

발간등록번호

11-1543000-000179-01

식물병원진균 *Cladosporium phlei*을 활용한 의료용  
약리핵심소재의 생산에 관한 연구

(Production of a key pharmacophore from  
a phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*)

전북대학교

농림축산식품자료실



0000112

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물병원진균 *Cladosporium phlei*을 활용한 의료용 약리핵심소재의 생산에 관한 연구” 의 보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 29 일

주관연구기관명 : 전 북 대 학 교

주관연구책임자 : 김 대 혁

연 구 원 : 이 민 희

박 진 아

이 중 기

응 웬 응 옥 르 영

소 금 강

정 지 은

백 진 호

세부연구책임자 : 김 범 태

연 구 원 : 한 인 철

방 성 준

조 익 수

채 민 선

김 효 연

# 요 약 문

## I. 제 목

식물병원진균 *Cladosporium phlei*을 활용한 의료용 약리핵심소재의 생산에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 광감각제인 hypocrellin B 합성 시 걸리는 시간 및 비용 절감을 위해 주요 전구물질인 phleichrome의 대량 생산이 필요
- Phleichrome 생합성과정을 분자수준에서 이해
- 다양한 균주육종을 통한 phleichrome의 대량 생산을 위한 균주 제조
- 농작물 폐기물을 활용한 유용물질 생산을 위한 최적배양 조건 확립

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. Phleichrome 생산에 관여하는 유전자 확보

- 가. *C. phlei*의 genomic library 제작
- 나. Genomic library의 rapid screening 방법 구축
- 다. *C. phlei*의 phleichrome 생합성 관련 유전자의 확보
- 라. 관련 유전자 특성화 실시

### 2. Phleichrome 생산에 대한 빠른 역가 검증법 개발

- 가. 고체배지의 agar block을 이용한 TLC 전개
- 나. 분석기기를 활용한 정량분석 방법

### 3. Phleichrome 대량생산을 위한 균주 육종

- 가. *C. phlei*의 UV-mutagenesis 실시 및 screening 방법 구축
- 나. Phleichrome 과발현 돌연변이체의 배양조건 최적화
- 다. Perylenequinone 합성 관련 유전자의 발현 조절을 위한 vector설계 및 재조합 균주 확보
- 라. *C. phlei*의 perylenequinone 관련 유전자 발현 조절에 의한 분자 육종

#### 4. Phleichrome 생산을 위한 발효조건 확립 및 물질 특성화 및 유도체 개발

- 가. *C. phlei* 생장에 따른 phleichrome의 발현 양 결정
- 나. Phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법 구축
- 다. *C. phlei* 대사체학 연구

#### 5. Phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체의 합성

- 가. Hypocrellin B의 반합성
- 나. Phleichrome의 aminated 유도체의 합성

#### 6. 농업폐기물을 활용한 배양조건 확립

- 가. *C. phlei*가 배양가능한 농작물 탐색
- 나. 농작물을 첨가한 배지에서의 균주 특성 탐색

#### 7. *C. phlei*의 phleichrome 생산과정 중 독성생성 여부 및 효능조사

- 가. *C. phlei* 배양시간별로 배양액을 회수하여 세균을 이용한 성장 제한 실험 실행
- 나. Phleichrome의 ROS 분석 표준화 조건 확립 및 활성검정

### IV. 연구개발결과

#### 1. Phleichrome 생산에 관여하는 유전자 확보

Phleichrome의 생합성에 관여하는 유전자를 확보하기 위하여 *C. phlei* genomic library를 제작하였으며, 보다 용이한 screening을 위하여 ordered library를 성공적으로 제작하였다. 다른 종들의 PKS유전자를 참고하여 degenerated primer를 제작하였으며 3차 screening을 통하여 4개의 관련 유전자를 확보하였다. 차후 이들 각 유전자의 특성화 작업을 위해서 유전자 발현을 확인하였다.

#### 2. Phleichrome 생산에 대한 빠른 역가 검증법 개발

고체배양의 plate의 색소체인 phleichrome 생성량의 차이를 빠르게 screening하는 방법과 소량의 균사 용매 추출액을 TLC방법을 통해 분석하는 표준화된 방법을 개발하였다.

#### 3. Phleichrome 대량생산을 위한 균주 육종

Survival test를 통한 *C. phlei*의 UV-mutagenesis 표준화 조건을 확립하였다. 이를 통해서 phleochrome 2개의 과발현 돌연변이체를 확보하였으며, 이들 각각의 과발현 돌연변이체의 배양조건을 최적화하였다. 또한 확보된 phleochrome 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 조절하기 위한 vector를 설계하였으며, 이를 통해서 재조합 균주를 확보하였다.

#### 4. Phleochrome 생산을 위한 발효조건 확립 및 물질 특성화 및 유도체 개발

*C. phlei* 생장 곡선에 따른 phleochrome 생산성을 조사하여 최적의 조건을 확인하였다. 차후 phleochrome의 효율적인 순수분리정제 방법을 구축하였으며, 정제된 phleochrome으로부터 다양한 활성 유도체를 합성하였다. 또한 phleochrome 유도물질을 개발하여 *C. phlei*의 metabolites의 profile을 확보하였다.

#### 5. Phleochrome으로부터 다양한 활성 유도체의 합성

Phleochrome을 출발물질로 한 hypocrellin B의 반합성법을 개발하고자 하였다. 또한 phleochrome을 출발물질로 한 다양한 aminated perylenequinone 유도체를 합성하는 합성법을 구축하였다.

#### 6. 농업폐기물을 활용한 배양조건 확립

농업폐기물을 활용하여 *C. phlei*의 대량생산이 가능한지를 확인하고자 하였다. 먼저 *C. phlei*의 기주 농작물을 탐색하고 각 농작물들을 배지에 첨가하여 균주의 배양조건을 구축하였다.

#### 7. *C. phlei*의 phleochrome 생산과정 중 독성생성 여부 확인 및 효능조사

*C. phlei* 균주의 배양시간별로 배양액을 회수한 후, 배지에 첨가하여 세균을 이용한 성장 제한실험을 진행하였으며 이를 통해서 *C. phlei*의 독성생성 여부를 확인하였다. 또한 phleochrome의 ROS 활성을 검증하여 효능을 조사하였다.

### V. 연구성과 및 성과활용 계획

- Phleochrome 생산에 대한 빠른 역가검증법 구축
- 분자 육종을 통한 phleochrome 과발현 균주 확보 및 배양조건 확립
- 농가폐기물을 활용한 균주배양의 적용가능성을 확인하여 저가비용의 균주 대량생산 기술에 적용

- Phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법 구축 및 phleichrome을 출발물질로하여 hypocrellin B의 반합성법으로 합성할 수 있는 합성법의 개발
- 의료용 소재물질인 phleichrome 생산의 실용화 및 산업화

## SUMMARY

### I. Title

Production of a key pharmacophore from a phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*

### II. Objectives and Requirements of Research and Development

- Determine the fermentational features for the mass production of phleichrome,
- Define the genes related to the biosynthesis of phleichrome,
- Improve the strain to over produce phleichrome using classical as well as molecular techniques,
- Establish a more efficient protocol for the large-scale purification of phleichrome,
- Find a better way to synthesize hypocrellin B from phleichrome,
- Synthesize various derivatives of hypocrellin B and phleichrome for more effective photosensitizer in PDT.

### III. Materials, Methods and Results

#### 1. Acquirement of PKS gene related phleichrome production

- A. Genomic library of *C. phlei*
- B. Established rapid screening method of genomic library
- C. Acquirement of genes related to biosynthesis of phleichrome
- D. Characterization of PKS genes

#### 2. Development of a method for titering of phleichrome production

- A. Thin layer chromatography using agar blocks of solid media
- B. Quantitative Analysis using spectrophotometer machine

#### 3. Improve the strain phleichrome for the mass production of phleichrome

- A. Established UV–mutagenesis and screening method of *C. phlei*
- B. Optimized culture conditions of phleichrome–overproduced mutants
- C. Acquisition of recombinant strain and design of recombinant vector for regulation of expression related to biosynthesis of perylenequinone
- D. Molecular breeding through regulation of gene expression related to perylenequinone of *C. phlei*

#### **4. Synthesis of inducers and establishment of fermentation condition for production of phleichrome**

- A. Determination of phleichrome production by growth of *C. phlei*
- B. Establishment of isolation and purification methods of phleichrome
- C. Research of metabolomics of *C. phlei*

#### **5. Synthesis of diverse derivatives form phleichrome**

- A. Semi–synthesis of Hypocrellin B
- B. Synthesis of aminated derivative of phleichrome

#### **6. Establishment of culture condition using agricultural waste**

- A. Search for agricultural products suitable for culture of *C. phlei*
- B. Characterization of *C. phlei* culture using agricultural crop

#### **7. Analysis of biological functions of phleichrome**

- A. Toxic test of *C. phlei* culture filtrate
- B. Establishment of ROS generation test method for determination of ROS activity of phleichrome

### **IV. Results of Research and Development**

#### **1. Acquisition of PKS gene related phleichrome production**

We set up an ordered library of genomic DNA of *C. phlei* for retrieval of genes related to phleichrome biosynthesis; we cloned PKS genes from genomic DNA using degenerate primers for the conserved domains and obtaining the full sequences of several PKS genes from three subgroups of fungal polyketide



synthase; we analyzed the structures and evolutionary relationship of these genes with PKS from other filamentous fungi. Finally, we confirmed correlation for gene expression related to the production of phleichrome

## **2. Development of a method for titering of phleichrome production**

We have developed screening method for analysis of production of phleichrome using solid media. Also we have established TLC method for analysis of production of phleichrome using small amount of mycelia.

## **3. Improve the strain phleichrome for the mass production of phleichrome**

We have established UV-mutagenesis method using survival test of *C. phlei* and acquired several phleichrome-overproduced mutants. Cultured conditions of mutants has been optimized. We have designed expression vector for genes related to biosynthesis of phleichrome and acquired recombinant strains.

## **4. Synthesis of inducers and establishment of fermentation condition for production of phleichrome**

The isolation and purification methods of phleichrome from the cultured biomass of *Cladosporium phlei* were developed. These methods include the pH adjustment of biomass extract for elimination of unnecessary metabolites, and simple silica gel chromatography. The methods are efficient and cost-effective, considering the isolation steps for phleichrome, its purity, and the adequacy for scale-up purification in grams.

For the maximum production of phleichrome from the culture of *Cladosporium phlei*, the diketopiperazine derivatives known as inducers in phleichrome production were prepared, and their activity was evaluated. Our results demonstrated that two inducers showed notable increase in phleichrome production by 10 times more than in control case. The two compounds are 3-benzyl-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione and 3-isobutyl-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione.

We have confirmed the production of phleichrome for two synthetic inducers based on leucine and phenylalanine on two strains (wild type, M35= hyper-

secretion mutant on nutrient-rich medium) and in different culture conditions.

## 5. Synthesis of diverse derivatives form phleichrome

On the basis of our successful production system, i.e. the maximum production of phleichrome by application of inducing agents and the efficient purification protocol, we extended our research scope to semi-synthesize diverse perylenequinone derivatives which could be prepared from the phleichrome as a starting material. First target material, hypocrellin B, an raw material for the further development of photosensitizers in photodynamic therapy, was prepared via our synthetic steps. The second ones are aminated phleichrome derivatives, which have shown the superior photophysical and photochemical properties, have been prepared efficiently in one or two reaction steps, and their photo-properties would be evaluated in the near future.

## 6. Establishment of culture condition using agricultural waste

We have screened various agricultural products for mass production of *C. phlei* and established culture conditions of *C. phlei* using selected crops.

## 7. Analysis of biological functions of phleichrome

After harvesting the culture filtrate of *C. phlei*, we performed the toxic test. We also tried the ROS generation test using HPLC purified phleichrome.

## V. Application of Developed Techniques

- Development of a method for titring phleichrome production
- Acquirement of phleichrome-overproduced mutants using molecular breeding and establishment of culture conditions
- Screening of culture condition using agricultural wastes and application to cost-effective mass production of
- Establishment of isolation and purification methods of phleichrom and development of synthesis method of various derivatives from phleichrome
- Industrialization and commercialization of phleichrome

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	16
Part 1. Objective of Research and Development .....	16
Part 2. Importances and Requirements of Research and Development .....	16
1. The technical view .....	16
2. The economical and industrial view .....	17
3. The social and cultural view .....	18
Part 3. Range of Research and Development .....	18
Chapter 2. Present Status of the Technical Development .....	20
Part 1. Satus of domestic technology development .....	20
Part 2. Status of global technology development .....	20
1. U.S.A and Canada .....	20
2. China .....	21
3. Japan .....	22
Chapter 3 Materials, Methods and Results .....	23
Part 1. Introduction .....	23
Part 2. Materials and Methods .....	24
Part 3. Results .....	27
1. Acquirement of PKS gene related phleichrome production .....	27
A. Genomic library of <i>C. phlei</i> .....	27
B. Established rapid screening method of genomic library .....	31

C. Acquirement of genes related to biosynthesis of phleichrome .....	32
D. Characterization of PKS genes .....	36
2. Development of a method for titering of phleichrome production .....	51
A. Thin layer chromatography using agar blocks of solid media .....	51
B. Quantitative Analysis using spectrophotometer machine .....	51
3. Improve the strain phleichrome for the mass production of phleichrome ..	54
A. Established UV–mutagenesis and screening method of <i>C. phlei</i> .....	54
B. Optimized culture conditions of phleichrome–overproduced mutants .....	56
C. Acquirement of recombinant strain and design of recombinant vector for regulation of expression related to biosynthesis of perylenequinone .....	57
D. Molecular breeding through regulation of gene expression related to perylenequinone of <i>C. phlei</i> .....	60
4. Synthesis of inducers and establishment of fermentation condition for production of phleichrome .....	62
A. Determination of phleichrome production by growth of <i>C. phlei</i> .....	62
B. Establishment of isolation and purification methods of phleichrome .....	66
C. Research of metabolomics of <i>C. phlei</i> .....	73
5. Synthesis of diverse derivatives form phleichrome .....	89
A. Semi–synthesis of Hypocrellin B .....	89
B. Synthesis of aminated derivative of phleichrome .....	95
6. Establishment of culture condition using agricultural waste .....	99
A. Search for agricultural products suitable for culture of <i>C. phlei</i> .....	99
B. Characterization of <i>C. phlei</i> culture using agricultural crop .....	99
7. Analysis of biological functions of phleichrome .....	105

A. Toxic test of <i>C. phlei</i> culture filtrate .....	105
B. Establishment of ROS generation test method for determination of ROS activity of phleichrome .....	105
Part 4. Discussion .....	111
Chapter 4. Achievements and Contributions of Research and Development ...	113
Chapter 5. Products and Application of Research and Development .....	116
Part 1. Products of Research and Development .....	116
Part 2. Application of Research and Development .....	122
Chapter 6. International Scientific and Technical Reference materials .....	125
Part 1. Confirmation of ROS activity using NBT reduction .....	125
Part 2. Synthesis of perylenequinones by chemical substitution .....	125
Part 3. Analysis of structure and chemical character of inducers of phleichrome	125
Part 4. EfPKS1 gene related with biosynthesis of elsinochrome .....	126
Chapter 7. Present Status of the facilities and equipments .....	127
Chapter 8. References .....	128

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	16
제 1 절 연구 개발의 목적 .....	16
제 2 절 연구 개발의 중요성 및 연구개발의 필요성 .....	16
1. 과학적·기술적 측면 .....	16
2. 경제·산업적 측면 .....	17
3. 사회·문화적 측면 .....	18
제 3 절 연구범위 .....	18
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	20
제 1 절 국내 기술개발 현황 .....	20
제 2 절 해외 기술개발 현황 .....	20
1. 미국과 캐나다 .....	20
2. 중국 .....	21
3. 일본 .....	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	23
제 1 절 서론 .....	23
제 2 절 연구범위 및 연구수행 방법 .....	24
제 3 절 연구개발 결과 .....	27
1. Phleichrome 생산에 관여하는 유전자 확보 .....	27
가. <i>C. phlei</i> 의 genomic library 제작 .....	27
나. Genomic library의 rapid screening 방법 구축 .....	31
다. <i>C. phlei</i> 의 phleichrome 생합성 관련 유전자의 확보 .....	32
라. 관련 유전자 특성화 실시 .....	36
2. Phleichrome 생산에 대한 빠른 역가검증법 개발 .....	51

가. 고체배지의 agar block을 이용한 TLC 전개 .....	51
나. 분석기기를 활용한 정량분석 방법 .....	51
3. Phleichrome 대량생산을 위한 균주 육종 .....	54
가. <i>C. phlei</i> 의 UV-mutagenesis 실시 및 screening 방법 구축 .....	54
나. Phleichrome 과발현 돌연변이체의 배양조건 최적화 .....	56
다. Perylenequinone 합성 관련 유전자의 발현 조절을 위한 vector설계 및 재조합 균주 확보.....	57
라. <i>C. phlei</i> 의 perylenequinone 관련 유전자 발현 조절에 의한 분자 육종 .....	60
4. Phleichrome생산을 위한 발효조건 확립 및 물질 특성화 및 유도체 개발 .....	62
가. <i>C. phlei</i> 성장에 따른 phleichrome의 발현 양 결정 .....	62
나. Phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법 구축 .....	66
다. <i>C. phlei</i> 대사체학 연구 .....	73
5. Phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체의 합성 .....	89
가. Hypocrellin B의 반합성 .....	89
나. Phleichrome의 aminated 유도체의 합성.....	95
6. 농업폐기물을 활용한 배양조건 확립 .....	99
가. <i>C. phlei</i> 가 배양가능한 농작물 탐색 .....	99
나. 농작물을 첨가한 배지에서의 균주 특성 탐색 .....	99
7. <i>C. phlei</i> 의 phleichrome 생산과정 중 독성생성 여부 및 효능조사 .....	105
가. <i>C. phlei</i> 성장과정별로 배양액을 회수하여 세균을 이용한 성장 제한 실험 실행	105
나. Phleichrome의 ROS 분석 표준화 조건 확립 및 활성검정.....	105
제 4 절 고찰 .....	111

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	113
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	116
제 1 절	연구개발 성과 .....	116
제 2 절	성과 활용 계획 .....	122
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	125
제 1 절	NBT reduction에 따른 ROS 활성 검증 .....	125
제 2 절	Perylenequinone 계열간의 구조 변이 및 치환 합성 .....	125
제 3 절	Phleichrome 유도물질의 화학적 특성 및 구조분석 .....	125
제 4 절	Elsinochrome 생합성을 encoding 하는 EfPKS1 유전자 .....	126
제 7 장	연구시설 · 장비 현황 .....	127
제 8 장	참고문헌 .....	128



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

사상성 진균의 대사물질인 색소체는 농·수·의·약학 뿐 아니라 다양한 산업적 활용도를 가지고 있다. 농작물을 비롯한 다양한 식물체를 기주로 하는 사상성 진균 *Cladosporium phlei*에서 생산하는 phleochrome은 중요한 식물 병원성 물질이지만, 산업적으로는 광에너지에 의해 활성산소를 배출하는 광감각제일 뿐 아니라, 다른 광감각제들의 주요전구물질로 최근 알려졌다. 광감각제는 각종 암 및 여러 난치성 질병의 새로운 치료법인 광역동치료(PDT)에서 빼놓을 수 없는 중요한 소재이다. 그러나 현재 사용되는 hypocrellin B와 같은 광감각제는 *Hypocrella bambusae*라는 희귀곰팡이에서 극히 제한적으로 생산되고, 사용상 여러 문제점이 드러나 그 유도체개발에 매진하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 hypocrellin B 합성의 주요 전구물질인 phleochrome 소재의 실용화를 위하여 생합성과정을 분자수준에서 이해하고, 이를 바탕으로 전통적인 방법 뿐 아니라, 유전자를 이용하는 다양한 균주육종을 통해 phleochrome의 대량생산을 위한 균주를 제조하고, 농작물 폐기물을 활용한 유용물질 생산을 위한 최적 배양 조건을 확립하고자한다.

## 제 2 절 연구 개발의 중요성 및 연구개발의 필요성

### 1. 과학적·기술적 측면

사상성 식물병원진균인 *C. phlei*의 기초연구는 매우 미진하다. 일본의 경우 홋카이도 대학을 중심으로 2005년에 *C. phlei*의 연구 결과를 발표 하였지만 아직 후속 연구에 대한 결과가 보고되지는 않고 있는 실정이다. 하지만 본 연구진이 개발 보고한 *C. phlei*의 형질전환방법 등 기초적인 분자생물학적인 기술과 방법 등을 활용하여, *C. phlei*의 색소체 생합성에 관여하는 유전자를 규명하고, 전통적인 방법과 함께 새롭게 확보된 유전자를 활용하는 “forward 및 reverse genetics”에 근거한 균주 육종, 그리고 제작된 균주의 최적 배양을 통한 유용물질의 생산은 기초에서 응용에 이르는 폭 넓은 학문 분야를 아우르기 때문에 유용물질의 생산을 위한 미생물 활용 분야에서 매우 중요한 원천 기술을 확보하리

라 기대한다.

Bio- 측면에서 고찰할 때, 현재 유일하게 사용되고 있는 광에너지요법 치료제 Photofrin II은 매우 긴 체내 잔류 기간(4-6주), 600-950 nm에서 빛의 흡수가 적어 그 약효가 현저히 작게 나타나고, Photofrin II 자체가 단일물질이 아니어서 제조 및 정제가 다소 어려운 점 등의 단점이 있다. 본 연구진이 제안하는 새로운 개념의 광감각제, perylenequinoid 계열 화합물은 Photofrin II의 단점을 보완할 수 있을 뿐만 아니라 단일 분자로 효율적인 합성과 유도체 생산이 이루어질 수 있다. 따라서 본 연구의 성공 결과 수반되는 핵심약리물질의 안정적 대량공급은 신물질의 합성 및 기능 평가 등의 측면에서 많은 파급효과를 거둘 수 있다. 특히 2차 대사산물 유래의 농·의약품 개발에 전형을 제시함으로써 의약품 산업에 활용하고 대사산물 유도체 생산 원천 기술 개발로 의약활성을 갖는 대사물질의 탐색과 생산에 관련된 기초 자료로 활용되어 추후 유전체 및 대사경로 변형의 기술을 병행하여 신의약품의 개발 모델이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 2. 경제·산업적 측면

Phleichrome과 같이 유용한 2차 대사산물의 생산을 난배양성 균주 *C. phlei*로부터 대량 생산이 가능하게 되면 화학적 합성의 방법보다 환경 친화적이고 제조원가를 크게 낮출 수 있는 장점이 있으므로 진균 배양 기술을 이용한 2차 대사산물의 생산 시도는 경제적으로도 효과가 큰 기술로 평가된다. 또한 국내의 발효기술은 세계적으로 매우 높은 기술 수준에 있으므로 본 연구를 통해 이차대사 산물의 대량 생산 조건이 확립되면 대용량의 발효조에 적용하여 대량생산 및 분리가 가능하게 되므로 관련 의약품 개발 및 분리정제분야의 국내외 산업체에 미치는 파급 효과가 클 것으로 판단된다.

의약품 시장에서 항생제, 항암제는 최대 시장을 형성하고 있어 기존의 의약품보다 활성이 높고 안전한 새로운 종류의 의약품을 얻으려는 노력이 계속되고 있으며 이러한 최근 동향에 맞추어 항암치료에서 광역학치료법이 중요하게 대두되고 있을 뿐만 아니라 생리활성 분야에 확대 적용 (항암 효과뿐만 아니라, 항바이러스, 항 HIV, PKC 저해효과, 피부의 제모 효과 및 피부홍반제거 여부, 말초혈관질환 치료 효과 등 다양한 분야로의 적용) 가능성이 검토되고 있는 바, 우수한 선도 물질을 성공적으로 확보하는 경우 그 경제적 가치가 매우 크다고 판단된다.

새로운 농업 폐기물 재사용 기술을 개발하는 계기가 마련될 것이며 상품화되지 못하는 폐기 농작물을 phleichrome 소재의 실용화 단계에서 생산량을 증대할 수 있는 재료로 사용 한다면 농가의 부수익을 창출할 수 있을 것이다. 나아가 소재 산업화 과정에서의 비용을 크게 절감할 수 있을 것으로 사료된다.

### 3. 교육적·문화적 측면

본 연구는 분자생물학을 이용한 최적의 phleichrome 생산 균주의 개발 분야, 균체로부터 phleichrome의 분리 및 동정 등의 천연물 화학 분야와 이 발효 최적화를 이루는 대사공학 분야가 상호 보완적으로 융합되어지는 성격을 가지고 있어 다학제간의 연구 경험과 정보를 습득한 우수인력을 양성할 수 있다.

## 제 3 절 연구범위

### 1. Phleichrome 생산에 관여하는 유전자 확보

- 가. *C. phlei*의 genomic library 제작
- 나. Genomic library의 rapid screening 방법 구축
- 다. *C. phlei*의 phleichrome 생합성 관련 유전자의 확보
- 라. 관련 유전자 특성화 실시

### 2. Phleichrome생산에 대한 빠른 역가 검증법 개발

- 가. phleichrome의 효율적인 역가 검증법 구축

### 3. Phleichrome 대량생산을 위한 균주 육종

- 가. *C. phlei*의 UV-mutagenesis 실시 및 screening 방법 구축
- 나. 우수 형질의 돌연변이체의 확보
- 다. Phleichrome 과발현 돌연변이체의 배양조건 최적화
- 라. Perylenequinone합성 관련 유전자의 발현 조절을 위한 vector설계
- 마. 재조합 균주의 제조

#### 4. Phleichrome생산을 위한 발효조건 확립 및 물질 특성화 및 유도체 개발

가. *C. phlei* 생장에 따른 phleichrome의 발현 양 결정

나. phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법 구축

다. *C. phlei* 대사체학 연구

#### 5. 농업폐기물을 활용한 배양조건 확립

가. Phleichrome 분비율을 증가시키는 농작물 탐색

#### 6. *C. phlei*의 phleichrome 생산과정 중 독성생성 여부 및 효능조사

가. *C. phlei* 배양시간별로 배양액을 회수하여 세균을 이용한 성장 제한 실험 실행

나. Phleichrome의 ROS 분석 표준화 조건 확립 및 활성검정

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 기술개발 현황

국내 연구에서는 본 연구진을 중심으로 하여 난배양성 사상성 진균인 *Cladosporium phlei*의 대량 배양조건을 확립하였고, 이를 바탕으로 1차 접종원이 될 진균의 cell bank 생성에 대한 방법을 제시하고, 나아가 배양된 *C. phlei*로부터 천연 perylenequinone 화합물인 phleichrome의 존재를 확인하고, 정제법을 제시하였다 [1]. 또한 최근 연구에 의해 *C. phlei*의 형질전환 방법이 개발되어 *C. phlei*로의 유전자 조작을 통한 분자 육종 기술이 가능하게 되었다 [2]. 더욱이 본 연구진은 그 동안 꾸준히 화학 합성팀과의 준비과정을 거쳐 co-culture를 통해서만 생산된 "inducer"를 대량 합성하여 화학적으로 합성된 inducer에 대한 phleichrome 생산 유도를 검증하는 긍정적인 결과를 확보하게 되었다. 그러나 본 연구를 제외한 국내에서의 광감각제 개발 연구는 그리 활성화 되지 못하고 있는 것으로 판단되며 관련 연구에 대한 정보를 얻기가 쉽지 않다. 본 연구진의 노력 결과 연구가 극히 제한된 *H. bambusae* 대신 *C. phlei*로부터 phleichrome의 생산 및 활용에 대한 가능성과 검증 결과들이 제시되었고 지속적인 응용에 이르기까지 더욱 많은 연구가 기대된다.

### 제 2 절 국외 기술개발 현황

주로 미국과 중국에서 광에너지 치료 요법제의 개발을 목적으로 perylenequinone 계열의 다양한 물질, 즉 hypocrellin, phleichrome, calphostin 등의 천연 대사물질의 구조를 기본 구조로 하여 다양한 구조적 변화를 도입한 유도체가 합성되고 있다.

#### 1. 미국과 캐나다

미국과 캐나다를 중심으로 수행되고 있는 연구에서는 핵심구조인 perylenequinone을 전 과정 화학합성 (total synthesis)으로 생산하는 연구를 진행하고 있으며, 이 연구를 통하여 perylenequinone 골격 구조를 보다 효율적으로 합성할 수 있는 합성법의 개발, 그리고 이 구조를 바탕으로 다양하게 구조적으로 변형된 유도체의 합성이 시도되고 있다. 그러나 광활성을 가지는 최종 유도체까지 그 합성 단계가 매우 길고, 이 전합성 과정 중에서

ortho-naphthoquinone 혹은 naphthalene 유도체의 이중화 반응 (dimerization reaction)을 통한 perylenequinone 구조의 합성은 그 반응의 까다로움으로 인하여 상당한 합성 노력이 필요하다. 또한 이 반응을 통하여 perylenequinone 구조는 카이랄 축 (chiral axis)을 가지게 되어 결과적으로 이성질체의 혼합물 (atropdiastereomer) 이 형성되며 이의 선택적 조절이 용이하지 않아 이에 대한 연구가 집중되고 있으나 뚜렷한 결과는 아직 보고되어 있지 않다. 따라서 주 연구 방향은 perylenequinone의 전합성이 반응단계가 많고 입체화학을 고려해야 하는 등의 합성측면에서의 문제점을 개선하고, 이 화합물로부터 광감각제로서의 우수한 특성을 높이기 위한 다양한 유도체의 합성 및 개발이 시도되고 있다. 또한 최근에는 간단한 화학적 반응을 통하여 핵심구조인 perylenequinone 계열간의 구조 변이 및 치환 합성이 가능하게 되어 phleichrome이 다른 perylenequinone 계열 화합물보다 효율적인 전구물질임을 확인하였고 (특허; US 7,816,563 B1), 따라서 대규모 화학적 유도체 생산의 가능성을 제시함으로써 phleichrome에 대한 폭 넓은 활용성을 토대로 그 중요성이 더욱 높아지고 있다.

## 2. 중국

중국을 중심으로 한 연구에서는 주로 천연에서 생산되는 천연 perylenequinone 화합물들로부터 구조적 변형을 유도한 다양한 유도체들이 합성되고 있으며, 이들 화합물들에 대한 광생물학적 (photobiologic) 특성을 측정하여 구조-활성간의 상관관계의 규명 분야에 치중하고 있다 [3]. 이 중 중국의 특정지역에서 자생하는 곰팡이 (*Hypocrella bambusae*)로부터 추출 정제된 Hypocrellin B는 광감각제로서 매우 우수한 특성을 보이는 물질로서 그 항암효과뿐만 아니라 HIV를 포함한 항바이러스 활성을 보이며, 세포 분화 및 생존에 필수적인 효소인 protein kinase C에 대한 활성을 나타내어 관련 분야의 매우 유망한 의약품 후보 물질로 많은 과학자들의 주목을 받고 있다. 그러나 이 물질도 광에너지 요법에 사용되는 빛의 에너지영역 (600-950 nm)에서 빛의 흡수가 적어 직접 적용 할 만큼 광활성 정도가 높지 않고, 또한 생리적 조건하에서 친수성 (hydrophilicity) 이 낮은 단점을 가진다. 따라서 hypocrellin B의 광감각제로서의 우수한 장점을 유지 혹은 향상시키면서 단점을 보완할 수 있는 다양한 구조의 hypocrellin B 유도체를 hypocrellin B 자체로부터 합성하는 노력이 계속되고 있으며, hypocrellin B의 특정 탄소 위치에 sulfonation, amination, halogenation, metal ion complex 형성 반응을 통하여 다양한 새로운 유도체들 개발 중이다. 현재는 aminated 계열의 화합물들이 집중적으로 합성되고 있다. 이와 같은 이유로 인하여 원료물질로 사용되는 hypocrellin B의 수요가 크게 증가하고 있으나 언급한 바와 같이 이 물질은 중국의 제한된 지역에서 제한된 계절에 매우 제한적인 양이 생

산되고 있을 뿐이며, 따라서 그 가격도 매우 높고, 중국내의 수요 증가에 따라서 그 판매도 매우 제한적으로 이루어지고 있다. 그 외 perylenequinone 계열 화합물들 혹은 이와 유사한 구조 화합물인 hypericine 등으로부터 보다 우수한 성질을 가지는 광감각제를 개발하려는 노력이 병행되고 있다 [4-5].

