(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0052226
(43) 공개일자 2018년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01) *C12P 17/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1007 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0149284
(22) 출원일자 2016년11월10일
심사청구일자 2016년11월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
부성희
경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 10, 109동 1003호(보라동, 민속마을 쌍용아파트)
조만호
경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 14, 108동 904호(상갈동, 금화마을대우현대1단지아파트)
이단비
경기도 고양시 일산서구 일산로 488, 1302동 701호(일산동, 후곡마을13단지아파트)
(74) 대리인
임상엽, 권정기

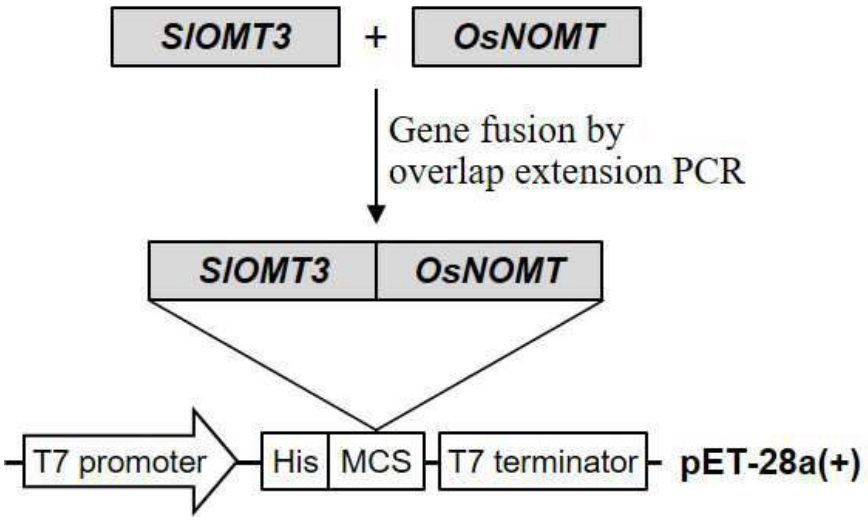
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **융합 플라보노이드 0-메틸전이효소 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 일 예는 복수 개의 플라보노이드 0-메틸전이효소가 결합된 것으로서, 상기 결합된 복수 개의 플라보노이드 0-메틸전이효소는 플라보노이드에 존재하는 서로 다른 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 0-메틸전이효소를 제공한다. 본 발명에 따른 융합 플라보노이드 0-메틸전이효소는 한 번의 단계를 통해 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드를 폴리메톡시플라보노이드로 생물전환시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 융합 플라보노이드 0-메틸전이효소를 사용하면 폴리메톡시플라보노이드의 제조 공정을 간소화할 수 있고 제조 시간을 단축시킬 수 있으며, 생산성을 향상시킬 수 있다. 본 발명에 따른 융합 플라보노이드 0-메틸전이효소에 의해 제조된 폴리메톡시플라보노이드는 의약품, 화장품, 식품 등에서 기능성 소재로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 9/96 (2013.01)
C12P 17/06 (2013.01)
C12Y 201/01 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01107501
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 복합 스트레스 저항성 벼 개발을 위한 페닐프로파노이드 경로 유전자 기능 규명
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소가 결합된 것으로서,

상기 결합된 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 플라보노이드에 존재하는 서로 다른 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기의 식 (Ⅰ)로 표현되는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 :

$OMT1-(L)_n-OMT2$ (Ⅰ)

상기 식 (Ⅰ)에서,

OMT1은 플라보노이드에 존재하는 소정 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소이고;

OMT2는 플라보노이드에 존재하는 하이드록실기 중 OMT1이 작용하는 하이드록실기와 다른 위치에 존재하는 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소이고;

L은 펩티드 링커이고;

n은 0 또는 1에서 선택되는 정수이다.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 OMT1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 OMT2는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 OMT1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소이고 OMT2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 2~20개의 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 GD, EAAAK, EAAAKGD, GSGGGS, GSGGGGSGGGS, GGGGSGGGSGGGSG, GGSGGT, GGGGS 또는 GGGGSGGGGS의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 8

제2항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소.

청구항 9

제1항의 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 10

제9항에 있어서, 하기의 식 (Ⅱ)로 표현되는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자 :

$OMT1X-(LX)_n-OMT2X$ (Ⅱ)

상기 식 (Ⅱ)에서,

OMTX1은 플라보노이드에 존재하는 소정 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소인 OMT1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고;

OMTX2는 플라보노이드에 존재하는 하이드록실기 중 OMT1이 작용하는 하이드록실기와 다른 위치에 존재하는 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소인 OMT2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고;

LX는 펩티드 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고;

n은 0 또는 1에서 선택되는 정수이다.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 OMT1X는 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 12의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 13의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 14의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 16의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 OMT2X는 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 12의 염기 서열을

갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 13의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 14의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 16의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 OMT1X은 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드이고 OMT2X는 서열번호 12의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 2~20개의 아미노산으로 구성되는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 GD, EAAAK, EAAAKGD, GSGGGS, GSGGGGSGGGS, GGGGSGGGSGGGSG, GGSGGT, GGGGS 또는 GGGGSGGGGS의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 16

제10항에 있어서, 서열번호 17의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 18의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 19의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 20의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자.

청구항 17

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항의 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자가 도입된 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 19

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 또는 상기 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 발현하는 형질전환체의 존재하에 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드 및 메틸 공여체를 반응시켜 폴리메톡시플라보노이드를 생성하는 단계; 및

상기 생성된 폴리메톡시플라보노이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드,

서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 기질 플라보노이드는 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(luteolin), 에리오딕티올(eriodictyol) 및 탁시폴린(taxifolin)으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 메틸 공여체는 S-아네도실-L-메티오닌, 콜린, 베타인, 5-메틸테르아히드로엽산 및 다이메틸테틴으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 폴리메톡시플라보노이드는 람나진(rhamnazin), 벨루틴(velutin), 3',7-O-다이메틸에리오딕티올(3',7-O-dimethyleriodictyol) 및 3',7-O-다이메틸탁시폴린(3',7-O-dimethyltaxifolin)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 플라보노이드 O-메틸전이효소 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 융합 단백질 형태의 신규 플라보노이드 O-메틸전이효소, 신규 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 융합 유전자, 융합 유전자가 도입된 발현벡터, 신규 플라보노이드 O-메틸전이효소를 발현하는 형질전환체, 신규 플라보노이드 O-메틸전이효소를 이용하여 폴리메톡시플라보노이드를 제조하는 방법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 플라보노이드(flavonoid)는 식물이 생산하는 이차 대사 산물로서 현재까지 약 9000종의 구조가 규명되었다. 플라보노이드는 항산화효과를 비롯하여 항암성, 항비이러스성, 항균성 등 다양한 생리 효과가 알려져 있다. 또한, 식품 성분으로서, 플라보노이드는 건강 촉진 및 질병 예방 기능을 가지고 있는 것으로 여겨지고 있다. 최근, 플라보노이드는 만성적인 인간 질환을 치료하기 위한 강력한 치료제로서 연구되고 있다.

[0003] 상기와 같은 플라보노이드의 다양한 생리학적 기능 및 생물학적 활성은 그들의 구조적인 다양성에서 기인한다. 상기 구조적인 다양성은 C 고리의 산화 정도 및 플라보노이드의 탄소 골격에서의 치환 정도에 기초하고 있다. 플라보노이드의 구조적 변형은 플라보노이드의 생물학적 활성을 증진시키거나 변화시킨다. 예를 들어, 플라보노이드의 생리활성 및 물리화학적 특성은 메틸화(methylation), 히드록실화(hydroxylaton), (이소)프레닐화[(iso)prenylation], 설폰화(sulfonation), 글리코실화(glycosylation) 등과 같은 구조 변형을 통해 변화되거나 향상될 수 있다. 이 중 효소를 이용한 플라보노이드 O-메틸화는 AdoMet(S-adenosyl-L-methionine)으로부터 메틸기를 수용체 분자의 하이드록실기로 전이시키는 활성을 지니는, 플라보노이드 O-메틸전이효소(Flavonoid O-methyltransferase, FOMT)에 의해 촉매될 수 있다. FOMT는 일반적으로 AdoMet를 메틸 공여자로 사용하나, FOMT의 종류에 따라 플라보노이드 구조에 대한 선택성 및 히드록실화 패턴이 상이하다. 따라서 특정 플라보노이드 변형에 있어서는 기질 및 위치 특이성이 서로 부합하는 적절한 FOMT가 선택되어야 하며, FOMT의 활성을 지닌 효소로 밝혀졌더라도 생물 공학에 적용하기 위해서는 그의 기질 특이성 및 위치 특이성이 규명되어야 한다. 플라보노이드의 메틸화는 플라보노이드의 반응성을 감소시키고 항균력을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드 중 quercetin은 양파와 사과 등에서 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. Quercetin은 항산화효과가 뛰어난 물질로 알려져 있고 이것은 6개의 하이드록실기를 함유하고 있어서 메틸화(methylation)를 통해 메톡시기를 가지는 다양한 quercetin 유도체를 만들 수 있다. 예를 들어, 대한민국 공개특허 제10-2015-0065439호에는 스트렙토마이시스 퍼시셔스(*Streptomyces peucetius*) ATCC 27952 유래 플라보노이드 O-메틸전이효소인 SpOMT2884 및 이를 이용하여 7,8-다이하이드록시플라본, 루테올린, 퀘세틴, 나린제닌, 피세틴, 폴모노네틴, 루틴 또는 다이드제인으로부터 메틸화 플라보노이드를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허 제10-1342774호에는 Micro-Tom 토마토 유래 플라보노이드 O-메틸전이효소인 *Si*OMT3 및 이를 이용하여 에리오딕티올(Eryodictiol), 루테올린(Luteolin), 트리세틴(Tricetin), 퀘르세틴(Quercetin), 미리세틴(Myricetin) 및 라리시트린(Laricitrin)으로부터 각각 호모에리오딕티올(Homoeryodictiol), 크리소에리올(Chrysoeriol), 이소람네틴(Isorhamnetin), 라리시트린(Laricitrin) 및 시린게틴(Syringetin)을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

[0004] 한편, 다이메톡시플라보노이드(Dimethoxyflavonoid) 등과 같은 폴리메톡시플라보노이드는 다양한 유용 생리활성을 가지고 있으나 대부분의 식물체에서 미량으로 존재하기 때문에 산업적 이용이 제한되고 있다. 따라서, 따라서 식물체에 풍부하게 존재하는 플라보노이드로부터 폴리메톡시플라보노이드를 효율적으로 제조하는 방법의 개발이 필요하다. 예를 들어, 다이메톡시플라보노이드(Dimethoxyflavonoid)는 플라보노이드 화합물의 하이드록실기에 대한 메틸화에 의하여 생합성 된다. 플라보노이드 화합물의 하이드록실기에 대한 메틸화는 플라보노이드 O-메틸전이효소(flavonoid O-methyltransferase, FOMT)가 촉매하며, 대부분의 FOMT는 다양한 플라보노이드 화합물을 기질로 사용하는 광범위 기질 특이성을 가지는 반면, 플라보노이드 화합물의 특정 위치에 있는 하이드록

실기에 메틸기를 도입하는 위치 특이성(regiospecificyty)을 가진다. 종래에는 하나의 FOMT를 이용하여 하나의 메틸기를 가진 모노메톡시플라보노이드(monomethoxyflavonoid)를 생산하는 연구는 주로 수행되었다. 하지만, 다이메톡시플라보노이드(dimethoxyflavonoid)는 두 개의 다른 위치에 있는 하이드록실기의 수소 원자가 메틸기로 치환되어야 하므로 다이메톡시플라보노이드(dimethoxyflavonoid) 화합물의 합성을 위해서는 두 개의 서로 다른 위치 특이성을 가진 FOMT가 필요하다. 두 개의 서로 다른 위치 특이성을 가진 FOMT를 이용하여 다이메톡시플라보노이드(dimethoxyflavonoid) 화합물을 합성하기 위해서는 두 단계의 메틸전이(methyltransferation) 반응이 필요하며, 이로 인해 노동력, 시간 및 비용이 많이 소요되고 반면 최종 생산 효율은 떨어지는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 한 번의 단계를 통해 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드를 폴리메톡시플라보노이드로 생물전환시킬 수 있는 효소 및 이의 다양한 용도를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 효소의 활성은 일반적으로 단백질의 3차 구조와 밀접한 관련이 있다. 서로 다른 활성을 가진 효소들을 융합하면 효소 각각의 3차 구조에 변형이 생겨 개별적인 활성들이 모두 발휘되지 못하는 경우가 빈번히 발생한다. 본 발명의 발명자들은 플라보노이드의 서로 다른 위치에 존재하는 하이드록실기에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환하는 촉매 활성을 가진 2개의 플라보노이드 O-메틸전이효소를 융합하였을 때 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소에서 융합된 효소 각각의 O-메틸화 촉매 활성이 모두 발휘되고, 상기 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 이용하여 기질 플라보노이드로부터 폴리메톡시플라보노이드를 제조할 때 제조 공정이 간소화되고 제조 시간이 단축되며 생산성이 향상되는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소가 결합된 것으로서, 상기 결합된 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 플라보노이드에 존재하는 서로 다른 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 것을 특징으로 하는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 제공한다.

[0008] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자를 제공한다.

[0009] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0010] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명의 일 예는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자 또는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0011] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 또는 상기 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 발현하는 형질전환체의 존재하에 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드 및 메틸 공여체를 반응시켜 폴리메톡시플라보노이드를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 폴리메톡시플라보노이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 한 번의 단계를 통해 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드를 폴리메톡시플라보노이드로 생물전환시킬 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 사용하면 폴리메톡시플라보노이드의 제조 공정을 간소화할 수 있고 제조 시간을 단축시킬 수 있으며, 생산성을 향상시킬 수 있다. 본 발명에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소에 의해 제조된 폴리메톡시플라보노이드는 의약품, 화장품, 식품 등에서 기능성 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 플라바논(Flavanone) 및 플라바노놀(Flavanonol)의 구조와 이에 속하는 화합물을 나타낸 것으로서, 3가지 고리 및 탄소 위치의 넘버링을 보여준다.

도 2는 플라본(Flavone) 및 플라보놀(Flavonol)의 구조와 이에 속하는 화합물을 나타낸 것이다.

도 3은 이소플라본(Isoflavone)의 구조와 이에 속하는 화합물을 나타낸 것이다.

도 4는 플라바논(Flavanone)의 골격 구조를 나타낸 것이고, 도 5는 플라바노놀(Flavanonol)의 골격 구조를 나타낸 것이고, 도 6은 플라본(Flavone)의 골격 구조를 나타낸 것이고, 도 7은 플라보놀(Flavonol)의 골격 구조를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에서 His-태그된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현 벡터를 제작하는 과정을 나타낸 것이다.

도 9는 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소를 정제하고 이의 분자량을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 10은 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 플라보노이드 O-메틸전이효소 활성을 측정한 결과이다.

도 11은 직접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 플라보노이드 O-메틸전이효소 활성을 측정한 결과이다.

도 12는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소가 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 하이드록실기를 가지는 플라보노이드를 기질로 사용하여 한 단계만의 반응 경로를 통해 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 메톡시기를 가지는 플라보노이드를 생산하는 과정을 나타낸 것이다.

도 13은 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로 형질전환된 *E. coli*를 이용한 비메틸화 플라보노이드의 생물전환 동력학 특성을 나타낸 것이다.

도 14는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로 형질전환된 *E. coli*를 이용하여 일 단계 생물전환에 의해 다른 농도의 비메틸화 플라보노이드로부터 다이메톡시플라보노이드를 생산한 결과를 반응 시간별로 나타낸 것이고, 도 15는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로 형질전환된 *E. coli*를 이용하여 일 단계 생물전환에 의해 다른 농도의 비메틸화 플라보노이드로부터 다이메톡시플라보노이드를 생산한 결과를 최대 수율과 최대 생성량으로 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명에서 언급한 다양한 플라보노이드의 화학 구조를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어인 "플라보노이드 O-메틸전이효소"는 플라보노이드에 존재하는 특정 위치의 하이드록실기에 메틸기를 전이시켜 하이드록실기를 메톡시기로 치환하는 반응에 대해 촉매 활성을 가지는 효소를 나타낸다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 용어인 "융합 플라보노이드 O-메틸전이효소"는 융합 단백질 또는 융합 폴리펩티드 형태의 플라보노이드 O-메틸전이효소를 나타낸다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어인 "폴리메톡시플라보노이드(polymethoxylated flavonoid or polymethoxyflavonoid)"는 분자 내에 적어도 2개의 메톡시기(methoxy group)를 가지는 플라보노이드 화합물을 나타낸다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어인 "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"는 별다른 설명이 없는 한, 상호 호환되는 개념으로 사용될 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어인 "융합 단백질"은 기능이 다른 2개 이상의 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이 서로 연결된 형태의 중합체를 의미한다. 본 발명에서 융합 단백질은 융합 폴리펩티드, 융합 올리고펩티드, 재조합 폴리펩티드, 재조합 올리고펩티드 또는 재조합 단백질과 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어인 "폴리뉴클레오티드"는 비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일-및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥영역의 혼합물인 RNA, 단일- 또는 이중 가닥, 또는 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명에서 폴리뉴클레오티드는 핵산 분자 또는 올리고뉴클레오티드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어인 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합

완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어인 "형질전환체"는 하나 이상의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 발현 벡터가 숙주 세포, 숙주 미생물, 숙주 식물, 숙주 곤충, 숙주 동물 등과 같은 숙주에 도입되어 형질전환된 생명체를 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어인 "플라보노이드"는 식물 이차 대사물(Plant secondary metabolite) 중 하나로서, 플라바논(Flavanone), 플라바노놀(Flavanonol), 플라본(Flavone) 및 플라보놀(Flavonol) 등로 분류될 수 있다. 도 1 내지 도 3에서 보이는 바와 같이 상기 플라보노이드는 A, B 및 C 고리로 명명되는 3가지 고리를 포함한다.

[0023] 플라바논(Flavanone)은 도 4와 같은 기본 골격을 가지는 플라보노이드의 한 종류로서, 그 예로 헤스페레틴(Hesperetin), 나린게닌(Naringenin), 에리오딕티올(Eriodictyol) 및 호모에리오딕티올(Homoeriodictyol)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라바논은 다른 플라보노이드와 달리 C 고리가 포화되어 있는 특성이 있다.

[0024] 플라바노놀(Flavanonol)은 3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one을 골격으로 사용하는 플라보노이드의 한 종류로서, 도 5와 같은 기본 골격을 가진다. 상기 플라바노놀(Flavanonol)은 3-히드록시플라바논(3-Hydroxyflavanone) 또는 2,3-다이하이드로플라보놀(2,3-dihydroflavonol)로 명명될 수 있으며, 다이하이드로퀘르세틴(Dihydroquercetin, Taxifolin) 또는 다이하이드드로캠프페롤(Dihydrokaempferol)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 플라본(Flavone)은 2-phenylchromen-4-one(2-phenyl-1-benzopyran-4-one)을 기본 골격으로 하는 플라보노이드의 한 종류로서 도 6과 같은 기본 골격을 가진다. 상기 플라본의 예로 루테올린(Luteolin), 아피게닌(Apigenin), 트리세틴(Tricetin) 및 탄제리틴(Tangeritin)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 플라보놀(Flavonol)은 3-Hydroxyflavone 골격을 가지는 플라보노이드의 한 종류로서, 도 7과 같은 기본 골격 구조를 가진다. 상기 플라보놀의 예로 퀘르세틴(Quercetin), 캠프페롤(Kaempferol), 미리세틴(Myricetin), 피세틴(Fisetin), 이소람네틴(Isorhamnetin), 라리시트린(Laricitrin), 시린게틴(Syringetin), 파치포돌(Pachypodol) 및 람나진(Rhamnazin)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0029] 본 발명의 일 측면은 한 번의 단계를 통해 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드를 폴리메톡시플라보노이드로 생물전환시킬 수 있는 효소에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 효소는 융합 단백질 또는 융합 폴리펩티드 형태를 갖는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소이다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소가 결합된 것으로서, 상기 결합된 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 플라보노이드에 존재하는 서로 다른 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 구성하는 상기 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소는 어떠한 매개자 없이 서로 직접적으로 연결될 수도 있고, 펩티드 링커와 같은 매개자에 의해 간접적으로 연결될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 예에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 바람직하게는 하기의 화학식 (Ⅰ)로 표현되는 폴리펩티드일 수 있다.

