(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0118545
(43) 공개일자 2011년10월31일

(51) Int. Cl.
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/76* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0082418
(22) 출원일자 2010년08월25일
심사청구일자 2010년08월25일
(30) 우선권주장
1020100037709 2010년04월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
윤여준
서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 126동 202호
박성렬
경기도 고양시 일산동구 풍동 숲속마을2단지아파트 207동 604호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

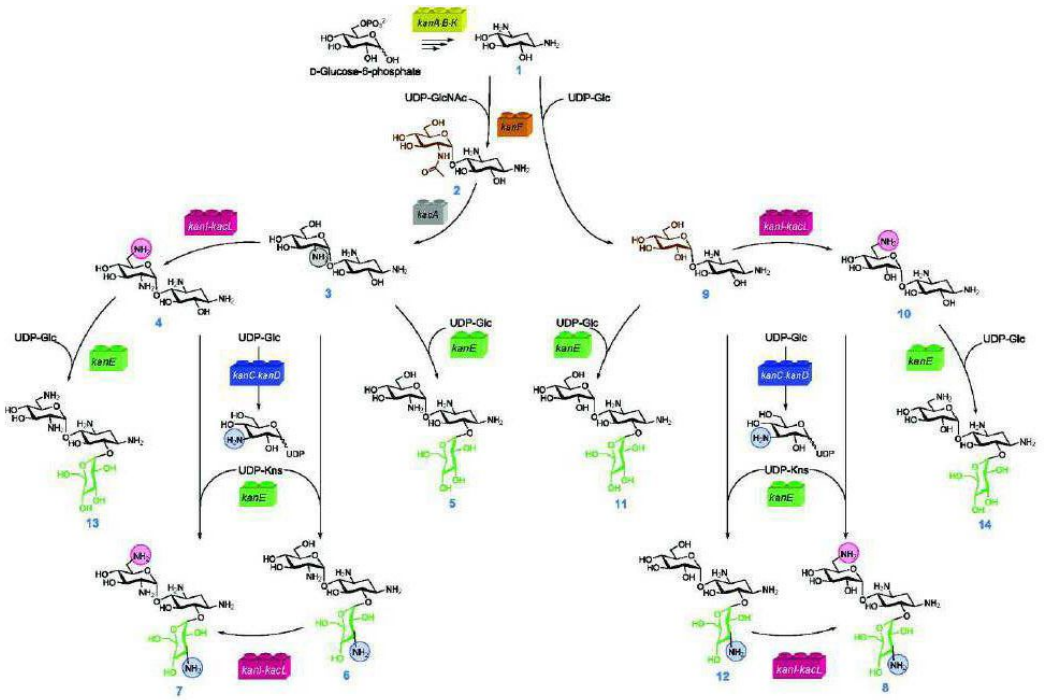
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 새로운 카나마이신 화합물, 카나마이신 생산 스트렙토마이세스 속 미생물 및 카나마이신의 생산 방법

(57) 요 약

kanA-kanB-kanK 및 기타 카나마이신 생산 관련 유전자를 발현하는 벡터 및 그 벡터로 형질전환된 스트렙토마이세스 속 재조합 미생물, 상기 미생물로 카나마이신 항균물질을 생합성하는 방법 및 상기 미생물로 만들어진 신규 카나마이신 화합물이 제공된다. 본 발명의 재조합 미생물을 통해 반합성 카나마이신인 아미카신과 토브라마이신의 직접적인 미생물 발효 생합성이 가능해지며, 반합성 카나마이신의 전구체인 카나마이신 B의 생산성이 향상된다.

대 표 도



(72) 발명자

박제원

경기도 고양시 일산서구 대화동 일신건영휴먼빌 602-1405

송재경

충청남도 아산시 신창면 읍내리 670-2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345068985

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 국가지정연구실사업

연구과제명 생합성경로 재설계를 통한 당포함항생제 및 항암제(glycosylated antibiotic and anticancer)의 유도체

기여율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기의 유전자 세트 중 어느 한 세트의 유전자를 포함하는 벡터:

1) kanA, kanB 및 *kanK*

2) kanA, kanB, kanK 및 *kanF*

3) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanC 및 *kanD*

4) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanI 및 *kacL*

5) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA 및 *kanE*

6) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC 및 *kanD*

7) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanI 및 *kacL*

8) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI 및 *kacL*

9) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, btrG, btrH, btrI, btrJ, btrK, btrO 및 *btrV*

10) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI, kacL, btrG, btrH, btrI, btrJ, btrK, btrO 및 *btrV*

11) kanA, kanB, kanK 및 *nemD*

12) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, kanE, kanC 및 *kanD*

13) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI 및 *kacL*

14) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI, kacL, aprD3 및 *aprD4*

15) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, tobM2, kanC, kanD, kanI, kacL, aprD3 및 *aprD4*

16) kanA, kanB, kanK 및 *tobM1*

17) kanA, kanB, kanK, tobM1, kacA, kanE, kanC 및 *kanD*

18) kanA, kanB, kanK 및 *gtmG*

19) kanA, kanB, kanK, gtmG, kacA, kanE, kanC 및 *kanD.*

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI* 및 *kacL* 유전자는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*)에서 유래하였고,

상기 *aprD3, aprD4, tobM1* 및 *tobM2* 유전자는 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*)에서 유래하였으며,

상기 *btrG, btrH, btrI, btrJ, btrK, btrO* 및 *btrV* 유전자는 바실러스 서큘란스(*Bacillus circulans*)에서 유래하였고,

상기 *nemD* 유전자는 스트렙토마이세스 프라디아에(*Streptomyces fradiae*)에서 유래하였으며,

상기 *gtmG* 유전자는 마이크로모노스포라 에키노스포라(*Micromonospora echinospora*)에서 유래한 것인 벡터.

청구항 3

하기의 유전자 세트 중 어느 한 세트의 유전자를 발현하는 스트렙토마이세스 속 미생물:

1) kanA, kanB 및 *kanK*

2) kanA, kanB, kanK 및 *kanF*

3) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanC 및 *kanD*

4) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanI 및 *kacL*

5) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA 및 *kanE*

6) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC 및 *kanD*

7) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanI 및 *kacL*

8) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI 및 *kacL*

9) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, btrG, btrH, btrI, btrJ, btrK, btrO 및 *btrV*

10) kanA, kanB, kanK, kanF, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI, kacL, btrG, btrH, btrI, btrJ, btrK, btrO 및 *btrV*

11) kanA, kanB, kanK 및 *nemD*

12) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, kanE, kanC 및 *kanD*

13) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI 및 *kacL*

14) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, kanE, kanC, kanD, kanI, kacL, aprD3 및 *aprD4*

15) kanA, kanB, kanK, nemD, kacA, tobM2, kanC, kanD, kanI, kacL, aprD3 및 *aprD4*

16) kanA, kanB, kanK 및 *tobM1*

17) kanA, kanB, kanK, tobM1, kacA, kanE, kanC 및 *kanD*

18) kanA, kanB, kanK 및 *gtmG*

19) kanA, kanB, kanK, gtmG, kacA, kanE, kanC 및 *kanD.*

청구항 4

제3항에 있어서,

카나마이신 내성 유전자를 더 발현하는 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 카나마이신 내성 유전자는 마이크로모노스포라 에키노스포라(*Micromonospora echinospora*)에서 유래한 *gtmF, gtmK* 및 *gtmL*인 미생물.

청구항 6

제3항에 있어서,

스트렙토마이세스 베네주엘라에(*Streptomyces venezuelae*)인 미생물.

청구항 7

제3항에 있어서,

9번 유전자 세트를 발현하며 스트렙토마이세스 베네주엘라에 KCTC11727BP인 미생물.

청구항 8

제3항에 있어서,

10번 유전자 세트를 발현하며 스트렙토마이세스 베네주엘라에 KCTC11728BP인 미생물.

청구항 9

제3항에 있어서,

13번 유전자 세트를 발현하며 스트렙토마이세스 베네주엘라에 KCTC11725BP인 미생물.

청구항 10

제3항에 있어서,

15번 유전자 세트를 발현하며 스트렙토마이세스 베네주엘라에 KCTC11726BP인 미생물.

청구항 11

제3항의 미생물을 이용하여 카나마이신 화합물을 생산하는 방법.

청구항 12

제8항의 미생물을 이용하여 직접적인 미생물 발효로 아미카신을 생산하는 방법.

청구항 13

제10항의 미생물을 이용하여 직접적인 미생물 발효로 토브라마이신을 생산하는 방법.

청구항 14

제9항의 미생물을 이용하여 카나마이신 B의 생산성을 향상시키는 방법.

청구항 15

제11항의 방법에 의해 생산된 카나마이신 화합물.

청구항 16

제15항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

그람음성균에 항균효과를 갖는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 그람음성균은 대장균(*Escherichia coli*) 또는 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 조성물.

청구항 19

제15항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물.

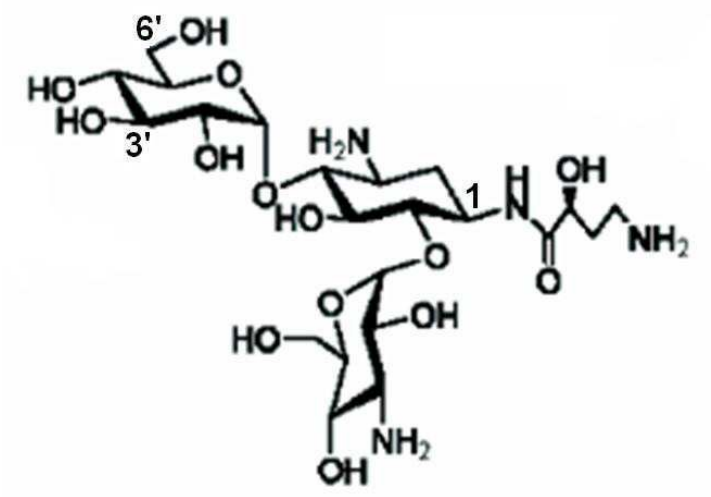
청구항 20

제15항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 낭성섬유증, 근위축증, 후드러증후군, 모세혈관확장증 및 어셔증후군으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 질병을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 21

화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

[화학식 1]



명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 카나마이신 화합물, 카나마이신을 생산하는 스트렙토마이세스속 미생물 및 상기 미생물을 이용한 카나마이신의 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스(*Streptomyces kanamyceticus*)로부터 만들어지는 카나마이신은 4,6-치환 2-데옥시스트렙타민 함유 아미노글리코사이드 항생제인 겐타마이신과 토브라마이신, 4,5-치환 아미노글리코사이드인 네오마이신과 부티로신이 있다.

[0003] 이러한 종류의 항생제는 주로 방선균(actinomycetes)에 의해 생산되며 오랫동안 널리 쓰여 왔다. 다른 항생제들과 마찬가지로, 아미노글리코사이드 변형 효소를 생산하는 아미노글리코사이드 내성 병원균의 출현은 심각한 문제를 일으킨다. 내성 문제는 아미카신(amikacin), 디베카신(dibekacin) 및 아르베카신(arbekacin)과 같은 천연 아미노글리코사이드의 반합성 변형물로 해결해왔다. 중심부 2-데옥시스트렙타민 (2-deoxystreptamine: 2-DOS) 및, 슈도다이사카라이드(pseudodisaccharide) 2'-*N*-아세틸파롬아민(2'-*N*-acetylparomamine), 파롬아민(paromamine) 및 네아민(neamine)은 대부분의 아미노글리코사이드의 공통된 생합성 중간산물이다. 중심부 및 파롬아민을 통한 네아민으로의 생합성 경로는 부티로신 및 네오마이신 생합성과 관련된 재조합 효소를 사용한 인비트로(*in vitro*) 실험을 통해 밝혀진 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 카나마이신 클러스터 중 하나인 당전이효소(GT) KanE (KanM2라고도 함)는 유리딘 5'-다이포스포-D-글루코스(UDP-Glc)를 공동기질로 사용하여 파롬아민의 당화과정을 촉매하여 3"-데아미노-3"-하이드록시카나마이신 C가 되게 한다. 카나마이신 C 및 카나마이신 B는 당전이효소 KanE에 의해서 카노사민 (kanosamine, Kns:D-3-글루코사민) 부분이 각각 파롬아민 및 네아민으로 옮겨짐으로써 만들어진다고 생각된다. 또는, 3"-데아미노-3"-하이드록시카나마이신 C가 카나마이신 C의 전구체로 여겨지기도 하는데, 이는 다시 카나마아신 C의 6' 위치가 아민화되어 카나마이신 B가 될 수 있다. 카나마이신 A는 2'-데아미노-2'-히드록시네아민에 카노사민을 KanE 촉매 첨가하거나 또는 카나마이신 B의 2' 위치에서 탈아민화함으로써 생합성될 수 있을 것으로 여겨진다. 그러나 슈도다이사카라이드 또는 3"-데아미노-3"-하이드록시카나마이신 C로부터 카나마이신을 만드는 생합성 과정에 대해서는 잘 알려지지 않았는데, 이는 아미노글리코사이드를 생산하는 방선균을 유전자 조작하고 기능적인 수용성 생합성 효소를 얻는 것이 쉽지 않기 때문이다.

[0005] 본 발명자들은 유전자 조작된 스트렙토마이세스 베네주엘라에 (*Streptomyces venezuelae*)에 기초하여 효과적인 이종 숙주 발현 시스템을 구축하고 겐타마이신 A_2의 생합성 과정을 효과적으로 밝혀낸 바 있다.

[0006] 본 발명의 목적은 카나마이신의 생합성 과정을 밝혀내고 재조합 균주를 통한 새로운 카나마이신의 생산방법 및 이를 통해 만들어진 새로운 항생물질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 최근 본 발명자들은 *S. kanamyceticus*로부터 카나마이신 생합성 유전자 집단을 분리해냈다. 아미노글리코사이드를 생산하지 않는 이종균주인 *S. venezuelae*에서 상기 카나마이신 생합성 유전자 집단을 발현시켜서 카나마이신을 생산한 결과, 본 발명자들이 분리해 낸 유전자 세트가 카나마이신 복합체를 생산하기에 충분한 유전자 모두를 포함하고 있다는 것을 확인했다.

[0008] 그러므로 상기와 같은 본 발명의 목적은 *kanA-kanB-kanK* 및 다른 카나마이신 관련 유전자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 스트렙토마이세스 속 미생물, 상기 미생물로 카나마이신을 생합성하는 방법 및 상기 미생물로 만들어진 신규 카나마이신 화합물에 의해 달성된다.

[0009] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 상세한 설명 및 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 의해, 카나마이신을 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 속 이종 미생물과 종래의 방법에 비해 효율적으로 카나마이신을 생산하는 방법 및 이를 통해 만들어진 새로운 카나마이신 화합물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 (a) 2-DOS 포함 아미노글리코사이드의 구조, 및 (b) 종전에 제안된 카나마이신의 생합성 경로를 보여주는 도면이다. (a) 카나마이신, 토브라마이신 및 겐타마이신은 4,6-치환 아미노글리코사이드이고, 부티로신 및 네오마이신은 4,5-치환 아미노글리코사이드로 이것들은 모두 천연 생산물이다. 한편 아미카신, 디베카신 및 아르베카신은 카나마이신 유래의 반합성 아미노글리코사이드이다. AHBA: S-4-아미노-2-하이드록시부티르산. (b) 화합물 5를 생산하는 과정이 나타나있다(굵은 선). 그러나 최종산물인 화합물 8로의 완전한 생합성 경로(점선)는 알려지지 않았었다. 2-DOI: 2-데옥시-사일로(scyllo)-이노소스(inosose); 2-DOIA: 2-데옥시-사일로-이노사민; UDP-GlcNA: 유리딘 5'-다이포스포-D-2-N-아세틸글루코사민; UDP-Glc; UDP-D-글루코스.

도 2는 후보 유전자를 발현시킨 재조합 숙주로부터 인 비보(*in vivo*)로 얻어낸 것과 무세포 추출물을 이용한 인 비트로 (*in vitro*) 반응에 의해 얻어낸 카나마이신 생합성 중간물질을 HPLC-ESI-MS/MS 분석한 도면이다. (a) 각각 *kanA-kanB-kanK*(2-DOS 생합성 유전자), *kanA-kanB-kanK-kanF*(*kanF*는 첫번째 당전이효소를 암호화하는 유전자임), 및 *kanA-kanB-kanK-kanF-kacA*(*kacA*는 데아세틸라제를 암호화하는 유전자)를 발현하는 재조합체(DOS, DOSf 및 PAR)로부터의 생산물을 분석한 크로마토그램이다. 각 색 블록은 주석달린 유전자를 나타낸다. (b) 세 종류의 UDP 당 즉, UDP-글루코스(Glc), UDP-2-*N*-아세틸글루코사민(GlcNAc) 및 UDP-2-글루코사민(GlcN)을 기질로 이용한 첫 번째 당전이효소 KanF에 의한 생산물 2 및 9의 크로마토그램이다. 각 상자는 *kanF*를 발현하는 재조합 숙주의 무세포 추출물을 나타내며, 검은 테두리 상자는 대조군인 끓인 무세포 추출물을 나타낸다. (c) *kanA-kanB-kanK-KanF-kacA* 및 *kanC-kanD*를 함께 발현하는 재조합체(PARcd)와 *kanA-kanB-kanK-KanF-kacA* 및 *kanI-kacL*를 함께 발현하는 재조합체(PARil)의 생산물 크로마토그램이다. (d) 파롬아민 및 2'-데아미노-2'-하이드록시파롬아민을 기질로 이용한 KanI-KacL의 촉매반응에 의해 생산된 화합물 4 및 10의 크로마토그램이다. (e) *kanA-kanB-kanK-kanF-kacA*와 *kanE* 발현체(KCXΔcΔd), *kanA-kanB-kanK-kanF-kacA-kanE-kanC-kanD* 발현체(KCX), *kanA-kanB-kanK-kanF-kacA-kanE-kanI-kacL* 발현체(KABΔcΔd), 및*kanA-kanB-kanK-kanF-kacA-kanE-kanC-kanD-kanI-kacL* 발현체(KAB)의 생산물 크로마토그램이다. (f) 파롬아민을 기질로 이용한 KanC-KanD 및 KanE의 촉매반응을 통해 생산된 화합물 5 및 6의 크로마토그램이다. 화살표는 연속 반응의 정지를 나타낸다. (g) 네아민을 기질로 이용한 KanC-KanD 및 KanE의 촉매반응을 통해 생산된 화합물 7 및 13의 크로마토그램이다. (h) KanI-KacL의 촉매반응에 의한 화합물 7 및 8의 생산을 보여주는 크로마토그램이다.

도 3은 카나마이신의 데칼코마니 형태의 생합성 경로를 보여준다. 각 색깔의 블록은 주석달린 유전자를 나타내고, 그것의 생산물은 카나마이신 중간체의 생합성 과정을 촉매한다는 것이 확인되었다. 각 색깔의 원은 같은 색의 블록으로 표시된 유전자의 생산물에 의해 형성되는 작용기를 나타낸다.

도 4는 첫 번째 당전이효소를 암호화하는 유전자를 바꾼 재조합 균주의 카나마이신 생합성 중간체의 HPLC-ESI-MS/MS 분석 도면이다. (a) *kanA-kanB-kanK*와 *kanF*(DOSf), *nemD*(DOSn), *tobMI*(DOSt$_1$) 또는 *gtmG*(DOSg)를 함께 발현하는 재조합체의 생산물의 크로마토그램이다. 오른쪽의 막대 그래프는 각 재조합 균주에 의해 생산된 카나마이신 슈도다이사카라이드 중간체의 수득량을 나타낸다. 하얀 막대는 화합물 2, 회색 막대는 화합물 9를 나타낸다. 데이터는 세 번의 실험으로부터 얻어냈다. (b) *kanA-kanB-kanK-kacA-kanE-kanC-kanD*와, *kanF, nemD, tobM1*, 또는 *gtmG* 중 하나를 발현하는 재조합체(각각 KCX, KCXfn, KCXΔft$_1$, 및 KCXΔfg)의 생산물의 크로마토그램이다. 막대그래프는 각 재조합 균주에 의해 생산된 카나마이신 슈도트라이사카라이드의 수득량을 나타낸다. 하얀 막대는 화합물 5 및 6을 나타내는데, 그것은 데칼코마니 형태의 합성경로에서 왼쪽 사이클의 화합물 7의 동질체(congener)이다. 회색 막대는 화합물 11 및 12의 수득량을 나타내는데, 그것은 오른쪽 사이클의 화합물 8의 동질체이다. (c) *kanA-kanB-kanK-kacA-kanE-kanC-kanD-kanI-kacL*와 *kanE* 또는 *nemD*를 발현하는 재조합체(KAB 및 KABΔfn)의 생산물 크로마토그램이다. 막대그래프는 재조합체에서 생산된 카나마이신의 수득량을 나타낸다. 하얀 막대는 화합물 6 및 7의 생산을 나타내고, 회색 막대는 화합물 12 및 8의 생산을 나타낸다.

