



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109554
(43) 공개일자 2024년07월11일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 9/02</i> (2006.01) <i>C12N 15/70</i> (2006.01)
 <i>C12N 9/10</i> (2006.01) <i>C12P 17/02</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 9/0004</i> (2013.01)
 <i>C12N 15/70</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0010720
 (22) 출원일자 2023년01월27일
 심사청구일자 2023년01월27일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020230000741 2023년01월03일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 박제원
 경기도 고양시 일산동구 위시터1로 7, 504동 904호(식사동, 위시터블루밍5단지)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인이룸리온</p> |
|---|---|

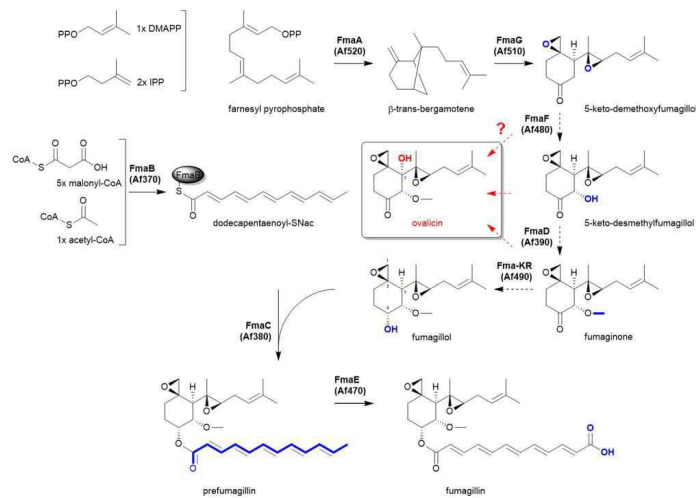
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **오발리신 및 이의 유도체를 생합성하기 위한 재조합 균주**

(57) 요약

본 발명은 세스퀴테르펜(sesquiterpene)계열의 미생물 유래 아차대사 천연물인 오발리신(ovalicin)을 생산할 수 있는 이종숙주(heterologous host) 재조합 균주 및 상기 균주를 통한 오발리신 및 이의 유도체들의 제조 방법에 관한 것이다. 상기 오발리신 및 이의 유도체들은 제약 및 기능성 바이오 소재 산업에 활용도 및 영향도가 높다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/1022 (2013.01)

C12P 17/02 (2013.01)

C12Y 202/01007 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서,

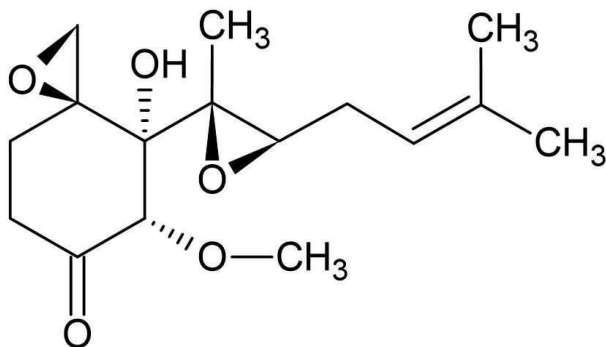
상기 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자는 오발리신(ovalicin) 생합성에 사용되는 푸마기논 수산화효소(fumaginone hydroxylase)를 코딩하는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 오발리신은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자:

[화학식 1]

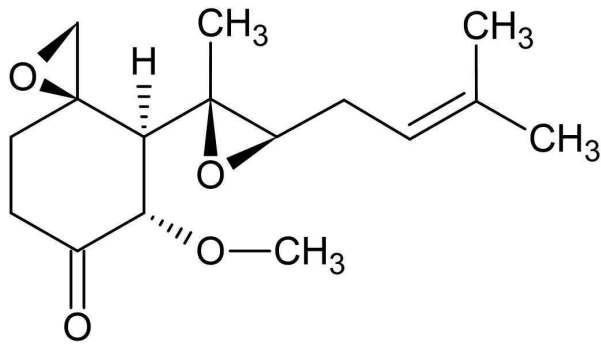


청구항 4

제2항에 있어서,

상기 푸마기논(fumaginone 또는 5-keto-fumagillol)은 하기 화학식 2로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자:

[화학식 2]



청구항 5

Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자.

청구항 6

제5항에 있어서,

1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXS)를 추가로 포함하는 인공 합성 유전자.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 Af410_opt는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 Af460_opt는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 tFmaA_opt는 서열번호 3로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 tFmaG_opt는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 11

제5항에 있어서,

상기 FmaF_opt는 서열번호 5로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 12

제5항에 있어서,

상기 FmaD_opt는 서열번호 6로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 13

제1항 및/또는 제5항에 있어서,

상기 EXU98501_opt는 서열번호 7로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 14

제6항에 있어서,

상기 DXS는 서열번호 8로 표시되는 것을 특징으로 하는, 인공 합성 유전자.

청구항 15

제5항의 인공 합성 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드.

청구항 16

제15항의 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 17

제16항의 재조합 발현 벡터가 도입되어 있는 형질전환체.

청구항 18

다음과 같은 단계를 포함하는 오발리신 및/또는 이의 유도체의 제조 방법:

- (a) 제17항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 형질전환체 및/또는 이의 배양액으로부터 오발리신 및/또는 이의 유도체 화합물을 제조하는 단계.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 오발리신 유도체는 5-ketodemethoxyfumagillol, 5-keto-desmethylyfumagillol 및 fumaginone로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오발리신(ovalicin) 및 이의 유도체를 생합성하기 위한 제조합 균주에 관한 것으로, 구체적으로 세스퀴테르펜(sesquiterpene) 계열의 미생물 유래 이차대사 천연물인 오발리신을 생산할 수 있는 제조합 균주 및 상기 균주를 통한 오발리신 및 이의 유도체들의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미생물 유래 이차 대사산물은 저분자 천연물 의약품 소재로서 다양한 약리 활성을 제시하고 있다. 저분자 천연물 화합물인 오발리신(ovalicin) 또한 곰팡이균 유래 이차 대사산물로서 1965년 진균의 일종인 *Pseudeurotium ovalis*에서 발견된 세계 최초의 비스테로이드계 면역억제제(immunosuppressant) 활성 천연물로 알려져 있다. 화학구조적으로 세스퀴테르펜(sesquiterpene)계열인 오발리신은 그 생합성 전구체로 β -bergamotene를 전구체로한 생합성 경로를 1987년 미국 브라운대학의 데이빗 케인 연구팀에서 첫 보고한 이래(비 특허문헌 1), 현재까지도 오발리신의 완전한 생합성 경로는 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 한편, 같은 세스퀴테르펜 계열 곰팡이균 유래 천연물로서 누룩곰팡이의 일종인 아스페르길루스 푸마기투스에서 좀 더 이른 시기인 1949년에 최초 분리된 푸마길린(fumagillin)이 있으며, β -bergamotene를 전구체로하여 푸마길린을 생합성하는데 관여할 것으로 예측되는 생합성 유전자 클러스터(biosynthetic gene cluster; BGC)가 2013년 처음으로 보고된 바 있다(비 특허문헌 2).

[0004] 오발리신은 중국 전통 한의약품 일종인 동충하초의 표지 물질로도 알려져 있어, 대략 kg 당 25 mg 수준으로 발효 생산되는 것으로 보고되어 있다. 특히 오발리신과 푸마길린은 면역억제 활성 보고 이후에 암세포의 혈관신생(angiogenesis)과 관련된 타입 2 메티오닌 아미노펩티다제(Methionine aminopeptidase type II; MetAP2) 저해 활성이 보고되면서 암 혈관신생억제제(anti-angiogenic cancer therapy)로서 꾸준히 연구·개발된 바 있다(비 특허문헌 3). 즉, 다양한 전임상 동물 실험으로 뚜렷한 항종양 활성이 보고된 이래로 1992년부터 혈관신생억제 항암 신약으로서 여러 적응증들에 대한 임상시험에 수차례 진행되었으나, 임상 시험 중 중추신경계 독성 및 상대적으로 빠른 신장 배출이라는 약물동력학적 단점으로 2022년 현재까지는 미국 FDA 승인에 실패하고 있다(비 특허문헌 4). 나아가, 관련 유도체로서 TNP-470, PPI-2458, CKD-732 및 SDX-7320 등이 추가적으로 연구·개발되어서 임상 시험 3상까지도 진입한 바가 있었으나 미국 FDA의 최종 승인을 받는데 실패하였다. 하지만, 앞서 기술된 MetAP2 저해관련 질환으로 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy) 그리고 항비만(anti-obesity) 관련 전임상 시도는 꾸준히 이어지고 있는 편이다(비 특허문헌 5). 최근에는, 반려동물의 기생충 원인 항편모충증 및 원생동물 기생을 통해 나타나는 미포자충병(intestinal microsporidiosis) 치료용 항생제로서의 임상 사용 또한 보고중이며(비 특허문헌 6), 그 밖에, 경구/주사투여를 통한 체내 투여와는 상이하게 체외 피부도말을 통한 항아토피(anti-atopic) 및 항비듬(anti-dandruff) 활성 또한 보고되어서 최근 외용 일반 의약품 및 기능성 화장품 원료소재로서 시장의 요구 및 그 활용 가능성이 높아지고 있다(비 특허문헌 4와 7).

[0005] 한편, 세스퀴테르펜 계열 화합물에 대한 관련 선행특허를 살펴본 바, 2005년 중근당은 푸마길롤(fumagillol) 포함 구조유사 유도체들을 유기합성 하여, 식이 조절 유전자 결핍형 마우스를 실험동물로 한 전임상 시험에서 지방조직 내 혈관내피세포의 증식억제 효과 및 자살유도 증가 효과를 제공하는 부작용이 거의 없으면서 그 비만 치료효과가 일부 확인된 비만치료용 조성물을 발명 특허로 보고한 바 있다(특허 문헌 1). 2018년에는 헬스케어 화학 원료품 제조사인 영국의 크로다 인터내셔널(Croda International PLC)은 푸마길린과 오발리신을 포함하는 동시에 추가적으로 spiroepoxide 구조 변형 유도체들을 발효 생산하는 *Peyronellaea* 곰팡이균을 고사된 나무껍질에서 신규 분리하고, 그 배양추출물의 *Malassezia* 비듬균에 대한 인비트로(in vitro) 항비듬 활성을 기재한 발명 특허를 보고하였다(특허 문헌 2). 최근 2022년 중국 쑤저우대학 연구팀은 푸마길린 유도체 중 하나인 TNP-470의 작용 타겟으로 T-type 칼슘이온채널을 기재하여 그 적응증으로 삼차신경 손상에 기인한 통증성 질환인 3차신경통(trigeminal neuralgia), 좌골신경통(sciatica) 그리고 편두통(migraine)을 포함하는 만성통증 예방 및 그 치료 의약조성물을 발명 특허로 보고하였다(특허 문헌 3).