[0030] $OMT1-(L)_n-OMT2$ (Ⅰ)

[0031] 상기 식 (Ⅰ)에서, OMT1은 플라보노이드에 존재하는 소정 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소이고; OMT2는 플라보노이드에 존재하는 하이드록실기 중 OMT1이 작용하는 하이드록실기와 다른 위치에 존재하는 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소이고; L은 펩티드 링커이고; n은 0 또는 1에서 선택되는 정수이다.

[0032] 상기 식 (Ⅰ)에서 OMT1 또는 OMT2는 그 종류가 크게 제한되지 않으며 공지된 모든 플라보노이드 O-메틸전이효소에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 식 (Ⅰ)에서 OMT1 또는 OMT2는 공지된 플라보노이드 O-메틸전이효소뿐만 아니라 실질적으로 O-메틸화(O-methylation) 활성을 갖는 O-메틸전이효소 변이체를 포함한다. O-메틸전이효소 변이체는 공지된 플라보노이드 O-메틸전이효소의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산

서열을 가질 수 있다. 또한, O-메틸전이효소 변이체는 공지된 플라보노이드 O-메틸전이효소의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 식 (Ⅰ)에서 OMT1은 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 식 (Ⅰ)에서 OMT2는 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소는 토마토(*Solanum lycopersicum*)에서 유래하고 3'번 탄소 위치 또는 5'번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환시키는 촉매 활성을 가진다. 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소와 관련하여, 본 발명의 발명자가 이전에 출원하여 등록받은 대한민국 등록특허 제10-1342774호에 개시된 내용을 모두 참조한다. 상기 3' 탄소 위치 또는 5' 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드의 예로는 에리오딕티올, 탁시폴린, 루테올린, 트리세틴, 퀘르세틴, 미리세틴 또는 라리시트린 등이 있다. 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소는 벼(*Oryza sativa*) 에서 유래하고 7번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환시키는 촉매 활성을 가진다. 상기 7번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드의 예로는 나린제닌(Naringenin) 등이 있다. 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소는 페퍼민트(*Mentha piperita*)에서 유래하고 8번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환시키는 촉매 활성을 가진다. 상기 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소는 페퍼민트(*Mentha piperita*)에서 유래하고 4'번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환시키는 촉매 활성을 가진다. 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이는 일일초(*Catharanthus roseus*)에서 유래하고 4'번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환시키는 촉매 활성을 가진다. 상기 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이는 허브 식물인 *Chrysosplenium americanum*에서 유래하고 3번 탄소 위치에 하이드록실기(hydroxyl group)를 가지는 플라보노이드에 작용하여 하이드록실기를 메톡시기로 전환시키는 촉매 활성을 가진다. 또한, 상기 식 (Ⅰ)에서 상기 OMT1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소이고 OMT2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소인 것이 더 바람직하다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소와 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소가 결합된 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(luteolin), 에리오딕티올(eriodictyol) 및 탁시폴린(taxifolin)으로 이루어진 군에서 선택되는 기질 플라보노이드에 작용하여 람나진(rhamnazin), 벨루틴(velutin), 3',7-O-다이메틸에리오딕티올(3',7-O-dimethyleriodictyol) 및 3',7-O-다이메틸탁시폴린(3',7-O-dimethyltaxifolin)으로 이루어진 군에서 선택되는 폴리메톡시플라보노이드로 전환시키는 촉매 활성을 가진다.

[0033] 상기 식 (Ⅰ)에서 펩티드 링거인 L은 단백질의 융합 또는 펩티드의 융합시 사용되는 공지의 다양한 펩티드 링커로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티는 링커는 2~40개의 아미노산으로 구성될 수 있고, 바람직하게는 2~20개의 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 글라이신(Gly,G) 잔기 및 세린(Ser,S) 잔기로 구성되는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 글라이신(Gly,G) 잔기 및 세린(Ser,S) 잔기로 구성되는 펩티드 링커는 GSGGGS, GSGGGGSGGGS 또는 GGGGSGGGSGGGSG의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 GD, EAAAK, EAAAKGD, GGSGGT, GGGGS 또는 GGGGSGGGGS의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 글라이신(Gly,G) 잔기로만 구성되는 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 링커는 2~15개의 연속되는 글라이신으로 구성되는 펩티드일 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 글라이신(Gly,G) 잔기, 프롤린(Pro, P) 잔기, 라이신 잔기(Lys, K), 아스파라진(Asn, N) 잔기, 세린(Ser,S) 잔기 또는 시스테인(Cys, C) 잔기에서 선택되는 2종 이상의 아미노산 잔기로 구성되는 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 링커는 GPNG, GGGKGGGG, GGGNGSGG, GGGCGGGG의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택될 수 있다.

[0034] 상기 식 (Ⅰ)로 표현되는 본 발명의 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 바람직하게는 서열번호 7의 아미노산

서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 상기 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소와 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소가 직접 결합된 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소이고, 상기 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소와 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소가 GD의 아미노산 서열을 갖는 펩티드 링커를 매개로 하여 결합된 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소이고, 상기 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소와 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소가 EAAK의 아미노산 서열을 갖는 펩티드 링커를 매개로 하여 결합된 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소이고, 상기 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소와 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소가 EAAKGD의 아미노산 서열을 갖는 펩티드 링커를 매개로 하여 결합된 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소이다.

[0036] 본 발명의 일 측면은 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소의 유전에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자는 전술한 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 이루어진다. 본 발명의 일 예에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자는 전술한 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 구성하는 복수 개의 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드들이 어떠한 매개자 없이 서로 직접적으로 연결될 수도 있고, 펩티드 링커을 코딩하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 매개자에 의해 간접적으로 연결될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 예에 따른 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자는 바람직하게는 하기의 화학식 (Ⅱ)로 표현되는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0037] $OMT1X-(LX)_n-OMT2X$ (Ⅱ)

[0038] 상기 식 (Ⅱ)에서, OMTX1은 플라보노이드에 존재하는 소정 위치의 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소인 OMT1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고; OMTX2는 플라보노이드에 존재하는 하이드록실기 중 OMT1이 작용하는 하이드록실기와 다른 위치에 존재하는 하이드록실기에 대해 작용하는 플라보노이드 O-메틸전이효소인 OMT2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고; LX는 펩티드 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고; n은 0 또는 1에서 선택되는 정수이다.

[0039] 상기 식 (Ⅱ)에서 OMT1 또는 OMT2는 그 종류가 크게 제한되지 않으며 공지된 모든 플라보노이드 O-메틸전이효소에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 식 (Ⅱ)에서 OMT1 또는 OMT2는 공지된 플라보노이드 O-메틸전이효소뿐만 아니라 실질적으로 O-메틸화(O-methylation) 활성을 갖는 O-메틸전이효소 변이체를 포함한다. O-메틸전이효소 변이체는 공지된 플라보노이드 O-메틸전이효소의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, O-메틸전이효소 변이체는 공지된 플라보노이드 O-메틸전이효소의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 식 (Ⅱ)에서 OMT1X는 바람직하게는 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 12의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 13의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 14의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 16의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 식 (Ⅱ)에서 OMT2X는 바람직하게는 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 12의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 13의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 14의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 16의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 상기 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 12의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 13의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 14의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 플

라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 15의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 16의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 본 발명에서 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 비번역된 서열(예를 들어, 인트론)을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다 (예를 들어, cDNA). 펩티드가 코딩되는 정보는 코돈을 사용하여 구체화된다. 전형적으로, 아미노산 서열은 유니버셜 유전자 코드를 사용하여 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다. "코돈"은 폴리펩티드 사슬에서 아미노산 서열을 결정하는 뉴클레오티드의 트리플렛(triplet)을 나타낸다. 대부분의 유기체는 단백질 또는 단백질 전구체인 이들의 폴리펩티드를 제조하는데 20 또는 21개 아미노산을 이용한다. DNA에는 4개의 가능한 뉴클레오티드인 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C) 및 티민 (T)이 존재하기 때문에, 20개 아미노산과 말단 시그널을 코딩할 수 있는 64개의 가능한 트리플렛이 존재한다. 이러한 중복성으로 인해, 대부분의 아미노산은 1개 이상의 트리플렛에 의해 코딩된다. 이에 따라, 코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 영향을 주지 않으면서 뉴클레오티드 서열의 변화를 허용할 수 있고, 이를 "코돈 축퇴성(codon degeneracy)"에 의한 "침묵 변이"라 한다. 본 발명은 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 모든 침묵 변이를 포함한다. 또한, 상기 식 (Ⅱ)에서 상기 OMT1X은 서열번호 11의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드이고 OMT2X는 서열번호 12의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드인 것이 더 바람직하다.

[0040] 상기 식 (Ⅱ)에서 펩티드 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드인 LX는 단백질의 융합 또는 펩티드의 융합시 사용되는 공지의 다양한 펩티드 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티는 링커는 2~40개의 아미노산으로 구성될 수 있고, 바람직하게는 2~20개의 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 글라이신(Gly,G) 잔기 및 세린(Ser,S) 잔기로 구성되는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 글라이신(Gly,G) 잔기 및 세린(Ser,S) 잔기로 구성되는 펩티드 링커는 GSGGGS, GSGGGGSGGGS 또는 GGGGSGGGSGGGSG의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 GD, EAAAK, EAAAKGD, GGSGGT, GGGGS 또는 GGGGSGGGGS의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 글라이신(Gly,G) 잔기로만 구성되는 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 링커는 2~15개의 연속되는 글라이신으로 구성되는 펩티드일 수 있다. 또한, 상기 펩티드 링커는 글라이신(Gly,G) 잔기, 프롤린(Pro, P) 잔기, 라이신 잔기(Lys, K), 아스파라진(Asn, N) 잔기, 세린(Ser,S) 잔기 또는 시스테인(Cys, C) 잔기에서 선택되는 2종 이상의 아미노산 잔기로 구성되는 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 링커는 GPNG, GGGKGGGG, GGGNGSGG, GGGCGGGG의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로부터 선택될 수 있다. 상기 식 (Ⅱ)에서 펩티드 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 GD의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 코딩하는 GGAGAC, EAAAK의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 코딩하는 GAAGCGGCGGCGAAA, EAAAKGD의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 코딩하는 GAAGCGGCGGCGAAAGGAGAC의 염기 서열를 가질 수 있다.

[0041] 상기 식 (Ⅱ)로 본 발명의 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자는 바람직하게는 서열번호 17의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 18의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 19의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 20의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 상기 서열번호 17의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 18의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 19의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다. 상기 서열번호 20의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 다양한 폴리뉴클레이티드들 중 하나이다.

[0043] 본 발명의 일 측면은 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소의 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다. 상기 재조합 벡터는 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 본 발명에서 벡터는 외래 DNA 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위 (replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 또한 미니구형 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 벡터는 박테리아 DNA 서열을 갖지 않는 플라스미

드일 수 있다. CpG 영역에서 풍부한 박테리아 DNA 서열의 제거는 전이유전자 발현 사일런싱을 감소시키고 플라스미드 DNA 벡터로부터 보다 지속적인 발현을 가져오기 위해 행해지고 있다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty)와 같은 트랜스포존[Izsvak et al. J. MoI. Biol. 302:93-102(2000)], 또는 인공 염색체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어인 "클로닝 벡터"는 숙주 세포 내로 DNA 단편을 운반하고 이를 재생산할 수 있는 물질로 정의된다. 본 발명에서 클로닝 벡터는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal), 전사 종결 서열(transcription termination sequence) 및 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)는 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)를 포함한다. 또한, 클로닝 벡터는 프로모터를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 본 발명에서 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있고, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)가 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어인 "발현 벡터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 발현 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코드하는 유전자, 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코드하는 DNA, 추가적 발현 조절 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. "프로모터"는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 의미한다. 또한, 세포 유형 특이적 또는 외부의 신호 또는 제제에 의해 유도되는 조절 가능한 프로모터 의존적 유전자를 발현하도록 하는 데 충분한 프로모터 구성이 포함될 수 있으며, 이러한 구성들은 유전자의 5' 또는 3' 부분에 위치할 수 있다. 본 발명에 따른 발현 벡터는 보존적 프로모터 및 유도적 프로모터 둘 다 포함할 수 있다. 프로모터 서열은 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 단일 폴리뉴클레오티드 상의 폴리뉴클레오티드 서열 연관성으로 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우) 프로모터는 코딩 서열과 연결되어 작동되거나, 리보좀 결합 자리가 번역을 촉진시킬 수 있도록 위치하고 있다면, 리보좀 결합 자리는 코딩 서열에 연결되어 작동되는 것이다. 코딩 서열은 센스 방향 또는 안티센스 방향에서 조절 서열에 연결되어 작동될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 발현 벡터는 예를 들어 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119); 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5); 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50); λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP); 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus) 또는 백시니아 바이러스(Vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스; 배큘로바이러스(Baculovirus)와 같은 곤충 바이러스를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 발현벡터로 핵산 발현 활성화 단백질(예를 들어, B42같은)이 연결된 융합 플라스미드(fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 융합 플라스미드는 필요에 따라 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등을 포함할 수 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 융합 플라스미드가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 제작시 pET28a(+) 벡터를 사용하였다. 또한, 상기 태그(tag) 서열이 포함된 발현 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예를 들어 태그(tag)로 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 발현 벡터에 포함된 경우에는 융합 단백질의 정제시 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 태그로 헥사히스티딘이 발현 벡터에 포함된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 측면은 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 발현하는 형질전환체에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 형질전환체는 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자가 도입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 유전자는 바람직하게는 발현 벡터를 통해 숙주에 도입되고, 숙주를 형질전환시킨다. 상기 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 일시적인 형질감염

(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposemmediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 영양 배지에서 배양하면 융합 단백질을 대량으로 제조할 수 있고, 분리도 가능하다. 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절하여야 한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포로는 원핵 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포 등 당업계에 공지된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 예를 들어, 숙주 세포로 에쉐리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 주지의 원핵 숙주들이 사용될 수 있고, 바람직하게는 대장균이 사용될 수 있다. 숙주 세포에 의한 단백질의 발현은 유도 인자인 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 사용하여 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서 재조합적으로 생산된 단백질은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 상기 재조합 단백질이 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laborarory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deuscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA, 1990). 예를 들어, 숙주 세포에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제 방법으로는 전기영동, 원심분리, 겔 여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 면역흡착 친화성 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 일 측면은 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법은 전술한 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소 또는 상기 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소를 발현하는 형질전환체의 존재하에 적어도 2개의 하이드록실기를 가지는 기질 플라보노이드 및 메틸 공여체를 반응시켜 폴리메톡시플라보노이드를 생성하는 단계; 및 상기 생성된 폴리메톡시플라보노이드를 회수하는 단계를 포함한다.

[0049] 본 발명의 일 예에 따른 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법에서 상기 융합 플라보노이드 O-메틸전이효소는 바람직하게는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법에서 상기 기질 플라보노이드는 바람직하게는 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(luteolin), 에리오딕티올(eriodictyol) 및 탁시폴린(taxifolin)으로 이루어진 군에서 선택된다. 또한, 상기 본 발명의 일 예에 따른 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법에서 반응 생성물은 상기 폴리메톡시플라보노이드는 바람직하게는 람나진(rhamnazin), 벨루틴(velutin), 3',7-O-다이메틸에리오딕티올(3',7-O-dimethyleriodictyol) 및 3',7-O-다이메틸탁시폴린(3',7-O-dimethyltaxifolin)으로 이루어진 군에서 선택된다. 상기 람나진은 퀘르세틴(quercetin)의 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 존재하는 하이드록실기가 메톡시기로 전환되어 생성된 화합물이다. 상기 벨루틴(velutin)은 루테올린(luteolin)의 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 존재하는 하이드록실기가 메톡시기로 전환되어 생성된 화합물이다. 상기 3',7-O-다이메틸에리오딕티올(3',7-O-dimethyleriodictyol)은 에리오딕티올(eriodictyol)의 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 존재하는 하이드록실기가 메톡시기로 전환되어 생성된 화합물이다. 상기 3',7-O-다이메틸탁시폴린(3',7-O-dimethyltaxifolin)은 탁시폴린(taxifolin)의 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 존재하는 하이드록실기가 메톡시기로 전환되어 생성된 화합물이다.

[0050] 본 발명의 일 예에 따른 폴리메톡시플라보노이드의 제조방법에서 상기 폴리메톡시플라보노이드를 회수하는 단계는 원심분리, 여과, 용매 추출, 막 분리, 크로마토그래피 등과 같은 공지된 다양한 분리 단위조작과 정제 단위조작을 조합하여 폴리메톡시플라보노이드를 함유하는 반응 생성액으로부터 특정 폴리메톡시플라보노이드를 특정 순도로 분리 및 정제하는 것으로 구성된다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[0054] **1. 실험 재료**

[0055] 실험에 사용한 대부분의 플라보노이드는 Indofine Chemical Company(Hillsborough, NJ, USA) 및 ChromaDex(Irvine, CA, USA)로부터 구입하였다. 또한, 호모에리오딕티올(Homoeriodictyol 또는 3'-O-methyleriodictyol) 및 3'-O-메틸탁시폴린(3'-O-methyltaxifolin)은 *Sl*OMT3로 형질전환된 대장균을 이용하여 생물전환을 통해 합성하였다(대한민국 등록특허 제10-1342774호 참조). 상기 *Sl*OMT3는 토마토(*Solanum lycopersicum*)에서 유래하고 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소이다. 또한, 7-O-메틸에리오딕티올(7-O-Methyleriodictyol), 7-O-메틸-루테올린(7-O-methylluteolin) 및 7-O-메틸탁시폴린(7-O-methyltaxifolin)은 *Os*NOMT를 발현하는 형질전환 대장균을 이용하여 생물전환을 통해 합성하였다. 상기 *Os*NOMT는 벼(*Oryza sativa*) 에서 유래하고 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 플라보노이드 O-메틸전이효소이다. 상기 *Os*NOMT는 나린제닌(Naringenin)의 7번 탄소 위치에 존재하는 하이드록실기에 작용하는 것으로 알려져 있다. 각각의 메틸화된 플라보노이드 산물은 분취 박막 크로마토그래피(preparative thin-layer chromatography)에 의해 정제되었다. 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 등급의 물, 아세토니트릴 및 아세트산은 Avantor Performance Materials(Center Valley, PA, USA)로부터 구입하였다. 또한, S-아네도실-L-메티오닌(-S-Adenosyl-L-methionine; 이하 AdoMet) 및 다른 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0057] **2. 오버랩 연장 PCR을 이용한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 생성**

[0058] (1) *Os*NOMT 유전자의 클로닝

[0059] *Os*NOMT 유전자의 클로닝을 위해 먼저 자외선으로 처리된 벼(*Oryza sativa* cv. Dongjin)의 잎으로부터 총 RNA를 TRIzol 시약(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 이용하여 추출하였다. 이후, 첫번째 가닥 cDNA 합성 키트(A first-Strand cDNA synthesis kit; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 RT-PCR에 의해 벼의 총 RNA로부터 첫번째 가닥 cDNA를 합성하였다. 이후, 첫번째 가닥 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 *Os*NOMT 유전자를 증폭하였다. *Os*NOMT 유전자를 증폭할 때 사용한 프라이머들은 하기 표 1과 같고 상기 프라이머들은 각각 Nde I(CATATG) 및 EcoRI(GAATTC) 제한효소 부위(밑줄친 부분)를 가진다.

