



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0114279
(43) 공개일자 2008년12월31일

(51) Int. Cl.

C12P 17/08 (2006.01) C07H 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0063678

(22) 출원일자 2007년06월27일

심사청구일자 2007년06월27일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

윤여준

서울 서초구 잠원동 동아아파트 101-1806

정원석

서울 서초구 방배4동 현대 2차 홈타운 203-1301

한아름

강원 춘천시 후평동 809 후평 4단지 아파트
417-407

(74) 대리인

이덕록

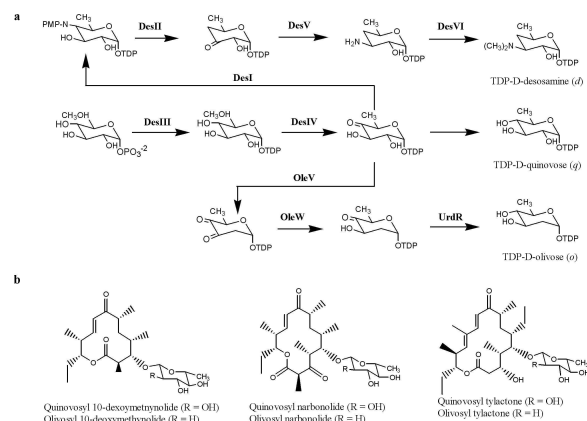
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 신규한 올리보실 틸락톤 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 올리보실 틸락톤 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 뉴클레오타이드-활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 *S. venezuelae* 돌연변이체를 제조하여 틸락톤과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 마크로라이드인 올리보실 틸락톤을 제조할 수 있는 방법과 이를 통해 제조된 신규한 올리보실 틸락톤을 제공함으로써 기존의 항생제에 대해 내성을 지닌 세균들에 의한 질병을 치료하는데 있어 효과적인 항생물질을 합성할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도2

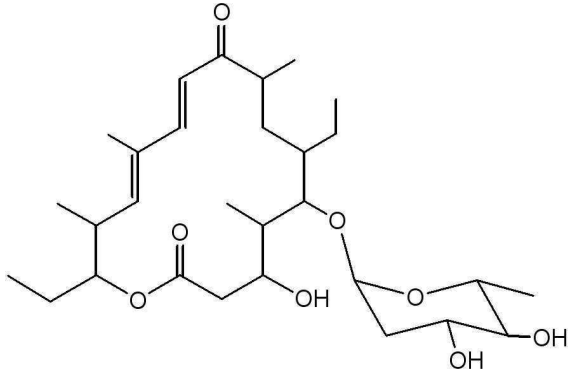


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 신규한 올리보실 틸락톤:

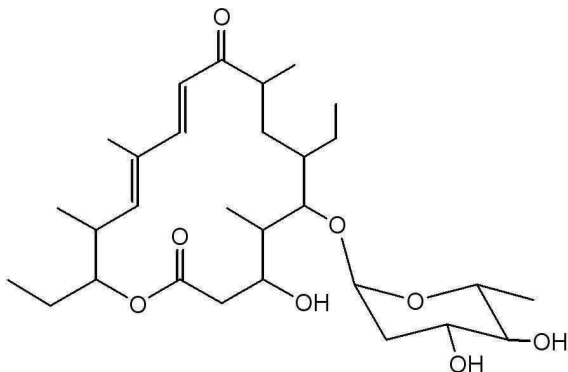
[화학식 1]



청구항 2

피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 *desIII*, *desIV* 및 *desR*을 삽입한 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) YJ069를 *desVII*(GeneBank 서열번호 AAC68677.1), *desVIII*(GeneBank 서열번호 AAC68676.1), *oleV*와 *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579) 및 *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)을 포함하고, 도 5의 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ146)로 형질전환하여 얻은 미생물의 성장배지에 틸락톤을 첨가하여 배양한 후 클로로포름으로 추출하고 메탄올로 농축함을 특징으로 하는 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 올리보실 틸락톤의 제조방법:

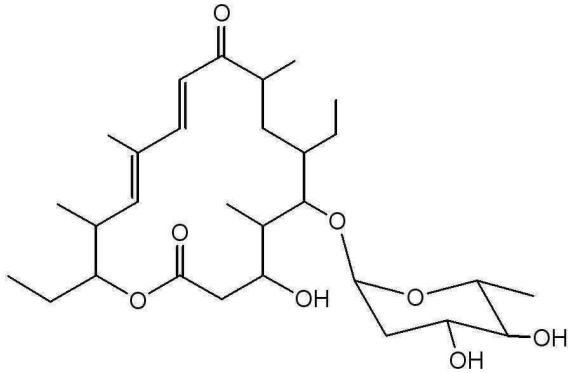
[화학식 1]



청구항 3

피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 *desIII*, *desIV* 및 *desR*을 삽입한 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) YJ069를 *tylMII*(GeneBank 서열번호 X81885), *tylMIII*(GeneBank 서열번호 X81885), *oleV*와 *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579) 및 *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)을 포함하고, 도 6의 개열지도를 가지는 재조합 벡터(pYJ249)로 형질전환하여 얻은 미생물의 성장배지에 틸락톤을 첨가하여 배양한 후 클로로포름으로 추출하고 메탄올로 농축함을 특징으로 하는 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 올리보실 틸락톤의 제조방법:

[화학식 1]



