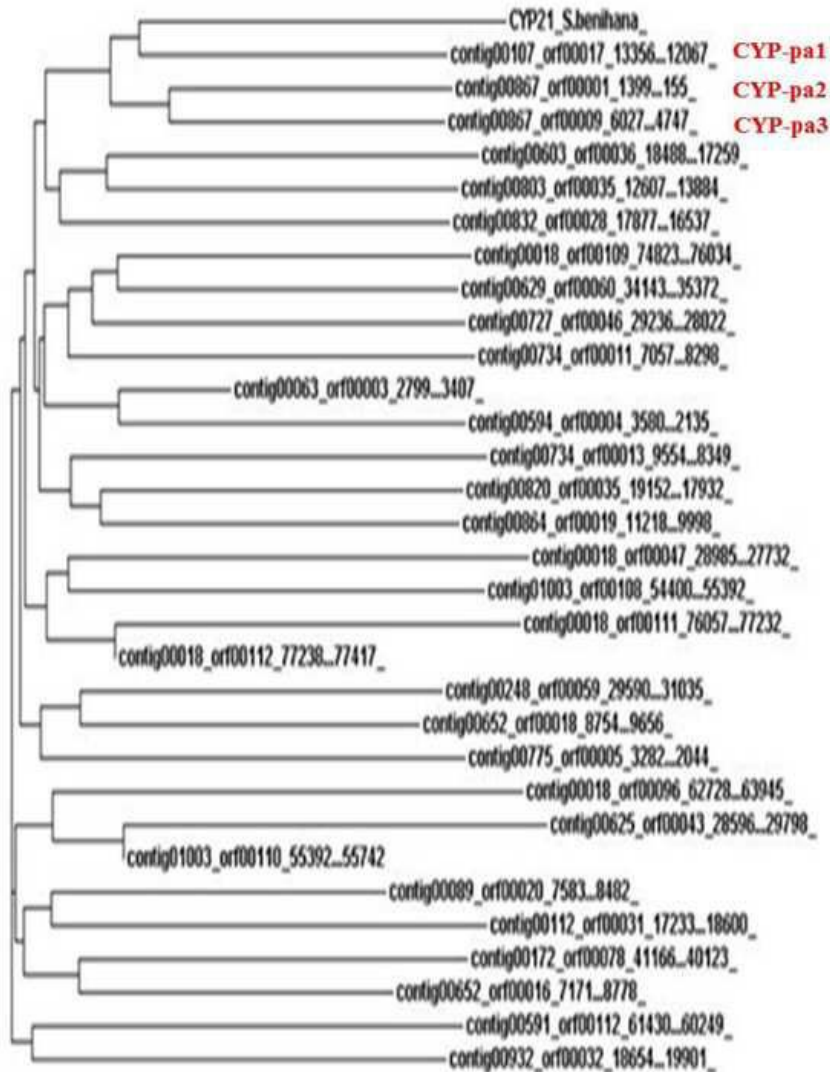
(A)