표 1

[0060]

프라이머 종류	프라이머 염기 서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한효소 인식 부위
*Os*NOMT 유전자 클로닝용 forward primer	GGCATATGGGAGACATGGTGAGCCCG	Nde I
*Os*NOMT 유전자 클로닝용 reverse primer	CCGAATTCTTACTTTGTGAACTCGAGAGC	EcoRI

[0061] 이후, PCR 산물을 pJEE1.2 벡터(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에 서브클로닝 하고 염기 서열을 확인하였다. 그 결과, 서브클로닝된 *Os*NOMT 유전자는 서열번호 12의 염기 서열을 포함하는 것으로 나타났다. 이후, pJEE1.2 벡터에 서브클로닝된 *Os*NOMT 유전자를 제한효소로 절단하고 pET-28a(+) 벡터(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하여 *Os*NOMT 유전자 발현벡터를 제작하였다. 이후, 제작한 *Os*NOMT 유전자 발현벡터[*Os*NOMT/pET-28a(+)]를 이종 발현(heterologus expression)을 위하여 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 형질전환하였다.

[0063] (2) *Sl*OMT3 유전자의 클로닝

[0064] TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 미니어쳐 토마토 품종인 Micro-Tom의 잎으로부터 총 RNA를 추출하였다. 이후, 첫번째 가닥 cDNA 합성 키트(A first-Strand cDNA synthesis kit; Roche Diagnostics,

Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 RT-PCR에 의해 토마토의 총 RNA로부터 첫번째 가닥 cDNA를 합성하였다. 이후, 첫번째 가닥 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 *Sl*OMT3 유전자를 증폭하였다. *Sl*OMT3 유전자를 증폭할 때 사용한 프라이머들은 하기 표 2와 같고 상기 프라이머들은 각각 BamH I(GGATCC) 및 SacI(GAGCTC) 제한효소 부위(밑줄친 부분)를 가진다.

표 2

[0065]

프라이머 종류	프라이머 염기 서열(5'→3')	프라이머에 포함된 제한효소 인식 부위
*Sl*OMT3 유전자 클로닝용 forward primer	CGGATCCATGGGTTCAACAAGCCTA	BamH I
*Sl*OMT3 유전자 클로닝용 reverse primer	CGAGCTCTCACTTGGTGAATTCCATAA	SacI

[0066] 이후, PCR 산물을 pGEM™-T Easy 벡터(Promega, Madison, WI)에 서브클로닝 하고 염기서열을 확인하였다. 그 결과, 서브클로닝된 *Sl*OMT3 유전자는 서열번호 11의 염기 서열을 포함하는 것으로 나타났다. 이후, pGEM™-T Easy 벡터에 서브클로닝된 *Sl*OMT3 유전자를 제한효소로 절단하고 pET-28a(+) 벡터(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하여 *Sl*OMT3 유전자 발현벡터[*Sl*OMT3/pET-28a(+)]를 제작하였다. 이후, 제작한 *Sl*OMT3 유전자 발현벡터를 이종 발현(heterologus expression)을 위하여 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 형질전환하였다.

[0068] (3) 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 생성

[0069] *Sl*OMT3 유전자와 *Os*NOMT 유전자를 간접적으로 융합시키기 위해 In-fusion® HD cloning kit(Clontech, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 2개의 유전자를 오버랩 연장 PCR(overlap extension polymerase chain reaction) 방법으로 증폭하고 결합시켰다. 오버랩 연장 PCR(overlap extension polymerase chain reaction)에 사용한 프라이머 세트를 하기 표 3에 나타내었다. 또한, 표 3에서 밑줄 친 부분은 오버랩되는 펩티드 링커의 염기서열이다.

표 3

[0070]

프라이머 종류	프라이머 염기 서열(5'→3')
*Sl*OMT3 유전자 오버랩용 forward primer	ATGGGTCGCGGATCCATGGGTTCAACAAGCCTA
*Sl*OMT3 유전자 오버랩용 reverse primer	TTTCGCCGCCGCTTCCTTGGTGAATTCCATAAT
*Os*NOMT 유전자 오버랩용 forward primer	GAAGCGGCGGCGAAAGGAGACATGGTGAGCCCGGTGG
*Os*NOMT 유전자 오버랩용 reverse primer	CTCGAGTGCGGCCGCTTACTTTGTGAACTCGAG

[0071] 이후, PCR 산물을 pJEE1.2 벡터(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에 서브클로닝 하고 염기 서열을 확인하였다. 그 결과, 서브클로닝된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자는 서열번호 20의 염기 서열을 포함하는 것으로 나타났다. 이후, pJEE1.2 벡터에 서브클로닝된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자를 제한효소로 절단하고 pET-28a(+) 벡터(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하여 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자 발현벡터를 제작하였다. 이후, 제작한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자 발현벡터[*Sl*OMT3/*Os*NOMT/pET-28a(+)]를 이종 발현(heterologus expression)을 위하여 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 형질전환하였다.

[0073] (4) 직접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 생성

[0074] *Sl*OMT3 유전자와 *Os*NOMT 유전자를 직접적으로 융합시키기 위해 In-fusion® HD cloning kit(Clontech, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 2개의 유전자를 오버랩 연장 PCR(overlap extension polymerase chain reaction) 방법으로 증폭하고 결합시켰다. 오버랩 연장 PCR(overlap extension polymerase chain reaction)에 사용한 프라이머 세트를 하기 표 4에 나타내었다. 또한, 표 4에서 밑줄 친 부분은 오버랩되는 *Sl*OMT3 유전자 내

염기 서열과 *Os*NOMT 유전자 내 염기 서열이다.

표 4

[0075]

프라이머 종류	프라이머 염기 서열(5'→3')
*Sl*OMT3 유전자 오버랩용 forward primer	ATGGGTCGCGGATCCATGGGTTCAACAAGCCTA
*Sl*OMT3 유전자 오버랩용 reverse primer	GCTCACCATGTCTCCCTTGGTGAATTCCATAAT
*Os*NOMT 유전자 오버랩용 forward primer	GGAGACATGGTGAGCCCGGTGG
*Os*NOMT 유전자 오버랩용 reverse primer	CTCGAGTGCGGCCGCTTACTTTGTGAACTCGAG

[0076] 이후, PCR 산물을 pJEE1.2 벡터(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에 서브클로닝 하고 염기 서열을 확인하였다. 그 결과, 서브클로닝된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자는 서열번호 18의 염기 서열을 포함하는 것으로 나타났다. 서열번호 18의 염기 서열에서 *Sl*OMT3 유전자 염기 서열과 *Os*NOMT 유전자 염기 서열 사이에 위치하는 5'-GGAGAC-3' 염기 서열은 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 클로닝 과정에서 벡터에 의해 삽입된 것으로서 펩티드 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 해석할 수도 있고 길이가 매우 짧아 무시할 수도 있다. 이후, pJEE1.2 벡터에 서브클로닝된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자를 제한효소로 절단하고 pET-28a(+) 벡터(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하여 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자 발현벡터를 제작하였다. 이후, 제작한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자 발현벡터[*Sl*OMT3/*Os*NOMT/pET-28a(+)]를 이종 발현(heterologus expression)을 위하여 *E. coli* BL21(DE3) 세포로 형질전환하였다.

[0078] **3. *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자 등의 발현 및 효소의 정제**

[0079] (1) *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현 및 발현된 효소의 정제

[0080] *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자가 도입된 *E.coli* 형질전환체를 37℃에서 카나마이신(25㎍/㎖)이 첨가된 LB 배지 내에서 OD_{600}의 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 이후, 상기 배지에 0.1mM IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현을 유도하고, 18℃에서 16시간 동안 추가로 형질전환체를 배양하였다. 이후, 배양액을 원심분리(4,800 g; 15분)하여 세포를 수득하였다. 이후, 수득한 세포 펠렛을 리소자임(lysozyme; 1mg/㎖) 및 페닐메틸설포닐플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride; 1 mM)이 첨가된 PBS(phosphate-buffered saline) 용액에 현탁하고, 소니케이션으로 세포를 파쇄하였다. 이후, 세포 현탁액을 원심분리(15,900 g; 20분)하여 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거하고 상등액을 수득하였다. 이후, 상등액에서 His-태그된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소를 염 분획(salt fractionation)과 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 이용하여 정제하였다. 구체적으로, 상등액을 암모늄설페이트(ammonium sulfate; 60% 포화)와 혼합하고 4℃에서 30분 동안 천천히 교반하였다. 이후, 혼합액을 원심분리(15,900 g; 20분)하여 침전물을 수득하고, 수득한 침전물을 역추출(back extraction)을 위해 33% 포화 암모늄설페이트가 포함된 PBS 용액에 현탁하였다. 이후, 현탁액을 4℃에서 10분 동안 천천히 교반하고 원심분리(15,900 g; 20분)하여 상등액을 수득하였다. 염 분획으로부터 얻은 상등액을 Ni-NTA 아가로스 비드(Qiagen, Hilden, Germany)와 혼합한 후 4℃에서 1시간 동안 진탕 교반하였다. 이후, 혼합물을 크로마토그래피 칼럼에 팩킹(packing)하고, 20mM 이미다졸이 포함된 Tris 완충액(50mM Tris, pH 8.0, 300mM NaCl)을 6 칼럼 부피로 칼럼에 통과시켜 세척하였다. 이후, 50mM 이미다졸이 포함된 Tris 완충액(50mM Tris, pH 8.0, 300mM NaCl)을 칼럼에 통과시켜 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소를 용출시켰다.

[0081] 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현에 의해 생성된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 나타났다. 또한, 직접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현에 의해 생성된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 나타났다.

[0083] (2) *Sl*OMT3 유전자와 *Os*NOMT 유전자의 발현 및 효소의 정제

[0084] *Sl*OMT3 유전자가 도입된 *E.coli* 형질전환체를 OD_{600}의 값이 0.6이 될 때까지 배양하고 0.5mM IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 *Sl*OMT3 유전자의 발현을 유도하고, 25℃에서 20시간 동안 추가로 형질전환체를 배양하였다. 이후, 위에서 기술한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 정제 방법과 동일한 방법을 사용하여 *Sl*OMT3 효소를 정제하였다. 정제한 *Sl*OMT3 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 나타났다.

[0085] *Os*NOMT 유전자가 도입된 *E.coli* 형질전환체를 OD_{600}의 값이 0.6이 될 때까지 배양하고 0.1mM IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 *Os*NOMT 유전자의 발현을 유도하고, 25℃에서 16시간 동안 추가로 형질전환체를 배양하였다. 이후, 위에서 기술한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 정제 방법과 동일한 방법을 사용하여 *Os*NOMT 효소를 정제하였다. 정제한 *Os*NOMT 효소는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 나타났다.

[0087] **4. 플라보노이드 O-메틸전이효소 활성 어세이**

[0088] 플라보노이드 O-메틸전이효소 활성 측정을 위한 반응 혼합물은 최종 부피가 500㎕이고, 20mM Tris-HCl(pH 7.5)에 용해된 50μM 플라보노이드 기질 및 100μM AdoMet로 구성된다. 플라보노이드 O-메틸전이효소 어세이에 사용된 플라보노이드 기질은 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(luteolin), 에리오딕티올(eriodictyol) 및 탁시폴린(taxifolin) 이었다. 반응 혼합물에 정제한 효소를 첨가하여 효소 반응을 개시한 후, 30℃에서 30분 동안 배양하였다. 이후, 반응 혼합물에 5N HCl 50㎕를 첨가하여 반응을 종결시키고, 반응 생성물을 에틸아세테이트 500㎕를 사용하여 2회 추출하였다. 이후, 에틸아세테이트 추출액을 진공 조건에서 건조하고, 메탄올 100㎕에 용해시켰다. 이후 각각의 반응 생성물을 Sunfire C_{18} 칼럼(Waters, Miliford, MA)이 장착된 역상 HPLC(Reversed phased high performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였다. 역상 HPLC 분석시 이동상으로 3% 아세트산-물에서 25 내지 60% 아세토나이트릴의 선형 구배(Linear gradient)를 25분간 사용하였고, 280㎚의 파장에서 반응 생성물 등을 검출하였다.

[0090] **5. *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자가 도입된 *E.coli* 형질전환체를 이용한 플라보노이드의 생물전환**

[0091] *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자가 도입된 *E.coli* 형질전환체를 37℃에서 카나마이신(25㎍/㎖)이 첨가된 LB 배지 내에서 OD_{600}의 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 이후, 상기 배지에 0.1mM IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현을 유도하고, 18℃에서 6시간 동안 추가로 형질전환체를 배양하였다. 이후, 배양액을 원심분리(4,800 g; 15분)하여 세포를 수득하였다. 이후, 수득한 세포 펠렛을 카나마이신(25㎍/㎖)이 첨가된 새로운 LB 배지에 현탁하고, 서로 다른 농도의 플라보노이드 기질 및 AdoMet를 첨가하고, 25℃에서 배양하였다. 생물전환에 사용된 플라보노이드 기질은 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(luteolin), 에리오딕티올(eriodictyol) 및 탁시폴린(taxifolin) 이었다. 플라보노이드 기질을 첨가한 후 미리 정한 시점에 배양액 일부를 샘플링하고 원심분리에 의하여 세포가 제거된 배양액을 수득하였다. 이후, 세포가 제거된 배양액을 에틸아세테이트 500㎕를 사용하여 2회 추출하고, 추출액을 위에서 기술한 역상 HPLC(Reversed phased high performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였다.

[0093] **6. 실험 결과**

[0094] (1) *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 생성 및 발현

[0095] 본 발명의 발명자들은 *Sl*OMT3 효소 및 *Os*NOMT 효소를 유전적으로 융합하여 플라보노이드의 3'번/5'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 존재하는 하이드록실기에 대해 활성을 가진 다기능 플라보노이드 O-메틸전이효소를 생성하였다. 도 8은 본 발명에서 His-태그된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현 벡터를 제작하는 과정을 나타낸 것이다. 도 8에서 보이는 바와 같이 *Sl*OMT3 유전자와 *Os*NOMT 유전자는 오버랩 연장 PCR에 의해 결합되었고, *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자는 His-태그를 가지는 pET-28a(+) 벡터에 클로닝 되었다. 도 8에서 MCS는 multi-cloning site를 나타낸다. 이후, N-말단에 His-태그를 가지는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자는 *E.coli* 형질전환체에서 용해가능한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소로 이종 발현되었고, *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 암모늄설페이트 분획과 Ni2+ 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다.

[0096] 도 9는 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소를 정제하고 이의 분자량을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 도 9에서 보이는 바와 같이 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소

의 분자량은 SDS-PAGE에 의할 때 약 82 kDa인 것으로 결정되었고, 이는 His-태그를 포함하는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소에 대해 예측한 분자량과 부합한다. 도 9에서 각 레인은 다음과 같다 : M; size marker, 1; crude extract from uninduced E. coli transformant, 2; crude extract from IPTG-induced *E. coli* transformant, 3; proteins after ammonium sulfate fractionation, 4; affinity-purified SlOMT3/OsNOMT fusion protein.

[0098] (2) *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 다양한 플라보노이드에 대한 활성

[0099] 2개의 서로 다른 단백질의 직접 결합 또는 간접 결합에 의해 생성된 재조합 융합 단백질은 종종 미스폴딩(misfolding)이 발생하고 생리활성을 잃게 된다[Y. Bai, D.K. Ann, W.-C. Shen, Recombinalt granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 102 (2005) 7292-7296.; H.L. Zhao, X.Q. Yao, C. Xue, Y. Wang, X.H. Xiong, Z.M. Liu, Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-α2b fusion protein by linker engineering, Protein Expr. Purif. 61 (2009) 73-77.; X. Chen, J.L. Zaro, W.-C. Shen, Fusion protein linkers: Property, design and functionality, Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (2013) 1357-1369.]. 본 발명에서 제조한 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소가 *Sl*OMT3 효소의 3'/5'-O-메틸화 활성과 *Os*NOMT 효소의 7-O-메틸화 활성을 모두 가지는지 확인하기 위해 플라보노이드 기질로 람네틴(rhamnetin 또는 7-O-methylquercetin) 및 나린제닌(naringenin)을 사용하고, AdoMet의 존재하에서 효소 반응을 수행하였다. 이후, 반응 생성물을 HPLC로 분석하였다. 도 10은 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 플라보노이드 O-메틸전이효소 활성을 측정한 결과이다. 도 10의 A에서 보이는 바와 같이 *Sl*OMT3 효소 및 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 람네틴(rhamnetin)을 람나진(rhamnazin)으로 전환하는 활성을 보였다. 또한, 도 10의 B에서 보이는 바와 같이 *Os*NOMT 효소 및 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 나린제닌(naringenin)을 사쿠라네틴(sakuranetin)으로 전환하는 활성을 보였다. 도 10의 A에서 "S"는 기질인 람네틴(rhamnetin)을 나타내고, "P"는 효소 반응 생성물을 나타내고, "C"는 람나진(rhamnazin) 표준품을 나타낸다. 또한, 도 10의 A에서 "S"는 기질인 나린제닌(naringenin)을 나타내고, "P"는 효소 반응 생성물을 나타내고, "C"는 사쿠라네틴(sakuranetin) 표준품을 나타낸다. 도 11은 직접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 플라보노이드 O-메틸전이효소 활성을 측정한 결과이다. 도 11에서 보이는 바와 같이 *Os*NOMT 효소 및 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 나린제닌(naringenin)을 사쿠라네틴(sakuranetin)으로 전환하는 활성을 보였다. 도 11에서 "S"는 기질인 나린제닌(naringenin)을 나타내고, "P"는 효소 반응 생성물을 나타내고, "C"는 사쿠라네틴(sakuranetin) 표준품을 나타낸다. 이러한 결과는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소가 직접 결합 또는 간접 결합과 관계없이 *Sl*OMT3 효소의 3'/5'-O-메틸화 활성과 *Os*NOMT 효소의 7-O-메틸화 활성을 모두 가지는 다기능 플라보노이드 O-메틸전이효소라는 것을 의미한다.

[0100] 이전의 연구 결과에 따르면, *Sl*OMT3 효소는 케르세틴(quercetin) 및 라리시트린(laricitrin) 등과 같은 다양한 플라보노이드에 대해 O-메틸화 활성을 가지는 반면 이소플라보노이드에 대해서는 O-메틸화 활성을 보이지 않는 것으로 보고되었다[M.H. Cho, H.L. Park, J.H. Park, S.W. Lee, S.H. Bhoo, T.R. Hahn, Characterization of a regiospecific flavonoid 3′/5′-O-methyltransferase from tomato and its application in flavonoid biotransformation, J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 55 (2012) 749-755.]. 또한, *Os*NOMT 효소는 나린제닌(naringenin), 케르세틴(quercetin) 등과 같은 다양한 플라보노이드에 대해 O-메틸화 활성을 가지는 것으로 보고되었다[T. Shimizu, F. Lin, M. Hasegawa, K. Okada, H. Nojiri, H. Yamane, Purification and identification of naringenin 7-O-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice, J. Biol. Chem. 287 (2012) 19315-19325.]. 본 발명의 발명자들은 *Sl*OMT3 효소, *Os*NOMT 효소 및 펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소의 다양한 플라보노이드에 대한 O-메틸화 활성을 평가하였고, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다. 하기 표 5에서 보이는 바와 같이 *Sl*OMT3 효소 및 *Os*NOMT 효소는 다양한 플라보노이드에 대해 O-메틸화 활성을 보였고, *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소도 *Sl*OMT3 효소 및 *Os*NOMT 효소 각각에 비교할 수 있을 정도의 3'/5'-O-메틸화 활성과 7-O-메틸화 활성을 보였다. 예를 들어, *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 람네틴, 7-O-메틸에리오딕티올, 7-O-메틸루테올린 등과 같은 기질에 대해 3'-O-메틸화 활성을 보였다. 또한, *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 호모에리오딕티올, 3'-O-메틸탁시폴린, 크리소에리올, 람네틴 등과 같은 기질에 7-O-메틸화 활성을 보였다. 도 12는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소가 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 하이드록실기를 가지는 플라보노이드를 기질로 사용하여 한 단계만의 반응 경로를 통해 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 메톡시기를 가지는 플라보노이드를 생산하는 과정을 나타낸 것이다. 하기 표 1의 결과 및 도 12의 반응 경로는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소가 에리오딕티올, 루테올린, 퀘르세틴 등과

같은 비메틸화 플라보노이드 기질로부터 다이메톡시플라보노이드 등과 같은 폴리메톡시플라보노이드를 생산하는데에 적용될 수 있다는 점을 시사한다.