### 3. 일본

일본을 중심으로 한 연구에서는 식물에 병 [purple eyespot in timothy (*Phleum pratense*)]을 일으키는 곰팡이인 *Cladosporium phlei*의 식물병학 및 균학적 연구가 이루어졌다. 특히 *C. phlei*의 주된 pigment인 phleichrome이 perylenequinone에 속하는 화합물이고 이 물질이 식물세포의 피사를 일으키는 주된 원인물질임 중의 하나임을 증명하였으며, 배양학적인 방법을 통해 특히 배양중인 *C. phlei*에 다른 곰팡이를 co-culture함으로 *C. phlei*로 하여금 더 많은 phleichrome의 생산을 유도하는 방법 등을 연구하고 있으며, 최근 co-culture관계에 있는 곰팡이에서 분비하는 inducer로 작용하는 물질의 화학적 특성 및 구조를 규명하기도 하였다[6-7].

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 서론

사상성 진균의 대사물질인 색소체는 농·수·의·약학 뿐 아니라 다양한 산업적 활용도를 가지고 있다. 농작물을 비롯한 다양한 식물체를 기주로 하는 사상성 진균 *Cladosporium phlei*에서 생산하는 phleichrome은 중요한 식물 병원성 물질이지만, 산업적으로는 광에너지에 의해 활성산소를 배출하는 광감각제일 뿐 아니라, 다른 광감각제들의 주요전구물질로 최근 알려졌다 [7-8]. 광감각제는 각종 암 및 여러 난치성 질병의 새로운 치료법인 광역동치료(PDT)에서 빼놓을 수 없는 중요한 소재이다. 그러나 현재 사용되는 hypocrellin B와 같은 광감각제는 *Hypocrella bambusae*라는 희귀곰팡이에서 극히 제한적으로 생산되고, 사용상 여러 문제점이 드러나 그 유도체개발에 매진하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 hypocrellin B 합성의 주요 전구물질인 phleichrome 소재의 실용화를 위하여 생합성과정을 분자수준에서 이해하고, 이를 바탕으로 전통적인 방법 뿐 아니라, 유전자를 이용하는 다양한 균주육종을 통해 phleichrome의 대량생산을 위한 균주를 제조하고, 농작물 폐기물을 활용한 유용물질 생산을 위한 최적 배양 조건을 확립하고자한다.

본 연구는 광감각제의 주요 전구물질인 phleichrome 소재의 실용화를 위해, phleichrome의 생합성에 대한 분자수준의 이해와 더불어, phleichrome의 대량생산을 위한 균주 육종 및 농가의 기주식물 폐기물을 활용한 배양 최적화의 내용으로 구성된다. 연구목표에 따른 연구내용을 요약하면 다음과 같다.

- Phleichrome은 진균의 주요 2차 대사물질인 perylenequinone에 속하는 색소체이다. 따라서 비교 유전체학 등을 통해 다른 곰팡이의 perylenequinone의 생합성관련 주요 유전자를 기준으로 *C. phlei*으로부터 phleichrome생산에 관여하는 유전자를 확보한다.
- Phleichrome생성량의 차이를 빠르게 screening하는 방법과, 소량의 균사 용매 추출액을 TLC 방법을 통해 분석 하는 표준화된 방법을 개발함으로써 phleichrome생산에 대한 빠른 역가검증과 함께 다양한 유도체를 개발한다.
- 전통적인 방법과 phleichrome생산에 관여하는 주요 유전자의 발현이 조절된 형질전환체를 통해 phleichrome생산을 향상시키는 분자유육종을 실시하여 신규 균주를 확보한다.
- Phleichrome을 이용하여 유기 합성이 아닌 반합성 과정 기술의 독창성과 산업성을 특허



로 보장받고, 산업가치가 높은 광감각제의 생산단가를 절감하고 경쟁력을 높여 국가의 부가가치를 높인다.

- phleichrome은 기주식물의 성분조건에서 생산이 잘 유도되는 것으로 알려져 있으므로 대사물질 생산량을 최적화하는 농작물을 조사하고 농가의 상품화하지 못한 농업폐기물을 활용하여 최적배양조건 및 최적배양조건에서 생산되는 물질들의 특성화를 확립한다.
- 확보한 대량생산균주와 대량생산기술을 이용하여 산업화를 추진한다.

본 연구는 *C. phlei*에서 phleichrome의 대량생산에 필요한 배양학적, 분자생물학적 균주를 개발하여 광역동치료제의 소재를 개발하고, 실용화 단계에서 농가의 상품화하지 못한 농업폐기물을 활용한 최적배양조건 및 최적배양조건을 확립하여 다음과 같은 성과를 기대한다.

- 비교적 연구가 이루어지지 않은 사상성진균 *C. phlei*의 대사체학 수준의 물질 생산 특성 규명과 유전체학 수준의 균주 육종기술이 확립될 수 있다.
- 자연계에 존재하는 배양이 어려운 종류의 미생물 배양조건을 확립하고 나아가 의약활성을 갖는 대사물질의 탐색과 생산에 관련된 기초 자료로 활용 가능하다.
- *C. phlei*는 기주특이성으로 인해 극히 성장조건이 제한되어 여타농작물에 악영향을 미치기 어려우므로 산업화 가능한 균주이며 신규 균주으로써 독창성과 경쟁력을 갖출 수 있다.
- 새로운 대사물질의 대량 확보는 이를 활용한 다양한 합성 및 응용연구를 제공하여 2차 대사산물 유래의 의약품 개발에 전형을 제시함으로써 대사산물 유도체 생산 원천 기술 개발에 따른 관련 분야의 학문적 그리고 산업적 우위를 점하리라 기대된다.
- 실용화단계에서 농가의 상품화하지 못한 농업폐기물을 활용하여 대사산물을 생산할 수 있으므로 대량생산과정의 비용절감과 농가의 부수익을 창출할 수 있다.

## 제 2 절 연구범위 및 연구수행 방법

### 1. Phleichrome 생산에 관여하는 유전자 확보

Phleichrome의 생합성에 관여하는 유전자를 확보하기 위하여 *C. phlei* genomic library를 제작하였으며, 보다 용이한 screening을 위하여 ordered library를 성공적으로 제작하였다. 다른 종들의 PKS 유전자를 참고하여 degenerated primer를 제작하였으며, 3차 screening을 통하여 4개의 관련 유전자를 확보하였다. 추가적으로 이들 각 유전자의 특성화 작업을 위해서 Northern blot analysis를 통해서 유전자 발현을 확인하였다.

## 2. Phleichrome생산에 대한 빠른 역가 검증법 개발

고체배양 plate에서 색소체인 phleichrome 생성량의 차이를 빠르게 screening하는 방법과 소량의 균사 용매 추출액을 TLC방법을 통해 분석하는 표준화된 방법을 개발하였다. 또한 spectrophotometer를 이용한 정량분석 방법을 구축하였다.

## 3. Phleichrome대량생산을 위한 균주 육종

Survival test를 통한 *C. phlei*의 UV-mutagenesis 표준화 조건을 확립하였다. 이를 통해서 phleichrome 2개의 과발현 돌연변이체를 확보하였으며, 이들 각각의 과발현 돌연변이체의 배양조건을 최적화하였다. 또한 확보된 phleichrome 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 조절하기 위한 vector를 설계하였으며, 이를 통해서 재조합 균주를 확보하였다.

## 4. Phleichrome생산을 위한 발효조건 확립 및 물질 특성화 및 유도체 개발

*C. phlei* 성장 곡선에 따른 phleichrome 생산성을 조사하여 최적의 조건을 확인하였다. 차후 phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법 방법을 구축하였으며, 정제된 phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체를 합성하였다. 또한 phleichrome 유도물질을 개발하여 *C. phlei*의 metabolites의 profile을 확보하였다.

## 5. Phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체의 합성

Phleichrome을 출발물질로 한 hypocrellin B의 반합성법을 개발하고자 하였다. 또한 phleichrome을 출발물질로 한 다양한 aminated perylenequinone 유도체를 합성하는 합성법을 구축하였다.

## 6. 농업폐기물을 활용한 배양조건 확립

농업폐기물을 활용하여 *C. phlei*의 대량생산이 가능한지를 확인하고자 하였다. 먼저 *C. phlei*의 기주 농작물을 탐색하고, 각 농작물들을 배지에 첨가하여 균주의 배양조건을 구축하였다.

## 7. *C. phlei*의 phleichrome 생산과정 중 독성생성 여부확인 및 효능 조사

*C. phlei* 균주의 성장과정별로 배양액을 회수한 후, 각가을 0.45 um filter로 filtering하여 농도별로 배지에 첨가하였다. 이렇게 제작된 배지를 이용하여 그람음성균과 그람양성균을

이용한 성장 제한실험을 진행하였으며 이를 통해서 *C. phlei*의 독성생성 여부를 확인하였다. 또한 phleochrome의 의학적 활용가능성을 조사하기 위하여 ROS 활성을 검증하였다.

## 제 3 절 연구개발 결과

### 1. Phleochrome 생산에 관여하는 유전자 확보

#### 가. *C. phlei*의 genomic library 제작

##### (1) Genomic library 제작

본 연구진은 선행연구에서 phleochrome과 같은 perylenequinone의 생합성에 관여하는 유전자 확보를 위하여 *C. phlei* genomic library를 제작하고자 하였다 [9-10]. High quality의 fosmid library 제작을 위하여 Epicentre biotechnology회사의 high copy *oriV* origin을 가지는 pCC1FOS vector (Figure 1)를 사용하였으며, *C. phlei* genomic DNA는 random sharing 방법을 통해서 약 40 kb 정도의 일정 크기로 잘라 사용하였다. 만들어진 library의 quality를 확인하기위해서 무작위로 선택된 50개의 fosmid clones의 DNA를 회수한 후에 *Eco72I* 제한효소를 처리하여, 약 30-50 kb 크기의 inserted DNA절편들이 삽입됨을 확인 할 수 있었다(결과미제시). 추가적으로 무작위로 선택된 10개의 fosmid clone의 fosmid DNA를 회수하여 inserted DNA 크기를 확인한 결과 각각의 크기가 다른 것을 확인할 수 있었다. 또한 *PstI* 제한효소를 처리함으로써 DNA 절편들이 다양한 패턴으로 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 2). 따라서 본 연구진에 의해 제작된 genomic library가 high quality임이 입증되었으며 그 활용도가 높을 것임을 예측할 수 있었다.

##### (2) Ordered library 제작

Genomic library를 활용한 유전자 screening 작업을 보다 용이하게 하기위하여 fosmid library DNA를 *E. coli*에 형질전환하여 형질전환체를 확보한 후, ordered library를 제작하고자 하였다. *C. phlei*의 전체 genome size를 99% 충족하기위해서 필요한 library clone은 약 4606개이다. 이는 아래의 공식에 따라 계산되었다 [11].

$$\frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

$N$  = 필요로 하는 clone의 수 (necessary number of recombinant)

$P$  = 원하는 확률 (desired probability)

$f$  = 삽입 DNA 절편의 전체 유전체 DNA에 대한 비

(fractional proportion of the genome in a single recombinant)

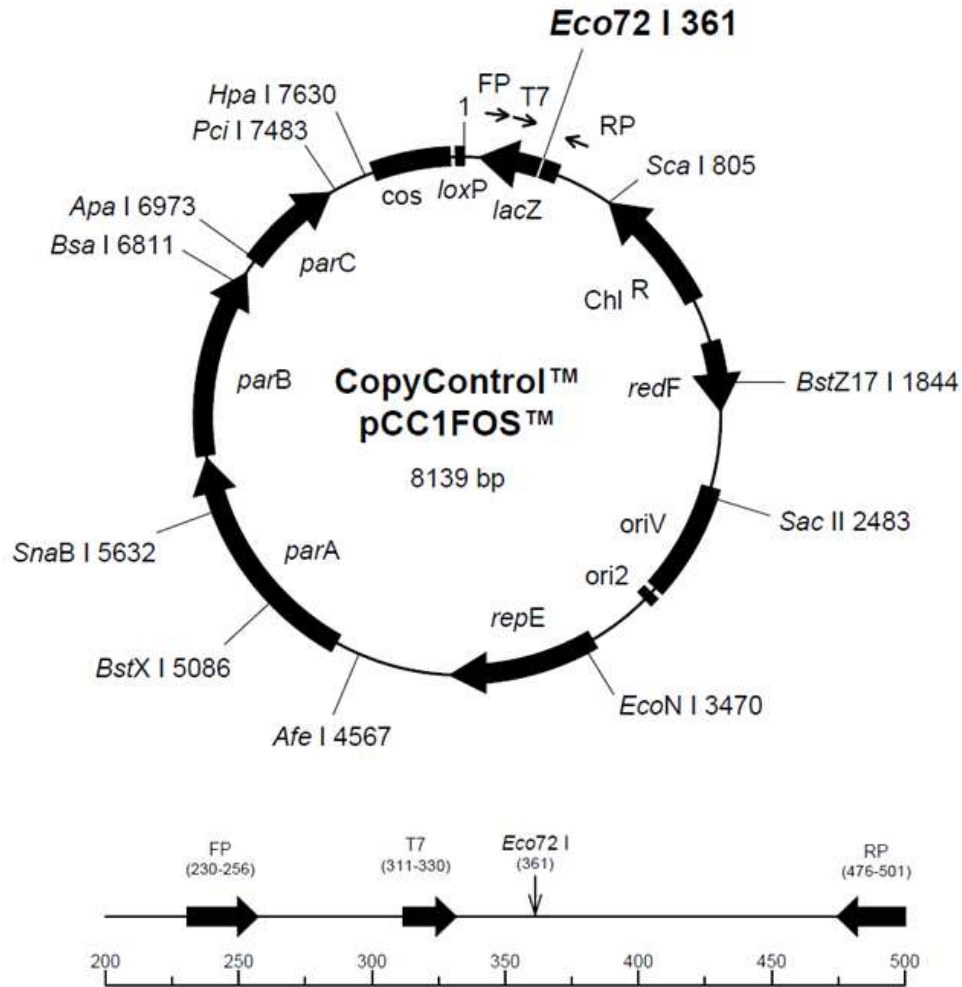
실제 적용시,

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-\frac{4.0 \times 10^4}{4.0 \times 10^8})} = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-0.001)}$$

$$= \frac{-4.60517}{-0.001} = 4605.17 \approx 4606$$

따라서 Genome size를 모르는 *C. phlei*의 genome size를 진균의 평균 크기인 40 Mb로 가정하였을 때, 전체 genome의 99%를 충족시키기 위한 clone의 수는 약 4606개이다.

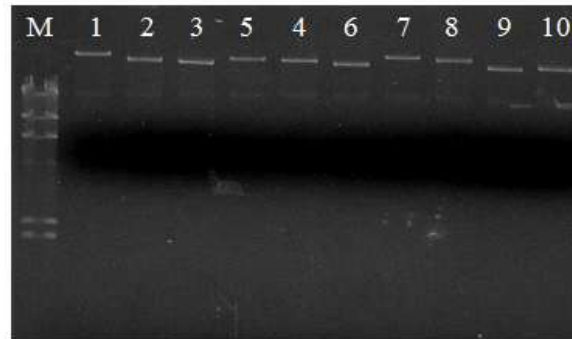
Ordered library를 제작하기 위해서 먼저 제작된 library를 chloramphenicol(34 ug/ml)이 첨가된 LB plate에  $5 \times 10^2$ 개의 colony가 나오게 여러 plate를 도말한 후, 각각의 single colony를 pick해서 96 well plate에 접종하였다. 위에서 계산한 clone의 개수보다 약 200개 많은 총 4800개의 single colony를 50장의 96well plate에 접종함으로써 성공적으로 odered library를 제작 완성하였다.



FP = pCC1™/pEpiFOS™ Forward Sequencing Primer 5' GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'  
 RP = pCC1™/pEpiFOS™ Reverse Sequencing Primer 5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'  
 T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Figure 1. pCC1FOS™ Vector Map.

**A**



**B**

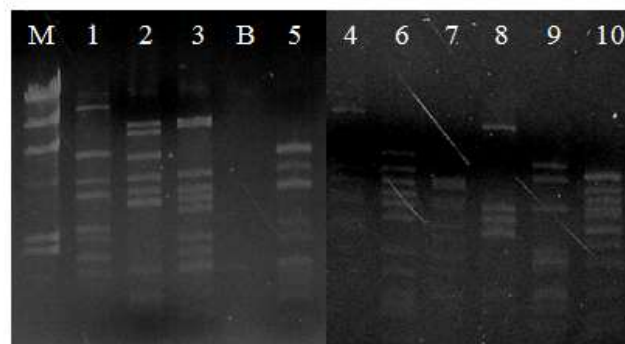


Figure 2. Quality check of *C. phlei* genomic library.

(A) Fosmid of randomly selective 10 fosmid clones. (B) Digested patterns using *Pst*I. M; marker, 1–10; fosmid clones, B; blank.

### 나. Genomic library의 rapid screening 방법 구축

Ordered library를 활용하여 보다 빠르게 유전자 screening을 하기 위한 rapid screening 방법을 구축하였다(Figure 3). 먼저 1차 screening 작업을 위하여 96 well plate 내의 96개 clones을 혼합하여 배양 후 fosmid DNA를 회수하였으며 50장 모두 동일한 방법으로 DNA를 준비하였다. 유전자 확보를 위하여 준비한 50개의 fosmid mixed DNA를 이용하여 PCR을 통해서 1차 screening을 하였으며, 이를 통해 후보유전자가 있다고 여겨지는 96 well plate를 다시 8개의 clones별로 혼합하여 배양 후 fosmid DNA를 회수하였으며 12 group의 fosmid DNA를 이용하여 PCR을 통해서 2차 screening 하였다. 마지막으로 후보유전자가 있다고 추정되는 group의 single clone 각각을 배양하여 8개의 fosmid DNA를 회수하였으며, 이를 이용한 PCR 방법과 Southern blot analysis 방법을 통하여 3차 screening을 수행하여 최종 clone을 확보하였다. 일반적인 library screening 방법과 비교하여 작업 수행에 걸리는 시간과 비용을 단축할 수 있었다.

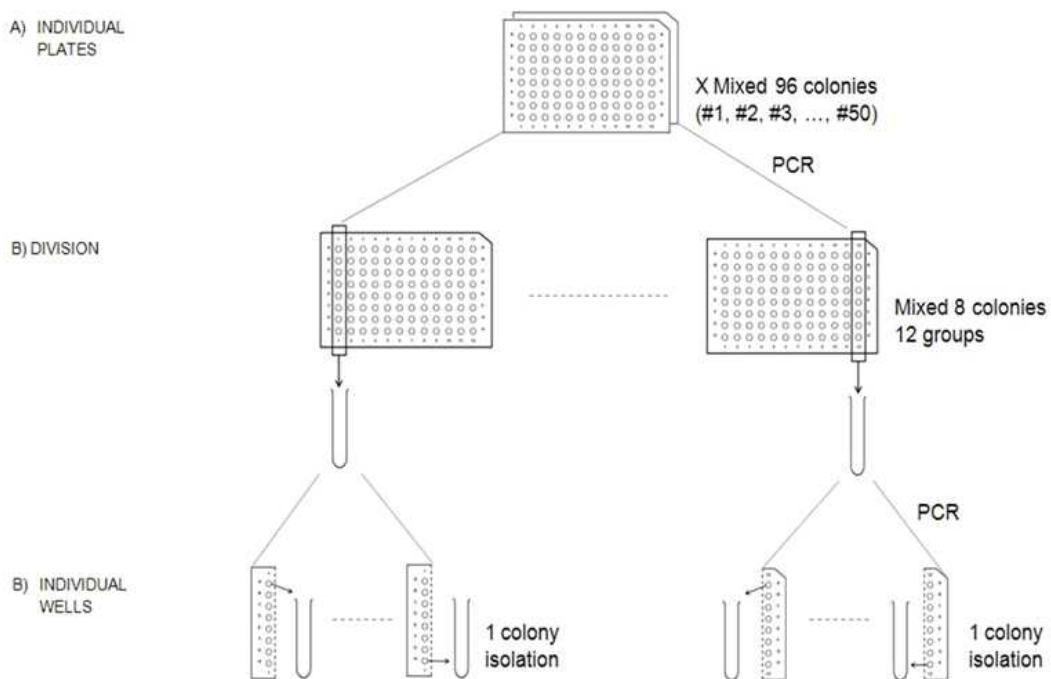


Figure 3. Strategy for screening of *C. phlei* genomic DNA library.



## 다. *C. phlei*의 phleichrome 생합성 관련 유전자의 확보

### (1) Library screening 방법에 의한 perylenequinone의 생합성 관련 유전자 확보

Perylenequinone과 같은 이차대사산물은 polyketide synthase (PKS)라는 유전자에 의해 생합성이 되는 것으로 보고되어져 있으며, 일반적으로 곰팡이의 PKS 유전자는 domain의 구성에 따라 크게 non-reducing (NR)과 reducing으로 나뉘며 reducing은 다시 partially reducing (PR), high reducing (HR)의 2가지 종류로 나뉜다 [9-10,12-14]. 본 연구진은 현재 연구하는 phleichrome도 마찬가지로 PKS 유전자에 의해 생합성 될 것이라고 판단하였다. 따라서 phleichrome 생합성 관련 유전자를 확보하기 위하여 우선 보고된 다른 종들의 PKS 유전자과 비교분석하여 conserved domain을 분석하였으며, 이를 참고로 하여 PKS 유전자의 기본 domain인 KS(ketosynthase), AT(acyl transferase), ACP(acyl carrier protein) 중에서 KS와 AT domain 내에서 degenerated primer pairs를 제작하였다(Figure 4, Table 1) [15-18]. 제작된 degenerated primer pairs를 사용하여 *C. phlei* 진균의 genomic DNA로부터 partial PKS 유전자 파편 30개를 확보하였다. 이를 cloning하여 sequencing 분석한 결과, 서로 다른 NR PKS, PR PKS, HR PKS 유전자 파편들을 획득하였다 (Table 2). 이렇게 확보한 partial PKS 유전자로부터 제작한 specific primer pair를 이용하여 전 실험단계에서 준비한 50개의 96 well mixed fosmid DNA를 대상으로 하여 각각의 primer pairs로 PCR을 수행하였다. 절편을 포함하는 plate를 추적한 후, rapid screening 방법으로 library를 screening하여 최종 single fosmid clone을 확보하였다 [19].

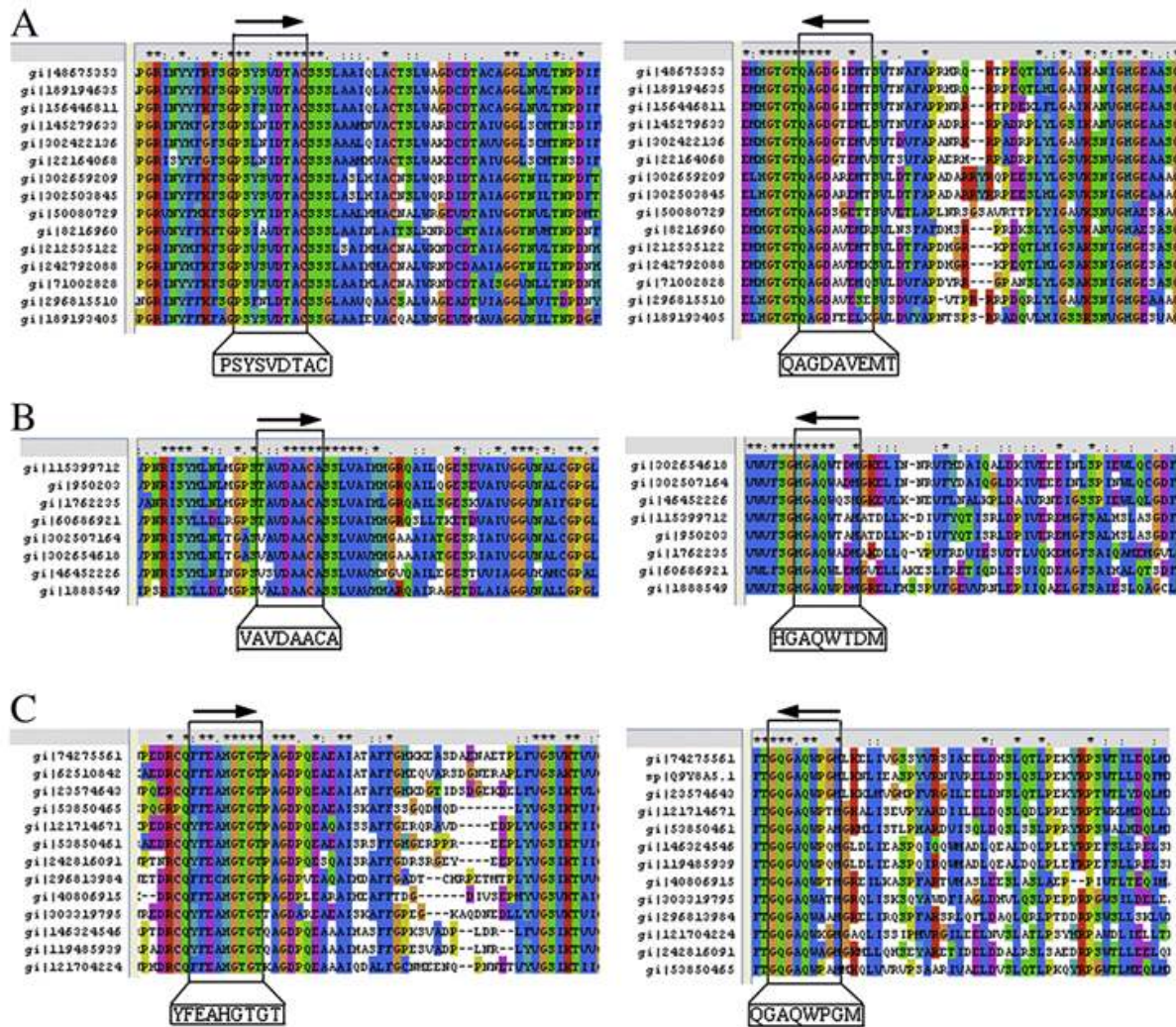


Figure 4. Multiple sequence alignment of the KS and AT domains of NR- (A), PR- (B), and HR-PKSs (C).

Conserved regions are boxed and amino acid residues used to design novel primers are represented at the bottom line. Arrows on the top indicate primer directions. The accession numbers for all sequences are given at left. *Penicillium citrinum* MlcA(gi|23574643); *Monascus pilosus* MkA (gi|74275561); *Aspergillus terreus* LovB (gi|62510842); *Aspergillus clavatus* NRRL 1 PKS1 (gi|121714671); *Magnaporthe oryzae* 70-15 syn6(gi|53850461); *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 PKS1 (gi|242816091); *M. oryzae* 70-15 syn7 (gi|53850465); *Coccidioides posadasii* C735 delta SOWgp (gi|303319795);

*Arthroderma otae* CBS 113480 PKS1 (gi|296813984); *Gibberella moniliformis* PKS10 (gi|40806915); *A. clavatus* NRRL 1 PKS2 (gi|121704224); *Aspergillus fumigatus* Af293 PKS1 (gi|146324546); *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (gi|119485939); *Arthroderma benhamiae* CBS 112371 PKS1 (gi|302503845); *Gibberella fujikuroi* pks4 (gi|8216960); *T. stipitatus* ATCC 10500 PKS2 (gi|242792088); *Penicillium marneffeii* ATCC 18224 (gi|212535122); *A. fumigatus* Af293 PKS2 (gi|71002828); *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP PKS1 (gi|189193405); *A. otae* CBS 113480 PKS2 (gi|296815510); *Xylaria sp.* BCC 1067 PKS12 (gi|22164068); *Verticillium alboatrum* VaMs.102 (gi|302422136); *Trichophyton verrucosum* HKI 0517 PKS1 (gi|302659209); *Ophiostoma piceae* TOPA45 (gi|145279633); *Cercospora nicotianae* (gi|50080729); *P. tritici-repentis* Pt-1C-BFP PKS2 (gi|189194635); *Elsinoe fawcettii* PKS1 (gi|156446811); *Cochliobolus miyabeanus* PKS1 (gi|48675353); *Penicillium griseofulvum* pks2 (gi|1888549); *Aspergillus ochraceus* (gi|46452226); *T. verrucosum* HKI 0517 PKS2 (gi|302654618); *Glarea lozoyensis* pks2 (gi|60686921); *A. benhamiae* CBS 112371 PKS2 (gi|302507164); *A. terreus* pksM (gi|950203); *Aparasiticus* pksL2 (gi|1762235).

Table 1

Primers used in this study.

Primer	Orientation	Domain <sup>a</sup> specificity	Sequence	Reference
KAF1	Forward	KS	GARKSICAYGGIACIGGIAC	Amnuaykanjanasin et al. (2005)
KAF2	Forward	KS	GARGCICAYGCACITCIAC	"
KAR1	Reverse	AT	CCAYTGIGCICCRTGICIGARAA	"
KAR2	Reverse	AT	CCAYTGIGCICCYTGICIGTRAA	"
LC1	Forward	KS	GAYCCIMGITTYTYAAYATG	Bingle et al. (1999)
LC2	Reverse	KS	GTCCIGTICCRTGCATYTC	"
KS3	Forward	KS	TTYGAYGCIGCIITYTYAA	Nicholson et al. (2001)
KS4	Reverse	KS	RTGRTTIGGCATIGTIATICC	"
XKS1	Forward	KS	TTYGAYGCIBCIITYTYRA	Amnuaykanjanasin et al. (2005)
XKS2	Reverse	KS	CRTTIGYICCIYDAAICCAA	"
HR-F	Forward	KS	ACTTCGAGGCCACGGNAANGGNAC	This study
HR-R	Reverse	AT	ATCGCGGCCACTGNRCNCCGY	This study
PR-F	Forward	KS	CATCGCCGTCGACGNGCNTGYGC	This study
PR-R	Reverse	AT	CATGTCGGCCACTGNGCNCGTR	This study
NR-F1	Forward	KS	GGCACCGGCACCCARGCNGGNGA	This study
NR-R1	Reverse	AT	GAACTCCTCCAGGATGGGNTCNACYTG	This study
NR-F2	Forward	KS	CCCTCTACACCGTCGAYACNGCNTG	This study
NR-R2	Reverse	KS	TCATCTCGACGGCTCNCNCGCYTG	This study
Cpks1-F	Forward	KS	AGCTGATCTCGTGAGCATCG	This study
Cpks1-R	Reverse	KS	ATGGGTCGTCTTGCCCTTGAC	This study
Cpks2-F	Forward	KS	ATTTCGAGCGTGTATGGCGA	This study
Cpks2-R	Reverse	AT	CGGAGAAGACCAAGTCAAGC	This study
Cpks3-F	Forward	KS	TCCTGATTGACGCTGTCT	This study
Cpks3-R	Reverse	KS	ACATCAAACACACGAGGC	This study
Cpks4-F	Forward	KS	GCGATCCAGTTGAAGTTGCTGC	This study
Cpks4-R	Reverse	AT	ATCTTAGGGGGCGGACTGCTCT	This study

<sup>a</sup> KS and AT represent the domains of the  $\beta$ -ketoacyl synthase and acyltransferase, respectively.