도 5는 재조합 숙주에 의해 생산된 화합물 17, 19 및 20의 HPLC-ESI-MS/MS 분석 도면이다. (a) 7개의 부티로신 생합성 유전자(*btrG-btrH-btrI-btrJ-btrK-btrO-btrV*)와 함께 화합물 12 생산 유전자 세트(*kanA-kanB-kanK-kacA-kanE-kanC-kanD*)를 발현하는 재조합체(KCXb) 또는 화합물 8 생산 유전자 세트(*kanA-kanB-kanK-kacA-kanE-kanC-kanD-kanI-kacL*)를 발현하는 재조합체(KABb)의 생산물의 크로마토그램이다. 화합물 15는 AHBA-결합 카나마이신 유도체인 아미카신이고, 화합물 17은 종전에는 알려지지 않은 AHBA-결합 카나마이신 유도체인 1-*N*-AHBA-카나마이신 X이다. (b) 유전자 *aprD3-aprD4*와 화합물 8 생합성 유전자 세트인 *kanA-kanB-kanK-nemD-kacA-kanE-kanC-kanD-kanI-kacL* 또는 *kanA-kanB-kanK-nemD-kacA-tobM2-kanC-kanD-kanI-kacL*를 함께 발현하는 재조합체(KABΔfna 및 KABΔfnΔet$_2$a)의 생산물 크로마토그램이다. 화합물 16과 18은 토브라마이신과 토브라마이신 생합성 중간체인 네브라민이다. (c) *aprD3-aprD4* 및 *tobM2* 유전자를 발현하는 재조합체가 생산한 카나마이신 유사체의 구조이다. 색깔 원은 같은 색 블록으로 표시된 주석달린 유전자의 생산물에 의해 형성된 기능기를 가리킨다.

도 6은 *kanE* 및 *kanC-kanD*를 각각 발현하는 재조합 *S. venezuelae*의 무세포 추출물을 사용한 인 비트로 반응으로부터 얻은 카나마이신 슈도트라이사카라이드의 HPLC-ESI-MS/MS 분석도면이다. (a) 화합물 11 및 12의 생산을 나타내는 크로마토 그램이다. 각 상자는 *kanE* 및 *kanC-kanD*를 발현하는 재조합 숙주의 무세포 추출물을 나타내며, 검은 테두리 상자는 대조군으로 사용한 끓인 무세포 추출물을 나타내고, 화살표는 연속 반응의 정지를 나타낸다. (b) 화합물 8 및 화합물 14의 생산을 나타내는 크로마토그램이다.

도 7은 *aprD3-aprD4* 유전자 쌍을 발현하는 재조합 숙주의 무세포 추출물을 사용한 인 비트로 반응에 의해 생산된 화합물 16 및 18의 HPLC-ESI-MS/MS 분석을 나타내는 도면이다. 각 상자는 *aprD3-aprD4* 유전자 쌍을 발현하는 재조합 숙주의 무세포 추출물을 나타내며, 검은 테두리 상자는 대조군인 끓인 무세포 추출물을 나타낸다.

도 8은 *S. kanamyceticus* 와 스트렙토마이세스 테네브라리우스(*Streptomyces tenebrarius*)와 같은 야생 균주의 무세포 추출물을 사용한 인 비트로 반응에 의해 생산된 화합물 16의 HPLC-ESI-MS/MS 분석을 나타낸다. 각 상자는 *S. kanamyceticus* ATCC 12853 (SK CFE) 및 *S. tenebrarius* ATCC 17920 (ST CFE)의 무세포 추출물을 나타낸다. 검은 테두리 상자는 대조군인 끓인 무세포 추출물을 나타낸다.

도 9는 야생형 *S. kanamyceticus*의 무세포 추출물을 이용한 인 비트로 반응에서 얻어진 카나마이신 슈도트라이사카라이드의 HPLC-ESI-MS/MS 분석 도면이다. 각 상자는 *S. kanamyceticus* ATCC 12853 (SK CFE)의 무세포 추출물을, 검은 테두리 상자는 대조군인 끓인 무세포 추출물을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 다음과 같은 유전자 조합을 가지는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 카나마이신 생산 재조합 스트렙토마이세스 속 미생물을 제공한다:

[0013] 1) *kanA, kanB* 및 *kanK* (DOS 균주)

[0014] 2) *kanA, kanB, kanK* 및 *kanF* (DOSf 균주)

[0015] 3) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF* 및 *kacA* (PAR 균주)

[0016] 4) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanC* 및 *kanD* (PARcd 균주)

[0017] 5) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanI* 및 *kacL* (PARil 균주)

[0018] 6) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA* 및 *kanE* (KCXΔcΔd 균주)

[0019] 7) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanE*, *kanC* 및 *kanD* (KCX 균주)

[0020] 8) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanE*, *kanI* 및 *kacL* (KABΔcΔd 균주)

[0021] 9) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanE*, *kanC*, *kanD*, *kanI* 및 *kacL* (KAB 균주)

[0022] 10) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanE*, *kanC*, *kanD*, *btrG*, *btrH*, *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* 및 *btrV* (KCXb 균주)

[0023] 11) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanE*, *kanC*, *kanD*, *kanI*, *kacL*, *btrG*, *btrH*, *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* 및 *btrV* (KABb 균주)

[0024] 12) *kanA*,*kanB*, *kanK* 및 *nemD* (DOSn 균주)

[0025] 13) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *nemD*, *kacA*, *kanE*, *kanC* 및 *kanD* (KCXΔfn 균주)

[0026] 14) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *nemD*, *kacA*, *kanE*, *kanC*, *kanD*, *kanI* 및 *kacL* (KABΔfn 균주)

[0027] 15) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *nemD*, *kacA*, *kanE*, *kanC*, *kanD*, *kanI*, *kacL*, *aprD3* 및 *aprD4* (KABΔfna 균주)

[0028] 16) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *nemD*, *kacA*, *tobM2*, *kanC*, *kanD*, *kanI*, *kacL*, *aprD3* 및 *aprD4* (KABΔfnΔet_2a 균주)

[0029] 17) *kanA*, *kanB*, *kanK* 및 *tobM1* (DOSt_1 균주)

[0030] 18) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *tobM1*, *kacA*, *kanE*, *kanC* 및 *kanD* (KCXΔft_1 균주)

[0031] 19) *kanA*, *kanB*, *kanK* 및 *gtmG* (DOSg 균주)

[0032] 20) *kanA*, *kanB*, *kanK*, *gtmG*, *kacA*, *kanE*, *kanC* 및 *kanD* (KCXΔfg 균주).

[0033] 바람직하게는 상기 *kanA*, *kanB*, *kanK*, *kanF*, *kacA*, *kanE*, *kanC*, *kanD*, *kanI* 및 *kacL* 유전자는 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 (*Streptomyces kanamyceticus*)에서 유래하였고, 각각 서열번호 5 내지 14이다.

[0034] 상기 *aprD3*, *aprD4*, *tobM1* 및 *tobM2* 유전자는 스트렙토마이세스 테네브라리우스 (*Streptomyces tenebrarius*)에서 유래하였으며, 각각 서열번호 15 내지 18이다.

[0035] 상기 *btrG*, *btrH*, *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* 및 *btrV* 유전자는 바실러스 서큘란스 (*Bacillus circulans*)에서 유래하였고, 각각 서열번호 19 내지 25이다.

[0036] 상기 *nemD* 유전자는 스트렙토마이세스 프라디아에 (*Streptomyces fradiae*)에서 유래하였으며, 서열번호 26이다.

[0037] 상기 *gtmG* 유전자는 마이크로모노스포라 에키노스포라 (*Micromonospora echinospora*)에서 유래한 것으로 서열번호 4이다.

[0038] 또한 바람직하게는 상기 미생물은 카나마이신 내성 유전자를 더 발현한다. 더욱 바람직하게는 상기 카나마이신 내성 유전자는 마이크로모노스포라 에키노스포라 (*Micromonospora echinospora*)에서 유래한 *gtmF-gtmK-gtmL*이며, 각각 서열번호 1 내지 3의 유전자이다.

[0039] 또한 바람직하게는 상기 미생물은 *S. venezuelae*이나 이에 한정되지는 않는다. 더욱 바람직하게는 상기 미생물은 *S. venezuelae* KCTC11725BP이다. 또한 바람직하게는 상기 미생물은 *S. venezuelae* KCTC11726BP이다. 또한 바람직하게는 상기 미생물은 *S. venezuelae* KCTC11727BP이다. 또한 바람직하게는 상기 미생물은 *S. venezuelae* KCTC11728BP이다.

[0040] 또한 본 발명은 상기 재조합 미생물로 카나마이신 항생물질을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 생산되는 카나마이신 항생물질은 아래의 화합물 1 내지 20이다.

[0041] -화합물 1: 2-데옥시스트렙타민(2-DOS)

[0042] -화합물 2: 2'-*N*-아세틸파롬아민

[0043] -화합물 3: 파롬아민

[0044] -화합물 4: 네아민

[0045] -화합물 5: 3"-데아미노-3"-하이드록시카나마이신 C

[0046] -화합물 6: 카나마이신 C

[0047] -화합물 7: 카나마이신 B

[0048] -화합물 8: 카나마이신 A

[0049] -화합물 9: 2'-데아미노-2'-하이드록시파롬아민

[0050] -화합물 10: 2'-데아미노-2'-하이드록시네아민

[0051] -화합물 11: 3"-데아미노-3"-하이드록시카나마이신 X

[0052] -화합물 12: 카나마이신 X

[0053] -화합물 13: 3"-데아미노-3"-하이드록시카나마이신 B

[0054] -화합물 14: 카나마이신 D

[0055] -화합물 15: 아미카신

[0056] -화합물 16: 토브라마이신

[0057] -화합물 17: 1-*N*-AHBA-카나마이신 X

[0058] -화합물 18: 네브라민

[0059] -화합물 19: 3'-데옥시카나마이신 C

[0060] -화합물 20: 3'-데옥시카나마이신 A

[0061] 또한 본 발명의 각 재조합 미생물에 따른 생산물은 아래와 같다.

[0062] -DOS: 화합물 1

[0063] -DOSf: 화합물 2 및 9

[0064] -PAR: 화합물 3 및 9

[0065] -PARcd: 화합물 3 및 9

[0066] -PARil: 화합물 4 및 10

[0067] -KCXΔcΔd: 화합물 5 및 11

[0068] -KCX: 화합물 6 및 12

[0069] -KABΔcΔd: 화합물 13 및 14

[0070] -KAB: 화합물 7 및 8

[0071] -KCXb: 화합물 17

[0072] -KABb: 화합물 15

[0073] -DOSn: 화합물 2 및 9

[0074] -KCXΔfn: 화합물 6 및 12

[0075] -KABΔfn: 화합물 7 및 8

[0076] -KABΔfna: 화합물 18, 19 및 20

[0077] -KABΔfnΔet_2a: 화합물 16

[0078] -DOSt_1: 화합물 2 및 9

[0079] -KCXΔft_1: 화합물 6 및 12

[0080] -DOSg: 화합물 2 및 9

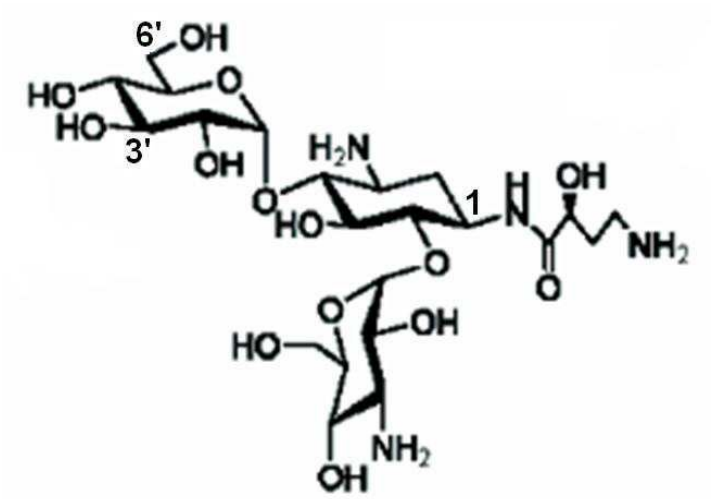
[0081] -KCXΔfg: 화합물 6 및 12

[0082] 본 발명의 유전자 재조합 미생물, 특히 KABΔfn균주를 이용하여 카나마이신을 생산하는 경우 야생균주에 비해서 반합성 아미노글리코사이드인 아르베카신의 전구체인 카나마이신 B의 생산성이 향상된다.

[0083] 또한 본 발명의 유전자 재조합 미생물, 특히 KABb 및 KABΔfnΔet_2a 균주를 이용하여 반발효, 반합성에 의하지 않고 직접적인 미생물 발효로 아미카신 및 토브라마이신을 생산할 수 있다.

[0084] 본 발명은 또한 하기 화학식 1의 신규 화합물을 제공한다.

화학식 1

[0085] 

[0086] 상기 신규 화합물은 화합물 17인 1-*N*-AHBA-카나마이신 X이다.

[0087] 본 발명의 미생물에 의해 생산된 본 발명의 카나마이신 화합물들은 항균 효과를 가진다. 보다 구체적으로 본 발명의 화합물은 그람음성균에 항균효과를 가진다. 더욱 구체적으로 상기 화합물은 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 항균효과를 가지나 이에 한정되는 것은 아니다. 특히 신규 화합물인 1-*N*-AHBA-카나마이신 X의 경우 아미카신 내성 *P. aeruginosa* 에도 항균효과를 가진다.

[0088] 한편 최근 여러 연구에서 2-DOS 구조를 포함하는 아미노글리코사이드 항생제가 소의 바이러스성 설사 바이러스(BVDV), 뎅구열 바이러스 (DENV)를 비롯한 여러 바이러스의 복제를 억제하여 항바이러스 효능이 있다는 보고가 있었다. 또한 아미노글리코사이드계 항생제가 포유류의 리보솜이 미성숙 정지 코돈의 돌연변이를 감지하고 교정하게 자극함으로써 낭성섬유증, 근위축증, 후드러증후군, 모세혈관확장증 및 어셔증후군과 같은 관련 유전병의 치료 및 개선 효과가 있다는 많은 연구 결과 보고가 있었다. 본 발명의 카나마이신 화합물 역시 2-DOS를 중심구조로 포함하는 화합물로서 항바이러스 효능 및 상기와 같은 유전병의 치료 및 개선효과가 있다고 여겨진다.

[0089] 그러므로 본 발명은 상기 카나마이신 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공한다.

[0090] 또한 본 발명은 상기 카나마이신 화합물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물을 제공한다. 또한 본 발명

은 상기 카나마이신 화합물을 유효성분으로 포함하는 낭성섬유증, 근위축증, 후드러증후군, 모세혈관확장증 및 어셔증후군으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 유전병을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0091] 상기 조성물은 경구, 직장, 질, 국소, 경피, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하 등으로 투여될 수 있다. 활성 화합물의 투여량은 MIC, 치료 받을 대상, 치료할 특정 질환 또는 병리상태, 질환 또는 병리상태의 심각도, 투여 경로, 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0092] 의도된 투여양식에 따라, 약학 조성물은 고체, 반고체 또는 액체 투여 형태일 수 있다. 투여 형태의 예는 정제, 산제, 캡슐, 좌약, 과립, 분말, 크림, 로션, 연고, 반창고, 액체 용액, 현탁액 및 분산액, 에멀션, 시럽 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 활성 성분은 리포솜, 미세입자, 또는 마이크로캡슐 등에 캡슐화될 수도 있다. 정제, 환제, 과립 등과 같은 고체 조성물은 편의상 코팅될 수 있다.

[0093] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 첨가물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 부형제, 담체, 희석제, 등장화제, 안정제, 항산화제, 결합제, 착색제, 향미제, 방부제 및 농후제 등을 포함할 수 있으며, 이러한 첨가물은 투여 경로 및 제제화에 따라 당업자가 통상적으로 선택할 수 있다. 또한 필요에 따라 습윤제, 유화제, pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질을 함유할 수 있다. 예를 들어, 이러한 보조 물질은 아세트산염, 솔비탄 모노라우레이트, 트라이에탄올아민 및 트라이에탄올아민 올리에이트를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 정맥내 투여를 위한 조성물인 경우 멸균 등장 수성 완충액 내의 용액일 수 있고 주사 부위의 통증을 완화시키기 위해 국소마취제를 포함할 수도 있다.

표 1

카나마이신 합성 관련 후보 유전자 프라이머의 서열

Gene	Primer sequence (5' to 3', restriction site shown with underline)	Portion of gene	Enzyme site
kanA-kanB	CCCGGATCCGAATCCCCCTTCGTGACG	5'	*Bam*HI
	GTGACTAGTGTTCGTCGACCACCGCGTCGA	3'	*Spe*I
kanK	GCTTCTAGAACTCCGGAGCACCCGTGCA	5'	*Xba*I
	GTGAAGCTTCGTGGTGCCGGACAGGCCCTA	3'	*Hind*III
kanC	GGGACCTCTAGAACGCGGTGGTCGACGAAC	5'	*Xba*I
	TCTTCCAAGCTTACTAGTTGTCGGCGGTCGCCCCGA	3'	*Spe*I/*Hind*III
KanD	GACCGCTCTAGACACCTCCGAGGTCCTCTC	5'	*Xba*I
	TGAAAAGCTTACTAGTGGGTGACGAGACGCCGGG	3'	*Spe*I/*Hind*III
kanE	ACATCTAGAGGCTCCGGAAGACCGCCGACGCCA	5'	*Xba*I
	TCGAAGCTTACTAGTGAGACGAGGAGGACCCTT	3'	*Spe*I/*Hind*III
kanF	CGAGGCTCTAGAGCCGGACCAGAACCCATT	5'	*Xba*I
	TAGAACAAGCTTACTAGTACGTCGGGTGTCGTACGG	3'	*Spe*I/*Hind*III
kanI-kacL	GATCGCTCTAGACACCTGGTTCTGGTTCCC	5'	*Xba*I
	AGGGGAAAGCTTACTAGTGTCAGGAGATGCCGACCG	3'	*Spe*I/*Hind*III
kacA	GGCGTCTAGATACCGGGAGATCGGGCTGTG	5'	*Xba*I
	ACAAAGCTTACTAGTTGCTCATAGCGACTCCTTGT	3'	*Spe*I/*Hind*III
nemD	CACTCTAGACATCGCCGTCCTCTCCCCGT	5'	*Xba*I
	TCAAAGCTTACTAGTGGCGCAGATACGGCGCAC	3'	*Spe*I/*Hind*III
tobM1	CCGTCTAGACCGCCCTTTCCCCGCAAC	5'	*Xba*I
	GATAAGCTTACTAGTCACACCGTCCTATTCCTG	3'	*Spe*I/*Hind*III
tobM2	CGATCTAGACCGGGAGGCGACCGTGT	5'	*Xba*I
	GCGAAGCTTACTAGTTCAGACGCATACGCCCAG	3'	*Spe*I/*Hind*III
gtmG	TGTCCTCTAGAGCTGCCCGGTCACTTCCCGC	5'	*Xba*I
	AAAAAGCTTACTAGTCACTCTTCCGGAAGAATC	3'	*Spe*I/*Hind*III
btrG-btrH	TTCTCTAGATCTAGGAAACCGCATGCC	5'	*Xba*I
	GGCTACGTAAAACTAGTGGTTTATCCGCTTTTGCT	3'	*Spe*I/*Sna*BI
btrI-btrJ	ACCTCTAGACGGAAACCGCCATCCCAT	5'	*Xba*I
	TCCTACGTAAAACTAGTGAGTTAATGAACAGCCGT	3'	*Spe*I/*Sna*BI
btrK-btrO	AGCTCTAGAAAGCCCGAAGCCTGCTTG	5'	*Xba*I
	GTTTACGTAAAACTAGTTCCCTAGACCGGATTCGA	3'	*Spe*I/*Sna*BI
btrV	TATTCTAGAATTGACTTATAACTCAAT	5'	*Xba*I
	CATTACGTAAAACTAGTATCCGAACGTCACATAAG	3'	*Spe*I/*Sna*BI
aprD3	GGTTCTAGATGATGGACGTGGCCGCGA	5'	*Xba*I
	GTTAAGCTTACTAGTGGGCCGTCGGTCGTCCTG	3'	*Spe*I/*Hind*III
aprD4	GGCTCTAGAAACCCCACCCTCACCATCCAG	5'	*Xba*I
	CGCAAGCTTACTAGTATCGTGTGGTCTCCGGCT	3'	*Spe*I/*Hind*III

[0094]

[0095] 본 발명자들은 *S. kanamyceticus*로부터 분리한 여러 후보 유전자들을 포함하는 플라스미드를 천연 데옥시슈가(타이미딘(thymidine) 5'-다이포스포-D-데소사민(desosamine))의 생합성 유전자가 결여된 *S. venezuelae* 균주에 삽입함으로써 완전한 카나마이신의 생합성 과정을 재구축했다. 본 발명자들은 카나마이신 생합성 후보 유전자들을 PCR로 증폭시켜 사용하였으며 사용된 프라이머의 서열은 표 1과 같다.

[0096] 본 발명자들은 본 발명에서 밝혀진 생합성 과정을 조작하여 카나마이신 B (화합물 7)가 주된 생산물이 되도록 하였는데, 이는 화합물 7을 생산할 경우 직접 발효에 의해서 3'-데옥시카나마이신 및 1-*N*-AHBA-결합 카나마이신을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 디베카신 및 아르베카신의 화학적 합성에 대한 가치 있는 대체물이 될 것이기 때문이다.

[0097] 본 발명의 재조합체로부터 만들어진 카나마이신 유도체와 유사체의 구조를 확인한 결과, 본 발명의 재조합 미생물로부터 만들어진 화합물들 중 알려진 카나마이신 항균물질의 경우 시판 표준 카나마이신 유도체 또는 *S. kanamyceticus* 유래의 카나마이신 유도체와 비교하였을 때 종래의 것과 같은 특성을 가졌다. 그런데, 본 발명의 재조합 이종 균주를 사용하여 종래의 카나마이신 항균물질 외에 새로운 카나마이신 유도체인 1-*N*-AHBA-카나마이신 X가 만들어졌음을 확인할 수 있었다.