표 5

[0101]

Flavonoid Substrate		Relative activity (%)[a]			
		SlOMT3 (3'-OMT)	SlOMT3/OsNOMT		OsNOMT (7-OMT)
			(3'-OMT)	(7-OMT)	
Flavanone	Naringenin			100	100
	Eriodictyol	24[b]	+[c]	+	41
	Homoeriodictyol				
	7-Methyleriodictyol	21	21		
Flavanonol	Taxifolin	△[d]	△	+	10
	3'-Methyltaxifolin			57	56
	7-Methyltaxifolin	-[e]	-		
Flavone	Apigenin			78	73
	Luteolin	93[b]	+	+	198
	Chrysoeriol			78	96
	7-Methylluteolin	20			
	Tricetin	+	+	-	-
	Tricin			-	-
Flavonol	Kaempferol				
	Quercetin	222[b]	+	+	83
	Rhamnetin	100	100		
	Isorhamnetin			111	139
	Syringetin			-	-

[0102] * a : 상대 활성을 결정하기 위해 50μM의 기질 플라보노이드와 1㎍의 정제된 효소를 사용하여 반응시킴

[0103] * b : Cho et al.[M.H. Cho, H.L. Park, J.H. Park, S.W. Lee, S.H. Bhoo, T.R. Hahn, Characterization of a regiospecific flavonoid 3′ /5′ -O-methyltransferase from tomato and its application in flavonoid biotransformation, J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 55 (2012) 749-755.]에 의해 이전에 보고된 데이터를 다시 계산함

[0104] * c : 플러스 표시는 플라보노이드가 효소의 기질로 이용되었음을 나타냄

[0105] * d : 삼각형 표시는 효소의 플라보노이드 기질에 대한 약한 OMT(O-methyltransferase) 활성을 나타냄

[0106] * e : 마이너스 표시는 효소의 플라보노이드 기질에 대한 OMT(O-methyltransferase) 활성이 검출되지 않음을 나타냄

[0108] (3) *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자로 형질전환된 *E. coli*를 이용한 비메틸화 플라보노이드의 생물전환 동력학 특성

[0109] 본 발명의 발명자들은 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자가 도입된 *E. coli* 형질전환체를 이용하여 비메틸화 플라보노이드로부터 다이메톡시플라보노이드를 생물공학적으로 생산하는 실험을 진행하였다. 구체적으로 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자가 도입된 E. coli 형질전환체를 이용하여 3'번 탄소 위치 및 7번 탄소 위치에 모두 하이드록실기가 존재하는 플라보노이드인 에리오딕티올, 탁시폴린, 루테올린 및 퀘르세틴의 생물전환 실험을 수행하였다. 각 플라보노이드 기질(50μM)을 IPTG로 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자의 발현이 유도된 *E. coli* 형질전환체의 배양액에 첨가하고 모노메톡시플라보노이드 및 다이메톡시플라보노이드의 형성을 관찰하였다. *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 효소는 3'-O-메틸화 활성과 7-O-메틸화 활성을 모두 가지고 있기 때문에 생물전환 과정에서 비메틸화 플라보노이드가 먼저 3'-메톡시플라보노이드 또는 7-메톡시플라보노이드로 전환되고 순차적으로 3',7-다이메톡시플라보노이드로 전환될 것으로 기대된다. 도 13은 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로

형질전환된 *E. coli*를 이용한 비메틸화 플라보노이드의 생물전환 동력학 특성을 나타낸 것이다. 도 13의 A는 비메틸화 플라보노이드 기질로 에리오딕티올을 사용한 결과이고, B는 비메틸화 플라보노이드 기질로 탁시폴린을 사용한 결과이고, C는 비메틸화 플라보노이드 기질로 루테올린을 사용한 결과이고, D는 퀘르세틴을 사용한 결과이다. 또한, 도 13에서 ●는 비메틸화 플라보노이드(non-methylated flavonoid)를 나타내고 ■는 3',7-O-다이메틸화 생성물을 나타내고, ◆는 3'-O-메틸화 중간체를 나타내고, ▲는 7-O-메틸화 중간체를 나타낸다. 도 13에서 보이는 바와 같이 생물전환 실험 직후에 바로 중간체인 3'-모노메톡시플라보노이드 및 7-모노메톡시플라보노이드가 관찰되었다. 이후, 모노메틸화 중간체가 감소하면서 다이메틸화 플라보노이드 생성물이 배양 배지에서 생산되었다. 이러한 결과는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자로 형질전환된 *E. coli*를 이용하여 생물전환에 의해 비메틸화 플라보노이드로부터 다이메톡시플라보노이드를 생산할 수 있다는 것을 증명한다.

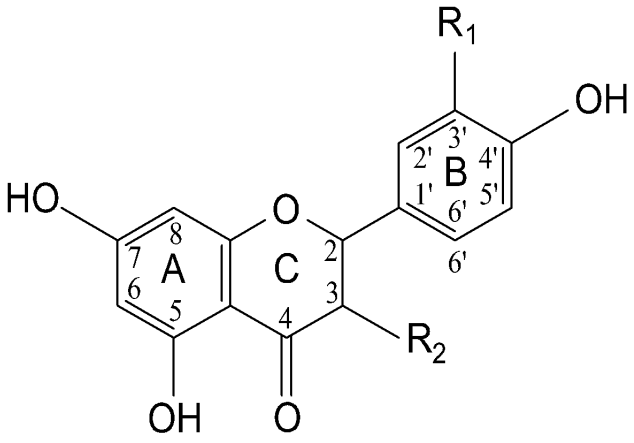
[0111] (4) *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자로 형질전환된 *E. coli*의 생물전환에 의한 다이메톡시플라보노이드의 생산

[0112] 본 발명의 발명자들은 서로 다른 농도(10, 50 및 250μM)의 플라보노이드 기질을 IPTG로 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자((펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)의 발현이 유도된 *E. coli* 형질전환체의 배양액에 첨가하고, 플라보노이드 기질의 다이메톡시플라보노이드로 산물로의 생물전환을 2~24 시간에 걸쳐 주기적으로 관찰하였다. 도 14는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로 형질전환된 *E. coli*를 이용하여 일 단계 생물전환에 의해 다른 농도의 비메틸화 플라보노이드로부터 다이메톡시플라보노이드를 생산한 결과를 반응 시간별로 나타낸 것이고, 도 15는 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로 형질전환된 *E. coli*를 이용하여 일 단계 생물전환에 의해 다른 농도의 비메틸화 플라보노이드로부터 다이메톡시플라보노이드를 생산한 결과를 최대 수율과 최대 생성량으로 나타낸 것이다. 도 14의 A는 비메틸화 플라보노이드 기질로 에리오딕티올을 사용한 결과이고, B는 비메틸화 플라보노이드 기질로 탁시폴린을 사용한 결과이고, C는 비메틸화 플라보노이드 기질로 루테올린을 사용한 결과이고, D는 퀘르세틴을 사용한 결과이다. 또한, 도 15의 A는 비메틸화 플라보노이드 기질로 에리오딕티올을 사용한 결과이고, B는 비메틸화 플라보노이드 기질로 탁시폴린을 사용한 결과이고, C는 비메틸화 플라보노이드 기질로 루테올린을 사용한 결과이고, D는 퀘르세틴을 사용한 결과이다. 도 14 및 도 15에서 보이는 바와 같이 *Sl*OMT3/*Os*NOMT 융합 유전자(펩티드 링커에 의해 간접적으로 결합된 형태임)로 형질전환된 *E. coli*는 탁시폴린을 제외하고는 비메틸화 플라보노이드 기질의 더 낮은 농도에서 더 높은 생물전환 수율을 보였다.예를 들어, 에리오딕티올 및 루테올린의 다이메틸화 산물로의 생물전환 수율은 10μM의 기질 농도에서 각각 86.7% 및 88.1%를 보였다. 퀘르세틴의 경우 10μM의 기질 농도에서 48.8%의 생물전환 수율을 보였다. 또한, 50μM의 기질 농도에서 에리오딕티올, 루테올린 및 퀘르세틴의 생물전환 수율은 각각 57.1%, 37.1% 및 21.0%를 보였다.

[0114] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

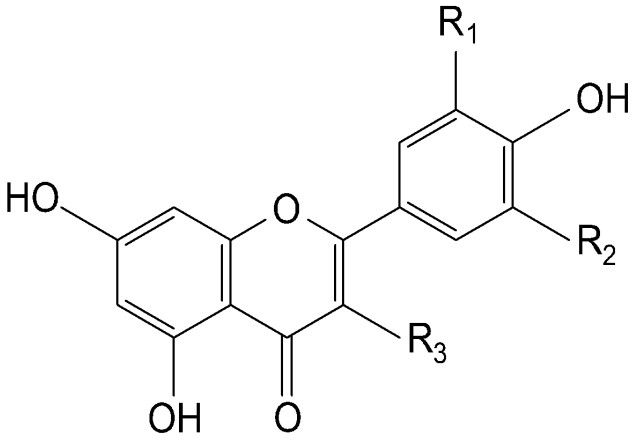
도면

도면1



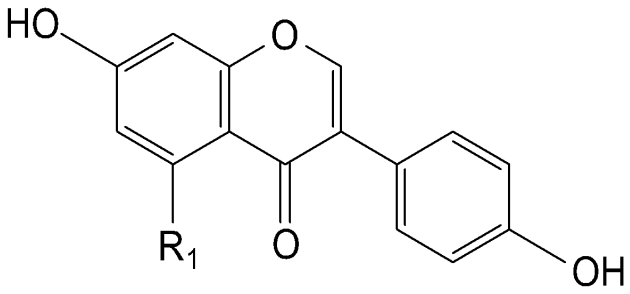
Narin genin; R_1 = H, R_2 = H
Eriodictyol; R_1 = OH, R_2 = H
Homoeriodictyol; R_1 = OCH_3, R_2 = H
Dihydroquercetin; R_1 = OH, R_2 = OH

도면2



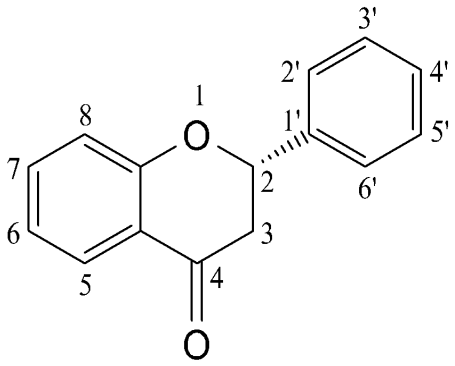
Apigenin; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H
Luteolin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H
Chrysoeriol; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = H
Tricetin; R_1 =OH, R_2 = OH, R_3 =H
Kaempferol; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH
Quercetin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH
Isorhamnetin; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH
Myricetin; R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH
Laricitrin; R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = OH
Syringetin; R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OH

도면3

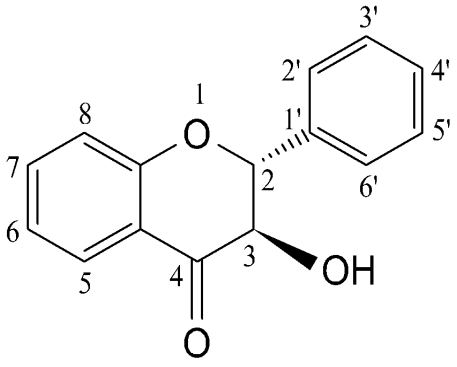


Daidzein; R_1 = H
Genistein; R_1 = OH

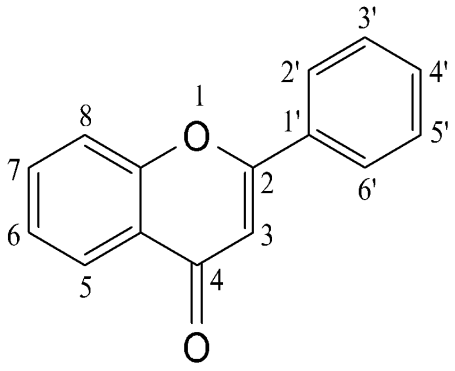
도면4



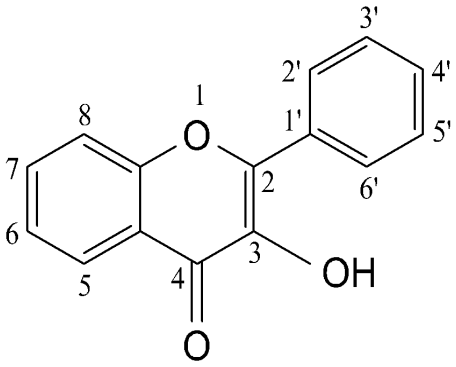
도면5



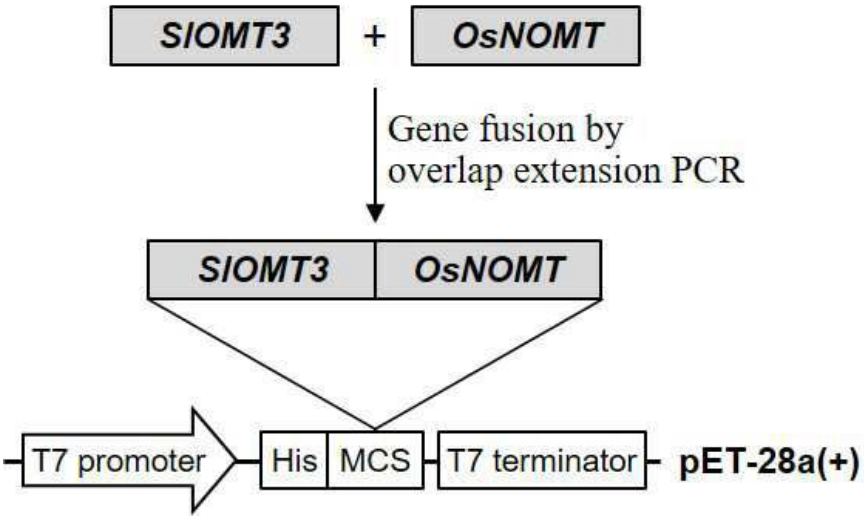
도면6


3'
2'
4'
1
8
1'
5'
O
7
2
6'
6
3
5
4
O

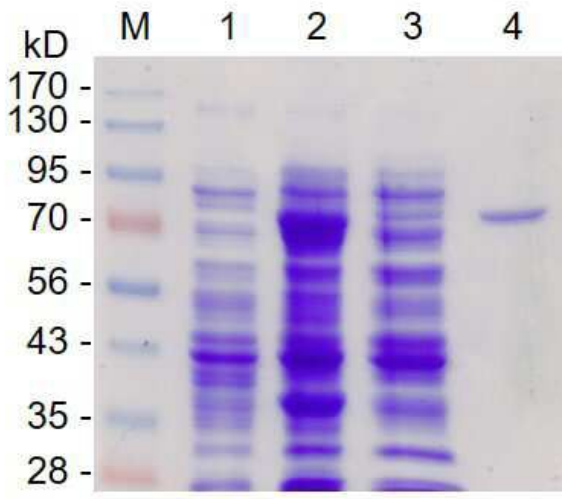
도면7


3'
2'
4'
1
8
1'
5'
O
7
2
6'
6
3
OH
5
4
O

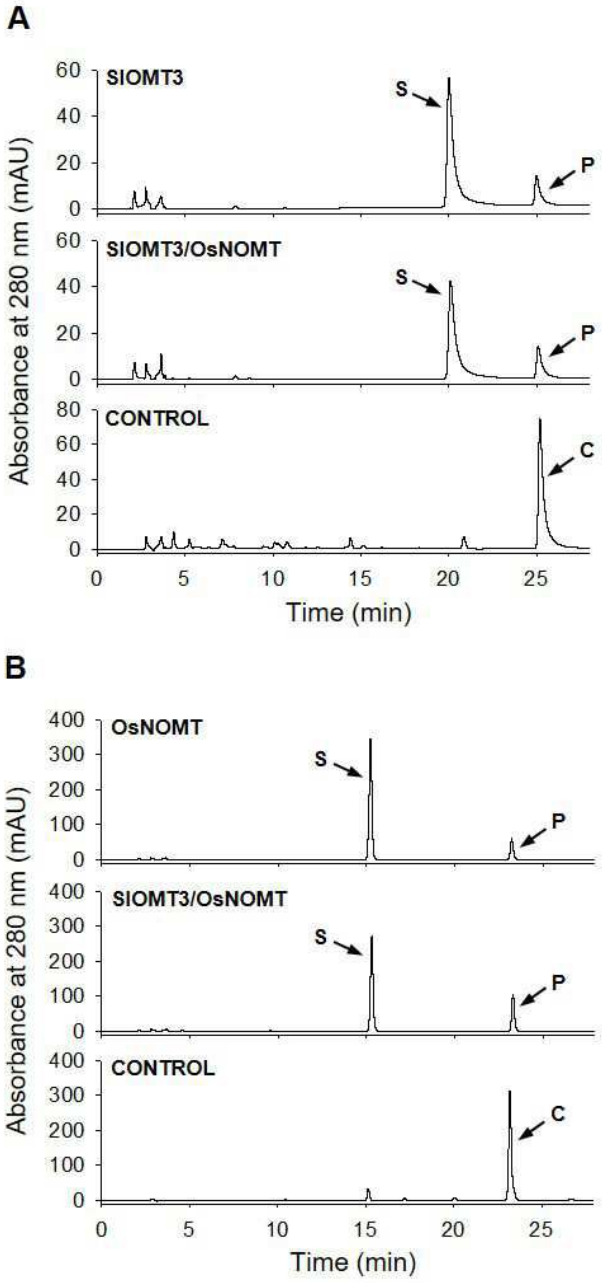
도면8


SlOMT3
+
OsNOMT
Gene fusion by
overlap extension PCR
SlOMT3
OsNOMT
T7 promoter
His
MCS
T7 terminator
pET-28a(+)

