

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0109105

(43) 공개일자

2006년10월19일

(21) 출원번호

10-2005-0031394

(22) 출원일자

2005년04월15일

(71) 출원인

한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

김상진
경기 안산시 상록구 사2동 요진아파트 213동 102호
강성균
경기 안양시 동안구 평촌동 72-1번지 대우아파트 112동 506호
서해접
서울 양천구 목2동 231-90호 유진파크빌 302호
김준태
서울 중랑구 망우2동 468-22호 거강다세대 401호
나현섭
대전 유성구 신성동 142-19번지 302호

(74) 대리인

유미특허법인

심사청구 : 있음

(54) 옥플록사신 에스테르에 대한 광학선택적 리파제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법

요약

본 발명은 옥플록사신 에스테르에 대한 광학선택적 리파제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 광학선택적 리파제를 사용하여 옥플록사신으로부터 레보플록사신만을 생산하는 새로운 생촉매 (biocatalyst)로써 유용하게 사용되어질 것이고, 또한 상기 광학선택적 리파제를 재조합 기술을 이용하여 대량생산함으로써 의약품 산업에 크게 기여 할 것이다.

대표도

도 2

색인어

레보플록사신, 리파제, 광학 선택성, 촉매

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1는 리파제가 트리아실글리세롤을 글리세롤과 지방산으로 가수분해하는 반응식을 나타내며,
 도 2는 본 발명에 따른 오픈록사신 에스테르-광학 선택성 리파제를 스크리닝하는 과정을 보여주는 모식도이고,
 도 3는 본 발명에 따른 오픈록사신 에스테르-광학 선택성 리파제 유전자의 클로닝과 서열분석 과정을 보여주는 모식도이고,
 도 4는 리파제 생산 균주에 대한 PNPO 분석(2차 선별과정)결과를 나타내는 흡광도 그래프이고,
 도 5는 본 발명에 따른 오픈록사신 에스테르-광학 선택성 리파제 스크리닝을 위한 HPLC 결과를 나타내고,
 도 6은 본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 세포의 SEM(Scanning electron microphotographs) 사진이고,
 도 7은 본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 세포의 TEM(Transmission electron microphotographs) 사진이고,
 도 8은 본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180에서 추출된 게놈 DNA를 보여주는 전기영동 사진이고,
 도 9는 본 발명의 일례에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 게놈 DNA 라이브러리의 제조를 나타내는 모식도이고,
 도 10은 TBN 플레이트상에 리파제 생산균주를 배양하여 리파제 활성을 보여주는 사진이고,
 도 11은 본 발명에 따른 오픈록사신 프로필 에스테르-enantioselective lipase의 HPLC 분석결과를 나타내고,
 도 12는 제한효소 처리에 의한 플라스미드 DNA (pJTL180)의 분석결과를 나타내는 전기영동 사진이고,
 도 13은 본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 리파제인 3.5kb DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열 및 유추 아미노산 서열을 나타내고,
 도 14는 본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 lipase (YAR180Lip)와 *Candida rugosa* (CrugLip1, rugLip2), *Geotrichum candidum* (GcanLip1, GcanLip2), *Geotrichum fermentans* (GferLip1), 및 *Yarrowia lipolytica* (YARLip1, YARLip3)의 리파제 서열의 다중 서열 분석결과를 나타내고,
 도 15는 본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 lipase의 발현정도와 시기를 나타내는 SDS-PAGE 분석결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 오픈록사신 알킬 에스테르 라세미체에 대한 광학선택적 리파제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법에 관한 것이다.

리파제(glycerol ester hydrolase EC 3.1.1.3)은 자유 지방산과 글리세롤로부터 에스테르 결합을 합성하고 또는 이를 가수분해하며, 이들 반응식은 도 1에 나타내고 있다. 리파제는 리피드와 물의 계면에서 작용하는 serine hydrolase이다. 활성부위에 보존된 5개 아미노산으로 구성된 펩타이드(Gly-X-Ser-X-Gly)에 상기 세린이 존재하면, 상기 세린에 친핵성 공격을 하여 효과적으로 다양한 에스테르 결합을 가수분해한다.

리파제는 다양한 미생물, 예컨대 박테리아, 곰팡이, 및 효모 등이 생산하며, 리파제를 암호화하는 많은 유전자가 클로닝되었다. 박테리아의 리파제는 8개의 군으로 구분되며 특히 *Pseudomonas*속 균주의 리파제에 대해 광범위한 연구가 진행되

어 왔다. 효모의 리파제는 *Candida rugosa*, *Trichosporon fermentans* 등이 있으며 기타 곰팡이 리파제로는 *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delemar*, *Thermomyces lanuginose* 및 *Rhizopus miehei* 등이 보고되고 있다. 상업적으로 이용가능한 미생물 리파제의 예를 아래 표 1에 나타내고 있다.

[표 1]

Origin	Organism producing lipase	Application
Yeast (Fungal)	<i>Candida rugosa</i> ^a	Organic synthesis
	<i>Candida antarctica</i> A/B	Organic synthesis
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> ^b	Detergent
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Food processing
Bacterial	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Detergent
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Detergent
	<i>Pseudomonas glumae</i>	Detergent
	<i>Bacillus pumilus</i>	Detergent
	<i>Burkholderia cepacia</i> ^c	Organic synthesis
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Organic synthesis, biotransformations, chemicals
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Organic synthesis
	<i>Chromobacterium viscosum</i> ^d	Organic synthesis, biotransformations, chemicals
	<i>Alcaligenes sp.</i>	Organic synthesis, technical grade
	<i>Achromobacter sp.</i>	Technical grade

리파제는 가장 중요한 산업적 촉매로서 예를 들면, 식품, 화장품, 향수, 가죽, 종이, 제약산업, 및 세제 등의 분야에서 널리 사용되어 왔다. 상업적으로 유용한 리파제는 곰팡이와 박테리아에서 유래된 것이다. 특히 리파제는 유기 용매중에서도 여전히 활성을 유지하며, 통상 정확한 화학선택성(chemoselectivity), 위치선택성(regioselectivity), 광학선택성(enantioselectivity)을 가지며, cofactor가 필요하지 않으며 부반응도 일으키지 않는다. 이러한 리파제의 특성으로 인해 다양한 생물공학 분야 매우 중요한 촉매일 뿐만 아니라 유기 화학에서도 생촉매로서 유용하다. 또한 리파제는 광학적으로 순수한 화합물을 얻기 위해서 라세메이트 혼합물의 분리에도 사용된다.

Quinolone계 항생제인 ofloxacin(9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-[4-methyl-1-piperazinyl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-에스테르(esteric acid)은 (S)-ofloxacin (levofloxacin)과 (R)-ofloxacin이 1:1로 혼합되어 있는 광학이성질체로서, 기존에 항생제 내성을 가지는 전염성 미생물에 대해 높은 항생효과를 보이는 것으로 알려져 있으며, 특히 levofloxacin이 rac-ofloxacin과 (R)-ofloxacin에 비해 항생효과가 탁월한 것으로 보고되었다. 레보플록사신은 동물 및 박테리아로부터 유래되는 광학선택성 에스테라제를 이용하여 오픈플록사신 에스테르로부터 제조된다. 그 예로서는 돼지 간의 리파제는 라세믹 오픈플록사신 부틸 에스테르로부터 (S)-오픈플록사신 에스테르를 광학선택적으로 가수분해한다(Lee 등 Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 15:313-317, 2000). 또한 *Bacillus niacini* EM001 에스테라제는 라세믹 오픈플록사신 프로필 에스테르로부터 (R)-오픈플록사신을 광학 선택적으로 가수분해한다(Kim 등, J. Mol. Catal. B: Enzym. 27:237-241, 2004).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 옥플록사신으로부터 레보플록사신만을 생산하는 새로운 생촉매 (biocatalyst)로써 유용하게 사용되고, 의약품 산업에 유용한 옥플록사신 에스테르에 대한 광학선택적 리파제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드, 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법, 및 상기 리파제를 생산하는 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머의 에스테르 결합만을 선택적으로 분해하는 리파제에 관한 것이다.

본 발명은 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머의 에스테르 결합만을 선택적으로 분해하는 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

본 발명은 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머만을 선택적으로 분해하는 리파제를 생산하는 균주에 관한 것이다.

본 발명은 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머만을 선택적으로 분해하는 리파제를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명에 따른 광학선택적 리파제는 *Bacillus niacini* EM001에 의 경우 (R)-오플록사신을 광학 선택적으로 가수분해하는 것인데 비해, (S)-오플록사신을 분해하는 특성을 가져 매우 유용하다. 또한 돼지 간의 리파제를 이용하는 기술은 sigma사에서 판매되는 기존의 효소를 이용한 것과는 전혀 다른 신규한 효모로부터 생산되는 신규 리파제로서, 효모를 이용한 다양한 생물공정 개발이 가능하고, 재조합 단백질과 형질전환 균주를 이용한 다양하고, 효율적인 생물공정 개발이 가능할 것이다.

이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

본 발명에 따른 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머만을 선택적으로 분해하는 리파제는 SEQ ID NO:2 에 나타난 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드이고, 더욱 바람직하게는 본 발명에 따른 리파제는 SEQ ID NO:1에 기재된 핵산서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드이다.

본 발명에 따른 리파제는 광학선택적으로 (S),(R)-오플록사신 프로필 에스테르중에서 (S)-오플록사신 프로필 에스테르만을 특이적으로 분해하여, (S)-오플록사신 (레보플록사신)을 60%의 ee_p (the enantiomeric excess of the product)로 생성하는 특이적 활성을 보이는 것으로서, 레보플록사신 생산에 산업적으로 유용한 특성을 함유하고 있다. 상기 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르중 알킬은 프로필, 또는 부틸 등을 포함한다.

본 발명에 따른 리파제는 기존의 알려진 리파제와 서열을 비교하면, *Yarrowia lipolytica*의 lipase Lip1 (32.73% identity), *Yarrowia lipolytica*의 lipase Lip3(30.24% identity)를 포함하여 *Candida rugosa*의 lipase Lip1 (19.24% identity), *Candida rugosa*의 lipase Lip2 (18.81% identity), *Geotrichum candidum*의 lipase Lip1 (18.13% identity), *Geotrichum candidum*의 lipase Lip2(17.25% identity), *Geotrichum fermentans*의 lipase Lip1 (17.25% identity)와 30%이하의 상동성을 보여 신종 리파제임을 알 수 있다(도 14)

본 발명에 따른 리파제는 약 52KDa의 분자량을 가지며 작용 pH는 6.0-8.0이고는 작용온도는 약 30도 이다.

본 발명은 또한 상기 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것으로서, SEQ ID NO:2에 나타난 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열로 이루어지며, (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 광학선택적으로 분해하는 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드이고, 더욱 바람직하게는 SEQ ID NO:1에 나타난 핵산서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드이다.