[0098] 본 발명의 일실시예에서는 우선 화합물 3을 합성하였다. Glc-6-포스페이트로부터 화합물 3을 합성하는 생합성 과정은 도 1b에 나타냈다. 예상한 바와 같이, *kanA-kanB-kanK* (DOS 균주)를 발현하는 재조합 이종 균주는 화합물 1을 생산했다(21.4㎛M) (도 2a). 아미노글리코사이드의 구조를 변형시키지 않고 *S. venezuelae* 내에서 카나마이신에 대한 내성을 가지게 하기 위해서, 겐타마이신 유전자 집단에서 뽑은 3개의 내성 유전자 *gtmF-gtmK-gtmL*를 재조합 이종숙주에 도입했다. 이러한 유전자를 발현하는 조작체는 대조 균주 (1.0 ㎍/ml)에 비해서 시판되는 카나마이신에 대해 높은 내성을 가졌다 (>10.0 mg/ml). 이 내성 유전자를 이후의 실험에서 이종 숙주에 카나마이신 생합성 유전자와 함께 발현시켰다.

[0099] 첫 번째 당전이효소를 암호화하는 *kanF* 및 화합물 1을 생합성하는 유전자를 발현하는 재조합체 (DOSf 균주)로 화합물 2를 만들어냈다 (1.3 ㎛M). 그런데 흥미롭게도 많은 양 (7.1㎛M)의 화합물 9가 함께 생성되었다. 또한 *kanF*를 발현하는 *S. venezuelae*의 무세포 추출물에 화합물 1을 당수용체 (glycosyl acceptor)로, UDP-Glc 또는 UDP-GlcNAc를 당공여체 (glycosyl donor)로 첨가하여 화합물 2번보다 9배나 많은 화합물 9를 생산하였다 (도 2b). 따라서 KanF가 UDP-Glc 및 UDP-GlcNAc를 모두 공동기질로 취하지만 UDP-Glc를 더 선호하는 것으로 생각된다. 화합물 2/9 생합성 유전자와 함께 2'-*N*-아세틸파롬아민 데아세틸라제로서의 역할이 보고된 바 있는 *kacA* 를 발현하는 재조합 균주 (PAR 균주)로부터는 화합물 3을 생산하였다(2.2㎛M) (도 2a).

[0100] 카나마이신 및 네오마이신의 생합성을 위해서는 화합물 3을 화합물 4로 전환시키는 것이 필요하다. 아미노글리코사이드 유전자 집단을 가상 실험 분석하여, KanI 및 KacL가 화합물 3을 화합물 4로 전환시키는데 관여할 것이라고 추측했다. 한편, KanC 및 KanD는 UDP-Glc의 C-3 하이드록실기를 아민화시켜서 UDP-kns을 만든다고 여겨진다. 또는, KanC 및 KanD가 화합물 5로부터 화합물 6을 형성하는데 관여한다고 생각되기도 한다.

[0101] 본 발명의 일실시예에서는 KanI-KacL 및 KanC-KanD의 기능을 확인하기 위해서, PAR 균주에 *kanC-kanD* 유전자를 발현시켰는데 (PARcd 균주) 그것은 화합물 4를 합성하는데 실패했고, 대신 화합물 3 및 9를 생산하였다. 반면에 *kanI-kacL*를 발현하는 재조합 균주 (PARil 균주)는 화합물 4 (2.2㎛M)뿐만 아니라 화합물 10 (4.3 ㎛M)도 역시 생산했다 (도 2c). *kanI-kacL*를 발현하는 재조합체의 무세포 추출물을 화합물 3 및 화합물 9와 함께 배양하자 각각 화합물 4 및 10을 만들어냈다 (도 2d).

[0102] 본 발명의 일실시예에서는 슈도트라이사카라이드 카나마이신을 생합성했다. 두 번째 당전이효소를 암호화하는 *kanE* 및 화합물 3 및 9의 생합성 유전자를 발현하는 균주 (KCXΔcΔd 균주)로 화합물 5 (3.2㎛M) 및 지금까지 생합성 중간체로 알려지지 않은 화합물인 화합물 11 (4.5㎛M)을 생산했다 (도 2e). KCXΔcΔd 균주에 추가로 *kanC-kanD*를 발현시키자 (KCX 균주), 화합물 6 (1.6㎛M) 및 화합물 12 (6.0㎛M)를 생산해냈는데, 그것은 C-3" 아민화에 *KanC-KanD*가 협력적 작용을 한다는 것을 의미한다. KCXΔcΔd 균주에 *kanI-kacL*를 함께 발현시킨 균주 (KABΔcΔd 균주)는 화합물 13 (2.0㎛M)과 화합물 14 (3.2㎛M)를 만들어냈다. 또한 KABΔcΔd 균주에 *kanC-kanD*를 발현시켜서 (KAB 균주) 1.0 mg/l (2.1㎛M)의 화합물 7 및 3.1 mg/l (6.3㎛M)의 화합물 8을 생산했다 (도 2e).

[0103] 본 발명의 일실시예에서는 UDP-Glc로부터 생합성된 UDP-kns가 슈도다이사카라이드의 C-6 부분에 결합하는지, 슈도트라이사카라이드의 글루코오스 부분이 카노사민으로 전환되는지를 확인하기 위해서, *kanE* 또는 *kanC-kanD*를 발현하는 재조합 *S. venezuelae*의 무세포 추출물을 각각 준비했다. 화합물 3 및 4를 UDP-Glc와 함께 넣고 배양

하여 각각 화합물 5/6 및 13/7을 생산하였다. *kanE*를 발현하는 재조합 균주의 무세포 추출물에 화합물 3 및 4를 UDP-Glc와 함께 넣고 반응시켰을 때, 각각 화합물 5 및 13이 만들어졌다. 이 반응을 차례로 정지시키고 *kanC-kanD*를 발현하는 균주의 무세포 추출물과 함께 배양하자 화합물 5 및 13은 남아있고 더 이상의 전환은 탐지되지 않았다. 그러나 화합물 3 및 4를 UDP-Glc 및 *kanC-kanD*를 발현하는 균주의 무세포 추출물과 함께 반응시켰을 때, 각각 화합물 6 및 7이 생성되었다 (도 2f,g). 유사한 결과가 화합물 9 및 10을 기질로 사용했을 때도 관찰되었다 (도 6). 이러한 결과는 카노사민의 생합성에 있어서, 이 효소 쌍의 작용에 의해 당전이 이전에 UDP-Glc의 하이드록실기가 아민화된다는 것을 보여주며, 이러한 예는 리파마이신을 생산하는 균주인 아미콜라톱시스 메디테라네 (*Amycolatopsis mediterranei*)에서의 카노사민 생합성 과정에서도 관찰된다.

[0104] 또한 *kanI-kacL*를 발현하는 균주의 무세포 추출물을 화합물 6 및 12와 함께 배양하자 화합물 7 및 8이 각각 생산되었다. KanI 및 KacL은 화합물 7, 8뿐만 아니라 4, 10의 생합성에 관여하는 것으로 보인다 (도 2d,h). 이것은 슈도다이- 및 트라이사카라이드에 대한 그것들의 이중 작용을 나타낸다. 종합해 보면, 기질에 유연성이 있는 KanF 및 KanE 당전이효소에 의해 지배되는 카나마이신 복합체의 데칼코마니 형태의 대칭적 생합성 경로가 확인되었다 (도 3).

[0105] 본 발명의 일실시예에서는 카나마이신 생합성 과정을 변화시켜 보았다. 화합물 8은 야생 카나마이신 생산자인 *S. kanamyceticus* 와 이종 숙주인 *S. venezuelae*에서 모두 카나마이신 생합성의 주 생산물이다. 앞서 실험한 결과 KanF 당전이효소가 UDP-GlcNAc보다는 UDP-Glc를 더 선호한다는 것을 알 수 있었다. KanI-KacL이 화합물 6에 비해 화합물 12를 기질로 더 선호한다는 것 또한 화합물 8과 7의 생산 비율에 관여한다 (도 2h). 아미카신 (화합물 15)은 화합물 8로부터 합성될 수 있지만, 내성균에 효능이 있는 최근의 반합성 아미노글리코사이드인 아르베카신은 화합물 7에서 3',4'-인접 하이드록실기를 제거하고 AHBA로 1-*N*-아실화함으로써 만들어질 수 있다. 만약 화합물 7/8 생합성을 위한 유전자 조합체(KAB 균주)에서 첫 번째 당전이효소 암호화 유전자인 *kanF*를 당공여체로서 UDP-Glc보다 UDP-GlcNAc를 더 선호하는 당전이효소를 암호화하는 다른 유전자로 치환한다면, 카나마이신 생합성 과정은 화합물 7의 생산을 늘리는 쪽으로 변화할 것이라고 가정하였다. 우선, 본 발명자들은 DOS균주의 KanF를 네오마이신, 토브라마이신 및 겐타마이신으로부터의 서로 다른 3개의 당전이효소 암호화 유전자인 *nemD, tobM1*, 및 *gtmG*로 각각 바꾸었다. *kanF*를 발현하는 대조군인 DOSf는 화합물 2 (1.4 μM; 총 슈도다이사카라이드의 14%) 및 화합물 9 (7.1 μM; 79%)를 생산했다. 반면 *nemD*를 발현하는 균주 (DOSn 균주)는 화합물 2 (4.4 μM; 57%) 및 9 (3.4 μM; 36%)를 생산하여 NemD 역시 UDP-당에 대해 유연성이 있지만 KanF에 비해서는 UDP-GlcNAc를 더 이용하는 것처럼 보인다. *tobM1* 및 *gtmG*로 *kanF*를 대체했을 때는 (각각 $DOSt_1$ 및 DOSg 균주), 화합물 2와 9의 생산 비율 사이에 유의적인 차이가 없었다 (도 4a).

[0106] 또한 본 발명의 다른 실시예에서는 KCX 균주에서 당전이효소 암호화 유전자 *kanF*를 개별적으로 치환해보았다. KCX 균주에 의해 생산되는 화합물 6과 12의 비율 (1.6 μM, 16% 및 6.0 μM, 60%)을 비교해보니 *nemD*를 발현하는 재조합 균주 (KCXΔfn)에서 슈도다이사카라이드 6과 12의 수율이 바뀌었다 (6: 5.0 μM, 65%; 12: 0.4 μM, 7%). 그러나 *tobM1* (KCXΔft_1) 또는 *gtmG* (KCXΔfg) 발현 균주는 슈도트라이사카라이드 산물 6과 12의 비율이 서로 유사하였다 (도 4b). 또, KAB 균주에 의해 생산되는 화합물 7 및 8의 수율은 각각 21% (2.3 μM) 및 61% (6.8 μM)였는데 KAB 균주의 *kanF*를 *nemD*로 치환한 균주 (KABΔfn)는 화합물 7의 생산이 46%까지 늘었다 (도 4c).

[0107] 본 발명의 다른 실시예에서는 1-*N*-AHBA-카나마이신과 3'-데옥시카나마이신을 직접 발효하여 생산해보았다. 본 발명자들은 화합물 15와 같은 AHBA 함유 1-*N*-아실화 카나마이신 및 화합물 16과 같은 3'-데옥시카나마이신을 직접 인 비보 생산하도록 카나마이신 경로를 조작했다. AHBA 분자구조는 원래 천연물인 부티로신에서 관찰되었다. 최근 *btrG-btrH-btrI-btrJ-btrK-btrO-btrV* 유전자 세트가 부티로신의 생합성 과정 중 C-1 부위의 아미노기에 AHBA 측쇄를 도입하는 것을 담당한다고 알려졌다. 이 유전자들을 KCX 균주에 도입하여 (KCXb 균주) 새로운 아미노글리코사이드인 화합물 17을 만들어냈다 (0.6 mg/l, 1.0 μM). 또한 KAB 균주에 *btr* 유전자 세트를 함께 발현시켜서 (KABb 균주) 0.5 mg/l의 화합물 15를 성공적으로 생합성했다(0.8 μM) (도 5a,c).

[0108] 또한 본 발명자들은 아미노글리코사이드 유전자 클러스터를 바이오인포매틱스 분석하여 토브라마이신 (화합물 16)을 소량 생산하는 균주인 *S. tenebrarius*로부터 두 개의 추정 아프라마이신 유전자인 *aprD3-aprD4*를 찾아냈는데, 이들은 슈도다이- 및/또는 -트라이사카라이드의 C-3'-탈산소화를 담당하는 것으로 보인다.

[0109] 본 발명의 일실시예에서는 화합물 7을 더 생산하도록, 제작된 KABΔfn 숙주에 *aprD3-aprD4* 유전자를 도입해 보았다. 만들어진 숙주 (KABΔfna)는 주 생산물로 화합물 18을 만들었고, 그 외에도 화합물 19 및 화합물 20을 생산하였지만 16은 생산하지 않았다 (도 5b,c). 이러한 결과는 AprD3-AprD4의 연합 활성을 통해 화합물 3, 10 및 4에서도 3'-하이드록실기를 제거한다는 것을 의미한다. 두 번째 당전이효소인 KanE는 카노사민을 선택적으로 화

합물 3 및 10에 전달하고 화합물 18에는 전달하지 않았다. 카노사민을 화합물 18에 전달하여 화합물 16을 생산할 수 있는 당전이효소를 선택하기 위해서, *S. kanamyceticus* 및 *S. tenebrarius*의 무세포 추출물을 준비하고 화합물 18과 함께 배양하였다. 두 번째 당전이효소 암호화 유전자로 *tobM2*를 가지는 *S. tenebrarius*의 무세포 추출물은 화합물 18을 16으로 전환시켰고, 한편 *S. kanamyceticus*의 무세포 추출물은 그렇지 않았다 (도 7). 그에 따라 본 발명자들은 당전이효소를 암호화하는 유전자인 *nemD*, *tobM2* 및 *aprD3-aprD4*와 화합물 7을 생합성하는 유전자를 발현하는 새로운 균주 (KABΔfnΔet$_2$a)를 구축했고 화합물 16을 생산했다 (0.4 mg/l; 0.8 μM) (도 5b,c). *aprD3-aprD4*를 발현하는 균주의 무세포 추출물은 화합물 4를 화합물 18로 전환하였지만 화합물 7을 화합물 16으로 전환하지는 않았다. 이는 이러한 효소들의 슈도다이사카라이드에 대한 활성이 제한됨을 보여준다 (도 7).

[0110] 일 실시예에서 본 발명에 의해 만들어진 카나마이신 중간체 및 유도체들의 항균범위를 시험하였다. 항균범위는 전형 균주인 그람 음성균 (*E. coli* 및 *Pseudomonas aeruginosa*)과 임상적으로 분리한 4개의 균주로 실험하였다 (표 2).

[0111] 슈도트라이사카라이드 중에서 6'-아미노 화합물인 4 및 10은 6'-하이드록실기를 가지는 화합물 3 및 9에 비해 상대적으로 카나마이신 감수성 *E. coli* 균주에 대해 더 큰 활성을 가졌다. 또한 화합물 6 및 12에 비해 그것의 6'-아미노 대응체인 화합물 7 및 8이 카나마이신 감수성 균주에 약간 더 활성을 가졌다. 한편 3"-아미노 유도체인 화합물 6, 7, 8 및 12는 3"-하이드록시 유도체인 화합물 5, 13, 14 및 11에 비해서 실험 균주들에 대해 더 큰 항균 활성을 보였다. 따라서 카나마이신의 C-6' 및/또는 C-3" 하이드록실기를 아민화하면 항균력이 증가되는 것으로 보이는데, 이는 과거의 연구결과와 일치한다.

[0112] 아미카신 감수성 *P. aeruginosa* 임상 분리 균주로 실험했을 때, 화합물 6, 7, 8 및 12를 제외한 대부분의 카나마이신 중간체들이 매우 낮은 항균활성을 보였다. 흥미롭게도, 아미카신 (화합물 15)과 비교했을 때 새로운 화합물 17은 모든 실험 균주에 대해 향상된 항균력을 보였다. 특히, 화합물 15가 임상적으로 분리한 아미카신 내성 균주 *P. aeruginosa*에 아무런 활성을 보이지 않은데 비해 화합물 17은 훨씬 강력한 활성 (MIC ~64)을 보였다.

표 2

[0113] 그람음성균에 대한 항균 범위

카나마이신 관련 아미노글리코사이드		MIC (/)					
		전형 균주		임상 분리 균주			
		E. coli ATCC 25922 (Kan^S)	P. aeruginosa ATCC 27853 (Kan^R)	E. coli CCARM 1A020 (Kan^S)	E. coli CCARM 1A023 (Kan^R)	P. aeruginosa CCARM 2206 (Amk^S)	P. aeruginosa CCARM 2178 (Amk^R)
슈도다이사카라이드	3	128	NA	128	NA	NA	NA
	9	128	NA	128	NA	NA	NA
	4	64	NA	64	NA	128	NA
	10	64	NA	64	NA	128	NA
슈도트라이사카라이드	6	16	NA	16	NA	64	NA
	12	16	NA	16	NA	64	NA
	5	128	NA	NA	NA	NA	NA
	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	7	2	NA	4	NA	32	NA
	8	2	NA	4	NA	16	NA
	13	128	NA	128	NA	NA	NA
	14	128	NA	128	NA	NA	NA
AHBA-슈도트라이사카라이드	15	128	64	128	32	≤0.25	NA
	17	16	16	32	16	0.25	64

[0114] MIC: 최소 억제 농도, 전형 균주 및 임상 분리균주는 각각 ATCC (American Type Culture Collection, USA) 및

CCARM (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, 한국)의 것이다.

[0115] Kan^S 및 Kan^R는 각각 카나마이신 감수성 및 내성 균주를 나타낸다. Amk^S 및 Amk^R는 각각 아미카신 감수성 및 내성 균주를 나타낸다.

[0116] NA는 128 μg/mL에서 활성이 없었음을 나타낸다.

[0117] 본 발명자들은 또한 KanF 및 NemD와 같은 당전이효소의 3D-모델을 구축하였다. 3D-모델은 MshA의 결정 구조를 템플리트로 사용하여 상동관계 모델링하여 생성시켰다. 이 효소들은 총 서열에서 각각 40%를 공유했다. 중요 잔기 및 그것의 상호관계는 강력한 지지 보존 촉매 결합 기전 (strongly supporting conserved catalytic association mechanisms)에 보존되었다. 촉매 기전을 확인하기 위해서 KanF 또는 NemD와 당공여체/당수용체간의 상호관계 시뮬레이션을 반복했다.

[0118] 먼저 오도도크 (AutoDock)를 사용하여 당공여체 (UDP-Glc 및 UDP-GlcNAc)를 두 개의 당전이효소, KanF 및 NemD의 추정 결합 위치에 각각 도킹 (docking)하였다. 그 다음 CDOCKER를 사용하여 당수용체 (화합물 1)를 각 당전이효소/당공여체 복합체의 추정 당수용체 결합 위치에 도킹하고, Glc 또는 GlcNAc의 부분에 깊숙이 도킹하여 당공여체 및 각 당전이효소의 주변 잔기들과의 이상적인 상호관계를 이루게 했다.

[0119] 당공여체의 C1 원자와 화합물 1의 O3 원자의 거리는 매우 좁은 범위에서 변했다 (~3.0). [KanF 또는 NemD/당공여체/화합물 1] 복합체의 총 에너지는 안정화되었고 시뮬레이션하는 동안 안정화된 상태를 유지하였다. 복합체에 대한 회전 반경은 시뮬레이션 내내 약 20 로 안정되게 나타났는데, 그것은 복합체 내에 화합물 1이 없을 때보다 화합물 1이 있을 때 단백질을 좀 더 조밀하게 만드는 것을 암시한다. 당전이효소 KanF (또는 NemD)의 두 개의 도메인 사이에는 커다란 친수성 포켓이 있다. 포켓은 당공여체와, Glu14(Glu41), Gln19(Gln46), Gln20(Gln47), His88(His115), Tyr110(Tyr137), Thr111(Thr138), Asp117(Asp204), Lys218(Lys245), Asn272(Asn299), Glu292(Glu319), Glu293(Glu320), Ser297(Ser324) 및 Glu300(Glu327)과 같은 이웃하는 친수성 잔기로 만들어진다. 도킹 구조에서의 친수성-친수성 결합의 분석을 통해 이런 잔기들이 상호관계에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 알게 되었다. 당공여체의 당부분과 화합물 1 사이에는 결합 부위에 친수성 잔기가 상호작용하는 것으로 생각된다. 두 당공여체의 우라실 부분은 Gly243(Gly270), Phe269(Phe296) 및 Ile275(Ile302)와 소수성 상호작용을 하고, 리보스 부분은 Ser297(Ser324) 및 Glu300(Glu327)와 친수성 상호작용을 하는 것으로 생각된다. 화합물 1과 Tyr110(Tyr137) 간의 친수성 접촉은 강력한데 왜냐하면 화합물 1이 페놀기 위에 위치할 때 Tyr의 페놀기가 원래의 위치에서 다소 안쪽으로 또는 바깥쪽으로 움직여서 화합물 1과 Tyr110(Tyr137)이 좀 더 근접하도록 하기 때문이다. 그러나 Leu89(Leu116)는 전혀 움직이지 않고 화합물 1과 강력한 소수성 상호작용을 한다. 화합물 1의 아미노기가 C3 위치에서 Asp177(Asp204)과 상호작용하여 화합물 1의 탈국지화된 음전하가 소실되게 한다. 화합물 1의 C6 위치에서 하이드록실기가 His88(His115)과 친수성 상호작용을 하고, 한편 화합물 1의 고리부분은 Gly16(Gly43) 및 Val17(Val44)와 소수성 상호작용을 한다. 당공여체의 Glc 또는 GlcNAc 부분은 Glu292(Glu319), Glu293(Glu320), 및 Leu294(Leu321)에 의해 형성된 포켓에 결합하는데, 이러한 잔기가 이 복합체의 안정에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 암시한다. 당공여체의 당 부분은 Glu292(Glu319) 및 Glu293(Glu320) 사이의 카르복실 부분 사이에 놓인다. Leu294(Leu321)는 당 부분과의 소수성 및 친수성 상호작용의 거의 중앙에 위치한다.