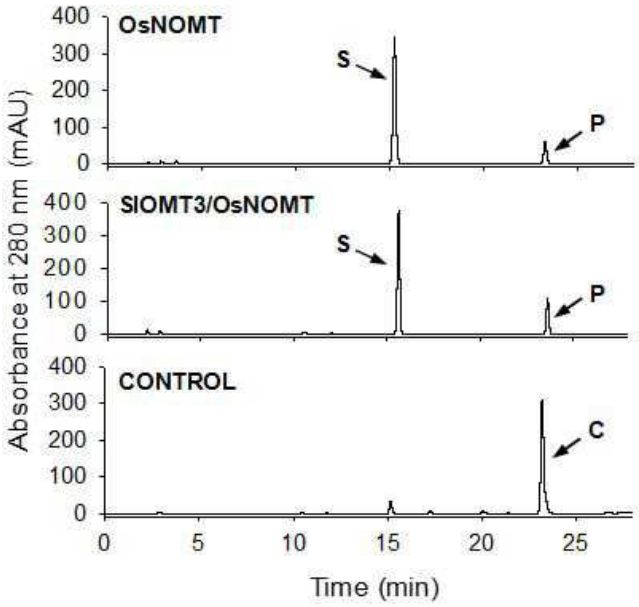
도면9



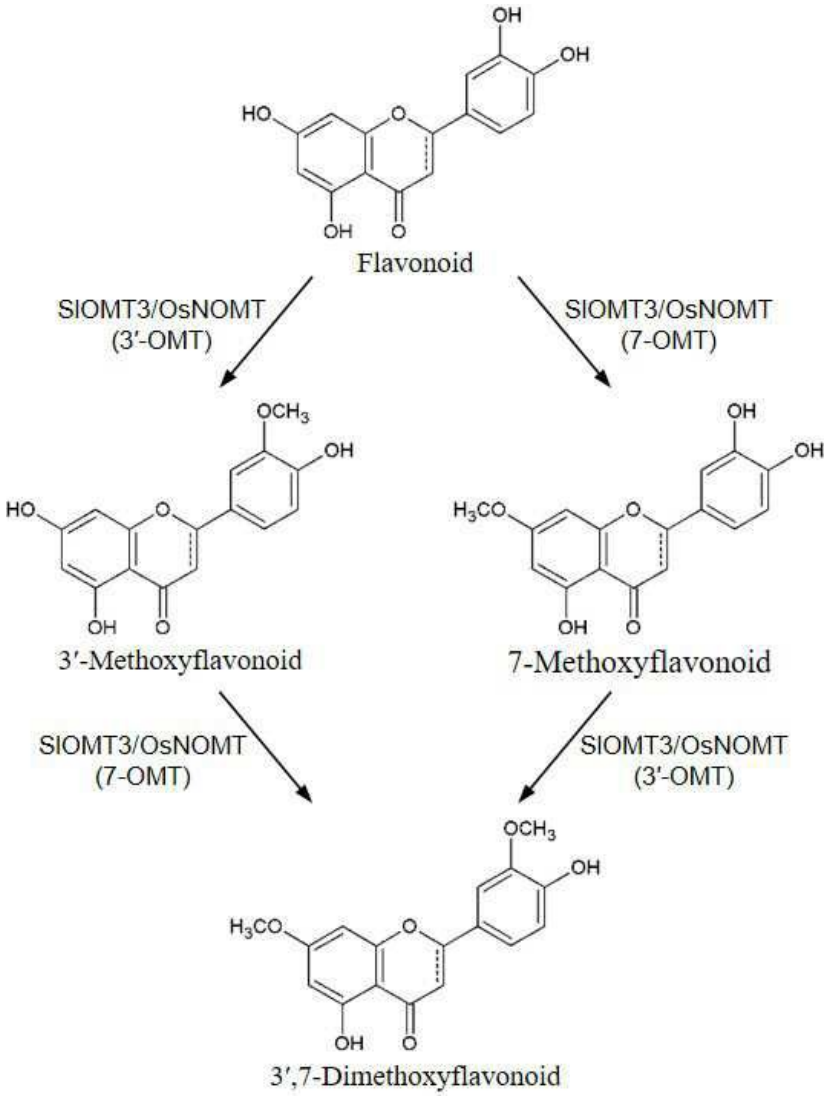
도면10


A
SlOMT3
S
P
SlOMT3/OsNOMT
S
P
CONTROL
C
Absorbance at 280 nm (mAU)
Time (min)
B
OsNOMT
S
P
SlOMT3/OsNOMT
S
P
CONTROL
C
Absorbance at 280 nm (mAU)
Time (min)

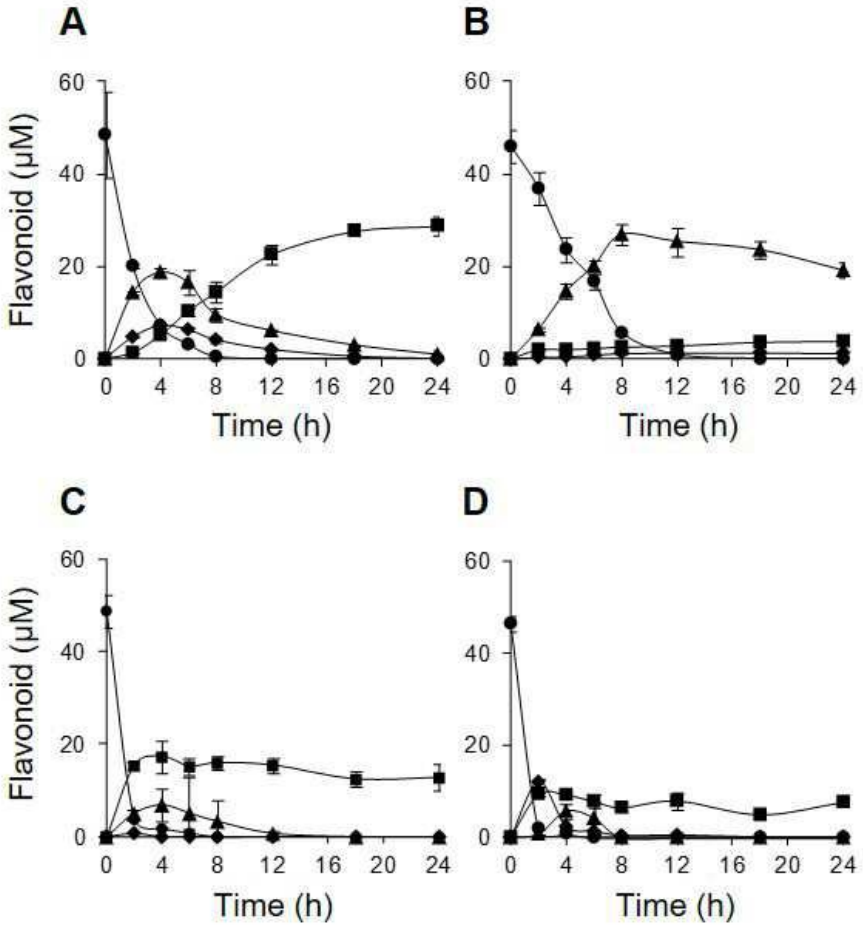
도면11


OsNOMT
SlOMT3/OsNOMT
CONTROL
S
P
C
Absorbance at 280 nm (mAU)
Time (min)

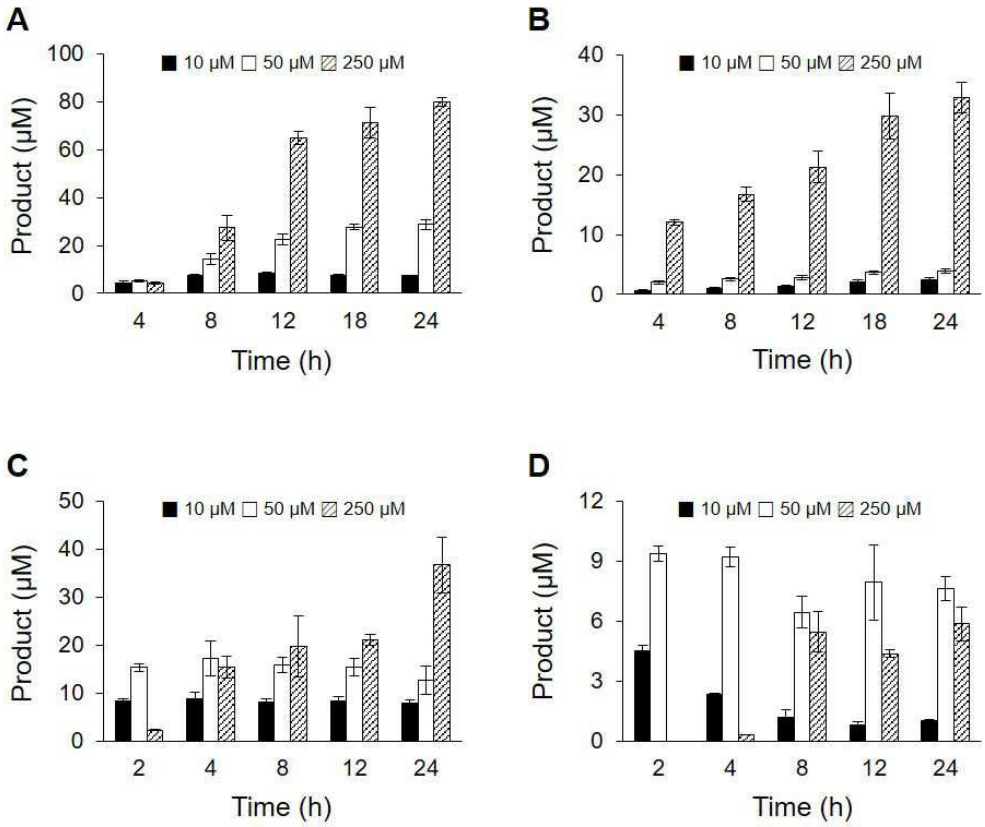
도면12


Flavonoid
SlOMT3/OsNOMT
(3′-OMT)
SlOMT3/OsNOMT
(7-OMT)
3′-Methoxyflavonoid
7-Methoxyflavonoid
SlOMT3/OsNOMT
(7-OMT)
SlOMT3/OsNOMT
(3′-OMT)
3′,7-Dimethoxyflavonoid

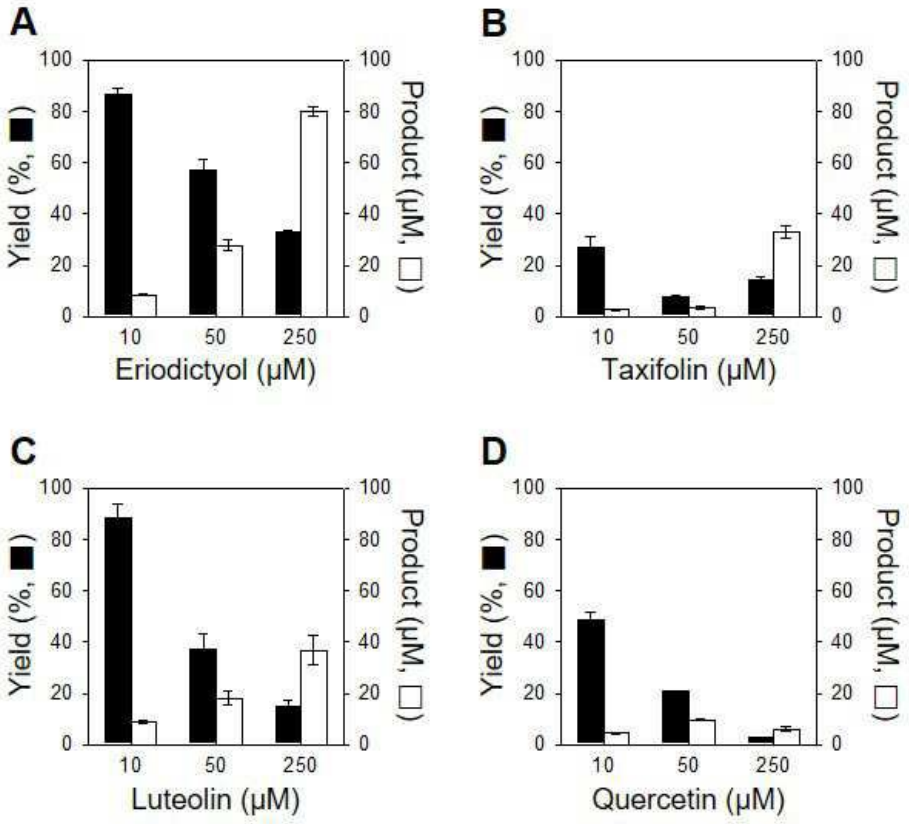
도면13



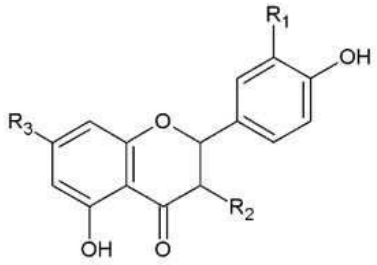
도면14


A
B
C
D
10 μM 50 μM 250 μM
Product (μM)
Time (h)

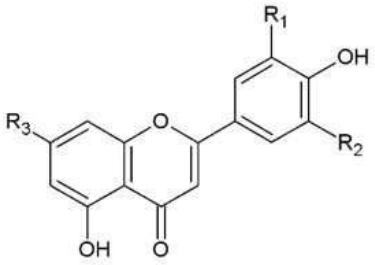
도면15


A
B
C
D
Yield (%, ■)
Product (μM, □)
Eriodictyol (μM)
Taxifolin (μM)
Luteolin (μM)
Quercetin (μM)

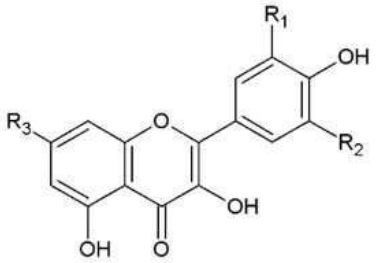
도면16



Naringenin; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH
Sakuranetin; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OCH_3
Eriodictyol; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH
Homoeriodictyol; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH
7-*O*-Methyleriodictyol; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OCH_3
3',7-*O*-Dimethyleriodictyol; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OCH_3
Taxifolin; R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH
3'-*O*-Methyltaxifolin; R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = OH
7-*O*-Methyltaxifolin; R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OCH_3
3',7-*O*-Dimethyltaxifolin; R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = OCH_3



Apigenin; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH
Luteolin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH
Chrysoeriol; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH
7-*O*-Methylluteolin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OCH_3
Velutin; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OCH_3
Tricetin; R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH
Tricin; R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OH



Kaempferol; R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH
Quercetin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH
Rhamnetin; R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OCH_3
Isorhamnetin; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OH
Rhamnazin; R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = OCH_3
Syringetin; R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_3 = OH

서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Fusion flavonoid O-methyltransferase and use thereof

<130> DP-16-786

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 357

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> 3'/5'-O-methyltransferase derived from Solanum lycopersicum

<400> 1

Met Gly Ser Thr Ser Leu Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Phe Leu Phe

1 5 10 15

Ala Met Gln Leu Ala Ser Ala Ser Val Leu Pro Met Val Leu Lys Ser

20 25 30

Ala Val Glu Leu Glu Leu Leu Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Pro Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Pro Cys Lys Asn

50 55 60

Pro Asp Ala Pro Val Met Leu Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Thr

65 70 75 80

Tyr Ser Val Leu Asn Cys Thr Leu Arg Thr Leu Pro Asp Gly Arg Val

85 90 95

Glu Arg Leu Tyr Ser Leu Ala Pro Val Cys Lys Phe Leu Thr Lys Asn

100 105 110

Ala Asp Gly Val Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Met Asn Gln Asp Lys

115 120 125

Val Leu Met Gln Ser Trp Tyr His Leu Lys Asp Ala Val Leu Asp Gly

130 135 140

Gly Ile Pro Phe Asn Lys Ala Tyr Gly Met Thr Ala Phe Glu Tyr His

145 150 155 160

Gly Thr Asp Pro Arg Phe Asn Lys Val Phe Asn Arg Gly Met Ser Asp

165 170 175

His Thr Thr Leu Ser Ile Lys Lys Ile Leu Glu Asp Tyr Lys Gly Phe

180 185 190

Glu Gly Leu Asn Ser Ile Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr

195 200 205

Val Ser Met Ile Val Ser Lys Tyr Pro Ser Ile Lys Gly Ile Asn Phe

210 215 220

Asp Leu Pro His Val Ile Glu Asp Ala Pro Ala Tyr Pro Gly Val Glu

225 230 235 240

His Ile Gly Gly Asp Met Phe Val Ser Val Pro Lys Ala Asp Ala Ile

245 250 255

Phe Met Lys Trp Ile Cys His Asp Trp Ser Asp Glu His Cys Leu Lys

260 265 270

Phe Leu Lys Asn Cys Tyr Glu Ala Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Ile

275 280 285

Ile Ala Glu Cys Leu Leu Pro Glu Val Pro Asp Thr Ser Ser Ser Thr

290 295 300

Lys Asn Thr Val His Val Asp Val Ile Met Leu Ala His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Gly Lys Glu Arg Thr Glu Lys Glu Phe Glu Ala Leu Ala Lys Gly Ala

325 330 335

Gly Phe Asn Gly Phe Thr Lys Ala Ser Cys Ala Tyr Asn Thr Trp Ile

340 345 350

Met Glu Phe Thr Lys

355

<210> 2

<211> 375

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> 7-O-methyltransferase derived from Oryza sativa

<400> 2

Met Val Ser Pro Val Val His Arg His Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Asp Asp Asp Asp Gln Ala Cys Met Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Gly

20 25 30

Gly Ser Val Val Ser Met Thr Leu Lys Ala Ala Ile Glu Leu Gly Leu

35 40 45

Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Ala Val Thr Ala Glu Glu

50 55 60

Leu Ala Ala Arg Leu Arg Leu Pro Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala

65 70 75 80

Val Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Ser Tyr Gly Val Val Arg Cys

85 90 95

Ala Thr Glu Ala Gly Pro Asp Gly Lys Ala Arg Arg Ser Tyr Ala Ala

100 105 110

Ala Pro Val Cys Lys Trp Leu Ala Ala Gly Ser Ser Ser Gly Glu Gly

115 120 125

Ser Met Ala Pro Leu Gly Leu Leu Asn Leu Asp Lys Val Phe Met Glu

130 135 140

Asn Trp Tyr Tyr Leu Lys Glu Ala Val Ser Glu Gly Gly Thr Ala Phe

145 150 155 160

Asp Lys Ala Tyr Gly Thr Ser Leu Phe Gln Tyr Leu Gly Gln Asp Gly

165 170 175

Asn Glu Pro Ser Asn Thr Leu Phe Asn Gln Ala Met Ala Ser His Ser

180 185 190

Val Val Ile Thr Asn Lys Leu Leu Gln Phe Phe Arg Gly Phe Asp Ala

195 200 205

Gly Ala Gly Val Asp Val Leu Val Asp Val Gly Gly Gly Val Gly Ala

210 215 220

Thr Leu Arg Met Ile Thr Ala Arg His Pro His Leu Arg Gly Val Asn

225 230 235 240

Tyr Asp Leu Pro His Val Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Glu Gly Val

245 250 255

Glu His Ile Gly Gly Ser Met Phe Asp His Val Pro Ser Gly Ser Ala

260 265 270

Ile Leu Leu Lys Trp Ile Leu His Leu Trp Gly Asp Glu Glu Cys Val

275 280 285

Lys Ile Leu Lys Asn Cys Tyr Lys Ala Leu Pro Ala Lys Gly Lys Val

290 295 300

Ile Leu Val Glu Tyr Val Leu Pro Ala Ser Pro Glu Ala Thr Leu Ala

305 310 315 320

Ala Gln Glu Ala Phe Arg Leu Asp Val Met Met Leu Asn Arg Leu Ala

325 330 335

Gly Gly Lys Glu Arg Thr Gln Gln Glu Phe Thr Asp Leu Ala Val Asp

340 345 350

Ala Gly Phe Ser Gly Asp Cys Lys Pro Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Val

355 360 365

Trp Ala Leu Glu Phe Thr Lys
370 375

<210> 3
<211> 366
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> 8-O-methyltransferase derived from Mentha piperita
<400> 3

Met Ala Leu Pro Asn Gly Ile Ser Ser Lys Gln Glu Leu Leu Glu Ala
1 5 10 15
Gln Ala His Val Trp Asn His Ile Tyr Ser Tyr Ile Asn Ser Met Ser
20 25 30
Leu Lys Cys Ala Ile Gln Leu Gly Ile Pro Asp Ala Ile His Lys His

35 40 45
Gly Asn Pro Ile Thr Leu Ser Gln Leu Ala Asp Ala Leu Asn Ile Asn
50 55 60
Lys Ala Lys Ser His Gly Leu Phe Arg Leu Met Arg Ile Leu Val His
65 70 75 80
Ser Gly Phe Phe Asp Lys Val Lys Val Lys Val Lys Val Glu Gly Glu
85 90 95
Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Ala Tyr Ser Leu Thr Pro Ala Ser Arg
100 105 110

Leu Leu Leu Arg Ser Glu Pro Leu Ser Val Ala Pro Phe Ala Leu Ala
115 120 125
Met Ser Asp Pro Val Tyr Thr Glu Thr Trp His His Leu Ser Glu Trp
130 135 140
Phe Arg Asn Asp Ala Val Ala Ala Phe Asp Thr Lys Tyr Gly Met Thr
145 150 155 160
Phe Pro Glu Tyr Ala Val Ala Asp Asp Arg Leu Asn Val Leu Phe Asn
165 170 175