본 발명은 상기 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 적용가능한 벡터로는 각 숙주용으로 개발된 다양한 벡터 및 프로모터등을 사용할 수 있다. 원색세포, 예컨대 대장균을 형질전환용 숙주로 하는 경우에는 lac, T7, ara, trc등 어떤 종류의 대장균 promoter를 이용한 발현 벡터를 이용하여 재조합 단백질 생산이 가능하다.

본 발명은 또한 상기 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 벡터로 형질전환체에 관한 것이며, 상기 형질전환체는 원색세포, 진핵세포 또는 곤충일 수 있다. 상기 숙주의 예로는 대장균, 효모, bacillus, 방선균, 유산균, 및 곤충등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 형질전환방법은 외래 유전자를 포함하는 벡터를 원색세포를 형질전환하는 통상의 방법을 모두 사용가능하다.

본 발명은 또한 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 광학선택적으로 분해하는 리파제를 생산하는 *Yarrowia lipolytica* 균주(KCTC 0533BP)에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 *Yarrowia lipolytica* CL 180 으로 명명하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180균주를 대전광역시 유성구 어은동 52번지에 주소를 둔 유전자은행에 기탁하였으며, 기탁번호는 KCTC 0533BP를 부여받았다.

본 발명은 또한 본 발명에 따른 리파제 pH 6.0-8.0에서 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물에 반응시켜 레보플록사신을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 리파제는 *Yarrowia lipolytica* 세포 배양물, 또는 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포 배양물로부터 분리한 리파제 일 수 있다. 본 발명의 일례에서 상기 리파제를 생산하는 재조합 E.coli에서 리파제는 내포체 형태로 발현되며, 통상의 내포체 형태로 발현되는 수불용성 단백질의 분리 및 정제방법으로 리파제를 얻을 수 있다. 예컨대, 상기 형질전환 세포를 파쇄한 후 얻어진 수불용성 단백질을 우레아를 이용하여 refolding하고, 얻어진 상등액을 talon resin으로 붙이고, 300mM 이미다졸로 용출하여 재조합 단백질을 얻을 수 있다. 또한, 재조합 리파제 단백질을 분리를 용이하게 하기 위하여 다양한 affinity tag과 단백질 수용성에 도움을 주는 tag을 이용할 수 있다. 예컨대, His-taq, GST-tag, Flag-tag, MBP-tag, T7-tag, Trx, CBP-tag등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 통상의 재조합 단백질 제조방법, 이의 생산방법, 및 발현방법을 사용하여 본 발명에 따른 재조합 리파제 단백질을 생산 및 분리할 수 있다.

본 발명이 일례에서, 본 발명에 따른 리파제 생성 균주 탐색은 3단계로 진행되었는데, 1차로 국내·외 다양한 시료로부터 리파아제 선택 배지 (Tributyryn)를 이용하여 리파아제 생산 균주를 순수분리하고, 2차로 이 균주가 가지는 리파아제가 오픈플록사신 에스테르를 가수분해하는지 여부를 *p*-nitrophenyl 오픈플록사신 (PNPO)을 이용하여 확인하였고, 마지막으로 오픈플록사신 프로필 에스테르를 기질로 광학선택성 (enantioselectivity)을 지닌 리파아제를 액체크로마토그래피에 의해 확인하였다. 이러한 탐색 과정을 통하여, 우리는 최종적으로 효모인 *Yarrowia lipolytica* CL 180 균주를 선택하였고, 이 리파아제의 특성을 파악하기 위하여 유전자 클로닝을 수행하였다. 유전자 클로닝은 *Yarrowia lipolytica* CL 180 균주로부터 genomic DNA를 추출하고 pUC118 벡터를 이용하여 게놈 라이브러리를 구축한 후, 대장균 시스템을 이용하여 광학선택성 (enantioselectivity)을 지닌 리파아제 유전자를 확인하는 방법으로 진행하였다. 결과적으로, 우리는 총 12,000개의 형질전환체에서 한 개의 콜로니가 광학선택성 (enantioselectivity)을 가지고 있는 양성 플론임을 확인하였다. DNA 분석을 통하여 이 클론은 3.5 kb의 삽입 DNA를 가지는 것이 확인되었고, 염기서열 분석 결과로부터 예상되는 리파아제 유전자는 1,431개의 open reading frame (ORF)을 갖는 염기로 구성되어 있으며 476개의 아미노산을 암호화하고 있다는 것을 확인하였다. 실제로 그 예측되는 아미노산 서열은 리파아제의 conserved motifs를 가지고 있었고, carboxylesterase/lipase type B1 family의 리파아제라는 것을 확인하였다. 또한, 이 리파아제가 *Yarrowia lipolytica* CLIB99의 hypothetical protein과 매우 유사하다는 것인데, 이것은 이 리파아제가 아직 동정되지 않은 새로운 단백질이라는 것을 의미한다. 따라서, 이 광학선택적 리파아제가 최적화를 통해 대량으로 생산 되어진다면, 오픈플록사신으로부터 레보플록사신만을 생산하는 새로운 생촉매 (biocatalyst)로써 유용하게 사용되어질 것이고, 의약품 산업에 크게 기여 할 것이다.

하기 예시적인 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

실시예 1: 오픈플록사신 에스테르에 대하여 광학 선택적인 리파아제 활성의 탐색

1-1. 리파아제 생산 균주의 탐색

다양한 국내외 해양으로부터 채취된 시료를 멸균 해수에 넣어 현탁한 후, 기본배지 (3% Sea Salts)에 1% tributyrin (C4) 에멀전이 첨가된 TBN agar plate에 도말하였다. TBN 아가 플레이트는 1% TBN을 0.1% Bacto yeast extract, 0.5% Bacto tryptone, 0.001% FePO₄ · 4H₂O, 3% sea salt가 혼합된 배지 1 L와 혼합하여 초음파 분쇄기를 이용해서 emulsion 한 후, 1.5% Bacto agar를 첨가하여 만들었다. 도말한 플레이트는 25℃ 에서 24시간 동안 배양하였고, tributyrin (C4)를 분해하여 투명환을 형성하는 균주를 1차 선택하였다. 마지막으로 16S rDNA분석을 통하여 리파아제 생산 균주를 최종 확인하였고, 이 균주들은 *p*-Nitrophenyl 오픈플록사신 가수분해를 위한 2차 탐색에 사용되었으며 이들 151개 균주를 다음 표 2에 나타냈다(표 2).

[표 2]

Sampling site	Nearest phylogenetic neighbor	Strains no.
Edison seamount (Near Lihir Island, Papua New Guinea)	<i>Pseudomonas</i> sp.	30
Geomun-do (South Sea, Korea)	<i>Vibrio</i> sp., <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Shewanella</i> sp., etc.	44
Barents Sea (North of Norway)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Hyphomicrobium</i> sp., <i>Actinobacterium</i> sp., etc.	14
Panweol industrial area (Ansan, Korea) Gwangyang Bay (Gwangyang, Korea) Yongjong-do (Incheon, Korea)	<i>Yarrowia lipolytica</i> 180, <i>Moraxella</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., etc.	25
Hu-jin (East Sea, Korea)	<i>Bacillus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Shewanella</i> sp., etc.	29
Ulung-do (East Sea, Korea)	<i>Rheinheimera</i> sp., <i>Photobacterium</i> sp., <i>Psychrobacter</i> sp., etc.	9

1-2. *p*-Nitrophenyl 오픈플록사신 (PNPO) 가수분해 활성 조사

오픈플록사신 에스테르를 가수분해 하는 리파아제 활성은 합성 기질인 *p*-Nitrophenyl 오픈플록사신 (PNPO)을 사용함으로써 조사되었다. 리파아제 활성은 PNPO로부터 분해되는 *p*-nitrophenol 의 양으로 측정 되었다. 상기 1차로 선택된 151rdml 리파아제 생산 균주를 modified ZoBell liquid medium에서 30°C에서 24시간 배양하여 세포를 얻은 후, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 두 번 washing하였다. 리파아제 활성을 측정하기 위하여 cell (1 g)은 반응액 (0.01 ml of 10 mM PNPO in acetonitrile, 0.04 ml of ethanol, and 0.95 ml of 50 mM Tris-HCl buffer [pH 8.0])과 혼합하여 10분 동안 반응시키면서 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 상기 PNPO의 분해능을 확인한 결과, 3종의 균주(strain BS5, 180, GMD499)를 선택하였다(도 4). 도 4는 리파제 생성 미생물을 이용한 PNPO 분석결과를 나타내는 것으로서 3종의 균주 (strain BS5, 180, GMD499)가 우수한 리파제 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

1-3. 오픈플록사신 에스테르에 대하여 광학선택적인 균주의 탐색

2차 탐색을 통하여 선별된 세가지 균주를 modified ZoBell liquid medium에서 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 전체 cell (10 g)을 얻었다. 효소 반응을 위해서 0.1M 인산완충용액을 제조하였으며 기질로는 (R),(S)-ofloxacin 프로필 에스테르를 사용하였다. 인산완충용액 10 ml에 10 mM의 ofloxacin 프로필 에스테르를 첨가한 뒤 20분간 초음파 분쇄하여 유효화시켜 반응에 사용하였으며 전체 cell (10 g)을 넣어 효소 반응을 개시하였다. 효소 반응은 30°C에서 48시간 동안 수행한 후, 100°C 끓는 물에 10분간 정치하여 효소의 반응을 정지시키고 동량의 methanol을 첨가한 뒤 vortexing하였으며 원심 분리하여 그 상등액을 회수하여 레보플록사신분석에 사용하였다. 분석은 Hewlett Packard-Model 1050 HPLC system을 사용하여 330 nm에서 측정하였으며 고정상으로 Shiseido사의 CAPCELL PAK C₁₈ (250 mm x 4.6 mm) column을 사용하였다. 그리고 이동상은 증류수와 methanol을 85:15로 혼합하여 9 mM의 L-isoleucine과 3 mM의 copper(II) sulfate pentahydrate를 첨가한 뒤 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다. 도 3에 ofloxacin 에스테르- enantioselective lipase 유전자의 cloning을 위한 도식도를 나타내고 있다.

선택된 3개의 균주를 이용하여 (R),(S)-오픈플록사신 프로필 에스테르중 (S)-오픈플록사신 프로필 에스테르 만을 선택적으로 분해하는 enantioselectivity 능력을 test하기 위해 modified Zobell liquid로 배양하고 얻어진 균체를 이용하여 HPLC 분석을 통해 enantioselectivity를 측정하였다. 최종적으로 균주 180은 (S)-오픈플록사신 프로필 에스테르를 선택적으로 분해하여 결과적으로 .60%의 ee_p(the enantiomeric excess of the product)로 (S)-오픈플록사신 (levofloxacin)을 생성하는 것을 확인하였다(도 5). 도 5에 나타낸 바와 같이, 상기 3종 균주를 대상으로 HPLC분석을 통해 오픈플록사신 프로필 에스테르를 광학선택적으로 분해할 수 있는 지를 보여주는 도면으로서, 180균주에서 entantioselectivity가 확인되었다. 도 5에서 피크 1은 (S)-오픈플록사신(레보플록사신)을 나타내고, 피크 2는 (R)-오픈플록사신을 나타낸다.