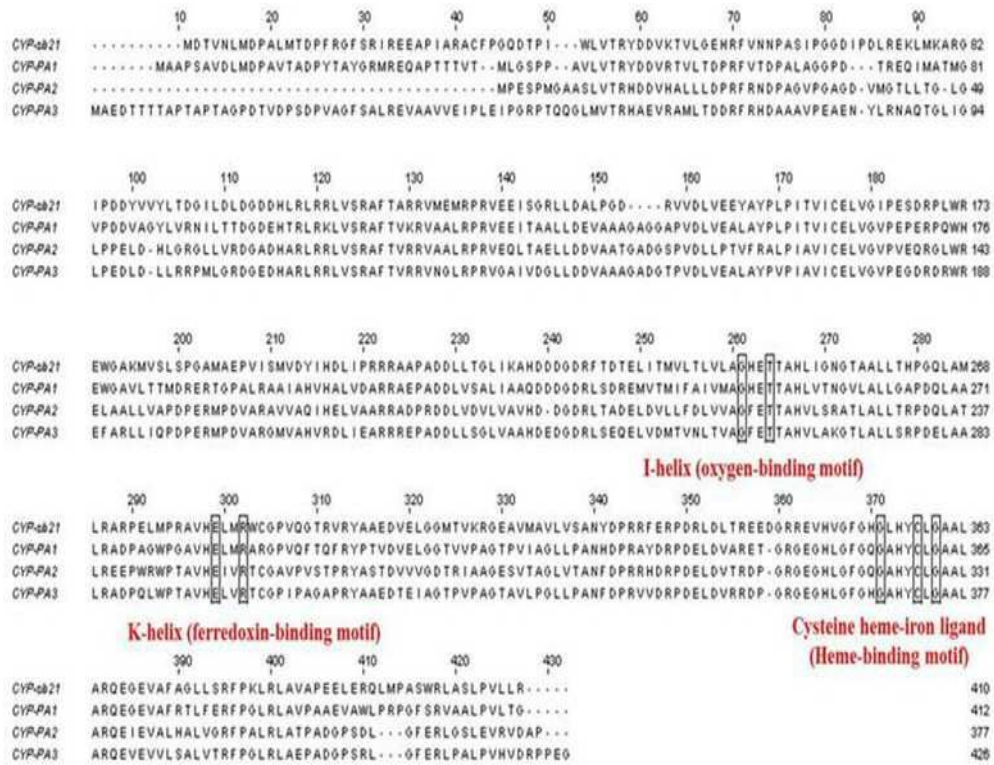
(B)