[0006] 전술한 바와 같이, 현재까지 오발리신의 생합성 경로는 아직까지도 밝혀지지 않고 있으나, 오발리신과 구조적 유사도가 가장 높은 세스퀴테르펜 계열 푸마길린의 중간 대사체인 푸마기논(fumaginone 혹은 5-keto-fumagillol) 생합성에 관여하는 일부 생합성 유전자들의 기능 확인 및 관련 BGC-마이닝을 통한 인실리코(in

silico) 예측을 통하여 오발리신의 생합성 경로를 예측 가능하다(도 1 참조). 즉, 테르펜과 테르페노이드 생합성의 주요 전구체인 FPP(farnesyl pyrophosphate)에 테르펜 사이클라제(terpene cyclase; FmaA 혹은 Af520) 효소가 촉매 작용하여 β -bergamotene이 생합성 되는 것을 실험적으로 확인하였고, 이후 시트크롬 P450 모노옥시게나제(cytochrome P450 monooxygenase; FmaG 혹은 Af510) 산화효소 반응으로 spiroepoxide 대사체가 생합성됨을 확인한 바 있다(비 특허문헌 8). 이후, 순차적으로 비헬철-의존성 디옥시게나제(none-heme iron-dependent dioxygenase; FmaF 혹은 Af480) 반응을 통한 탄소 6번 위치에 수산화반응 그리고 메틸전이효소(*O*-methyltransferase; FmaD 혹은 Af390) 반응을 통한 *O*-메틸화 세스퀴테르펜 대사체인 푸마기논으로까지 생합성 되는 것으로 예측 가능하였다(도 1 참조). 즉, 오발리신 구조 유사체인 푸마기논의 생합성에 필수적인 최소한의 유전자 세트(minimal biosynthetic set)는 *fmaA-G-F-D*로 예측되며, 오발리신의 화학적 구조는 푸마기논과 비교하여 탄소 7번 위치에 수산기가 추가 부가된 세스퀴테르펜 구조로 차이가 나는 바, 오발리신 생합성을 위해서는 상기 4종 유전자 세트에 추가적인 생합성 유전자 바이오파트의 발현이 필요하다. 현재까지 푸마기논의 생합성에 관여하는 상기 유전자들 그리고 푸마기논 생합성에 관여하는 유전자들의 개별 발현 및 야생균주 내 관련 유전자 손실화등의 인비트로 및 인비보(in vivo) 실험들을 통하여 개별 바이오촉매의 기능 확인은 이루어진 바 있다. 자세히 보자면, 2013년 미국 UCLA 화학공학과 Yi Tang 교수팀은 푸마기논 생산성 아스페르길루스 푸미가투스의 유전체 마이닝을 통하여 푸마기논 BCG를 밝히는데 성공하였으며, 생합성 후반부에 작용하는 바이오촉매 중 폴리케티드 신타제(polyketide synthase; FmaB)와 아실전이효소(acyltransferase; FmaC)의 기능을 인비트로 반응을 통하여 확인하였으며(비 특허문헌 2), 또한 푸마기논 생합성 전구체인 β -bergamotene 생합성에 관여하는 테르펜 사이클라제(terpene cyclase; FmaA)의 생체 내 기능을 생산 균주 유전자 결실화를 통한 인비보 돌연변이합성(mutasynthesis)으로 밝힌 바 있다. 같은 해, 미국 Wisconsin Madison대학 미생물학과 Nancy Keller 교수팀은 진균 이차대사산물 BGC의 global 혹은 pathway-specific regulator인 LaeA (혹은 FapR)의 BGC-마이닝을 통하여 푸마기논 생합성 관련 슈퍼클러스터(supercluster)의 생합성 조절기작을 보고한 바 있다(비 특허문헌 9). 상기 기술 내용과 같이, 세스퀴테르펜계열 화합물 관련 생합성 유전자들의 일부 기능을 밝혔음에도 불구하고, 푸마기논 생합성에 필수적일 것으로 예측되고 있는 FmaF 및 FmaD의 인비보 혹은 인비트로 촉매반응을 확인하지 못하고 있었다(도 1 참조). 그러던 와중, 올해 2022년 중국과학원 소속 상해기술대학의 chengshu Wang 연구팀은 곤충병원성 곰팡이균의 일종인 *Metarhizium robertsii*의 유전체 마이닝을 통하여 탄소 12번 위치에 수산기가 추가부가된 오발리신 구조 유도체인 12-hydroxy-ovalicin의 생합성 및 그 관련 BGC를 보고하였고(비 특허문헌 10), 역시 2022년 올해 프랑스 국립과학연구소와 파리 사클레 대학 공동 연구팀은 프랑스 기이나 흰개미에 공생하는 곰팡이균인 *Pseudallescheria boydii*로부터 오발리신 탄소 1번 위치에 지방산들이 추가 부가된 오발리신 지방산 유도체(ovalicin fatty acids)들을 분리하는 한편 그 생합성 관련 BGC를 통한 생합성 경로 또한 예측하기도 하였다(비 특허문헌 11). 전술한 두 가지 문헌들에서 제공되는 BGC들을 대상으로한 인실리코 분석을 통하여 기존 푸마기논 기반 생합성 경로에서는 확인할 수가 없었던 오발리신 생합성 관련 유전자 후보군들의 선발이 가능하게 되었고, 이는 20세기 중반 자연계에서 분리된 이후 반세기 이상의 기간 동안 그 생합성 경로가 밝혀지지 못한 세스퀴테르펜 계열 천연물 화합물 오발리신 생합성 퍼즐(ovalicin biosynthetic puzzle) 내 밝혀지지 않았던 생합성 유전자파트(missing bioparts)를 찾는데 중요한 단서라 할 것이다.

[0007]

미생물 유래 세스퀴테르펜 계열 오발리신의 합성은 크게 화학적 유기합성, 그리고 해당 곰팡이균이 기생하는 동충하초의 발효와 같이 크게 두 가지로 대별 가능하지만, 해당 오발리신 화합물의 이종 숙주 내 발현 즉 합성 생물학 혹은 대사 공학적 전략을 통한 미생물 세포공장의 연구 개발 및 발명은 지금까지 보고된 바가 전무하다. 이에 본 발명자는 인실리코 BGC-마이닝을 통한 오발리신 생합성에 필수적인 유전자 후보군을 탐색하고 이종 숙주 내 단백질 발현을 통한 바이오 촉매로서 기능 확인한 후 오발리신 생합성 관련 인공 합성 유전자 조합들을 이종 숙주에 도입한 재조합 균주 제조하고 해당 균주들의 배양을 통한 오발리신 및 그 생합성 관련 유도체들을 제조하는 방법들을 개발함으로써 제약 및 기능성 바이오 소재 산업에 활용도 및 영향도가 높은 세스퀴테르펜 계열 화합물들의 재조합 균주를 활용한 산업적 발효 생산을 도모하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009]

(특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0552043호

(특허문헌 0002) 미국 등록특허공보 제10888548호

(특허문헌 0003) 중국 공개특허공보 제114617870호

비특허문헌

[0010]

(비특허문헌 0001) D.E. Cane, D.B. Mcilwaine, The biosynthesis of ovalicin from beta-trans-bergamotene, Tetrahedron Lett 28(52) (1987) 6545-6548.

(비특허문헌 0002) H.C. Lin, Y.H. Chooi, S. Dhingra, W. Xu, A.M. Calvo, Y. Tang, The fumagillin biosynthetic gene cluster in Aspergillus fumigatus encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of beta-trans-bergamotene, J Am Chem Soc 135(12) (2013) 4616-4619.

(비특허문헌 0003) X. Guruceaga, U. Perez-Cuesta, A.A.D. de Cerio, O. Gonzalez, R.M. Alonso, F.L. Hernando, A. Ramirez-Garcia, A. Rementeria, Fumagillin, a mycotoxin of Aspergillus fumigatus: Biosynthesis, biological activities, detection, and applications, Toxins 12(1) (2020) 7.

(비특허문헌 0004) G.F. Bills, J.B. Gloer, Z.Q. An, Coprophilous fungi: antibiotic discovery and functions in an underexplored arena of microbial defensive mutualism, Curr Opin Microbiol 16(5) (2013) 549-565.

(비특허문헌 0005) Y-H. Chang, Common therapeutic target for both cancer and obesity, World J Biol Chem 8(2) (2017) 102-107.

(비특허문헌 0006) J. Padia, L. Kulakova, A. Galkin, O. Herzberg, Discovery and preclinical development of anti-giardiasis fumagillol derivatives, Antimicrob Agents Chemother 64(10) (2020) e00582.

(비특허문헌 0007) S.H. Hwang, Y. Yang, Y. Jeong, Y. Kim, Ovalicin attenuates atopic dermatitis symptoms by inhibiting IL-31 signaling and intracellular calcium influx, J Biomedical Res 35(6) (2021) 448-458.

(비특허문헌 0008) H.C. Lin, Y. Tsunematsu, S. Dhingra, W. Xu, M. Fukutomi, Y.H. Chooi, D.E. Cane, A.M. Calvo, K. Watanabe, Y. Tang, Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway, J Am Chem Soc 136(11) (2014) 4426-4436.

(비특허문헌 0009) P. Wiemann, C.J. Guo, J.M. Palmer, R. Sekonyela, C.C.C. Wang, N.P. Keller, Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster, Proc Natl Acad Sci USA 110(42) (2013) 17065-17070.