명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 신규한 올리보실 틸락톤 및 그 제조 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 뉴클레오타이드-활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 *S. venezuelae* 돌연변이체를 제조하여 틸락톤과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 마크로라이드인 올리보실 틸락톤을 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 신규한 올리보실 틸락톤에 관한 것이다.
- <8> 마크로라이드 계열의 항생제는 임상적으로 가장 중요한 항생제 중 몇몇을 포함하며 이들의 활성은 하나 이상의 디옥시당에 붙어있는 폴리케타이드 마크로락톤 링으로부터 유래한다. 마크로라이드 계열 항생제의 생합성과 관계되는 복제되어 서열화된 유전자의 수는 지난 수십년 동안 급속하게 증가해왔으며, 유전정보에 관한 지식이 확대됨에 따라 새로운 마크로라이드 계열의 항생제를 생산하기 위한 폴리케타이드 합성효소(PKS)와 디옥시당 생합성 경로의 조작이 가능하게 되었다(Rodriguez E et al. (2001) *Cur Opin Microbiol* 4:526-534). 그러므로, 마크로락톤 링의 생합성, 디옥시당 구성 성분 및 이들의 전이에 관여하는 유전자들을 조합함으로써 마크로라이드의 구조를 변형시키기 위한 조합 생합성(combinatorial biosynthetic) 연구가 수행되어오고 있다(Mendez C et al. (2001) *Trends Biotechnol* 11:449-456; Blanchard S et al. (2006) *Curr Opin Chem Biol* 10:263-271).
- <9> 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) 균주는 최근 조합 생합성의 호스트(host)로서, 그리고 다른 종의 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 균주 유래 마크로라이드 계열 항생제의 이중 발현 경로로서 발전되어져 왔다(Yoon YJ et al. (2002) *Chem Biol* 9:203-214; Hong JSJ et al. (2004) *FEMS Microbiol Lett* 238:291-399; Jung WS et al. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 763-769). 유전적 조작이 가능해짐과 함께, 스트렙토마이세스 베네주엘라(*S. venezuelae*) 균주의 상대적으로 빠른 성장속도(두배 속도, 대략 1시간)로 인해 대사산물의 생산 짧은 배양 기간(3-4일)이 필요하게 되었다(Xue Y et al. (2001) *Metab Eng* 3:15-26; Jung WS et al. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 763-769).
- <10> 조합 생합성을 위한 호스트로서 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) 균주를 사용함에 따른 또 다른 이점은 천연의 글리코실트랜스퍼라제인 DesVII(도 1a)와 더불어 보조 단백질인 DesVIII를 가지고 있으며(Borisova SA et al. (2004) *J Am Chem Soc* 126:6534-6535), 이들은 아글리콘과 디옥시당 모두에 대하여 보기 드문 기질 유연성을 가진다는 점이다. 기질로서 합성 디옥시당(Zhao L et al. (1998a) *J Am Chem Soc* 120:10256-10257; Zhao L et al. (1998b) *J Am Chem Soc* 120:12159-12160; Zhao L et al. (2001) *J Am Chem Soc* 123, 7909-7910; Yamase H et al. (2000) *J Am Chem Soc* 122:12397-12398; Hong JSJ et al. (2004) *FEMS Microbiol Lett* 238:291-399)과 합성 아글리콘(Tang L et al. (2001) *Chem Biol* 8:547-555; Borisova SA et al. (2006) *Angew Chem Int Ed* 45:2748-2753; Jung WS et al. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 763-769)을 이용하는 DesVII의 유연성을 입증하는 최근의 보고서들은 이 효소가 조합 생합성을 위한 중요한 도구임을 알려준다. 이러한 특징들 때문에 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) 균주는 조합 생합성적 접근을 통해 신규한 마크로라이드 항생제들을 생산하기 위하여 흥미를 가지게 되는 호스트인 것이다. 그러

나, 합성 디옥시당을 합성 아글리콘에 붙이는 것이 가능한, 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) 균주에 근거한 조합 생합성 시스템은 아직 개발되어지지 않았다.

<11> 이에 본 발명자는 상기와 같은 점을 고려하여 뉴클레오타이드-활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 *S. venezuelae* 돌연변이체를 제조하여 틸락톤과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 마크로라이드인 올리보실 틸락톤을 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

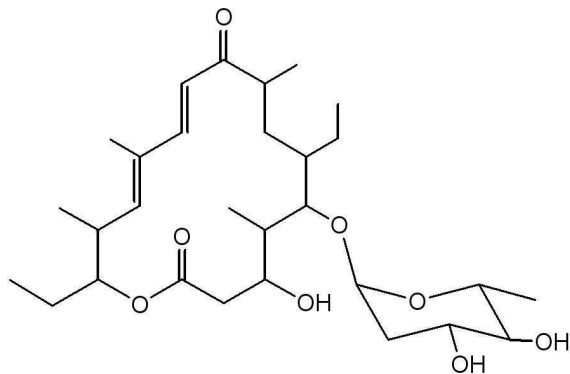
<12> 본 발명은 뉴클레오타이드-활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 *S. venezuelae* 돌연변이체를 제조하여 틸락톤과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 마크로라이드인 올리보실 틸락톤을 제조함을 그 목적으로 한다.

<13> 이하, 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

발명의 구성 및 작용

<14> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 올리보실 틸락톤 및 이의 제조방법을 제공한다:

화학식 1



<15> 본 발명의 신규 올리보실 틸락톤의 물리화학적 특징은 다음과 같다:

<17> $C_{29}H_{48}O_8$

<18> 분자량: 524.69

<19> C: 66.38; H: 9.22; O: 24.39.

<20> 본 발명의 올리보실 틸락톤은 두 가지 경로를 통해 생합성 가능하다.

<21> 첫째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 *desIII*, *desIV* 및 *desR*을 삽입한 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) YJ069를 *desVII*(GeneBank 서열번호 AAC68677.1), *desVIII*(GeneBank 서열번호 AAC68676.1), *oleV*와 *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579) 및 *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)을 포함하고, 도 5의 개열지도로 가지는 재조합 벡터(pYJ146)로 형질전환하여 얻은 미생물을 틸락톤과 함께 배양하는 것이며,

<22> 둘째로는 피크로마이신(pikromycin, Pik)를 코딩하는 전장의 생합성 유전자 클러스터 PKS와 데소사민(desosamine, des) 생합성 효소를 결실시킨 다음 *desIII*, *desIV* 및 *desR*을 삽입한 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) YJ069를 *tylMII*(GeneBank 서열번호 X81885), *tylMIII*(GeneBank 서열번호 X81885), *oleV*와 *oleW*(GeneBank 서열번호 AF055579) 및 *urdR*(GeneBank 서열번호 AF269227)을 포함하고, 도 6의 개열지도로 가지는 재조합 벡터(pYJ249)로 형질전환하여 얻은 미생물을 틸락톤과 함께 배양하는 것이다.