실시예 2: 180균주의 동정

최종 선택된 오플록사신 에스테르- enantioselective 리파제 생성 균주를 동정하기 위해 ribosome DNA의 염기서열을 분석하였고, 그 결과 180 균주는 small subunit (SSU) rDNA의 DNA 염기 서열에 따라 yeast *Yarrowia lipolytica*에 속하는 균주로 분류되었다. 180균주는 환경 분리주로서 small subunit (SSU) rDNA가 *Yarrowia lipolytica* 차이가 있어 *Yarrowia lipolytica* CL 180 으로 명명하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180균주를 대전광역시 유성구 어은동 52번지에 주소를 둔 유전자은행에 기탁하였으며, 기탁번호는 KCTC 0533BP를 부여받았다.

본 발명에 따른 *Yarrowia lipolytica* CL 180 (KCTC 0533BP)는 반월공단에서 기름으로 오염된 토양에서 분리된 균주로서 세포의 SEM사진을 도 6에 나타냈으며, TEM사진을 도 7에 각각 나타냈다. 본 발명에 따른 유류분해능이 있는 *Yarrowia lipolytica* CL 180이 ofloxacin-에스테르에 대한 enantioselective 리파제 활성도 함유하고 있는 새로운 특성을 확인하였다.

실시에 3: 오플록사신 에스테르에 대하여 광학 선택성을 가지는 리파아제의 클로닝

2-1. 사용된 균주와 플라스미드

Yarrowia lipolytica CL 180 균주는 광학 선택성을 가지는 리파아제의 유전자 클로닝을 위하여 source로 사용되었다. *E. coli* DH5a 균주는 플라스미드 DNA의 형질전환을 위하여 사용되었다. 벡터pUC118 (*Hind*II/BAP treated)는 클로닝과 DNA 시퀀싱을 위하여 사용되었다. 리파제 유전자 클로닝에 사용된 균주 및 플라스미드에 대해 하기 표 3에 정리하였다.

[표 3]

Strains or Plasmids	Relevant characteristics	Source
Strains		
<i>Yarrowia lipolytica</i> 180	Producer of ofloxacin ester-hydrolyzing lipase, yeast isolated	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>supE44 Δ lacU169(Δ lacZ Δ M15) hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	New England Biolabs
Plasmids		
pUC118 (<i>Hind</i> II/BAP)	Cloning vector, Ap ^r , lacZ/MCS	TaKaRa
pJTL180	Ap ^r , pUC118 containing 3.5 kb insert of <i>Y. lipolytica</i> 180 DNA with lipase gene ligated into the <i>Hind</i> II restriction site	This study

2-2. 배지와 배양 조건

Yarrowia lipolytica CL 180 균주와 *E. coli* DH5a 균주는 Luria-Bertani (LB) 배지 (0.5% NaCl, 1% Bacto yeast extract, 1% Bacto tryptone)를 사용하여 각각 30℃ 와 37℃ 에서 배양하였다. *E. coli* DH5a 균주는 경우에 따라 50 ug/ml ampicillin과 IPTG, 그리고 X-gal이 첨가된 배지에서 배양하였다. LB-TBN 고체 배지는 제조합 클론의 라이브러리 탐색을 위하여 제조되었다. LB-TBN 고체 배지를 제조하기 위하여 1% TBN 은 1 L의 LB 배지와 혼합되었고 TBN emulsion 위하여 sonication을 수행하였으며 1.5%의 Bacto agar를 첨가하였다.

2-3. 게놈 DNA 추출

Yarrowia lipolytica CL 180균주로부터 enantioselective하게 (S)-오플록사신 에스테르를 특이적으로 분해하여 (S)-오플록사신 (레보오플록사신)을 생성하는 리파제 활성을 확인하였고, 그 단백질의 특성을 연구하고자 해당 유전자를 cloning 하고자 하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180을 90 ml 배양하여 게놈 DNA 58.8 ug를 획득하였다.

Yarrowia lipolytica CL 180로부터 게놈 DNA의 추출은 Breeden lab()에 묘사된 방법에 의해 수행하였다. *Yarrowia lipolytica* CL 180의 5 ml 배양액을 원심 분리하여 cell을 얻은 뒤, 0.5 mm 사이즈의 glass beads를 포함하는 lysis buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS)와 혼합하여 vortexing을 2 분간 수행하였다. 300 ul의 상등액을 회수하여 275 ul의 7 M ammonium acetate (pH 7.0)를 첨가하였다. 65°C에서 5분간 방치한 후, 그 시료는 다시 얼음에 5분간 방치하였다. 500 ul의 chloroform을 첨가하여 원심 분리 후, DNA를 포함한 500 ul의 상등액은 1 ml의 isopropanol과 함께 -20°C에서 침전되었다. 그 pellet을 70% (v/v) ethanol을 이용하여 washing 하였고, 건조 후에 50 ul TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0])에 현탁되었다. 추출된 DNA는 0.5% TAE gel을 이용하여 확인하였다(도 8). 도 8에는 *Yarrowia lipolytica* CL 180의 게놈 DNA 추출을 보여주는 전기영도 사진이며, 레인 1은 크기 마커인 ?? *Hind*III이고, 레인 2는 게놈 DNA of *Yarrowia lipolytica* CL 180 (147 ng/ul)을 나타낸다.

2-4. 게놈 라이브러리의 구축

Yarrowia lipolytica CL 180의 게놈 라이브러리는 pUC118 (*Hinc*II/BAP treated) 벡터에 의하여 구축되었다. *Yarrowia lipolytica* CL 180으로부터 게놈 DNA를 분리하여 nebulization으로 shearing한 후 2??5kb 크기의 DNA절편을 클로닝 벡터인 pUC118에 삽입한 후, *E. coli* DH5a competent cell에 heat shock 처리하여 형질전환하였다.

추출된 게놈 DNA를 이용하여 게놈 라이브러리탐색 방법을 이용하여 cloning 하고자 하였으며, nebulizer를 사용하여 게놈 DNA를 무작위적으로 잘라서 약 2-5 kb의 크기의 DNA 단편들을 low melting temperature agarose gel로 분리하였다. 분리된 단편을 end-repairing 하여 blunt end로 만들었고, 만들어진 blunt-ended DNA는 pUC118의 *Hinc*II site에 ligation 하였다. 결과적으로 얻어진 플라스미드를 *E. coli* DH5a에 형질전환하여 게놈 라이브러리를 구축하였다 (도. 9). 얻어진 형질전환체를 ampicillin, IPTG, X-gal를 포함한 LB-TBN 고체배지에 포말하여, 전체 12,000개의 콜로니 중 DNA가 함유된 흰색 콜로니를 선택하였고, 그 중 TBN 분해활성을 보인 콜로니를 최종선택하였고, 해당 형질전환체에 함유된 플라스미드를 pJTL180으로 명명하였다(도 9). 도 9에는 상기 게놈 라이브러리의 구축과정을 보여주는 모식도로서, (a) 무작위적으로 잘린 *Yarrowia lipolytica* CL 180의 게놈 DNA이고, (b) pUC118 클로닝 벡터이고, (c) *Yarrowia lipolytica* CL 180 리파제를 함유하고 있는 pJTL180 플라스미드 DNA의 제한효소 지도를 나타낸다.

2-5. *Yarrowia lipolytica* CL 180의 게놈 라이브러리로 부터 광학선택적 리파아제 탐색

E. coli DH5a 형질전환체를 50 ug/ml의 ampicillin, 0.1 M IPTG, 그리고 50 mg/ml X-gal을 포함하는 LB-TBN 고체배지에 도말하여 37°C에서 48 시간 동안 배양한 후, 기질을 분해하여 투명환을 생성하는 흰색 콜로니를 선별하였다. TBN 플레이트상의 리파제 활성을 도 10에 나타냈으며, 콜로니 주변에 할로를 형성한 것으로부터 상기 형질전환체가 리파제 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

선별된 클론을 50 ug/ml의 암피실린과 0.1 M IPTG가 함유된 LB 배지에서 24 시간 배양한 후, 원심 분리하여 전체 cell을 얻었다. 이 cell을 기질인 (R),(S)-오픈록사신 프로필 에스테르와 반응시킨 후에 HPLC방법으로 최종적으로 (R),(S)-오픈록사신 프로필 에스테르의 (S)-enantiomer를 광학 선택적으로 가수분해 할 수 있는지 확인하였다. HPLC 분석 결과를 도 11에 나타냈으며, *E. coli* DH5a (pJTL180)는 환경분리주 *Yarrowia lipolytica* CL 180와 마찬가지로 enantioselective하게 (S)-오픈록사신 프로필 에스테르를 선택적으로 분해하여 60%의 ee_p (the enantiomeric excess of the product)로 (S)-오픈록사신 (레보플록사신)을 생성할 수 있었다. 도 11에서 (a)는 HPLC diagram of enantioselectivity using lipase from *Yarrowia lipolytica* CL 180 야생균주에서 얻어진 리파제를 이용한 광학선택성을 보여주는 HPLC 결과이고, (b)는 본 실시예에서 제조된 형질전환체인 *E. coli* DH5a (pJTL180)에서 얻어진 리파제를 이용한 광학선택성을 보여주는 HPLC 결과이고, (a) 및 (b)에서 피크 1은 (S)-오픈록사신 (레보플록사신)이고, 피크 2는 (R)-오픈록사신이다.

2-6. cloning 된 리파제 유전자 특성 분석

상기에서 선택된 pJTL180 플라스미드를 특성분석을 위해 분리하였고, 제한효소로 처리하여 약 3.5 kb 크기의 절편을 획득하였으며 도 12에 제한효소를 처리하여 얻어진 pJTL180 플라스미드의 단편의 전기영동 사진을 나타내며, 도 12에서 레인1은 크기마커로서 1kb DNA ladder이고, 레인 2는 절단되지 않은 플라스미드 pJTL180의 DNA이고, 레인 2은 *Ban*H1/*Hind*III를 처리하여 선형화된 pJTL180의 DNA를 나타낸다.

상기에서 획득된 3.5 kb를 primer walking방법을 이용하여 전체 DNA 염기서열을 결정하였다. 3.5 kb의 DNA 단편 시퀀스는 클로닝 벡터인 pUC118의 sequencing 용 primer인 M13R primer와 M13F primer을 이용하여 primer walking 방법으로 확인되었다. 상기 3.5 kb DNA 단편 서열분석에 사용된 프라이머를 하기 표 4에 나타냈다. 표 4에서 프라이머는 순차적으로 SEQ ID NO: 3 내지 10으로 서열목록에 나타냈다.