Glu Ala Met Ala Cys Asp Ala Gly Phe Val Asn Ser Ile Leu Thr Thr

180 185 190

Glu Cys Arg Glu Ile Phe Asp Gly Leu Glu Ser Met Val Asp Val Gly

195 200 205

Gly Gly Thr Gly Ala Thr Ala Lys Gly Ile Ala Ala Ala Phe Pro Gly

210 215 220

Met Glu Cys Thr Val Leu Asp Leu Pro Asn Val Val Gly Gly Leu Lys

225 230 235 240

Gly Ser Glu Asn Leu Ser Phe Val Ser Gly Asp Met Phe Asp Phe Ile

245 250 255

Pro His Ala Asp Ala Ile Phe Met Lys Phe Ile Leu His Asp Trp Asn

260 265 270

Asp Glu Glu Cys Val Lys Ile Leu Lys Lys Cys Lys Glu Ala Ile Ser

275 280 285

Arg Ser Asn Asn Ser Cys Arg Lys Ile Ile Leu Val Glu Ile Val Met

290 295 300

Glu Asp Glu Lys Glu Thr His Glu Ala Thr Glu Thr Lys Leu Phe Phe

305 310 315 320

Asp Met Gln Met Leu Ala Ile Ile Thr Gly Lys Glu Arg Ser Glu Lys

325 330 335

Glu Trp Gly Lys Leu Phe Phe Asp Ala Gly Phe Thr Asn Tyr Lys Ile

340 345 350

Thr Arg Val Leu Gly Leu Arg Ser Val Ile Glu Val Phe Pro

355 360 365

<210> 4

<211> 343

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> 4'-O-methyltransferase derived from Mentha piperita

<400> 4

Met Val Ala Asp Glu Glu Val Arg Val Arg Ala Glu Ala Trp Asn Asn

1 5 10 15

Ala Phe Gly Tyr Ile Lys Pro Thr Ala Val Ala Thr Ala Val Glu Leu
20 25 30
Gly Leu Pro Asp Ile Leu Glu Asn His Asp Gly Pro Met Ser Leu Leu
35 40 45
Glu Leu Ser Ala Ala Thr Asp Cys Pro Ala Glu Pro Leu His Arg Leu
50 55 60
Met Arg Phe Leu Val Phe His Gly Ile Phe Lys Lys Thr Ala Lys Pro
65 70 75 80
Pro Leu Ser Asn Glu Ala Val Tyr Tyr Ala Arg Thr Ala Leu Ser Arg

85 90 95
Leu Phe Thr Arg Asp Glu Leu Gly Asp Phe Met Leu Leu Gln Thr Gly
100 105 110
Pro Leu Ser Gln His Pro Ala Gly Leu Thr Ala Ser Ser Leu Arg Thr
115 120 125
Gly Lys Pro Gln Phe Ile Arg Ser Val Asn Gly Glu Asp Ser Trp Thr
130 135 140
Asp Pro Val Asn Gly Tyr His Met Lys Val Phe Ser Asp Ala Met Ala
145 150 155 160

Ala His Ala Arg Glu Thr Thr Ala Ala Ile Val Arg Tyr Cys Pro Ala
165 170 175
Ala Phe Glu Gly Ile Gly Thr Val Val Asp Val Gly Gly Arg His Gly
180 185 190
Val Ala Leu Glu Lys Leu Val Ala Ala Phe Pro Trp Val Arg Gly Ile
195 200 205
Ser Phe Asp Leu Pro Glu Ile Val Ala Lys Ala Pro Pro Arg Pro Gly
210 215 220
Ile Glu Phe Val Gly Gly Ser Phe Phe Glu Ser Val Pro Lys Gly Asp

225 230 235 240
Leu Val Leu Leu Met Trp Ile Leu His Asp Trp Ser Asp Glu Ser Cys
245 250 255

Ile Glu Ile Met Lys Lys Cys Lys Glu Ala Ile Pro Thr Ser Gly Lys
260 265 270
Val Met Ile Val Asp Ala Ile Val Asp Glu Asp Gly Glu Gly Asp Asp
275 280 285
Phe Ala Gly Ala Arg Leu Ser Leu Asp Leu Ile Met Met Ala Val Leu
290 295 300

Ala Arg Gly Lys Glu Arg Thr Tyr Arg Glu Trp Glu Tyr Leu Leu Arg
305 310 315 320
Glu Ala Gly Phe Thr Lys Phe Val Val Lys Asn Ile Asn Thr Val Glu
325 330 335
Phe Val Ile Glu Ala Tyr Pro
340

<210> 5
<211> 359
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> 4'-O-methyltransferase derived from Catharanthus roseus
<400> 5
Met Asp Leu Gln Thr Ala Glu Phe Arg Glu Ala Gln Ala Lys Ile Trp

1 5 10 15
Ser Gln Ala Phe Ser Phe Ala Asn Cys Ala Ala Leu Lys Cys Ala Val
20 25 30
Lys Leu Gly Ile Ala Asp Ala Ile Asp Asn His Asp Lys Lys Ala Leu
35 40 45
Thr Leu Ser Glu Leu Thr Glu Glu Leu Ser Ile Lys Pro Ser Lys Ser
50 55 60
Pro Phe Leu Gln Arg Leu Met Arg Gln Leu Val Asn Ala Gly Phe Phe
65 70 75 80

Thr Glu Ala Lys Gln Leu Arg Asp Asp Asn Lys Asp Gly Arg Thr Thr
85 90 95
Thr Ala Tyr Ala Leu Thr Pro Val Ser Arg Leu Leu Leu Lys Asn Glu
100 105 110

Gln Trp Asn Leu Arg Gly Ile Val Leu Thr Met Leu Asp Pro Ala Glu
115 120 125
Leu Lys Ala Trp Ser Val Leu Asn Asp Trp Phe Lys Asn Asp Asp Pro
130 135 140
Thr Ala Phe Gln Thr Ala His Glu Lys Asn Tyr Trp Asp Tyr Thr Ala

145 150 155 160
Glu Asn Thr Gln His Cys Gln Ile Phe Glu Asp Ala Met Ala Asn Asp
165 170 175
Ser Val Leu Val Ser Lys Leu Leu Val Thr Glu Tyr Lys Phe Leu Phe
180 185 190
Glu Gly Leu Thr Ser Leu Ile Asp Leu Gly Gly Ser Thr Gly Thr Ile
195 200 205
Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ser Phe Pro Asn Leu Lys Cys Thr Val Phe
210 215 220

Asp Leu Pro His Val Val Ala Asn Leu Glu Ser Thr Lys Asn Leu Glu
225 230 235 240
Phe Val Gly Gly Asp Met Phe Glu Lys Leu Pro Pro Ser Asn Ala Ile
245 250 255
Leu Leu Lys Trp Ile Leu His Asp Trp Asn Asp Glu Asp Cys Val Lys
260 265 270
Ile Leu Lys Asn Cys Lys Lys Ala Ile Gln Glu Lys Gly Asn Gly Gly
275 280 285
Lys Val Ile Ile Ile Asp Thr Val Val Tyr Ser Gln Lys Asn Glu Lys

290 295 300
Glu Leu Val Asp Leu Gln Ile Ser Met Asp Met Ala Met Val Ile Asn
305 310 315 320
Phe Ala Ala Lys Glu Arg Thr Glu Glu Glu Trp Glu His Leu Ile Arg
325 330 335
Glu Ala Gly Phe Ser Gly His Lys Ile Phe Pro Met Tyr Asp Phe Arg
340 345 350
Ser Ile Ile Glu Val Tyr Pro
355

<210> 6

<211> 343

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> 3-O-methyltransferase derived from Chrysosplenium americanum

<400> 6

Met Leu Phe Ala Met Gln Leu Ala Cys Ala Ser Val Leu Pro Met Val
1 5 10 15

Leu Lys Ser Ala Ile Glu Leu Asp Leu Leu Glu Ile Ile Arg Gly Gln
20 25 30

Asp Thr Cys Met Ser Pro Thr Glu Ile Ala Ser His Leu Pro Thr Thr
35 40 45

Asn Pro Asp Ala Pro Ala Met Val Asp Arg Ile Leu Arg Leu Leu Ser
50 55 60

Cys Tyr Ser Val Val Thr Cys Ser Val Arg Ser Val Asp Asp Gln Arg
65 70 75 80

Val Tyr Gly Leu Ala Pro Val Cys Lys Tyr Leu Thr Lys Asn Gln Asp
85 90 95

Gly Val Ser Ile Ala Ala Leu Cys Leu Met Asn Gln Asp Lys Val Leu
100 105 110

Met Glu Ser Trp Tyr His Leu Lys Asp Ala Val Leu Asp Gly Gly Ile
115 120 125

Pro Phe Asn Lys Ala Tyr Gly Met Ser Ser Phe Glu Tyr His Gly Thr
130 135 140

Asp Pro Arg Phe Asn Lys Val Phe Asn Arg Gly Met Ser Asp His Ser
145 150 155 160

Thr Ile Thr Met Lys Lys Val Phe Gln Thr Tyr Gln Gly Phe Gln Gly
165 170 175

Leu Thr Ser Leu Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr Leu Thr
180 185 190

Met Ile Leu Ser Lys Tyr Pro Thr Ile Arg Cys Ile Asn Phe Asp Leu

195 200 205

Pro His Val Ile Glu Asp Ala Pro Glu Tyr Pro Gly Ile Glu His Val

210 215 220

Gly Gly Asp Met Phe Val Ser Val Pro Lys Gly Asp Ala Ile Phe Met

225 230 235 240

Lys Trp Ile Cys His Asp Trp Ser Asp Glu His Cys Leu Lys Leu Leu

245 250 255

Lys Asn Cys Tyr Asp Ala Leu Pro Asn Asn Gly Lys Val Ile Leu Ala

260 265 270

Glu Cys Ile Leu Pro Glu Val Pro Asp Ser Ser Leu Ala Thr Lys Gly

275 280 285

Val Val His Ile Asp Val Ile Thr Val Ala His Asn Pro Gly Gly Lys

290 295 300

Glu Arg Thr Glu Lys Glu Phe Glu Ala Leu Ala Lys Ala Ala Gly Phe

305 310 315 320

Gln Gly Phe Gln Val Phe Cys Asn Ala Phe Asn Thr Tyr Ile Ile Glu

325 330 335

Phe Ser Lys Lys Ile Cys Asn

340

<210> 7

<211> 732

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 1

<400> 7

Met Gly Ser Thr Ser Leu Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Phe Leu Phe

1 5 10 15

Ala Met Gln Leu Ala Ser Ala Ser Val Leu Pro Met Val Leu Lys Ser

20 25 30

Ala Val Glu Leu Glu Leu Leu Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Pro Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Pro Cys Lys Asn

50 55 60

Pro Asp Ala Pro Val Met Leu Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Thr

65 70 75 80

Tyr Ser Val Leu Asn Cys Thr Leu Arg Thr Leu Pro Asp Gly Arg Val

85 90 95

Glu Arg Leu Tyr Ser Leu Ala Pro Val Cys Lys Phe Leu Thr Lys Asn

100 105 110

Ala Asp Gly Val Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Met Asn Gln Asp Lys

115 120 125

Val Leu Met Gln Ser Trp Tyr His Leu Lys Asp Ala Val Leu Asp Gly

130 135 140

Gly Ile Pro Phe Asn Lys Ala Tyr Gly Met Thr Ala Phe Glu Tyr His

145 150 155 160

Gly Thr Asp Pro Arg Phe Asn Lys Val Phe Asn Arg Gly Met Ser Asp

165 170 175

His Thr Thr Leu Ser Ile Lys Lys Ile Leu Glu Asp Tyr Lys Gly Phe

180 185 190

Glu Gly Leu Asn Ser Ile Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr

195 200 205

Val Ser Met Ile Val Ser Lys Tyr Pro Ser Ile Lys Gly Ile Asn Phe

210 215 220

Asp Leu Pro His Val Ile Glu Asp Ala Pro Ala Tyr Pro Gly Val Glu

225 230 235 240

His Ile Gly Gly Asp Met Phe Val Ser Val Pro Lys Ala Asp Ala Ile

245 250 255

Phe Met Lys Trp Ile Cys His Asp Trp Ser Asp Glu His Cys Leu Lys

260 265 270

Phe Leu Lys Asn Cys Tyr Glu Ala Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Ile

275 280 285

Ile Ala Glu Cys Leu Leu Pro Glu Val Pro Asp Thr Ser Ser Ser Thr

290 295 300

Lys Asn Thr Val His Val Asp Val Ile Met Leu Ala His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Gly Lys Glu Arg Thr Glu Lys Glu Phe Glu Ala Leu Ala Lys Gly Ala

325 330 335

Gly Phe Asn Gly Phe Thr Lys Ala Ser Cys Ala Tyr Asn Thr Trp Ile

340 345 350

Met Glu Phe Thr Lys Met Val Ser Pro Val Val His Arg His Ala Ala

355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Asp Asp Asp Gln Ala Cys Met Tyr Ala

370 375 380

Leu Glu Leu Leu Gly Gly Ser Val Val Ser Met Thr Leu Lys Ala Ala

385 390 395 400

Ile Glu Leu Gly Leu Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Ala

405 410 415

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

420 425 430

Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Ser Tyr

435 440 445

Gly Val Val Arg Cys Ala Thr Glu Ala Gly Pro Asp Gly Lys Ala Arg

450 455 460

Arg Ser Tyr Ala Ala Ala Pro Val Cys Lys Trp Leu Ala Ala Gly Ser

465 470 475 480

Ser Ser Gly Glu Gly Ser Met Ala Pro Leu Gly Leu Leu Asn Leu Asp

485 490 495

Lys Val Phe Met Glu Asn Trp Tyr Tyr Leu Lys Glu Ala Val Ser Glu

500 505 510

Gly Gly Thr Ala Phe Asp Lys Ala Tyr Gly Thr Ser Leu Phe Gln Tyr

515 520 525

Leu Gly Gln Asp Gly Asn Glu Pro Ser Asn Thr Leu Phe Asn Gln Ala

530 535 540

Met Ala Ser His Ser Val Val Ile Thr Asn Lys Leu Leu Gln Phe Phe

545 550 555 560

Arg Gly Phe Asp Ala Gly Ala Gly Val Asp Val Leu Val Asp Val Gly
565 570 575
Gly Gly Val Gly Ala Thr Leu Arg Met Ile Thr Ala Arg His Pro His
580 585 590
Leu Arg Gly Val Asn Tyr Asp Leu Pro His Val Ile Ala Gln Ala Pro
595 600 605
Pro Val Glu Gly Val Glu His Ile Gly Gly Ser Met Phe Asp His Val
610 615 620

Pro Ser Gly Ser Ala Ile Leu Leu Lys Trp Ile Leu His Leu Trp Gly
625 630 635 640
Asp Glu Glu Cys Val Lys Ile Leu Lys Asn Cys Tyr Lys Ala Leu Pro
645 650 655
Ala Lys Gly Lys Val Ile Leu Val Glu Tyr Val Leu Pro Ala Ser Pro
660 665 670
Glu Ala Thr Leu Ala Ala Gln Glu Ala Phe Arg Leu Asp Val Met Met
675 680 685
Leu Asn Arg Leu Ala Gly Gly Lys Glu Arg Thr Gln Gln Glu Phe Thr

690 695 700
Asp Leu Ala Val Asp Ala Gly Phe Ser Gly Asp Cys Lys Pro Thr Tyr
705 710 715 720
Ile Phe Thr Asn Val Trp Ala Leu Glu Phe Thr Lys
725 730

<210> 8
<211> 734
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 2
<400> 8
Met Gly Ser Thr Ser Leu Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Phe Leu Phe
1 5 10 15

Ala Met Gln Leu Ala Ser Ala Ser Val Leu Pro Met Val Leu Lys Ser
20 25 30

Ala Val Glu Leu Glu Leu Leu Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Pro Gly
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Pro Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Pro Cys Lys Asn
50 55 60
Pro Asp Ala Pro Val Met Leu Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Thr
65 70 75 80
Tyr Ser Val Leu Asn Cys Thr Leu Arg Thr Leu Pro Asp Gly Arg Val

85 90 95
Glu Arg Leu Tyr Ser Leu Ala Pro Val Cys Lys Phe Leu Thr Lys Asn
100 105 110
Ala Asp Gly Val Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Met Asn Gln Asp Lys
115 120 125
Val Leu Met Gln Ser Trp Tyr His Leu Lys Asp Ala Val Leu Asp Gly
130 135 140
Gly Ile Pro Phe Asn Lys Ala Tyr Gly Met Thr Ala Phe Glu Tyr His
145 150 155 160

Gly Thr Asp Pro Arg Phe Asn Lys Val Phe Asn Arg Gly Met Ser Asp
165 170 175
His Thr Thr Leu Ser Ile Lys Lys Ile Leu Glu Asp Tyr Lys Gly Phe
180 185 190
Glu Gly Leu Asn Ser Ile Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr
195 200 205
Val Ser Met Ile Val Ser Lys Tyr Pro Ser Ile Lys Gly Ile Asn Phe
210 215 220
Asp Leu Pro His Val Ile Glu Asp Ala Pro Ala Tyr Pro Gly Val Glu

225 230 235 240
His Ile Gly Gly Asp Met Phe Val Ser Val Pro Lys Ala Asp Ala Ile
245 250 255
Phe Met Lys Trp Ile Cys His Asp Trp Ser Asp Glu His Cys Leu Lys
260 265 270
Phe Leu Lys Asn Cys Tyr Glu Ala Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Ile
275 280 285

Ile Ala Glu Cys Leu Leu Pro Glu Val Pro Asp Thr Ser Ser Ser Thr
290 295 300

Lys Asn Thr Val His Val Asp Val Ile Met Leu Ala His Asn Pro Gly
305 310 315 320
Gly Lys Glu Arg Thr Glu Lys Glu Phe Glu Ala Leu Ala Lys Gly Ala
325 330 335
Gly Phe Asn Gly Phe Thr Lys Ala Ser Cys Ala Tyr Asn Thr Trp Ile
340 345 350
Met Glu Phe Thr Lys Gly Asp Met Val Ser Pro Val Val His Arg His
355 360 365
Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Asp Asp Asp Gln Ala Cys Met

370 375 380
Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Gly Gly Ser Val Val Ser Met Thr Leu Lys
385 390 395 400
Ala Ala Ile Glu Leu Gly Leu Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly
405 410 415
Ala Ala Val Thr Ala Glu Glu Leu Ala Ala Arg Leu Arg Leu Pro Ala
420 425 430
Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala
435 440 445

Ser Tyr Gly Val Val Arg Cys Ala Thr Glu Ala Gly Pro Asp Gly Lys
450 455 460
Ala Arg Arg Ser Tyr Ala Ala Ala Pro Val Cys Lys Trp Leu Ala Ala
465 470 475 480
Gly Ser Ser Ser Gly Glu Gly Ser Met Ala Pro Leu Gly Leu Leu Asn
485 490 495
Leu Asp Lys Val Phe Met Glu Asn Trp Tyr Tyr Leu Lys Glu Ala Val
500 505 510
Ser Glu Gly Gly Thr Ala Phe Asp Lys Ala Tyr Gly Thr Ser Leu Phe

515 520 525
Gln Tyr Leu Gly Gln Asp Gly Asn Glu Pro Ser Asn Thr Leu Phe Asn

530 535 540

Gln Ala Met Ala Ser His Ser Val Val Ile Thr Asn Lys Leu Leu Gln

545 550 555 560

Phe Phe Arg Gly Phe Asp Ala Gly Ala Gly Val Asp Val Leu Val Asp

565 570 575

Val Gly Gly Gly Val Gly Ala Thr Leu Arg Met Ile Thr Ala Arg His

580 585 590

Pro His Leu Arg Gly Val Asn Tyr Asp Leu Pro His Val Ile Ala Gln

595 600 605

Ala Pro Pro Val Glu Gly Val Glu His Ile Gly Gly Ser Met Phe Asp

610 615 620

His Val Pro Ser Gly Ser Ala Ile Leu Leu Lys Trp Ile Leu His Leu

625 630 635 640

Trp Gly Asp Glu Glu Cys Val Lys Ile Leu Lys Asn Cys Tyr Lys Ala

645 650 655

Leu Pro Ala Lys Gly Lys Val Ile Leu Val Glu Tyr Val Leu Pro Ala

660 665 670

Ser Pro Glu Ala Thr Leu Ala Ala Gln Glu Ala Phe Arg Leu Asp Val

675 680 685

Met Met Leu Asn Arg Leu Ala Gly Gly Lys Glu Arg Thr Gln Gln Glu

690 695 700

Phe Thr Asp Leu Ala Val Asp Ala Gly Phe Ser Gly Asp Cys Lys Pro

705 710 715 720

Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Val Trp Ala Leu Glu Phe Thr Lys