<23> 본 발명에서 얻고자 하는 올리보실 틸락톤은 상기 형질전환된 미생물 YJ069/pYJ146 또는 YJ069/pYJ249 과 틸락톤의 배양물을 클로로포름으로 추출하고 메탄올로 농축함으로써 분리정제할 수 있다.

<24> 본 발명에서는 뉴클레오타이드-활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 *S. venezuelae* 발현 효소의 유전적으로 조작된 돌연변이체를 제공하며, 이로서 마크로락톤의 외인성 원료

(exogenous source)를 주입했을 때 신규한 글리코실화 마크로라이드인 올리보실 틸락톤을 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 신규한 올리보실 틸락톤을 제공한다.

<25> DesVII/DesVIII 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍을 발현하는, 두 개의 돌연변이체 YJ069/pYJ142(TDP-D-퀴노보스 생산용) 및 YJ069/pYJ146(TDP-D-올리보스 생산용)을 10-디옥시메티노라이드 및 나르보노라이드를 첨가한 성장배지에서 배양시킴으로써 퀴노보스- 및 올리보스-글리코실화 마크로라이드를 생산할 수 있다. 이들 두 개의 돌연변이체를 사용하여 본 발명에서는 16-멤버 링 구조의 아글리콘인 틸락톤을 퀴노보실 또는 올리보실 틸락톤으로 성공적으로 전환할 수 있다. 퀴노보실 틸락톤은 DesVII/DesVIII의 정제된 효소를 사용하여 시험관내에서 이미 합성된 바 있으나(Borisova SA et al. (2006) *Angew Chem Int Ed* 45:2748-2753), 이에 반해 올리보실 틸락톤의 생합성은 보고된 바 없다. 올리보실 틸락톤은 기질-유연성의 글리코실트랜스퍼라제 DesVII에 의해 생산되는 신규한 글리코실화 16-멤버 링 구조의 마크로라이드 중 또 다른 예가 되며, 이로서 글리코실트랜스퍼라제는 합성 디옥시당을 합성 아글리콘에 붙이기 위한 도구로서 그 유용성이 확대되었다.

<26> 본 발명에서는 또한 *S. fradiae* 유래의 TyIMII 글리코실트랜스퍼라제의 디옥시당과 아글리콘에 대한 유연성을 확인한다. 10-디옥시메티노라이드와 나르보노라이드를, TyIMII/TyIMIII를 발현하는 두 개의 돌연변이체 YJ069/pYJ243(TDP-D-퀴노보스 생산용) 및 YJ069/pYJ249(TDP-D-올리보스 생산용)에 첨가함에 따라 글리코실화 마크로라이드를 생산하는데 실패하였다. 다른 한편으로, 16-멤버 링 구조의 아글리콘, 틸락톤을 TyIMII를 이용하여 글리코실화하여 퀴노보실 및 올리보실 틸락톤을 생산하였다. 이러한 결과를 통해 TyIMII가 DesVII에 비해 아글리콘에 대하여 더욱 강한 기질 특이성을 가짐을 알 수 있었는데 이는 합성 디옥시당만이 천연의 아글리콘 기질인 틸락톤으로 전환될 수 있기 때문이다.

<27> 하이브리드 마크로라이드의 조합 생합성에 대한 주요 제약(limitations) 중 하나는 하이브리드 화합물의 현저하게 낮은 수율이다(Tang L et al. (2001) *Chem Biol* 8:547-555; Yoon YJ et al. (2002) *Chem Biol* 9:203-214). 틸락톤을 주입한 YJ069/pYJ146 및 YJ069/pYJ249로부터 제조된 신규한 마크로라이드인 올리보실 틸락톤은 검출을 위하여 LC/MS와 같은 분석적 방법에 민감할 것이 요구된다. 비록 올리보실 틸락톤의 글리코실화 사이트가 낮은 전환 수율 때문에 결정될 수 없을지라도, TyIMII(도 1b) 및 DesVII의 내재된 촉매적 특이성에 의하여 TDP-D-올리보스가 틸락톤의 C-5 위치의 산소에 도입된 것으로 판단되었다(Borisova SA et al. (2006) *Angew Chem Int Ed* 45:2748-2753). 더 나아가 NMR과 같은 분석을 통하여, 틸락톤의 글리코실화 사이트를 확인하는 것이 필요할 것으로 생각되었다.

<28> 최근의 연구들을 통하여 다수의 DesVII 및 TyIMII를 포함하는 글리코실트랜스퍼라제가 디옥시당을 아글리콘으로 효과적으로 전환하기 위하여 보조적 단백질을 필요로 하는 것을 알 수 있었다(Melancon III CE et al. (2004) *J Am Chem Soc* 126:16725-16727; Borisova SA et al. (2004) *J Am Chem Soc* 126:6534-6535; Hong JSJ et al. (2005) *J Microbiol Biotechnol* 15:640-645). 본 발명에서는 효과적인 글리코실화를 위하여 보조적 단백질이 요구된다는 것을 조사하기 위하여 추가적인 실험을 수행하였다. 먼저, 파트너 단백질인 DesVIII 또는 TyIMIII이 결여된 각각의 DesVII 또는 TyIMII의 발현은 글리코실화 생성물을 생산하지 못했다(데이터 미도시됨)는 점을 통해 DesVII 및 TyIMII의 촉매적 활성을 위한 보조적 단백질이 요구된다는 점을 확인할 수 있었다. 둘째로, DesVII/TyIMIII 또는 TyIMII/DesVIII를 발현시킴으로써 파트너 단백질을 바꿔도 어떠한 글리코실화 화합물을 생산할 수 없다는 결과를 얻었다(데이터 미도시됨). 이러한 결과들을 통하여 천연의 보조적 단백질인 TyIMIII 및 DesVIII는 이들의 천연 파트너 글리코실트랜스퍼라제인 TyIMII 및 DesVII 각각에 대하여 생체 내 활성을 필요로 함을 유추할 수 있었다.