[표 4]

Primers	Oligonucleotide sequence (5' → 3')
M13F (Universal)	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC
M13R (Universal)	GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13F1	ACC GGT CAA GAT GCT GTA GAT ATC
M13R1	TCG GAA AGG AGA TGT AAC GTC TGA
M13F2	AGA GTC TCC TCC AAA TTC ACC AAT G
M13R2	TCA CTC CAG CTA CAG TAC AGT ACA
M13F3	GAG CCA TTG AGT GCT TTC GAG TTA A
M13R3	TTG CGC GTC TCT TAG ACA GAA GAT

시퀀싱 data 분석은 벡터 NTI sequence analysis software package (base-calling, sequencing assembly, and finishing editing software)가 사용되었고, Deduced amino acid sequence는 protein homology와 domain composition 분석을 위하여 complete nonredundant protein sequence database (NCBI)를 이용하였다. Potential signal peptides는 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) program을 이용하였고, Transmembrane segment search는 TmPred at ISREC (http://www.ch.embnnet.org/embnnet-test/software/TMPRED_form.html) web site를 이용하였다. Protein sequences의 비교는 CLUSTALW program을 이용하였다.

얻어진 3.5 kb의 염기서열 분석 결과 1,431 bp로 구성된 open reading frame (ORF)를 확인하였다. 확인된 ORF는 52% G+ C 로 구성되어 있었다.

분석결과 예측된 ORF는 476 아미노산으로 구성된 52 kDa의 단백질에 대한 정보를 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 시작 codon은 ATG였고, TAG로 stop되었다. A potential ribosome binding site (CACCATG)가 시작 ATG codon으로부터 7 bp 앞쪽에서 발견되었다 (도 13). 도 13은 클로닝된 3.5 kb 염기서열 및 정보분석을 나타내는 것으로서, 프로모터 부위와 (TATA box) 리보솜 binding site (RBS)는 box와 밑줄로 표시되었으며, 활성화에 필수적인 Ser, Asp, His를 box로 표시하였고, 활성 active site를 dotted line으로 표기하였고, Stop codon은 asterisk으로 표기하였고, trans-membrane helix는 염기서열아래 a dotted line으로 표기하였다.

SignalP 분석결과 세포외로 secretion 되기 위한 signal sequence는 발견되지 않았다. Kyte-Doolittle plot 분석 결과 대상 단백질은 아마도 membrane에 부착하기 위한 두 부분의 hydrophobic spans ($V^{98}-S^{114}$, $G^{208}-L^{231}$)을 함유하고 있는 것으로 사료되었다. 단백질 서열중 cell attachment motif $R^{345}G^{346}D^{347}$ 의 존재는 이러한 사실을 뒷받침해준다 (D'Souza 등, Trends Biochem. Sci. 16:246-250, 1991).

함유된 단백질 정보의 분석결과 type B1 carboxylesterase/lipase family에 30%이하의 상동성을 나타내었고, serine hydrolase와 type B1 carboxylesterase/lipase family의 active site에 일반적으로 conserve 되어 있는 $GES^{189}SG$ motif (Gly-X-Ser-X-Gly)가 발견되었다. 또한 리파제 활성화에 필수적인 the triad serine, aspartate, histidine가 단백질 서열로부터 분석되었다 (S^{189} , E^{302} , H^{387} , Fig. 13). 이러한 사실로부터 리파제 활성화에 필요한 필수적인 서열은 보존되어 있지만 기존의 알려진 리파제와는 상당히 다른 신종의 리파제로 확인하였다.

기존의 알려진 단백질과 연관성을 살펴보기 위해 BLAST homology search를 실시한 결과, 기능이 알려지지 않고, 단백질에 대한 정보를 함유할 것으로 추정된 새로운 유전자와 유사성을 나타내었다. 최근 진행되고 있는 *Yarrowia lipolytica* CLIB99 의 genomic 결과 발견된 hypothetical protein 과 99% identity를 보였지만 (표 5), *Yarrowia* 와 *candida*를 포함한 이미 알려진 다른 균주의 type B1 carboxylesterase/lipase family와 비교한 결과 기존의 알려진 *Yarrowia lipolytica* 의 lipase Lip1 (32.73% identity), *Yarrowia lipolytica* 의 lipase Lip3(30.24% identity)를 포함하여 *Candida rugosa*의

lipase Lip1 (19.24% identity), *Candida rugosa* 의 lipase Lip2 (18.81% identity), *Geotrichum candidum* 의 lipase Lip1 (18.13% identity), *Geotrichum candidum* 의 lipase Lip2(17.25% identity), *Geotrichum fermentans* 의 lipase Lip1 (17.25% identity)와 30%이하의 상동성을 보여 신종 리파제로서 확정하였다(도 14, shows a multiple alignment).

[표 5]
Yarrowia lipolytica 180 리파제 유전자에 대한 블라스트 서치

Protein	Source	Identities(%)	Positives(%)	Score(bits) /E-value
Hypothetical protein	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB99	474/476 (99)	475/476 (99)	978 /0
Hypothetical protein	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB99	232/470 (49)	320/470 (68)	495 /e-139
YLIP1	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB99	168/498 (33)	262/498 (52)	269 /1e-70
Lipase I protein	<i>Yarrowia lipolytica</i> JM12	167/499 (33)	260/499 (52)	268 /3e-70
YLIP3 Carboxylesterase/ lipase type B	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB99 <i>Yarrowia lipolytica</i> INAG135668	151/446 (33)	226/446 (50)	218 /2e-55
Hypothetical protein	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	121/450 (26)	203/450 (45)	129 /2e-28

도 14는 다중 염기서열 비교결과를 나타내는 것으로서 본 발명의 *Yarrowia lipolytica* CL 180 lipase (YAR180Lip)와, *Candida rugosa* (CrugLip1, CrugLip2), *Geotrichum candidum* (GcanLip1, GcanLip2), *Geotrichum fermentans* (GferLip1), and *Yarrowia lipolytica* (YARLip1, YARLip3)의 리파제와 다중 염기서열을 비교한 것으로서, 동일 아미노산은 별표로 표기하고 동종의 아미노산은 점(dot)으로 표기하였고, 겹은 dash로 나타내고, oxyanion hole site (a)과 활성 active site serine (b)은 box로 나타내었다.

또한 cloning 된 *Yarrowia lipolytica* CL 180 리파제는 지금까지 보고된 리파제와는 상당히 다른 신종의 리파제인 동시에, enantioselective하게 (S), (R)- 오픈플록사신 프로필 에스테르중 (S)-오픈플록사신 프로필 에스테르를 특이적으로 분해하여, (S)-오픈플록사신 (레보플록사신)을 60% 의 ee_p (the enantiomeric excess of the product)로 생성하는 특이적 활성을 보이는 레보플록사신 생산에 산업적으로 유용한 특성을 함유하고 있다.

실시에 3: cloning 된 리파제의 발현 및 재조합 단백질 분석

3.1 사용 균주 및 유전자 운반체

Cloning된 (S)-오픈플록사신 프로필 에스테르의 선택적 활성을 보인 리파제의 발현을 통한 재조합 단백질의 조제와 대량생산을 위하여, 발현 벡터로는 pET24a를, 숙주세포로는 *E. coli* DH5a, *E. coli* BL21 (DE3)RP 를 사용하였다.

3.2 DNA의 조작

제한 효소의 처리는 DNA 를 적절한 완충용액에 녹이고 제조 회사의 지시에 따라 반응시키고 65°C 에서 10분간 열처리하거나, EDTA를 첨가하여 반응을 중지시킨다. 제한효소로 절단한 DNA 절편의 회수는 DNA 절편분리 kit (Qiagen, Co.)를 사용하며, 플라스미드는 플라스미드 miniprep (Qiagen, co.)을 사용하였으며 대부분의 DNA 조작방법은 Maniatis 등 (1989)의 표준방법을 이용한다.

3.3 Expression system 확립

pET24a의 NdeI, SalI site에 NdeI, SalI site를 포함하는 primer를 제작하였다.

정방향 P1: 5'- CGACCCGGCATATGACTACAATTAACCTCGAAAGCACTCAATG - 3'(SEQ ID NO: 11)

역방향 P2: 5' - CTCCACATGTGCGACCATAGCCACTCTCCAGCAGGAGT - 3'(SEQ ID NO:12)

리파제 유전자의 ORF를 포함한 pJTL180을 이용하여 Ex-taq polymerase (Takara, Co.)를 이용하여 PCR을 수행하였다. Ligation한 후, DH5α에 형질전환 하여 candidate를 얻고, 이로부터 DNA 플라스미드 prep하여 이를 sequencing하여 mutation이나, frame shift가 일어나지 않은 완전한 DNA가 cloning되었음을 확인한다. 이후 BL21(DE3)RP 균주에 형질전환 하여 expression 하였다.

3.4 재조합 단백질의 생산

pET24a에 cloning된 리파제 유전자의 expression을 위해 LB medium에 Kanamycin (50 ug/ml)이 첨가된 medium에서 seed culture 한 후 동일한 main medium에 1% 접종하여 3시간 배양 후 IPTG를 최종 1mM의 농도로 첨가하여 발현하였다. 발현정도와 시기를 분석하기 위해 1시간 마다 sampling하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 발현결과를 도 15에 나타냈으며, 도 15에 나타낸 바와 같이 pET24a 에 의해 발현된 재조합 단백질은 성공적으로 잘 발현되었음을 알 수 있다. 도 15에서 레인 1은 SDS-PAGE 표준물질, 레인 2는 *E. coli* BL21 세포 추출물이고, 레인 3은 IPTG로 발현을 유도하지 않은 세포 추출물이고, 레인 4는 IPTG로 발현을 유도하지 않은 세포 추출물이고, 레인 5는 수용성 분획이고, 도 6은 불용성 분획을 나타낸다.

발현이 확인된 콜로니를 대량배양하여 재조합 단백질을 분리하기 전, soluble fraction, inclusion body, periplasmic region중의 어느곳으로 생산되는 지를 확인하였고 이는 pET system의 protocol에 따랐다.

3.5 재조합 단백질의 분리

다량의 리파제를 분리하기 위하여 *E. coli*에서의 expression system을 이용하였다. 순수분리의 용이를 위해 His-Tag이라는 oligopeptide를 접합시켰고, His tag 분리는 Talon resin (Clontech, Co.)를 이용하여 분리하였다.

본 발명은 상술한 실시예에 한정되지 않으며, 첨부된 특허청구범위에 의해 정해지는 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 많은 변형이 가능함은 물론이다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명의 광학선택적 리파아제가 최적화를 통해 대량으로 생산 되어진다면, 옥플록사신으로부터 레보플록사신만을 생산하는 새로운 생촉매 (biocatalyst)로써 유용하게 사용되어질 것이고, 의약품 산업에 크게 기여 할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

SEQ ID NO:2에 나타낸 아미노산 서열로 이루어지며, (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 광학선택적으로 분해하는 리파제.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO:1에 나타낸 핵산서열에 의해 암호화되는 펩타이드인 리파제.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르중 알킬은 프로필, 또는 부틸인 리파제.

청구항 4.

SEQ ID NO:2에 나타난 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열로 이루어지며, (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 광학선택적으로 분해하는 리파제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, SEQ ID NO:1에 나타난 핵산서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6.

(R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 광학선택적으로 분해하는 리파제를 생산하는 *Yarrowia lipolytica* 균주(KCTC 0533BP).

청구항 7.

제 4항 또는 제5항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 8.

제 4항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질전환된 원핵세포.