[0120] 본 발명자들은 또한 분자역학 및 결합 자유 에너지 분석을 수행했다. 당공여체는 위와 같이 여러 친수성기를 가지기 때문에 그것의 당전이효소 및 용매 분자와의 활성 부위에서의 수소결합 상호작용은 KanF 및 NemD와 밀착된 결합을 하는데 중요하다. KanF와 UDP-Glc의 수소결합 수 (~5)는 KanF와 UDP-GlcNAc 간의 수 (~2)에 비해 크고, NemD와 UDP-Glc 간의 수 (~3)는 NemD와 UDP-GlcNAc 간의 수 (~6)보다 작다. 이는 KanF의 경우 UDP-GlcNAc에 비해 UDP-Glc와의 결합력이 상대적으로 더 크며, NemD의 경우 반대로 UDP-Glc에 비해 UDP-GlcNAc와의 결합력이 더 크다는 것을 의미한다.

[0121] UDP-Glc 및 UDP-GlcNAc가 KanF 및 NemD에 결합하는 자유 에너지는 각각 -42.2, -47.3, -41.4, 및 -46.7 kJ/mol로 계산되었다 (표 3).

표 3

당공여체와 KanF 및 NemD의 주변 잔기간의 평균 결합 자유 에너지 (kJ/mol)

	KanF+ UDP-GlcNAC	KanF+ UDP-Glc	NemD+ UDP-Glc	NemD+ UDP-GlcNAc
$\langle E_{enz}^{vdW} \rangle$	-7.98±0.59	-7.13±0.17	-8.07±0.24	-7.45±0.40
$\langle E_{enz+sub}^{vdW} \rangle$	-42.09±0.39	-35.04±0.84	-43.90±0.38	-41.95±0.08
$\langle E_{enz}^{Elec.} \rangle$	-258.33±1.65	-284.48±1.47	-253.13±1.34	-277.01±1.83
$\langle E_{enz+sub}^{Elec.} \rangle$	-329.18±0.47	-367.88±0.48	-321.53±0.74	-356.63±0.18
$\triangle G$	-42.25±1.15	-47.28±1.82	-41.37±1.18	-46.71±1.09

[0122]

[0123] * 결합 자유 에너지(G)는 분자 동력학 시뮬레이션에 기초하여 계산하였다:

[0124] $$\triangle G = 0.2\left(\langle E_{enz-sub}^{vdW} \rangle - \langle E_{enz}^{vdW} \rangle\right) - 0.5\left(\langle E_{enz-sub}^{Elec} \rangle - \langle E_{enz}^{Elec} \rangle\right)$$

[0125] 여기서 <>는 UDP-Glc 및 UDP-GlcNAc와 같은 기질 (sub)과 KanF 및 NemD와 같은 효소의 주변 잔기 (enz) 사이의 평균 발데르발스 (vdW) 및 정전기적 (Elec) 상호작용을 나타낸다. 0.2 및 0.5는 각각 vdW 및 Elec의 조정계수 (scaling factor)이다.

[0126] 본 발명자들은 기질-유연성을 가지는 당전이효소의 KanF가 화합물 1에 부가하는 공동기질로 UDP-Glc 및 UDP-GlcNAc 모두를 취해서 화합물 9 및 2를 합성한다는 것을 밝혀냈다. 화합물 9의 구조 발견을 통해 KanF가 *N*-아세틸글루코사민 전이효소일 뿐만 아니라 글루코스 전이효소라는 것도 밝혀냈다. 이러한 당전이효소의 활성은 종전 아미노글리코사이드 생합성에서는 알려지지 않았었다. 또한 화합물 9는 KanI-KacL에 의해 화합물 3이 4로 전환되는 것과 같은 방식으로 화합물 10으로 전환된다. KanI-KacL는 또한 화합물 6 및 12를 각각 7 및 8로 변환시킨다. 두 번째 당전이효소인 KanE 역시 당수용체에 대한 두드러진 기질 유연성을 보이는데 UDP-Kns을 화합물 3, 4, 9 및 10으로 옮겨서 각각 화합물 6, 7, 12, 및 8을 만들어낸다. KanE는 또한 UDP-Glc를 당공여체로 취하고, UDP-Glc를 상기 슈도다이사카라이드로 옮겨서 화합물 5, 13, 11, 및 14를 생성시킨다(도 2,3).

[0127] 본 발명의 재조합 균주를 사용하여 AHBA-결합 카나마이신을 직접 생산하는 방법은 반합성 아미노글리코사이드의 직접적인 발효 생산 방법으로서는 최초이다.

[0128] 또한 본 발명에 의해 만들어진 새로운 아미노글리코사이드인 화합물 17 (1-*N*-AHBA-카나마이신 X)은 Kan^R 및 Amk^R 실험 균주 모두에 강력한 항균활성을 가졌다. 화합물 15와 17의 유일한 구조적 차이점은 C-6' 위치에 붙은 작용기이다 (도 5c). 이것은 화합물 15에서 아미노글리코사이드 6'-아세틸트랜스퍼라제의 표적으로 작용하는 6'-아미노기를 떼면 화합물 15에 내성을 가지는 병균에 효과적이라는 것을 보여준다. 화합물 17의 또 다른 장점은 아미노기의 수가 감소했기 때문에 독성이 감소할 것이라는 것이다.

[0129] 또한, 조작된 경로를 통해 화합물 16을 직접 인 비보로 생산하는 것은 *S. tenebrarius*에 의해 생산되는 총 네브라마이신 인자 (factor)의 9%를 차지하는 6"-*O*-카르바모일토브라마이신의 가수분해를 통한 종래의 방법에 비해 훨씬 경제적이다.

[0130] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할

수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0131] **<실시예 1>**

[0132] **재료의 준비**

[0133] 표준 카나마이신, 카나마이신 B, 네오마이신, 파로모마이신, 토브라마이신 및 아미카신은 시그마사(Sigma, 미국)로부터 구입하였다. 2-머캅토에탄올, 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF), 페놀/클로로포름/아이소아밀알코올(25:24:1), 유리딘 5'-다이포스포-D-글루코스(UDP-Glc) 및 유리 비드(150 내지 212 μm)도 시그마사로부터 구입하였다. 헵타플루오로부티르산(HFBA)은 플루오카사(Fluka)에서, HPLC-등급 아세토니트릴, 메탄올 및 물은 제이티베이커사(J.T. Baker)로부터 공급받았다. 2-데옥시스트렙타민(2-DOS, 화합물 1) 및 UDP-2-N-아세틸-D-글루코사민(UDP-GlcNAc)은 국내의 진켐사로부터 구입했다. 양이온성 고체상 교환기(OASIS MCX SPE, 3 mL/60 mg) 및 진공 매니폴드는 워터스사(Waters)의 것이고, 배지 성분, 대두분, 효모추출물 및 맥아추출물은 비디사이언스사(BD Science, USA)에서 구입하였다.

[0134] 파롬아민 및 네아민은 메탄올분해를 통해 파롬마이신 및 네오마이신으로부터 만들었다. UDP-2-D-글루코사민(UDP-GlcN)은 글루코사민-1-포스페이트 및 유리딘 5'-트라이포스페이트(UTP)를 UDP-D-글루코스 피로포스포릴라제로 효소 반응시켜서 제조하였다. 서브클로닝을 위해 대장균(*E. coli*) DH10B 및 플라스미드 Litmus28(New England Biolabs)를 사용하였다. 강력한 *ermE** 프로모터와 티오스트렙톤 저항 마커를 가지는 다복제(high-copy number) 대장균-스트렙토마이세스(*E. coli-Streptomyces*) 셔틀 벡터 pSE34를 발현 플라스미드로 사용하였다.

[0135] **<실시예 2>**

[0136] **균주 배양**

[0137] *S. venezuelae*의 재조합 균주는 30℃, 액상 R2YE에서 배양하여 원형질체를 만든 다음 티오스트렙톤(30 μg/mL)을 첨가한 R2YE 고체 배지에서 다시 배양하였다. 서브클로닝에 사용한 *E. coli* 균주는 암피실린(50 μg/mL)이 첨가된 LB 배지에서 배양했다.

[0138] 카나마이신 생합성 중간물질 및 그 유사체를 만들기 위해서, 생합성 후보 유전자를 발현하는 *S. venezuelae*를 티오스트렙톤(25μg/mL) 첨가 R2YE 배지 300mL에서 30℃로 4일간 배양하였다. *S. kanamyceticus* ATCC 12853을 액상의 ISP2(0.4% 효모추출물, 1.0% 맥아추출물, 0.4% 포도당)에서 30℃로 5일간 배양하였고, *S. tenebrarius* ATCC 17920는 발효 배지(2.0% 포도당, 2.0% 수용성 전분, 4.0% 대두분, 0.5% 효모 추출물, 0.5% $CaCO_3$, 및 0.4% $MgSO_4 7H_2O$, pH 7.0)에서 30℃로 5일간 배양하였다.

[0139] 카나마이신 생합성 중간산물 및 유사체의 항균 범위를 확인하기 위해 총 6종의 그람양성균을 사용하였다: 카나마이신 감수성(Kan^S) *E. coli* ATCC 25922, 카나마이신 내성(Kan^R) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Kan^S *E. coli* CCARM (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, 한국) 1A020, Kan^R *E. coli* CCARM 1A023, 아미카신 감수성(AmkS) *P. aeruginosa* CCARM 2206, 및 아미카신 내성(Amk^R) *P. aeruginosa* CCARM 2178.

[0140] **<실시예 3>**

[0141] **발현 플라스미드 및 재조합 *S. venezuelae* 균주의 구축 및 복제**

[0142] 내재성 데옥시슈가 티미딘 5'-다이포스포(TDP)-D-데소사민 생합성 유전자가 제거된 *S. venezuelae* 돌연변이주를 이종숙주로 사용하였다

[0143] 카나마이신 변형 유전자(*aphII*)를 없애기 위해서 유전자 교체 플라스미드로 pYJ188을 증식성 플라스미드 매개 상동 재조합 기술(replicative plasmid-mediated homologous recombination)로 *S. venezuelae* YJ003 변이체의 원형질에 도입시켰다. 서던 하이브리다이제이션을 통해 카나마이신 감수성 및 유전자형에 따른 여러 종류의 이중 교차 변이체(double crossover mutants)를 동정해냈다.

[0144] 여러 가지 카나마이신 생합성 유전자를 포함하는 DNA 단편을 pSKC2로부터 특정 데옥시올리고뉴클레오타이드 프

라이머(표 1 참조)를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. NemD, GtmG, AprD3, AprD4, TobM1 및 TobM2를 암호화하는 DNA 단편은 *S. fradiae* ATCC 10745, *M. echinospora* ATCC 15385 및 *S. tenebrarius* ATCC 17920의 게놈 DNA를 이용하여 PCR-증폭하여 얻었다. *btrI, btrJ, btrK, btrO, btrV, btrG,* 및 *btrH* 유전자를 포함하는 DNA 단편은 S-4-아미노-2-하이드록시부티르산(AHBA) 생합성 및 전달을 위해서 필요한데, *B. circulans* NR3312의 게놈 DNA를 템플리트로 사용하여 PCR-증폭했다. 각 프라이머 쌍은 각 DNA 단편의 서브클로닝을 용이하게 하기 위한 제한 부위를 가졌다.

[0145] Pfu 폴리머라제(Fermentas)를 사용하여 사용설명서에 따라 PCR을 수행했다. 모든 PCR 산물을 Litmus 28로 클로닝하고 서열을 확인했다.

[0146] 2-DOS 생합성 유전자를 발현시키기 위해서, *kanA-kanB* 및 *kanK*를 포함하는 PCR-증폭 단편을 각각 *Bam*HI/*Spe*I 및 *Xba*I/*Hind*III로 절단하고, 동시에 *Bam*HI와 *Hind*III로 잘려진 pSE34와 연결해서, pDOS를 만들었다. *kanF*의 *Spe*I/*Hind*III-분해 DNA 단편을 pYJ489로부터 분리한 저항성 유전자 세트(*gtmF-gtmK-gtmL*)의 *Xba*I/*Hind*III 단편과 연결시키고 pDOS를 *Xba*I/*Hind*III 단편으로 삽입함으로써 2-DOS 생합성 유전자와 함께 *kanF*를 발현하는 플라스미드 pDOSf(*kanA-kanB-kanK-kanF-gtmF-gtmK-gtmL*)를 구축하였다.

[0147] 플라스미드 pPAR, pPARcd, pPARil, pKCXΔcΔd, pKCX, pKABΔcΔd, pKAB, pDOSn, pDOSt_1, pDOSg, pKCXΔfn, pKCXΔft_1, pKCXΔfg, 및 pKABΔfn를 구축하기 위한 모든 후속 복제 과정은 앞서 설명한 바와 같이 *Spe*I 및 *Xba*I 위치의 양립성 결합 말단을 이용하였다.

[0148] 1-*N*-AHBA 카나마이신을 직접 발효하여 생산하기 위해서, *btrG-btrH*를 포함하는 플라스미드 Litmus 28을 *Spe*I/*SnaB*I 제한 효소로 처리하고 *Xba*I/*SnaB*I에 의해 잘린 DNA 단편 *btrI-btrJ*와 연결하였다. 만들어진 *btrG-btrH-btrI-btrJ*를 포함하는 플라스미드를 동일한 방법으로 *btrK-btrO-btrV*와 연결하였다. 그 다음, *btrG-btrH-btrI-btrJ-btrK-btrO-btrV*를 포함하는 플라스미드를 *Xba*I/*Spe*I로 분해하고, pKCX 및 pKAB의 *Xba*I 위치(표 2 참조)에 이식하여 각각 pKCXb 및 pKABb를 만들었다. pKCXb 및 pKABb 내에서의 *btrG-btrH-btrI-btrJ-btrK-btrO-btrV*을 포함하는 DNA 단편의 정확한 위치를 확인하기 위해서 제한 단편 분석을 실시했다.

[0149] 그 다음, 3'-데옥시카나마이신을 *in vivo* 생산하기 위해서 플라스미드 pKABΔfna 및 pKABΔfnΔet$_2$a를 구축하였다.

[0150] *aprD3*를 포함하는 플라스미드 Litmus 28을 *Spe*I/*Hind*III으로 분해시키고, *aprD4*을 포함하는 *Xba*I/*Hind*III DNA 단편과 결합시켰다. *aprD3-aprD4* 유전자 세트를 포함하는 플라스미드를 *nemD-kanE-kanC-kanD-kanI-kacA-kacL-gtmF-gtmK-gtmL*을 포함하는 *Xba*I/*Hind*III DNA 단편과 연결시켰다. 만들어진 플라스미드를 *kanA-kanB-kanK*(pDOS)를 포함하는 pSE34의 *Xba*I/*Hind*III로 이동시켜서 pKABΔfna를 만들었다. 플라스미드 pKABΔfnΔet$_2$a는 pKABΔfna에 *kanE* 대신 *tobM2*를 넣은 것이다.

[0151] 카나마이신 생합성 유전자들의 기능을 규명하기 위한 *S. venezuelae* 재조합 균주의 무세포 추출물을 확보하기 위하여 우선 *kanF, kanE, kanI-kacL, kanC-kanD,* 및 *aprD3-aprD4*을 포함하는 DNA 단편들을 *Xba*I/*Hind*III 단편으로서 pSE34에 클로닝하여, pKanF, pKanE, pKanI-KacL, pKanC-KanD, 및 pAprD3-AprD4를 만들었다. 만들어진 모든 플라스미드를 *S.venezuelae*의 조작 균주에 이식하여 대응하는 재조합체를 만들었다.

[0152] **<실시예 4>**

[0153] **카나마이신 생합성 중간산물 및 유사체의 분리 및 동정**

[0154] 실시예 3에 따라 조작된 재조합 숙주의 생산물을 Spherisorb S5 ODS2(250×20 mm, Waters) 세미-프렙 칼럼을 이용하여 HPLC-ESI-MS/MS 분석용 이동상으로 용리시켜서 HPLC를 수행했다. 유속 12 mL/분으로 150분간 용리시켰고, 이 용리액을 3-mL부분으로 구획화해서 HPLC-ESI-MS/MS로 확인하여 각 카나마이신-연관 생합성 중간산물 및 유사체를 확인하였다. 관심 있는 산물을 포함하는 구획을 모아놓고 OASIS MCX SPE로 추출한 다음 동결건조했다. 298 K에서 Varian INOVA 500 분광광도계를 사용하여 ^{1}H, ^{13}C, 및 2D ^{1}H-^{1}H COSY NMR 스펙트럼을 얻었다. 트리메틸실일-2,2,3,3-테트라데유테로프로피온산(TSP)을 내부표준으로 사용하여 화학적 이동을 ppm 단위로 기록하였다. 이전에 규명된 ^{1}H and ^{13}C NMR 스펙트럼과 비교하여 각 화합물의 구조를 확인하였고, NMR 데이터는 MESTREC(Magnetic Resonance Companion) 소프트웨어를 이용하여 처리하였다.

[0155] **<실시예 5>**

[0156] **카나마이신 생합성 중간산물 및 유사체의 분석**

[0157] 여러 가지 조합의 아미노글리코사이드 생합성 유전자를 발현하는 *S. venezuealae* 재조합 균주에 의해 생산된 카나마이신 생합성 중간산물 및 그 유사체를 OASIS MCX(Waters) SPE 정제 과정을 이용하여 발효 배지로부터 추출하고 HPLC-ESI-MS/MS로 분석하였다.

[0158] 시료를 XTerra MS C18 칼럼(50×2.1 mm, 3.5 , Waters)에서 10 mM에서 시작하는 헵타플루오로부티르산(Fluka) 아세토니트릴 구배액을 이용하여 45분간 분리하였다. 화합물의 분석은 다중 반응 모니터링 모드의 MS/MS 분석을 통해 이루어졌다. 모이온으로부터 산출 이온으로의 전이를 탐지하기 위해 아래와 같이 분석체에 대한 특정 중량쌍을 고름으로써 정량하였다: 화합물 1, 163 > 84; 화합물 2, 366 > 163; 화합물 3 및 10, 324 > 163 ; 화합물 4, 323 > 163; 화합물 5, 12 및 14, 486 > 163; 화합물 6, 8 및 13, 485 > 163; 화합물 7, 484 > 163; 화합물 9, 325 > 163; 화합물 11, 487 > 163; 화합물 15, 586 > 264; 화합물 16, 468 > 163; 화합물 17, 587 > 264; 화합물 18, 307 > 163; 및 화합물 19 및 20, 469 > 163. 세 번씩 배양하고 각각 추출하였다.

[0159] **<실시예 6>**

[0160] **AprD3-AprD4 활성 인 비트로 반응**

[0161] 슈도다이- 또는 트라이사카라이드에서의 3'-탈산소화 반응에 대한 AprD3-AprD4 쌍의 활성을 측정하기 위해서 인 비트로 실험을 하였다. *aprD3-aprD4* 유전자를 발현하는 재조합 숙주로부터 얻은 무세포 추출물에 100 μM의 네아민 또는 카나마이신 B를 가하였다. 30℃에서 2시간 동안 배양한 후에 반응을 정지시켰다. 이렇게 만들어진 관심 산물을 포함하는 상층액을 OASIS MCX SPE를 이용하여 추출한 다음, HPLC-ESI-MS/MS 분석을 하였다. 실험은 각각 2번 수행했고 결과는 도 7에 도시한 바와 같다.

[0162] **<실시예 7>**

[0163] **KanF의 당전이 인 비트로 반응**

[0164] *S.venezuelae*의 무세포 추출물은 유리 비드 균질화를 통해 만들었다. 만들어진 무세포 추출물을 100 mM TrisHCl, pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 6 mM 2-머캅토에탄올 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF; Sigma)를 함유하는 트리스 완충액에 현탁시키고 단백질 농도를 교정시켰다. *kanF*만 발현하는 재조합 숙주의 무세포 추출물에 100 μM의 2-DOS 및 200 μM UDP-Glc(Sigma), UDP-GlcNAc(GeneChem) 또는 UDP-GlcN를 공동기질로 첨가함으로써 KanF에 의한 당전이 반응을 시작시켰다. 100 μM의 6'-하이드록시 슈도다이- 및 -트라이사카라이드 3, 6, 9 및 12를 *kanI-kacL*를 발현하는 재조합 숙주의 무세포 추출물과 섞어 반응시킴으로써 6'-아미노화에 대한 KanI-KacL의 활성을 측정하였다. 30℃에서 2시간 배양한 후에, 얼음처럼 차가운 페놀/클로로포름/아이소아밀 알코올(25:24:1; Sigma)로 반응을 정지시키고 18,000g로 5분간 원심분리하였다. 관심 산물을 포함하는 상층액을 OASIS MCX SPE를 이용해 추출하고, 100 μl의 물을 넣은 다음, HPLC-ESI-MS/MS 분석을 하였다.