725 730

<210> 9

<211> 737

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 3

<400> 9

Met Gly Ser Thr Ser Leu Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Phe Leu Phe

1 5 10 15

Ala Met Gln Leu Ala Ser Ala Ser Val Leu Pro Met Val Leu Lys Ser

20 25 30

Ala Val Glu Leu Glu Leu Leu Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Pro Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Pro Cys Lys Asn

50 55 60

Pro Asp Ala Pro Val Met Leu Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Thr

65 70 75 80

Tyr Ser Val Leu Asn Cys Thr Leu Arg Thr Leu Pro Asp Gly Arg Val

85 90 95

Glu Arg Leu Tyr Ser Leu Ala Pro Val Cys Lys Phe Leu Thr Lys Asn

100 105 110

Ala Asp Gly Val Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Met Asn Gln Asp Lys

115 120 125

Val Leu Met Gln Ser Trp Tyr His Leu Lys Asp Ala Val Leu Asp Gly

130 135 140

Gly Ile Pro Phe Asn Lys Ala Tyr Gly Met Thr Ala Phe Glu Tyr His

145 150 155 160

Gly Thr Asp Pro Arg Phe Asn Lys Val Phe Asn Arg Gly Met Ser Asp

165 170 175

His Thr Thr Leu Ser Ile Lys Lys Ile Leu Glu Asp Tyr Lys Gly Phe

180 185 190

Glu Gly Leu Asn Ser Ile Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr

195 200 205

Val Ser Met Ile Val Ser Lys Tyr Pro Ser Ile Lys Gly Ile Asn Phe

210 215 220

Asp Leu Pro His Val Ile Glu Asp Ala Pro Ala Tyr Pro Gly Val Glu

225 230 235 240

His Ile Gly Gly Asp Met Phe Val Ser Val Pro Lys Ala Asp Ala Ile

245 250 255

Phe Met Lys Trp Ile Cys His Asp Trp Ser Asp Glu His Cys Leu Lys

260 265 270

Phe Leu Lys Asn Cys Tyr Glu Ala Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Ile
275 280 285
Ile Ala Glu Cys Leu Leu Pro Glu Val Pro Asp Thr Ser Ser Ser Thr
290 295 300
Lys Asn Thr Val His Val Asp Val Ile Met Leu Ala His Asn Pro Gly
305 310 315 320
Gly Lys Glu Arg Thr Glu Lys Glu Phe Glu Ala Leu Ala Lys Gly Ala
325 330 335
Gly Phe Asn Gly Phe Thr Lys Ala Ser Cys Ala Tyr Asn Thr Trp Ile

340 345 350
Met Glu Phe Thr Lys Glu Ala Ala Ala Lys Met Val Ser Pro Val Val
355 360 365
His Arg His Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Asp Asp Asp Gln
370 375 380
Ala Cys Met Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Gly Gly Ser Val Val Ser Met
385 390 395 400
Thr Leu Lys Ala Ala Ile Glu Leu Gly Leu Val Asp Glu Leu Leu Ala
405 410 415

Ala Ala Gly Ala Ala Val Thr Ala Glu Glu Leu Ala Ala Arg Leu Arg
420 425 430
Leu Pro Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Met Leu Arg
435 440 445
Leu Leu Ala Ser Tyr Gly Val Val Arg Cys Ala Thr Glu Ala Gly Pro
450 455 460
Asp Gly Lys Ala Arg Arg Ser Tyr Ala Ala Ala Pro Val Cys Lys Trp
465 470 475 480
Leu Ala Ala Gly Ser Ser Ser Gly Glu Gly Ser Met Ala Pro Leu Gly

485 490 495
Leu Leu Asn Leu Asp Lys Val Phe Met Glu Asn Trp Tyr Tyr Leu Lys
500 505 510

Glu Ala Val Ser Glu Gly Gly Thr Ala Phe Asp Lys Ala Tyr Gly Thr
515 520 525

Ser Leu Phe Gln Tyr Leu Gly Gln Asp Gly Asn Glu Pro Ser Asn Thr
530 535 540

Leu Phe Asn Gln Ala Met Ala Ser His Ser Val Val Ile Thr Asn Lys
545 550 555 560

Leu Leu Gln Phe Phe Arg Gly Phe Asp Ala Gly Ala Gly Val Asp Val
565 570 575

Leu Val Asp Val Gly Gly Gly Val Gly Ala Thr Leu Arg Met Ile Thr
580 585 590

Ala Arg His Pro His Leu Arg Gly Val Asn Tyr Asp Leu Pro His Val
595 600 605

Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Glu Gly Val Glu His Ile Gly Gly Ser
610 615 620

Met Phe Asp His Val Pro Ser Gly Ser Ala Ile Leu Leu Lys Trp Ile

625 630 635 640

Leu His Leu Trp Gly Asp Glu Glu Cys Val Lys Ile Leu Lys Asn Cys
645 650 655

Tyr Lys Ala Leu Pro Ala Lys Gly Lys Val Ile Leu Val Glu Tyr Val
660 665 670

Leu Pro Ala Ser Pro Glu Ala Thr Leu Ala Ala Gln Glu Ala Phe Arg
675 680 685

Leu Asp Val Met Met Leu Asn Arg Leu Ala Gly Gly Lys Glu Arg Thr
690 695 700

Gln Gln Glu Phe Thr Asp Leu Ala Val Asp Ala Gly Phe Ser Gly Asp
705 710 715 720

Cys Lys Pro Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Val Trp Ala Leu Glu Phe Thr
725 730 735

Lys

<210> 10

<211> 739

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 4

<400> 10

Met Gly Ser Thr Ser Leu Thr Gln Thr Glu Asp Glu Ala Phe Leu Phe
1 5 10 15

Ala Met Gln Leu Ala Ser Ala Ser Val Leu Pro Met Val Leu Lys Ser
20 25 30

Ala Val Glu Leu Glu Leu Leu Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Pro Gly
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Pro Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Pro Cys Lys Asn
50 55 60

Pro Asp Ala Pro Val Met Leu Asp Arg Met Leu Arg Leu Leu Ala Thr
65 70 75 80

Tyr Ser Val Leu Asn Cys Thr Leu Arg Thr Leu Pro Asp Gly Arg Val

85 90 95

Glu Arg Leu Tyr Ser Leu Ala Pro Val Cys Lys Phe Leu Thr Lys Asn
100 105 110

Ala Asp Gly Val Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Met Asn Gln Asp Lys
115 120 125

Val Leu Met Gln Ser Trp Tyr His Leu Lys Asp Ala Val Leu Asp Gly
130 135 140

Gly Ile Pro Phe Asn Lys Ala Tyr Gly Met Thr Ala Phe Glu Tyr His
145 150 155 160

Gly Thr Asp Pro Arg Phe Asn Lys Val Phe Asn Arg Gly Met Ser Asp
165 170 175

His Thr Thr Leu Ser Ile Lys Lys Ile Leu Glu Asp Tyr Lys Gly Phe
180 185 190

Glu Gly Leu Asn Ser Ile Val Asp Val Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr
195 200 205

Val Ser Met Ile Val Ser Lys Tyr Pro Ser Ile Lys Gly Ile Asn Phe
210 215 220

Asp Leu Pro His Val Ile Glu Asp Ala Pro Ala Tyr Pro Gly Val Glu

225 230 235 240

His Ile Gly Gly Asp Met Phe Val Ser Val Pro Lys Ala Asp Ala Ile

245 250 255

Phe Met Lys Trp Ile Cys His Asp Trp Ser Asp Glu His Cys Leu Lys

260 265 270

Phe Leu Lys Asn Cys Tyr Glu Ala Val Pro Ala Asn Gly Lys Val Ile

275 280 285

Ile Ala Glu Cys Leu Leu Pro Glu Val Pro Asp Thr Ser Ser Ser Thr

290 295 300

Lys Asn Thr Val His Val Asp Val Ile Met Leu Ala His Asn Pro Gly

305 310 315 320

Gly Lys Glu Arg Thr Glu Lys Glu Phe Glu Ala Leu Ala Lys Gly Ala

325 330 335

Gly Phe Asn Gly Phe Thr Lys Ala Ser Cys Ala Tyr Asn Thr Trp Ile

340 345 350

Met Glu Phe Thr Lys Glu Ala Ala Ala Lys Gly Asp Met Val Ser Pro

355 360 365

Val Val His Arg His Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Asp Asp

370 375 380

Asp Gln Ala Cys Met Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Gly Gly Ser Val Val

385 390 395 400

Ser Met Thr Leu Lys Ala Ala Ile Glu Leu Gly Leu Val Asp Glu Leu

405 410 415

Leu Ala Ala Ala Gly Ala Ala Val Thr Ala Glu Glu Leu Ala Ala Arg

420 425 430

Leu Arg Leu Pro Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Met

435 440 445

Leu Arg Leu Leu Ala Ser Tyr Gly Val Val Arg Cys Ala Thr Glu Ala

450 455 460

Gly Pro Asp Gly Lys Ala Arg Arg Ser Tyr Ala Ala Ala Pro Val Cys

465 470 475 480

Lys Trp Leu Ala Ala Gly Ser Ser Ser Gly Glu Gly Ser Met Ala Pro

485 490 495

Leu Gly Leu Leu Asn Leu Asp Lys Val Phe Met Glu Asn Trp Tyr Tyr

500 505 510

Leu Lys Glu Ala Val Ser Glu Gly Gly Thr Ala Phe Asp Lys Ala Tyr

515 520 525

Gly Thr Ser Leu Phe Gln Tyr Leu Gly Gln Asp Gly Asn Glu Pro Ser

530 535 540

Asn Thr Leu Phe Asn Gln Ala Met Ala Ser His Ser Val Val Ile Thr

545 550 555 560

Asn Lys Leu Leu Gln Phe Phe Arg Gly Phe Asp Ala Gly Ala Gly Val

565 570 575

Asp Val Leu Val Asp Val Gly Gly Gly Val Gly Ala Thr Leu Arg Met

580 585 590

Ile Thr Ala Arg His Pro His Leu Arg Gly Val Asn Tyr Asp Leu Pro

595 600 605

His Val Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Glu Gly Val Glu His Ile Gly

610 615 620

Gly Ser Met Phe Asp His Val Pro Ser Gly Ser Ala Ile Leu Leu Lys

625 630 635 640

Trp Ile Leu His Leu Trp Gly Asp Glu Glu Cys Val Lys Ile Leu Lys

645 650 655

Asn Cys Tyr Lys Ala Leu Pro Ala Lys Gly Lys Val Ile Leu Val Glu

660 665 670

Tyr Val Leu Pro Ala Ser Pro Glu Ala Thr Leu Ala Ala Gln Glu Ala

675 680 685

Phe Arg Leu Asp Val Met Met Leu Asn Arg Leu Ala Gly Gly Lys Glu

690 695 700

Arg Thr Gln Gln Glu Phe Thr Asp Leu Ala Val Asp Ala Gly Phe Ser

705 710 715 720

Gly Asp Cys Lys Pro Thr Tyr Ile Phe Thr Asn Val Trp Ala Leu Glu

725 730 735

Phe Thr Lys

<210> 11

<211> 1071

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> polynucleotide coding 3'/5'-O-methyltransferase derived from Solanum lycopersicum

<400> 11

atgggttcaa caagcctaac tcaaacagag gatgaagctt tcttgttcgc tatgcaactg 60

gcgagtgcct ctgtactacc catggtctta aaatcagctg tagaacttga gcttctggaa 120

cttatggcta aggctggtcc aggtgcatcc atttcgcctg ctgagctagc gtctcaactc 180

ccttgtaaga acccagatgc accggtaatg ctggatcgaa tgcttaggct tcttgctact 240

tactctgttc tgaattgtac actcaggaca ctccctgatg gacgtgtaga gcggctttat 300

agtcttgctc cggtttgtaa gttcttgact aagaatgccg atggtgtttc cgttgcccca 360

cttttgctta tgaatcaaga taaagtactc atgcagagct ggtaccactt aaaagatgca 420

gtacttgatg gtggaatccc attcaacaag gcatatggaa tgacagcatt cgagtaccat 480

ggaacagatc caagattcaa caaagttttc aaccgtggaa tgtccgatca caccacctta 540

tccatcaaga agattctgga agactataaa ggatttgaag gactcaactc cattgttgat 600

gttggtggtg gaacaggggc tactgtaagc atgattgtct ctaagtatcc ctctattaag 660

ggcattaact ttgatttacc acatgttatt gaagatgccc cagcttaccc tggcgttgaa 720

cacattggtg gtgacatgtt tgttagtgtg ccgaaagcgg atgctatttt catgaagtgg 780

atatgtcatg attggagcga tgagcattgt ttaaagtttt tgaagaattg ctacgaagcg 840

gttcctgcaa atgggaaagt gataattgca gaatgcttac ttccagaggt gccagataca 900

tcaagttcca caaagaatac agtacatgtt gatgtaataa tgttagcaca taatccagga 960

ggcaaagaaa ggactgagaa agaatttgag gctttggcta aaggggctgg atttaatgga 1020

ttcaccaagg cttcttgtgc ttacaacact tggattatgg aattcaccaa g 1071

<210> 12

<211> 1125

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> polynucleotide coding 7-O-methyltransferase derived from Oryza sativa

<400> 12

atggtgagcc cggtggtaca ccgtcacgcc gccggcggcg gcagcggcgg cgacgacgac 60

gaccaggctt gcatgtacgc gctggagctc ctgggagggt cggtcgtctc catgacactc 120

aaggcggcga tcgagctcgg cctcgtcgac gagctcctcg ccgccgccgg cgccgccgtg 180

accgcggagg agctagctgc gcggctccgg ctccctgctg cggtcgccgc cgcggcggcg 240

gtggaccgca tgctgcggct cctcgcctcg tacggcgtcg tcaggtgcgc gacggaggcc 300

gggcccgacg gcaaggcccg ccggagctac gccgcggcgc cggtgtgcaa atggctcgcc 360

gccgggagca gcagcggcga agggtccatg gctccgcttg ggctgctcaa cctcgacaag 420

gtgttcatgg agaactggta ctacctgaag gaggcagtgt cggagggagg gacagcattc 480

gacaaggcgt acggcacgtc cttgttccag tacctgggcc aggacggcaa cgagccctcc 540

aacacgctct tcaaccaggc catggccagc cactccgtcg tcatcaccaa caagctgctc 600

caattcttcc gcggcttcga cgccggcgcc ggcgtggatg tgctcgtcga cgtcggcggc 660

ggcgtcggcg ccacgctgcg gatgatcacc gctcgccacc cccacctgcg tggcgtcaac 720

tacgaccttc cccatgtcat cgcgcaggcg ccgccagttg aaggtgtgga gcatatcgga 780

ggcagcatgt ttgaccatgt tcccagtgga agcgcaatct tgctcaagtg gattctgcac 840

ttgtgggggg acgaggagtg cgtgaagatc ctgaagaact gctacaaggc gctgccggcg 900

aaggggaagg tgatcttggt ggagtatgtg ctcccggcga gcccggaggc gacgctggcg 960

gcgcaggaag cgttccggct cgacgtcatg atgctgaacc gcctcgccgg cggcaaggag 1020

aggacgcagc aggagttcac cgacctcgcc gtcgacgccg gcttctccgg cgactgcaag 1080

cctacctaca tcttcaccaa cgtctgggct ctcgagttca caaag 1125

<210> 13

<211> 1000

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> polynucleotide coding 8-O-methyltransferase derived from Mentha piperita

<400> 13

atggcattgc ctaatggcat atcatcaaag caagagcttc ttgaagctca agctcatgta 60

tggaaccaca tctacagcta cataaactcc atgtccttaa aatgcgcgat tcaattaggc 120

atacccgacg ccatccacaa acacggcaac cctataacgc tttcccaact agccgatgcc 180

ctcaacatca acaaggccaa gtcccacggc ctctttcgcc taatgcggat tctagtccac 240

tccggattct tcgacaaggt caaggtcaag gtcaaggtcg agggcgagga cgaggaagaa 300

gaggaagatg cttattccct aactccagct tcgcgcctct tgttgaggag cgagcccttg 360

agcgtggcgc ctttcgcgct cgccatgtcg gaccccgtct acacggagac atggcaccat 420

ctgagcgaat ggttccgcaa cgatgctgtg gctgcgttcg ataccaaata cgggatgaca 480

ttcccggagt acgcggtggc tgacgatagg ttgaatgtgt tgttcaatga ggctatggct 540

tgtgatgcgg gctttgtgaa tagtattctc actacggagt gtagagagat cttcgatggc 600

ttggaatcga tggttgatgt cggcggcggc accggagcca cggcgaaggg gatcgccgcc 660

gccttccccg ggatggaatg tactgtgctt gaccttccaa acgttgtagg tggcctcaag 720

ggatctgaga atctgagctt tgttagtggg gacatgtttg attttattcc tcatgctgat 780

gcaattttta tgaagtttat attacatgac tggaacgacg aggagtgcgt taaaatactg 840

aagaaatgca aagaagcaat aagtaggagc aacaacagct gcagaaaaat aattcttgta 900

gaaatagtga tggaagatga aaaagaaacg cacgaggcaa cggaaacgaa gctcttcttc 960

gatatgcaaa tgctagcaat aatcacgggg aaagagagga 1000

<210> 14

<211> 1000

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> polynucleotide coding 4'-O-methyltransferase derived from Mentha

piperita

<400> 14

atggtggcgg atgaagaagt gcgagttcga gcagaagcgt ggaacaatgc tttcggctat 60

atcaagccaa ccgcggtggc aacggcggtg gagctaggtt taccggacat cttggagaac 120

cacgacggcc ccatgtcgtt gctggagctc tccgccgcca ccgactgccc cgctgagcct 180

ctccaccggc ttatgcggtt tttggtattc catggcatct tcaagaaaac cgctaaacca 240

ccgctctcta acgaagccgt ttactacgct cggacggcgc tctctcgtct cttcacgagg 300

gatgagttgg gggatttcat gttgctccag accggcccgc tgtcgcagca ccctgccggt 360

ttgaccgcca gttctctgag aaccgggaag ccccagttca tcaggtcggt caacggagag 420

gactcgtgga ctgacccggt caacggttat catatgaagg tcttttcgga tgccatggcg 480

gcgcacgccc gggagacgac ggcggcgatc gtccgttact gtcctgcggc attcgagggg 540

atcggcacgg tggtggacgt cggcggccgc catggggtag ctctagagaa gcttgtggcg 600

gccttccctt gggttcgcgg gatcagcttc gacctccctg aaattgtggc gaaggccccg 660

ccacgaccgg ggatcgagtt cgtcggaggg agctttttcg aaagcgtgcc gaaaggagac 720

ctagttctac tcatgtggat attgcacgat tggagtgacg aatcttgcat agagattatg 780

aagaaatgca aagaagcgat tccgacaagt ggaaaagtga tgatcgtaga tgctatagtc 840

gacgaagatg gagaaggtga cgactttgcc ggagctcgtt tgtcgctaga tttgataatg 900

atggcggtgt tggcgcgggg taaggaaaga acttatcgag aatgggagta tcttcttcgg 960

gaggcaggat ttacaaaatt cgtagtgaaa aatatcaata 1000

<210> 15

<211> 1000

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> polynucleotide coding 4'-O-methyltransferase derived from Catharanthus roseus