청구항 9.

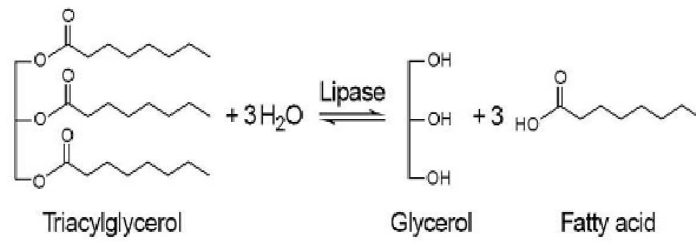
제1항에 따른 리파제를 pH는 6.0-8.0에서 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물에 반응시켜 레보플록사신을 제조하는 방법.

청구항 10.

제 9항에 있어서, 상기 리파제는 제 6항의 *Yarrowia lipolytica* 세포 배양물, 또는 제 8항의 형질전환된 세포 배양물로부터 분리한 리파제인 것인 방법.

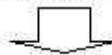
도면

도면1



도면2

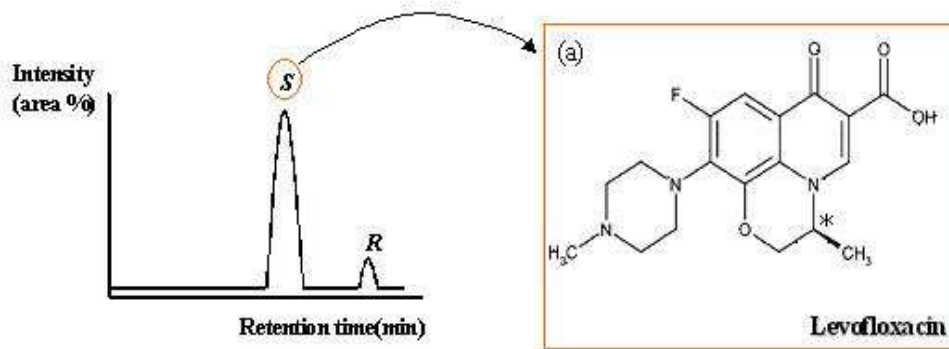
Screening and isolation of lipase-producing microorganism
(Tributyrin plate assay)



Screening of ofloxacin ester-hydrolyzing microorganism
(PNPO assay)

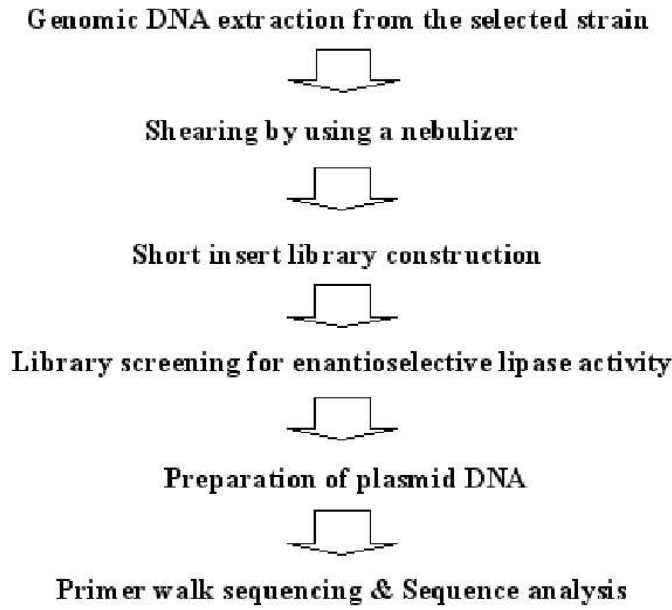


Screening of ofloxacin ester-enantioselective microorganism

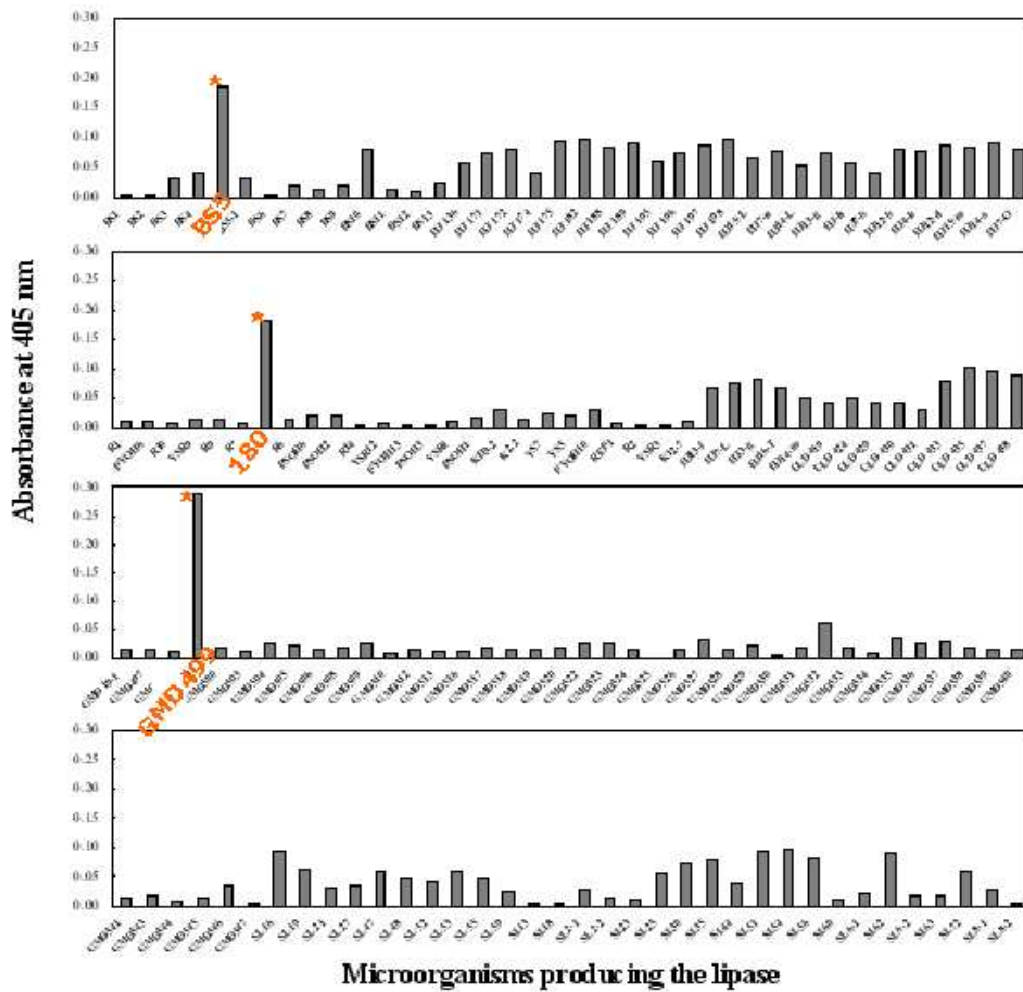


(HPLC analysis)