Table 2

Summary of PCR amplifications.

Primer pair (Forward/Reverse)	No. <sup>a</sup> PCR clones	PKS type <sup>b</sup>
KAF1/KAR1	3	HR-PKS ( <i>Cpks4</i> ) <sup>c</sup>
KAF1/KAR2	2	HR-PKS ( <i>Cpks4</i> )
KAF2/KAR1	2	PR-PKS
KAF2/KAR2	2	PR-PKS
LC1/LC2	3	NR-PKS
KS3/KS4	3	HR-PKS ( <i>Cpks3</i> )
XKS1/XKS2	4	N.D.
HR-F/HR-R	2	HR-PKS ( <i>Cpks4</i> )
PR-F/PR-R	2	PR-PKS
NR-F1/NR-R1	3	NR-PKS
NR-F2/NR-R2	4	N.D.

N.D. No significant homology to known genes.

<sup>a</sup> Number of PCR amplicons of expected size that were cloned and sequenced.

<sup>b</sup> Type of PKS genes based on sequence homology.

<sup>c</sup> Indicates the specific HR-PKS gene out of two different HR-PKS genes.

## 라. 관련 유전자 특성화 실시

### (1) Full-length PKS 유전자 확보

본 연구에서는 앞선 library screening 방법을 통해서 획득한 4개의 full-length polyketide synthase (PKS) 유전자 각각의 염기서열을 조사하였으며, 4개의 다른 *C. phlei*의 PKS 생합성 유전자의 full-length 확보에 성공하였다. 각각의 유전자에 대해서 12,841 bp의 NR PKS, 11,239 bp의 PR PKS, 19,312 bp와 16,469 bp의 HR PKS 유전자 염기서열을 확보하였다. 이들 유전자의 예상되어지는 ORF 부분을 이용하여 NCBI blast search를 한 결과, *Cochliobolus sativus* (GenBank ID: HQ830033.1; 84% identity; E value 0), *Penicillium patulum* (GenBank ID: X55776.1; 72% identity; E value  $2e-139$ ), *A. clavatus* (GenBank ID: XM001274945.1; 68% identity, E value  $9e-46$ ), and *Thielavia terrestris* (GenBank ID: XM003649194.1; 79% identity, E value  $4e-42$ )의 fungal PKS 유전자들과 높은 유사성을 보이는 것을 확인하였다(Figure 5-8). 이들 유전자들을 차례대로 CpPKS1, CpPKS2, CpPKS3, CpPKS4라고 명명하였다.

### (2) 확보된 PKS 유전자의 ORF 분석

확보된 4개의 PKS 유전자의 ORF region을 분석하였다. ORF내에 존재하는 intron과 exon의 경우, CpPKS1, CpPKS2, CpPKS3, CpPKS4 유전자들과 blast search시 가장 높은 유사성을 보인 *Pyrenophora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Botryotinia* models 을 참고하였으며 분석 프로그램으로는 FGENESH eukaryotic gene prediction online software([http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs & subgroup=gfind](http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind))를 사용하였다. 이미 알려진 PKS 유전자를 토대로 각각의 frame을 분석하였으며, splicing signal 5' (GTRRGT) and 3' (YAG)의 존재를 확인하였다 [20]. 확보된 4개의 PKS 유전자내에 크기가 36-117 bp에 해당되는 intron이 존재할 것이라 생각되어진다 (Table 3). 차후 full-length의 amino acid를 이용하여 각각의 PKS 유전자가 가진 domain structure를 확인하였으며, 이를 통해서 각 유전자가 어떤 domain structure 특징을 갖는지를 확인하였다 (Figure 9). CpPKS1 유전자의 경우 C-terminal region에서 TE domain 앞쪽으로 두 개의 ACP domain을 갖으며, CpPKS3와 CpPKS4의 경우에는 DH, KR, ER domain과 같은 추가적인 reducing domain을 지니는데 이는 HR PKS 유전자의 특징 중 하나에 속한다.

### (3) 다른 종과의 PKS 유전자 염기서열 비교

*C. phlei* genomic library를 이용하여 얻은 4개의 PKS 유전자의 추정되는 amino acid sequence를 ClustalX를 이용하여 이미 알려진 다른 PKS 유전자의 amino acid sequence와 비교 분석해보았다 [21]. 다른 곰팡이 15개의 NR PKS, 8개의 PR PKS, 13개의 HR PKS를 포함한 총 39개의 amino acid sequence를 가지고 multiple alignment를 수행하였으며, 여기에 out-group으로 fatty acid synthase (FAS) 유전자를 추가하였다 [9]. Neighbor joining method를 이용하여 phylogenetical sequence alignment를 진행하였으며, PKS 유전자의 기본 domain 중에서 KS, AT domain 부분을 분석하였다 [21]. 결과적으로 우리는 곰팡이의 3가지 PKS 유형을 모두 가지고 있는 것으로 나타났으며, 특히 CpPKS1 유전자가 *E. fawcettii*로부터 생산되는 perylenequinone 계열에 속하는 elsinochrome의 생합성에 관여하는 PKS 유전자와 높은 유사성을 보았다 (Figure 10) [22]. 따라서 CpPKS1 유전자가 phleichrome의 생합성에 관여하는데 있어 중요한 역할을 할 것이라 예상하였다.

### (4) *C. phlei* genomic DNA상의 NR PKS 유전자의 Copy 수 확인

이미 이전에 보고된 바 있는 perylenequinone 관련 다수 논문을 통해, perylenequinone 물질의 생성에 직접적으로 연관되어지는 PKS 유전자가 nonreducing PKS 유전자 group인 것을 예상할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 PKS 생합성 유전자 중에서 *C. phlei*에서 phleichrome을 생성하는데 중요하게 관련되어질 것이라고 예상되어지는 nonreducing PKS 유전자의 copy 수를 확인하고자 Southern blot analysis를 수행하였다. 무작위로 고른 7개의 제한효소 (*Not* I, *Eco*R I, *Pst* I, *Hind*III, *Kpn* I, *Bam*H I, *Cla* I)을 사용하여 *C. phlei* genomic DNA를 자른 후, 여기에 확보된 nonreducing PKS 유전자인 CpPKS1 유전자의 약 600 bp 정도 되는 KS domain의 partial fragment를 probe 처리하여 hybridization을 수행하였다. 그 결과 모든 lane에서 오직 하나의 band 만을 관찰 할 수 있었으며 이를 통해서 *C. phlei* genomic DNA에 nonreducing PKS 유전자가 one copy임을 확인할 수 있었다(Figure 11). 따라서 *C. phlei*에 존재하는 nonreducing PKS 유전자가 이미 확보되어진 CpPKS1 유전자만 존재한다는 추정하에 이 유전자 발현에 대한 실험을 우선적으로 수행하고자 하였다.

### (5) CpPKS1 유전자의 Promoter region 분석

CpPKS1 유전자 발현 조절을 좀 더 이해하기 위해서 본 연구팀은 CpPKS1의 start codon의 1.2 kb upstream sequence를 분석하였으며, 다양한 transcriptional

regulator를 확인할 수 있었다 (Figure 12) [22]. ATG codon으로부터 308 nucleotides upstream에서 TATA box를 확인할 수 있었다. CpPKS1 유전자의 promoter region에서 multiple GATA consensus motifs와 nitrogen-induced AreA (Marzluf 1997) and the light-regulated WC1/WC2 (Linden and Macino 1997) transcriptional activators의 존재를 확인하였다. CpPKS1 promoter는 또한 1개의 ambient pH-regulated PacC-binding consensus motifs (GCCARG) (Espeso et al. 1997)와 multiple cAMP-inducible C/EBP-binding motifs (CCAAT or CAAT) (Rangan et al. 1996)을 갖는 것을 확인 하였다. 추가적으로 CpPKS1 promoter는 *Aspergillus nidulans*에서 이미 알려져 있는 conidial formation-related BrlA (MRAGGGR or YCCCTYK)와 AbaA transcriptional activator를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

## (6) 확보된 유전자들의 발현양상 조사

### (가) *C. phlei*의 total RNA 확보 조건 확립

본 연구에서는 1, 2 차년도에 확보된 perylenequinone 합성 관련 유전자의 발현을 확인하기 위해서 *C. phlei*의 total RNA를 확보하고자 하였다. Total RNA는 본 연구팀에서 주로 사용하는 방법인 phenol을 이용하여 추출하는 방법과 TRI reagent를 이용하여 추출하는 방법, 두가지를 통해서 확인해 보았다. Phenol을 이용하여서 total RNA를 추출하였을 경우, 최종 획득할 수 있는 RNA의 양이 많았지만 RNA의 손상이 심해서 TRI reagent로 획득한 RNA에 비해서 질이 많이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 13). 따라서 *C. phlei*의 total RNA 획득은 TRI reagent를 이용하여 추출하는 방법을 선택하여 나머지 실험에 활용하기로 하였다.

### (나) *C. phlei*의 18s rRNA 유전자 확보

*C. phlei* 균주에서 유전자 발현을 확인할 때 internal control로 사용할 house-keeping gene을 얻기 위해 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. 약 830 bp의 *C. phlei* 18s rRNA gene의 frgment를 확보하였으며 이를 pGEM T-easy vector에 cloning 하였다. NCBI blast search를 통해 18s rRNA 유전자가 제대로 확보되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 14).

### (다) Northern blot analysis를 통한 관련 유전자의 활성화 확인

1차년도 연구에서는 유기용매를 이용한 TLC (thin layer chromatography)를 통해서 *C. phlei*가 성장률에 따라, 그리고 분자육종 균주별로 phleochrome 생성량에 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 Northern blot analysis를 수행하여 wild type 균주와 돌연변이 균주인 M35, M45의 total RNA를 TRI reagent를 이용하여 날 짜별로 추출한 후, 이들의 상관관계를 확인하고자 하였다. V8 juice media에 WT, M45 균주를 6, 9, 12, 15, 18일 동안 각각 키운 후, total RNA를 획득하였다. M35균주의 경우에는 6, 9일째 total RNA를 획득하여 Northern blot analysis를 확인하였다. 본 연구팀에서 확보한 house-keeping gene인 *C. phlei*의 18s rRNA gene을 internal control로 사용하였으며, CpPK1 유전자의 일부분을 probe DNA로 사용하여 실험을 수행하였다 (Figure 15). 이전에 *C. phlei*의 성장에 따른 phleochrome의 생산량을 TLC를 통해서 확인하였을 때와 마찬가지로 12일 째 강한 signal을 확인할 수 있었으며, 이를 통해서 CpPKS1이 phleochrome의 생합성에 관여하는 gene일 것이라고 예상할 수 있었다. CpPKS3, CpPKS4, CpPKS5의 발현 확인의 경우, V8 juice media에 WT, M45균주를 6, 9, 12, 15, 18일 동안 각각 키운 후, total RNA를 획득하였다. 각각의 유전자의 일부분을 probe DNA로 사용하여 실험을 수행하였다(Figure 16). 충분한 RNA의 양에 불구하고 어떤 signal도 확인할 수 없었다. PKS gene의 copy수가 적어 이러한 결과가 나타난 것이라 추정하고 현 조건의 Northern blot analysis를 통해서 유전자의 발현을 확인 할 수 없을 것이라 판단하여, 추가적으로 Real time PCR을 통해서 유전자의 발현을 확인함과 동시에 여러 조건을 더 바꾸어 Northern blot analysis를 수행하고자 한다.



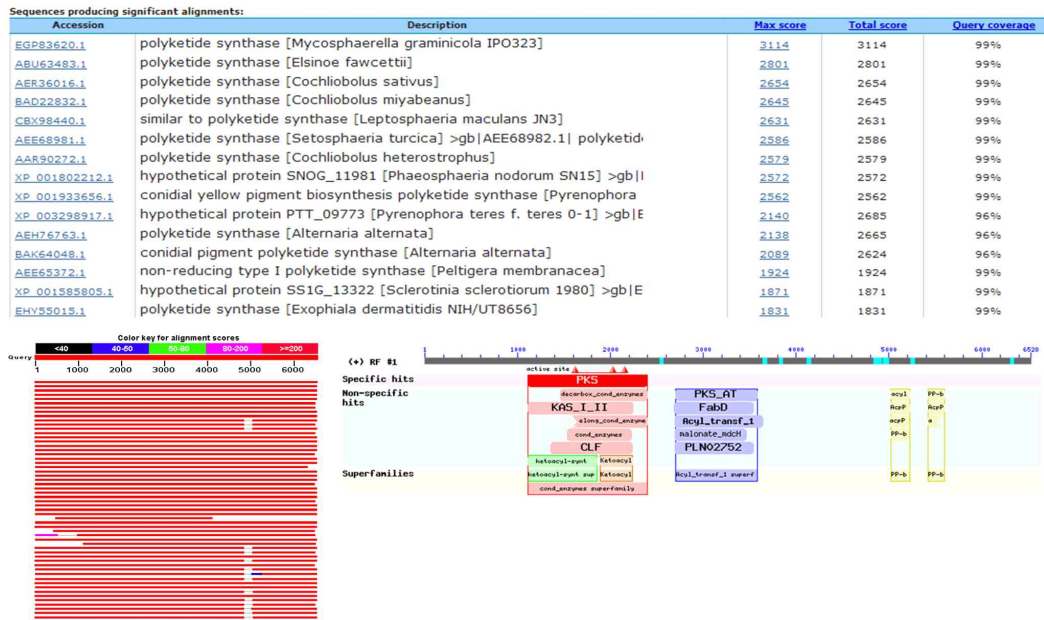


Figure 5. BLASTx result of CpPKS1 gene.

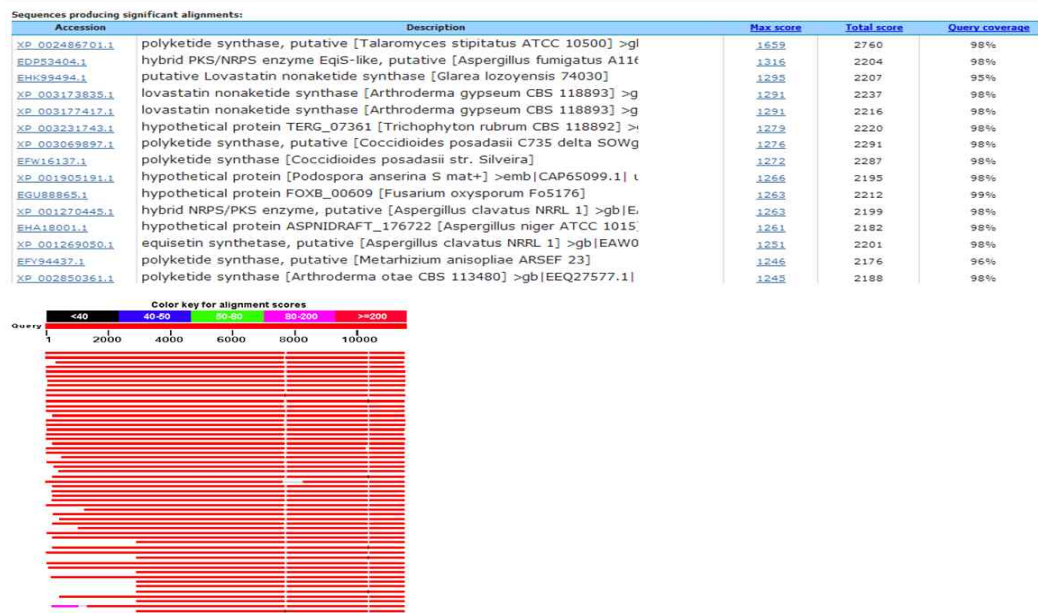


Figure 6. BLASTx result of CpPKS2 gene.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">XP_001557060.1</a>	hypothetical protein BC1G_04310 [Botryotinia fuckeliana B05.10] >gb E	1156	2290	94%
<a href="#">AAR90246.1</a>	polyketide synthase [Botryotinia fuckeliana]	1154	2288	94%
<a href="#">CCD54538.1</a>	BcPKS10, polyketide synthase [Botryotinia fuckeliana]	1151	2133	88%
<a href="#">EGX89763.1</a>	polyketide synthase, putative [Cordyceps militaris CM01]	1093	2229	94%
<a href="#">ADF28668.2</a>	reducing type I polyketide synthase [Peltigera membranacea]	1066	2188	94%
<a href="#">XP_001806097.1</a>	hypothetical protein SNOG_15965 [Phaeosphaeria nodorum SN15] >gb I	1051	1908	87%
<a href="#">XP_001825712.2</a>	polyketide synthase [Aspergillus oryzae RIB40]	1027	2006	94%
<a href="#">BAE64579.1</a>	unnamed protein product [Aspergillus oryzae RIB40]	1027	1980	94%
<a href="#">EFQ35393.1</a>	beta-ketoacyl synthase domain-containing protein [Glomerella graminicola]	1025	2020	94%
<a href="#">XP_003296852.1</a>	hypothetical protein PTT_07049 [Pyrenophora teres f. teres 0-1] >gb E	1010	2044	96%
<a href="#">EHK21872.1</a>	putative polyketide synthase [Trichoderma virens Gv29-8]	1005	2053	95%
<a href="#">AAV32931.1</a>	PKSKA1 [Xylaria sp. BCC 1067]	930	1931	94%
<a href="#">XP_002649242.1</a>	polyketide synthase [Thielavia terrestris NRRL 8126] >gb AEO62906.1]	913	1853	96%
<a href="#">GAA8575.1</a>	polyketide synthase [Aspergillus kawachii IFO 4308]	909	1886	94%
<a href="#">XP_001213896.1</a>	predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624] >gb EAU35165.1] predi	907	1883	94%

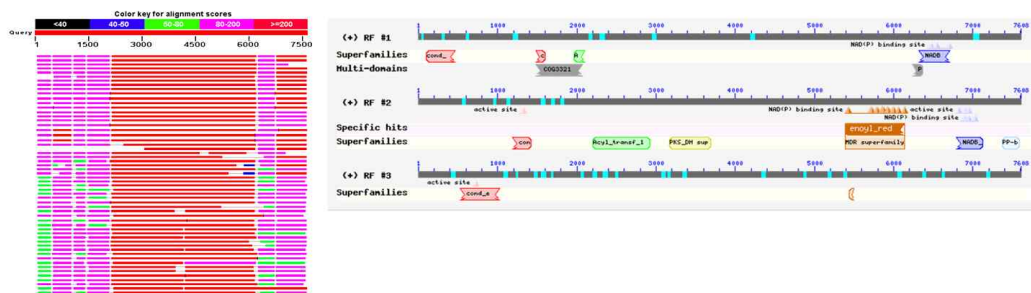


Figure 7. BLASTx result of CpPKS3 gene.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">AAC49814.1</a>	polyketide synthase [Aspergillus terreus]	1901	1901	96%
<a href="#">BAA20102.2</a>	6-methylsalicylic acid synthase [Aspergillus terreus]	1900	1900	96%
<a href="#">XP_001215453.1</a>	6-methylsalicylic acid synthase [Aspergillus terreus NIH2624] >gb EAU3	1894	1894	96%
<a href="#">AAK48943.1</a>	6-methylsalicylic acid synthase [Byssosclamyces nivea]	1892	1892	96%
<a href="#">P22367.1</a>	RecName: Full=6-methylsalicylic acid synthase; Short=6-MSAS >emb C	1845	1845	96%
<a href="#">ADF47133.1</a>	6-MSAS [Penicillium griseofulvum]	1844	1844	96%
<a href="#">XP_002564832.1</a>	Pc22g08170 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255] >emb CAP98	1839	1839	96%
<a href="#">XP_001273093.1</a>	6-methylsalicylic acid synthase MsaS [Aspergillus clavatus NRRL 1] >gb	1806	1806	95%
<a href="#">XP_003015543.1</a>	polyketide synthase, putative [Arthroderma benhamiae CBS 112371] >g	1762	1762	96%
<a href="#">XP_003169413.1</a>	6-methylsalicylic acid synthase [Arthroderma gypseum CBS 118893] >g	1755	1755	96%
<a href="#">XP_003019112.1</a>	polyketide synthase, putative [Trichophyton verrucosum HKI 0517] >gt	1753	1753	96%
<a href="#">XP_002849666.1</a>	6-methylsalicylic acid synthase [Arthroderma otae CBS 113480] >gb EE	1745	1745	96%
<a href="#">AAC23536.1</a>	polyketide synthase PKSL2 [Aspergillus parasiticus]	1741	1741	97%
<a href="#">XP_003233709.1</a>	6-methylsalicylic acid synthase [Trichophyton rubrum CBS 118892] >gb	1739	1739	96%
<a href="#">BAE65442.1</a>	unnamed protein product [Aspergillus oryzae RIB40]	1731	1731	97%

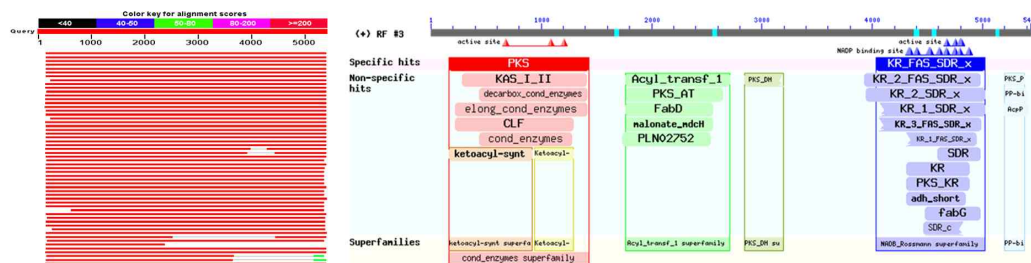


Figure 8. BLASTx result of CpPKS4 gene.

Table 3

Characteristics of PKS gene-splicing regions of *C. phlei*.

Gene	Intron	Size	5' splice site	3' splice site
<i>Cppks2</i>	1	53	GTGAGT	CAG
<i>Cppks3</i>	1	59	GTAAGC	CAG
	2	54	GTACGT	TAG
	3	50	GTATGT	TAG
	4	117	GTAAGT	CAG
	5	51	GTGAGT	CAG
	6	55	GTTTCGT	CAG
	7	83	GTAAGT	CAG
	8	39	GTGAGT	CAG
	9	36	GTAGGT	TAG
	10	51	GTATGT	TAG
<i>Cppks4</i>	1	56	GTAAGA	CAG
	2	51	GTACGA	TAG
	3	68	GTGAGC	CAG
	4	56	GTAAGT	TAG
	5	49	GTCAGT	CAG
	6	51	GTGAGA	AAG
	7	53	GTATGA	CAG
	8	52	GTATGT	CAG

Note that the *Cppks1* gene is predicted to be intronless.

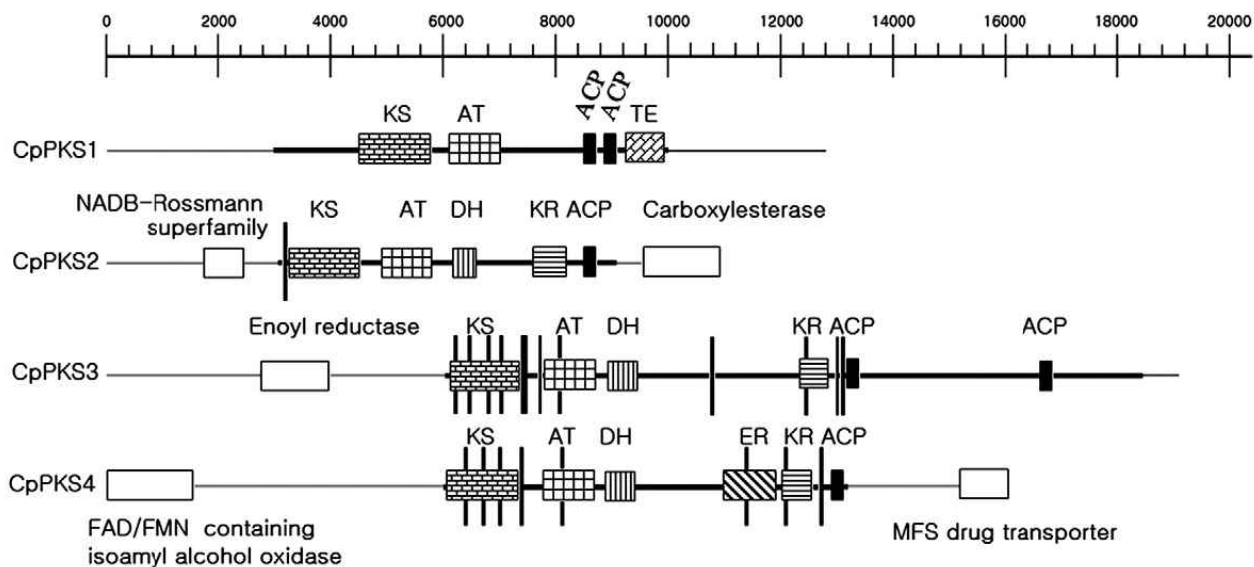


Figure 9. Schematic organization of four PKS genes in *C. phlei*.

Thick lines represent the ORF region of each PKS, in which the position and appropriate size of putative introns are represented by short vertical lines. All PKS-conserved domains were detected using the INTERPROSCAN program and are shown at their corresponding positions in the ORF. Flanking regions other than the ORF of PKS and neighboring genes are shown as thin lines and open boxes, respectively. The size of the DNA sequence is shown at the top line.

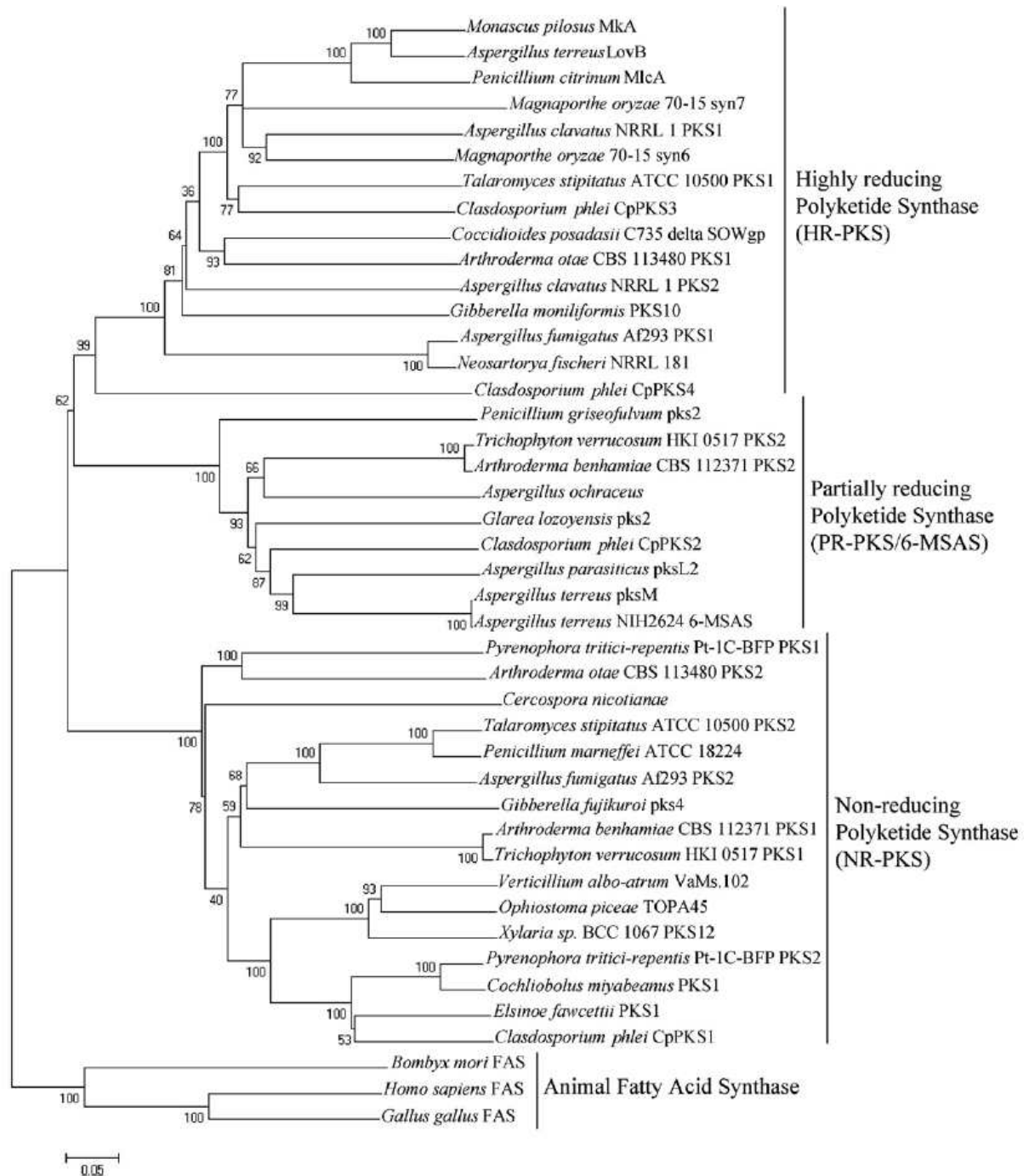
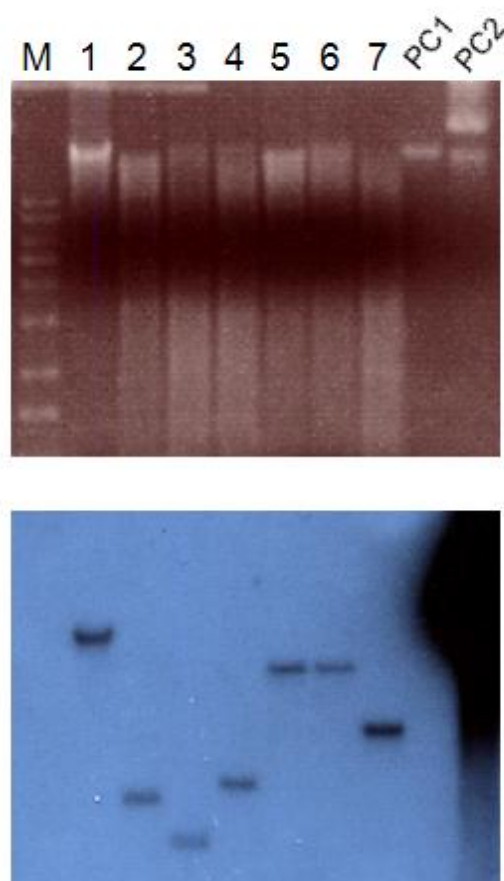


Figure 10. Phylogram of fungal PKSs inferred based on Neighbor Joining analysis of the full-length deduced amino acid sequences.