[0165] **<실시예 8>**

[0166] **KanC-KanD 활성 인 비트로 반응**

[0167] KanC-KanD의 활성을 확인하기 위한 반응은 *kanE* 또는 *kanC-kanD*를 발현하는 두 개의 *S. venezuelae* 균주의 무세포 추출물을 이용하여 수행했다. *kanE*(또는 *kanC-kanD*)를 발현하는 균주의 무세포 추출물에 200 μM UDP-Glc와 100 μM 화합물 3 또는 4를 넣고 실시예 7에서 설명한 바와 같은 조건으로 배양한 후 반응을 정지시켰다. 반응 산물을 포함하는 상층액을 *kanC-kanD*(또는 *kanE*)를 발현하는 균주의 무세포 추출물과 함께 30℃에서 2시간 배양한 후에 반응을 다시 정지시켰다. 만들어진 상층액을 위와 같은 정제과정을 거친 후 HPLC-ESI-MS/MS 분석했다. 슈도다이사카라이드 9 및 10으로도 두 가지 무세포 추출물을 이용한 연속 반응을 수행했다. 실험은 각각 2번씩 수행했다.

[0168] **<실시예 9>**

[0169] **야생형 *S. kanamyceticus* 및 *S. tenebrarius*로부터 추출한 무세포 추출물을 이용한 인 비트로 반응**

[0170] *S. kanamyceticus*의 KanE 및 *S. tenebrarius*의 TobM2의 3'-데옥시네아민, 즉 네브라민에 대한 당전이 활성을 측정하기 위해서 *in vitro* 실험을 하였다. *S. kanamyceticus*의 무세포 추출물(SK CFE) 및 *S. tenebrarius* 무세포 추출물(ST CFE)에 100㎛M의 네브라민을 첨가하였다. 반응을 간섭할 수 있는 야생형 균주의 카나마이신- 또는 토브라마이신-연관 동질체(congener)가 최소한으로 남아있게 하기 위해서 무세포 추출물은 유리 비드 균질화 후에 추가로 다음과 같이 OASIS MCX SPE 통과 처리하였다. 우선, 두 야생형 균주로부터 얻은 무세포 추출물을 각각 메탄올과 물로 헹군 SPE 카트리지에 넣었다. 그 다음 카트리지를 통과한 용리 샘플을 확보하였다. 이상의 추출과정은 4℃ 정도의 차가운 상태에서 수행했다. 이렇게 만들어진 무세포 추출물을 30℃에서 화합물 18과 함께 2시간 동안 반응시킨 후에 다시 OASIS MCX SPE 정제과정을 거친 후 HPLC-ESI-MS/MS 분석을 하였다. 두 번의 실험을 하였고 결과는 도 8에 도시했다.

[0171] 화합물 6, 7 또는 12의 카나마이신 8로의 전환반응은 100 ㎛M의 화합물 6, 7 또는 12를 *S. kanamyceticus*의 무세포 추출물에 첨가함으로써 측정했다. 이 무세포 추출물은 유리 비드 균질화 후에 위에 설명한 바와 같이 OASIS MCX SPE 통과 처리 하였다. 30℃에서 2시간 배양한 다음 반응을 종료시켰다. 원하는 산물을 함유하는 상층액을 OASIS MCX SPE로 추출하고 HPLC-ESI MS/MS 분석을 하였다. 실험은 각각 2번 수행했고 결과는 도 9에 나타내었다.

[0172] **<실시예 10>**

[0173] **카나마이신 생합성 중간산물 및 유사체의 MIC 측정**

[0174] 다양한 카나마이신-관련 슈도다이- 및 트라이사카라이드들과 AHBA-결합 유사체(화합물 16, 18, 19 및 20 제외)들의 MIC를 CLSI(Clinical and Laboratory Standard Institute, 구 NCCLS)의 마이크로-희석법으로 측정하였다. 실시예 2에 기재한 바와 같이, 그람음성 *E. coli* 및 *P. aeruginosa* 균주 및 임상적으로 분리한 균주를 30℃에서 뮐러 힌톤 브로스(BD Science)에서 배양했다. 아미노글리코사이드를 연속적으로 2배 희석하여 최종 농도가 0.25-128㎛g/ml사이가 되도록 했다. 물 부분표본을 음성 대조군으로 사용했다. 실험 균주들의 생장은 랩시스템즈 바이오스크린(Labsystems Bioscreen) C 리더로 관찰했고, MIC는 브로스 배지에 희석된 아미노글리코사이드의 실험 세균의 생장을 억제하는 최저 농도로 결정하였다.

[0175] **<실시예 11>**

[0176] **KanF 및 NemD와 같은 당전이효소에 대한 3D 구현**

[0177] 두 당전이효소 KanF 및 NemD에 대해서 MODELLER18로 상동관계 모델링을 하였고 MshA(PDB code: 3C48)의 원자좌표를 템플리트로 사용하여 FoldX로 최적화하였다. VADAR로 3D 구조 모델을 산정하였다. 당공여체(UDP-Glc 및 UDP-GlcNAc) 및 수용체(2-DOS)에 대한 결합 형태를 결정하기 위해서 분자 도킹 모델을 사용하였고, 분자 역학 시뮬레이션을 위해서 HF/6-31G(d)를 이용하여 가우시안03(Gaussian03)으로 에너지를 최소화하고 구조를 최적화하였다.

[0178] 당공여체 및 2-DOS의 당전이효소에 대한 도킹은 일차적으로 몇 가지 알고리즘에 의한 예측 지형 결합 부위에 따라 만들어졌다. MMFF 역장 및 AutoDock 4.0 프로그램 스위트에 기초한 CDOCKER 프로그램(Accelrys, Inc.)으로 자동 도킹을 하였다. 활성 부위는 KanF 및 NemD의 예상 촉매 중심으로부터 6Å반지름의 구로 정의하였다. 각 복합체 모델을 정육면체 상자의 TIP3 물분자로 용매화하고 KanF 및 NemD 단백질의 전체 표면과 그것의 당공여체/2-DOS가 12Å이상의 두께를 가진 물층으로 덮이도록 했다. 최대 경사 알고리즘(steepest descent algorithm)과 CHARMM의 결합 구배법(conjugate gradient method)을 순차적으로 이용하여 각 복합체에 대한 에너지를 최소화하였다. 그 다음 CHARMM 패키지를 이용하여 상기 단백질 및 당공여체/2-DOS로 500-ps 위치 제한 분자 역학을 수행하였다. 마지막으로, 300K에서 맥스웰 분포(Maxwellian distribution)로부터 초기 속도를 취함으로써 3-ns 분자역학을 시작했다. 용매 및 당공여체/2-DOS는 각각 약하게 온도조에 결합했고, 완화시간은 0.1-ps였다. 시스템 역시 등방성으로 약하게 완화시간 0.5ps로 1 기압 하에서 압력조에 결합했고 등온 압축률은 0.5×10^{-3} 였다.

원거리 정전기력은 입자 메쉬 에발트법(particle-mesh Ewald method)으로 계산하였다. 단거리 반데르발스 및 쿨롱 작용은 각각 0.1Å을 경계로 나누었다. 모든 결합 길이는 SHAKE 알고리즘을 이용하여 제한하였고, 시간 단계는 0.002-ps로 맞추었다. 당공여체 및 KanF(또는 NemD) 사이의 결합 자유 에너지는 기본 변수를 사용하여 선형 상호 에너지법(linear interaction energy method)으로 계산하였다.

[0179] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[0180] 본 발명에 의해, 카나마이신을 생산하는 재조합 스트렙토마이세스 속 이종 미생물과 종래의 방법에 비해 효율적으로 카나마이신을 생산하는 방법 및 이를 통해 만들어진 새로운 카나마이신 화합물이 제공된다.

수탁번호

[0181]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11725BP

수탁일자 : 20100716

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11726BP

수탁일자 : 20100716

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11727BP

수탁일자 : 20100716

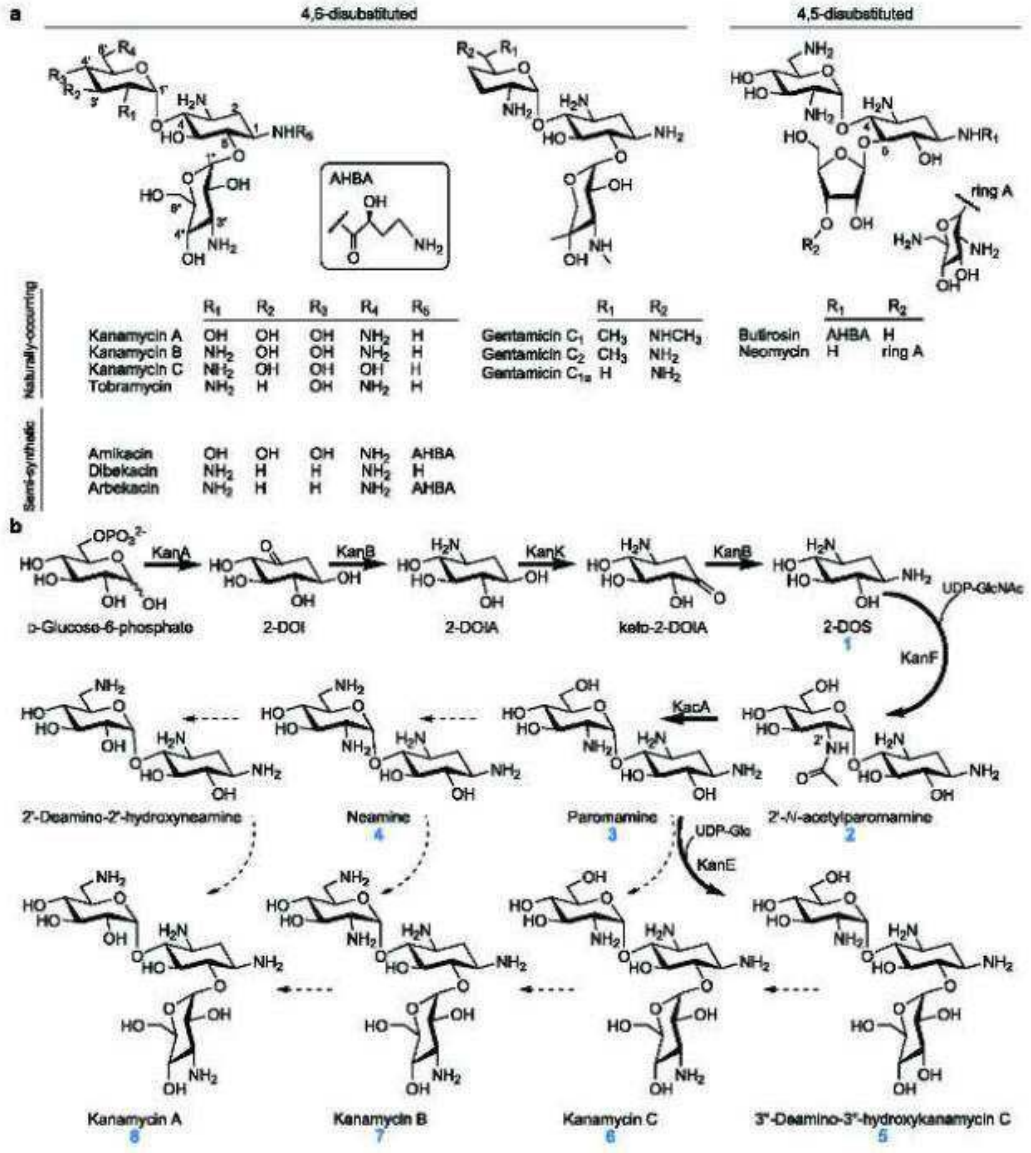
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11728BP

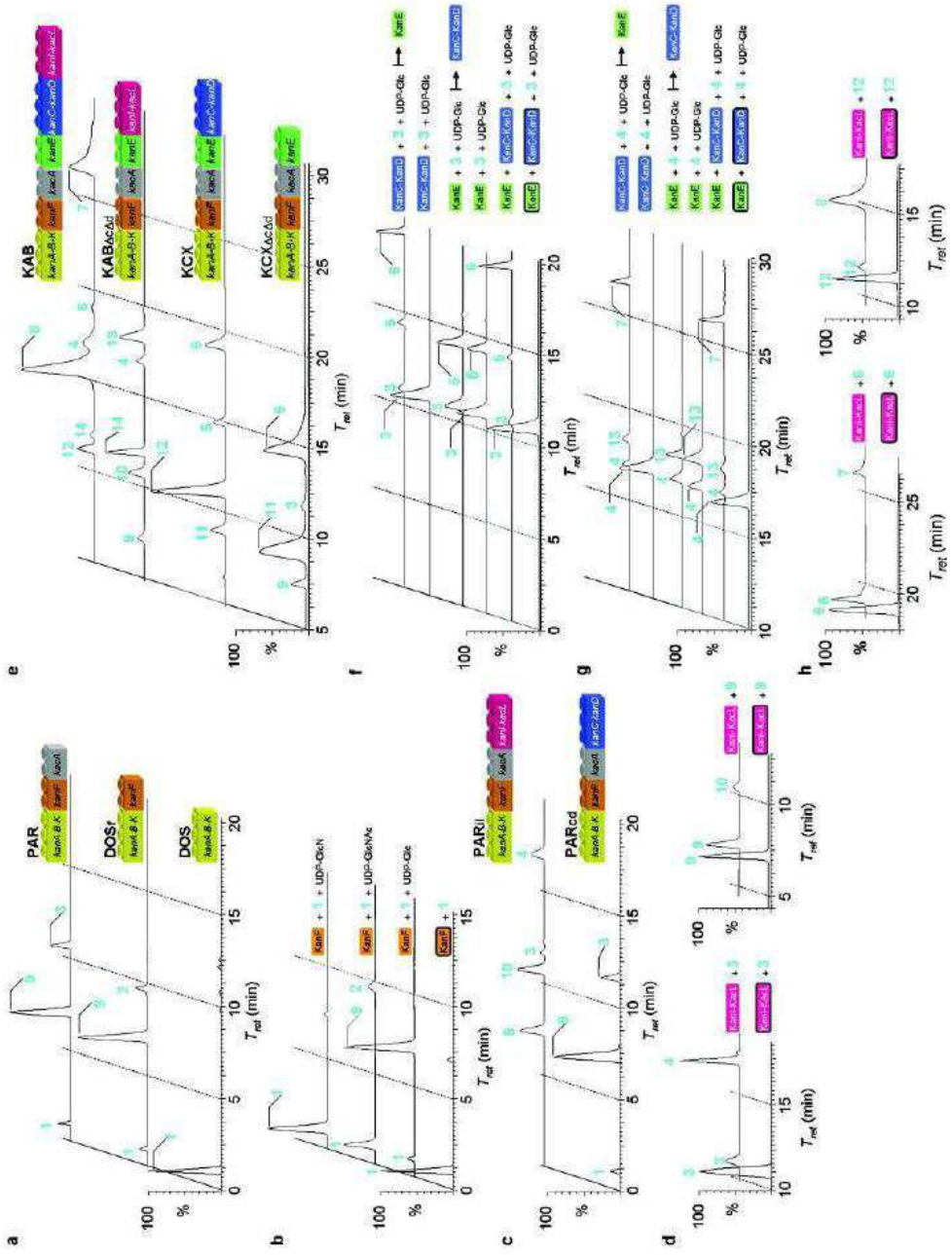
수탁일자 : 20100716

도면

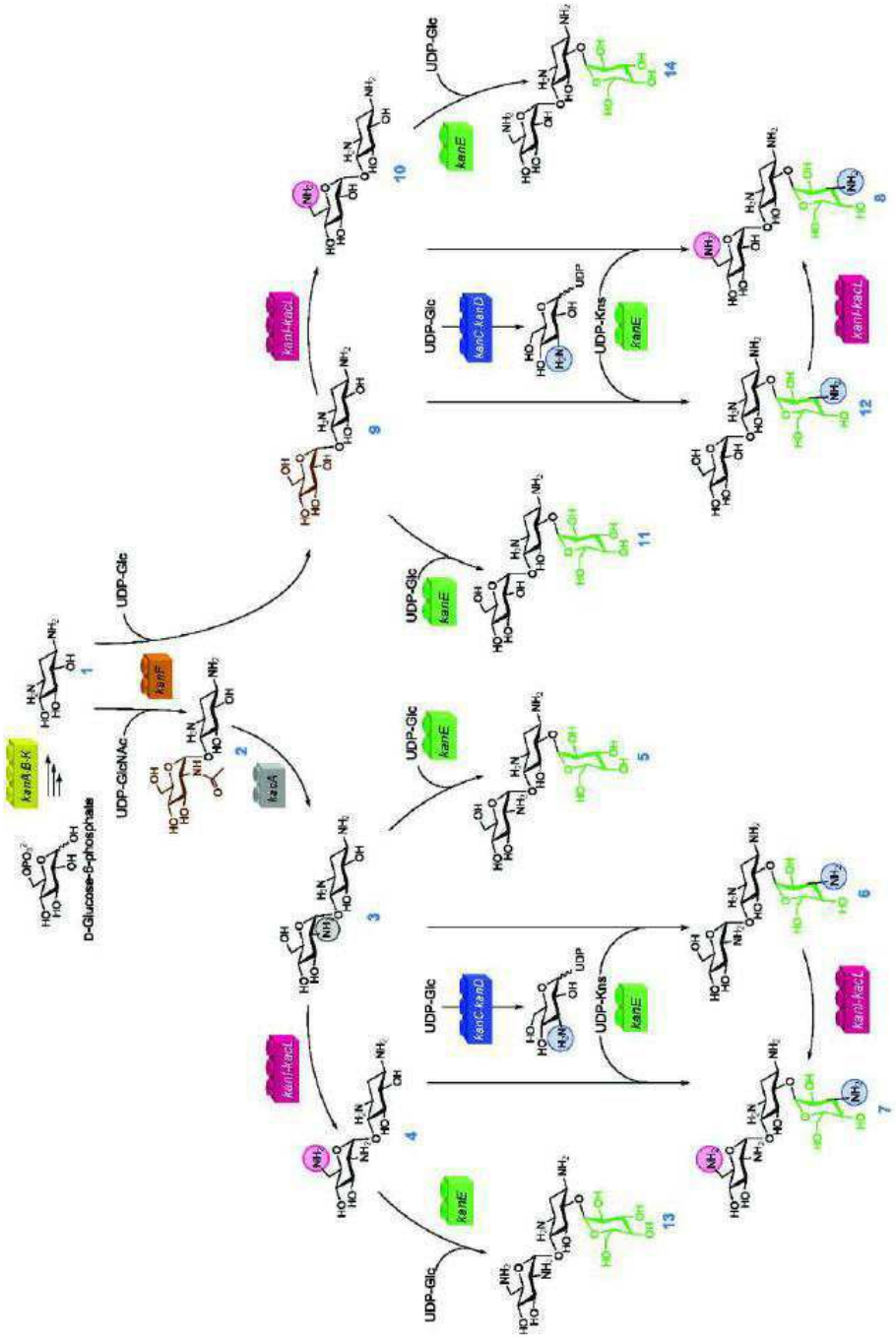
도면1


a
4,6-disubstituted
4,5-disubstituted
AHBA
ring A
Naturally occurring
Semi-synthetic
Kanamycin A
Kanamycin B
Kanamycin C
Tobramycin
Gentamicin C1
Gentamicin C2
Gentamicin C1a
Butirosin
Neomycin
Amikacin
Dibekacin
Arbekacin
b
KanA
KanB
KanK
KanB
UDP-GlcNAc
KanF
KacA
UDP-Glc
KanE
D-Glucose-6-phosphate
2-DOI
2-DOIA
keto-2-DOIA
2-DOS
1
2'-Deamino-2'-hydroxyneamine
Neamine
4
Paromamine
3
2'-N-acetylparomamine
2
Kanamycin A
8
Kanamycin B
7
Kanamycin C
6
3''-Deamino-3''-hydroxykanamycin C
5