(비특허문헌 0010) Y.L. Sun, B. Chen, X.L. Li, Y. Yin, C.S. Wang, Orchestrated biosynthesis of the secondary metabolite cocktails enables the producing fungus to combat diverse bacteria, mBio (2022) doi/10.1128/mbio.01800-22.

(비특허문헌 0011) J. Sorres, T. Hebra, N. Elie, C. Leman-Loubiere, T. Grayfer, P. Grellier, D. Touboul, D. Stien, V. Eparvier, Antiparasitic ovalicin derivatives from Pseudallescheria boydii, a mutualistic fungus of French guiana termites, Molecules 27(4) (2022) 1182.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011]

본 발명의 목적은 오발리신 및 이의 유도체를 생합성하기 위한 제조합 균주를 제공하는 것이다.

[0012]

본 발명의 다른 목적은 상기 제조합 균주를 통한 오발리신 및/또는 이의 유도체들의 제조방법을 제공하는 것이다.

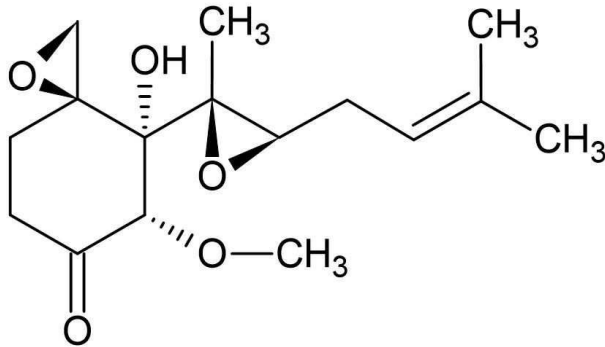
과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자를 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자는 오발리신(ovalicin) 생합성에 필수적인 푸마기논 수산화효소(fumaginone hydroxylase)를 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 오발리신은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

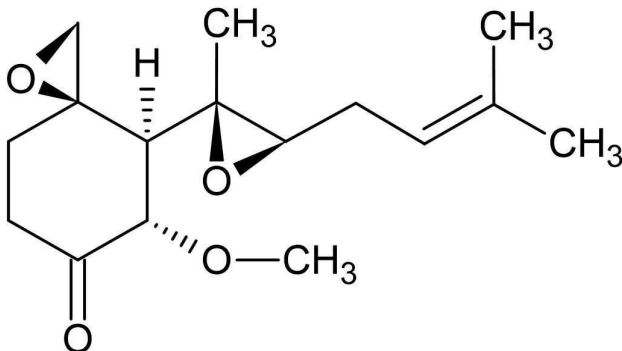
[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 푸마기논(fumaginone 또는 5-keto-fumagillol)은 하기 화학식 2로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0020] [화학식 2]



[0021]

[0022] 또한, 본 발명은 Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자를 제공한다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 인공 합성 유전자는 이중 숙주 내 오발리신의 생합성을 가능하게 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt, EXU98501_opt 및 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXS)를 포함하는 인공 합성 유전자를 제공한다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 인공 합성 유전자는 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXS)를 포함하여 이중 숙주 내 오발리신의 생합성을 더욱 증진시킬 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 Af410_opt는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 Af460_opt는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 tFmaA_opt는 서열번호 3로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 tFmaG_opt는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 FmaF_opt는 서열번호 5로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 FmaD_opt는 서열번호 6로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 EXU98501_opt는 서열번호 7로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 DXS는 서열번호 8로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 인공 합성 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터가 도입되어 있는 형질전환체를 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체 및/또는 이의 배양액으로부터 오발리신 및/또는 이의 유도체 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 오발리신 및/또는 이의 유도체의 제조 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 오발리신 유도체는 5-ketodemethoxyfumagillol, 5-keto-desmethylfumagillol 및 fumaginone으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명의 세스퀴테르펜(sesquiterpene)계열의 미생물 유래 아차대사 천연물인 오발리신(ovalicin)을 생산할 수 있는 이종숙주(heterologous host) 재조합 균주를 통해 오발리신 및 이의 유도체들을 효과적으로 생합성할 수 있으며, 상기 오발리신 및 이의 유도체들은 제약 및 기능성 바이오 소재 산업에 활용도 및 영향도가 높다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 세스퀴테르펜 계열 오발리신과 푸마길린 화합물 및 연관된 생합성 중간 대사체들의 생합성 경로를 도식화한 것이다.
- 도 2는 푸마길린 생합성 중간 대사체인 푸마기논을 기질로 하여 이종 숙주 OVA1에 발현된 후보 유전자산물과의 인비트로(in vitro) 바이오촉매 반응 결과를 (A) 고성능 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기(High Performance Liquid Chromatography-ESI-tandem MS)로 분석한 크로마토그램과 (B) OVA1 균주 무세포추출물의 바이오 촉매 반응 산물 스펙트럼이다.
- 도 3은 오발리신과 구조적 유도체들의 생합성에 필수적이라 예측되어 합성한 인공 유전자들의 조합을 발현한 대장균 재조합 OVA3 균주의 배양 추출물부터 오발리신 및 관련 유도체들이 생합성 되는 것을 확인한 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기(HPLC-ESI-tandem MS) 크로마토그램이다. 한편, 세스퀴테르펜 계열 화합물 내성관련 유전자 바이오파트 조합들만 도입한 재조합 OVA2 균주의 배양 추출물의 크로마토그램은 대조구로 제시되었다.
- 도 4는 오발리신 생합성이 확인된 대장균 재조합 균주에 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXS; 서열번호 8)를 추가해서 발현한 대장균 재조합 OVA4 균주의 배양 발효액으로부터 오발리신 생산성이 향상되었음을 확인한 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기(HPLC-ESI-tandem MS) 크로마토그램이다. 한편, 오발리신 생합성 재조합 OVA3 균주의 배양 추출물의 크로마토그램은 비교구로 제시되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0045] 다른 식으로 정의하지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사

용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0047] 현재까지 미생물 유래 세스퀴테르펜 계열 오발리신의 화합물의 이중 숙주 내 발현 즉, 합성 생물학 혹은 대사 공학적 전략을 통한 미생물 세포공장의 연구·개발 및 발명은 보고된 바가 없다.
- [0048] 이에, 본 발명자들은 세스퀴테르펜 생합성에 관여하는 곰팡이균 유래 유전자들의 이중숙주 내 원활한 발현을 위하여 코돈 최적화(codon-optimization)를 거친 인공 합성 유전자 세트를 가진 재조합 균주를 제조하고, 상기 재조합 균주의 배양과정을 거쳐 오발리신 뿐만 아니라 그 유도체들을 제조하는 방법을 개발하였다. 또한, 상기 재조합 균주의 배양 발효 과정을 거쳐 제조되는 목적 화합물들의 생산성을 증대하기 위하여 이중 숙주에 대장균 유래 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXS)를 코딩하는 유전자를 추가 형질전환 시킨 재조합 균주를 제조하였다.
- [0049] 따라서, 본 발명은 일 관점에 있어서, EXU98501_opt 인공 합성 유전자에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 EXU98501_opt 인공 합성 유전자는 오발리신 생합성에 필수적인 푸마기논 수산화효소(fumaginone hydroxylase)를 코딩하는 것을 특징으로 한다.
- [0051] 본 발명은 다른 관점에 있어서, Af410_opt 및 Af460_opt를 포함하는 인공 합성 유전자에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 Af410_opt와 Af460_opt 인공 합성 유전자 산물은 오발리신과 푸마길린을 포함하는 세스퀴테르펜 계열 화합물에 대한 내성을 대장균 이중숙주 내 부여하는 기능을 나타내며, 오발리신의 재조합 균주 내 이중 생산에 있어서 필수적인 포함되어야 할 생합성 유전자 세트인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 또 다른 관점에 있어서, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자는 오발리신의 이중 숙주 내 생합성에 관여하는 최소 유전자 세트인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0055] 본 발명은 또 다른 관점에 있어서, Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 인공 합성 유전자에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명은 또 다른 관점에서, Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt, EXU98501_opt 및 1-데옥시자일룰로스-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXS)를 포함하는 인공 합성 유전자에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 오발리신의 이중 숙주 내 생합성에 관여하는 최소 유전자 세트에 오발리신 전구체인 DXP의 생합성에 직접적으로 관여하는 DXS 인공 합성 유전자 파트를 추가적으로 도입할 경우 세스퀴테르펜 계열 목적 화합물인 오발리신의 이중숙주 내 생산성을 향상할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt, EXU98501_opt 및 DXS 인공 합성 유전자는 각각 서열번호 1 내지 서열번호 8로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 유전자들은 서열번호 1 내지 서열번호 8로 표시되는 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열 또는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %" 는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 바람직하게는 상기 Af410_opt(서열번호 1), Af460_opt(서열번호 2), tFmaA_opt(서열번호 3), tFmaG_opt(서열번호 4), FmaF_opt(서열번호 5), FmaD_opt(서열번호 6) 인공 합성 유전자들은 곰팡이균 일종인 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 유래 유전체 내 푸마길린 생합성 유전자 클러스터에서 확보된 상보적 디옥시리보핵산 서열을 기반으로 코돈 최적화되었고, 코돈 최적화 전 GenBank 등록번호는 각각 XM_742070(Af410), XM_742066(Af460), KC407776(FmaA), XM_742061(FmaG), XM_742064(FmaF), XM_742072(FmaD) 이다. 특히, FmaA와 FmaG의 경우엔 발현된 유전자산물들이 각각 아미노말단 신호 펩티드(N-terminal signal peptide)를 포함하고 있는 막결합 및 CYP계열 단백질인 바, 아미노말단 시그널

펩티드 부분이 제거(truncated)된 코돈 최적화 인공 유전자 tFmA와 tFmAG를 대장균 포함 박테리아 속 재조합 균주에 도입하였다.

[0060] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 바람직하게는 상기 EXU98501_opt 인공 합성 유전자(서열번호 7)는 곤충병원성 곰팡이균 일종인 메타리지움 로버치(*Metarhizium robertsii*) 유전체 내 12-hydroxy ovalicin 생합성 유전자 클러스터에서 확보된 상보적 디옥시리보핵산 서열을 기반으로 코돈 최적화되었고, 코돈 최적화 전 GenBank 등록번호는 JELW01000026 유전체 정보 내 X797_008449 유전자좌인 EXU98501이다.