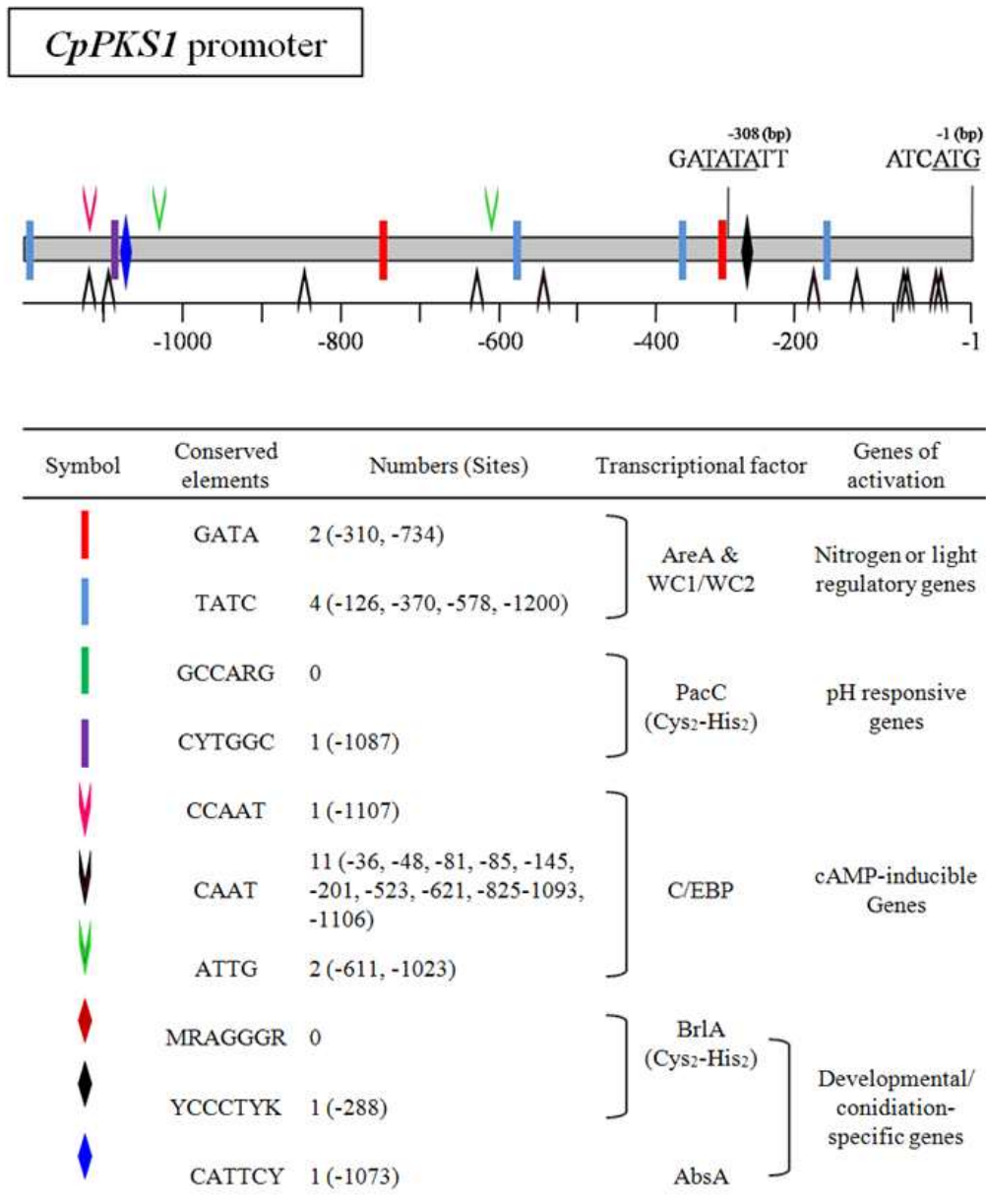
Vertical bars indicate major clades, each of which represents the reducing state of polyketides. Numbers below the branches indicate the percentage bootstrap support for each clade. Three FAS genes were included as an out-group: *Homo sapiens* FAS (gi|1049053); *Gallus gallus* FAS (gi|1345958); *Bombyx mori* FAS (gi|2058460). Bar represents 0.05 substitutions per amino acid position



**Figure 11. Southern blot analysis of *C. phlei* genomic DNA.**

Southern blot analysis of *C. phlei* genomic DNA for finding copy number of nonreducing PKS genes. *C. phlei* genomic DNA samples are digested with 7 kinds of restriction enzymes. The blot is hybridized with the probe that is a partial fragment of KS domain of CpPKS1 gene.

lane 1; digested with *Not*I, lane 2; digested with *Eco*R I, lane 3; digested with *Pst* I, lane 4; digested with *Hind*III, lane 5; digested with *Kpn*I, lane 6; digested with *Bam*H I, lane 7; digested with *Cla*I.



**Figure 12. Promoter analysis of CpPKS1.**

Promoter analysis of 1.2-kb sequences upstream of the putative ATG translational start codon of *CpPKS1* in both directions, identifying a number of putative binding sites for global transcriptional regulators such as AreA (nitrogen regulatory protein), the WC1/WC2 complexes (light regulatory proteins), PacC (ambient pH regulatory protein), and C/EBP (cAMP-activated protein). The *CpPKS1* promoter also has conserved sequences for recognition and binding of the conidial formation-associated BrlA and AbsA transcriptional activators in *Aspergillus nidulans*.

*Definition of mixed bases: R = A or G; M = A or C; Y = C or T.*

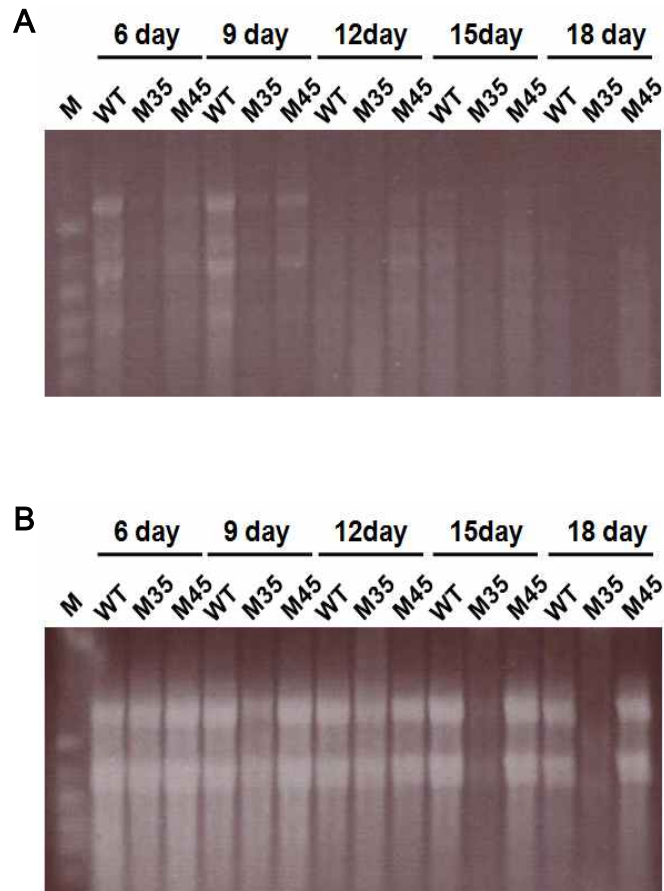
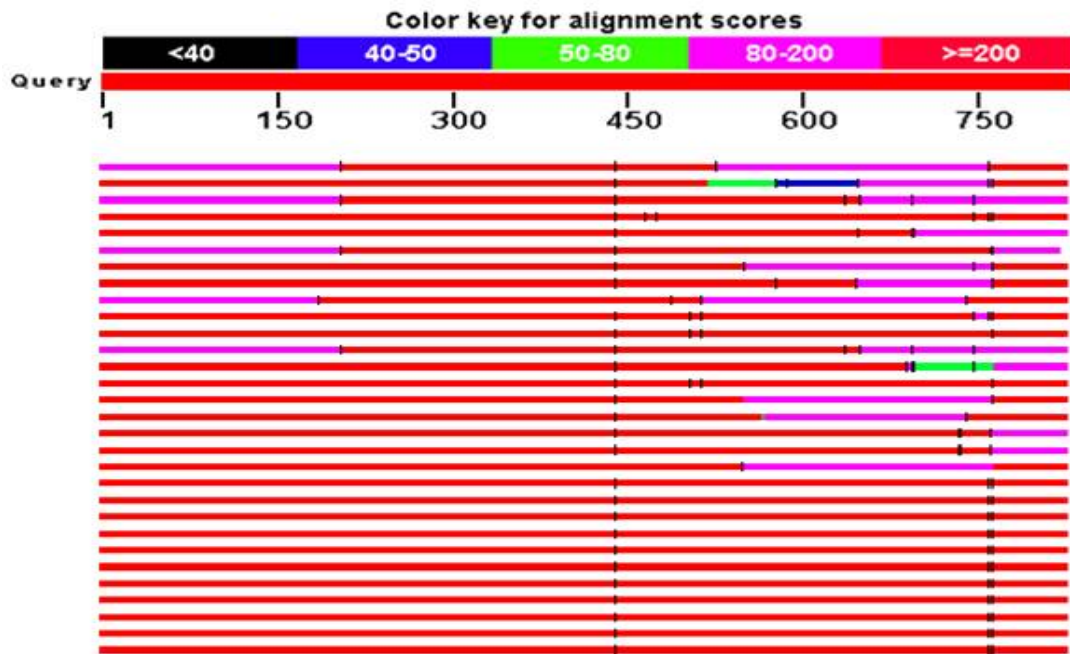


Figure 13. Total RNA extraction of *C. pheii* using the phenol and TRI reagent.

(A) Total RNA extraction using the phenol. (B) Total RNA extraction using the TRI reagent.





Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">AY137508.1</a>	Aureobasidium pullulans strain 33v1 18S ribosomal RNA gene, partial sec	<a href="#">537</a>	3302	99%
<a href="#">AY137506.1</a>	Aureobasidium pullulans strain 29v1 18S ribosomal RNA gene, partial sec	<a href="#">537</a>	3302	99%
<a href="#">EU342957.1</a>	Mycosphaerella punctiformis clone 29i small subunit ribosomal RNA gene	<a href="#">384</a>	3328	99%
<a href="#">EU167558.1</a>	Davidiella tassiana strain CBS 723.79 small subunit ribosomal RNA gene,	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">EU167592.1</a>	Cladosporium sp. CBS 266.53 small subunit ribosomal RNA gene, internal	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">EU167591.1</a>	Davidiella macrospora strain CBS 138.40 small subunit ribosomal RNA ge	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">EU375523.1</a>	Cladosporium cladosporioides strain MD-2 18S ribosomal RNA gene, part	<a href="#">581</a>	3504	99%
<a href="#">NG_016492.1</a>	Cladosporium cladosporioides voucher CBS:H-6933, H-6934 culture-coll	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">AY251096.2</a>	Cladosporium bruhnei strain CPC 5101 18S small subunit ribosomal RNA {	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">JN397376.1</a>	Cladosporium bruhnei strain USN 11 18S ribosomal RNA gene, partial sec	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">AY251093.2</a>	Cladosporium cladosporioides strain STE-U 3682 18S small subunit ribos	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">AY251097.2</a>	Cladosporium uredinicola strain CPC 5390 18S small subunit ribosomal Rf	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">AY251091.2</a>	Cladosporium cladosporioides strain STE-U 3683 18S small subunit ribos	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">GU322367.1</a>	Cladosporium sp. CF-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">FJ716247.1</a>	Cladosporium sp. 7F 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">582</a>	3510	99%
<a href="#">FJ716252.1</a>	Cladosporium sp. 15F 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">582</a>	3510	99%

Figure 14. tBLASTx result of partially obtained gene fragment for 18s rRNA gene of *C. phlei*.

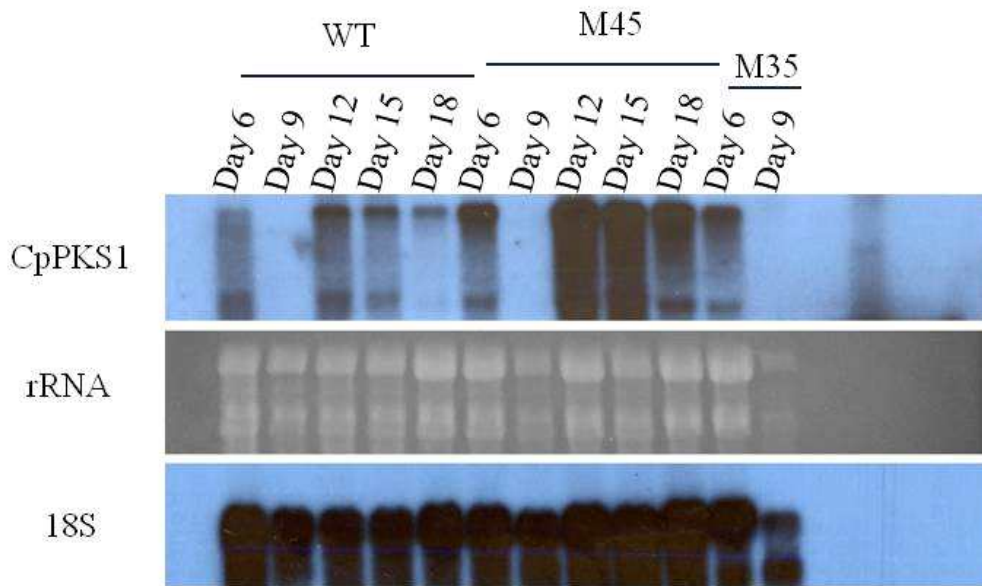


Figure 15. V8 mycelia were harvested at regular interval (6, 9, 12, 15 and 18 days) and RNA samples were prepared according to previously described protocol. 30 ug of total RNA was loaded on each lane. The rRNA was shown to indicate equal loading amount. CpPKS1 was shown to accumulated at all time points except for day 9 and peaked at day 12. The pattern was observed for all three different strains (M45, M35 and WT) although in M35 strain only day 6 and day 9 RNA samples were used.

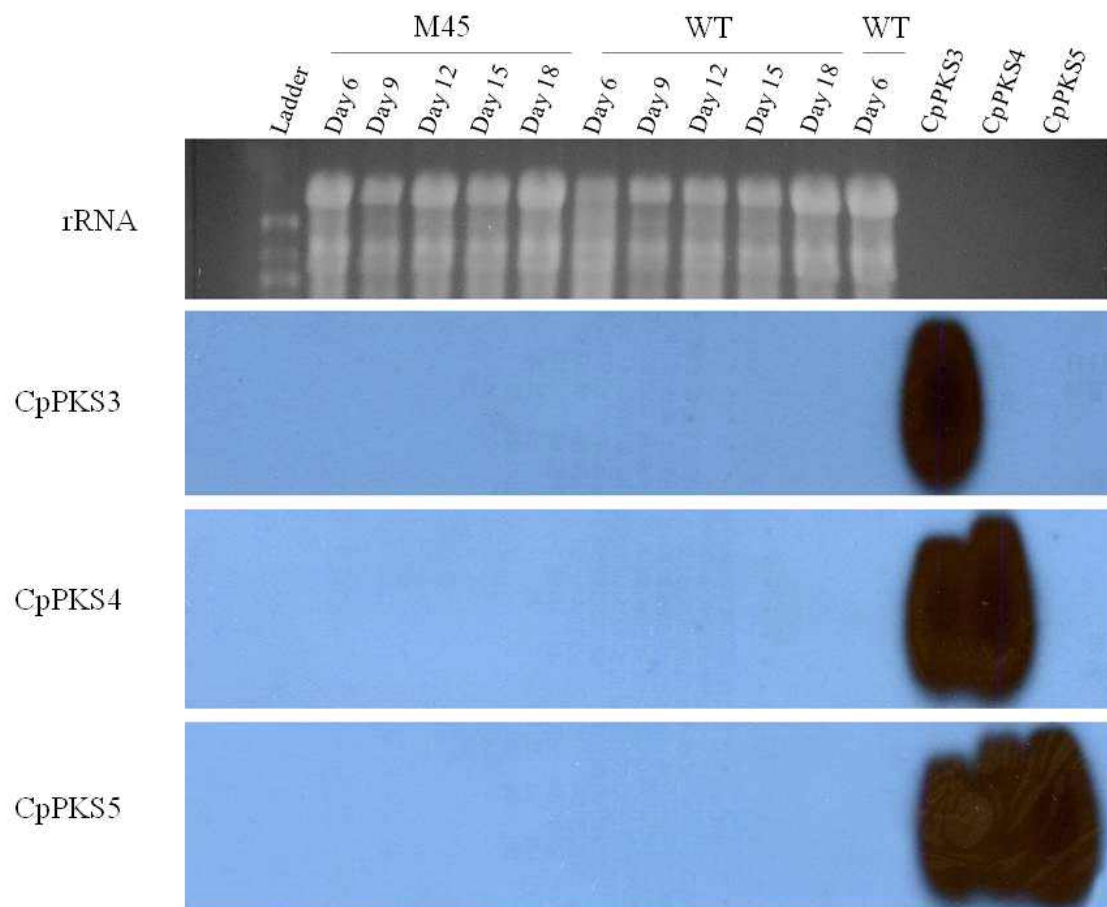


Figure 16. V8 mycelia were harvested at regular interval (6, 9, 12, 15 and 18 days) and RNA samples were prepared according to previously described protocol. 30 ug of total RNA was loaded on each lane. The gel was blotted and probed with 3 different probes, namely the CpPKS3, CpPKS4 and the newly discovered CpPKS5. There was no accumulation of the transcripts of these three genes in the Northern membrane.

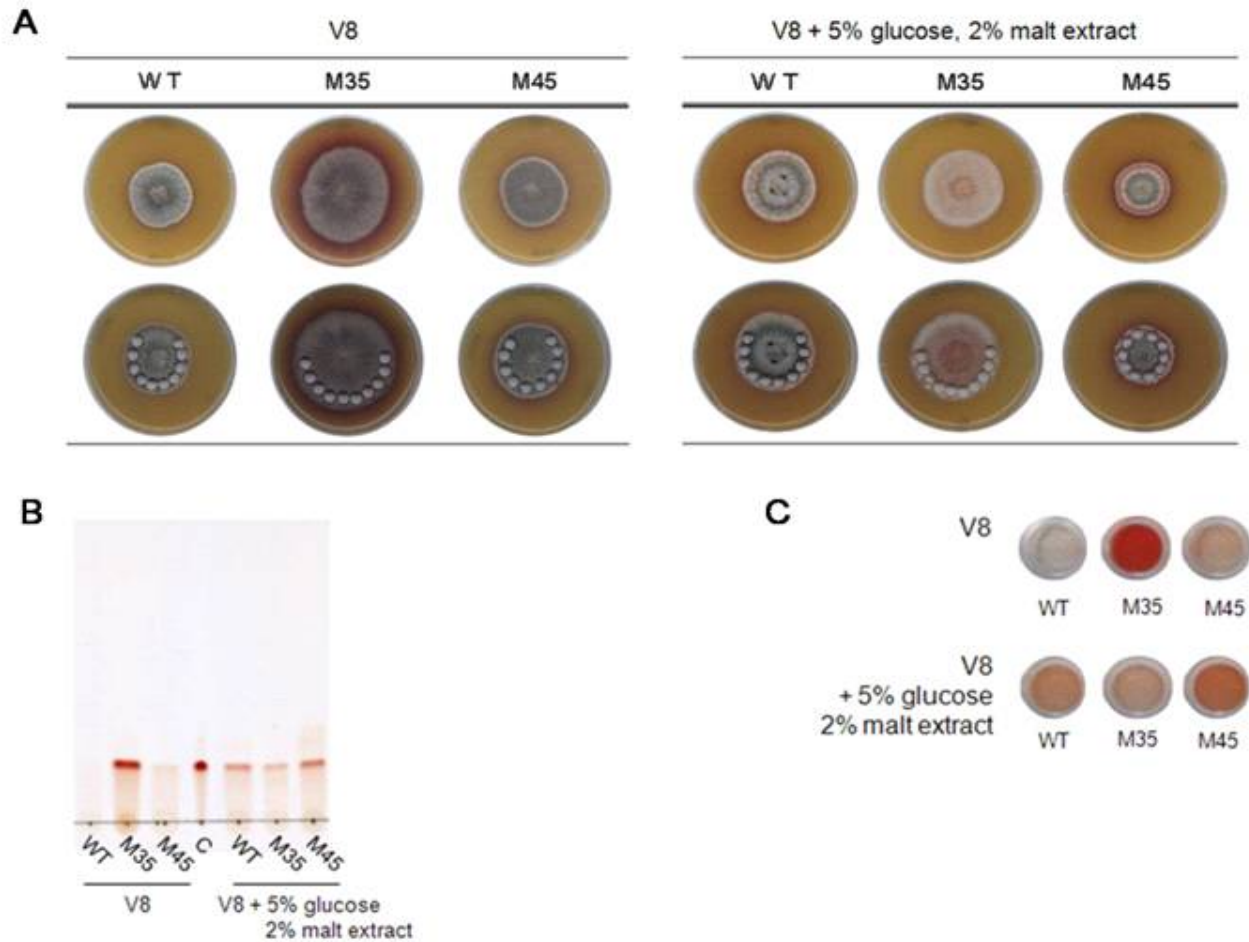
## 2. Phleichrome생산에 대한 빠른 역가 검증법 개발

### 가. 고체배지의 agar block을 이용한 TLC 전개

균주간의 phleichrome 생성량을 신속히 분석비교하기 위하여 일정한 수, 일정한 크기의 agar block을 본 연구진에서 phleichrome 추출을 위하여 최종 결정한 ethyl acetate와 5시간 반응시킨 후 상층액만을 따내어 TLC 전개하는 방법을 개발하였다. 이를 통해서 신속 정확하게 균주간의 생성량을 간단히 비교 분석할 수 있었다 (Figure 17).

### 나. 분석기기를 활용한 정량분석 방법

TLC 전개 이전에 각 균주의 ethyl acetate extract의 일정량을 이용하여 초고속으로 생성량을 측정할 수 있는 spectrophotometer를 검출 방법으로 확립하였다. 다양한 파장을 조사하여 phleichrome의 양이 정확히 검출되는 475 nm 파장을 찾아냈으며, 간편하게 균주간의 phleichrome 생성량을 조사가능하게 되었다 (Figure 18).



**Figure 17. Rapid screening using agar block.**

(A) Morphology of WT, M35 and M45 under two different culture conditions (right: V8 medium, left: V8 supplemented with glucose and malt-extract). (B) Thin Layer Chromatography (TLC) of phleochrome extracted with ethyl acetate from three strains under two different culture conditions. Comparing with the parental strain, M35 is overproducing under V8 culture condition while M45 is overproducing under V8 supplemented with glucose and malt-extract. (C) Ethyl acetate extracts from 3 strains under two different culture conditions as seen on 96 well plate.

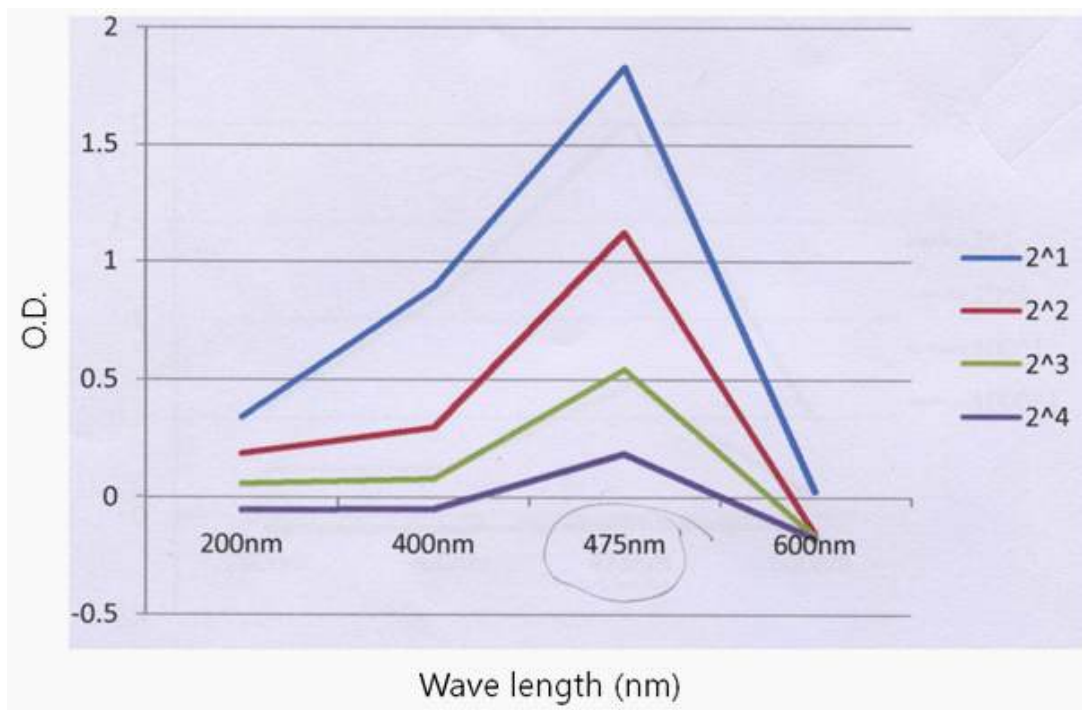


Figure 18. Spectrophotometer rapid screening

### 3. Phleochrome 대량생산을 위한 균주 육종

#### 가. *C. phlei*의 UV-mutagenesis 실시 및 screening 방법 구축

##### (1) *C. phlei*의 UV mutagenesis 표준화 조건 확립

UV mutagenesis 방법을 통한 과발현 돌연변이주를 확보하기 위하여 UV mutagenesis 조건을 확립하고자 하였다. Energy와 시간을 다르게 해주었을 때 5J 15sec의 조건이 90% killing dose를 보이는 것으로 확인 되었다 (Figure 19) [23-24].

##### (2) UV(ultraviolet) mutagenesis를 통한 mutant 확보

UV mutagenesis를 실시 한 후 50개의 mutants를 확보하였고, 이는 W.T에 비해 red pigment가 진하게 보여 지는 것을 선택하였다 (Figure 20).

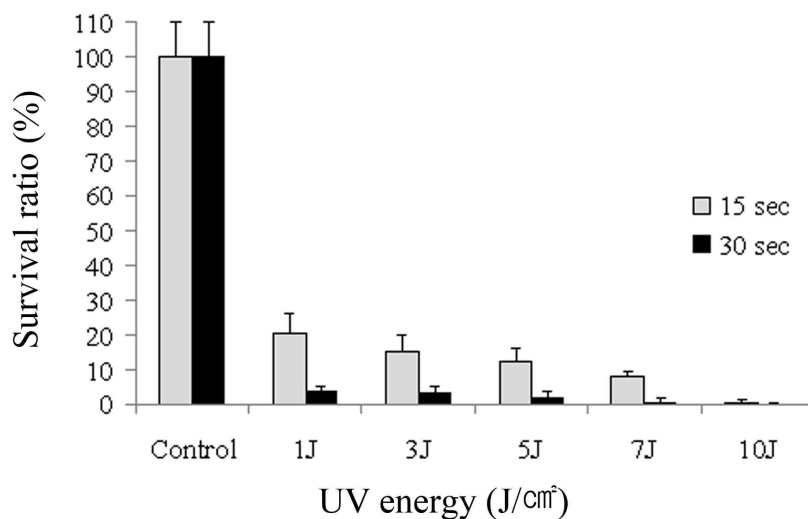
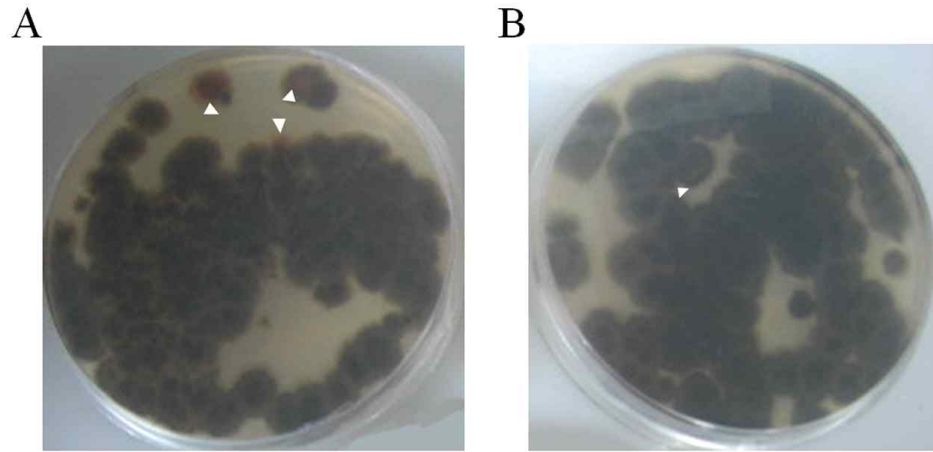


Figure 19. Survival ratio of UV-irradiated spores.



**Figure 20.** Colony morphology of UV-irradiated spores on PDA.

Arrows indicate the putative mutant strains showing the marked changes in the pigment color. Note that the pigment color changes as the culture proceeds. Only colonies showing the difference from others were primarily selected for further analysis.



#### 나. Phleichrome 과발현 돌연변이체의 배양조건 최적화

본 연구에서는 1차년도에서 수행된 UV mutagenesis를 통해서 이미 확보된 50개의 돌연변이체 중 PDA 배지에서 *C. phlei*의 wild type 균주에 비해 red pigment가 진하게 보이는 돌연변이체인 M35 균주와 wild type 균주에 비해 red pigment가 약한 돌연변이체인 M45 균주 각각에 대해서 phleichrome 생성량 최적화를 위한 배지를 탐색하고자 하였다. 1차년도 연구를 통해서 확인된 최적화 배지인 V8 juice 배지와 함께 V8 juice 배지에 glucose와 malt extract를 첨가한 V8GM 배지를 이용하여 각 돌연변이체의 15일째 배양하여 표현형을 관찰하였으며, agar plug를 유기용매인 ethyl acetate에 extraction 한 후 thin layer chromatograph (TLC)전개를 통한 phleichrome 생산성을 관찰하였다 (Figure 17). 추가적으로 V8GM배지에서 날짜별로 균주들을 culture하여 유기용매에 extraction 한 후, thin layer chromatograph (TLC)전개를 통해 배양일별 phleichrome 생산성을 확인하였다. 그 결과, M35 균주의 경우 V8 juice 배지에서 wild type 균주보다 phleichrome을 많이 생성하지만 V8GM 배지에서는 wild type 균주보다 phleichrome을 많이 생성하지 않았으며 M45 균주의 경우에는 M35 균주와는 정반대로 V8 juice 배지에서보다 V8GM 배지에서 phleichrome을 더 많이 생성하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 21).

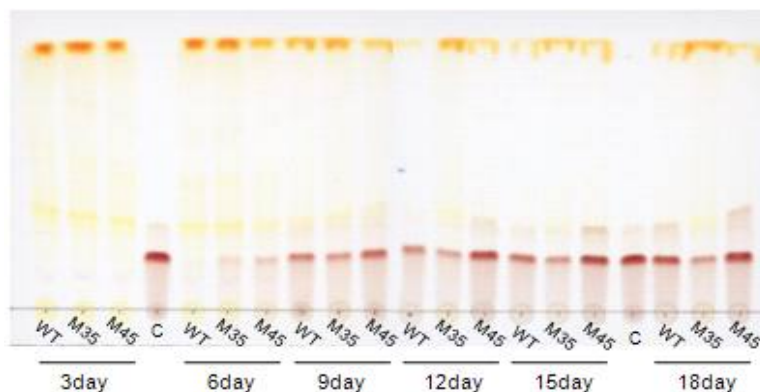


Figure 21. TLC analysis of wild type, M35, M45 strain of *C. phlei* on V8GM media.

Days indicate sample preparations from the corresponding days after the incubation. Lane C in the TLC plate contains purified phleichrome.

## 다. Perylenequinone 합성 관련 유전자의 발현 조절을 위한 vector 설계 및 재조합 균주 확보

### (1) 항생제 selection marker 확인

*C. phlei*의 항생제 selection maker로 사용할 수 있는 유전자는 본 연구진에 의한 선행연구에서 hygromycin이 가능함을 확인하였다 [2]. 보다 다양한 분자유종을 시도하기 위하여 더 많은 종류의 selection maker의 확보가 중요하다고 판단한 본 연구진은 hygromycin을 제외한 다른 selection maker를 조사하고자 하였다. 먼저 geneticin을 배지에 첨가하여 균주를 배양하였을 경우, 야생형 균주뿐만 아니라 과발현 균주들도 모두 잘 자람을 확인하여 selection maker로 사용할 수 없음을 확인하였다 (Figure 22).