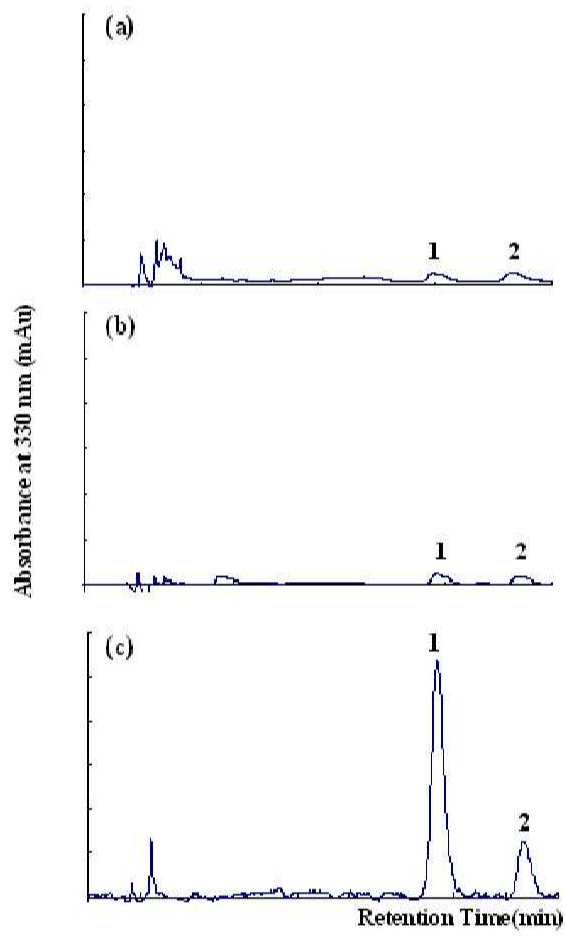
도면3



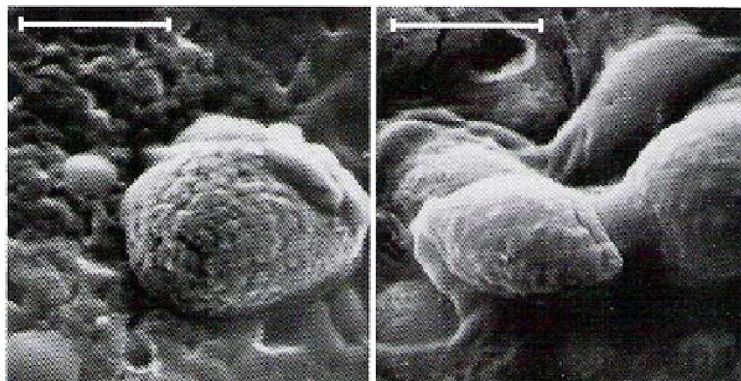
도면4



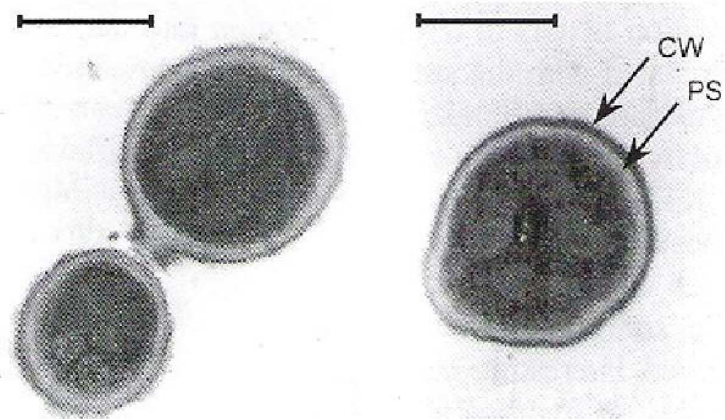
도면5



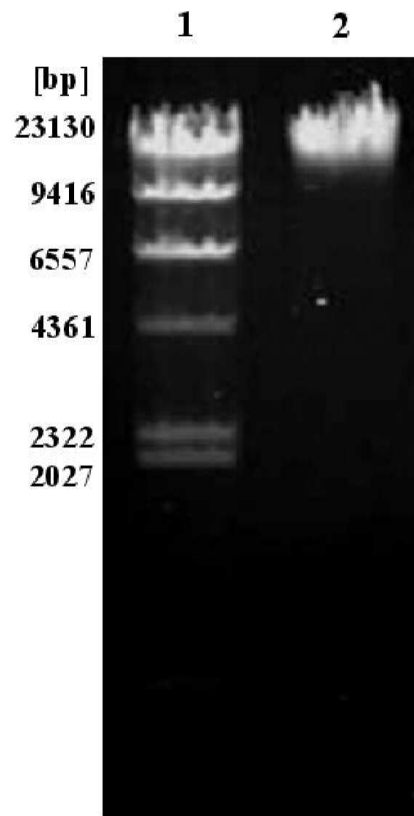
도면6



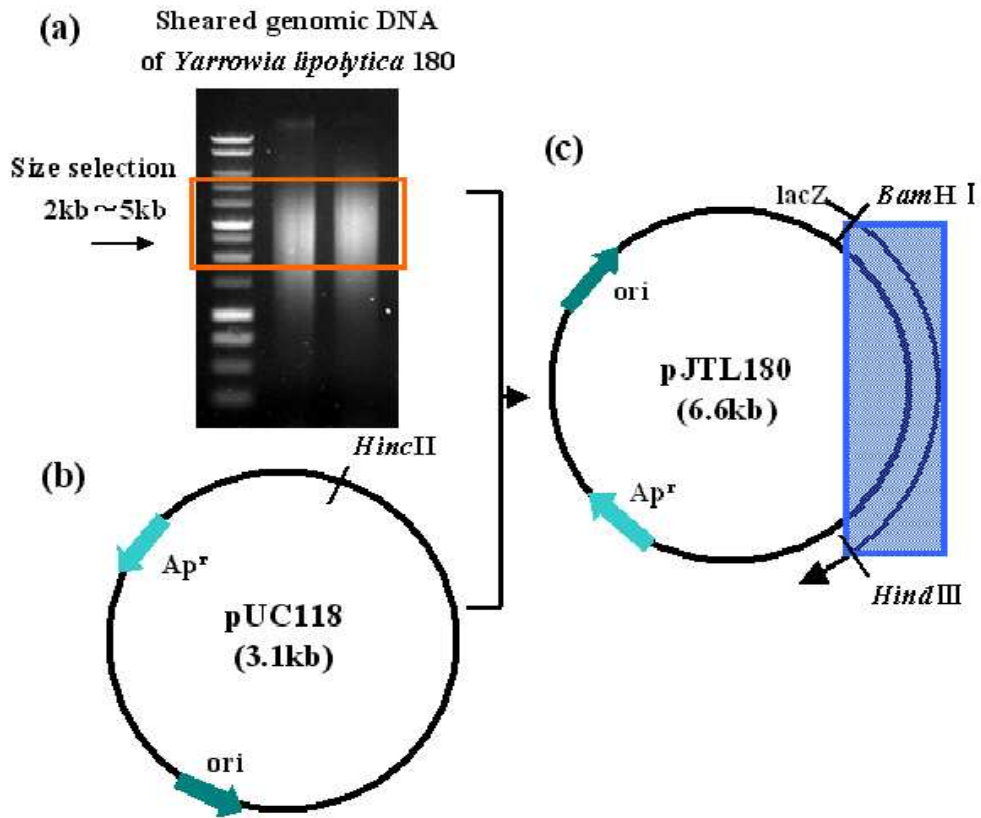
도면7



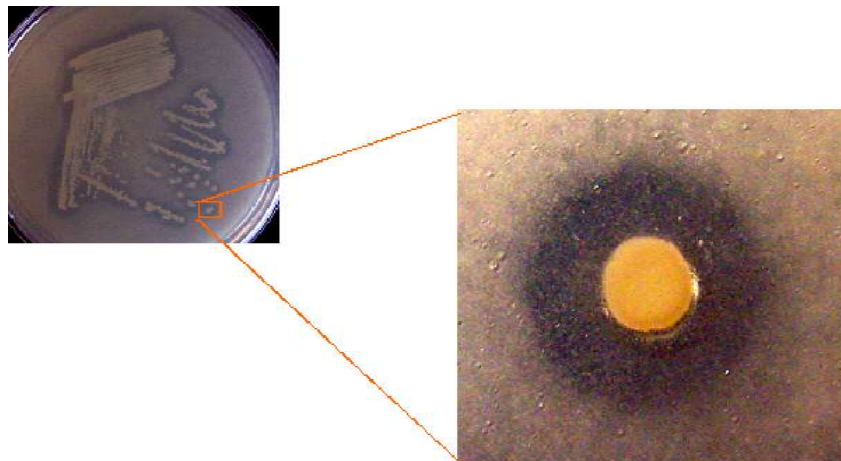
도면8



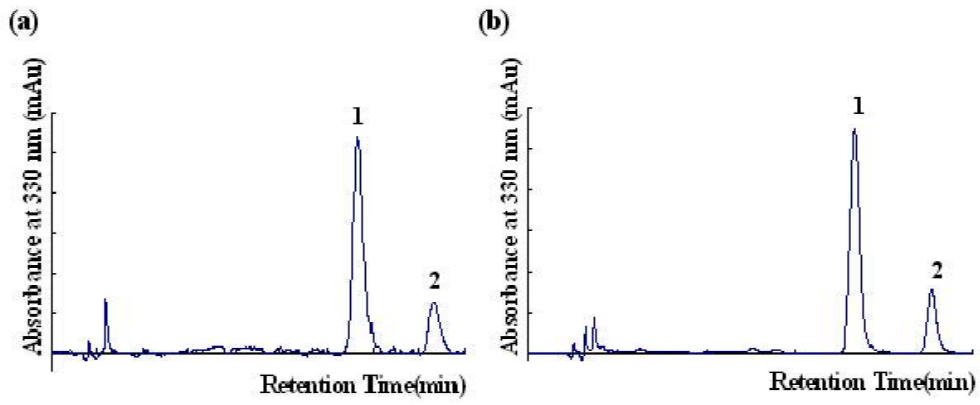
도면9



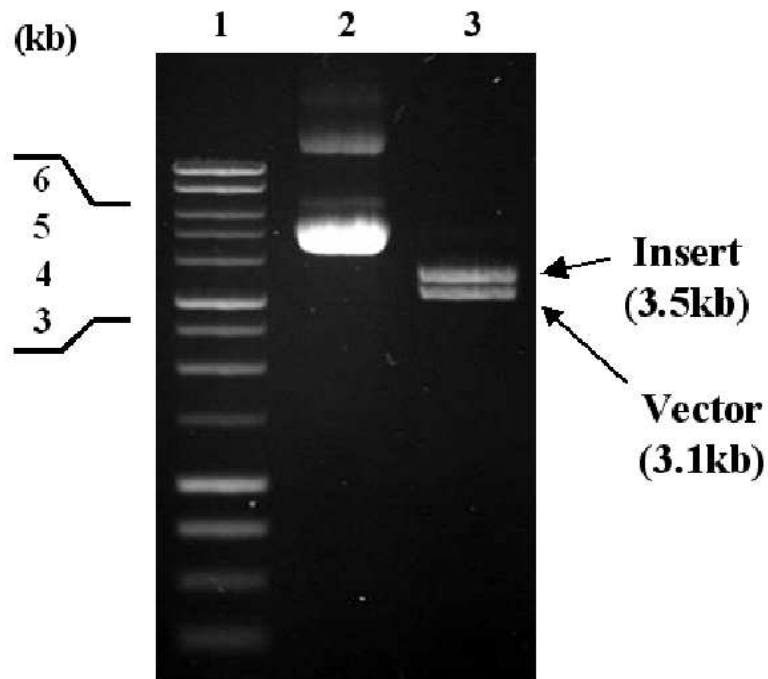
도면10



도면11



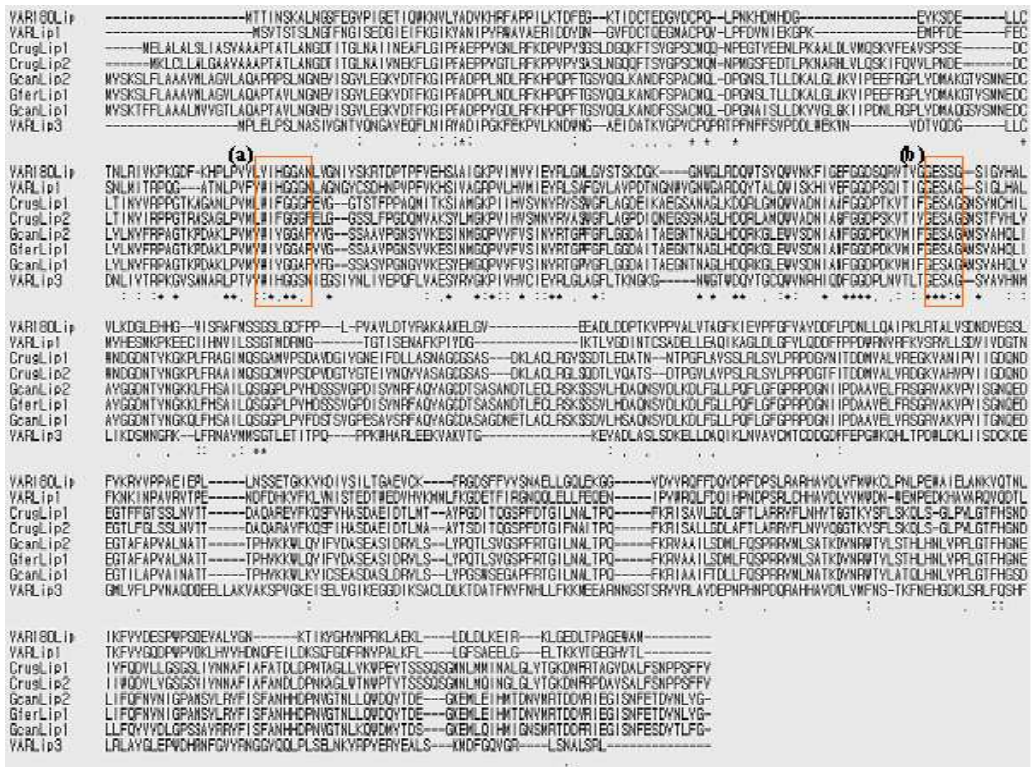
도면12



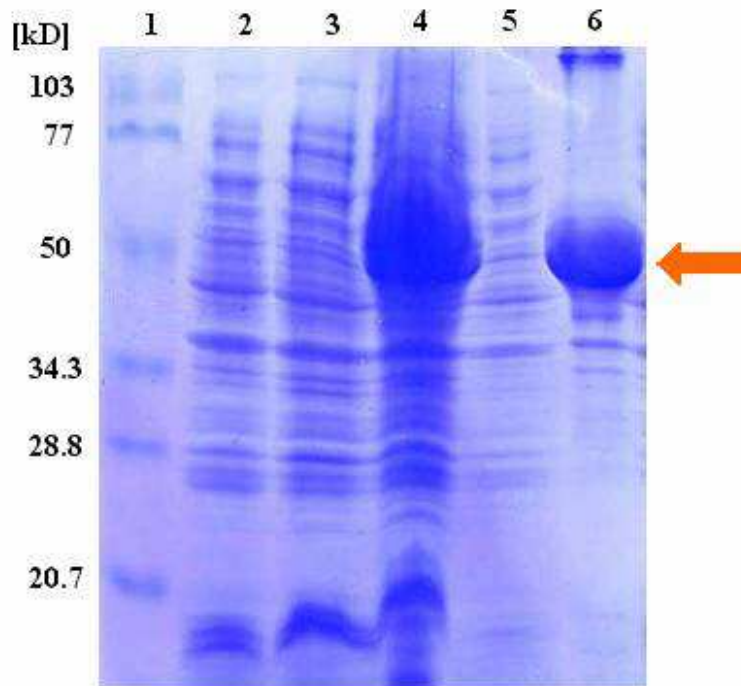
도면13

ATGCTGTAGCT GACTTTT CBTTCCT TCTTTATCTTGCTCTCCAAGTCAACTGTTCATTCGGTTCGGCAATATTAACGTT AGCGCCCTGGGCTTTT TACGCTGACGAGABAATAACACCTT	120
CCAGCCAGCGT GACAATCAGCTCCAGAACACAGCCGTGGGAACCCGTCGMAAGGAGATGTAAAGTCTGAGGTTGTGGCAATGTTGTGGATCCAGT CATCCGCCGCCCGGTGGMGGMGTG	240
GCAATTCAGCCGTTCTCAAGCGGTCTCGAACAATCAACAGGTCGTGTGGACATGTTCTCCACAGGTTTCCACAGGTGGGGTGGTGGATGGATGACGCGTCCCGGCTCGATTCAACACAAATC	360
AACAAATCGCT CTGGTATCGTGGCTCCTTTTCCATCCCAATCAAGCATCCGAGCTTGGATTAGCTAATGAGCTGCTGTGACGTTGATGGAGCTGGTGTGTGCTACAAGTAGACGAGAGGC	480
AGAAGACAGAT TACAAGACAGAACCCGCTGCATCAATGGAGCGTCACTGAGCAGTCCATACACACTCCACCGTCCACGAGCGGCTGTCTATGTGT TAGCGTGCACATTTTATTCCCGCATG	600
TTTTGTTGGT CATGGTATTTGTAGTCTGCCCTTCCACTCGTGAAGCTCCCAAAAACA TGAACCCCAACACACTTTCACCTCCAGCTACAGTACA GTACAGTACATGCTATAGTTAGGGCT	720
CTATTAGGGGTTGGGCGACTATAAAGAAGTGGTAGAGTGAATAAAGGAGTGAATAAGACTCGGTGTGCCCTCGAT AAGAGCGAATGTATTTACGCGCTCTCTCTCTCTCTATAT	840
ATATATATATA TATATGATTAATGGTGTGTTCATCCCAATTCAGCAGCATCGCTTTGGGGGTGTCACTGTGTGTGCTGATAGGAGTGCCTGTACT GATATTCCTCCAGTAAT TGACCA	960
BTGCGATGABA CCGTGAAGTACTGTATGTTCCATTCGCAATACCCCGTATCCCGAT TACCCCATTCGATCAACCTATTGATCCGAA TGTAAATGTCATGCTGTATGACTGTCT	1080
ATCCGCTCAA CCAACTACTAACCA TACCATCTCAGTTTTACTATAAGTGGTGTGTTCTTGCAGCTCTCTTAGACABAAGTCCGACCATTTGATCCGAA TGTAAATGTCATGCTGTATGACTGTCT	1200
CAGCTGAACTCATACGAAAGAGCTCCGCTABAAAAATAGAGAAATTTGAAAGCAAGCAGACTTGAACCTCGGCCCGCATCTTTGATTCACAGTBAACACTACAGAGAACCCATCTC	1320
TGTCGTGGAA ACTCAGTGCATGACGAAAACAGCTCAAGCGTGGGATCGTGTGGCGGTCCAGACTACAAGTAGCAGTABAACCTCTTCCAGCTTACCCCGCTTTGACAGGTGGCT	1440
AAACAAATGCA TATGGGACTATTTTGGGACCATCACTGACTACTACCCCGCTAATTTGAAAGAA GGTGGCCACACAACTAATCCCTGTGGCGTTCACGAGCTGCAAAAGGCTCTCTTT	1560
CGTGAATGAAGTTAGCCGCTCGCCACGCGCCCTGGTGGAGATTCGGAACACTGCTAGTTAACCATGTCCGAACTGCACGAGTACAGATGATATCGGTGGAGTACTGTAGTACA	1680
GTACATAGCTCGGTTGGGTATGTAAGACAGATTTTACAGGGCGTGGAGATTTGGTGCAT TGTGAATGATTAACAATAACAATGAGCTGTGCAGTTGCAATGAGTAACTATTC	1800
GTGGTCTCATTTCCCGCTAAAGTGCACATATCTTTTGATCCGTCAACGTCCCGACGTTAAACTCTCGGCTAGCTCACTAACCGCGAAGCTAAGGTCGTTGGATTTATAGCCCATCT	1920
GGCTGCATGAACCAAGGAAACTACAAGTGTGAGGAAATATATATAATCACCCAGTACTTGGAGTGTCAACCCATCAGAACTCCAACTACACACTACACACACACACACACTACTACA	2040
ATTAAGTGGAAAGCACTCAATGGCTCTTTTGGAGAGTCCCGATTTGGGAGACCATCCAGTGGAAAGAACGTTCTGTACGCGATGTCAAGCACCGGTTTGTCTCTCTATTTCTGAAGCT	2160