<29> 새롭게 얻은 *S. venezuelae* 돌연변이체는 아글리콘의 다양한 구조의 글리코실화 마크로라이드로의 생합성을 위한 단순한 시스템을 제공한다. 더 나아가, 본 발명은 아글리콘 및 디옥시당에 대한 글리코실트랜스퍼라제의 유연성은 물론 글리코실트랜스퍼라제 효소를 활성화하기 위한 보조적 단백질의 기능을 조사하였다. 비록 글리코실화 마크로라이드가 조합 생합성을 위한 다른 수단들과 같이 낮은 전환 수율로 합성된다 할지라도(Tang L et al. (2001) *Chem Biol* 8:547-555; Perez M et al. (2006) *Appl Environ Microbiol* 72:6644-6652), *S. venezuelae*는 다른 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* species) 균주에 비하여 더 빠르게 성장하는 이점을 가지며, 완전한 생합성을 위하여 상대적으로 짧은 배양 기간(3일)을 가지는 특징이 있다.

<30> 이하, 본 발명을 실시예에 대해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<31> 실시예 1: 박테리아 계통, 배양 조건 및 유전적 조작

<32>

스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) ATCC 15439를 돌연변이체 제조를 위해 사용하였다. 스트렙토마이세스 베네주엘라(*Streptomyces venezuelae*) 돌연변이체는 적절한 항생제, 아프라마이신(apramycin, 0.5mg/mL)가 포함된 SCM 액체배지에서 배양하였다(Yoon YJ et al. (2002) *Chem Biol* 9:203-214). TSB(trypsin soy broth) 배지에서 배양시킨 *S. fradiae* ATCC 19609를 게놈 DNA 제조를 위해 사용하였다. 유전적 조작은 공인된 과정에 따라서 *E. coli* DH5 α 내에서 수행되었다(Sambrook J et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). 리트머스 28(Litmus 28, New England Biolabs), T-이지 벡터(T-easy vector, Promega) 및 pGEM-3Zf(+)(Promega)가 서브클로닝을 위해 사용되었고, 서던 블롯 하이브리다이제이션(Southern blot hybridization)은 디고시게닌(digoxigenin, DIG) 라벨링 및 검출 키트(Roche)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

<33>

실시예 2: Pik PKS 및 *des* 클러스터-결실 호스트 제조

<34>

*S. venezuelae*의 Pik PKS 및 *des* 유전자 클러스터-결실 돌연변이체를 제조하기 위하여, 아프라마이신(apramycin) 내성 유전자가 포함된 pKC1139(Bierman M et al. (1992) *Gene* 116:43-49) 유래의 결실 플라스미드 pYJ188을 *des* 클러스터의 업스트림(upstream)과 다운스트림(downstream) 양측면에 상동성을 띤 두 개의 1-kb 프래그먼트를 클로닝함으로써 제조하였다. *des* 클러스터의 업스트림 영역의 *Hind*III-*Pst*I 프래그먼트와 다운스트림 영역의 *Kpn*I-*Eco*RI 프래그먼트는 pYJ100으로부터 얻어진 다음(Hong JSJ et al. (2004) *FEMS Microbiol Lett* 238:291-399), 이어서 pGEM-3Zf(+)으로 서브클론되었다. *des* 클러스터의 업스트림과 다운스트림 세그먼트들을 포함하는, 결과적으로 얻은 *Hind*III-*Eco*RI 프래그먼트는 pYJ188로 명명되는 플라스미드를 형성하기 위하여 pKC1139로 형질전환되었다. 상기 플라스미드는 그 다음 플라스미드-매개 상동 재조합(plasmid-mediated homologous recombination)을 위하여 Pik PKS 결실 돌연변이체 DHS2001의 프로토플라스트 안으로 삽입되었다(Jung WS et al. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 763-769). 이중 교차(double crossover) 돌연변이체들은 아프라마이신 민감성 표현형과 서던 블롯 하이브리다이제이션에 의한 유전자형에 근거하여 동정되었다. 결과적으로 얻은 돌연변이체를 YJ028로 명명하였다.

<35>

des 클러스터는 상동재조합을 통해 DHS2001(Jung WS et al. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 763-769)의 염색체로부터 프레임 상으로(in-frame) 결실되었다. 몇몇 재조합 클론들로부터 게놈 DNA의 서던 하이브리다이제이션 분석이 일정 이중교차 재조합을 거친 돌연변이체를 동정하기 위하여 수행되었다(데이터 미도시됨). Pik PKS 및 *des* 결실 돌연변이체 YJ028의 배양 추출액을 LC/MS를 통해 분석하였으나 마크로락톤 아글리콘 및 글리코실화된 마크로라이드의 생성은 검출되지 않았다. YJ028의 배양액에 10-디옥시메티노라이드와 나르보노라이드를 주입하는 것은 상응하는 데소사미닐 화합물들의 생성을 유발하지 않았으며, 이는 *des* 클러스터가 활성화되지 않음을 의미하는 것으로 판단되었다(데이터 미도시됨).