### (2) 유전자 발현조절을 위한 over-expressed vector 제작 및 재조합 균주 확보

CpPKS1 유전자의 과다발현을 유도하여 phleochrome 생산량이 증가된 돌연변이 균주를 제작하기 위하여 over-expressed vector를 제작하였다. 본 연구진이 선행연구에서 개발한 밤나무동고병균의 cryparin promoter 188 크기의 유전자에 CpPKS1 유전자의 open reading frame을 fusion한 후 hygromycin 저항성 selective marker가 삽입된 plasmid에 cloning하여 최종 vector를 제작하였다(Figure 23). 차후에 이를 이용하여 *C. phlei*의 protoplast에 형질전환시키고 hygromycin이 첨가된 배지에서 selection하였다. 총 31개의 형질전환체를 얻었으며, 이들을 hygromycin 배지에 3차 계대한 후 genomic DNA를 회수하여 PCR을 통해서 CpPKS1 유전자와 hygromycin 유전자가 삽입됨을 확인하였다. 추가적으로 southern blot analysis를 진행하고 있다.

### (3) 유전자 발현조절을 위한 heterogous expressed vector 제작 및 재조합 균주 확보

CpPKS1 유전자를 밤나무 동고병균인 *C. parasitica*에 heterogous expression 함으로써 CpPKS1 유전자가 다른 균주에서도 phleochrome을 생산할 가능성이 있는지를 확인하고자 하였다. 밤나무동고병균의 강력한 promoter로 알려진 cryparin promoter 188에 CpPKS1 유전자의 open reading frame을 fusion하여 geneticin 저항성 selective marker가 삽입된 plasmid에 cloning하여 최종 vector를 제작하였다 (Figure 24). 차후에 이를 이용하여 밤나무 동고병균인 *C. parasitica*의 protoplast에 형질전환시키고 geneticin이 첨가된 배지에서 selection하였다. 총 24개의 형질전환체를 얻었으며, 이들을 geneticin 배지에 3차 계대한 후 genomic DNA를 회수하였다. 현재 PCR을 통해서 CpPKS1 유전자와 geneticin 유전자가 삽입됨을 확인하는 작업을 진행중에 있다.

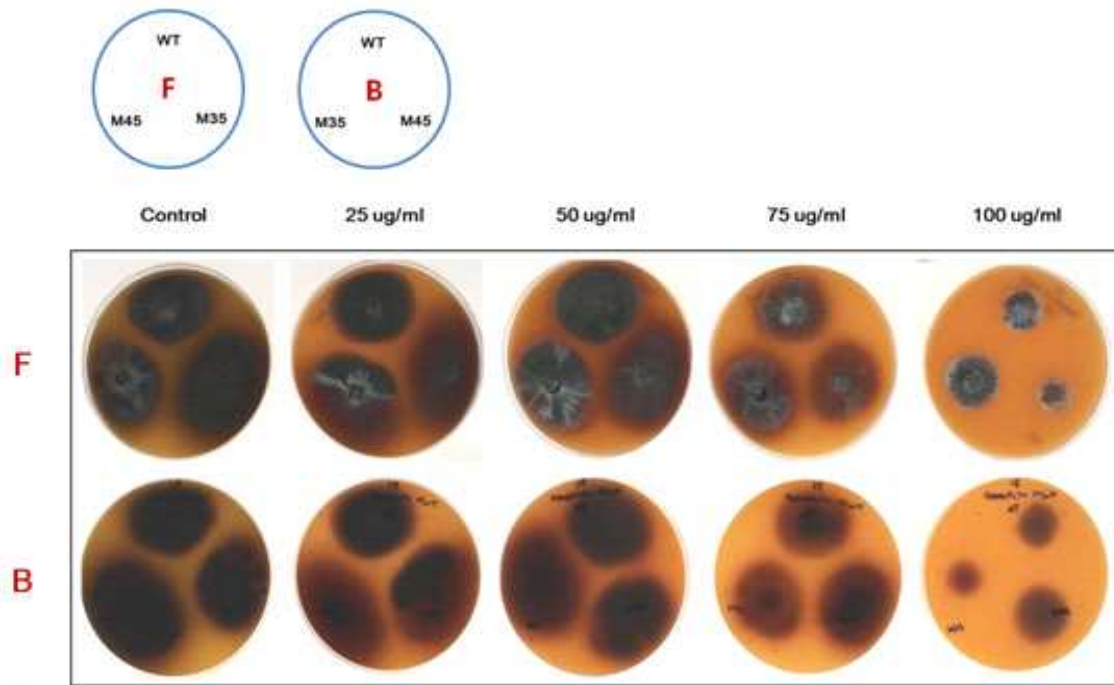


Figure 22. Genetic test for selection marker

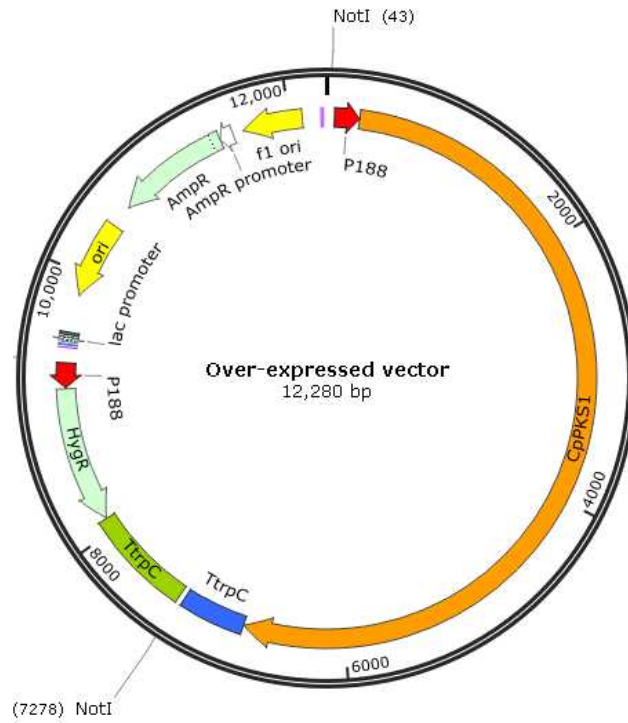


Figure 23. Over-expressed vector of CpPKS1

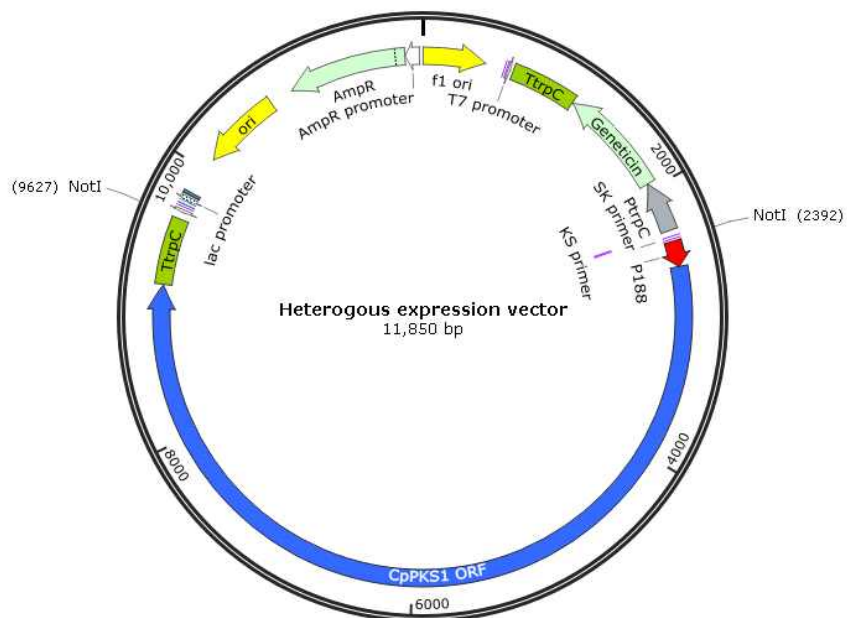


Figure 24. Heterologous expressed vector map of CpPKS1

## 라. *C. phlei*의 perylenequinone 관련 유전자 발현 조절에 의한 분자 육종

### (가) Comparative genomics에 의한 생합성 유전자의 발현 조절 regulator 유전자 확보

PKS transcription factor로 이미 알려진 ZEB2 유전자를 서울대학교 이인원 교수님 실험실에서 분양받아 유전자 phleichrome의 발현조절이 가능함을 확인하고자 하였다 [25]. 확보한 ZEB2 clone의 경우, *Gibberella zeae*에서 강하게 발현되는 2,146 bp의  $\beta$ -tubulin promoter와 1,048 bp의 ZEB2 유전자가 pCR-XL-TOPO vector에 삽입되어 있었다. (Figure 25).

### (나) ZEB2 유전자 expression vector 제작

앞서 얻은 ZEB2 유전자를 *C. phlei*에 삽입시키기 위해서 expression vector를 제작하였다 (Figure 26). 이인원 교수님 실험실에서 가져온 ZEB2 expression vector의 경우 *C. phlei*가 selection maker로 사용할 수 있는 항생제 저항성 유전자가 없기 때문에 약 2.3 kb의 hygromycin 유전자를 삽입하였다.

### (다) 재조합 균주 확보

앞서 확보한 expression vector를 circular와 linear 두가지 형태로 *C. phlei* 야생형균주에 형질 전환을 시도하였다. 각각의 형질전환체들은 hygromycin이 첨가된 배지에서 selection하였다. Selection 배지에서 얻은 형질전환체들은 genomic DNA를 회수하여 PCR을 통해서 유전자의 삽입여부를 확인하였다. 결과적으로 circular form으로 형질전환하여 총 7개의 형질전환체를 확보할 수 있었으며 linear form으로 형질전환하여 총 1개의 형질전환체를 확보할 수 있었다. 추가적으로 이들 각각의 형질전환체들의 total RNA를 획득하여 Northern blot analysis를 수행하고 있는 중이며, ZEB2 유전자가 phleichrome의 transcription factor로 작용하는지를 확인하고자 한다.

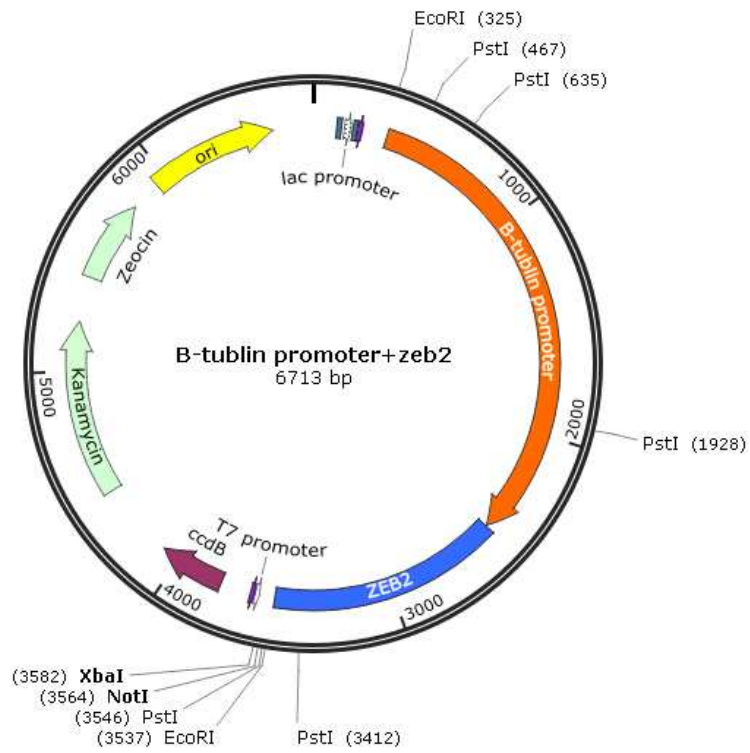


Figure 25. ZEB2 expression vector for *Gibberella zeae*

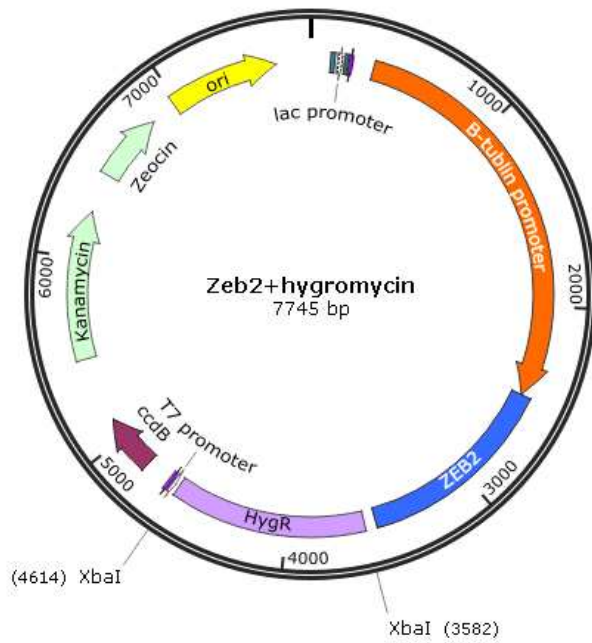


Figure 26. ZEB2 expression vector for *C. phlei*

#### 4. Phleichrome생산을 위한 발효조건 확립 및 물질 특성화 및 유도체 개발

##### 가. *C. phlei* 성장에 따른 phleichrome의 발현 양 결정

###### (1) 성장에 따른 *C. phlei* 균체의 형태관찰

선행연구에서 phleichrome을 생성하는 사상성진균 *C. phlei*의 실험실 최적배양조건을 성립하여 보고한바 있다 (Figure 27) [1]. 본 연구에서 성장에 따른 phleichrome 생성량을 비교분석하기 위하여 선행연구의 배양조건을 참고하였으며 20℃ 최적온도에서 1일부터 22일까지 관찰하여 생산량을 비교분석하고자 하였다. Phleichrome 추출 전 각 일별로 배양한 균체의 표현형을 관찰한 결과 배양시간이 경과함에 따라 무성생식포자와 색소침적이 증가함을 관찰하였으며 (Figure 28) phleichrome 생성량도 지속적으로 증가할 것이라 추정하였다.

###### (2) 성장에 따른 *C. phlei*의 phleichrome 생성량 조사

Fig. 2의 plate로부터 동량의 균사체를 확보하여 ethyl acetate와 혼합 후 5시간 반응시켜 추출액을 확보하여 육안으로 비교하였다. 그 결과 서서히 붉은색의 색소 생성량이 시간이 경과함에 따라 서서히 증가하며 12일 쯤부터 급격히 증가하기 시작하여 17일 이후부터 급격히 감소하는 걸 관찰하였고 14-15일 배양된 균사체에서 생산된 색소체의 양이 최고치임을 확인하였다 (Figure 29A). 또한 TLC (thin layer chromatography) 전개를 통하여 육안관찰결과를 정확히 재입증하였으며 비교군인 순수분리 phleichrome과 동일한 물질임을 확인하였다 (Figure 29B).

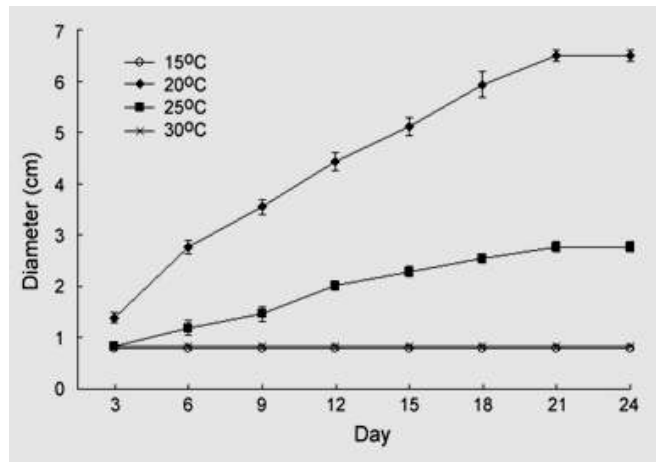


Figure 27. Time-course profiles representing the growth rate as a function of temperature.

The growth rate was determined by measuring the diameter of each colony at 90° angles until no further expansion was observed. Error bars represent the standard deviation of five replicates in three independent experiments.



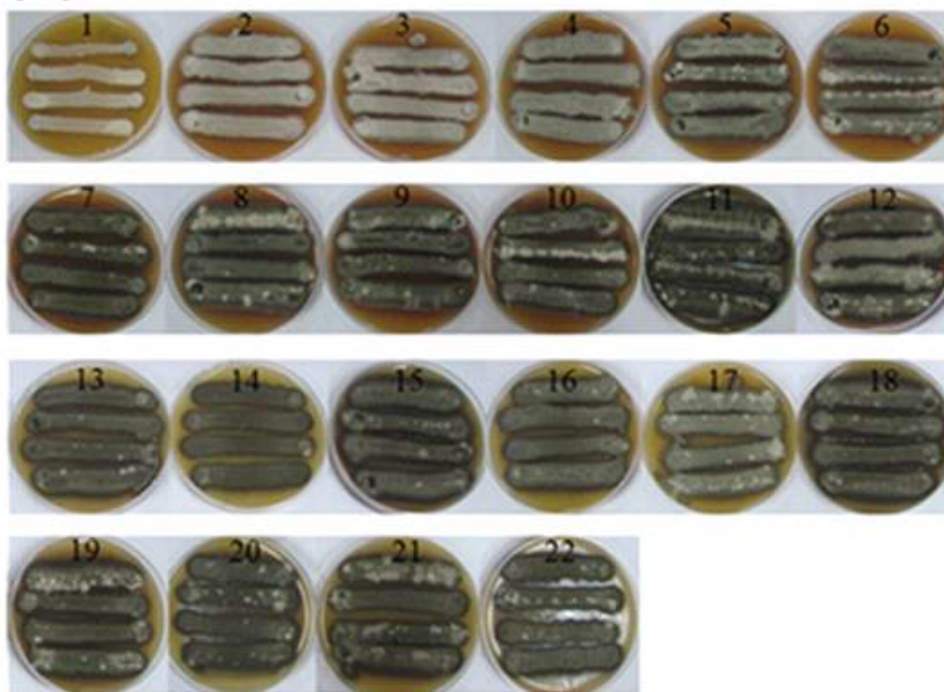


Figure 28. Assessment of the colony morphology the color of ethyl acetate extract from the agar plugs containing actively growing mycelia.

Numbers indicate sample preparations from the corresponding days after the incubation.

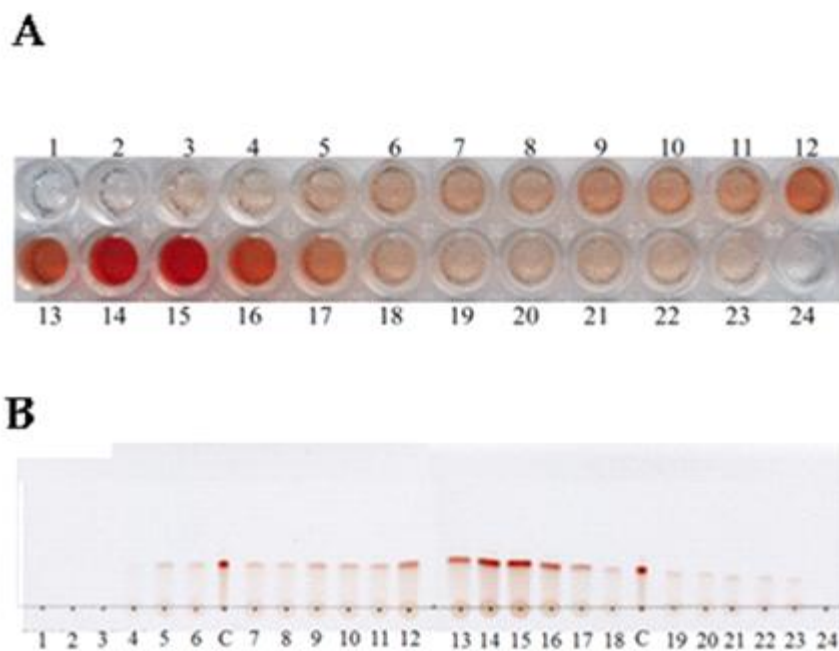


Figure 29. The color of ethyl acetate extract from the agar plugs containing actively growing mycelia (A) and the TLC analysis of corresponding ethyl acetate extract (B).

Numbers indicate sample preparations from the corresponding days after the incubation. Lane B in the TLC plate contains purified phleichrome.

## 나. Phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법 구축

### (1) Phleichrome의 효율적인 대량 분리정제법 구축

Phleichrome으로부터 약리활성을 가지는 perylenequinone 계열의 화합물을 반합성하기 위한 목적으로 *C. phlei*의 crude extract로부터 순도 높은 phleichrome의 대량정제법의 구축이 요구되었으며, 이를 위하여 1차년도에서 정립한 분석 목적의 정제법을 보다 효율적으로 개선하여 다음의 대량 정제법을 구축하였다. 이 정제법에서는 1차년도에 적용했던 LH-20 chromatography 단계를 보다 간단한 hexane 추출로 대체하여 silica gel chromatography 단계 직전에 수행하였으며, 통산·염기 처리 단계와 더불어 다량의 무극성 물질을 제거하는 효과가 입증되어 고순도의 phleichrome을 분리하는데 기여하였다. 마지막 분리 단계인 silica gel chromatography에서 최적 전개용매의 선정 연구를 통하여 전개용매의 조성을 acetonitrile : hexane = 5 : 5 로 섞은 혼합용매로 결정하였다. 결과적으로 높은 순도 (~95%)의 phleichrome을 대량 정제하는 방법을 구축하였다 (Figure 30).

### (2) HPLC를 이용한 phleichrome의 순도 결정법 재구축

Phleichrome으로부터 약리활성을 가지는 perylenequinone 계열의 화합물을 반합성하기 위해서는 출발물질로 사용되는 phleichrome의 순도 결정이 매우 중요하다. 본 연구에서는 정제된 phleichrome 순도를 신뢰도 높고 용이하게 검증할 수 있는 방법을 재구축하였다. Phleichrome의 UV-visible spectrum에서 관찰된 여러 파장에서 HPLC를 수행하여 phleichrome 이외의 불순물의 존재 여부를 확인함으로써 최종 분리된 phleichrome의 순도에 대한 신뢰도를 검증하였다 (Figure 31). Phleichrome의 순도는 94% 이상으로 나타났으며 (Figure 32), 1차년도 정제된 phleichrome 시료의 순도보다도 높게 나타나는 것을 확인하였다. 실험에 사용한 HPLC system 및 전개조건은 다음과 같다.

- HPLC System

: S 2100 Solvent delivery system, S 7131 Reagent organizer (Sykam, Germany)

- Reversed phase column

: HECTOR C18-M51002546, 250mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m, (RStech Co., Korea)

- UV-Vis Detector

: S 3210 UV-Vis detector (Sykam, Germany)

- Gradient elution system

A = Acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v)

B = H<sub>2</sub>O with 0.1% formic acid (v/v)

[ 90% B (0 min); 90% B (1 min); 0% B (20 min); 0% B (21 min); 90% B (26 min); 90% B (33 min) ]

- Flow rate : 1mL/min

- Injection volume : 5 $\mu$ l

- detecting wavelength : 280nm

위의 정제 과정으로 얻어진 phleichrome을 사용하여 calibration curve를 완성하였다 (Figure 33). 이 자료는 이 후 추출물의 phleichrome의 정량 분석에 매우 유용하게 적용하였다. 위 단계 중 acid-base 처리 정제 단계까지를 이용하여 phleichrome 일차 분리 결과는 Table 4과 같다. 각 mutant의 crude extraction 결과를 바탕으로 M45의 phleichrome 생산량이 가장 큰 것을 확인하였고, 이에 따라 M45의 추가적인 추출 및 정제 과정을 수행하였다. M45의 harvest 후 mold 59.14 g 에 대하여 grinding을 수행하였고, 이를 통해 57.93 g의 powder를 얻었다. Powder는 일련의 추출과정을 통해 ethyl acetate로 추출하였고, 추출물에 대한 두 번의 정제과정을 거쳐 phleichrome을 얻었다. 얻어진 phleichrome의 UV-vis absorbance spectrum이 기존 보고되었던 phleichrome의 최대 흡광 파장과 일치하는 것을 확인하였다 [1]. 3차 purification을 마친 phleichrome은 상당히 순수할 것으로 보여졌지만, 이후에 진행 될 다양한 약리활성물질의 합성을 위한 starting material로 사용하기 위하여 더욱 순수한 phleichrome을 확보할 필요가 있음이 확인 되었고, 따라서 flash column 을 사용하여 추가적인 분리과정을 수행하였다. 이 때, 용리액의 조건은 chloroform : methanol = 9 : 1을 사용하였다 (Figure 34). Flash column을 사용한 분리 과정까지 마치고 얻어진 phleichrome은 NMR analysis를 통해 최종 확인하였다. (Figure 35)

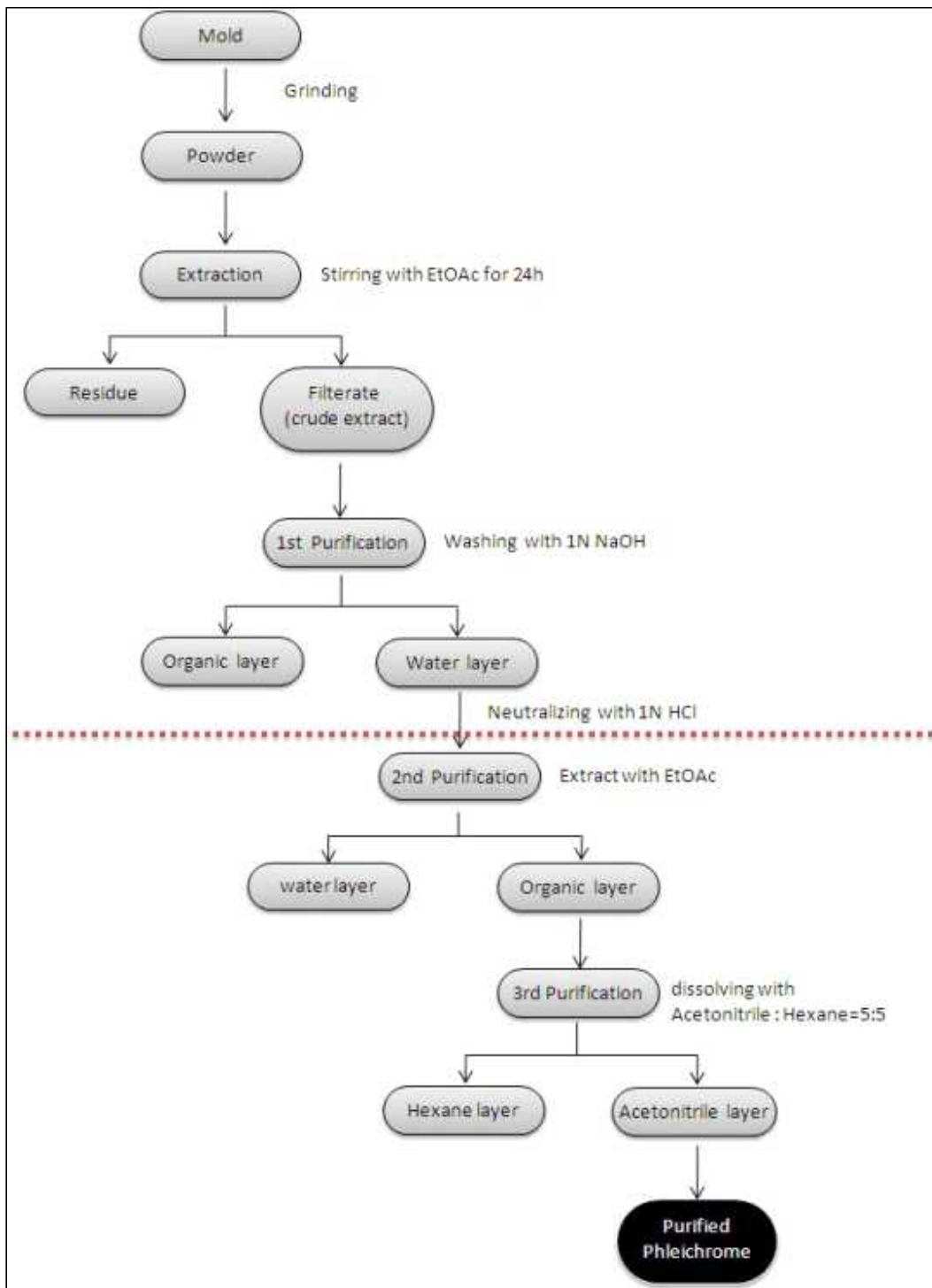


Figure 30. *C. phlei*의 crude extract로부터 고순도의 phleichrome의 대량정제 흐름도

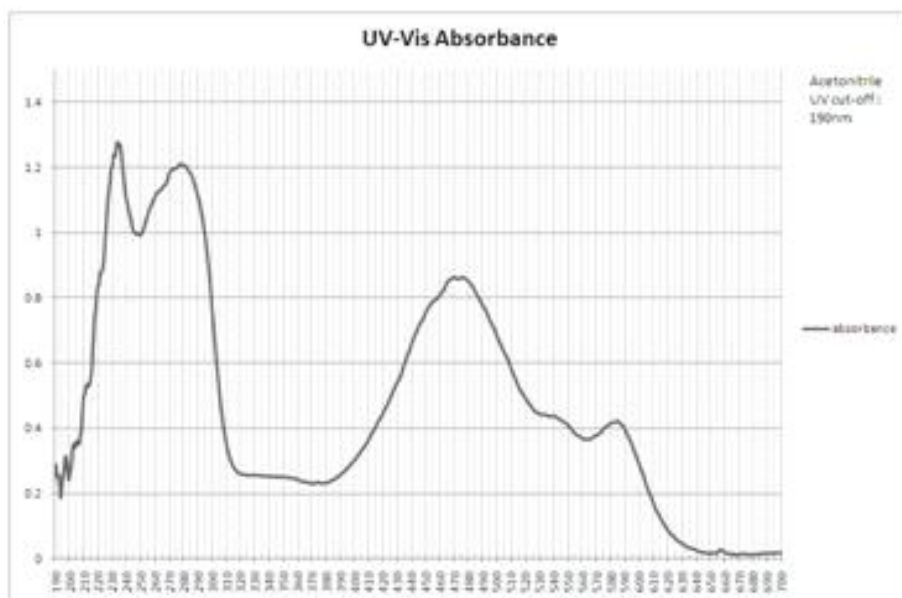


Figure 31. UV–Visible spectrum of phleichrome.