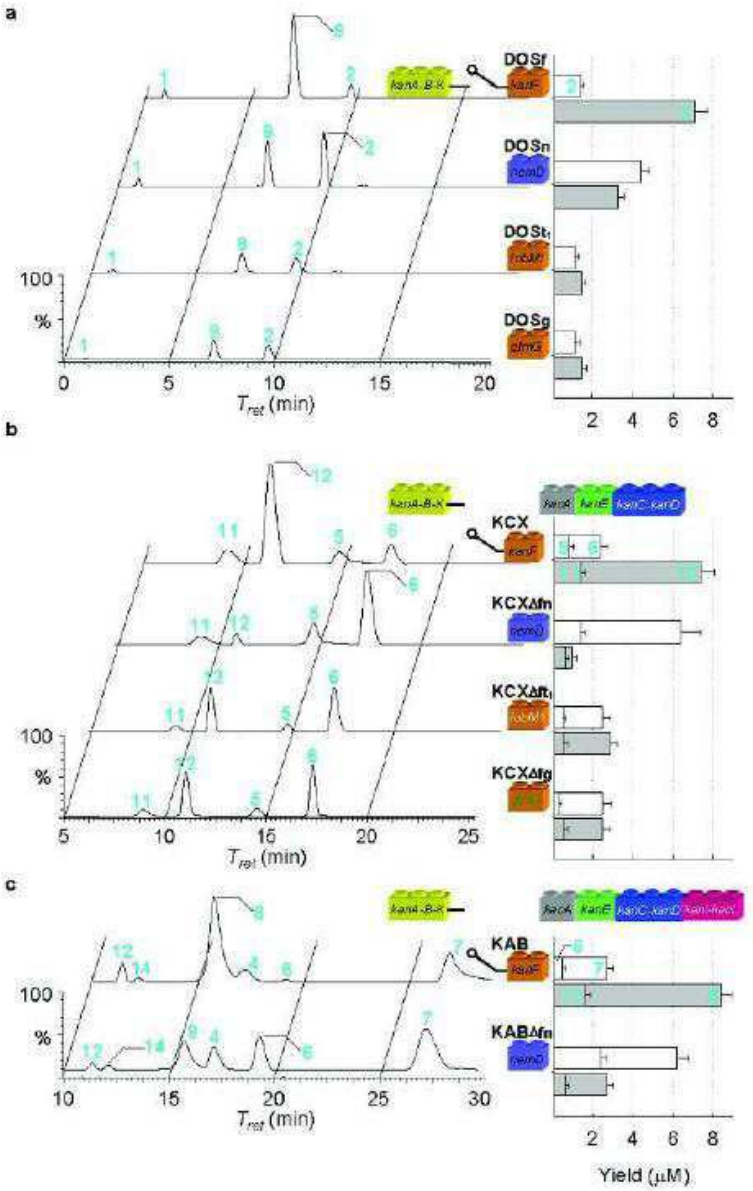
도면2



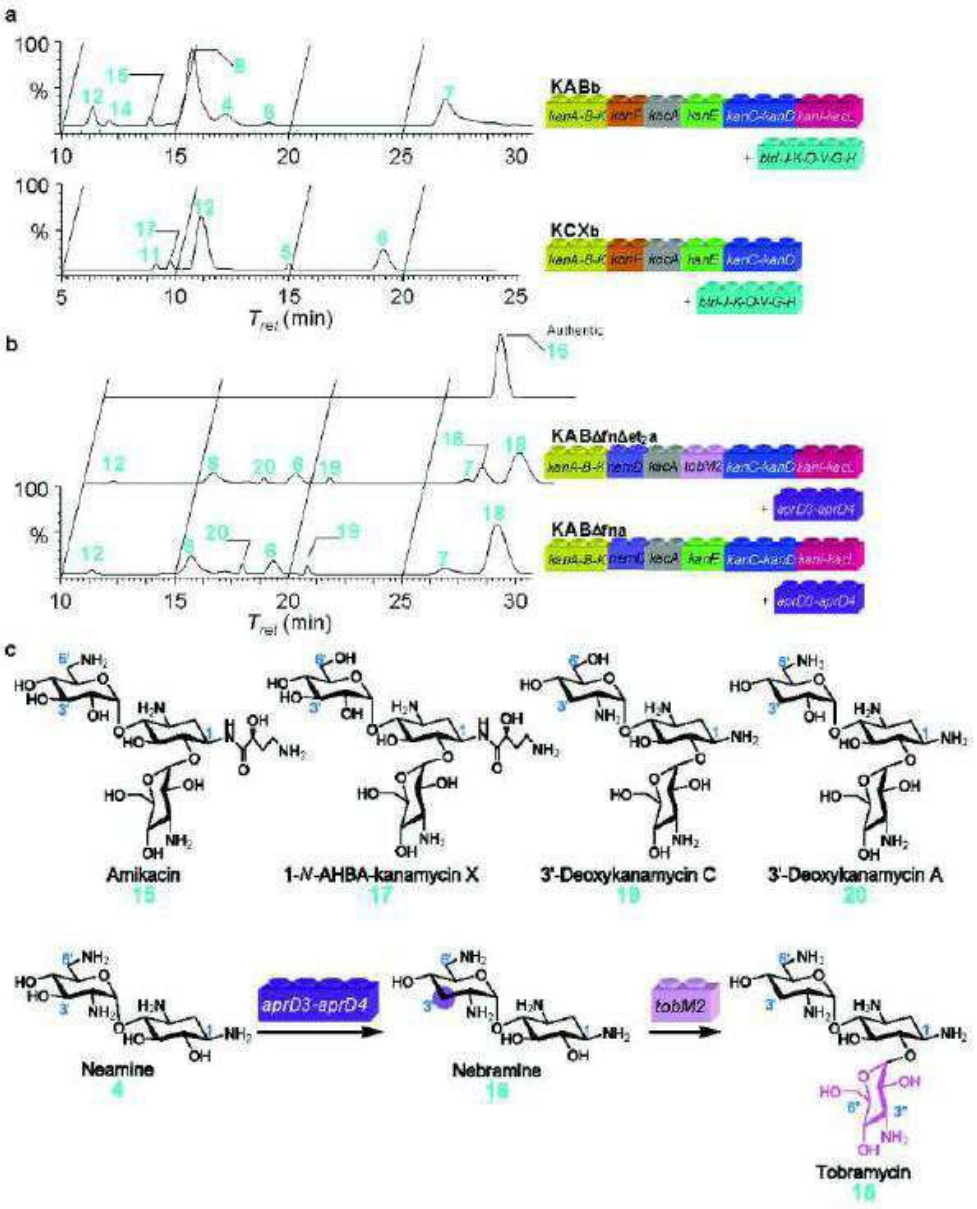
도면3


D-Glucose-6-phosphate
UDP-GlcNAc
UDP-Glc
UDP-Kns
kanA
kanB-K
kanF
kanE
kanC-kanD
kanI-kacL

도면4


a
DOSf
DOSn
DOSt4
DOSg
100
%
0
5
10
15
20
T_{ret} (min)
2
4
6
8
b
KCX
KCXΔfn
KCXΔft4
KCXΔfg
100
%
5
10
15
20
25
T_{ret} (min)
c
KAB
KABΔfn
100
%
10
15
20
25
30
T_{ret} (min)
2
4
6
8
Yield (μM)

도면5



서 열 목 록

<110> EHWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> New kanamycin compound, kanamycin-producing Streptomyces sp. and kanamycin producing method