<36>

실시예 3: 발현 플라스미드와 돌연변이체의 제조

<37>

중요한 중간 당(intermediate sugar)인 TDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose(도 2a)를 합성하고 마크로라이드 계열의 항생제에 대한 자가-내성(self-resistance)을 주기 위하여, *des*III, *des*IV 및 *des*R을 포함하는 통합 플라스미드(integrative plasmid) pYJ136이 사용되었다(Hong JSJ et al. (2004) *FEMS Microbiol Lett* 238:291-399). 플라스미드 pYJ136은 YJ069를 생성하기 위하여 돌연변이체 YJ028의 염색체 DNA 안으로 통합되었다. TDP-D-퀴노보스(도 2a)의 형질전환을 위한 *des*VII 및 *des*VIII를 포함하는 발현 플라스미드 pYJ142와, TDP-D-올리보스(도 2a)의 생합성과 형질전환을 위한 *ole*V, *ole*W, *urd*R, *des*VII 및 *des*VIII을 포함하는 발현 플라스미드 pYJ146이 제조되었다(Hong JSJ et al. (2004) *FEMS Microbiol Lett* 238:291-399). 네 개의 플라스미드 pYJ320, pYJ243, pYJ321 및 pYJ249가 TDP-D-퀴노보스와 TDP-D-올리보스의 생합성과 TyIMII/TyIMIII에 의한 이들의 형질전환을 위하여 하기와 같이 제작되었다. *ty*/MII 유전자는 서열 1 및 2의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 *S. fradiae*의 게놈 DNA로부터 증폭되었다: 5'-GAGGATCCGTCTGAGGCGCTCGCCGA-3' 및 5'-TGCGGGATCCCGTGGCGGATGAATGGGCC-3'(밑줄친 부분은 제한 부위임). *ty*/MII의 PCR 산물은 *Bam*HI로 잘라져서 pSE34(Yoon YJ et al. (2002) *Chem Biol* 9:203-214)의 같은 부위로 클론되어 pYJ320을 생성하였다. *Bam*HI로 잘라진 *ty*/MII는 또한 *ty*/MIII의 *Bam*HI-*Xba*I 프래그먼트를 포함하는 pSE34 유도체인 pYJ196(Hong JSJ et al. (2007) *Gene* 386:123-130)의 같은 부위에 형질전환되어 pYJ243을 생성하였다. *des*VII, *ole*V, *ole*W 및 *urd*R 유전자들이 클론되어진 pYJ144(Hong JSJ et al. (2004) *FEMS Microbiol Lett* 238:291-399)로부터 분리된 *ole*V, *ole*W 및 *urd*R 유전자들이 포함된 *Xba*I-*Hind*III 프래그먼트가 pYJ320으로 서브클론되어 pYJ321을 생성하였다. *ty*/MIII 유전자는 서열 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotides) 5'-ACCGTCTAGACGCGGGGAGAGAGAGAGGCC-3' 및 5'-CGGCGTCTAGACAGTGCCTTCTCACTCGGGGA-3'(밑줄친 부분은 제한 부위

임)를 이용하여 PCR에 의해 증폭되었다. *tylMIII* 유전자는 *XbaI*에 의해 잘라져서 pYJ249를 제작하기 위하여 pYJ321 안으로 클론되었다.본 발명에서 사용한 돌연변이체와 플라스미드를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

<38>

균주 또는 플라스미드	특징	참고문헌
균주		
<i>S. venezuelae</i> ATCC 15439	야생형	
DHS2001	<i>pikA</i> deletion mutant	Jung WS et al. (2006) <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> 72: 763-769
YJ028	<i>pikA</i> and <i>pikB</i> (<i>des</i>) deletion mutant	본 발명
YJ069	YJ028/pYJ136	본 발명
플라스미드		
pSET152	Shuttle vector for <i>E.coli</i> and <i>Streptomyces</i>	Bierman M et al. (1992) <i>Gene</i> 116:43-49
pSE34	Shuttle vector for <i>E.coli</i> and <i>Streptomyces</i>	Yoon YJ et al (2002) <i>Chem Biol</i> 9:203-214
pYJ136	<i>desR</i> , <i>desIII</i> , <i>desIV</i>	Hong JSJ et al. (2004) <i>FEMS Microbiol Lett</i> 238:291-399
pYJ142	<i>desVII</i> , <i>desVIII</i>	Hong JSJ et al. (2004) <i>FEMS Microbiol Lett</i> 238:291-399
pYJ243	<i>tylMII</i> , <i>tylMIII</i>	본 발명
pYJ146	<i>desVII</i> , <i>desVIII</i> , <i>oleV</i> , <i>oleW</i> , <i>UrdR</i>	Hong JSJ et al. (2004) <i>FEMS Microbiol Lett</i> 238:291-399
pYJ249	<i>tylMII</i> , <i>tylMIII</i> , <i>oleV</i> , <i>oleW</i> , <i>UrdR</i>	본 발명
pYJ320	<i>tylMII</i>	본 발명
pYJ196	<i>tylMIII</i>	Hong JSJ et al. (2007) <i>Gene</i> 386:123-130
pYJ144	<i>desVII</i> , <i>oleV</i> , <i>oleW</i> , <i>UrdR</i>	Hong JSJ et al. (2004) <i>FEMS Microbiol Lett</i> 238:291-399
pYJ321	<i>tylMII</i> , <i>oleV</i> , <i>oleW</i> , <i>UrdR</i>	본 발명

<39>

핵심 중간당인 TDP-4-케토-6-디옥시-D-글루코스(도 2a)의 생합성을 위한 *desIII*, *desIV*와 마크로라이드 계열의 항생제에 대한 자가-내성을 부여하기 위한 *desR*을 포함하는 통합 플라스미드 pYJ136(Hong et al. 2004)이 YJ069를 얻기 위하여 YJ028의 염색체 DNA에 통합되었다. 보리소바(Borisova) 등은 상기 중간당이 야생형 *S. venezuelae*의 특수 경로-독립 환원능(specific pathway-independent reduction capability)에 의해 TDP-D-퀴노보스로 전환되므로 두 개의 유전자(*desIII*, *desIV*)로도 TDP-D-퀴노보스(도 2)의 생합성이 충분하다고 보고한바 있다(Borisova SA et al. (1999) *Org Lett* 1:133-136).

<40>

TDP-D-퀴노보스의 형질전환에 관여하는 두 개의 유전자(*desVII* 및 *desVIII*)를 포함하는 플라스미드 pYJ142와, TDP-D-올리보스의 생합성과 형질전환에 관여하는 다섯개의 유전자(*oleV*, *oleW*, *urdR*, *desVII* 및 *desVIII*)을 포함하는 플라스미드 pYJ146(Hong et al. 2004)이 돌연변이체 YJ069 안으로 형질전환되어 YJ069/pYJ142 및 YJ069/YJ146을 각각 생성하였다.