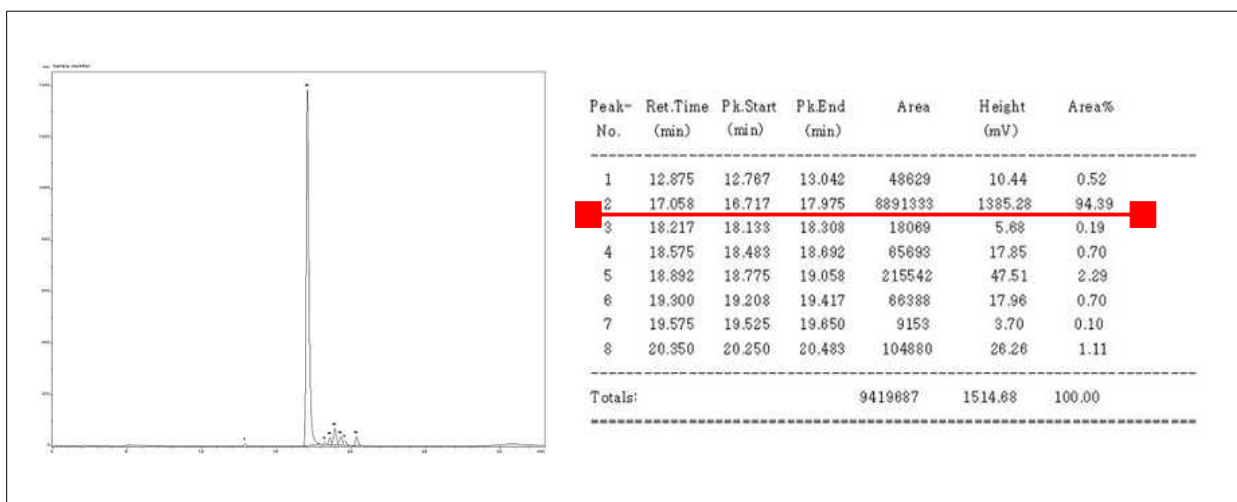


Figure 32. HPLC data of phleichrome.

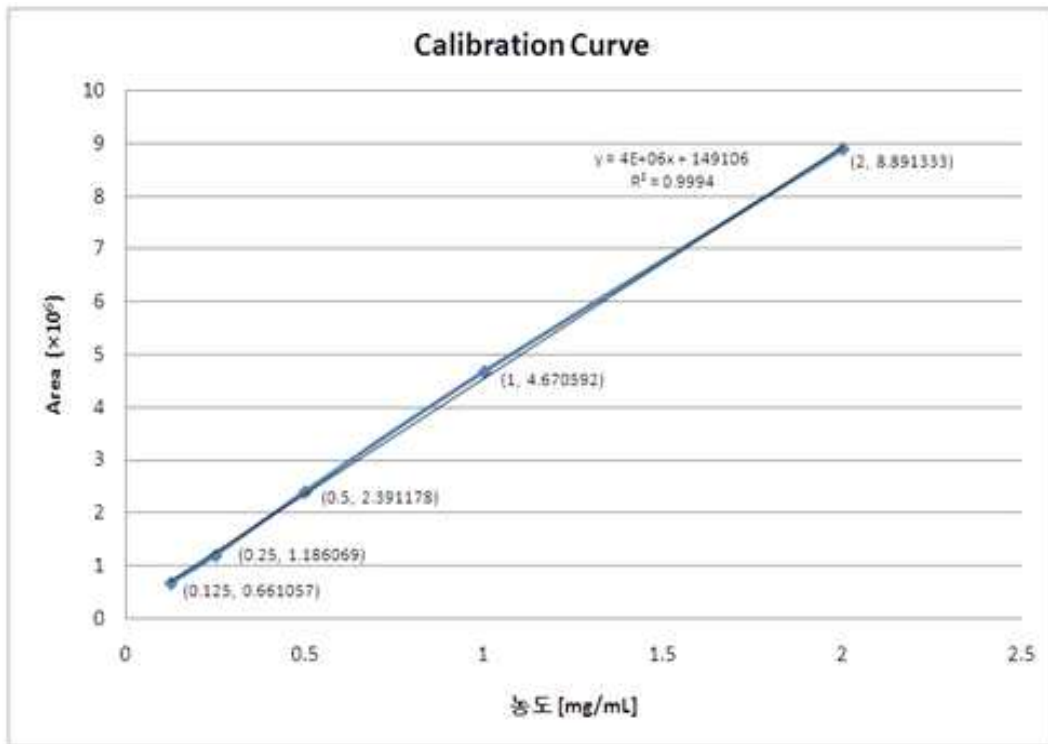


Figure 33. Calibration curve data of phleichrome.

**Table 4.** Extraction data of phleichrome

Extraction sample	stock(mg)	Extraction sample	stock(mg)
M35-100920	27	GM-M35-110805	53
WT-100920	18	GM-M45-110808	20
M35-#22-100924	6	V8-WT-110808	10
A.M35-100924	76	V8-M35-110808	14
A-Mycell WT-100925	128	V8-M45-110808	7
L-M35-100925	75	V8-WT-110823	261
L-WT-100925	53	V8-M35-110823	146
PA-M35#4-100927	16	V8-M45-110823	277
PA-WT#11-100927	8	GM-WT-110901	117
PA-WT#10-100930	8	GM-M35-110901	122
V8 WT#1-101118	10	GM-M45-110901	217
V8 WT#2-101118	8	V8-WT-110916	8
V8 M35#1-101119	8	V8-M35-110918	9
V8 M35#2-101119	6	V8-M45-110916	6
GM-WT#1-101122	16	GM-WT-110918	10
GM-WT#2-101122	18	GM-M35-110916	23
GM-M35#1-101123	7	GM-M45-110918	20
GM-M35#2-101123	6	V8-WT-111010	91
WT#1~2-110411	151	V8-M35-111010	75
M45#1~2-110411	97	V8-M45-111010	117
GM-WT-110509	261	GM-WT-111012	406
GM-M45-110509	293	GM-M35-111012	140
GM-WT-110509	20	GM-M45-111012	422

A: agar; L: liquid; V8 : 20% V8 juice, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 2% Agar; GM: 20% V8 juice, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 5% glucose, 2% Malt extract, 2% agar



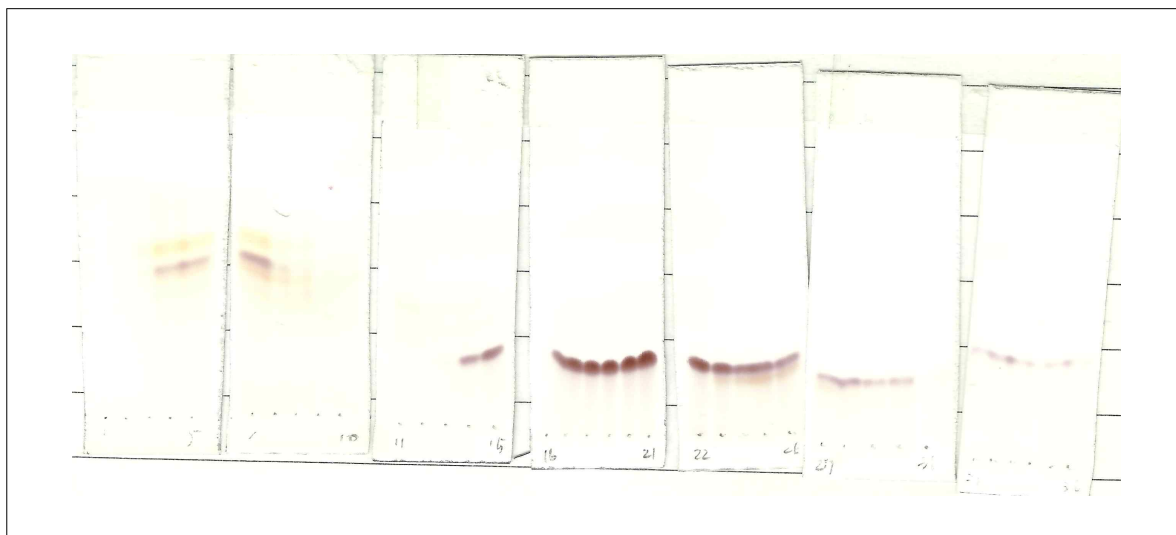


Figure 34. TLC screening of Flash column chromatography

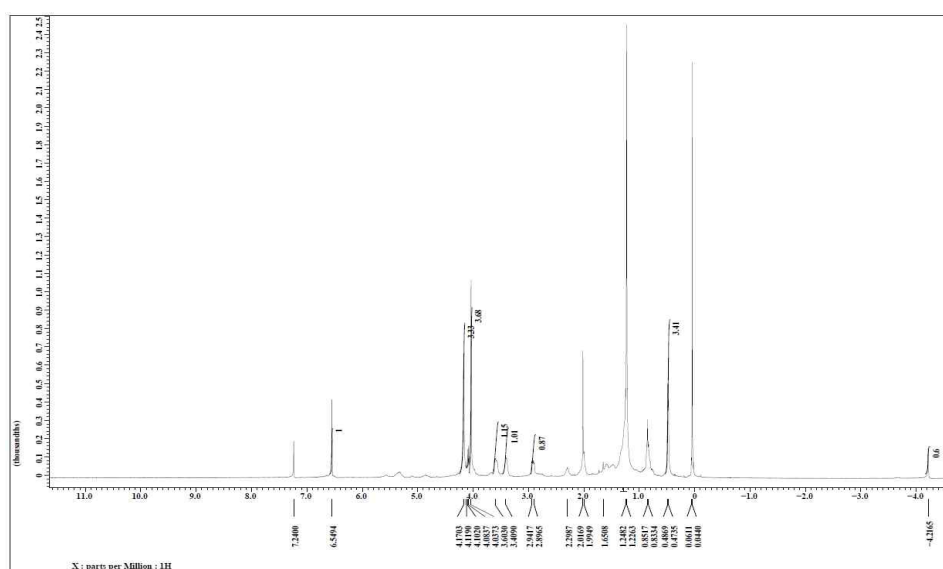


Figure 35. <sup>1</sup>H-NMR analysis of Phleichrome

## 다. *C. phlei* 대사체학 연구

### (1) *Cladosporium phlei* 균주의 phleichrome 생산량 증대를 위한 proline-based cyclic dipeptide (diketopiperazine) 계열 유도물질(inducer) 합성

제 2세부과제 연구팀은 phleichrome 대량생산을 유도하기 위한 inducer 생산을 위해 다음과 같은 합성단계를 개발하는데 성공하였다(Figure 36). 다양한 Boc-protected amino acid 1을 L-proline methylester hydrochloride를 사용하여 화합물 2로 전환시킨 후, TFA로 처리하여 TFA salt 3을 합성하였다. 화합물 3을 5% NaHCO<sub>3</sub>로 처리하여 최종물질 diketopiperazine 4를 ~90% 수득률로 합성하였다. 본 합성 단계는 총 3단계의 반응단계로써 비교적 짧고 수득률이 높으며, 이 후 합성할 계획인 다른 diketopiperazine 유도체의 합성에 매우 유용하게 적용될 수 있는 효과적인 합성법으로 판단된다. 이 합성법을 이용하여 *C. phlei*의 phleichrome 최대 생산을 유도하기 위한 실험에 필요한 양을 gram 단위 scale로 합성하여 공동 연구진에게 제공하였다. 또한, 이 화합물들이 매우 유의한 phleichrome 생산 증대 효과를 가짐을 공동연구진의 실험 결과로 확인되었다. 현재 합성한 diketopiperazine inducer는 cyclo-(L-pro-L-leu)와 cyclo-(L-pro-L-Phe)의 2종 화합물이다 (Figure 37). 두 물질의 구조는 다양한 분광학적 data를 측정하고 분석하여 결정하였으며, 이 둘 두 화합물의 분광학적 data 중 <sup>1</sup>H-NMR을 그림으로 나타내었다 (Figure 38).

현재까지 알려진 DKP유도체 중에서 Cyclo(L-pro-L-Leu)와 Cyclo(L-Pro-L-Phe)는 최근 phleichrome의 생산을 향상시키는 물질로 밝혀졌다. Cyclo(L-pro-L-Leu)와 Cyclo(L-Pro-L-Phe)는 *Epichloe thyphina*라고 하는 식내서성 곰팡이(endophytic fungus)에서 생산되는 것으로, *E.thyphina*는 phleichrome을 생산하는 *C. phlei*와 마찬가지로 원산지가 유럽과 온대아시아인 큰조아재비(timothy) 식물에서 발생하는 곰팡이로 알려져 있다. 본 연구진에서는 phleichrome의 생산성 향상을 위한 첫번째 작업으로써 phleichrome inducer로써 알려져 있는 Cyclo(L-pro-L-Leu)와 Cyclo(L-Pro-L-Phe)의 효율적인 합성법을 개발하고, 이를 이용하여 Proline-based 된 다양한 amino acid를 합성하였다 [26]. 그 후 inducer로써 알려져 있는 Cyclo(L-pro-L-Leu)와 Cyclo(L-Pro-L-Phe)를 적용한 *C. phlei*과 적용하지 않은 *C. phlei*의 차이를 연구하는데에 중점을 두었다. 현재까지 얻어진 diketopiperazine inducer는 이미 문헌에서 효과가 입증된 cyclo-(L-pro-L-leu)와 cyclo-(L-pro-L-Phe)이다(Figure 33).

Figure 36. diketopiperazine 계열의 phleichrome 생산 유도물질(inducers)의 합성

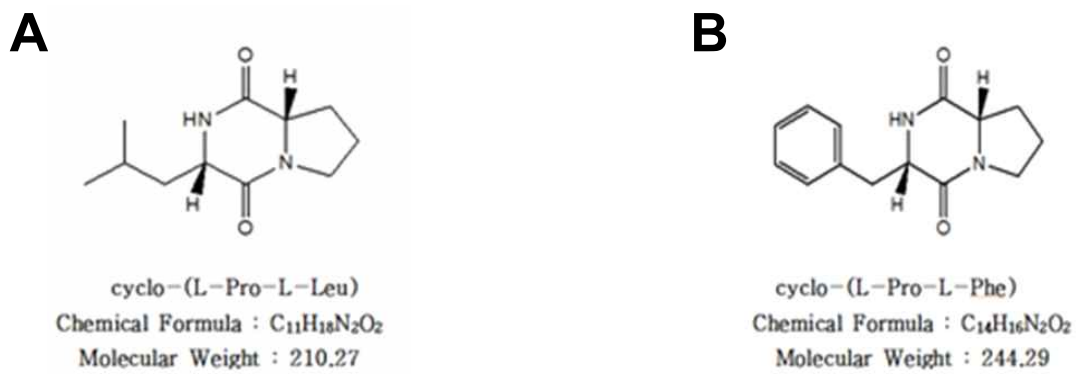


Figure 37. Chemical structure of diketopiperazine inducers.

(A) cyclo-(L-pro-L-leu) inducers and (B) cyclo-(L-pro-L-Phe) inducers.

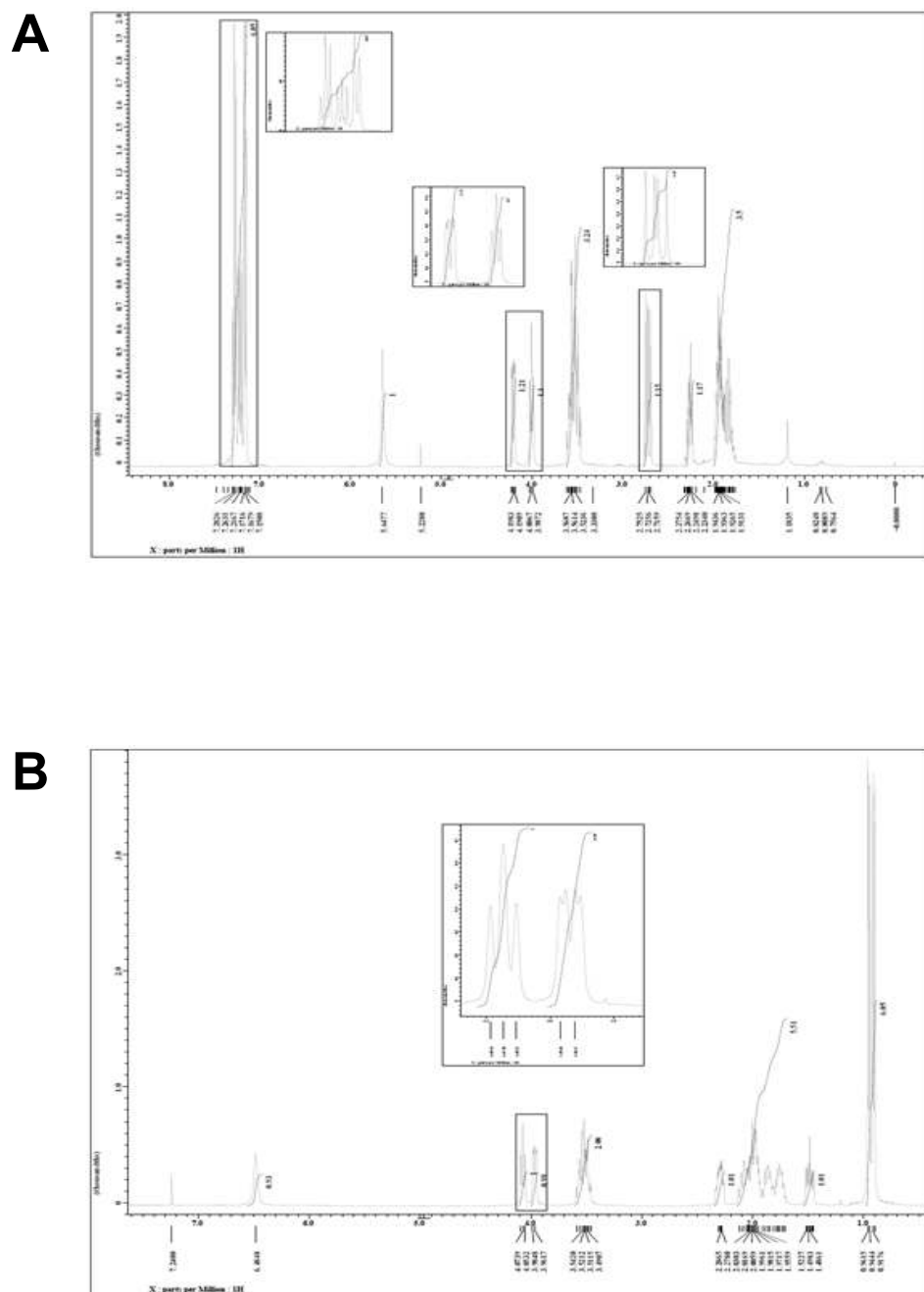
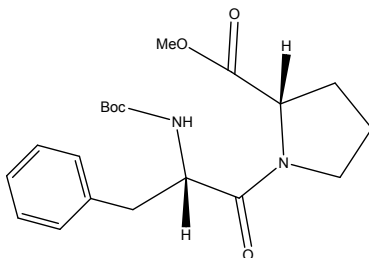


Figure 38.  $^1\text{H}$ -NMR analysis of 2 kinds of diketopiperazine inducers.

(A)  $^1\text{H}$ -NMR analysis of cyclo-(L-Pro-L-Phe) inducers. (B)  $^1\text{H}$ -NMR analysis of cyclo-(L-Pro-Leu) inducers.

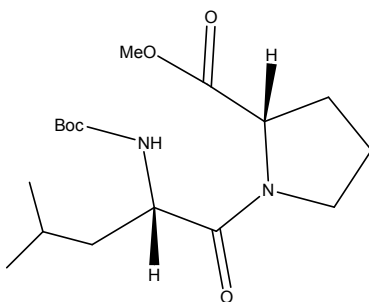
(2) diketopiperazine 유도체의 Spectroscopic data

(가) Methyl 1-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-phenylpropanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2a)



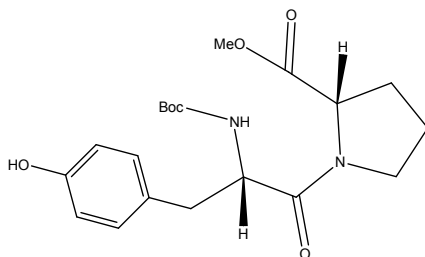
mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,400MHz):  $\delta$  7.22 (m, 5H,H-2'' ,3'' ,4'' ,5'' ,6'' ), 5.27 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$ , -NH), 4.60 (m, 1H,H-1'' ), 4.45 (m, 1H,H-5), 3.69(s,3H,-OCH<sub>3</sub>), 3.55, 3.15(m,2H,H-2), 3.05, 2.86(m,2H,H-2' ), 2.11, 1.88 (m, 4H,H-3,4), 1.33(s,9H,-Boc);  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,100MHz):  $\delta$  172.11, 170.47, 154.99, 136.24, 129.53, 128.14, 126.55, 79.37, 58.73, 53.08, 51.98, 46.63, 38.94, 28.83, 28.14, 24.69; ESI-MS (m/z) : cald for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(M+H)<sup>+</sup>:376.1998,found:377.3.

(나) Methyl 1-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-4-methylpentanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2b)



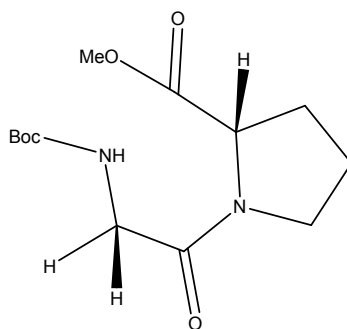
mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,400MHz):  $\delta$  5.08 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$ , -NH), 4.44 (m, 2H,H-1' ,5), 3.65 (m, 7H,H-2,4,-OCH<sub>3</sub>), 2.17,1.98(m,4H,H-2' ,3), 1.74 (m, 1H,H-3' ), 1.38 (s, 9H,-Boc),0.93(dd,6H, $J=6.3,17.8\text{Hz}$ , H-4' );  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,100MHz):  $\delta$  172.42, 171.75, 155.61, 79.41, 58.59, 52.11, 50.20, 46.63, 41.87, 28.88, 28.26, 24.83, 24.46, 23.30, 21.73; ESI-MS (m/z) : cald for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(M+H)<sup>+</sup>:342.2155,found:343.3.

(㉔) Methyl 1-(2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(4-hydroxyphenyl)propanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2c)



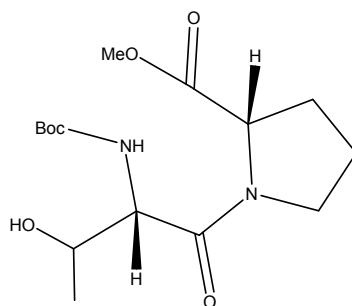
mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,400MHz):  $\delta$  7.04 (d, 2H, $J$ =8.2Hz, H-2'' , 6'' ), 6.67 (d, 2H, $J$ =8.3Hz, H-3'' ,5'' ), 5.26 (d, 1H, $J$ =8.8Hz, -NH), 4.59 (q, 1H, $J$ =6.3Hz, H-1' ), 4.48 (dd, 1H, $J$ =3.8,7.8Hz, H-5), 3.62 (m, 4H,H-2,-OCH<sub>3</sub>),3.29(p,1H, $J$ =6.3Hz, H-2), 2.98 (q, 1H, $J$ =6.3Hz, H-2' ), 2.80 (dd, 1H, $J$ =5.8,14.1Hz, H-2' ), 2.13, 1.91 (m, 4H,H-3,4),1.36(s,9H,-Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,100MHz):  $\delta$  172.31, 170.94, 155.48, 155.43, 130.65, 126.94, 115.30, 79.95, 58.92, 53.25, 52.22, 46.86, 37.82, 28.92, 28.25, 24.79; ESI-MS (m/z) : cald for  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ (M+H)<sup>+</sup>:392.1947,found:393.3.

(㉕) Methyl 1-(2-(tert-butoxycarbonylamino)acetyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2d)



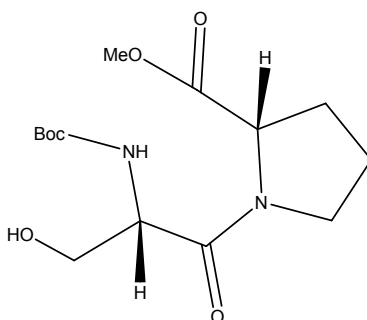
mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,400MHz):  $\delta$  5.36 (s, 1H,-NH),4.42(dd,1H, $J$ =3.8,8.5Hz, H-5), 3.85 (m, 2H,H-1' ), 3.63 (s, 3H,-OCH<sub>3</sub>), 3.50,3.39(m,2H,H-2), 2.01 (m,4H,H-3,4), 1.36(s,9H,-Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,100MHz):  $\delta$  172.15, 167.17, 155.57, 79.31, 58.63, 52.06, 45.62, 42.76, 28.77, 28.10, 24.42; ESI-MS (m/z) : cald for  $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ (M+H)<sup>+</sup>:286.1529,found:287.3.

(㉓) Methyl 1-(2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxybutanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2e)



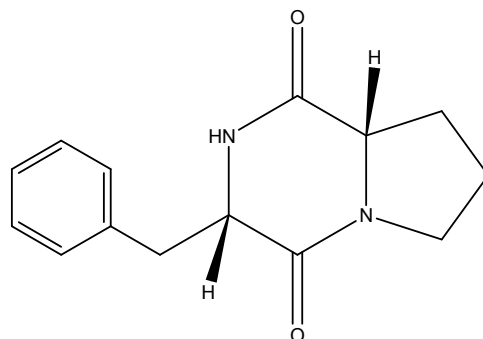
mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  5.43 (s, 1H, -NH), 4.50 (m, 1H, H-1'), 4.36 (s, 1H, H-2'), 4.12 (m, 1H, H-5), 3.72 (m, 5H, H-2, -OCH<sub>3</sub>), 3.06 (s, 1H, -OH), 2.20, 1.99 (m, 4H, H-3,4), 1.40 (s, 9H, -Boc), 1.16 (d, 3H,  $J=6.3\text{Hz}$ , H-3');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):  $\delta$  172.47, 170.95, 156.07, 79.93, 67.40, 58.83, 55.57, 52.42, 47.24, 28.91, 28.63, 24.86, 18.45; ESI-MS (m/z) : calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$  (M+H)<sup>+</sup>: 330.1791, found: 331.0.

(㉔) Methyl 1-(2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate (2f)



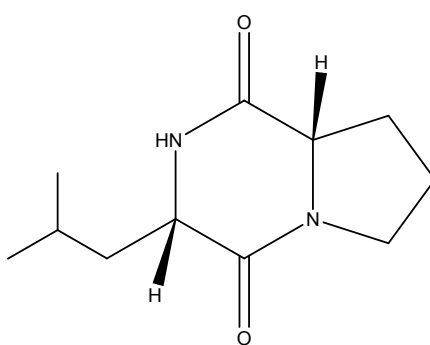
mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  4.56 (m, 2H, H-1', 5), 3.83 (m, 1H, H-2'), 3.69 (m, 4H, H-2', -OCH<sub>3</sub>), 2.90 (m, 2H, H-2), 2.23, 1.97 (m, 4H, H-3,4), 1.40 (s, 9H, -Boc);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):  $\delta$  172.89, 170.20, 155.59, 80.02, 64.18, 58.90, 52.59, 47.19, 39.11, 28.85, 28.28, 24.81; ESI-MS (m/z) : calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$  (M+H)<sup>+</sup>: 316.1634, found: 317.0.

(사) 3-benzyl-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (4a)



mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,400MHz):  $\delta$  7.28 (t, 2H, $J$ =7.8Hz, H-3'',5''), 7.21 (t, 1H, $J$ =7.3Hz, H-4''), 7.15 (d, 2H, $J$ =6.8Hz, H-2'',6''), 5.64 (s, 1H,-NH), 4.20(dd,1H, $J$ =2.9,10.7Hz, H-1'), 4.00 (t, 1H, $J$ =7.3Hz, H-5), 3.53 (m, 3H,H-2,2'), 2.72 (dd, 1H, $J$ =10.5,14.6Hz, H-2'), 2.25, 1.88 (m, 4H, H-2,3);  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,100MHz):  $\delta$  169.33, 165.01, 135.92, 129.21, 129.08, 127.49, 59.09, 56.15, 45.40, 36.75, 28.31, 22.50; ESI-MS (m/z) : cald for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2(\text{M}+\text{H})^+$ :244.1212,found:245.2.

(ㅇ) 3-isobutyl-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (4b)

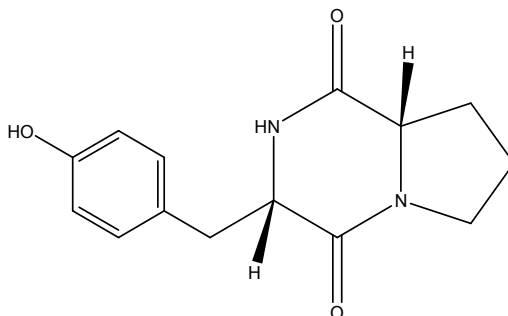


mp: °C;  $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,400MHz):  $\delta$  6.48 (s, 1H,-NH),4.07(t,1H, $J$ =7.8Hz, H-5), 3.96 (dd, 1H, $J$ =3.4,9.2Hz, H-1'), 3.52 (m, 2H,H-2), 2.29,1.91, 1.48(m,7H,H-3,4,2',3'), 0.93 (dd, 6H, $J$ =6.8,17.5Hz, H-4');  $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ,100MHz):  $\delta$  170.35, 166.20, 58.91, 53.36, 45.42, 38.49, 28.01,



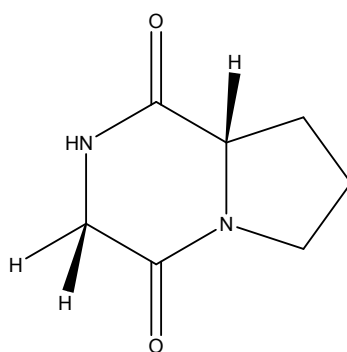
24.55, 23.20, 22.68, 21.20; ESI-MS (m/z) : calcd for  $C_{11}H_{18}N_2O_2(M+H)^+$ :210.1368,found:211.2.

(㉔) 3-(4-hydroxybenzyl)-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (4c)



mp: °C;  $^1H$ -NMR( $D_2O$ ,400MHz):  $\delta$  6.88 (d, 2H, $J$ =8.8Hz, H-2'' ,6'' ), 6.68 (d, 2H, $J$ =8.3Hz, H-3'' ,5'' ), 4.31 (s, 1H,-NH),3.82(m,1H,H-1' ), 3.31 (m, 1H,H-5), 3.14(m,2H,H-2), 3.01(dd,1H, $J$ =3.9,14.4Hz, H-2' ), 2.81 (dd, 1H, $J$ =4.3,14.1Hz, H-2' ), 1.82, 1.60, 0.56 (m, 4H,H-3,4); $^{13}C$ -NMR( $D_2O$ ,100MHz):  $\delta$  170.89, 166.76, 155.63, 132.26, 127.52, 116.18, 59.39, 57.38, 45.57, 38.21, 28.51, 21.66; ESI-MS (m/z) : calcd for  $C_{14}H_{16}N_2O_3(M+H)^+$ :260.1161,found:261.2.

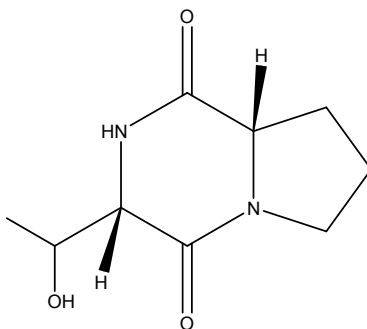
(㉕) hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (4d)



mp: °C;  $^1H$ -NMR( $D_2O$ ,400MHz):  $\delta$  4.17 (t, 1H, $J$ =6.8,7.3Hz, H-5), 4.02 (m, 1H,H-1' ), 3.73 (d, 1H, $J$ =17.5Hz, H-1' ), 3.40 (dd, 2H, $J$ =5.1,8.3Hz, H-2), 2.19, 1.84 (m, 4H,H-3,4); $^{13}C$ -NMR( $D_2O$ ,100MHz):  $\delta$  172.72, 166.80, 59.49, 46.35, 46.24,

28.68, 22.60; ESI-MS (m/z) : cald for C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(M+H)<sup>+</sup>:154.0742,found:155.1.