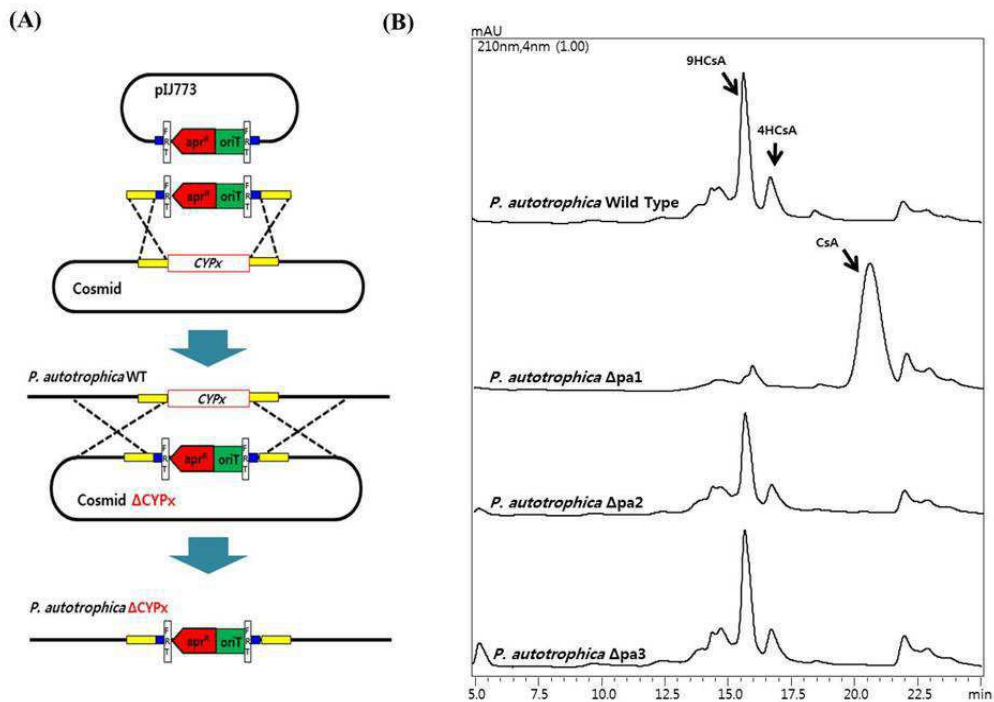
도면3a



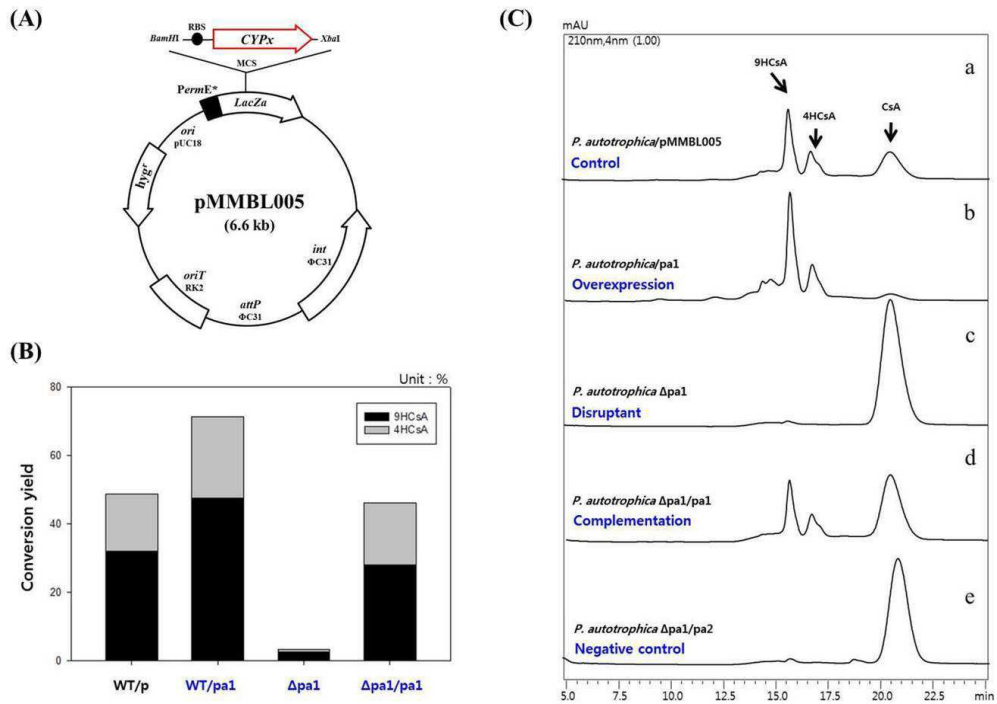
도면3b



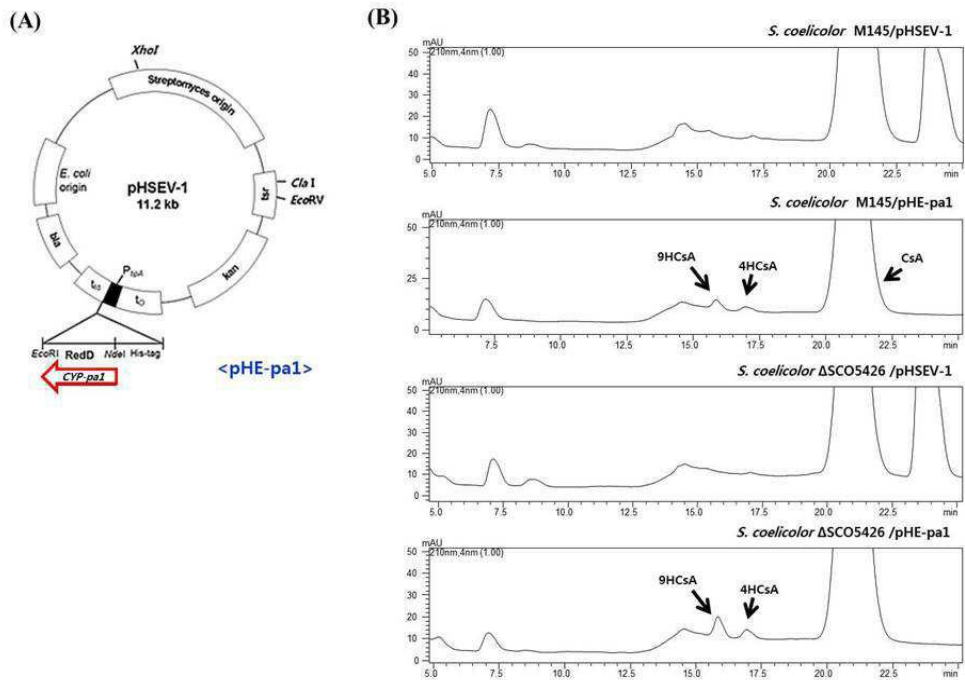
도면4



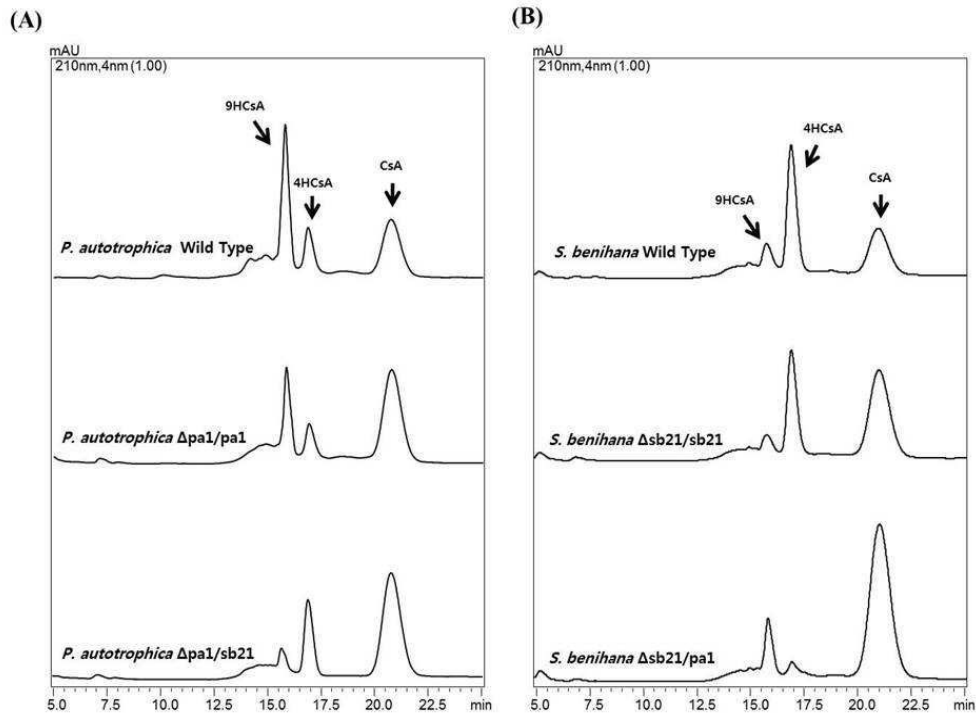
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Novel cyclosporin specific hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*
- <130> ADP-2014-0047
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 429
- <212> PRT
- <213> *Pseudonocardia autotrophica*
- <400> 1

Val Glu Thr Ser Arg Pro Leu Thr Arg Ala Arg Glu Glu Arg Ser Pro

1 5 10 15

Glu Met Ala Ala Pro Ser Ala Val Asp Leu Met Asp Pro Ala Val Thr

20 25 30

Ala Asp Pro Tyr Thr Ala Tyr Gly Arg Met Arg Glu Gln Ala Pro Thr

35 40 45

Thr Thr Val Thr Met Leu Gly Ser Pro Pro Ala Val Leu Val Thr Arg
 50 55 60
 Tyr Asp Asp Val Arg Thr Val Leu Thr Asp Pro Arg Phe Val Thr Asp
 65 70 75 80
 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Asp Thr Arg Glu Gln Ile Met Ala Thr
 85 90 95
 Met Gly Val Pro Asp Asp Val Ala Gly Tyr Leu Val Arg Asn Ile Leu