[0061] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 바람직하게는 상기 DXS 코딩 인공 합성 유전자(서열번호 8)는 대장균 야생 균주의 일종인 K12 균주의 유전체 내 존재하는 1-데옥시-D-xyulose-5-포스페이트 합성효소(1-deoxy-D-xyulose-5-phosphate synthase; DXS)를 코딩하는 리보핵산 서열을 기반으로 인공 합성하였으며, GenBank 등록번호는 945060 이다.

[0062] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 인공 합성 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0063] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

[0064] 본 발명에서 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유 동물 세포 바이러스 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다. 상기 재조합 발현 벡터 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다.

[0065] 본 발명에 적합한 프로모터는, 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용 될 수 있으며, 예를 들어, 칼리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 노팔린 신타아제 (nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤펔리나 엘로우 모틀 바이러러스 프로모터, 리 볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리 오스포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.

[0066] 본 발명에서 용어 "작동적으로 결합(operatively linked)"라 함은, 핵산 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 되는 것을 말한다.

[0067] 본 발명의 일 구현예에서 상기 벡터에는 필요에 따라서 벡터가 도입된 세포를 선택할 수 있는 선택 마커 등을 추가로 보유시킬 수 있다. 선택 마커로서는, 네오마이신 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자, 퓨로마이신 내성 유전자와 같은 약제 내성 마커, 갈락토시다아제 등의 효소 활성을 지표로 선택할 수 있는 마커, 혹은, GFP 등의 형광 발광등을 지표로 택할 수 있는 마커 등을 들 수 있다. 또, EGF 리셉터, B7-2 등의 표면 항원을 지표로 선택할 수 있는 선택 마커 등을 이용할 수 있다.

[0068] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 벡터를 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method) 및 열충격법(heat shock) 등이 있다.

[0069] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 재조합 발현 벡터가 도입되어 있는 형질전환체에 관한 것이다.

[0070] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 형질전환체는 재조합 벡터로 형질 전환된 형질 전환 생물이다. 상기 형질 전환 생물은 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있으며, 그 예로서, 대장균 등의 박테리아, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 등의 곰팡이, 곤충세포, 동물세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용 될 수 있다. 이들 다양한 세포에 본 발명의 재조합 도메인을 포함하고 이들 각 종류의 세포에 맞추어서 구성된 발현 벡터를 사용하여 목적 단백질을 발현할 수 있다.

[0071] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 벡터를 형질전환체 내로 운반하는 방법은, 상기 형질전환체가 원핵세포

인 경우, CaCl_2 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 형질전환체가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍 스트란 처리법, Agrobacterium 매개 유전자 전달법 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

- [0072] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균(*E.coli*) 뿐 아니라 이중숙주 발효공정에 일반적으로 활용되고 있는 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 락토코커스(*Lactococcus*) 속, 바실러스 (*Bacillus*) 속, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 속, 클로스트리듐(*Clostridium*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속, 리스테리아세아에(*Listeriaceae*) 과, 페칼리박테리움(*Faecalibacterium*) 속, 유박테리움 (*Eubacterium*) 속 및 아세토젠(*acetogen*)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속 (예를 들어, 스킴조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*), 클루베로미세스(*Kluveromyces*), 피치아(*Pichia*), 한센울라(*Hansenula*), 야로이(*Yarrowia*), 슈반니오미세스 (*Schwaniomyces*) 등)의 효모(*yeast*)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체 및/또는 이의 배양액으로부터 오발리신 및/또는 이의 유도체 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 오발리신 및/또는 이의 유도체 화합물들의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0074] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 오발리신 유도체는 5-ketodemethoxyfumagillol, 5-keto-desmethylfumagillol 및 fumaginone으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않으나 가장 바람직하게는 5-keto-desmethylfumagillol 또는 fumaginone이다.
- [0075] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 형질전환체 및/또는 이의 배양액을 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography; HPLC) 방법으로 분리, 정제, 또는 분리 및 정제하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 오발리신 및 이의 유도체 화합물들은 중압 액체 크로마토그래피 방법으로 분리, 정제, 또는 분리 및 정제될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 HPLC 방법에 사용되는 고정상은 역상(reversed-phase)의 C18일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 HPLC 방법에 사용되는 이동상은 물:메탄올(methanol):아세토니트릴(acetonitrile) 혼합용매의 비율기 용출일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않은 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

[0082] [실시예]

실시예 1

[0083] 오발리신 생합성에 필수적인 푸마기는 수산화효소 코딩 유전자 발견

[0084] (실시예 1-1) 재조합 균주 OVA1 제작

[0085] 대장균 코돈 이용도(codon usage)에 따른 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 EXU98501_opt 바이오파트를 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181(pET22B(+)) 기반 플라스미드; AmpR 암피실린 선택 마커; T7 프로모터/lac 오퍼레이터/라이보솜 결합부위(RBS)/T7 전사 종결자(transcription terminator))에 XbaI와 HindIII 제한 부위를 활용한 바이오브릭스(BioBricks) 조립법으로 조립하였다. 보편적으로 사용된 제한 효소들은 Takara(Kyoto, 일본)에서 구입하였으며, 인공 유전자의 합성 및 서열 분석 등의 서비스는 각각 진스크립트(서울, 대한민국)와 코스모젠텍(서울, 대한민국)에 의뢰하였다. 상기 EXU98501_opt 인공 합성 유전자

를 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이중숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, 미국)에 이염화 칼슘(CaCl_2)를 이용한 열 펄스 형질전환법(heat pulse transformation)으로 도입시켰고, 형질전환체의 선별을 위하여 암피실린 항생제 100 ppm을 사용하여 최종적으로 재조합 균주 OVA1(EXU98501_opt 인공 합성 유전자 바이오파트를 도입된 대장균 균주)을 제작하였다.

[0087] (실시예 1-2) 재조합 균주 OVA1의 무세포추출물을 활용한 인비트 바이오촉매 반응

[0088] 상기 재조합 OVA1 미생물을 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 37°C에서 배양하였고, 광학농도 0.6 ~ 0.8 사이로 성장을 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자 최종농도 0.3 mM의 이소프로필-D-티오갈락토 피라노사이드(isopropyl-D-thio galactopyranoside, IPTG, Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 이 후, 22°C에서 20시간 추가 배양하였다. 배양 후 50 mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 이 후, 12000 rpm에서 30분간 2번에 걸쳐 냉장 원심 분리하고, 상등액을 모아 무세포추출물로 이용하였다. 인비트로 바이오촉매 반응을 위하여 냉장 보관 중인 상기 무세포추출물 500 μL 에 메탄올에 용해된 푸마기논(fumaginone; JRMediChem LLC, Princeton, NJ, 미국) 기질을 최종농도 2 mM 수준으로 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응을 실시하였다. 반응 후, 동량의 에틸아세테이트(ethylacetate) 유기용매를 두 차례에 걸쳐 첨가하여 바이오 촉매 반응을 정지시키는 동시에 반응물들을 상층의 유기용매로 추출한 후 상온에서 스피드백(SpeedVac, EYELA, Tokyo, 일본)으로 감압 건조하였다. 한편, 인공 유전자 EXU98501_opt 바이오파트를 추가 도입하지 않은 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181만을 이중숙주인 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환한 재조합 균주를 대조구로 하여 상기 동일한 반응 및 추출 조건으로 준비하였다.

[0090] (실시예 1-3) 인비트로 바이오촉매 반응물의 기기분석

[0091] 상기 유기용매로 추출되어 감압 건조된 푸마기논 화합물과 재조합 단백질의 바이오 촉매 반응산물들은 200 μL 의 메탄올에 재 용해시킨 후, 고성능 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기(High Performance Liquid Chromatography-ESI-tandem MS; ThermoFinnigan, San Jose, CA, 미국)에 일부 시료(10 μL)를 주입하여 기기분석 하였으며, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18 (Waters, 50 x 1.0 mm, 1.7 μm ; Milford, MA, 미국)을 그리고 이동상으로 메탄올:아세트나이트릴:물:개미산 45:35:19.2:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 130 μL 속도로 등용매 용출하였다(도 2 참조). 고성능 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기 크로마토그램 상, 기질인 푸마기논(fumaginone; JRMediChem LLC)은 머무름 시간 11.3분으로 그리고 푸마기논의 탄소 7번 위치가 수산화된 반응산물인 오발리신은 머무름 시간 7.5분으로 나타났다. 대조구의 경우엔 별도 바이오 촉매 반응이 없어 기질인 푸마기논만이 크로마토그램 상 검출되었으나, EXU98501_opt 발현 재조합 OVA1 균주에서 준비한 무세포추출물 인비트로 반응물의 경우엔 기질인 푸마기논의 검출량이 줄어드는데 비하여 반응산물인 오발리신의 검출이 확인되었다. 또한, 오발리신(ovalicin; BOC Sciences, Shirley, NY, 미국) 표준품의 전형적인 질량 단편화 패턴(mass fragmentation pattern)을 EXU98501_opt 발현 재조합 OVA1 균주에서 준비한 무세포추출물 인비트로 반응물에서 역시 확인한 바, EXU98501_opt 유전자 바이오파트는 오발리신 생합성에 필수적인 푸마기논 수산화효소(fumaginone hydroxylase)를 코딩하고 있음을 밝혀냈다. 결과적으로, 본 발명에서 20세기 중반 자연계에서 분리된 이후 반세기 이상의 기간 동안 그 생합성 경로가 밝혀지지 못한 세스퀴테르펜 계열 천연물 화합물 오발리신 생합성 퍼즐(ovalicin biosynthetic puzzle) 내 밝혀지지 않았던 생합성 유전자파트(missing bioparts)를 최초로 확인하였다.