I N S K A L N G R S F E G V P I G E T I Q A K K N V L V A D V K H R F A P P I L K T	43
GACTTTGAGGAAAGACATCGACTGTACGAAAGGAGTATGATTTGTCCGACTGCCAACA AACACGATATGCAAGTGGGAGTACAAGAGGAGGAGGCTCTGTGCACCAACTCG	2280
D F E G K T I D C T E D G Y D C P Q L P N K H D H D E E Y K S D E L L C T N L	63
CGGA TGTGAAGCCAGGGCACTTCAGACACCCCTTCCCGCTCTGTATCATCCAGAGTGTCACTTGTGTGGAAACA TTAGACAGGCAAGCCGATCTACTCGTGTGTG	2400
R I V K P K G D F K H P L P V Y L V I H G G A N L V G N I V S K R T D P T P F Y	129
GAGCACTGTGCAATCGCCAGCCGTGTCAATGTTGTTCATGAGTATCGACTCGGTATGCTTGGTACTCCAGCTCCAGGATGGAAAGGTTAACTGGGTTCTGGAGACCAAGTGG	2520
E H S A A I G K P V I M V V I E V R L G N L G V S T S K D G K G N W G L R D Q W	163
ACTTCAGTTCAGTGGGTTAACAAAGTTCAATGGTGAATTTGAGGAGACTCTCAGCGAGTGACTGTGGAGGAGACTCTTCTGGCTCAATTTGGTGTCCAGCTCTTGTCTGAAGGACGGC	2640
T S Y Q N Y N K F I G E F G G D S Q R V T Y G G E S I S G S I G Y H A L V L K D G	203
CTCGAGACCA TGGGTTATCAGCGAGCCCTCAATGCTTCCGATCTCTGAGCTGTTTCCCTCTCTTCCGTTGCTTATCTGTATACTACCGAGCCAGGCTGCTAAGGAGCTTGGT	2760
L E H H G V I S R A F M S S G S L G C F P P L P V A Y L D T V R A K A A K E L G	243
GTTGAAGAGGGGATCTCGATGACDCTACCAAGCTCCCTCCCTACGCTCTCGTCAAGCGCGGAT TCAAGTCCGATACCCCTTTGGCTTGTATGCTACGATGACTTTTGGCTGACAC	2880
Y E E A D L D D P T K V P P V A L V T A G F K I E V P F G F Y A V D D F L P D N	283
CTGCTGCAAGCCATTCACAGCTCAGAACCCGCTCTGTCTCCGACAGCACTATGAGGTTCTCTATTTGTGAGGAGTGGTGGCACTCCGAGATCGAACCTCTCTCACTCCCTCC	3000
L L Q A I P K L R T A L V S D N D V E G S L F V K R V V P P A E I E P L L H S S	323
GAGACGGAAGAGGTCAGGATATCTACAGCATCTTGAACCGGTGCCAGGTTGTGCAAGTCCGAGGATAGTTCTTTGTGTGTCTAACGACAGCTACTCGGCCACTGGAAAG	3120
E T G K K Y K D I Y S I L T G A E V C K F R G D S F F Y Y S N A E L L G Q L E K	363
GGAGSTGTGACTCTACCGACAGTCTTCGACCAAGTGTATCCCTTTGACCCCTCTCTTAGGGCCGTCATGCTGTGCACTTGTCTCA YGTGGAAATGCTTTCCCAACTCCCTGAG	3240
G G V D V Y R Q F F D D V D P F D P S L R A R H A Y D L V F N W K C L P N L P E	403
TGGGCCATCGAAGTGGCCAAAGTACGAGCCAACTGATCAAGTTCGATACGATGAGTCTCCCTGGCCCTCGATGAGGTTGCCCTTGTGGAAACAGACCATCAAGTACGGTCAT	3360
W A I E L A N K V Q T N L I K F V V D E S P N P S D E V A L V G N K T I K V G H	443
TACAACCTCGAAAGCTGGCAAGAGGCTGCTTGAOCTCGAAGTCAAGGATTCGAAAGCTTGGAGGATCTCACTCCTGCTGGAGAGTGGCTATGTAGACTATTATTTAAATTAAG	3480
Y N P R K L A E K L L D L D L K E I R K L G E D L T P A G E V A N +	476
ACATTGAC	3466

도면14



도면15



서열목록

<110> KORDI

<120> FLOXACIN ESTER-ENANTIOSELECTIVE LIPASE, NUCLEOTIDE ENCODING THE

LIPASE, AND METHOD OF PRODUCING THE LEVOFLOXACIN

<130> DPP20050934KR

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1431

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1428)