<41>

실시예 4: 10-디옥시메티노라이드, 나르보노라이드 및 틸락톤의 생합성 및 정제

<42>

10-디옥시메티노라이드와 나르보노라이드를 축적하는 *des* 결실 돌연변이체 YJ003(Hong et al. 2004)를 SPA 고체배지(Yoon et al. 2002) 상에서 적절한 항생제, 아프라마이신(apramycin, 0.5mg/mL)을 첨가하여 30℃에서 3일 동안 배양하였다. 틸락톤을 축적하는 돌연변이체 *S. venezuelae* YJ005(Jung et al. 2006)를 R2YE 고체배지(Kieser T et al. (2000) *Practical Streptomyces genetics*, John Innes Centre, Norwich) 상에서 적절한 항생제, 아프라마이신(apramycin, 0.5mg/mL)을 첨가하여 30℃에서 4일 동안 배양하였다. YJ003과 YJ005의 아가 플레이트 상에서 성장한 배양균(agar-grown culture)을 주사위 모양으로 잘라 배양균 부피의 2배에 해당하는 메탄올로 추출하였다. 상기 YJ003과 YJ005의 추출물을 동일 부피의 물로 세척한 다음 동일 부피의 에틸아세테이트로 추출하였다. YJ003과 YJ005의 조추출물을 정제하여(Lee SK et al. (2006) *J Nat Prod* 69:847-849) 정제된 10-디옥시메티노라이드, 나르보노라이드 및 틸락톤을 제조하였다. 얻어진 화합물의 순도(purity)는 액체

크로마토그래피/질량 분광광도계(LC/MS)와 탠덤 질량분석계(MS/MS)를 이용하여 측정하였다. 틸락톤 표준 물질은 에릭 킨들리페 교수 실험실(Professor Eric Cundliffe, University of Leicester)로부터 입수하였다.

<43>

본 발명에서 제작된 돌연변이체 *S. venezuelae* 내에서의 TDP-D-퀴노보스와 TDP-D-올리보스의 생합성을 확인하기 위하여, 10-디옥시메티노라이드 또는 나르보노라이드를 각 YJ069/pYJ142 및 YJ069/pYJ146의 성장 배지에 주입하였다. 10-디옥시메티노라이드와 나르보노라이드(도 2b)의 퀴노보실 유도체는 각각 $m/z=465$ 의 보유시간이 22.5분(도 3a)인 것과, $m/z=521$ 의 보유시간이 24.7분(도 3b)인 것으로 나타났다.

<44>

<45>

실시예 5: 돌연변이체 *S. venezuelae* 내에서의 마크로라이드 생합성 및 분석

<46>

각각의 돌연변이체 *S. venezuelae* 즉, YJ069/pYJ142, YJ069/pYJ146, YJ069/pYJ243 또는 YJ069/pYJ249를 50mL의 SCM 액체배지에서 적절한 항생제, 아프라마이신(apramycin, 0.5mg/mL)을 첨가하여 30℃ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 0.5mg의 정제된 틸락톤을 상기 각 배양액에 첨가한 다음 48시간 동안 추가 배양하였다. 결과적으로 얻은 배양액을 동일 부피의 클로로포름으로 추출한 다음 메탄올로 농축하였다. 얻어진 생성물을 LC/MS와 MS/MS를 조합 이용하여 분석하였다. LC는 이중 이동상[용매 A: 5mM 암모늄 아세테이트 버퍼에 아세토니트릴(acetonitrile)/메탄올 4:1 혼합용매; 용매 B: 5mM 암모늄 아세테이트 수용액; A: 20-75%, 30분, 75%, 10분, 75-20%, 10분]이 형성된 엑스테라(Xterra) 컬럼(4.6 mm×15 mm, 5 μ m)을 사용하여 유속 0.15 mL/min에서 워터스(Waters, Milford, MA) 모델 2690 분리모듈로 수행하였다. 얻어진 유출물은 마이크로매스(Beverly, MA) 콤팩트 LC 트리플 탠덤 사중극자 질량 분석계(Micromass Quattro LC triple tandem quadrupole mass spectrometer)에 주입한 다음 질량 분광학적 데이터는 양-이온 모드(positive-ion mode)로 수집하였다. 얻어진 화합물의 상대량은 LC/MC 크로마토그램으로부터 얻은 피크 세기를 이용하여 비교하였다. 글리코실화된 화합물의 수율은 다섯 번 수행하여 얻은 배양액과 추출액의 평균값으로 하였다.

<47>

먼저, DesVII의 작용에 의하여 어떤 퀴노보실 및 올리보실 틸락톤(도 2b)이 합성되는지를 조사하기 위하여, 틸락톤을 YJ069/pYJ142 및 YJ069/pYJ146의 성장 배지에 첨가하였다. 틸락톤이 주입된 YJ069/pYJ142의 유기 추출물을 LC/MS를 통해 분석한 결과, 퀴노보실 틸락톤(도 3c)에 해당하는 $m/z=563$ 의 피크가 보유시간 28.5분에서 관찰되어졌다. 틸락톤을 주입한 YJ069/pYJ146의 유기 추출물에서는 올리보실 틸락톤(도 3f)에 해당하는 $m/z=547$ 의 피크가 보유시간 30.9분에서 관찰되어졌다. MS/MS 분석 결과, $m/z=547$ 피크의 올리보실 틸락톤은 올리보실 틸락톤의 탈수형(dehydrated form)에 해당하는 $m/z=528$ 의 특징적인 이온 피크, 올리보스(o)의 유실을 나타내는 $m/z=417$ 의 피크, 및 틸락톤의 탈수형에 해당하는 $m/z=399$ 의 피크를 나타내었다(도 4b). 표준 틸락톤의 MS/MS 분리 패턴(fragmentation pattern)은 도 4c에 나타내었다. 틸락톤의 8% 및 3% 정도가 각각 퀴노보실 틸락톤 및 올리보실 틸락톤으로 전환되었다.