실시예 2

[0093] 오발리신 이중 숙주 내 생산을 위하여 오발리신 및 푸마길린 내성을 부여한 재조합 균주 제조 및 내성 검증

[0094] (실시예 2-1) 재조합 균주 OVA2 제작

[0095] 대장균 이중숙주 내 발현에 적합한 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 2종 Af410_opt와 Af460_opt를 포함하는 외래 유전자 바이오파트 조합을 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181(pET22B(+)) 기반 플라스미드; AmpR 선택 마커; T7 프로모터/lac 오퍼레이터/라이보솜 결합부위(RBS)/T7 전사 종결자(transcription terminator))에 순차적으로 XbaI와 HindIII 제한 부위를 활용한 바이오브릭스(BioBricks) 조립

법으로 조립하였다. 해당 인공 합성 유전자 바이오파트를 XbaI와 HindIII로 절단하고, 미리 SpeI과 HindIII로 절단한 상기 pNB181 바이오디바이스에 연결하였다. 조립된 후, 추가적으로 상이한 유전자 바이오파트를 연결하기 위하여, 다시 BglII와 XhoI으로 절단된 바이오디바이스에 BamHI과 XhoI으로 절단된 바이오파트 유전자 단편을 연결하였다. 이 경우 XbaI과 SpeI, 그리고 BglII와 BamHI은 각각 바이오브릭스 자국(scar)으로 그 제한 부위가 사라지게 된다. 상기 2종의 인공 합성 유전자 바이오파트들을 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이중숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, 미국)에 이염화칼슘(CaCl₂)를 이용한 열 펄스 형질전환법(heat pulse transformation)으로 도입시켰고, 형질전환체의 선발을 위하여 암피실린 항생제 100 ppm을 사용하여 대장균 재조합 균주 OVA2(Af410_opt와 Af460_opt 인공 합성 유전자 바이오파트 조합을 도입된 대장균 균주)를 제작하였다.

[0097] (실시예 2-2) 재조합 균주 OVA2의 오발리신 및 푸마길린 내성 검정

[0098] 상기 재조합 OVA2 미생물을 LB(Luria Bertani)액체배지에 1% 부피비로 접종한 후, 37℃ 진탕기에서 배양하였고, 광학농도 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자 최종농도 0.3 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG, Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 이 후, 22℃에서 12시간 추가 배양하는 동안 다이메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜둔 오발리신(ovalicin; BOC Sciences)과 푸마길린(fumagillin; Sigma-Aldrich) 표준품 각각을 최대 1000 ppm에서 20 ppm 농도까지 연속 희석하여 도말한 LB(Luria Bertani)고체배지 플레이트를 미리 준비해 놓았다. 12시간 추가 배양된 재조합 균주 배양액 50 µL를 분취하여 미리 준비해둔 상기 LB고체배지 플레이트에 균일하게 도말하여 약 1시간 동안 무균시험대에서 건조시킨 후 37℃ 인큐베이터에서 하룻밤 동안 배양하였다. 한편, 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181을 이중숙주인 대장균 BL21(DE3)에 형질전환한 재조합 균주를 대조구로 하여 상기 LB(Luria Bertani)고체배지 플레이트에 동일조건으로 도말하였다. 그 결과, 20 ~ 1000 ppm 농도의 오발리신 및 푸마길린에 노출된 대조구는 모든 구간에서 그 생육이 확인되지 않았으며, 그에 비하여 재조합 균주 OVA2는 최대 농도 1000 ppm을 제외한 즉 20 ~ 500 ppm 농도까지의 오발리신과 푸마길린 노출에도 그 생육이 가능함을 알 수 있었다. 따라서, 재조합 균주 OVA2 내 발현된 Af410_opt와 Af460_opt 인공 합성 유전자산물은 오발리신과 푸마길린을 포함하는 세스퀴테르펜 계열 화합물에 대한 내성을 대장균 이중숙주 내 부여하는 기능을 확인할 수 있었고, 이후 오발리신의 재조합 균주 내 이중 생산에 있어서 필수적인 포함되어야 할 생합성 유전자 바이오파트임을 제시하고 있다.

실시예 3

[0100] 오발리신 생합성 유전자 조합을 도입한 재조합 균주의 발효 배양을 통한 오발리신 화합물의 이중 발현

[0101] (실시예 3-1) 재조합 균주 OVA3 제작

[0102] 대장균 이중숙주 내 발현에 적합한 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 총 7종 Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 외래 유전자 바이오파트 조합들을 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181(pET22B(+)) 기반 플라스미드; AmpR 선택 마커; T7 프로모터/lac 오퍼레이터/라이보솜 결합부위(RBS)/T7 전사 종결자(transcription terminator))에 순차적으로 XbaI와 HindIII 제한 부위를 활용한 바이오브릭스(BioBricks) 조립법으로 조립하였다. 해당 인공 합성 유전자 바이오파트를 XbaI와 HindIII로 절단하고, 미리 SpeI과 HindIII로 절단한 상기 pNB181 바이오디바이스에 연결하였다. 조립된 후, 추가적으로 상이한 유전자 바이오파트를 연결하기 위하여, 다시 BglII와 XhoI으로 절단된 바이오디바이스에 BamHI과 XhoI으로 절단된 바이오파트 유전자 단편을 연결하였다. 이 경우 XbaI과 SpeI, 그리고 BglII와 BamHI은 각각 바이오브릭스 자국(scar)으로 그 제한 부위가 사라지게 된다. 상기 7종의 인공 합성 유전자 바이오파트들을 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이중숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, 미국)에 이염화칼슘(CaCl₂)를 이용한 열 펄스 형질전환법(heat pulse transformation)으로 도입시켰고, 형질전환체의 선발을 위하여 암피실린 항생제 100 ppm을 사용하여 최종적으로 대장균 재조합 균주 OVA3(Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt 인공 합성 유전자 바이오파트들 조합을 도입된 대장균 균주)를 제작하였다.

[0104] (실시예 3-2) 재조합 균주 OVA3 발효 배양액 내 오발리신 생산 여부 기기분석

[0105] 상기 재조합 OVA1 미생물을 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 37℃에서 배양하였고, 광학농도 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자 최종농도 0.3 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노시드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG, Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 이 후, 22℃에서 20시간 추가 진탕 배양을 진행한 후, 동량의 에틸아세테이트(ethylacetate) 유기용매를 두 차례에 걸쳐 첨가하여 세스퀴테르펜 계열 화합물들을 상층의 유기용매로 추출한 후 상온에서 스피드백(SpeedVac, EYELA, Tokyo, 일본)으로 감압 건조하였다. 한편, 실시예 2에 기재된 Af410_opt와 Af460_opt 인공 합성 유전자 바이오파트 조합을 도입한 재조합 OVA2 균주를 대조구로 하여 상기 동일한 배양 및 유기용매 추출 조건으로 준비하였다. 이후, 재조합 균주 내 오발리신 이종 생산 여부를 확인하기 위하여 상기 감압건조 추출물들을 고성능 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기로 기기분석 하였다(도 3 참조). 그 결과, 재조합 OVA3 균주의 배양 추출물의 질량 분석기 크로마토그램 상 오발리신을 검출하였다. 즉, 오발리신(ovalicin; BOC Sciences) 표준품과의 동일한 머무름 시간 및 전형적인 질량 단편화 패턴을 보이는 스펙트럼을 제시하고 있는 바, Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt 총 7종의 인공 합성 유전자 바이오파트들 조합을 도입한 재조합 OVA3 균주의 배양 발효액으로부터 오발리신을 생합성하는데 성공하였다. 반면, 대조구로서 세스퀴테르펜 계열 화합물 내성 유전자인 Af410_opt와 Af460_opt 바이오파트만을 조합 도입한 재조합 OVA2 균주의 배양 발효액에서는 오발리신이 검출되지 않았다. 따라서, 오발리신의 이종 숙주 내 생합성에 관여하는 최소 유전자 세트는 tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt를 포함하는 총 5종 인공 합성 유전자 바이오파트 조합임을 알 수 있었다.

실시예 4

[0107] 오발리신 전구체 생합성 관련 유전자 추가 도입한 재조합 균주 발효 배양을 통한 오발리신 화합물의 생산성 증대

[0108] (실시예 4-1) 재조합 균주 OVA4 제작

[0109] 대장균 이종숙주 내 발현에 적합한 코돈 최적화로 합성한 인공 유전자 총 8종 Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt, EXU98501_opt 및 DXS를 포함하는 유전자 바이오파트 조합들을 대장균 발현용 바이오디바이스인 플라스미드 pNB181(pET22B(+)) 기반 플라스미드; AmpR 선택 마커; T7 프로모터/lac 오퍼레이터/라이보솜 결합부위(RBS)/T7 전사 종결자(transcription terminator))에 순차적으로 XbaI와 HindIII 제한 부위를 활용한 바이오브릭스(BioBricks) 조립법으로 조립하였다. 해당 인공 합성 유전자 바이오파트를 XbaI와 HindIII로 절단하고, 미리 SpeI과 HindIII로 절단한 상기 pNB181 바이오디바이스에 연결하였다. 조립된 후, 추가적으로 상이한 유전자 바이오파트를 연결하기 위하여, 다시 BglII와 XhoI으로 절단된 바이오디바이스에 BamHI과 XhoI으로 절단된 바이오파트 유전자 단편을 연결하였다. 이 경우 XbaI과 SpeI, 그리고 BglII와 BamHI은 각각 바이오브릭스 자국(scar)으로 그 제한 부위가 사라지게 된다. 상기 7종의 인공 합성 유전자 바이오파트들을 포함하는 바이오디바이스를 발현용 이종숙주인 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, 미국)에 이염화칼슘(CaCl₂)를 이용한 열 펄스 형질전환법(heat pulse transformation)으로 도입시켰고, 형질전환체의 선별을 위하여 암피실린 항생제 100 ppm을 사용하여 최종적으로 대장균 재조합 균주 OVA4(Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt, EXU98501_opt 및 DXS 인공 합성 유전자 바이오파트들 조합을 도입된 대장균 균주)를 제작하였다.