 100 105 110
 Thr Thr Asp Gly Asp Glu His Thr Arg Leu Arg Lys Leu Val Ser Arg
 115 120 125
 Ala Phe Thr Val Lys Arg Val Ala Ala Leu Arg Pro Arg Val Glu Glu
 130 135 140
 Ile Thr Ala Ala Leu Leu Asp Glu Val Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly
 145 150 155 160
 Ala Pro Val Asp Leu Val Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Leu Pro Ile Thr
 165 170 175
 Val Ile Cys Glu Leu Val Gly Val Pro Glu Pro Glu Arg Pro Gln Trp
 180 185 190
 His Glu Trp Gly Ala Val Leu Thr Thr Met Asp Arg Glu Arg Thr Gly
 195 200 205
 Pro Ala Leu Arg Ala Ala Ile Ala His Val His Ala Leu Val Asp Ala
 210 215 220
 Arg Arg Ala Glu Pro Ala Asp Asp Leu Val Ser Ala Leu Ile Ala Ala
 225 230 235 240
 Gln Asp Asp Asp Gly Asp Arg Leu Ser Asp Arg Glu Met Val Thr Met
 245 250 255
 Ile Phe Ala Ile Val Met Ala Gly His Glu Thr Thr Ala His Leu Val
 260 265 270
 Thr Asn Gly Val Leu Ala Leu Leu Gly Ala Pro Asp Gln Leu Ala Ala
 275 280 285
 Leu Arg Ala Asp Pro Ala Gly Trp Pro Gly Ala Val His Glu Leu Met
 290 295 300