<48>

한편, *S. fradiae* 유래의 또 다른 글리코실트랜스퍼라제인 TyIMII와 이의 파트너 단백질 TyIMIII를, 합성 디옥시당(Gaisser S et al. (2000) *Mol Microbiol* 36:391-401; Melancon III CE et al. (2005) *J Am Chem Soc* 127:12240-12241)을 이의 천연 디옥시당은 물론 천연 아글리콘과 틸락톤으로 전환하고 마이카르미노스(mycarminose)를 합성 하이브리드 아글리콘(hybrid aglycones)(Reeves CD et al. (2004) *Chem Biol* 11:1465-1472)으로 전환하기 위하여 사용하였다. 본 발명에서는 TDP-D-퀴노보스와 TDP-D-올리보스를 포함하는 합성 디옥시당과, 10-디옥시메티노라이드, 나르보노라이드 및 틸락톤을 포함하는 아글리콘에 대한 TyIMII의 기질 유연성을 조사하였다. TDP-D-퀴노보스 또는 TDP-D-올리보스 디옥시당 경로가 발현되는 YJ069/pYJ243과 YJ069/pYJ249의 성장 배지 각각에 TyIMII/TyIMIII를 코딩하는 유전자와 더불어 10-디옥시메티노라이드 또는 나르보노라이드를 주입하였다. 10-디옥시메티노라이드와 나르보노라이드가 주입된 YJ069/pYJ243과 YJ069/pYJ249 돌연변이체로부터 얻은 추출물을 LC/MS로 분석하였으나, 10-디옥시메티노라이드와 나르보노라이드 유도체에 해당하는 피크가 관찰되지 않았으며, 이는 성장 배지내에 해당 글리코실화 화합물들이 존재하지 않음을 의미하는 것으로 판단되었다. 더 나아가, 틸락톤을 YJ069/pYJ243 또는 YJ069/pYJ249의 성장 배지에 주입하였다. LC/MS 분석을 통해, 퀴노보스- 및 올리보스-글리코실화 화합물들에 해당하는 피크들을, DesVII/DesVIII가 글리코실트랜스퍼라제와 보조적 단백질 쌍(auxiliary protein pair)으로서 발현되어진 YJ069/pYJ243과 YJ069/pYJ249에 의해 생산된 이들 화합물들의 동일 보유시간에서 각각 관찰할 수 있었다. 이는 YJ069/pYJ243과 YJ069/pYJ249 성장배지 각각에 퀴노보실 틸락톤과 올리보실 틸락톤이 존재함을 입증하는 것이라 판단되었다. TyIMII에 의한 퀴노보스- 및 올리보스-글리코실화 화합물의 전환 수율은 틸락톤에 대하여 각각 7% 및 6% 정도였다.

발명의 효과

<49>

이상, 상기 실시예들을 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명은 뉴클레오타이드-활성화 당은 물론 글리코실트랜스퍼라제-보조적 단백질 쌍의 합성을 위한 *S. venezuelae* 돌연변이체를 제조하고, 이를 틸락톤과 함께 배양함으로써 신규한 글리코실화 마크로라이드인 올리보실 틸락톤을 제조할 수 있는 방법과 이를 통해 제조된 신규한 올리보실 틸락톤을 제공함으로써 기존의 항생제에 대해 내성을 지닌 세균들에 의한 질병을 치료하는데 있어 효과적인 항생물질을 합성할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있으므로 생물의약품산업 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 YC-17, 나르보마이신 및 5-O-마이카미노실 틸락톤의 생합성 경로를 나타낸 것이다. 이때 a는 DesVII/DesVIII가 TDP-D-테소사민을 10-디옥시메티노라이드 및 나르보노라이드에 붙이는 것을, b는 TyIMII/TyIMIII가 TDP-D-마이카미노스를 틸락톤에 붙이는 것을 나타낸다.

<2>

도 2는 TDP-D-테소사민, TDP-D-퀴노보스 및 TDP-D-올리보스의 생합성을 위한 경로(a)와 퀴노보실 및 올리보실 글리코실화 마크로라이드의 구조(b)를 나타낸다.

<3>

도 3은 DesVII에 의해 생산된 퀴노보실 및 올리보실 유도체의 LC/MS 분석 결과이다. 이때 a는 퀴노보실 10-디옥시메티노라이드, b는 퀴노보실 나르보노라이드, c는 퀴노보실 틸락톤, d는 올리보실 10-디옥시메티노라이드, e는 올리보실 나르보노라이드, f는 올리보실 틸락톤에 해당된다.

<4>

도 4는 DesVII에 의해 생산된 퀴노보실 및 올리보실 틸락톤의 MS/MS 분석결과이다. 이때 a는 퀴노보스(q)-글리코실화 틸락톤, b는 올리보스(o)-글리코실화 틸락톤, c는 틸락톤 표준물질에 해당된다.

<5>

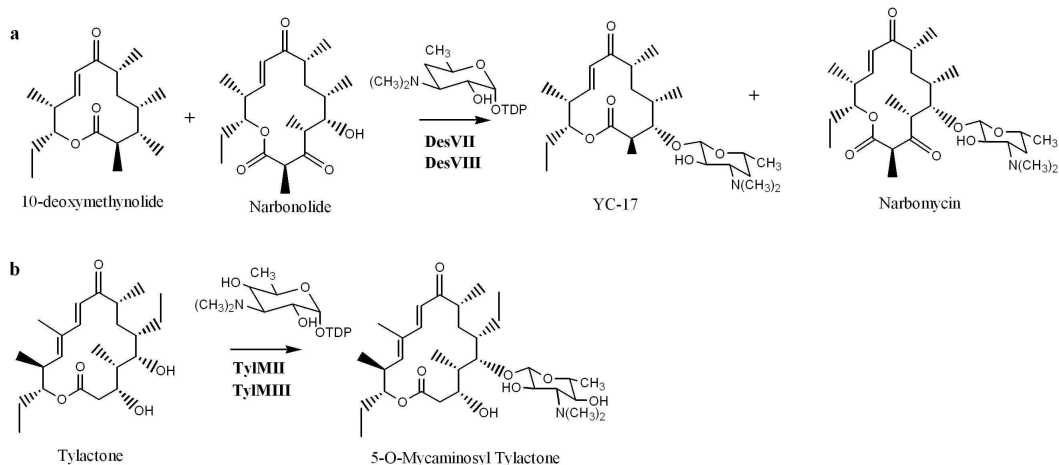
도 5는 pYJ146의 개열지도를 나타낸다.