[0111] (실시예 4-2) 재조합 균주 OVA4 발효 배양액 내 오발리신 생산성 향상 여부 기기분석

[0112] 상기 Af410_opt, Af460_opt, tFmaA_opt, tFmaG_opt, FmaF_opt, FmaD_opt 및 EXU98501_opt 총 7종의 인공 합성 유전자 바이오파트 외에 오발리신 생합성 전구체 중 하나인 1-데옥시자일로스-5-포스페이트(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; DXP) 대사에 관여하는 DXS 인공 합성 유전자 바이오파트를 추가 도입한 재조합 균주 OVA4 미생물을 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 37℃에서 배양하였다. 광학농도 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자 최종농도 0.3 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노시드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG, Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 이 후, 22℃에서 20시간 추가 진탕 배양을 진행한 후, 동량의 에틸아세테이트(ethylacetate) 유기용매를 두 차례에 걸쳐 첨가하여 세스퀴테르펜 계열 화합물들을 상층의 유기용매로 추출한 후 상온에서 스피드백(SpeedVac, EYELA, Tokyo, 일본)으로 감압 건

조하였다. 한편, 실시예 3에 기재된 Af410_opt, Af460_opt, tFmA_opt, tFmG_opt, FmAF_opt, FmAD_opt 및 EXU98501_opt 총 7종의 인공 합성 유전자 바이오파트들 조합들을 도입한 재조합 OVA3 균주를 비교구로 하여 상기 동일한 배양 및 유기용매 추출 조건으로 준비하였다. 이후, 재조합 균주 내 오발리신 이중 생산 여부를 확인 하기 위하여 상기 감압건조 추출물들을 고성능 액체 크로마토그래피-전자분무 이온화-질량분석기로 기기분석 하였다(도 4 참조). 그 결과, 재조합 OVA4 균주의 배양 추출물의 질량분석기 크로마토그램 상 오발리신의 검출량이 비교구인 재조합 OVA3 균주에서 확인된 오발리신 검출량보다 약 3배쯤 증가했음을 확인하였다. 따라서, 오발리신의 이중 숙주 내 생합성에 관여하는 최소 유전자 세트에 오발리신 전구체인 DXP의 생합성에 직접적으로 관여하는 DXS 인공 합성 유전자 바이오파트를 추가적으로 도입할 경우 세스퀴테르펜 계열 목적 화합물인 오발리신의 이중숙주 내 생산성을 향상할 수 있었다.

[0114] [서열목록]

[0115] 서열번호 1

[0116] >Af410_opt (1698 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)

[0117] TCTAGAATGCTACAATCACAGAGAAGGGGATTAGATTGGATTCTGTTGGTTGTTGAGTCGCGTGGTATTGCCTATACCCGCTGGCTAGCACGTGCTGGATT
 CCGAAGTTCCCGAACCTCTCTGTCTAACGGCGGCCAGGTCCGGCGCCAAGCAGTACCCGTGGTGCCGCGTGAATTCAGCCGTCGTCTGTTAGCG
 CTGCGCTGCTTCTGCGTTATCGCGCCGCTGCTCCGCGCGCGCAGGTAGCCACAGCTACGTTGCCGCGCTACGGTGTTCGCGGTACCTCCGAAGTTCAA
 GATTGTACCCTGCGTTCCCACTCGCGTTTCGTTGGTACTGGTACATGACCGTAGACGCACCAGAGTTGCTTGAAAAGCTGCGTATCACGGATGCGGGTGCT
 AATGGTGACATATGAGTCGTCCACGTGCGCCGCTGCGAACGGCACTGGCAAAGAAGTCGATGACGGCAGTGACGACGACGGCACCGAGAACCCGCGCGG
 GTTGACGCGGAACATTCCACTGCGAAAAAGAAAAAGAAATAAAAAAGCGCAAAACGAAAAAGAAGCAGCCGAAAGTGACAGCCGATCCGCCCAGCATCCCGCTG
 AGCCAGCTGTTTCCGAATAACAGCTATCCGAAGGGTGAGGAAGTGAATACAAAGACGAGAACCGTTATCGTACCACATCCGAGGAAAAACGTCATCTGGAC
 AACCTGAATTCTGACTTCTGTAGCGATTACCGCCAGGCAGCGAGGCCCATCGTCAGGTTGCCAATGGGCACAACGTAACATTAAGCCAGGCCAGACCTTG
 CTGGAGATCGCAACGGTATCGAGGAGTCGGCTCGTGCCTGGTGGGTCATGATGGTCTACCGAAGGTGACAGCTTGATTGCGGGCATGGGTTTTCCGACC
 GGCCTCAATATCGACAACATCGTGGCACACTACAGCCGAACGCAGGTTGCAAGACCGTCTTGGCGCAAAACAACGTTCTGAAAGTTGATATCGGAATCCAC
 GTGGGTGGGCGTATTGTGATAGCGGTTACCATGGCTTTTCGATCCGATGTATGATAACCTTTTGGCGCGCGTTAAGGACGCGACCAATACCGCGTGCCT
 GAAGCGGGTATTGACGTTTCGTGTTGGCGAGCTGGGTGGTTATATTCAGGAGGCTATGGAATCTTACGAGTGCGAAAATCCGCGGAAAAACGTACCCGATCAAA
 GCGATCCGTAATCTGTGCGGTCATACCATCTCCCTTATTCAATTCACGGCACCAAAAAACGTGCCGTTTCGTGAAGAGCAATGATATGACCAAAATGGAAGAG
 GGTGACGTGTTTGCTATTGAAACCTTCGGTAGCACCAGTTCTGGTCGTTACGTGGAGGGCGGTGAGGTAAGCCACTATGCGCTGCGCGGCGACGCGGATCGC
 AAGGACCTGACTCTGTCTTCCGCCAGAAGCCTGCTGACGCGATCAAAAAGAACTTTAGCACCATTCGTTCTGTCTGATAGATATCTGGACAGAATCGGCCAA
 GAAAAATATCTTTGGGCTTGAATATCTGGTCAAGTCCGGCATCGTGAGGATTACCCGCGTTAAACGAAAAAGCCGGGCACGTACACCGCGCAGTTTGAA
 CACACCATTCGTGTCGTCGACGGTGAAAGAGGTCATTAGCCGTGGCGATGACTACTAAAGCTT

[0119] 서열번호 2

[0120] >Af460_opt (1206 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)

[0121] TCTAGAATGACAAATTCAGATCCCAAGAACAAATGTTGCGGTACCGACTGTGATAATGAGGCGGGTACGCTGCAATGTCCGACCTGTCTGAAATTGGGCGTC
 AAGGGTAGCTACTTCTGCAGCAAGAGTGCTTTAAAAAACTGGACACCCACAAGGCGTCATGCATAAGACCCAAAACGCGACAGGCTGTACAACCCG
 TTCCCGTCTACCAAGTTCACCGTTCTGTTCCGCCGGTTTATCCGCTGAGCCCTCGTCGTTCAAGTTCGGAAGCACATTAACGCTCCGACTGGGCAGAACT
 GGTATCCCGGTAGAGAGATGCGCCTCAGCCGTTTCAAATGGGATCTGTGGACGAGAAGGGTCAGCAGGCAATGAGAAAAGTTTGCGCTGTGGCGGTGAG
 GTGCTGGACATCACTGTGCGCGGTACGCCAGGTGTGACCACGATTACCTGGATGAAATCTGTCACAACGCTGCATTGAGCGCGATTCTTACCCGAGC
 CCGCTGAACTATAACCATTTTCCGAAAAGCATTTCACCTCCCCAACGAAGTTGTTGCCACGGCATCCCGATCAGCGTGTGTTGCTCGACGGGACATC
 TTGAACCTGGACGTGTCTGTACCATGGTGGATATCACGCCGATTGAAATGAAACCTATTATGTTGGTGACAAAGCCAAAGCTGACCCGGATAGCGTCCGT
 CTTGTGGAACGACCCGCGAGGCTTTGGACATGGCTATTGAAATCGTTAAGCCGGGCGTGCCGATTCTGTGAGTTCCGCAAGATCATCGAGAAACACGCGCG
 AGCCGCGGTTTGGTGGTCATCAAACTTGGGGTGGTCACGGCATTAACAGCGAATTCACCCCGCTCCATGGATTCCGCATTATGCAAGAACAAGGCGGTG
 GGTACATGCAAGCCGGGATGACCTTACGATCGAGCCGATCTGGCACTGGGTGGTAATCGTGAGAAGTACTGGCCGACGAGTGGAACCAATGTGACCGTT
 GATGGTAAGCGCACCGCGAGTTTGAACATACCTGCTGGTGACGGAACCGCGGTGAGGTGCTGACCGCTCGTCTGGAATAATCCCGGGCGGCCAATT
 CCGATTCCGGAAGTGCCAACGGCAAGGCGCATAATGGCCACGCGAACGGCATGCGAATGGCGAAGTCAAAACTAAAGCTT