Arg Ala Arg Gly Pro Val Gln Phe Thr Gln Phe Arg Tyr Pro Thr Val
305 310 315 320

Asp Val Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Pro Ala Gly Thr Pro Val Ile
325 330 335

Ala Gly Leu Leu Pro Ala Asn His Asp Pro Arg Ala Tyr Asp Arg Pro
340 345 350

Asp Glu Leu Asp Val Ala Arg Glu Thr Gly Arg Gly Glu Gly His Leu
355 360 365

Gly Phe Gly Gln Gly Ala His Tyr Cys Leu Gly Ala Ala Leu Ala Arg
370 375 380

Gln Glu Gly Glu Val Ala Phe Arg Thr Leu Phe Glu Arg Phe Pro Gly

385 390 395 400

Leu Arg Leu Ala Val Pro Ala Ala Glu Val Ala Trp Leu Pro Arg Pro

405 410 415

Gly Phe Ser Arg Val Ala Ala Leu Pro Val Leu Thr Gly

420 425

<210> 2

<211> 1290

<212> DNA

<213> Pseudonocardia autotrophica

<400> 2

gtggagacgt cgctccgct gaccgggcg cgcgaggaga ggagtcgca gatggccgca 60

ccgagtgcg tggacctgat ggaccggcc gtcaccgac accgtacac cgcctacggg 120

cggtatgcg agcaggcgcc caccaccacc gtgacgatgc tgggcagccc gcccgccgtg 180

ctcgtcacc gctacacga cgtccgcacg gtcctgaccg acccgcggtt cgtgaccgat 240

ccggcgctcg ccggggggcc ggacaccgc gagcagatca tggcgacgat ggggggtccc 300

gacgacgtcg ccggctacct ggtgcgcaac atctcacca ccgacggcga cgagcacacc 360

cggctgcgca agctcgtgtc gcgcgcgttc acggtgaagc gggtagcggc gctgcgcccg 420

cgggtggagg agatcaccgc gcacctgtc gacgaggtcg ccgcccggg ggccgggtggc 480

gcgccggtgg acctggtgga ggcgtggcc taccgctgc cgatcaccgt gatctgcgag 540

ctcgtcgggg taccgagacc cgagcgccc cagtggcacg aatggggagc ggtgctgacc 600

acgatggacc gcgagcggac cgggccccgcg ctgcgggcgg cgatcgccca cgtgcacgcc	660
ctcgtcgacg cccgccgggc cgagccccgc gacgacctgg tcagcgccct gatcgccgcc	720
caggacgacg acggcgaccg cctctcggac cgcgagatgg tcacgatgat cttcgcgatc	780
gtcatggcgg ggcacgagac gacggcgcac ctggtcacca acggcgtgct ggcgctgctg	840
ggcgccccgg accagctcgc cgcgctgcgg gccgaccggg cgggctggcc gggcgcggtg	900
cacgagctga tgcgcgcccg cggccccgtg cagttcacc agttccggtg cccgaccgtc	960
gacgtcgagc tgggcggcac cgtcgtgccc gccgggaccc cggtcacgc cgggctgctg	1020
ccggccaacc acgacccgcg cgcctacgac cggcccgacg agctcgacgt cggccgggag	1080
accgggcggg gcgagggaca cctcgggttc ggacaggcg cgcactactg cctgggcgcg	1140
gcgctggccc ggcaggaggg cgaggtggcc ttccggacgc tgttcgaacg cttccccggc	1200
ctgcggctcg ccgtgccggc cgcggaggtc gcctggctgc cccgtcccgg gttcagccgg	1260
gtggcggcgc tgccggtgct caccgggtga	1290