<6>

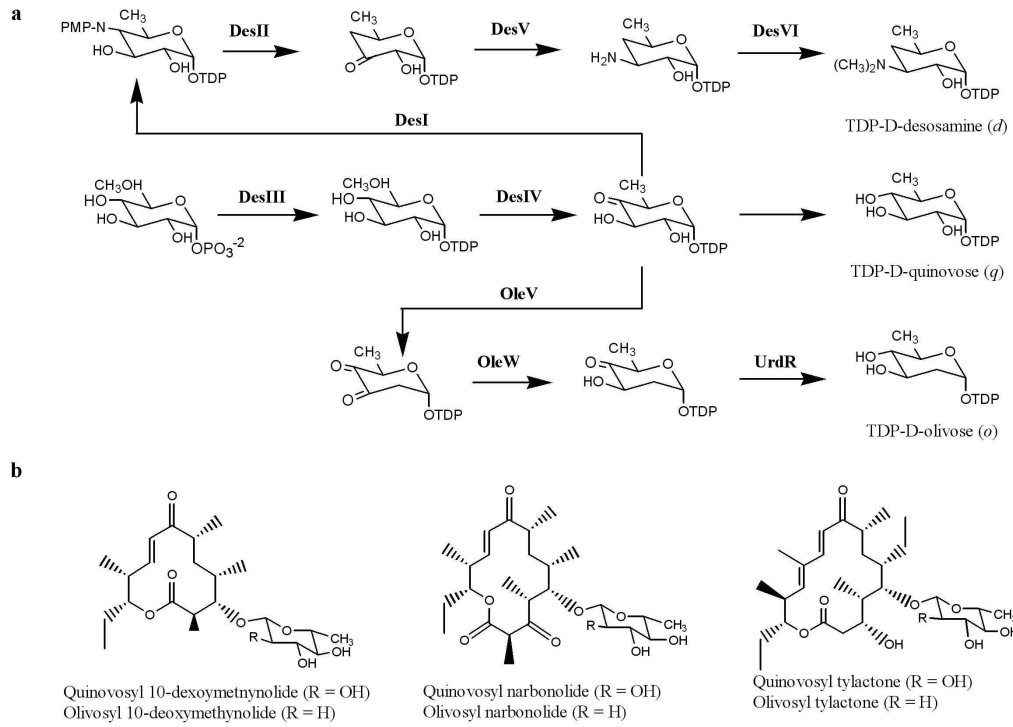
도 6은 pYJ249의 개열지도를 나타낸다.

도면

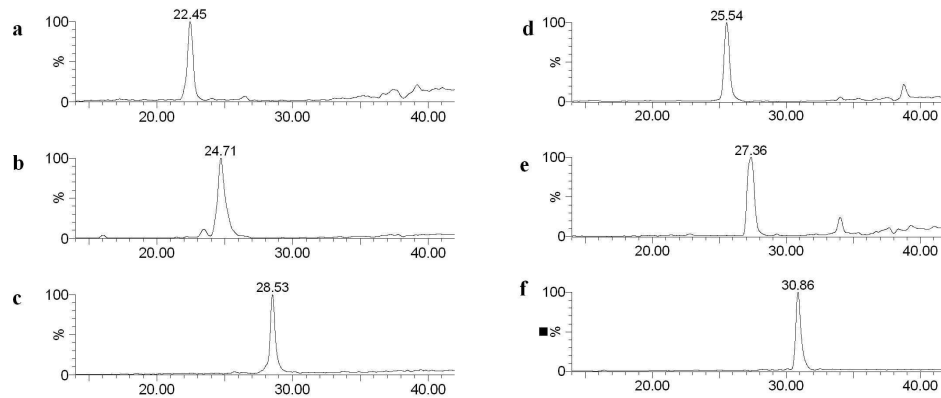
도면1



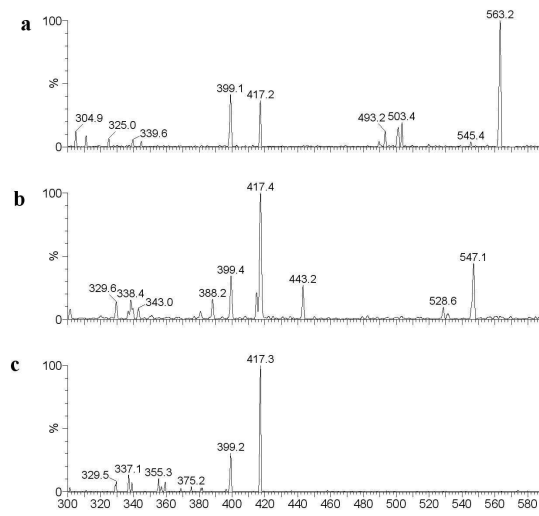
도면2



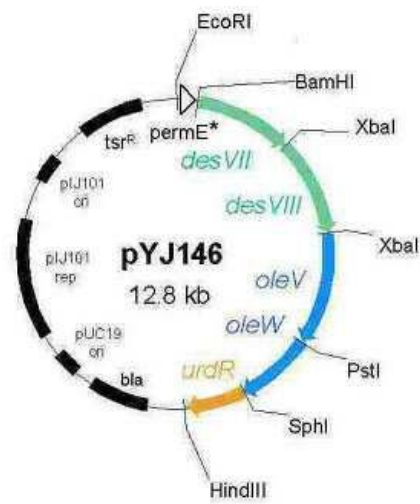
도면3



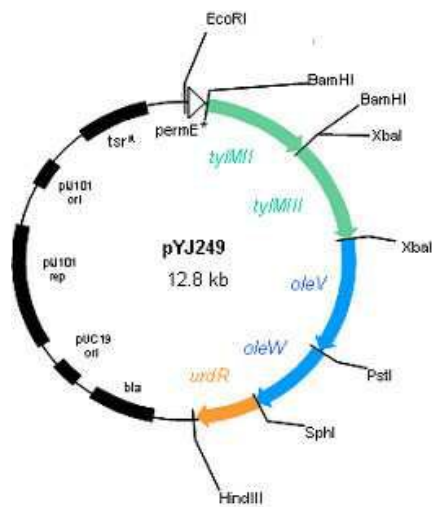
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> YOON, Yeo-Joon
<120> New olivosyl ty lactone and its preparation method

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 1
gaggatccgt ctgagggcgc tcgccga

27

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 2
tgcgggatcc ccgtggcgga tgaatgggcc 30

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 3
accgttctag acggcgggga gagaggagag gcc 33

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 4
cggcgtctag acagtgcct tctcactcgg gga 33