- [0123] 서열번호 3
- [0124] >tFmaA_opt (783 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)
- [0125] TCTAGAATGGCTGTAGCTTTAGTTCTAGCGGCACCCTGCAGCTTTCACTTGATCATCAAAGGTTTTCTGTGGAACCAGCTGCACCTGTTGACCTTTCAGGTTAAGAACCAATTGACGGCATCGACGAGGATTCCATTGCGAAACCGCATAGACCGTTGCCGAGCGGTCGTATTACCCGGGTCAAGCGACTTTGTTATATCGTGTTCTTTTTTTCCTTATGTGGGTGTGCTGCGGTGTACCAACACCATTAAGCTGTACCTTGGTTTACAGCATCGCAATCGTGGTGTACAATGAAGGTGGTTGGCGGCCATTCCGGTCGTGAAGAACCTGATCGGCGCTATCGGTCTGGGTGTTATTGTGTTGGGCACCACAATCATTTTTGATGGCGGTAAAGAACTGCACGGCTGAAAGCTGTGGCTGTCTGATGATCGTTGGTATTTTCGCGACGACTGGTCATGCACAAGACTTCCGCGATCGTACCGCAGATGCGACGCGTGGTCGCAAAACCATCCCGCTGCTCTTGCTCAGCCGGTAGCGCGTTGGTCACTGGCCACGATCACCGCGCGTGGACCATCGGCCTGATCGCTCTGTGGAAGCCGCTGCAATTGTGACCTGGCGTATGTGGCGCGTCTCTGCGCTGCCTGGACGGCTTCTCTCGAGCTACGACGAGAAGGATGACTACGTTAGCTACTGCTGGTATGGCTTCTGGCTGTAGGTTCCAATATTCTGCCAATTTTCCCGCTCTGCGCGCGAGCTGCCGTAAAAGCTT
- [0127] 서열번호 4
- [0128] >tFmaG_opt (1392 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)
- [0129] TCTAGAATGGGAACTACTAGTAATATTTACGATAAGGATGCGGCACACGCCGTGATGGGTAAAAAGCCCCAAAAACGAGCGCCCGTCCGCAGTTAAATTTCCGCGCAGCTGTGCGGCTTTGAGAAGTTCTTGATCAGCGACCAATATAACGATAAATATCGTCTCCATCGTAAGATGGTTCATCAAGAGATAGGCACCAAAAGCCTGAGCGCGGTTTCCGCCCTATTACAGGAGCAGGAGAGCATTCGTTTTATTCTGCAGACCTTAACCGCCAGACGACATTCTGCAGCACCTGAAGACTCTGGCTGCTGCGATCGTCTGAAGATCACCTATGGCTACAGATCGAGCGCAAGGGTCAGGACCCACTGGTGGAGCTGATTGAACATGCAATGGAGAAGTTGTCGAAGCGTTTCGTGCCGTTGGCTTGGGCAGTGGACAGCGTTCCGGCGATCAAATACCTGCCGATTGGTTCCCGGGTATGAGCTACAGAAAGACCGCACGTAAAGTGGCGTGCTATCAACGAGGCGGCGGCTGAAGTCCCGTATGATTTTGTAAACGTCAGATGGCACACAAGGCGACCAACCGTCTACGTCTCCAAGTTGTTGAAAAAGCACATGATTAAGAGTGAGGACAACAAAATCAACGTGAGCGCGCGGATGAAGAGGCCATCAAGTGGACTGCGGTGTCTTTGTATGCAGCGGGTAGCGATAGCACGGTGGCCATCATTATTCTGTATCTGCGGTTTAGTCATGTTCCCGGAGGTGGTTACCCGTGCGCAAGAGGAAATCGATCGCGTGGTGGGTAGCGACCGCTGCCGAATTTTGATGACCGCACCAATCTGCCATACGTTGATGGTATTATCAAAGAGGCTTGGCGCTGGAATCCGGTTGGTCCGATGGGCTGACCCACAAAAGCGAAGAGGACTTGGTTTGTGGCAATACCTGATTCCGAAGGAAGTACCTCTTGCCGTCCCTGTGGTGGTTCTGAACGACCCGAAAGAGTATCCGGAGCTCGTGTTTTAAACCGGAACGCTACATGAACCGTTTAACCATCCGGATCCCTCTGAGATTGCGTTCCGGTACGCGCGTGGTTCGTGCGCAGGCCGTTACTTCCCGACGCAAGCGTGATATCACCGTTGTACAGCTGCTTGGGTCTTCAACGTTCTGAAGGCTAGAGATGACCAGGGTAATGAAATCCCGGTGACCTACAAGCCATTCCGGGTATGGTCAATCGTCCGGCACCGTTCCAGTTTAAAGTTGAACCGGTAGCCAACACCACATCGACCTGTTGCGCCGTATCGAAAGCGAACAGATTCCGGAAGTTCCCATGCGTCCCTGCTGAAGCCGTCCACCGTTTAAAGCTT
- [0131] 서열번호 5
- [0132] >FmaF_opt (942 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)
- [0133] TCTAGAATGCTAGGAAGGCACGAATGTACAATATCAGAGAGCGTGAGCGCCTTAGACCCGACGGCGCAAGAGCCGGAATATACCTTGGTACCTAGCACCTCGAGAGATTTGGTACGCGACATGACTCTGAACATGGAAGATGCCAGGCACATCTGAAGGAGCAGCGCTGGGTAAAGATCCCGGTGTTCTGAGCAAAAGCGGAGCGGAAGACGCGTTGTCGCGCCTTTGGGAAGCGAAGGCAGCAAGCGAGGCTCGTGGTGAGTGCACCTTTCAGCCGATTCTGGATCCGAATCCGGCGAACGTGCGCGTGTCTACCTGCCGGAAGTGGACGCTTACTGGCGTGACATGCTGGTCAACCCAACTGCGTTGGACTTGGCGAAGAGCCTGTGGGAGACCAGCTGCTCGTCAGCAACTTTAGCGGAACATCGCACGTCCGGGTGCGGAGTCAATGGCACTGCACTCTGATCAATCCATTGTTCTCCCGGCACCGTGGCTGGATGTTTGGGCAGTTAACGTGATCTGGTGTCTGACGCGTATGACCAAAGAGAACGGTGCTACCCTTTACATCCCAGGCAGCAATAAATGGACCACCTGGGAGGACGTTCCGGATAATGCTCCGGATTTGTTAGTGCCGTTGAGGCCGATGCGGGCGACATCGTGGTGATCGATGGTCGTCTGTGGCACACCAGCGGTTCTAACGTGACGGAAAGACGAGGACCGTGCCATTCTGTTGCGGTATTACTCCGCCCCACATATGCGTCCGCTGACCAATTGGAGTGCGAAGCTGCCGAAAGAACTGCAGGAAACCCGTGTCGCCGAGTTGAAGGAACTGTTGGCTCTGAGCCATATTGGCTATGTTGTCAAAGGTGACCTGACCTATATGGCTCAAAAATACCCGTCCGAAAAAGGCACACGCGGTTTCTGCGTAAAGCTT
- [0135] 서열번호 6
- [0136] >FmaD_opt (759 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)
- [0137] TCTAGAATGCACTGGCCCGATTTCTAGCTAAAACAACTATAGAAAACCGCGTGATGATAAAGCGTCTTGCTACATTGACACCTTTCCGGAGAAAAAGTCCTTCTTCGAGCGCTGCAGCGGAACCCGGTTACCAAGAATCCTTCAGCAGCTTCATGGACGTGTGGGCAAAAGGCAACGTCGTTGGCTGAGTTCTATGAT

ACCCAGGCGCTGCTGGATGGCGCGGATTTAAGCAATGGTTCGCCGTTTGTGGTTGATGTTGGTGGTCATCACGGCATTGACCTGATGCGTGTGCTGAGAAG
CATCCGGAATTGCCAGCAGGCAGCCTGGTTTTGGAAGATCTTCCGGACGTCGTGGGCGCGGTTTCATTTGACCACGGATAAAATCCGCACTGTAGCCACGAC
TTGTTTGAAGGAGGTGTTGAACAACCGATTAAGGGTGCAGCGCGCATATTTATGCACGCGTTCTGCACGACTGGTCTGATGAAACCTCCGTTAAGATCTTG
CGTCAGATTGCAGCGGTGATGAAACCGGTTATAGCAAGGTGCTGATTAACGACATCGTGATCCCATCAACCGGTGCCTCTTGTACCAAGCGGTATGGAC
TGCCTGGTGTGCAGGCGAGCGCTAATGAACGTACGGAAGCTGTGTGGAGCAAGGTGATCAAGGACGCGGGCCTGAAGCTGGTCAAATACTACCCGACGGC
CGTGGTTACGAGTCGGTCATCGAGGCCGAGCTGCCGTAAAGCTT

[0139] 서열번호 7

[0140] >EXU98501_opt (939 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)

[0141] TCTAGAATGGATCAACCCCCAGAACTATTTCTACAACTATAAGCCGAGCATCCGTATCGCAGAACTGAGCGCAAATGCGCCGATTGAGGAAATCTCTCC
GTGATTGATCGTGATGGTGGTGTATCATCAACGGTTTGGTTAGCAGCGAAGAGCTGGAGTCTATTGAGAAGGAGATCGAAATGTACACCAAGAGACACCGC
TCCGAAGACGAAGGTTTCTTCAAAGACCTGGTTCCGAGGAGACCATCTGTATCGGCGGTTTGGTGGTAAATCCGATACGATGGCACGTATCTGCGAACAC
CCGGTGTAGAACAGCTGCGTACCCACATTCTACCGATGTTGGTACTCGCGGTGTGAGAAGTACAACCTGCGGTACCATATCGACCCGTTGCTGTCCGTG
AGCCTGTCTGTTCCGTATTGATGATGGTGCGCCACGTCAACGTCTGCACAGAGACGACGGCACGCACTTGATTGAGCACGAAAGCAAACCGTACAAGCTGAAT
AACGCGCGCAATTTGGTGTCTGATCGCTGGCGTAGAACTACGCAAGAAAACGGTGTACCATGTTTATCCCGGTAGCCATCGCTGGGATGATAAACGT
GAGCCGCGCTGGACGAGGTCACCTTTGCTGAGATGAAACCTGGCGCGCGCTGATTTTTCTGGCGAGTTGCTGGCATGGCGCCGTCATAACAGCGTTCCG
GGCTTACCCGTGTGCTGCACGGCTGTTCTTCTGCGCGGTACCTACCGCACCCAAAGAGATCAGTTTCTGGCCATCCCGGTAGCAAGGCACGTCTATG
TCTCCGAAGATGCTGAATTTGCTCGGTTATAAGCAGCCGGGCGCGGCTGGGCATGGTTGAGAAGCGGATCCAATGTTGGACCTTGAGCACTTTTTAAAA
GAAGCGAACCTGTAAAGCTT