(카) 3-(1-hydroxyethyl)-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (4e)



mp: °C; <sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O,400MHz): δ 4.28 (dq, 1H,J=2.4,6.8Hz, H-1' ), 4.13 (m, 1H,H-5),3.98(m,1H,H-2' ), 3.49, 3.34 (m, 2H,H-2), 2.19,1.81(m,4H,H-3,4), 1.17(d,3H,J=6.8Hz, H-3' ); <sup>13</sup>C-NMR(D<sub>2</sub>O,100MHz): δ 172.63, 166.53, 66.75, 61.02, 59.63, 46.06, 29.06, 22.37, 19.32; ESI-MS (m/z) : cald for C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(M+H)<sup>+</sup>:198.1004, found:199.1.

(3) Phleichrome 유도물질의 적용

(가) Phleichrome 유도물질 (inducers)의 phleichrome 생산 유도 활성 검증

본 연구에서는 제 2 세부 과제 연구팀에서 합성한 phleichrome 유도물질의 활성을 검증하고자 하였다. 사용한 diketopiperazine inducer는 cyclo-(L-pro-L-leu)와 cyclo-(L-pro-L-Phe)의 2종 화합물이며, 이들 각각의 유도물질을 PDAMB 배지에 첨가하여 phleichrome의 생산이 유도되는지를 확인하였다. 각각의 유도물질을 5 uM, 100 uM, 150 uM, 200 uM의 농도로 첨가한 PDAMB media에서 *C. phlei* wild type 균주를 15일 동안 배양한 후, 균주의 표현형과 배지로의 phleichrome 분비량을 확인하였다. 그 결과, 각각의 유도물질을 첨가한 배지에서의 표현형은 유도물질을 첨가하지 않은 배지에서의 표현형과 조금 다르게 mycelia위로 secondary metabolite가 많이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Figure 39). 유도물질을 첨가한 배지에서 얻은 균주의 mycelia를 가지고 TLC를 수행한 결과, 150 uM의 phleichrome 유도물질들이 첨가된 배지에서의 균주가 가장 많은 phleichrome을 생산하는 것을 확인할 수 있었으며 이를 통해서 합성된 cyclo-(L-pro-L-leu)와 cyclo-(L-pro-L-Phe)유도물질이 *C.*

*phlei*에서 제대로 phleochrome의 생산을 활성화시킨다는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 40).

#### (나) phleochrome 과발현 균주에서의 cyclo-(L-pro- L-Phe) 활성 검증

앞서 확인한 유도물질 중에 좀 더 효율이 좋다 여겨지는 cyclo-(L-pro- L-Phe) 유도물질을 첨가한 PDAMB배지와 V8 juice배지에서 야생형 균주와 phleochrome 과발현 균주인 M35 균주를 배양한 후, 배지에서의 표현형과 phleochrome 생산량을 확인하였다. PDAMB 배지에서 배양했을 시, 각 균주들이 morphology가 조금 다르게 변하는 것을 확인할 수 있었다. phleochrome 유도체를 첨가하였을 때, 균체위로 분비되는 secondary metabolite들이 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었으며 pigmentation이 좀더 강하게 되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 41A). V8 juice 배지에서 배양한 균주들의 경우 morphology가 크게 변하지는 않았으나, pigmentation이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 41B). 각각의 배지에서 mycelia를 회수하여 ethyl acetate와 반응시켜 TLC를 통해서 phleochrome의 생성량을 확인해 보았다. 모든 배지와 균주에서 phleochrome 유도체를 넣었을 시에 phleochrome의 생산이 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 42-43). 특히 phleochrome 유도물질을 100 uM이상을 넣었을 시에 보다 많이 phleochrome을 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해서 phleochrome 유도체를 넣어 배양시 야생형 균주는 크게 상관없지만 phleochrome 과발현 균주인 M35의 경우, PDAMB 배지보다 V8배지에서 배양하였을 시 phleochrome을 많이 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 추가적으로 이들 각각의 용액을 spectrophotometer를 통해서 정량화하여 phleochrome 생산량을 정량화 하는 실험이 진행 중에 있다.

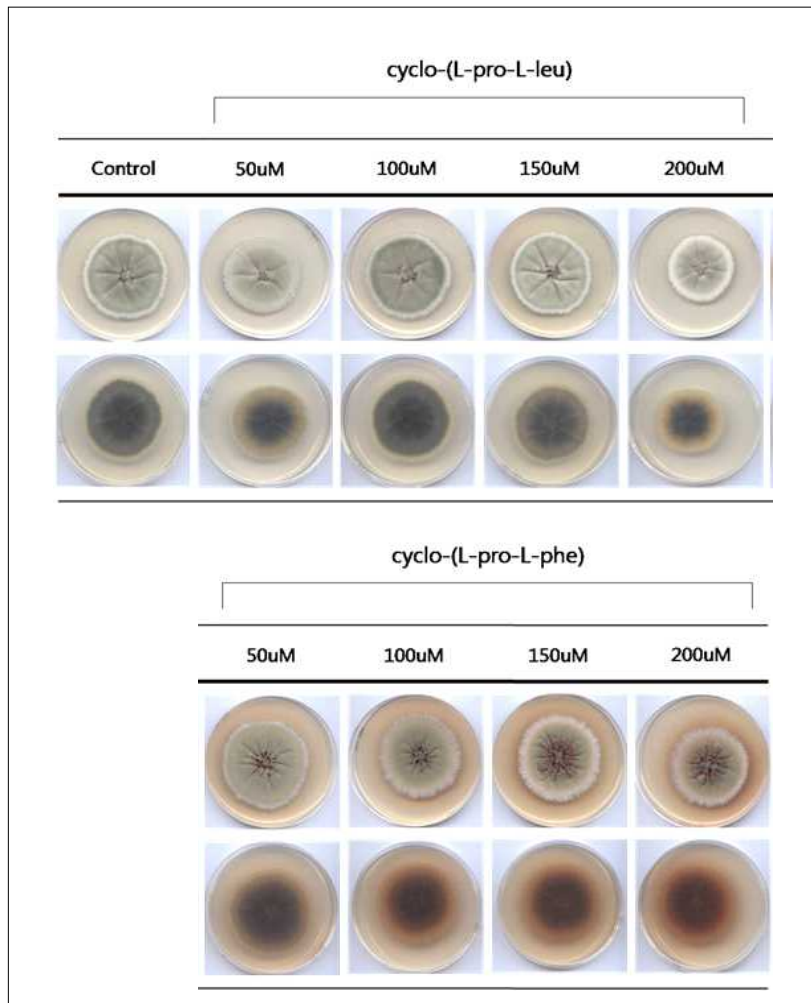
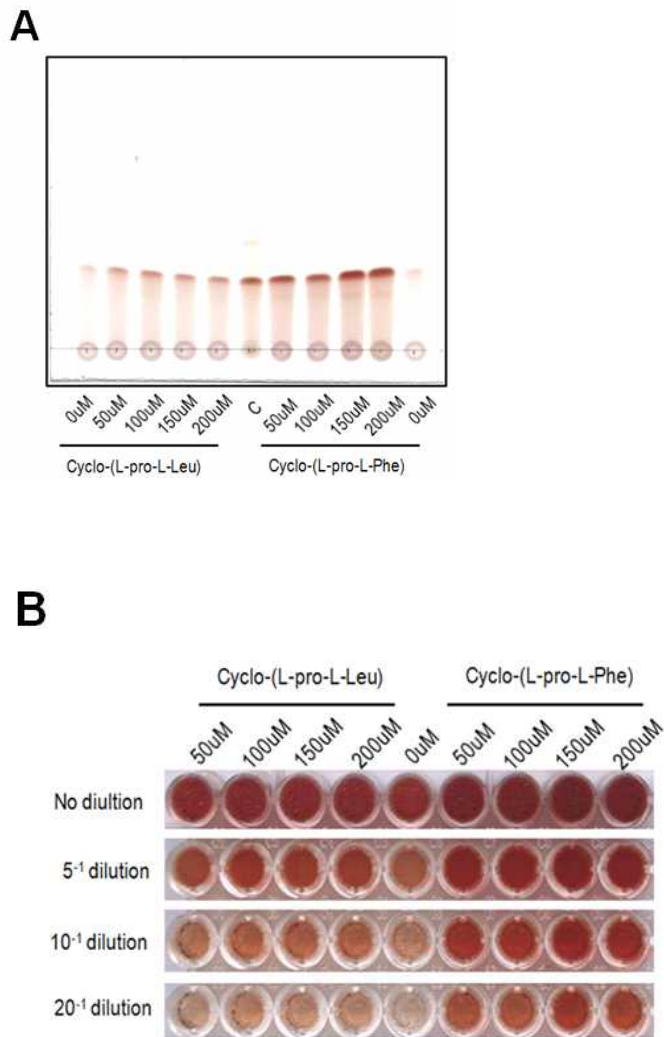


Figure 39. Morphology of wild type of *C. phlei* on the PDA plate supplemented with cyclo-(L-pro-L-leu) and cyclo-(L-pro-L-phe) inducer.



**Figure 40. Phleichrome extraction from mycelia**

(A) TLC analysis of the ethyl acetate extract of mycelia. (B) The color of ethyl acetate extract from mycelia.

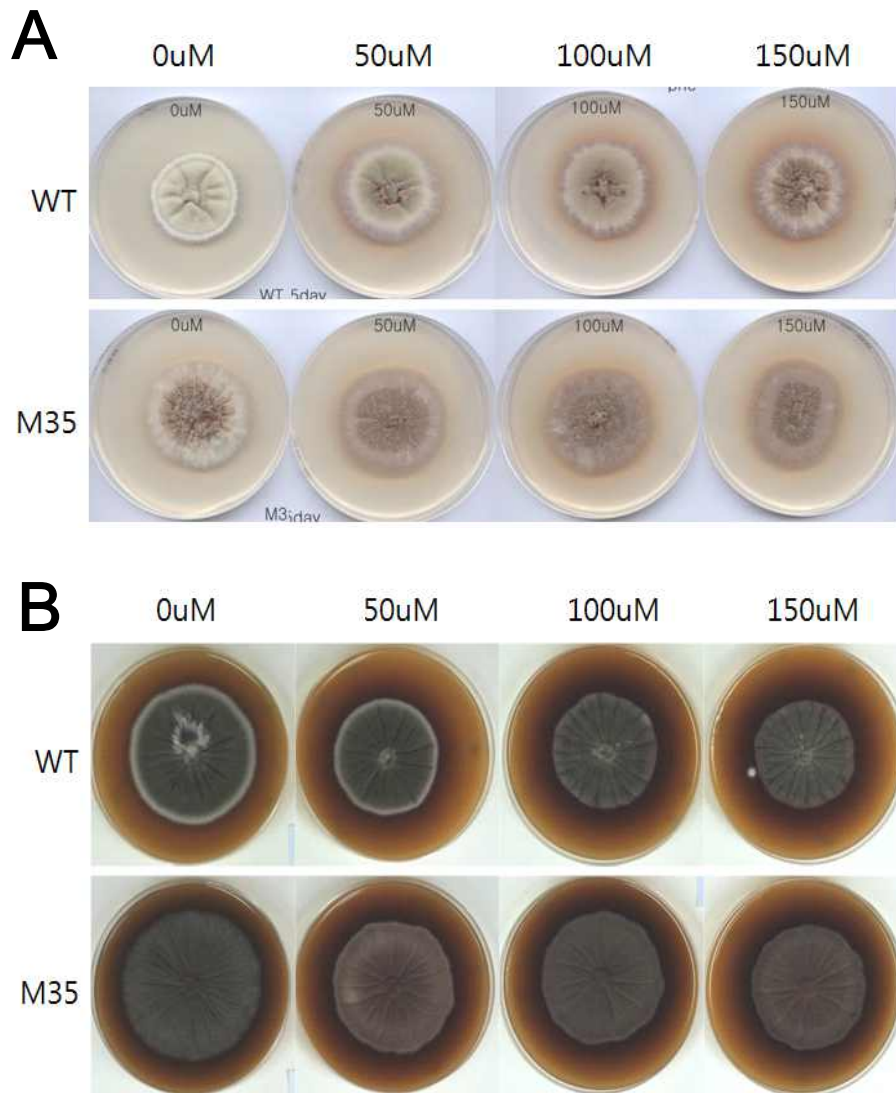
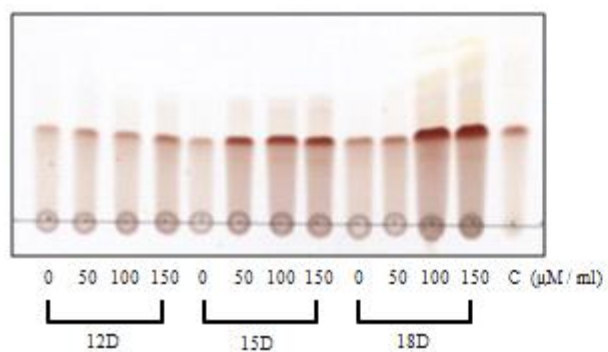


Figure 41. Morphology of wild type and mutant 35 of *C. phlei*

(A) morphology on the PDA plate supplemented with cyclo-(L-pro-L-phe) inducer.

(A) morphology on the V8 juice plate supplemented with cyclo-(L-pro-L-phe) inducer

**A**



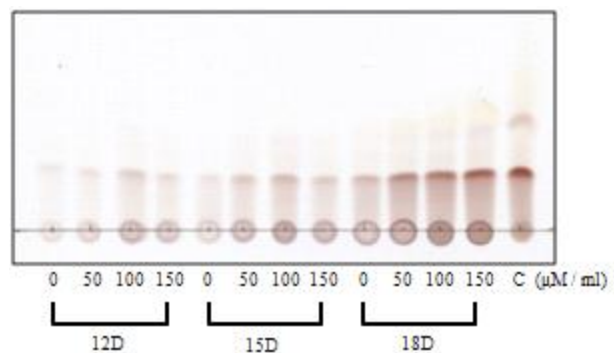
Set 1-1) Mycelia 1g +2ml Ethyl acetate

0.5  $\mu\text{l}$  total 2  $\mu\text{l}$  spotting

C : control( purified phleichrome 10mg/ml)

0.5  $\mu\text{l}$  total 1  $\mu\text{l}$  spotting (10  $\mu\text{g}$ )

**B**



Set 1-1) Mycelia 1g +2ml Ethyl acetate

0.5  $\mu\text{l}$  total 2  $\mu\text{l}$  spotting

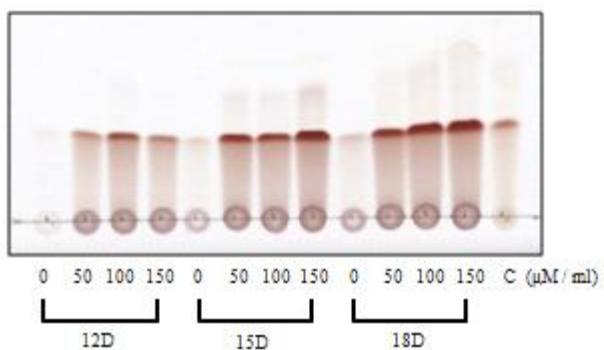
C : control( purified phleichrome 10mg/ml)

0.5  $\mu\text{l}$  total 1  $\mu\text{l}$  spotting (10  $\mu\text{g}$ )

Figure 42. Phleichrome extraction from mycelia on PDA media

(A) TLC analysis of mycelia of wild type. (B) TLC analysis of mycelia of mutant 35.

**A**



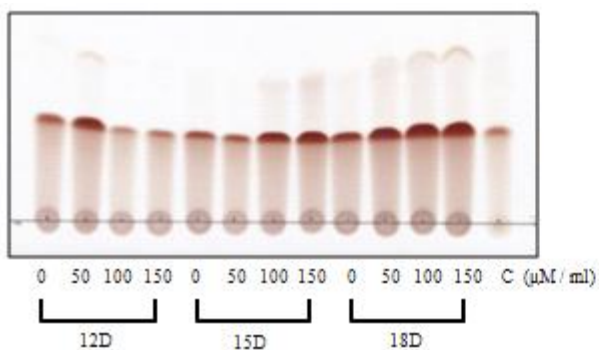
Set 1-1) Mycelia 1g +2ml Ethyl acetate

0.5  $\mu\text{l}$ 씩 total 2  $\mu\text{l}$  spotting

C : control( purified phleichrome 10mg/ml)

0.5  $\mu\text{l}$ 씩 total 1  $\mu\text{l}$  spotting (10  $\mu\text{g}$ )

**B**



Set 1-1) Mycelia 1g +2ml Ethyl acetate

0.5  $\mu\text{l}$ 씩 total 1  $\mu\text{l}$  spotting

C : control( purified phleichrome 10mg/ml)

0.5  $\mu\text{l}$ 씩 total 1  $\mu\text{l}$  spotting (10  $\mu\text{g}$ )

Figure 43. Phleichrome extraction from mycelia on V8 juice media

(A) TLC analysis of mycelia of wild type. (B) TLC analysis of mycelia of mutant 35.



#### (4) *C. phlei*의 발효 최적화

*C. phlei*의 발효최적화를 위해 발효조에서 배양을 시도하였다. 플라스크 배양과 비교 시 발효조에서의 배양은 산소전달, 전단응력, pH등의 운전조건이 다르므로 배지의 최적 조성비도 플라스크 배양과는 다소 상이할 수 있을 것으로 예상된다. 그러나 플라스크 배양에서 얻은 결과를 토대로 발효조 운전조건을 확립하는 실험을 수행하였다. 2.5 L의 발효조 (Kobio Tech Co. Ltd.)에서 1.5 L로 조업부피를 유지하였다. 공기유속은 2 vvm (volume of air/ volume of fluid/ min), 교반속도는 200 rpm, pH는 5로 유지하였다. 발효 중 거품을 제거하기 위해 소포제를 사용하였으며, 증발로 인한 배지의 감소를 막기 위해서 습윤기를 공기 공급라인에 설치하여 공기 중의 수분함량을 포화상태로 유지하여 발효조로 공급하였다. 종균배양은 플라스크 배양방법과 동일한 방법으로 배양하였으며, 발효조에 10%(v/v) 접종하여 실험을 수행하였다. 배양 기간 동안 일정 시간마다 시료를 취하여 건조균체질량과 phleochrome 생산을 분석하고 용존산소농도의 변화를 관찰하였다. 발효조 배양 실험 시 발효조는 121℃에서 15분간 고압살균 하였고, 살균 후 무균상자에서 방냉하고, 살균한 배지를 분주하였다. 현재 나온 데이터 값을 분석 중에 있으며, 추가적으로 통계학적 실험계획법에 의한 생산배지 최적화를 진행하기 위해 FAT 방법을 이용한 영양원의 선별을 수행하고 있다.

## 5. Phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체의 합성

### 가. Hypocrellin B의 반합성

중국의 특정지역에서 자생하는 곰팡이 (*Hypocrellabambuase*)로부터 추출 및 정제된 hypocrellin B는 광감각제로서 매우 우수한 특성을 보이는 물질로서 그 항암효과뿐만 아니라 HIV를 포함한 항바이러스 활성을 보이며, 세포 분화 및 생존에 필수적인 효소인 protein kinase C에 대한 활성을 나타내어 관련 분야의 매우 유망한 의약품 후보 물질로 많은 과학자들의 주목을 받고 있다. 그러나 hypocrellin B를 곰팡이로부터 추출 및 정제하여 사용하는 것이 매우 제한적이므로 hypocrellin B의 화학적인 합성법의 연구가 진행되어왔다.

현재까지 알려진 hypocrellin B의 유기화학적 전합성법은 13~14단계 또는 그 이상을 필요로 한다. 이러한 방법을 통해 hypocrellin B를 합성할 경우에는 starting material로부터 최종물질인 hypocrellin B를 얻는데 까지 몇 달을 넘나드는 상당히 긴 시간이 소요될 뿐만 아니라 매우 낮은 overall yield를 가진다. 따라서 hypocrellin B의 전합성 과정 중의 중간체 역할을 하는 phleichrome을 미생물로부터 추출하여 starting material로 사용하여 hypocrellin B의 생합성(반합성) 과정은 그 단계가 매우 짧으며, 입체특이성의 조절이 가능하다는 면에서 기존의 유기 전합성 과정에 비하여 매우 경제적이다 (Figure 44)

Non-protic solvent를 사용하여 4,9-dihydroxy-3,10-perylenequinone core (Phleichrome) **1**과 methylating agent를 mild한 base 존재 하에서 반응시켜 4,9-dimethoxy-3,10-perylenequinone core **2**를 얻었다 [27]. 이 단계에서 얻어진 화합물 **2**는 반응 조건이 상당히 mild하였음에도 불구하고 그 수율이 좋지 않아 solvent 조건 및 base 조건 등에 다양한 변화를 주어 최적의 조건을 찾으려 노력하였다. 그 결과, 10% 미만이던 수율을 최고 75.8%까지 올릴 수 있는 반응 조건을 찾았다.(Table 6)

최고 yield를 보인 반응 조건은 solvent로서 정제된 acetone을 사용하여 phleichrome **1**과 methylating agent인 dimethyl sulfate를  $K_2CO_3$  존재 하에서 반응시켜 4,9-dimethoxy-3,10-perylenequinone core **2**를 얻는 방법이다. 이 반응의 TLC 모니터링 결과와 반응의 crude product로부터 product를 분리하기 위하여 용리액 조건을 chloroform : methanol= 9 : 1로 하는 column 과정의 TLC 양상 및 화합물 **2**의 NMR 분석 spectrum은 각각 다음과 같다 (Figure 45-48).

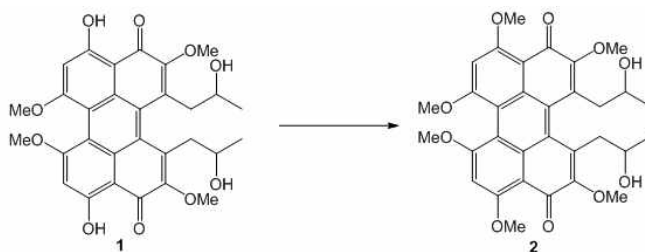
이후 Lown이 보고한 방법에 준하여 화합물 **2**로부터 4,9-dimethoxy-3,10-perylenequinone core **3**을 합성하는 반응을 진행하였으며 이 반응의 TLC 모니터링

결과와 반응의 crude product로부터 product를 분리하기 위하여 용리액 조건을 chloroform : methanol = 9 : 1로 하는 column 과정의 TLC 양상 및 화합물 **3**의 NMR 분석 Spectrum은 각각 다음과 같다 (Figure 49-51) [28].

현재까지 얻어진 **3**으로부터 문헌에 보고된 방법에 준하여 최종적으로 hypocrellin B **4**의 합성을 진행할 계획이다.

Figure 44. Semi-synthesis of Hypocrellin B from phleichrome as a starting material

Table 6. Optimization study for methylation of Phleichrome



Base	Methylating agent	solvent	yield
TBAF	Methyl iodide	THF	4.5%
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Methyl iodide	Acetone	4.8%
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Methyl iodide	THF	16.5%
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Methyl iodide	DMF	57.6%
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Dimethyl sulfate	Acetone	75.8%

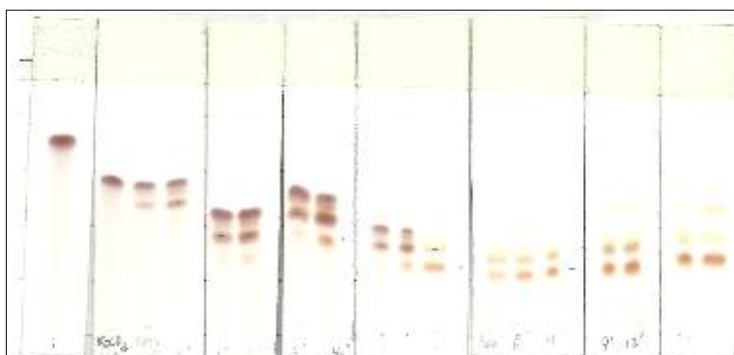


Figure 45. TLC Monitoring of the reaction from 1 to 2

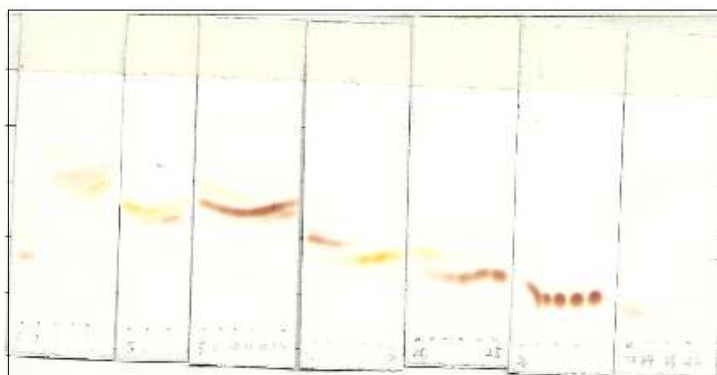


Figure 46. TLC screening of Flash column chromatography for 2

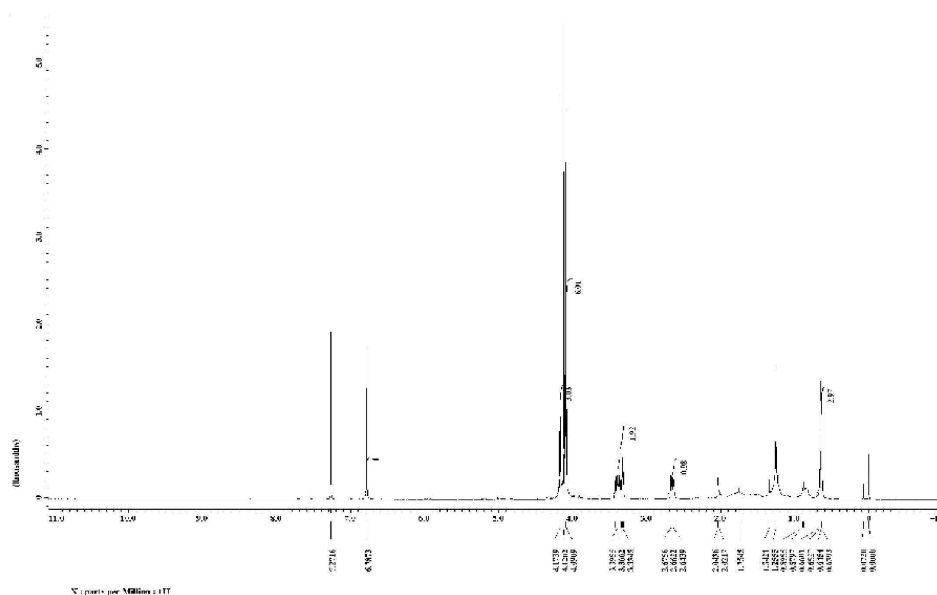


Figure 47.  $^1\text{H}$ -NMR analysis of 2

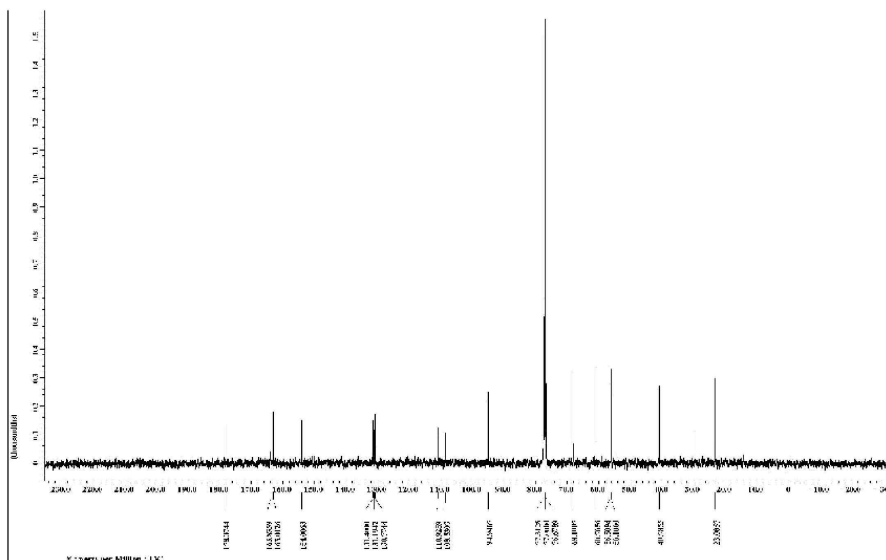


Figure 48.  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis of 2



Figure 49. TLC Monitoring of the reaction from 2 to 3

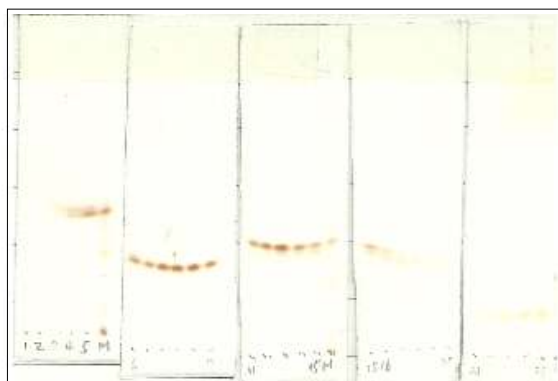


Figure 50. TLC screening of Flash column chromatography for 3

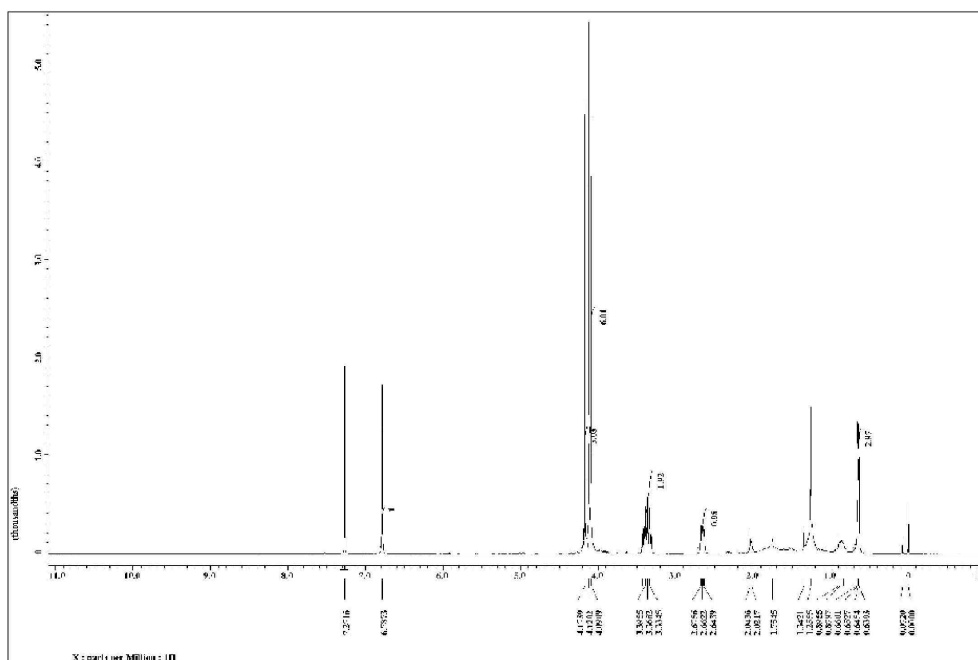


Figure 51.  $^1\text{H}$ -NMR analysis of 3

## 나. Phleichrome의 aminated 유도체의 합성

주로 미국과 중국에서 신규 감광각제의 개발을 목적으로 다양한 종류의 perylenequinone 계열의 화합물, 즉 hypocrellin, phleichrome, calphostin 등의 천연 화합물의 구조를 기본 구조로 하여 다양한 구조적 변화를 도입한 유도체가 합성되고 있다. 특별히 중국을 중심으로 한 연구에서는 주로 천연에서 생산되는 천연 hypocrellin B로부터 구조적 변형을 유도한 다양한 유도체들을 합성되고 있으며, 이들 화합물들에 대한 광생물학적 (photobiologic) 특성을 측정하여 구조-활성간의 상관관계의 규명 분야에 치중하고 있다. hypocrellin B의 경우 비교적 좋은 광감각적 활성을 보이는 것으로 알려져 왔음에도 불구하고 이 물질 역시 광에너지 요법에 사용되는 빛의 에너지영역 (600-950 nm)에서 빛의 흡수가 충분치 않아 직접 적용 할 만큼 광활성 정도가 높지 않고 (red shift window), 또한 생리적 조건하에서 친소성 (최적의 hydrophobicity) 이 낮은 단점을 가진다. 따라서 hypocrellin B의 광감각제로서의 우수한 장점을 유지 혹은 향상시키면서 단점을 보완할 수 있는 다양한 구조의 hypocrellin B 유도체를 hypocrellin B 자체로부터 합성하는 노력이 계속되고 있으며, hypocrellin B의 특정 탄소 위치에 sulfonation, amination, halogenation, metal ion complex 형성 반응을 통하여 다양한 새로운 유도체들의 개발이 진행되어 왔으며, 현재는 aminated 계열의 화합물들이 집중적으로 합성되고 있다 (Figure 52) [4] [29].