<150> KR1020100037709

<151> 2010-04-23

<160> 62

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 825

<212> DNA

<213> Micromonospora echinospora

<400> 1

atgacgacat ctgcgcctga ggaccgtatc gaccaggtcg agcaggccat caccaagagc 60

cggcgctacc agacggtggc cccggccacc gtgcggcgcc tggcccgggc tgccctcgtc 120

gccgcgcggg gcgacgtgcc ggacgcggtg aagcgcacca agcgcgggct gcatgagatc 180

tacggggcct tcctgccgcc cagcccgccc aactacgcag cgttgctgcg gcagctcgac 240

tccgctgtgg acgccggtga cgacgaggcg gtccgggcgg ctctgcgccg cgcgatgtca 300

gtgcatgtgt ccactcgtga gcgattgccg cacctggcgg agttctacca ggagatcttc 360

cgtcacgtgc cccagcccaa cacgctgcgt gacctcgcct gtggcctcaa tccgctggcc 420

gctccctgga tgggcctgtc ggaccagacc gtctacgtcg cctccgacat cgacgcccgg 480

ctgatcggct tcgtggacgc cgccctgacg aggctgggcg tcgcgcaccg tacgagcgtg 540

gtcgacctcc tcgaggaccg ccttgacgag ccgaccgacg tcacgctatt gctgaagacg 600

ctgccctgtc tggagactca gcgacgaggc tccggctggg aagtgattga cattgtcaac 660

tcgccgatta tcgtggtaac cttcccgacc aagtctctcg gtcagcgatc gaaggggatg 720

tttcagaact attcacaaag ttttgagtcc caggccagag aacggtcgtg ccgaattcag 780

cgactggaga tcggcaacga gctgatttac gtcattcaga aatag 825

<210> 2

<211> 1407

<212> DNA

<213> Micromonospora echinospora

<400> 2

atgtctgaca cggccaaaca agcgaccggc gcggaggtca agcagcccgg cgcagcgggt 60

cccagccgac cgggactcgc gctgaccctt ctggcctcct gtgcgttgat gatcgtcctc 120

gactcgacgg tggtctacgt cgccctgccg cagatccagc agagcctcga ggtgagcgcc 180

accgggctgg tctgggtggt caacgcgtac gccctggcgt tcggcggtct gatgctgctc 240

ggcggccggg ccggcgacat cgtcggccag cggcggatcc tcctcgtcgg gctggcggtc 300

ttcggcgtcg cctcgctgat ctgcggtctg gcgacctcgc cggagatgct gatcggtgcc 360

cgtgccctcc aggggatcgg ggccgcgctg gtcgccccga cgtcgctctc gctgattccg 420

atcaacttca ccgacaacgc ggcccggaac aaggcgatcg gtgtctacac cggcatcgcc 480

gcggccggcg gcacgctcgg cctgatcctc ggcggggtgc tcagcgacgc cgcctcctgg 540

cgctgggtgt tcttcatcaa cgtgccggtg gtcgcgctgg tgctcctgct cgcgccgcgc 600

gtcctgcgcg agagccagcc gcagcgcggc tcgttcgaca tcgtcggggc ggtgacctcg 660

accggtgcga tggtcgccct ggtgtacgcg ctcgtccgca cctcgaccaa gggttggggc 720

gacccggtcg tcctggcctg cctcgccgtg gcggccgtcc tgttcaccgt gctgatcctg 780

gccgagcgtc gggcccggca gccgctgctg ccgctgcggc tgttcgccga ccgggtccgg 840

gccagcggct tcgtcaccct gctgttcttc ccggccgcct tcgccggcat gttcttcttc 900

ctcacccagt acttccaggg ggtgtggagc tactccgcgc tgcgtaccgg gttcgccttc 960

atcccggcgg cggtcctggt cctggtcgcc gcgatcctga gcggacagct ggtacccaag 1020

ctcggtccga gcgtcgtggc cgggatcggc gcgctgctca ccacgctcgg gatgatctgg 1080

ctcacccaga tctccgccga cggcggctac gtcacctcgc tgctcggtcc gctggcgatc 1140

gccggtttcg gcgccggcct gatctactcg tcggtgaccg cctcgatcat gtccaacgtg 1200

gcgccggagg tgaccggcgc ggcgtccagc gtgttgcagg cggtccagca gatcggtccg 1260

gcgctgggac tggccgtgct ggtcaccgcg gcgggcacgc ccgccgaccc ggtcgagggg 1320

atgcgtaggg cgttctgggt ggctgccgtc atcgccgcgc tgccggccgt cctcgccctg 1380

ttcaaccgtc ggtcgcgtac cgagtga 1407

<210> 3

<211> 894

<212> DNA

<213> Micromonospora echinospora

<400> 3

gtgccggccg gtgaaccggc accggccacc cggccggagc cggagtcggc catcctgccg 60

gagccggccg cggccgtgcc gtcgccgccg ccggagtcac ccgccgtgca gaaggtgatc 120

gcccggctca ccgccgcggc caagtaccgt gacgtgcacc cggagaccgt cgccgacctg 180

gtccggcggg agggtcgggc caccggggac gccgccgagc tggaacggcg ggtccgggcc 240

cggctgcaca aggtcgccgc cctgcacctg ctcaccgccc ggccggcggc gctgcgcaag 300

gcgctggacc gggccgacct cgacgacccg cagtcccggc gggactggtg ccggcaggtg 360

ctggccgggc acttctccac cgccgaacgc ctgcccgacc tggacacctt ctacccgacc 420

ctgttcgggc tggtgccgcc gccggagacg gtggccgaca tcgcgtgcgc gctgaacccg 480

ttcaccgtgc cctggctgcg ggaggtgagc gacgcccgct acgtcggcta cgacttcaac 540

gcgacgttcg tggagctggg caacgcgttc ctcgcccgga cccatccgga gtgcgagatc 600

cggcacgagg aggtgctcac cgacggccac cgggtgagcg ctgacctggg gttgctgctc 660

aagacgtacc actgcatgga gggacgccgg cccggcgccg ggctggcgct ggtcgaccgg 720

ctggcgtgcc ggcacgtggt ggtgtcgttc cccacccggg ccatgaacgg ccgggcggcg 780

gtcttcgtgc cccgtcacgt ggaggagctg gccgagctgg cccgcgaccg gggatggagc 840

tggtcgcggg ccactctggc gtccgaggac ctggtggcga tccacaagga gtga 894

<210> 4

<211> 1176

<212> DNA

<213> Micromonospora echinospora

<400> 4

gtgggcggta tgcaggtgca gatcctggcg ttgtcccgca gcctggccag ggcgggcgtc 60

gaccagctcg tgctgaccct gggctttccg gggttgccgc cgacgaagca gatcgagccg 120

ggcctgaccg ttcgtatcgc ccgggtgtcc ctgccccaga tccgttccga gatcactgga 180

ttggtcggcc tgggacaggc atggttgatc ggaaccatcc gggagtgcct ccggttgcgt 240

cgcggtgact ggcgccccga tctcgtccac gtgcacgccg acggccagat ctggccactg 300

gtcgcgggtc ggatcgccgc ccggatcctg ggcgtgccgt acgtgctcac cctgcactgc 360

tcccggctct ccgtctacca gccgatgtcg gcggtggacg cgatggcgca ccgcctggtc 420

acccaggcgg aacgacaggc gctgcgctcc gccgcccggg tcagcaccct gaccgcccgc 480

accgccgacg tggtgagcgc cgcgaccggt ctggaccgct ctgccatcgt ggtcaacccg 540

gacgcggtcg acatcacccc ggccacgccc gccgaggcgg cggcgttcgc gcagcggtac 600

ggcctgaccg gccgccggcc gctcatcggc tacatcggcc gggtcgccca cgagaagggc 660

tggccggacc tgctccgcct ggccgaactt ctggacgacc tctccccgac cttcctcgtc 720

gtcggtgacg gcccccagcg ggaacggatg gaacgggaga tcgccgaggc cggtcgcgcg 780

caccagttcg tggtgaccgg tttcctcccg cacgaccagg tgccggccgc tctcgcgctg 840

gtggacaccc tggtcatgcc ctcgatccac gaggaactcg ggggcagcgc gatcgaggcg 900

atcatgacgg gcaccccggt cgccgcctac gcggtcgggg gactgcgcag caccatcggc 960

tcggcctgcc ccgacctgct cagcgagccc ggcgacgtac gcggactcgc cgacgtcgtc 1020

cggcacgtcc tgaccgaccg ggacgcggtg gtcgcgcaga tccacgccgc gcagaccagc 1080

accgccagca ccttcgacgt cgccgccacc cgggaccgga tgatcgactg ctaccgcgcc 1140

gccctcgccg gggccggggc ggcgagcggg aagtga 1176

<210> 5

<211> 1173

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 5

atgcaggtca ccaccatcac gatggatgac gtccagtatc cctaccgatt aggcacggac 60

tgcctcgacg gcatcgtcac gcgcctcggc gaactcggcg ccagccgcta cctgatcgtc 120

agcgacccca gggtcgccga gctgtacggg caggggctgc gcgaacggct cgcggagcag 180

gcgggacccg ccgagctgat cacccatgcc tcgggagaac agaacaaggg cctgcccgca 240

ctgcacgacc tggccgagga ggcgctgcgg cgcggcgccg accggcagag catcgtcgta 300

gcactcggcg gcggtgtcac cgggaacatc gcggggctgc tggccgcgct gctcttccgc 360

ggcatccgtc tggtgcacgt gcccaccacc gtggtggcca tgctggattc ggtgctctcg 420

ctcaagcagg ccgtgaacgc gggagtcggc aagaacctgg tcggcacctt ctaccagccc 480

gtcgaagtgc tcgccgacac cgcgatgctg cgcaccctgc cggtccgcga ggtcaggtcg 540

gggatgtgcg aggtggtgaa gaactcgctc gccatccgcc ccagcatgat cgaccagctg 600

tcggccgggc tgcgccccga cggccgctat cccgacgaca cgatgcactg gatcatctac 660

gagagcctgg ccgccaaggc ccaggtcacg gcgtacgaca agtacgagcg cggcgaggga 720

ctcatcctgg agtacgggca caccgtcggg cacgccgtgg agcactcctc gcagggagcc 780

gtgccgcacg gcgccgccgt cgcgctcggc atgatcgccg ccgcccaggt ctcccaccgg 840

gcgggctggg cctcggccga actcgtcgac ctgcaccggg agctcgtcgc caagaccggg 900

gtcgcgcggc gcatcccgtc cgacataccg ctctccgccg tcaggcaccg cctctccttc 960

gacaacaagc ggggctacct cccggcctcc gccgacacct atccgatggt gctgctcgaa 1020

tcccccggca aggtgctgcg cagcgagggc accgtcctga cggcggcgcc acgggacctg 1080

gtcgacgcgg tggtcgacga actcgcggaa cccccacggc ccgcggccgc gaggaccgac 1140

gacgccgcca ccgtcctcgg cggtgccggg tga 1173

<210> 6

<211> 1284

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 6

atgcccctgc aaagttcacg gcttgcggtc gacaacggaa cccccgtccg cggcaagccc 60

tggccggtgt ggccgcagcc caccgacggc accctcgacg ccctctcccg cgtcctgcgt 120

tccggccgct gggccatcag cggcccctac cggggcgtgg agtcggccga acgccgcttc 180

gcccgccggt tcgccgacta ccaccgcatc gcccactgcg tgcccgcctc cagcggtacg 240

gcgagcctga tgctggccct ggaggcctgt ggcgtcggcg cgggagacga ggtcatcctg 300

cccggcgtca cctgggtcgc ctccgcctcc acggtggtgg gcgtcaacgc ggtgccggtg 360

ttcgccgaca tcgacccgga caccctctgc ctcgacccgg acgccgtcga ggcggccatc 420

accccggcca ccaaggcgat cgtcgtcgtc cacctctacg cggccgtcgc cgacctcacc 480

cgcctcaagg aggtggccga ccggcacggc atcgtgctca tcgaggactg cgcgcaggcc 540

cacggcgccg agttcgaagg ccacaaggtc ggcaccttcg gcgcggtcgg caccttcagc 600

atgcagcaga gcaaggtcct gaccagcggc gagggcggcg ccgccatcac cgccgacccg 660

gtgctcgccc gccggatgga acacctgcgc gcggacggcc gctgctaccg cgatcaggcg 720

ccgccctccg gccacatgga gctcgtcgag acgggcgagc tgatgggcag caaccgctgc 780

atctccgagt tccaggcagc ggtcctgacc gagcagctgg gcgaactcga ccggttcaac 840

gccctgcgac ggcacaacgc ggaactcctc gacgcgctgc tgaccgacgt cggataccgc 900

ccgcagcgca gcacgcccgg caccaccgcc cgcacgtact acacctacgt cgccgagctg 960

cccgacgcgg aactgcccgg cgcggacatc accaaggtca ccgaggcgct gaccgccgaa 1020

ctcggcttcc cggtggcacc ggcctactcg ccgctcaacg ccaaccccct gtacgacccg 1080

gccagtcgca gccggttcgc cctcggaccg cagcacgaga agctcatcga ccccgcccga 1140

ttcgtgctcc cggtgagcgg ccgcctgacg cgtcggctcg tcaccttcca ccacgccgcc 1200

ctgctcggcg acgagtcgga catgagggac atcgcggaag cgttcaccaa ggtgctccag 1260

caccgggccg tcctggccgc ttga 1284

<210> 7

<211> 2064

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 7

gtgaaggcac tcgtgttcca cagccccgag aaggcgacct tcgaacagcg cgacgtcccc 60

actccccggc cgggcgaagc cctcgtccac atcgcgtaca actccatctg cggcagcgac 120

ctctcgctct accgcggtgt ctggcacggc ttcggctacc ccgtcgtgcc cggacacgag 180

tggagcggca ccgtggtcga gatcaacggc gccaacggac acgaccagtc gctggtcggc 240

aagaacgtgg tgggcgatct gacctgcgcg tgcgggaact gcgcggcctg cgggcgcggg 300

accccggtgc tctgcgagaa cctccaggaa ctcggcttca ccaaggacgg cgcctgcgcc 360

gagtacatga ccatcccggt cgacaacctc cgcccgctgc cggacgcgct gtcgctgcgt 420

agcgcctgcc aggtcgaacc gctcgcggtg gcgctcaacg cggtcagcat cgcgggcgtc 480

gctcccggtg accgggtcgc cgtcatgggg gccgggggca tcggcctcat gctgatgcag 540

gtcgcgaggc atctcggcgg tgaggtgacg gtcgtgtccg aaccggtcgc cgaacggtga 600

aggcactcgt gttccacagc cccgagaagg cgaccttcga acagcgcgac gtccccactc 660

cccggccggg cgaagccctc gtccacatcg cgtacaactc catctgcggc agcgacctct 720

cgctctaccg cggtgtctgg cacggcttcg gctaccccgt cgtgcccgga cacgagtgga 780

gcggcaccgt ggtcgagatc aacggcgcca acggacacga ccagtcgctg gtcggcaaga 840

acgtggtggg cgatctgacc tgcgcgtgcg ggaactgcgc ggcctgcggg cgcgggaccc 900

cggtgctctg cgagaacctc caggaactcg gcttcaccaa ggacggcgcc tgcgccgagt 960

acatgaccat cccggtcgac aacctccgcc cgctgccgga cgcgctgtcg ctgcgtagcg 1020

cctgccaggt cgaaccgctc gcggtggcgc tcaacgcggt cagcatcgcg ggcgtcgctc 1080

ccggtgaccg ggtcgccgtc atgggggccg ggggcatcgg cctcatgctg atgcaggtcg 1140

cgaggcatct cggcggtgag gtgacggtcg tgtccgaacc ggtcgccgaa cggcgcgcgg 1200

tcgccgggca gttgggcgcc accgagctgt gctccgccga gccggggcag ctggccgaac 1260

tcgtcgcccg gcgccccgag ctcacgcccg acgtggtcct ggaggcatcc ggctatccgg 1320

ctgcgctcca ggaggccatc gaggtggtca ggccgggcgg ccgcatcggc ctgatcggct 1380

accgggtgga ggagacggga ccgatgtccc cgcagcacat cgcggtcaag gcgctgaccc 1440

tgcgcggctc gctgggcccc ggcggccgct tcgacgacgc cgtcgaactg ctcgcgaagg 1500

gcgacgacat cgcggtcgag ccgctgctca gccacgagtt cggcctcgcc gactacgcca 1560

ccgcgctcga cctggcgctg tcccgcacga acggcaacgt gcgctccttc ttcaacctgc 1620

gcgactaggc gcgcggtcgc cgggcagttg ggcgccaccg agctgtgctc cgccgagccg 1680

gggcagctgg ccgaactcgt cgcccggcgc cccgagctca cgcccgacgt ggtcctggag 1740

gcatccggct atccggctgc gctccaggag gccatcgagg tggtcaggcc gggcggccgc 1800

atcggcctga tcggctaccg ggtggaggag acgggaccga tgtccccgca gcacatcgcg 1860

gtcaaggcgc tgaccctgcg cggctcgctg ggccccggcg gccgcttcga cgacgccgtc 1920

gaactgctcg cgaagggcga cgacatcgcg gtcgagccgc tgctcagcca cgagttcggc 1980

ctcgccgact acgccaccgc gctcgacctg gcgctgtccc gcacgaacgg caacgtgcgc 2040

tccttcttca acctgcgcga ctag 2064

<210> 8

<211> 1164

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 8

atgcaggtac agatcctgcg gatgtcccgc gccctggccg agttgggggt gcgccagcag 60

gtgctcaccg tcggcttccc cggtctgccc agagtgcggc gcgactccga gaacctggtg 120

gtgcggatca ccagggcccc gctgcccagg ctgcgctcca ggatcaccgg cctggtcggc 180

ctcaaccagg cgtggctggc cgccgcgctc accgaatgcg tgaaactgcg gcgccgctgg 240

cccgccgacc tgatccaggt ccatctggac ggccagctct gggcgttgct cgcgggaccg 300

gtcgccgccc gcctggtggg cgtgccgtac acggtcaccg tgcactgctc gcggctggcg 360

gtgtatcagc ccatgtccac cgtcgaccgc atccagcacc ccttggtgac cgccgtcgag 420

cgctgggcgc tgcgccgtgc ggccgggatc accacgctga ccgagcggac cgccacggtg 480

ctcgccgccg aactgggcgc ggcccagagg gtgatcgacg tggtgcccga cgcggtcgac 540

cccgatcggg ccgaggccgc gcccgccgag gtcgagcggc tgaagaagcg tttcggcctg 600

ccgcaggagg gcggtcccgt catcggattc gtcggccgga tcgcccacga gaagggctgg 660

cgccacgccg tccaggcggt ggccgaactc gcggacgcgg gccgggactt caccttcctc 720

gtcgtcggag acggaccgca gcgggccgac atggaggcgg cggtggccga ggccggtctc 780

accgaccggt tcgtcttcac cgggttcctg cccaacgacg agatccccgc cgtgatgacc 840

gccctggacg tcctcctgat gccgtccgtg cacgaggagt tgggcggcag cgccgtcgag 900

gccatgctcg cgggaacgcc ggtggccgcc tacggggtcg gcggcctgtg cgacaccgtg 960

ggcaaggtga ccccgtcctt gctggccgcg cccggccagg tggccgaact cgcgcggacg 1020

gtcaagcggg tactcgacga tcccgcgccg gtcctggccg aattgcgtgc cggacgggag 1080

tggctcgcgg acgagttcgg tgtccaccac gcggccggtc tcgcgttggc ccactatgag 1140

cgggtactcg gcaaagaacg gtag 1164

<210> 9

<211> 750

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 9

gtgagggtcc tcctcgtctc cccccacccc gacgacatcg cgctgtcctt cggcggctgg 60

gtcgcggccc acgcccgcgg gctcgcggcc aagggctggc ggttcgacct gctgaccgtc 120

ttcggcacga ccctgtacgc gccccacagc ccgcgcgccg tcaccaagga ggccatcagc 180

acgctccggg agcgcgagga ccgcgactac gcgcgccgtc acgggctgcg gctgacctct 240

ctccggcagg aggactgctc ctgcctgggc atggacgacg aggaggagct catcgccccc 300

gaggcgaccg atcctcgccg ggccgccgtg cggcagctga tcgcggcggc gctcgccggg 360

gccgacctgg tcgtcgcgcc gctggctgtc ggcggccacg tggatcaccg catcgtccgc 420

accgcggtgc ggcagtcgct cggcgccacc ccctgcctct ggtacgagga cctgccgtac 480

gcgttggaga gccccgtcga ggtgccctcc gaccaccggc cctggctggt cgacatcagg 540

gggcacgagg cggccaagcg cgccgatctc gcgctgtacc gctcgcagat gaccgccgcc 600

gacacctccg aggtcctctc gtaccggccg gacggcgcgt ccgtcccgtg cgagcggctc 660

tggagttcgg cgggcttccc ccaggacctg gccgagcgga tggcactggc cacgctggcc 720

gccgtgacac ccgacaagga gtcgctatga 750

<210> 10

<211> 1170

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 10

atgggcggca tgcacctgct ggtgcgggcc ctggtcgagg agatggcggg ccgcggcgtc 60

ccgcaccggg tcctgacgat gtcaccgccc aaggtgccca aggacatcag gatcgggcag 120

cggatcaagg tgcacgcccg gcggctgccc gtgctgccca tcccctccga cctggagggg 180

tacttcggac tcgtcggcgc ctgggccaag ggcagcctgt tgtgggtgct gcgcaaccgc 240

aagcggctgc gccgggagat cggggcgcgg gtgcacgcgc actgcgacgg ctcgggcgcc 300

gcggccttct acccgtatct gatgtcccgg atcctcggcg tgccgctggt ggtccagatc 360

cactccagcc gctatctgag ccagcacccc accacgctct tcgagcgggt gaccgacccg 420

atcgccaagt gggcggagcg gcacgccgtc cgcaaggccg ccgcggtcct gatgctcacc 480

gaccgggccc gcgacgagat gcggcgcaag gcccagctgc ccgcggagcg cgtgcaccgg 540

ctcgcgtacc tggccagcga ccagttcaag gacgccgaca ccgaggcgag gcgggcggaa 600

ctgcgggagc gctacggcct cgacgaccgc ccgatcgtgc tctacgtggg gcggatcgcc 660

gccgagaagg gcgtggagta ctacatcgag gccgcggccg aactgacccg caggggccgg 720

gactgccagt tcgtcatcgc cggggacggt cccgcccggc cggacctcga aaagctgatc 780

ggcgcccgcg ggctgcgcga ccgggtgacc atcacgggct tcatgtccca cgagttcatc 840

ccatccatga tctccctggg cgaactcgtg gtgctgccgt cccggtacga ggagctgggc 900

atcgtcatcc tggagtgcat gaccatgcgc aggccgctgg tcgcgcacga cgtgaacggc 960

gtcaacaagc tcatcgagga cggcaccacc ggaatcgtcg taccccgtt caggaccccg 1020

gagatggccg acgccgtcga gcggctcctc gacgatccgg agctgcgcga gcggatggcg 1080

gagaacgccg ccccgctgcc cgccgccaag tactcgctct ccgcggcggg cgaccaactg 1140

gcgggcatct accgggagat cgggctgtga 1170

<210> 11

<211> 1080

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 11

atgggcgggg tgcacgccga ggtggtggcg gctcatcccg gcgcccggct cgaagcggtg 60

cacgacctcg accccgccgc cgccagggac ctggccgagc ggttccgcgc cgagcgggcc 120

gagccctcct gggcggacct gctcgccgac cccgcgatcg acctgctcat catcaccacg 180

cccaacgggc tgcaccaccg gcaggcggcc gaggcgctgc gggcgggcaa gcacgtactg 240

gtggagaagc cgctcggtgt cacgccggag caggtggccg agctcgtcga actcgccgga 300

cggcacgacc gggtccttgc ccacggaagc aacttcgtgc acagcccgaa gttcgtccgg 360

gcccgtcaac tggtcgcgga caccgaggcg ttcggacggc cgcacctggt ccgggtcgtc 420

ttccgcaact cgggccccga ggccgcctgg gccgcgtcca aggacctcgc gggcggcgga 480

gccctcctgg acctgggctg tcacgcggtg gagctgtgcc ggtggctgct cgacggcgcc 540

gacgtcgagt cggtcagcgc ccgactgcag cgggtgcggc cgccccacga cgccgaagcg 600

gaccgcgcgt ccggcaccgc gggaaccgcg cgggtcgcgc tggaggacca ggcgctgctg 660

gtcatggagt tcgccgacgg cgcggtcggg cagtgcgacg tctcctgggt cacccagggc 720

ggtgagcagg tcaccgcgga gatcatcggc accaagggca gggtcgaggt cgacctgtgg 780

accggcatgg ggctgcgcgc ctactcggac aagggctatc aggacgtctg ggatcccgag 840

cagggctggg tgcatccgga atgggagtgg atccgggcga gcggctacta ccaccaggac 900

ggcaccgtga tcgaggcggt gggccagggc atccccctca cccacggccc cgcggaagcg 960

ctcgcctcgg cccgtgtcct ggccaccggt taccgcagtc acgcggaggg gcgggtactg 1020

cggctgtccg gcgcgccggt cggccctggc gcgtcgacga cggcggcggg ctcggaatga 1080

1080

<210> 12

<211> 1260

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 12

atgagcaaga agctggcgct gttcggcgga actcccgtac ggaacgagga gttctacgac 60

ggcccgcaca tcgggccgca cgatctcgac cgcctcaaat ccgtcctcga ctcggggaac 120

ttcggcggca tccccttccc caacacccac cacaccgcct tcgccgacct gttcaccggc 180

aagctcggcg ccccgtacgg cctgatggtc tccaacggca ccatcagtct ctccatcgcg 240

ctgcgcgccc tgggcgtgcg tgccggggac gaggtgatca ccaccggcta cacctggatg 300

ggcacggccg cggcgatcgt gcacatcaac gccgtccccg tcctggtgga catcgacccc 360

acgacctggt gcatcgaccc ggcggcggtg gaggcggcga tcaccccgcg caccaaggtg 420

atcgtcccgg tccatctggg caatcagatc gccgacctcg acgcgctgcg ggcgatcgcc 480

gacaagcacg gactcgcgat cctggaggac accgcgcacg ggcacttcgc cgagtggcgg 540

gggcagtgcg tgggcaccca cggggacgcg ggcagcttca gcttcgagag cagcaagatc 600

atgactgccg gtgagggcgg cttcctggtg gccagggacg aggacgtgta ccagcggatg 660

atgtcgctgg ccaactgcgg ccgcaaggag ccgggttacg acggtttcgc gggccgcacc 720

ctgggctgga acgcccgcgc gagcgaactg caggccgcct tcatgatcgg gcaggtcgag 780

cagcacgacg cgctgcacgc caagcgggcg gcgagcgcgg cgaagctcac cgcggggctc 840

gccgagatcg gcggcttcac tcccgtgggg aacgacgacc cgaggatcac ccggcgccag 900

tactacgagg tcatctaccg cttcgacccc gccgcctggg aggggctgca ccgggacgag 960

gtcctctcgg cgatccttgc cgagggcatc gagctggagg gcgacgcctt ctacccgccc 1020

gtacacaaga gcgaactgtt cgcggtggac gccgtccact ggcccatgat cgccgagagg 1080

tacggcgatc ggatcggccc ggacagcgtc gacctgcccg tcgccgaccg cgccgccgcc 1140

gacgagtccg tgtgggtgca ccacgcgctg ctcaccggcg acgacaagga cctcggcgac 1200

atcctcgaag ccgtcgccaa ggtccgcgac aacctgcgag aactgcacga cgcgagctga 1260

1260

<210> 13

<211> 1527

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 13

gtgcgcatca tctccgtaca ggaggcggcc acccgcacct tcgacgtctg cgtggtgggc 60

agcggcgcct ccggtgccat caccgccgcg gtgctcgccg aacggggcct gtccgtgctc 120

atcctcgaac agggcaccgc gatcccgccg ggcaccgacc acgacgacgt cgaggacccc 180

gacacctggg cgtacgcacg cgacggggaa ggctggagca aggagggcta tccctggagc 240

gccatggcgt tcggcggcgg cacggtgttc tacggcggca tctccttccg ctacgaacag 300

cgcgacctcg acccgccgcc cgcgctcctc ggcgacgccg actacgcgca ctggcggctg 360

cggctcgacg aactggagcc gcactacgac tgggtggagg accggctcgg cgtgagcggc 420

ccgtcccacg gccgggtggg cgactacgcc ttcccccact acgcgcgggg ctcgctgccg 480

cacaccccga tgggcggcgc gctggcccgg ggcgccgacg ccctggggct gaccccgctg 540

tccaccccga tggcgatcag cggggccagg gaccggcacg gccccggctg cgccgagctg 600

acgccgtgca ccggcttcac ctgcccggtc aacgccaagg ccgatgtgat cagccgcatc 660

ctggcgcgcg ccgaggggga cgtgtccgtc gccctggaca ccagagcggt gcggttcgtg 720

gcctcggcac cggggcgggc gaaacgtctc gaagtgctcg gcggcagtcc ccgcagccgc 780

cgctcggtcc atgccgaccg cttcgtcctc gcggccaacg ccatccagtc cgccgcgctc 840

ctgctgcgtt cggcggaccg gcgcgagccg gacggcatgg ggaactccag cggtcaggtg 900

ggccgccacc tggccatgaa gaacagcgtc tacgtccgcg gcaggaccca ggagcggatc 960

gtcgcccacc agccgctgcg ccatcgctac tccagcgtct gcgtcctgga ccacctgcgc 1020

ggtgcggagt tccccgggca gctgggcggg atcatctacg aggccaaccc gtgggaggac 1080

cccgaggccg accgtcctgg cgccggttcg ctgctccagc tggagtgcct cctcggcgac 1140

cgcccgcagg cccgcaacat ggtgcggctc gccaggagcc gggaccggga cgggctccag 1200

cgcatcgtca tggactaccg ccagcacccc ttggacggcg aacgcctgga cgtgctccag 1260

gggaaggcga aggatgtact gcacgcggcc ggggccgagc gcaccgagtc cgtcgacagc 1320

gatttcgcga ccggcagcac gcatctgcac ggcacgctgc gcgccggtga cgaccccgcg 1380

acctcggtga ccgaccggac gggccggctg cacgactacg acaacgtgtg gtcggcggac 1440

ggcgcgacgt tcccccttcgc cgggaacttc aatcccaccc tcaccatcca ggccaatgcc 1500

cggcggatcg cggtcggcat ctcctga 1527

<210> 14

<211> 1179

<212> DNA

<213> Streptomyces kanamyceticus

<400> 14

gtgtccacgc accccgtcct ggactggagc cgatccgccg aacacctgcg ccgctcccac 60

ggcgtcacca ccgacccccg ccccgacgag gacggccact acccctgcgt actgacccgg 120

ggcagcggca ctcgcgtgta cgacctggac ggcaacgcct acctcgatct caccggatcc 180

ttcggctcgg tgctcatcgg gcacgcggaa ccggccgtcg tacgggcggt gaccgacgtc 240

ctgagcgaag gcaatctctt ctacaccggc gcgagcccgc gccgactggc cctcgcggag 300

cggctccttg actggttccc ctggtccgag caggccatct tctaccgcac ggggtcctgc 360
gcggtgtccg cggcggcccg gctcgcccag cacgcgaccg gccgcaaccg ggtgctgagt 420
tccggctacc acggctggca cgactggcac ctggaggcgg tgcccgaggc caagcccaag 480
accttcgagt cgtacgccac cgagttccac aacgacctgg cgctctaccg ctcctggctc 540
gaccggcacg gcgaggagat cgcggcggtc gtggtgacgc ccgagccgca ccgcttcgac 600
cacgcctact accaggagct gcgcgaggtg gccaaggagc acggctgcct gttcgtcgtg 660
gacgaggtca agaccggctt ccgggccggg gcgggcgggt tcagcgccct ggccgggatc 720

gagccggacg ccgtgaccgt ctccaagggc atggccaacg gacacagcat ctccgccgtg 780
gtgggccagc gacagctcac ccaggagctg agcgaggcgc acgtctggtc cacctaccag 840
aacgaacagg tggggttcgc cgccgcgttg gcgtccctgg acttcctgga gcggcacgac 900
gtggcggccg tgacgcgccg cacgggtgag gcggtccggc agggcgtgct ccagctcttc 960
gccgaacacg gcctgcccgt cggggcgccg ggctggggac cgatgttcga gctggacttc 1020
gacgccgccg acgagggtct cgccgagcgg ctcgaagcgg cgctgctgcg ccacgggatc 1080
ttctgcgaca cgggcgacga cttcaacatg atgttccata ccgcggagca caccgacgag 1140

ctcctcgagc ggttcgccgc cgcgctcggc gacctctga 1179

<210> 15
<211> 783
<212> DNA
<213> Streptomyces tenebrarius
<400> 15

atggagcaac ggtacgtgct ggtcaccggg gccagtcgcg gtctgggacg gcgcagcgcc 60
gaggagctgg ccggccgagg gtggaccgtc gtcctggcct gccgcgacgt cgcggacgtc 120
gcgtcactgc tcgcgacggt gcgcggccgg ggcgccaggg cccacgcggt tccgatggac 180
gtgaccgacc cggacagcgt cgccgcggcg gtggacgccg tgcgcgaggt cggcgggcgg 240
ctgcacgccc tggtgaacaa cgccggggtg ttccgtcacg ccgaggagcg cttcccgggg 300

ctgacgccgg gggacgcgct cgacatcctg ctcaccaaca cctacggccc gctggtggtg 360
accagggcgt tcctcccccc gttgcgcgcc gcgggcgggg cggcggtggt gaacgtgacc 420
agccgcgacg ccgacgagga caccttcgac ggcgagttca cctgctaccg cgcgtccaag 480
gccgcgctga acgcgatgac caggaacctg gcggtcgcgc tgcgccccga ccggatcgtc 540
gtcaacgcgg tcgatccggg gtggatcccc accgacatgg gcggtccgga ggccccggac 600