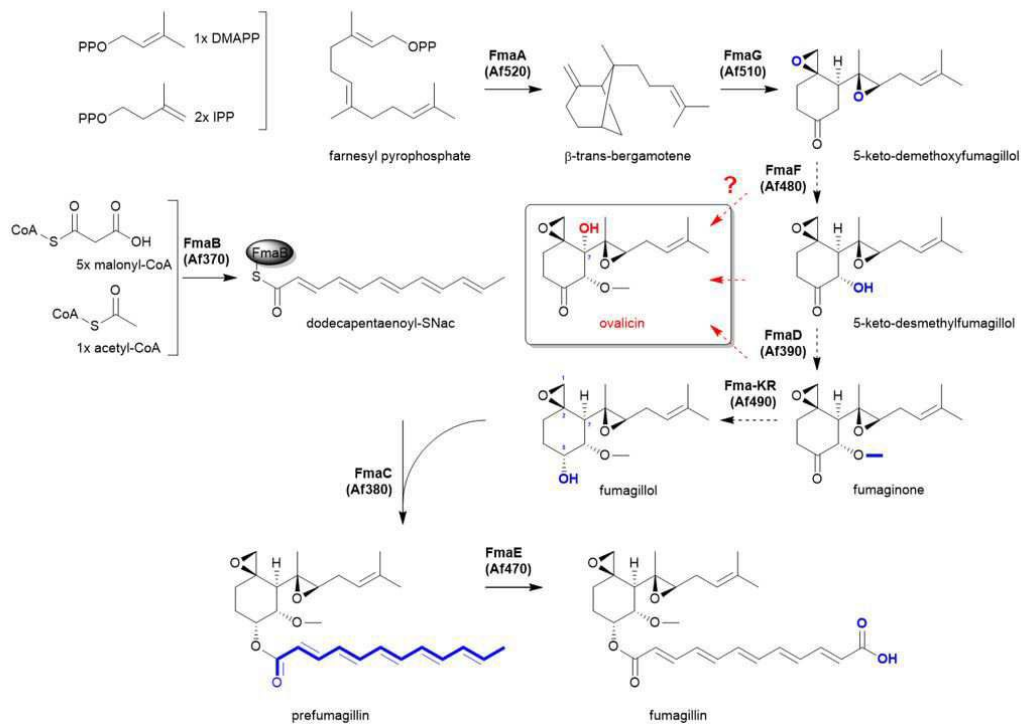
[0143] 서열번호 8

[0144] >DXS (1875 bp; 5 ‘말단에 *Xba*I 및 3 ‘말단에 *Hind*III 제한효소 위치 밀줄)

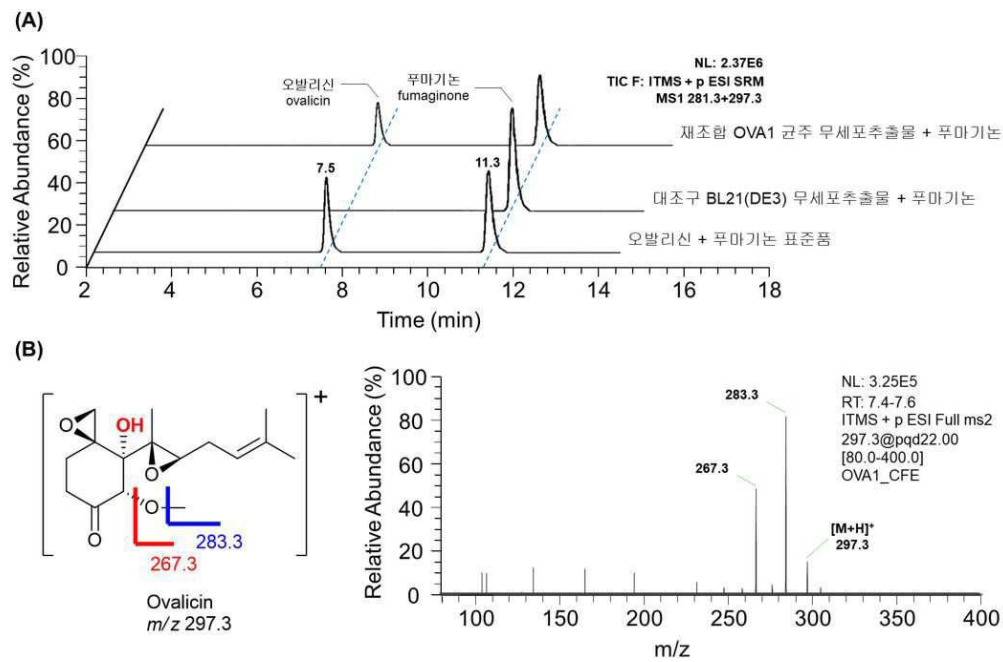
[0145] TCTAGAATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCGACCCTGGCACTGGTTCGACTCCACCCAGGAGTTACGACTGTTGCCGAAAGAGAGTTACCGAAACTCTGC
GACGAACTGCGCCGTATTTACTCGACAGCGTGAGCCGTTCAGCGGGCACTTCGCTCCGGGTGGGCACGGTCGAACTGACCGTGGCGTGCATATGTC
TACAACACCCCGTTTGACCAATTGATTTGGGATGTGGGGCATCAGGCTTATCCGCATAAAATTTTGACCGGACGCGCGACAAATCGGCACCATCCGTCAG
AAAGGCGGTCTGCACCCGTTCCCGTGGCGCGGCAAGCGAATATGACGTATTAAGCGTCGGGCATTCATCAACCTCCATCAGTCCGGAATTGGTATTGCG
GTTGTGCGCAAAAAGAAGGCAAAATCGCCGCACCGTCTGTGTATTGGCGATGGCGCGATTACCGCAGGCATGGCGTTTGAAAGCGATGAATACGCGGGC
GATATCCGTCTGATATGCTGGTGATTCTCAACGACAATGAAATGTCGATTTCCGAAATGTCGGCGCGCTCAACAACCATCTGGCACAGCTGCTTTCCGGT
AAGCTTTACTCTTCACTGCGCGAAGGCGGGAAAAAGTTTTCTCTGGCGTGCCGCCAATTAAGAGCTGCTCAAACGCACCGAAGAACATATTAAGGCATG
GTAGTGCCTGGCACGTTGTTGAAGAGCTGGGCTTTAACTACATCGGCCCGTGGACGGTCACGATGTGCTGGGGCTTATCACCACGCTAAAGAATGCGC
GACCTGAAAGGCCCGCAGTTCCTGCATATCATGACCAAAAAAGTCTGTTATGAACCGCGAGAAAAAGACCCGATCACTTTCCACGCCGTGCTAAATTT
GATCCCTCCAGCGGTTGTTTCCGAAAAGTAGCGCGGTTTCCGAGCTATTCAAAAATCTTTGGCGACTGGTTGTGCGAAACGGCAGCGAAAGACAACAAG
CTGATGGCGATTACTCCGCGATGCGTGAAGTTCCGGCATGGTCGAGTTTTACGTAATTTCCCGGATCGCTACTTCGACGTGGCAATTGCCGAGCAACAC
GCGGTGACCTTTGCTGCGGGTCTGGCGATTGGTGGGTACAAACCATTTGTCGCGATTACTCCACTTTCTGCAACGCGCCTATGATCAGGTGCTGCATGAC
GTGGCGATTCAAAGCTTCCGGTCTGTTGCCATCGACCGCGCGGCATTGTTGGTGTGACGGTCAAACCCATCAGGTGCTTTTGATCTCTTACCTG
CGCTGCATACCGGAAATGGTCATTATGACCCGAGCGATGAAAACGAATGTGCGCAGATGCTCTATACCGGCTATCACTATAACGATGGCCCGTCAGCGGTG
CGCTACCCGCGTGGCAACGCGGTGCGGTGGAACGACGCGCTGGAATACTACCAATTGGCAAAGGCATTGTGAAGCGTCGTGGCGAGAACTGGCGATC
CTTAACCTTTGGTACGCTGATGCCAGAAGCGGCGAAAGTCGCCGAATCGCTGAACGCCACGCTGGTCGATATGCGTTTTGTGAAACCGCTTGATGAAGCGTTA
ATTCTGGAATGGCCGCCAGCCATGAAGCGCTGGTCACCGTAGAAGAAAACGCCATTATGGCGCGCAGGCAGCGCGGTGAACGAAGTGTGATGGCCCAT
CGTAAACAGTACCCGTGCTGAACATTGGCCTGCCGACTTCTTTATTCGCAAGGAACTCAGGAAGAAATGCGCGCCGAACCTCGGCTCGATGCCGCTGGT
ATGGAAGCCAAAATCAAGCCTGGCTGGCATAAAGCTT

도면

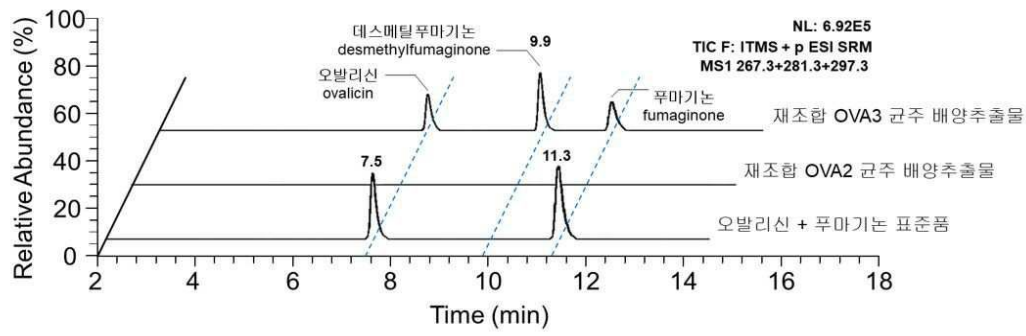
도면1



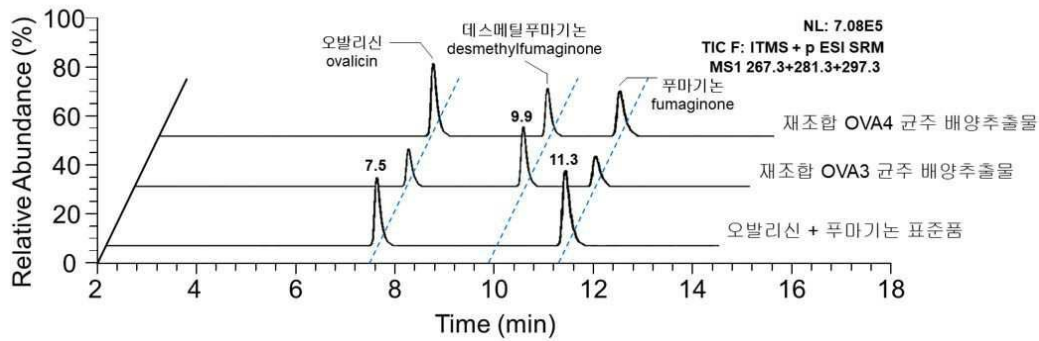
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.