<400> 15

atggatttgc aaactgccga gtttcgtgaa gctcaagcta aaatatggag ccaagcattt 60

tcctttgcga attgtgcagc tttgaaatgt gcagttaaat taggcatagc agatgcaata 120

gacaatcatg acaaaaaagc tctcactctt tctgaactta ctgaagagct ctctatcaag 180

ccttctaaat ctccatttct acaacgccta atgcgtcaat tagtaaatgc tggcttcttt 240

acagaagcca agcaattaag ggatgacaat aaggacggga ggacaactac agcttatgcg 300

ctcacgccag taagccgtct tctattgaag aatgagcaat ggaatttaag aggaatcgta 360

ctcacaatgc ttgatcctgc tgaattaaag gcttggagtg ttttaaatga ttggtttaag 420

aatgatgatc caactgcttt tcaaacagct catgaaaaaa attattggga ttatacagct 480

gaaaataccc agcattgcca aatttttgaa gatgccatgg ctaatgactc tgttttggtc 540

tcaaagttgt tggttacaga gtataagttt ttgtttgaag gcttaacttc cttgattgat 600

cttggtggca gcacaggtac aattgctaaa gcccttgcca aaagctttcc aaacttaaag 660

tgtactgtat ttgatctccc acatgtggtt gctaaccttg aatcaactaa gaatttggag 720

tttgttggag gagacatgtt tgagaaactt ccccccttcta atgcaatcct tcttaaggta 780

caaatttttcg tttatatacc attaattctt ctgcaaacaa gtatatgcac ttatccatat 840

ataacttgat acttttgcct ctatgtttgt taattgcaaa taatacatat ggcatcaaat 900

ttttacaggg ctgacgaata ctgtgcctac aagatagaaa catattagaa ttgaggagat 960

tgcttttcaa attggtagga tcgaagaata tttaatatta 1000

<210> 16

<211> 1000

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> polynucleotide coding 3-O-methyltransferase derived from Chrysosplenium americanum

<400> 16

agaagaagaa gcaatgctgt ttgctatgca actggcatgt gcatccgtgt taccaatggt 60

cctcaaatcg gccatagaac tagacctgtt ggagatcata agaggtcaag atacgtgcat 120

gtccccaact gagattgctt ctcatttgcc tacaaccaac cctgatgcac cagccatggt 180

cgatcgcatt ttgcgcctcc tctcgtgcta ctctgtcgtc acgtgctctg ttcgaagtgt 240

cgatgatcaa agagtttacg gtcttgcacc agtttgcaag tacctgacca aaaatcaaga 300

tggtgtctcc attgctgctc tctgtctcat gaatcaagat aaagtcctta tggagagctg 360

gtaccacttg aaagatgcag tgcttgatgg tggaattcca ttcaacaaag cctacggaat 420

gtcttctttc gagtaccacg gcactgatcc aagattcaac aaagttttca ataggggaat 480

gtcggatcat tctacgatta ccatgaagaa agttttccaa acttatcaag ggttccaagg 540

actaacatct ttggttgatg tcggtggtgg taccggagca acgcttacca tgatcctctc 600

caagtaccct acaattcgat gcatcaactt tgatttgcct catgtcattg aggatgcccc 660

tgaatatccc ggcattgagc atgttggtgg agacatgttt gttagtgtcc ccaaaggaga 720

tgccattttc atgaagtgga tatgtcatga ttggagcgac gagcactgct tgaaattatt 780

gaaaaattgt tatgatgccc ttccgaataa tgggaaggtg attcttgctg aatgcatact 840

cccggaggta ccggacagca gcctagcaac taaaggagtt gtacatatcg atgttataac 900

tgtggcgcat aatccgggtg ggaaggagag gactgaaaaa gaattcgagg ctttagccaa 960

ggctgctggt tttcaaggtt ttcaagtgtt ctgcaatgca 1000

<210> 17

<211> 2196

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 1

<400> 17

atgggttcaa caagcctaac tcaaacagag gatgaagctt tcttgttcgc tatgcaactg 60

gcgagtgcct ctgtactacc catggtctta aaatcagctg tagaacttga gcttctggaa 120

cttatggcta aggctggtcc aggtgcatcc atttcgcctg ctgagctagc gtctcaactc 180

ccttgtaaga acccagatgc accggtaatg ctggatcgaa tgcttaggct tcttgctact 240

tactctgttc tgaattgtac actcaggaca ctccctgatg gacgtgtaga gcggctttat 300

agtcttgctc cggtttgtaa gttcttgact aagaatgccg atggtgtttc cgttgcccca 360

cttttgctta tgaatcaaga taaagtactc atgcagagct ggtaccactt aaaagatgca 420

gtacttgatg gtggaatccc attcaacaag gcatatggaa tgacagcatt cgagtaccat 480

ggaacagatc caagattcaa caaagttttc aaccgtggaa tgtccgatca caccacctta 540

tccatcaaga agattctgga agactataaa ggatttgaag gactcaactc cattgttgat 600

gttggtggtg gaacaggggc tactgtaagc atgattgtct ctaagtatcc ctctattaag 660

ggcattaact ttgatttacc acatgttatt gaagatgccc cagcttaccc tggcgttgaa 720

cacattggtg gtgacatgtt tgttagtgtg ccgaaagcgg atgctatttt catgaagtgg 780

atatgtcatg attggagcga tgagcattgt ttaaagtttt tgaagaattg ctacgaagcg 840

gttcctgcaa atgggaaagt gataattgca gaatgcttac ttccagaggt gccagataca 900

tcaagttcca caaagaatac agtacatgtt gatgtaataa tgttagcaca taatccagga 960

ggcaaagaaa ggactgagaa agaatttgag gctttggcta aaggggctgg atttaatgga 1020

ttcaccaagg cttcttgtgc ttacaacact tggattatgg aattcaccaa gatggtgagc 1080

ccggtggtac accgtcacgc cgccggcggc ggcagcggcg gcgacgacga cgaccaggct 1140

tgcatgtacg cgctggagct cctgggaggg tcggtcgtct ccatgacact caaggcggcg 1200

atcgagctcg gcctcgtcga cgagctcctc gccgccgccg gcgccgccgt gaccgcggag 1260

gagctagctg cgcggctccg gctccctgct gcggtcgccg ccgcggcggc ggtggaccgc 1320

atgctgcggc tcctcgcctc gtacggcgtc gtcaggtgcg cgacggaggc cgggcccgac 1380

ggcaaggccc gccggagcta cgccgcggcg ccggtgtgca aatggctcgc cgccgggagc 1440

agcagcggcg aagggtccat ggctccgctt gggctgctca acctcgacaa ggtgttcatg 1500

gagaactggt actacctgaa ggaggcagtg tcggagggag ggacagcatt cgacaaggcg 1560

tacggcacgt ccttgttcca gtacctgggc caggacggca acgagccctc caacacgctc 1620

ttcaaccagg ccatggccag ccactccgtc gtcatcacca acaagctgct ccaattcttc 1680

cgcggcttcg acgccggcgc cggcgtggat gtgctcgtcg acgtcggcgg cggcgtcggc 1740

gccacgctgc ggatgatcac cgctcgccac ccccacctgc gtggcgtcaa ctacgacctt 1800

ccccatgtca tcgcgcaggc gccgccagtt gaaggtgtgg agcatatcgg aggcagcatg 1860

tttgaccatg ttcccagtgg aagcgcaatc ttgctcaagt ggattctgca cttgtggggg 1920

gacgaggagt gcgtgaagat cctgaagaac tgctacaagg cgctgccggc gaaggggaag 1980

gtgatcttgg tggagtatgt gctcccggcg agcccggagg cgacgctggc ggcgcaggaa 2040

gcgttccggc tcgacgtcat gatgctgaac cgcctcgccg gcggcaagga gaggacgcag 2100

caggagttca ccgacctcgc cgtcgacgcc ggcttctccg gcgactgcaa gcctacctac 2160

atcttcacca acgtctgggc tctcgagttc acaaag 2196

<210> 18

<211> 2202

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 2

<400> 18

atgggttcaa caagcctaac tcaaacagag gatgaagctt tcttgttcgc tatgcaactg 60

gcgagtgcct ctgtactacc catggtctta aaatcagctg tagaacttga gcttctggaa 120

cttatggcta aggctggtcc aggtgcatcc atttcgcctg ctgagctagc gtctcaactc 180

ccttgtaaga acccagatgc accggtaatg ctggatcgaa tgcttaggct tcttgctact 240

tactctgttc tgaattgtac actcaggaca ctccctgatg gacgtgtaga gcggctttat 300

agtcttgctc cggtttgtaa gttcttgact aagaatgccg atggtgtttc cgttgcccca 360

cttttgctta tgaatcaaga taaagtactc atgcagagct ggtaccactt aaaagatgca 420

gtacttgatg gtggaatccc attcaacaag gcatatggaa tgacagcatt cgagtaccat 480

ggaacagatc caagattcaa caaagttttc aaccgtggaa tgtccgatca caccacctta 540

tccatcaaga agattctgga agactataaa ggatttgaag gactcaactc cattgttgat 600

gttggtggtg gaacaggggc tactgtaagc atgattgtct ctaagtatcc ctctattaag 660

ggcattaact ttgatttacc acatgttatt gaagatgccc cagcttaccc tggcgttgaa 720

cacattggtg gtgacatgtt tgttagtgtg ccgaaagcgg atgctatttt catgaagtgg 780

atatgtcatg attggagcga tgagcattgt ttaaagtttt tgaagaattg ctacgaagcg 840

gttcctgcaa atgggaaagt gataattgca gaatgcttac ttccagaggt gccagataca 900

tcaagttcca caaagaatac agtacatgtt gatgtaataa tgttagcaca taatccagga 960

ggcaaagaaa ggactgagaa agaatttgag gctttggcta aaggggctgg atttaatgga 1020

ttcaccaagg cttcttgtgc ttacaacact tggattatgg aattcaccaa gggagacatg 1080

gtgagcccgg tggtacaccg tcacgccgcc ggcggcggca gcggcggcga cgacgacgac 1140

caggcttgca tgtacgcgct ggagctcctg ggagggtcgg tcgtctccat gacactcaag 1200

gcggcgatcg agctcggcct cgtcgacgag ctcctcgccg ccgccggcgc cgccgtgacc 1260

gcggaggagc tagctgcgcg gctccggctc cctgctgcgg tcgccgccgc ggcggcggtg 1320

gaccgcatgc tgcggctcct cgcctcgtac ggcgtcgtca ggtgcgcgac ggaggccggg 1380

cccgacggca aggcccgccg gagctacgcc gcggcgccgg tgtgcaaatg gctcgccgcc 1440

gggagcagca gcggcgaagg gtccatggct ccgcttgggc tgctcaacct cgacaaggtg 1500

ttcatggaga actggtacta cctgaaggag gcagtgtcgg agggagggac agcattcgac 1560

aaggcgtacg gcacgtcctt gttccagtac ctgggccagg acggcaacga gccctccaac 1620

acgctcttca accaggccat ggccagccac tccgtcgtca tcaccaacaa gctgctccaa 1680

ttcttccgcg gcttcgacgc cggcgccggc gtggatgtgc tcgtcgacgt cggcggcggc 1740

gtcggcgcca cgctgcggat gatcaccgct cgccacccca acctgcgtgg cgtcaactac 1800

gaccttcccc atgtcatcgc gcaggcgccg ccagttgaag gtgtggagca tatcggaggc 1860

agcatgtttg accatgttcc cagtggaagc gcaatcttgc tcaagtggat tctgcacttg 1920

tgggggggacg aggagtgcgt gaagatcctg aagaactgct acaaggcgct gccggcgaag 1980

gggaaggtga tcttggtgga gtatgtgctc ccggcgagcc cggaggcgac gctggcggcg 2040

caggaagcgt tccggctcga cgtcatgatg ctgaaccgcc tcgccggcgg caaggagagg 2100

acgcagcagg agttcaccga cctcgccgtc gacgccggct tctccggcga ctgcaagcct 2160

acctacatct tcaccaacgt ctgggctctc gagttcacaa ag 2202

<210> 19

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 3

<400> 19

atgggttcaa caagcctaac tcaaacagag gatgaagctt tcttgttcgc tatgcaactg 60

gcgagtgcct ctgtactacc catggtctta aaatcagctg tagaacttga gcttctggaa 120

cttatggcta aggctggtcc aggtgcatcc atttcgcctg ctgagctagc gtctcaactc 180

ccttgtaaga acccagatgc accggtaatg ctggatcgaa tgcttaggct tcttgctact 240

tactctgttc tgaattgtac actcaggaca ctccctgatg gacgtgtaga gcggctttat 300

agtcttgctc cggtttgtaa gttcttgact aagaatgccg atggtgtttc cgttgcccca 360

cttttgctta tgaatcaaga taaagtactc atgcagagct ggtaccactt aaaagatgca 420

gtacttgatg gtggaatccc attcaacaag gcatatggaa tgacagcatt cgagtaccat 480

ggaacagatc caagattcaa caaagttttc aaccgtggaa tgtccgatca caccacctta 540

tccatcaaga agattctgga agactataaa ggatttgaag gactcaactc cattgttgat 600

gttggtggtg gaacaggggc tactgtaagc atgattgtct ctaagtatcc ctctattaag 660

ggcattaact ttgatttacc acatgttatt gaagatgccc cagcttaccc tggcgttgaa 720

cacattggtg gtgacatgtt tgttagtgtg ccgaaagcgg atgctatttt catgaagtgg 780

atatgtcatg attggagcga tgagcattgt ttaaagtttt tgaagaattg ctacgaagcg 840

gttcctgcaa atgggaaagt gataattgca gaatgcttac ttccagaggt gccagataca 900

tcaagttcca caaagaatac agtacatgtt gatgtaataa tgttagcaca taatccagga 960

ggcaaagaaa ggactgagaa agaatttgag gctttggcta aaggggctgg atttaatgga 1020

ttcaccaagg cttcttgtgc ttacaacact tggattatgg aattcaccaa ggaagcggcg 1080

gcgaaaatgg tgagcccggt ggtacaccgt cacgccgccg gcggcggcag cggcggcgac 1140

gacgacgacc aggcttgcat gtacgcgctg gagctcctgg gagggtcggt cgtctccatg 1200

acactcaagg cggcgatcga gctcggcctc gtcgacgagc tcctcgccgc cgccggcgcc 1260

gccgtgaccg cggaggagct agctgcgcgg ctccggctcc ctgctgcggt cgccgccgcg 1320

gcggcggtgg accgcatgct gcggctcctc gcctcgtacg gcgtcgtcag gtgcgcgacg 1380

gaggccgggc ccgacggcaa ggcccgccgg agctacgccg cggcgccggt gtgcaaatgg 1440

ctcgccgccg ggagcagcag cggcgaaggg tccatggctc cgcttgggct gctcaacctc 1500

gacaaggtgt tcatggagaa ctggtactac ctgaaggagg cagtgtcgga gggagggaca 1560

gcattcgaca aggcgtacgg cacgtccttg ttccagtacc tgggccagga cggcaacgag 1620

ccctccaaca cgctcttcaa ccaggccatg gccagccact ccgtcgtcat caccaacaag 1680

ctgctccaat tcttccgcgg cttcgacgcc ggcgccggcg tggatgtgct cgtcgacgtc 1740

ggcggcggcg tcggcgccac gctgcggatg atcaccgctc gccaccccca cctgcgtggc 1800

gtcaactacg accttcccca tgtcatcgcg caggcgccgc cagttgaagg tgtggagcat 1860

atcggaggca gcatgtttga ccatgttccc agtggaagcg caatcttgct caagtggatt 1920

ctgcacttgt ggggggacga ggagtgcgtg aagatcctga agaactgcta caaggcgctg 1980

ccggcgaagg ggaaggtgat cttggtggag tatgtgctcc cggcgagccc ggaggcgacg 2040

ctggcggcgc aggaagcgtt ccggctcgac gtcatgatgc tgaaccgcct cgccggcggc 2100

aaggagagga cgcagcagga gttcaccgac ctcgccgtcg acgccggctt ctccggcgac 2160

tgcaagccta cctacatctt caccaacgtc tgggctctcg agttcacaaa g 2211

<210> 20

<211> 2217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide coding SlOMT3/OsNOMT fusion enzyme 4

<400> 20

atgggttcaa caagcctaac tcaaacagag gatgaagctt tcttgttcgc tatgcaactg 60

gcgagtgcct ctgtactacc catggtctta aaatcagctg tagaacttga gcttctggaa 120

cttatggcta aggctggtcc aggtgcatcc atttcgcctg ctgagctagc gtctcaactc 180

ccttgtaaga acccagatgc accggtaatg ctggatcgaa tgcttaggct tcttgctact 240

tactctgttc tgaattgtac actcaggaca ctccctgatg gacgtgtaga gcggctttat 300

agtcttgctc cggtttgtaa gttcttgact aagaatgccg atggtgtttc cgttgcccca 360

cttttgctta tgaatcaaga taaagtactc atgcagagct ggtaccactt aaaagatgca 420

gtacttgatg gtggaatccc attcaacaag gcatatggaa tgacagcatt cgagtaccat 480

ggaacagatc caagattcaa caaagttttc aaccgtggaa tgtccgatca caccacctta 540

tccatcaaga agattctgga agactataaa ggatttgaag gactcaactc cattgttgat 600

gttggtggtg gaacaggggc tactgtaagc atgattgtct ctaagtatcc ctctattaag 660

ggcattaact ttgatttacc acatgttatt gaagatgccc cagcttaccc tggcgttgaa 720

cacattggtg gtgacatgtt tgttagtgtg ccgaaagcgg atgctatttt catgaagtgg 780

atatgtcatg attggagcga tgagcattgt ttaaagtttt tgaagaattg ctacgaagcg 840

gttcctgcaa atgggaaagt gataattgca gaatgcttac ttccagaggt gccagataca 900

tcaagttcca caaagaatac agtacatgtt gatgtaataa tgttagcaca taatccagga 960

ggcaaagaaa ggactgagaa agaatttgag gctttggcta aaggggctgg atttaatgga 1020

ttcaccaagg cttcttgtgc ttacaacact tggattatgg aattcaccaa ggaagcggcg 1080

gcgaaaggag acatggtgag cccggtggta caccgtcacg ccgccggcgg cggcagcggc 1140

ggcgacgacg acgaccaggc ttgcatgtac gcgctggagc tcctgggagg gtcggtcgtc 1200

tccatgacac tcaaggcggc gatcgagctc ggcctcgtcg acgagctcct cgccgccgcc 1260

ggcgccgccg tgaccgcgga ggagctagct gcgcggctcc ggctccctgc tgcggtcgcc 1320

gccgcggcgg cggtggaccg catgctgcgg ctcctcgcct cgtacggcgt cgtcaggtgc 1380

gcgacggagg ccgggcccga cggcaaggcc cgccggagct acgccgcggc gccggtgtgc 1440

aaatggctcg ccgccgggag cagcagcggc gaagggtcca tggctccgct tgggctgctc 1500

aacctcgaca aggtgttcat ggagaactgg tactacctga aggaggcagt gtcggaggga 1560

gggacagcat tcgacaaggc gtacggcacg tccttgttcc agtacctggg ccaggacggc 1620

aacgagccct ccaacacgct cttcaaccag gccatggcca gccactccgt cgtcatcacc 1680

aacaagctgc tccaattctt ccgcggcttc gacgccggcg ccggcgtgga tgtgctcgtc 1740

gacgtcggcg gcggcgtcgg cgccacgctg cggatgatca ccgctcgcca cccccacctg 1800

cgtggcgtca actacgacct tccccatgtc atcgcgcagg cgccgccagt tgaaggtgtg 1860

gagcatatcg gaggcagcat gtttgaccat gttcccagtg gaagcgcaat cttgctcaag 1920

tggattctgc acttgtgggg ggacgaggag tgcgtgaaga tcctgaagaa ctgctacaag 1980

gcgctgccgg cgaaggggaa ggtgatcttg gtggagtatg tgctcccggc gagcccggag 2040

gcgacgctgg cggcgcagga agcgttccgg ctcgacgtca tgatgctgaa ccgcctcgcc 2100

ggcggcaagg agaggacgca gcaggagttc accgacctcg ccgtcgacgc cggcttctcc 2160

ggcgactgca agcctaccta catcttcacc aacgtctggg ctctcgagtt cacaaag 2217