agcctggacg cggccgtgac ggcggtggtc gacgccgtcg agctggccgg gagcgaccgg 660

accggggtcc tgctcagggc tggccgcgac cccgcccctc cggtggcggc gccgagcgag 720

cccaaccagc ggcaccagcc ggacctcccg ccgccccccg tcccgcggtg gtcggcgtcg 780

tga 783

<210> 16

<211> 1383

<212> DNA

<213> Streptomyces tenebrarius

<400> 16

gtgaatgagg tgcgacgaat gcggctcggc acggtactgc tggtgagccc gaagacttcg 60

ttcgggcgtg atctgcaacg gacgtacgcg ggcgggctcg gcacggtctg caaggacgag 120

gacttcctgc tgcccccgct cgacctgatg cgcctggccg gcgtcctgcg cgaggacgcc 180

gacgacatcg cgatcgccga cgaggaggtc accggcgtgg tcccctccgt ggagcccggc 240

accacggtga tctgccacgt ctcgctgccc agcctgctgg aggacgccga gcggctggcg 300

accttccgcg cgcagggcgc ccgctgctac gcctacacga gcatccgcag ccccgcccag 360

tggcggaccc tgttcgagcg gggcggctgc gagggcgtcc tgctccccga gtcgatctcc 420

ttcgcccgcg ccgcgctcgc cggcgaccac accgtgccgg gcctggtgac cccggactcg 480

ctgctcgacc cccggcacca ccagccggcc ttcggtgacc tggcggccga gccgctgccg 540

gccagggacc tggtcgacca cacgccgtac atgttccccc cgatcgcgcg caccgggatc 600

accagcatca acggcagctt cggctgcccc tacccgtgcc gcttctactg cccgtacccg 660

ctcagcgagg gccgcaagat ccgcacctac cccgtcgagc ggatcgtggc ggagttccgg 720

cagtgcgccg agctgggcat caccgcggcc gtcttccgcg acccggtgtt ctccttccac 780

cgcgaccgca ccctggagct gtgccaggcc ctcaaggccg ccgacaccgg ggtgccctgg 840

tggtgcgaga cccggatcga ccggctcgac gaggaggtcg tggccgcgct ggtcgacgcc 900

gggtgcgtcg gcgtcgaggt cggcgtggag agcggcgacc ccgacatgca ggcgaccgcc 960

gtccgcaagc gcctgaacct ggacaccgtc cggaagttcc acgcggtggc caggaaggcc 1020

gggctgaagc tggtcttcct gttcctgatc ggcctgccca gggagaccag gatgtcgatc 1080

cggcgcacct tcgacttcat cctggagctg gggctggccg acaccgagtt caacctcagc 1140

gtgatcaccc cctacccggg caccgagctg caccagatcg cggtggacaa ggggtggatc 1200

gacggctcgc agaacgcctt caccagccac aacgccgtga tgcacaccga cgagctgagc 1260

atcggcgacc tggagcgggc cagccggttc gtcgacgagc tgcacgcggt ctgcaaggcg 1320

gggcccgccg agcgggccga gttccaggcc agggtgcacg cctggtcgac cggtgacgcc 1380

tga 1383

<210> 17

<211> 1251

<212> DNA

<213> Streptomyces tenebrarius

<400> 17

gtgcgtgttc tccggctcac cccgttcttc caccacgact gcgtcacctc gtggccggcc 60

gagttcgacg cggtcggcgg gatgcagttg cagatcctgc ggctgtcccg cgagctggcc 120

cggcgcggcg tgcgccagca ggtgctcacg ctgggcttcc ccggcctgcc ccgggtgcgg 180

gtcgactcgc cgaacctggt cgtgcggatc accagggccc cgctgccccg gctgcggtcg 240

gagctgaccg gcctggtcgg gctcaaccag gcgtggctgg tcgccgcgct ggccgcgtgc 300

gtgcggctca ggcgcacctg gcgccccgac ctggtccacg tgcacgccga cggccagctc 360

tgggcgttgc tggcgggacc ggccgcgtcc cgcgtgctcg gcgtgcccta ctgcgtgacg 420

ctgcactgct cgcgcctgtc ggtgtaccag cccatgtcgt ggatcgacca gctccagcac 480

cggctggtcg tcgcggcgga gaagtgggcg ctgcgcgggg cctccggcgt gtcgaccctg 540

accgaccgca ccgcgtcggt ggtcgcctcc gcgctcgggg tgggcgcgga ggacgtcgac 600

gtggtccccg actcggtgga cacgtcgtcc actgtggaca gagcagaggg gcgcgtgctg 660

ctggagaagc tgggcgtgcc gtccgaccac gaggccgtcg gctacgtcgg ccgcgtcgcg 720

cacgagaagg gctggcccga cctcgtgcgc gtggccggcg cgctgtccga ccggaaggcg 780

accttcctgg tcgtcgggga cgggccgcag agcgggcgca tgcgcgacga ggtcgccgcc 840

gccggcctgt ccgaccggtt cctgttcacc gggttcctgc cccatcacga catcccggcg 900

gtcatggccg gtctggacgt gctcgtgatg ccgtcgcggc acgaggagct gggcgggagc 960

gcgctggagg cgatgctggc gggaacgccc gtggccgcct acgccgtggg tgggctgcgg 1020

gacaccgtgg gccacgtgac gccgtcgctg ctcgtgcctc ccggcgacgt cacggcgctc 1080

gcggaggccg ttcgtggtgt gctcgacgac ccgcggcccc accgcgacca ggtggcggcc 1140

ggccgttcct ggctgaccga cctcttcgac ggcggtgccg ccgcgcgtcg ggtgatcgcc 1200

cactatgagc gtgtcctcag tggaaccgcc cgtctccgcc ctcaggaata g 1251

<210> 18

<211> 1263

<212> DNA

<213> Streptomyces tenebrarius

<400> 18

gtgcggcggc ggggcggcgt gctggcgctc accccgttct tcctctaccc cgagtaccag 60

gactgctggt cggcccggtt cgactcgatg ggcgggatgc acctgctggt gcgggcgctc 120

gtggaggaga tggccggcag gggcgtcccg caccgcgtgc tcaccatggc cccgcccggc 180

gtgcccaggg acctggccat cgcccgcaac gtcaccgtcc acgcgcgacg cctcccggtg 240

ttgccgatcc cgtcccagtt ggaggggtac ttcgggctgg tcggggcgtg ggccaagggg 300

agcctgctgt gggtcctgcg gaaccggagg cggctgcggc gggagatctc cctggtgcac 360

gcccactgcg acgggtcggg ctcggcgccg ttctacggct ggctcatcgc gcgggcgctg 420

ggcgtgccgc tggtggcgca gatccactcc agccggttcc tgagccagca ccccacgacg 480

ttgtgggaac gggtcaccga cccggccgcg aagtgggcgg agcggttcac cgtccgcaac 540

gcggcggcgg tgctgatgct caccgagaag gcccgcaccg agatgcggga cgcggcggcg 600

ctggaccccc ggcgcgtcca ccggctggcc tacctggcca gcgaccgctt cgccgagggc 660

gacaccgagg agcggaggac cgagatcagg cggcgcttcg gcctggacac cggccagccc 720

gtcgtcctct acgtcgggcg gatcgcggcc gagaagggcg tggagttctt cgtcgaggcc 780

gccgccgaac tgcggcggcg cgggcgtaac tgccggttcc tcgtcgcggg ggacggcccg 840

acccgccagg agatcgagaa gctggccgag gacaggggcg tcgccgaccg gatcacgatc 900

accggtttcc tgccgcacga gctgatcccc tcggtgatgg cattgtccca gctcgtggtc 960

ctgccctccc ggtacgagga actgggcatc gtgatcctgg agtgcatgag catgcgccgg 1020

ccgatcgtcg cgcacgacgt caacggcgtg cacaagctca tcgagcatgg caggaccggg 1080

ctgttggtgc cgccgttcga cacgcccgcg atggccgacg ccatcgaggc gctgctggac 1140

gacccggagc tgcgggagcg gatcgccgag accgccgccc cgctgccgtc cgcgaagtac 1200

tcgctgacca cggcggcgga ccagctcacg gacatctacc gggagctggg cgtatgcgtc 1260

tga 1263

<210> 19

<211> 471

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 19

atgattagct ggacgaaagc ttttaccaag ccgttaaagg ggagaatttt catgcccaac 60

ttatttgtct acgggactct gcgtgaggga gaaaacaacc acaagtatat gaaagaagcc 120

accctgcttt cgcgaaaggc cagcatagcc ggttccttgg tagataccgg caacggttac 180

cccggcttac tgctggaaaa tcagctggtg gcgggcgagt ggtatgaagt ctcggaagaa 240

acgctgaaac ggatagatga gctggaagag tatttcggtc ccggggatac aagaaactta 300

tttgacagaa tcgaatgcca agtaaacgag agcggcggaa cacatctggg ttggacgtac 360

gtgtacaacc gggacgatta cctggaaaca aggttttccg actggaaaca ataccggctg 420

cagcatgctt ccggaataga ggagaagcaa gatgtgcctc actcgttatg a 471

<210> 20

<211> 909

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 20

atgtgcctca ctcgttatga cgagaaattt ttcgattgca gaaaatcgca gataatcgct 60

tatttggact cacaacaggt ccccgtcatt cctctatttt ataacagtta tcaaagcaca 120

gcggaaattt accgccagat ctttatcgaa aataagagca aatggaagta ttcagagcct 180

tctttttccg acgatgattt actaagaaaa ggaattaggc ctgttcgggc ttcttttccc 240

gacttcagcc aggcttcgga ttgtttaaag gatctgctgg cccggcataa actcgttttc 300

gtatgggggg acgagtattg tctgccttac cggaaggaag ccttccaggc cattcattcc 360

actcattcgc ttgttgtcac gggctatgac ggtgagaaca aggcatacta cgtggaagat 420

tgggacgggc tctacggata tttgccggct gtacatttgg aagcggcttt cgacagtctg 480

tccaggcaga tgaggacatt gttggttctg gaactgaacg acgaggaaat gcgggaaaac 540

aaacaagagg atacagattt gttccggaag tggctgcaag ccttcgagga cgactatatc 600

ttctacgacc gggtgctgct ggatatgcgc gattatgagg aaaaccggct gatctcgatg 660

gatcacggac ttcgtttaat cgccgcatcc cggcatgttt tctccaagtt tcttcattat 720

atagatgacg ccccggagga ggtcggcctc cttatccgca accatcaact cgctaaccat 780

atcgcggcca tcgtcaggcg gtacattatc gccaaacaga ttgattggga cggggcagct 840

tgcaagattc ggcaattaag agagcaagag gatgacttta tgcggaagct aaagagccgt 900

tacggctaa 909

<210> 21

<211> 264

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 21

atgtctttag aaactcagga aaatgttcgg accgctcaaa ttgtatcttg cgtgaatgaa 60

attctgcaga cgaaggaatt cattaccccg gaaaccgatt tgtttctgct tggcttggac 120

tcggtaaccg ccgttaatct gatcgtcagt ttggaaagcc atttcgggat cacgtttaac 180

gacgacgaac tgatcgtgga aaatttttcg acggtgcgga aaattacgga acatgtgacg 240

gtcaaacttg aggaagccct atga 264

<210> 22

<211> 1259

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 22

atgaagttca ctcatccgct ggattattat cgtctgaacg gcaaacaaat cctgtggtac 60

atgaatatcg gcgaagatca ggacagccag gcgtcgaatt actttccctc cgtcaaggac 120

cctcaatccg agaagattgt cgtgcagcag gagcaacagc ttctctttct ggcgaggccg 180

caggacacgg tatttttca tacgatgccg gagcaagcct ttctcgatta ttggaaagag 240

cgccgcctct ccttgccgtc gataatttgt tgcgacaaac tttcgcaagt gcctgatctt 300

gagcgttata cgattatccc gtttattgtt tcggatcaac tgcttgagct gaagcggcgg 360

tatccgcata tggatatcat tgcgccggat ttggcggtct gccgggaaat caatcataag 420

ttcaatacga gaagacttat ggagaggaac gggtttaacg tcacaacggg ttatttctgc 480

agcgatatcg agagcttgga gcatgcctac gaacagctca tttccgccgg cttttccaaa 540

tgcgtgttga aagttccata cggctcgtcg ggtaaaggtc tcaaagtcat cgacaacgaa 600

cggaatttcc gtttttgct gaattatatt caaaaccgcc agacaaacgt cgacctgctc 660

ctggaaggct ggcatcccca ccgtctcagc ctgacgtctc agcttttcat taccgaatat 720

gaagtccatc ttctggccgt caccgagcaa atcatagacc cgaacggtgt ctataaagga 780

acgaatttta cgcctgcctt atcgcaatcg gaagcggccg attatcgtga agaaatctta 840

cgggcaggag aactgatacg gcagatgggg tataggggcg tgcttgggat cgattcgatc 900

ctcgatacga acggagaact gattccggtt atcgagatta acgccaggct cactcaggtc 960

acctatattc ttccgttggt tatcgaacag aaaaagcgtt atgagtttgt cgaaagcagg 1020

gtgctggtgt ttaattccag agcggatctg gattttgaag attacgaaaa cgatctctcg 1080

gaagtgaccc gcgatttacc ggtccgaatc gatctttaca atttctgcaa ggcttcggga 1140

gcctttaaaa acacctataa gctctttgtg ttagtttctg cccacaattc cgaacagctg 1200

ataaaagccc gaagcctgct tgacgagctg aacacgaaaa tgacaacggc tgttcatta 1259

<210> 23

<211> 1287

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 23

atgaacctgg atcaagctga aatcacggcc ttaacgaaaa ggtttgagac tccttttat 60

ttgtatgacg gcgattttat cgaagcgcat taccggcaat taagaagccg gacgaacccg 120

gcgatccagt tttatttgtc cctaaaagca aataacaata ttcatctggc caaattgttc 180

cggcagtggg gacttggcgt cgaggttgca tccgccggag aactcgcttt agcccggcat 240

gccggatttt cagccgaaaa catcattttc tcgggaccgg ggaagaagcg gagcgagctc 300

gagattgccg ttcaaagcgg gatttactgc atcatcgcgg aatccgttga agaactcttt 360

tacatagaag aactggctga aaaagaaaac aaaacggccc gcgtcgcgat ccggatcaat 420

cccgataaaa gcttcggcag cacggccatc aaaatgggcg gagtaccgag acagttcgga 480

atggacgaat ccatgctgga tgccgtaatg gatgccgtcc gctctcttca attcaccaaa 540

tttatcggga tacacgtata taccggaacc cagaatctga ataccgacag cattatcgag 600

tcgatgaaat acaccgtaga tctaggcaga aacatttatg aacgatacgg aatcgtctgt 660

gaatgtatta atcttggcgg agggttcgga gtcccgtatt tttcacacga aaaggcactg 720

gatatcggca aaatcacgcg tacggtcagc gattacgttc aagaggcgag ggatacacgg 780

ttcccgcaaa cgacctttat tatcgaaagc ggaagatact tattggctca agcggccgtg 840

tatgtaaccg aggtgcttta ccggaaagcg tccaaaggag aagtttttgt gatcgtagac 900

gggggaatgc accaccatgc ggcctccact ttccggggaa gaagtatgcg gagcaactac 960

cccatggaat atattcccgt tagggaagac tccggccgtc gcgaactcga aaaagtcacc 1020

attgccggtc ctctctgtac gcccgaagat tgtctaggga aggatgtcca tgtgccggcc 1080

ttgtatccgg gcgacctcgt atgtgtgttg aactcgggag cttacggact gagctttagc 1140

ccggttcatt ttctggggca cccgacgccc attgaaattc tcaaacggaa cggttcatac 1200

gagctgatca gacggaaagg aacggcggat gatatagtcg ccacccagct gcagacagaa 1260

tcaaatctcc tctttgtgga caaatag 1287

<210> 24

<211> 1026

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 24

atgattgcat tggatacgat tcagtattat ggccaaattc caggcgtcaa ccattataac 60

ggcaagaaag aatttatgga aaacgccgtt aaaatcgcgc agctgtccga tgcttacggc 120

atagtcgggt ccctgtcgtt ttttaaccat tccgtattgg acccttgggc cgtaagctcg 180

gttattatgc ggcatacgga acgtcatgtt cctctaattg cgcttcagcc ctacatgtat 240

cctccctata cggctgccaa gttaattcag agcttcactt atttgtacga ccggcggatc 300

gacttgaata tgatcaccgg ggccgttacc ggcgagctcc agcaaaccgg gggctatatc 360

gatcattcgt cccgctacaa gaaacttcac gaatatgttc aggtgctccg tctgctgctt 420

gaatccgatt ctgccgtttc gttcaaaggg gactattatg agctgaataa tttggagttc 480

aagcctttgc tgccggacaa acggcttttc ccgcgcatat ttatgtccgg ttcttccgag 540

gaagggcttg aaacgggttt gaaagcggcg gatttcgtcg ttactcatcc gggaccgctg 600

gaacatttta aacgccattt tagcgaaaag gtgcagggat cggctgttca aagtgccata 660

agaatcgaga ttatcgccag agaatcggcg gagcaagcat ggaagatcgc tcatgcccgt 720

tatcccggca accggcaggg gaagatccag ctccggatga aaacaaattc ggaatcaagc 780

tggcagcgga tgctggccga actggcttta gcgagtgaaa cgtacgatga agtcttctgg 840

atgggcgggt acatgaacgg cggaatttac agtcccgtgt tagtcgggga ttacgagcaa 900

gtggccgctt atttgaatga gtattacaaa ctcggcgtga aagccgtgtt gctgggttcc 960

atgtacagcg aggaggattt tattcatttc agccgggtga aggaaggaat ttcgaatccg 1020

gtctag 1026

<210> 25

<211> 576

<212> DNA

<213> Bacillus circulans

<400> 25

gtggctcatc cgaatttgca gcagtcccgt gtcaacaaac gttgggtgga ggaattgaaa 60

aaacatcccg gcgaggttac cgtgcatgaa ctgtacggcg cgtatccgga gaaggtattg 120

gatatcgggc gggagcaggc tttgctggcg gaatgtgaac gtctcgtgct gcagtttccg 180

cttcaatggt acagcacacc gccgcttctg aagcagtggc tcgatgaagt gttcacaacg 240

gggtggctgt tcggtccggg cggtaaagcc gtagccggaa aagaactcct gatcgccgtt 300

tctatcgggg gagcggcgga gacttacgag gcgggcggcc tgatcgggta cacgatcagt 360

gaattgaccc gccctctgca agctttcgcc aatcagatcg gcatgacgat gcttccgcac 420

tttaaatttc acggtgcgaa tcaggcggcg gacgaactga tcgagagcag cgcggagcga 480

tacgtcaggc atatcttgac tcccgagctt gatccccgga ttgcccggcg gagaatgctt 540

aatgacatga aacagaagat gcaggcctcc ctgtaa 576

<210> 26

<211> 1266

<212> DNA

<213> Streptomyces fradiae

<400> 26

gtgcgtgtgc tgcggctcac ccccttcttc caccacgact gcgtcaccgc ctggcccgcg 60

gagttcgacg ccgtcggggg catgcaggtg cagatcctcc gcctctcgcg ggaactggcc 120

gaccgcggcg tggagcagct cgtcatgacc gtcgggttcc ccggcctgcc cagggagcgc 180

gtcgaccggc ccggcctccg ggtccgggtc acccgggcgc cgctgccccg gctgcgctcc 240

gaactgaccg gcctcgtggg gctcaaccag gcgtggctcg ccgcggtgct gacggcctgt 300

gcgccgctgc gccgcacctg gaggcccgac ctggtgcacg tccacgcgga cggccagctc 360

tgggcgctgc tcgccgggcc gctcgtctcg cgtctggtcg gcgcgccgta ctgcctcacc 420

ctgcactgct cgcggctggc ctcgtacgag ccgatgtccc gcttcgaccg gctccagcac 480

cggctggtgg cggcggccga gcggtacgcg ctgcggcggg cgcgccgggt gtcgacgctg 540

acctcgcgca ccgcggacac ggtggcgcgg ctgctgccgc tcgaccgggc cctggtggac 600

gtgctgcccg actcggtcgg cgacgtgcgg ccggtggcgc ggccggaggc cgaggagtac 660

gtgcggtcgc tcggcgtgcc cgccgggcgg ccggtggtgg gctgggtcgg ccgggtcgcg 720

cacgagaagg ggtggcggga cttcgtcgcg atggcggagc ggtgggacgc cgggtcgggc 780

gccccggggg cggtgttcgc cgtggtgggc gacgggccgc agcgggagcg gatgcgggag 840

gcggtcgagg cggcggggct cgcggaccgg ttcgtgttca ccggtttcct gccccatgac 900

gccgtgccgt ccgtgatgac ggcgctggac gtcctcgtca tgccgtccgc ccacgaggag 960

ctgggcggca gcgcgctgga ggccatggtg tgcggcacgc ccgtcgcggg ctacgcggtc 1020

ggcgggctgc gcgacacggt cggctcggtc acgccctccc tgctcgtccc gcggggcgac 1080

gtggcggcgc tgacccgcgc cgccggcgac gcggtcacgg acgccgaacg gcaccgcaag 1140

acggtcgcgg cggccgttcc cgacctgctg ggccggtacg gcgcggacac cgtcgagcgg 1200

gcgctggagc actaccggct ggccgtcggc cgggcgtccg gaggggggtgc cgggtgggcg 1260

ccgtga 1266

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for kanA-kanB

<400> 27

cccggatccg aatccccctt cgtgacg 27

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for kanA-kanB

<400> 28

gtgactagtg ttcgtcgacc accgcgtcga 30

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for kanK

<400> 29

gcttctagaa ctccggagca cccgtgca 28

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for kanK

<400> 30

gtgaagcttc gtggtgccgg acaggcccta 30

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for kanC

<400> 31

gggacctcta gaacgcggtg gtcgacgaac 30

<210> 32

<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer for kanC
<400> 32
tcttccaagc ttactagttg tcggcggtcg ccccga 36

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer for kanD
<400> 33
gaccgctcta gacacctccg aggtcctctc 30

<210> 34
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer for kanD

<400> 34
tgaaaagctt actagtgggt gacgagacgc cggg 34

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer for kanE
<400> 35
acatctagag gctccggaag accgccgacg cca 33

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer for kanE

<400> 36

tcgaagctta ctagtgagac gaggaggacc ctt 33

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for kanF

<400> 37

cgaggctcta gagccggacc agaacccatt 30

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for kanF

<400> 38

tagaacaagc ttactagtac gtcgggtgtc gtacgg 36

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for kanI-kacL

<400> 39

gatcgctcta gacacctggt tctggttccc 30

<210> 40

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for kanI-kacL

<400> 40

aggggaaagc ttactagtgt caggagatgc cgaccg 36

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for kacA

<400> 41

ggcgtctaga taccgggaga tcgggctgtg 30

<

210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for kacA

<400> 42

acaaagctta ctagttgctc atagcgactc cttgt 35

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for nemD

<400> 43

cactctagac atcgccgtcc tctccccgt 29

<210> 44

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for nemD

<400> 44

tcaaagctta ctagtggcgc agatacggcg cac 33

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for tobM1

<400> 45

ccgtctagac cgccctttcc ccgcaac 27

<210> 46

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for tobM1

<400> 46

gataagctta ctagtcacac cgtcctattc ctg 33

<210

> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for tobM2

<400> 47

cgatctagac cgggaggcga ccgtgt 26

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for tobM2

<400> 48

gcgaagctta ctagttcaga cgcatacgcc cag 33

<210> 49

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for gtmG

<400> 49

tgtcctctag agctgcccgg tcacttcccg c 31

<210> 50

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for gtmG

<400> 50

aaaaagctta ctagtcactc ttccggaaga atc 33

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for btrG-btrH

<400> 51

ttctctagat ctaggaaacc gcatgcc 27

<

210> 52

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for btrG-btrH

<400> 52

ggctacgtaa aactagtggt ttatccgctt ttgct 35

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for btrI-btrJ

<400> 53

acctctagac ggaaaccgcc atcccat 27

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for btrI-btrJ

<400> 54

tcctacgtaa aactagtgag ttaatgaaca gccgt 35

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for btrK-btrO

<400> 55

agctctagaa agcccgaagc ctgcttg 27

<210> 56

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for btrK-btrO

<400> 56

gtttacgtaa aactagttcc ctagaccgga ttcga 35

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for btrV

<400> 57

tattctagaa ttgacttata actcaat 27

<210> 58

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for btrV

<400> 58

cattacgtaa aactagtatc cgaacgtcac ataag 35

<210> 59

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for aprD3

<400> 59

ggttctagat gatggacgtg gccgcga 27

<210> 60

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for aprD3

<400> 60

cttaagctta ctagtgggcc gtcggtcgtc ctg 33

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for aprD4

<400> 61

ggctctagaa accccaccct caccatccag 30

<210

> 62

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for aprD4

<400> 62

cgcaagctta ctagtatcgt gtggtctccg gct 33