<400> 1

atg act aca att aac tcg aaa gca ctc aat ggc tct ttt gag gga gtc 48

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

1 5 10 15

ccc att ggg gag acc atc cag tgg aag aac gtt ctg tac gcc gat gtc 96

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

20 25 30

aag cac cgg ttt gct cct cct att ctc aag act gac ttt gag gga aag 144

Lys His Arg Phe Ala Pro Pro Ile Leu Lys Thr Asp Phe Glu Gly Lys

35 40 45

acc atc gac tgt acc gaa gac gga tac gat tgt ccc cag ctg ccc aac 192

Thr Ile Asp Cys Thr Glu Asp Gly Tyr Asp Cys Pro Gln Leu Pro Asn

50 55 60

aaa cac gat atg cac gat ggc gag tac aag agc gac gag ctt ctg tgc 240

Lys His Asp Met His Asp Gly Glu Tyr Lys Ser Asp Glu Leu Leu Cys

65 70 75 80

acc aac ctg cgg atc gtg aag ccc aag ggc gac ttc aag cac ccc ctt 288

Thr Asn Leu Arg Ile Val Lys Pro Lys Gly Asp Phe Lys His Pro Leu

85 90 95

ccc gtc tac ttg tac atc cac gga ggt gcc aac ttg gtt gga aac att 336

Pro Val Tyr Leu Tyr Ile His Gly Gly Ala Asn Leu Val Gly Asn Ile

100 105 110

tac agc aag cga acc gat cct act ccg ttt gtg gag cac tct gct gca 384

Tyr Ser Lys Arg Thr Asp Pro Thr Pro Phe Val Glu His Ser Ala Ala

115 120 125

atc ggc aag cct gtc atc atg gtt gtc att gag tat cga ctc ggt atg 432

Ile Gly Lys Pro Val Ile Met Val Val Ile Glu Tyr Arg Leu Gly Met

130	135	140	
ctt ggt tac tcc acc tcc aag gat gga aag ggt aac tgg ggt ctg cga			480
Leu Gly Tyr Ser Thr Ser Lys Asp Gly Lys Gly Asn Trp Gly Leu Arg			
145	150	155	160
gac cag tgg act tca gtt cag tgg gtt aac aag ttc att ggt gaa ttt			528
Asp Gln Trp Thr Ser Val Gln Trp Val Asn Lys Phe Ile Gly Glu Phe			
	165	170	175
gga gga gac tct cag cga gtg act gtt gga gga gag tct tct ggc tca			576
Gly Gly Asp Ser Gln Arg Val Thr Val Gly Gly Glu Ser Ser Gly Ser			
	180	185	190
att ggt gtc cac gct ctt gtt ctg aag gac ggc ctc gag cac cat ggc			624
Ile Gly Val His Ala Leu Val Leu Lys Asp Gly Leu Glu His His Gly			
	195	200	205
gtt atc agc cga gcc ttc atg tct tcc gga tct ctg ggc tgt ttc cct			672
Val Ile Ser Arg Ala Phe Met Ser Ser Gly Ser Leu Gly Cys Phe Pro			
	210	215	220
cct ctt ccg gtt gct tat ctt gat act tac cga gcc aag gct gct aag			720
Pro Leu Pro Val Ala Tyr Leu Asp Thr Tyr Arg Ala Lys Ala Ala Lys			
225	230	235	240
gag ctt ggt gtt gaa gag gcg gat ctc gat gac cct acc aag gtc cct			768
Glu Leu Gly Val Glu Glu Ala Asp Leu Asp Asp Pro Thr Lys Val Pro			
	245	250	255
ccc tac gct ctc gtc acg gcc gga ttc aag atc gaa tac ccc ttt ggc			816
Pro Tyr Ala Leu Val Thr Ala Gly Phe Lys Ile Glu Tyr Pro Phe Gly			
	260	265	270
ttc tat gct tac gat gac ttt ttg cct gac aac ctg ctg caa gcc att			864
Phe Tyr Ala Tyr Asp Asp Phe Leu Pro Asp Asn Leu Leu Gln Ala Ile			
	275	280	285
ccc aag ctc aga acc gct ctt gtc tcc gac aac gac tat gag ggt tct			912
Pro Lys Leu Arg Thr Ala Leu Val Ser Asp Asn Asp Tyr Glu Gly Ser			
	290	295	300
cta ttt gtg aag cga gtg gtg cca cct gcc gag atc gaa cct ctt ctc			960
Leu Phe Val Lys Arg Val Val Pro Pro Ala Glu Ile Glu Pro Leu Leu			
305	310	315	320
aac tcc tcc gag acc gga aag aag gtc aag gat atc tac agc atc ttg			1008
Asn Ser Ser Glu Thr Gly Lys Lys Val Lys Asp Ile Tyr Ser Ile Leu			
	325	330	335
acc ggt gcc gag gtg tgc aag ttc cga gga gat agt ttc ttt gtc gtg			1056
Thr Gly Ala Glu Val Cys Lys Phe Arg Gly Asp Ser Phe Phe Val Val			

340	345	350	
tct aac gca gag cta ctc ggc caa ctg gaa aag gga ggt gtt gac gtc			1104
Ser Asn Ala Glu Leu Leu Gly Gln Leu Glu Lys Gly Gly Val Asp Val			
355	360	365	
tac cga cag ttc ttc gac cag gtt gat ccc ttt gac cct tct ctt agg			1152
Tyr Arg Gln Phe Phe Asp Gln Val Asp Pro Phe Asp Pro Ser Leu Arg			
370	375	380	
gcc cgt cat gct gtc gat ctt gtc ttc atg tgg aaa tgt ctt ccc aac			1200
Ala Arg His Ala Val Asp Leu Val Phe Met Trp Lys Cys Leu Pro Asn			
385	390	395	400
ctc cct gag tgg gcc atc gaa ctg gcc aac aag tac cag acc aac ctg			1248
Leu Pro Glu Trp Ala Ile Glu Leu Ala Asn Lys Tyr Gln Thr Asn Leu			
405	410	415	
atc aag ttc gtc tac gat gag tct ccc tgg ccc tcc gat gag gtt gcc			1296
Ile Lys Phe Val Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Pro Ser Asp Glu Val Ala			
420	425	430	
ctt gtt gga aac aag acc atc aag tac ggt cat tac aac cct cga aag			1344
Leu Val Gly Asn Lys Thr Ile Lys Tyr Gly His Tyr Asn Pro Arg Lys			
435	440	445	
ctg gca gag aag ctg ctt gac ctc gac ctc aag gag att cga aag ctt			1392
Leu Ala Glu Lys Leu Leu Asp Leu Asp Leu Lys Glu Ile Arg Lys Leu			
450	455	460	
gga gag gat ctc act cct gct gga gag tgg gct atg ta g			1431
Gly Glu Asp Leu Thr Pro Ala Gly Glu Trp Ala Met			
465	470	475	
<210> 2			
<211> 476			
<212> PRT			
<213> Yarrowia lipolytica			
<400> 2			
Met Thr Thr Ile Asn Ser Lys Ala Leu Asn Gly Ser Phe Glu Gly Val			
1	5	10	15
Pro Ile Gly Glu Thr Ile Gln Trp Lys Asn Val Leu Tyr Ala Asp Val			
20	25	30	
Lys His Arg Phe Ala Pro Pro Ile Leu Lys Thr Asp Phe Glu Gly Lys			
35	40	45	
Thr Ile Asp Cys Thr Glu Asp Gly Tyr Asp Cys Pro Gln Leu Pro Asn			
50	55	60	

Lys His Asp Met His Asp Gly Glu Tyr Lys Ser Asp Glu Leu Leu Cys
 65 70 75 80
 Thr Asn Leu Arg Ile Val Lys Pro Lys Gly Asp Phe Lys His Pro Leu
 85 90 95
 Pro Val Tyr Leu Tyr Ile His Gly Gly Ala Asn Leu Val Gly Asn Ile
 100 105 110
 Tyr Ser Lys Arg Thr Asp Pro Thr Pro Phe Val Glu His Ser Ala Ala
 115 120 125
 Ile Gly Lys Pro Val Ile Met Val Val Ile Glu Tyr Arg Leu Gly Met
 130 135 140
 Leu Gly Tyr Ser Thr Ser Lys Asp Gly Lys Gly Asn Trp Gly Leu Arg
 145 150 155 160
 Asp Gln Trp Thr Ser Val Gln Trp Val Asn Lys Phe Ile Gly Glu Phe
 165 170 175
 Gly Gly Asp Ser Gln Arg Val Thr Val Gly Gly Glu Ser Ser Gly Ser
 180 185 190
 Ile Gly Val His Ala Leu Val Leu Lys Asp Gly Leu Glu His His Gly
 195 200 205
 Val Ile Ser Arg Ala Phe Met Ser Ser Gly Ser Leu Gly Cys Phe Pro
 210 215 220
 Pro Leu Pro Val Ala Tyr Leu Asp Thr Tyr Arg Ala Lys Ala Ala Lys
 225 230 235 240
 Glu Leu Gly Val Glu Glu Ala Asp Leu Asp Asp Pro Thr Lys Val Pro
 245 250 255
 Pro Tyr Ala Leu Val Thr Ala Gly Phe Lys Ile Glu Tyr Pro Phe Gly
 260 265 270
 Phe Tyr Ala Tyr Asp Asp Phe Leu Pro Asp Asn Leu Leu Gln Ala Ile
 275 280 285
 Pro Lys Leu Arg Thr Ala Leu Val Ser Asp Asn Asp Tyr Glu Gly Ser
 290 295 300
 Leu Phe Val Lys Arg Val Val Pro Pro Ala Glu Ile Glu Pro Leu Leu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ser Glu Thr Gly Lys Lys Val Lys Asp Ile Tyr Ser Ile Leu
 325 330 335
 Thr Gly Ala Glu Val Cys Lys Phe Arg Gly Asp Ser Phe Phe Val Val

340 345 350

Ser Asn Ala Glu Leu Leu Gly Gln Leu Glu Lys Gly Gly Val Asp Val
 355 360 365

Tyr Arg Gln Phe Phe Asp Gln Val Asp Pro Phe Asp Pro Ser Leu Arg
 370 375 380

Ala Arg His Ala Val Asp Leu Val Phe Met Trp Lys Cys Leu Pro Asn
 385 390 395 400

Leu Pro Glu Trp Ala Ile Glu Leu Ala Asn Lys Tyr Gln Thr Asn Leu
 405 410 415

Ile Lys Phe Val Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Pro Ser Asp Glu Val Ala
 420 425 430

Leu Val Gly Asn Lys Thr Ile Lys Tyr Gly His Tyr Asn Pro Arg Lys
 435 440 445

Leu Ala Glu Lys Leu Leu Asp Leu Asp Leu Lys Glu Ile Arg Lys Leu
 450 455 460

Gly Glu Asp Leu Thr Pro Ala Gly Glu Trp Ala Met
 465 470 475

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13F(Universal)

<400> 3
 ggaaacagct atgaccatga ttac 24

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13R (Universal)

<400> 4
 gacgttgtaa aacgacggcc agt 23

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13F1

<400> 5
 accggtcaag atgctgtaga tatc 24

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13R1

<400> 6
 tcggaaggga gatgtaacgt ctga 24

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13F2

<400> 7
 agagtctcct ccaaattcac caatg 25

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13R2

<400> 8
 tcactccagc tacagtacag taca 24

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13F3

<400> 9
 gagccattga gtgctttcga gttaa 25

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> M13R3

<400> 10
 ttgcgcgtct cttagacaga agat 24

<210> 11
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> P1

<400> 11
 cgacccggca tatgactaca attaactoga aagcactcaa tg 42

<210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> P2

<400> 12
 ctccacatgt cgaccatagc ccaactctcca gcaggagt 38