이 같은 hypocrellin B 유도체에 관한 연구를 바탕으로 하여 본 연구진이 확보하고 있는 기술로 분리 및 정제를 마친 phleichrome를 출발 물질로 하여 hypocrellin B의 반합성 연구와 동시에 Phleichrome의 유도체 연구에 착수하였고, 현재 다양한 amine을 사용하여 amino-substituted phleichrome의 합성하는 연구를 수행 중에 있다.

그 중 첫째로, phleichrome 1에 cyclohexylamine을 도입하는 반응을 수행하였다. 반응은 solvent로서 정제된 pyridine 하에서 phleichrome에 cyclohexylamine을 RT에서 75h 동안 stirring하여 4번 위치에 선택적으로 cyclohexylamine이 도입된 phleichrome 5를 얻는다 (Figure 53). 반응 진행과정의 TLC를 이용한 모니터링 결과와 반응 종결 후 crude product로부터 flash column을 사용하여 product 5를 분리하는 과정의 TLC 양상은 다음과 같다. 이때 TLC 및 Flash column의 용리액 조건은 hexane : chloroform : methanol = 4 : 3 : 1이다.(Figure 54, 55) 반응 결과 얻어진 화합물 5의 NMR 분석 spectrum은 다음과 같다(Figure 56). 이후 이에 준하는 방법들을 사용하여 benzylamine, ethylenediamine, n-butylamine과 같은 다양한 amine을 phleichrome에 도입하는 반응들을 현재 수행 중에 있다.



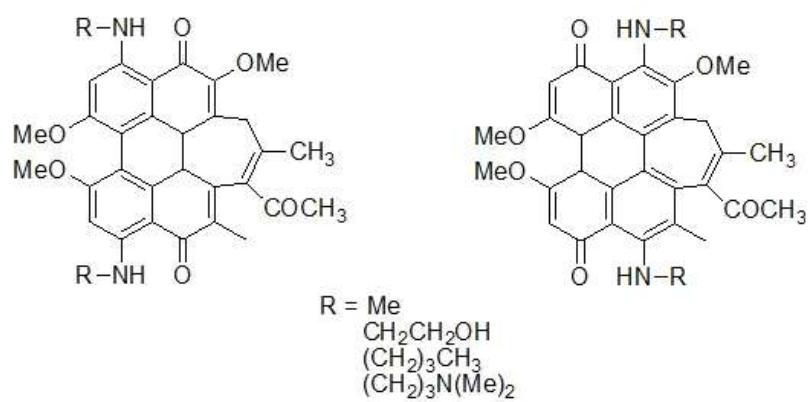


Figure 52. Amino-substituted hypocrellin B derivatives

Figure 53. Synthetic method to cyclohexylaminated phleichrome

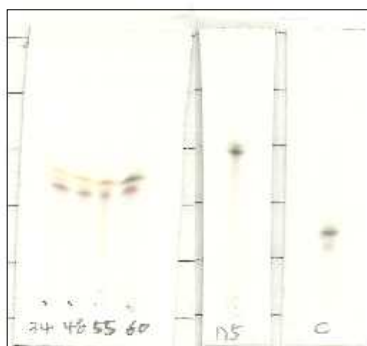


Figure 54. TLC Monitoring of the reaction from 1 to 5

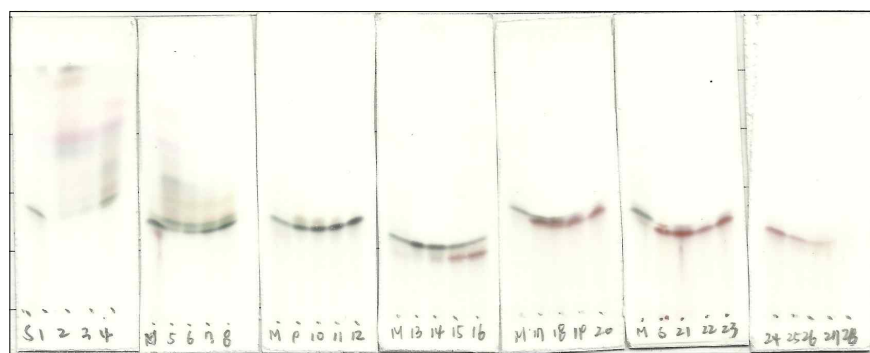


Figure 55. TLC screening of Flash column chromatography for 5

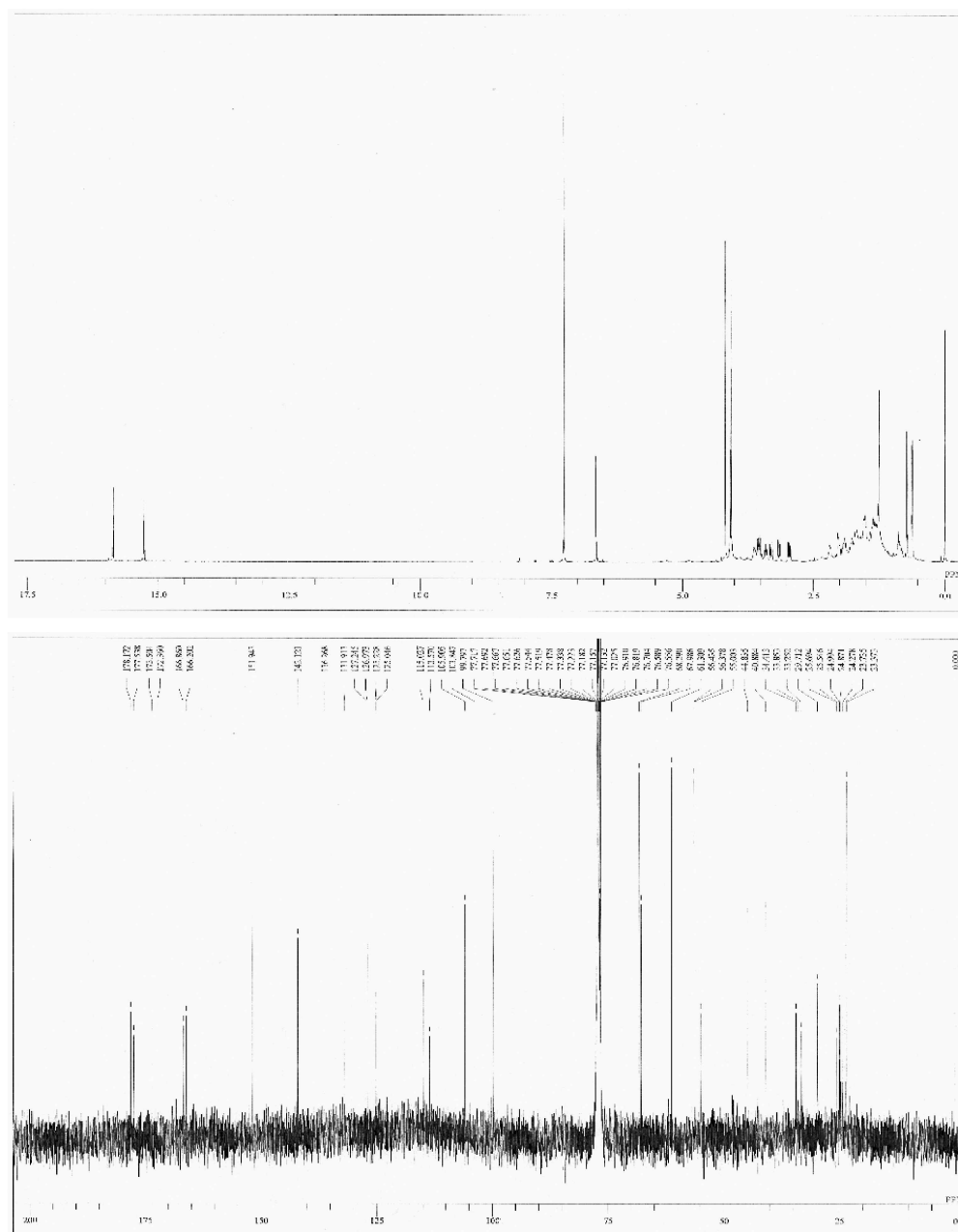


Figure 56.  $^1\text{H}$ -NMR &  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis of 5

## 6. 농업폐기물을 활용한 배양조건 확립

### 가. *C. phlei*가 배양가능한 농작물 탐색

*C. phlei*는 벼목 화분과 timothy, 통화식물목 가지과 토마토, 중심자목 석죽과 카네이션의 농작물에서 성장하므로, 농작물의 성분이 포함된 배양조건에서 2차 대사산물의 생성량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 1차년도 기초 조사를 기반으로 대사물질 생산량을 최적화하는 농작물을 조사하고 각 작물에 따른 *C. phlei*의 배양가능성을 상세히 확인하고자 하였다. *C. phlei* 배양 최적화 배지의 주성분인 V8 juice 음료에는 여러 채소들이 들어가 있다. 그 중에서 흔히 구할 수 있는 토마토, 적색양배추 그리고 당근을 선택하였다. 특히 토마토 생산의 경우, 전체 과채류 생산의 약 16.5%를 차지하고 있으며 최근 웰빙 바람을 타고 매년 생산량이 증가하고 있기 때문에 상대적으로 재배 면적 대비 농업 폐기물 역시 많이 생성될 것이라고 예상된다. 따라서 *C. phlei* 균주의 대량생산에 사용하여 균주의 대량생산 비용을 절감시킬 수 있을 것이라 추정되었다.

### 나. 농작물을 첨가한 배지에서의 균주 특성 탐색

선행연구를 통해 확인된 *C. phlei* 배양 최적화 배지의 주성분인 V8 juice에 첨가되는 채소인 토마토, 적색양배추 그리고 당근을 녹즙기로 즙을 내어 즙만을 배지에 농도별로 첨가하여 *C. phlei* wild type 균주를 배양 관찰하였다. 토마토 배지의 경우, 실험실에서 최적화 배지로 사용되는 V8 juice 배지에서 자라는 표현형(Figure 57)과 비슷하게 자랐으며, 성장률 역시 크게 차이나지 않는 것으로 보여 졌다(Figure 58). 토마토를 첨가한 배지와 마찬가지로 적색양배추를 첨가한 배지 역시 유사한 표현형과 성장률을 보였다(Figure 59). 당근을 첨가한 배지의 경우에는 다른 최적화 배지인 V8GM 배지에서 자라는 표현형과 유사하게 자랐으며, 당근 즙을 50% (v/v)의 비율로 넣은 배지에서 가장 좋은 성장률을 보였다(Figure 60). 본 연구에서는 토마토, 적색양배추, 당근을 첨가한 배지에서 자라나는 표현형과 성장률이 실험실에 사용되는 최적화 배지에서 배양했을 경우의 성장률과 크게 차이 나지 않음을 확인 할 수 있었다(Figure 61). 이를 통해서 *C. phlei*의 농업 폐기물을 활용하여 실용화 단계에 응용할 수 있는 가능성을 확인하였으며, 추가적으로 현재 이들 각각의 농작물 첨가 배지에서 키운 야생형 균주와 과발현 균주들을 대상으로 색소체를 분리하여 TLC를 수행함으로써 대사물질 생산량을 최적화하는 농작물을 조사 중에 있다.

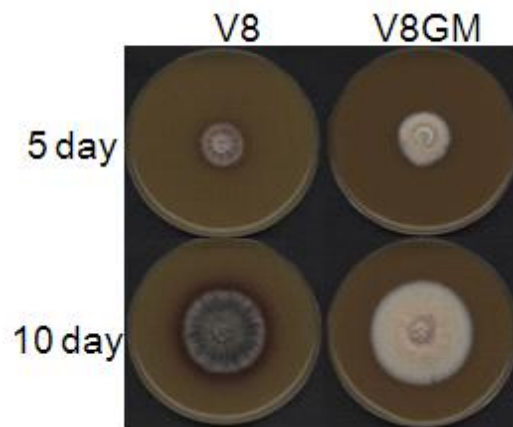


Figure 57. Colony morphology of wild type strain of *C.phlei* on the optimal medium. The wild type colony morphology on V8 juice media, V8GM media supplemented with  $\text{CaCO}_3$  after 5day, 10day.

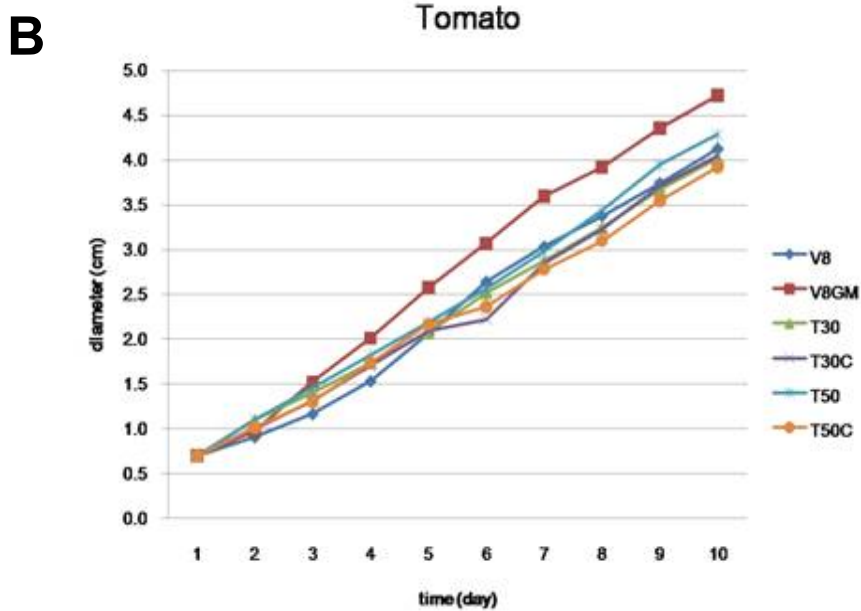
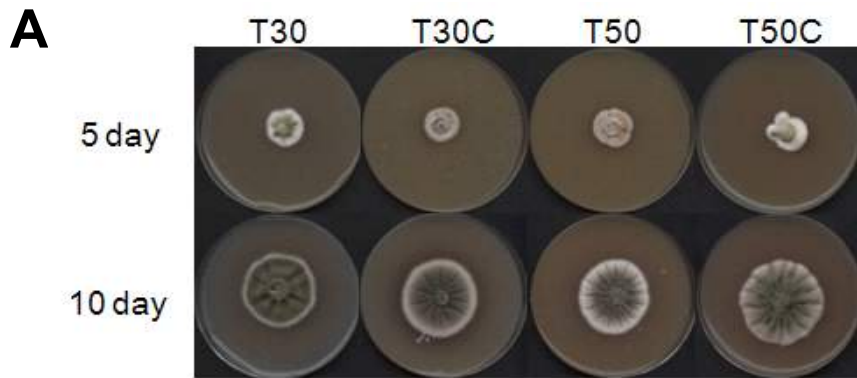


Figure 58. Colony morphology and vegetable growth on the Tomato media.

(A) The wild type colony morphology on Tomato 30%, Tomato 30% supplemented with  $\text{CaCO}_3$ , Tomato 50% and Tomato 50% supplemented with  $\text{CaCO}_3$  after 5day, 10day. (B) Vegetative growth of *C. phlei* wild type strain in 6 kinds of media (V8, V8GM, T30, T30C, T50, T50C).

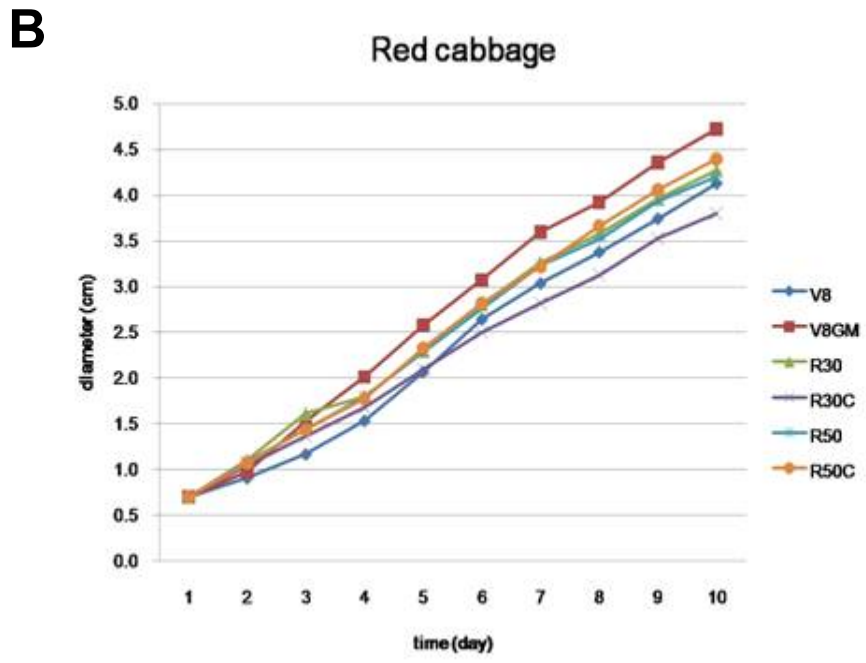
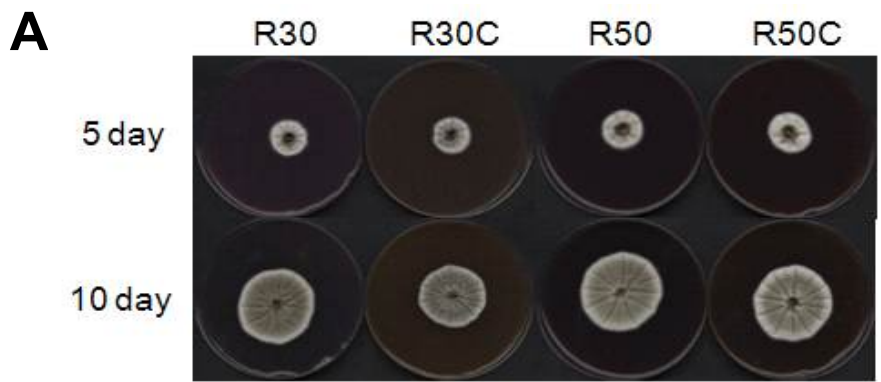


Figure 59. Colony morphology and vegetable growth on the Red cabbage media. (A) The wild type colony morphology on Red cabbage 30%, Red cabbage 30% supplemented with  $\text{CaCO}_3$ , Red cabbage 50% and Red cabbage 50% supplemented with  $\text{CaCO}_3$  after 5day, 10day. (B) Vegetative growth of *C. phlei* wild type strain in 6 kinds of media (V8, V8GM, R30, R30C, R50, R50C).

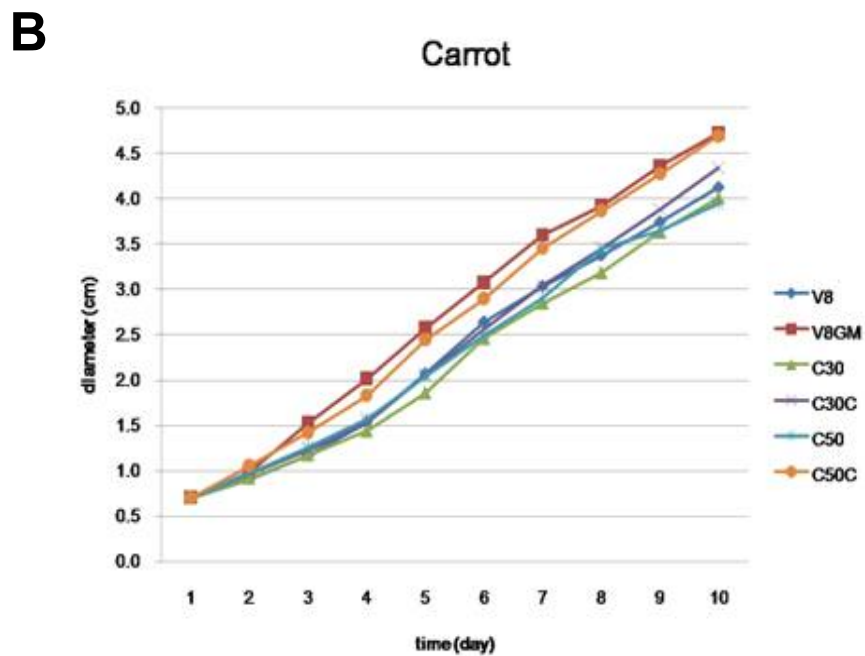
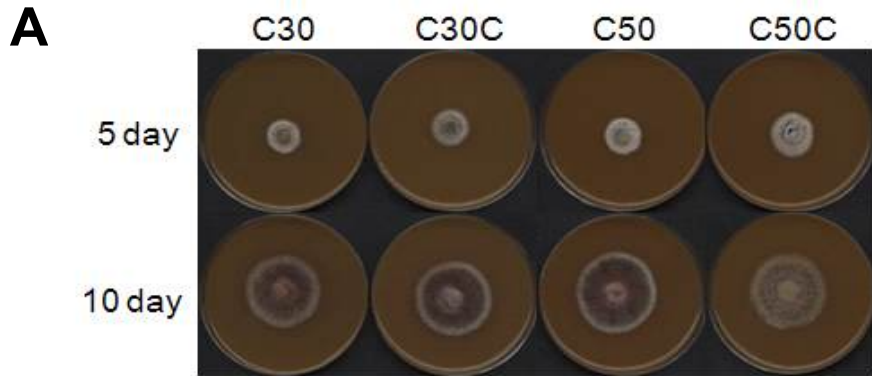


Figure 60. Colony morphology and vegetable growth on the Carrot media.

(A) The wild type colony morphology on Carrot 30%, Carrot 30% supplemented with  $\text{CaCO}_3$ , Carrot 50% and Carrot 50% supplemented with  $\text{CaCO}_3$  after 5day, 10day. (B) Vegetative growth of *C. phlei* wild type strain in 6 kinds of media (V8, V8GM, C30, C30C, C50, C50C).



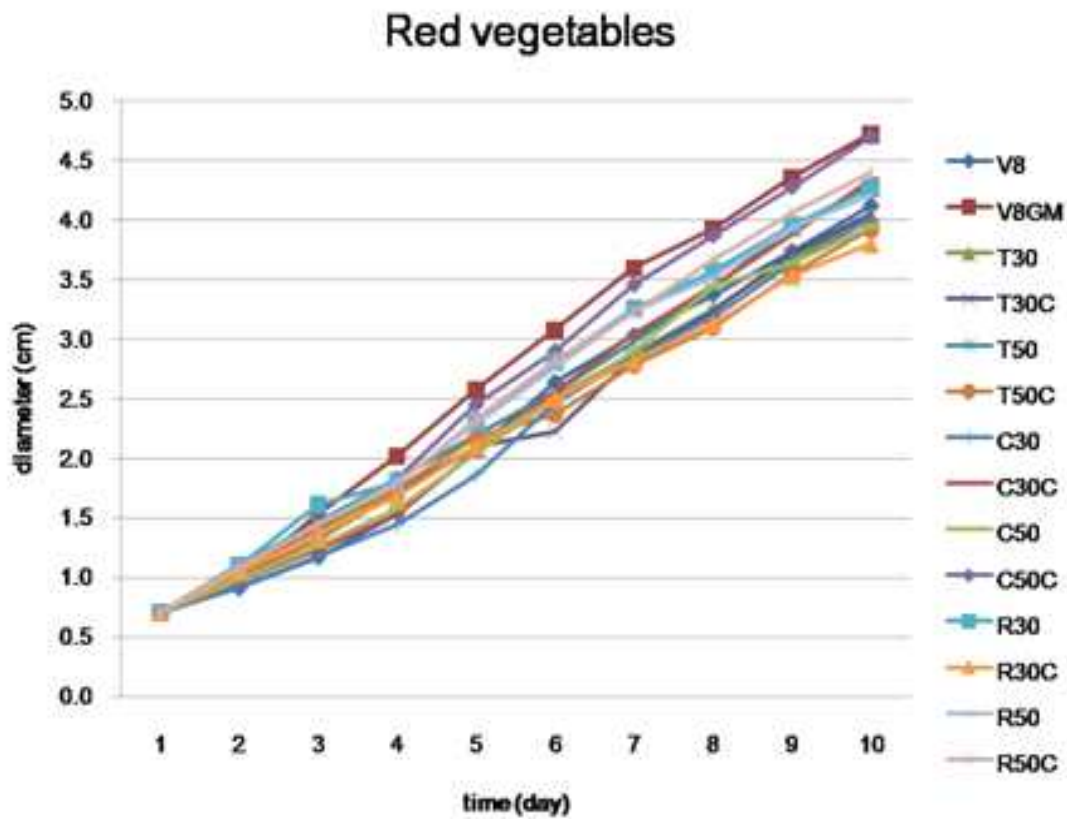


Figure 61. Vegetative growth of wild type strain of *C. phlei* on the vegetables media.

## 7. *C. phlei*의 phleichrome 생산과정 중 독성생성 여부 확인

### 가. *C. phlei* 성장과정별로 배양액을 회수하여 세균을 이용한 성장 제한 실험 실행

*C. phlei* 균주가 성장과정 중에 독성물질을 생성하는지를 알고자 세균을 이용한 성장 제한 실험을 수행하였다. *C. phlei* 균주를 액체 배양하여 12일, 15일, 18일째의 배양액을 회수하였으며, 이를 가지고 실험을 진행하였다. 그람양성균(*Bacillus subtilis*)과 그람음성균(*Escherichia coli*) 각각 1균주씩을 임의로 선택하여 LB 액체 배지와 *C. phlei* 균주 배양액을 적절 비율로 섞은 배지에 접종하였다. 각 균주들은 실험 16시간 전 1th seed했으며, 이를 이용하여 준비한 각각의 액체배지에 0.01비율로 접종하였다. 10시간 동안 배양을 진행하였으며, 2시간 간격으로 OD값을 측정하여 세균의 성장을 확인하였다 (Table 6). 결과적으로 그람음성균을 배양한 조건에서는 별 영향이 없었으나, 그람양성균을 배양한 조건에서 *C. phlei* 균주를 오래 키운 배지의 배양액에서 보다 성장이 제한됨을 확인할 수 있었다 (Figure 62-63). 따라서 *C. phlei* 균주가 phleichrome 생성과정 중 그람음성균의 성장에는 큰 영향을 미치지 않으나 그람양성균의 성장에 미비하지만 영향을 미치는 것으로 관찰 되었으므로 독성생성 때문인지 추가 확인 과정이 필요할 것으로 사료된다. 추가적으로 phleichrome의 과다 생산을 유도하는 유도물질을 넣어 균주를 배양한 배양액을 회수하여 세균을 이용한 성장 제한 실험을 진행하고 있다.

### 나. Phleichrome의 ROS 분석 표준화 조건 확립 및 활성검정

본 연구에서는 *C. phlei*에서 생성되는 phleichrome이 reactive oxygen species (ROS)를 발생시키는지 확인하고자 하였다. 현재까지 phleichrome의 ROS 발생을 조사한 연구 관련 보고가 전무하므로, 이를 수행하기 위해서 유사 물질인 perylenequinone 계열 물질인 elsinochrome의 연구에서 사용한 nitro blue-tetrazolium (NBT) test를 참고 하였으며 *C. phlei* wild type 균주에서 정제된 phleichrome을 이용하여 분석하고자 하였다 [30]. NBT의 경우, 환원이 됨에 따라 색이 푸르게 변하는 특성을 지니는데 이를 통해서 superoxide 생산을 파악하는데 사용이 된다. 이를 토대로 phleichrome이 빛을 받게 되면, 산소와 반응하여서 superoxide ( $O_2^-$ )를 생성하게 된다. 이때 생성된 superoxide가 NBT를 환원시킴으로써 NBT가 암청색을 띄는 formazan 입자로 변하게 됨에 따른 NBT의 색조 변화를 육안적으로 구분할 수 있을 것이라 추정하였으며, 이를 조건 확립 실험을 통해서 확인할 수 있었다. 또한 spectrophotometer를 이용하여 푸른 계열 색을 확인할 수 있는 560 nm 파장에서

optical density (OD)값을 측정함으로써 이에 대한 정확한 값의 정량화 가능여부를 확인할 수 있었다. 앞서 확립된 ROS 분석 조건을 토대로 정제된 phleichrome과 유사한 물질로 알려져 있는 perylenequinone 물질인 cercosporin을 참고시료로 하여 NBT test를 수행하여 ROS 발생을 측정하였다. 일정한 시간간격을 주기로 ROS 발생을 관찰한 결과, 빛과 산소에 노출되는 시간이 경과함에 따라 환원된 NBT에 의한 암청색이 진해짐을 관찰하였으며 이 결과는 perylenequinone 물질들의 농도가 증가함에 따라 암청색 또한 진해짐을 관찰하였다 (Figure 64). 이 반응물들을 spectrophotometer로 측정하여 정량한 결과 역시 같은 결과를 나타내었으며(Figure 65) 이들 연구결과에 따라 phleichrome이 빛과 산소에 노출되는 시간, phleichrome의 농도의 증가에 따라 ROS의 생성량 역시 일정수준으로 증가하는 것을 확인하였다. 이는 또한 phleichrome의 의학적 실증검증 표준화 방법이 구축된 것이라 할 수 있다.

Table 6. Toixc test

<i>E. coli</i>		O.D (600nm)				
	Media	2h	4h	6h	8h	10h
NC	LB:10ml+V8:40ml	0.1506	0.4805	0.7896	0.8677	0.8906
	LB:30ml+V8:20ml	0.2909	1.3359	1.707	1.9357	2.023
12DAY	LB:10ml+CF:40ml	0.2531	0.6921	1.0178	1.0286	1.0454
	LB:30ml+CF:20ml	0.3451	1.2428	1.8268	1.9545	2.0164
15DAY	LB:10ml+CF:40ml	0.2542	0.6947	0.9825	1.0172	0.9886
	LB:30ml+CF:20ml	0.3185	1.2301	1.8062	1.931	1.9843
18DAY	LB:10ml+CF:40ml	0.2542	0.7156	1.0042	1.0042	0.9987
	LB:30ml+CF:20ml	0.3376	1.2627	1.8835	2.0217	2.0164

<i>B. subtilis</i>		O.D (600nm)				
	Media	2h	4h	6h	8h	10h
NC	LB:10ml+V8:40ml	0.1761	1.1366	2.223	2.4507	2.517
	LB:30ml+V8:20ml	0.5946	1.8268	2.3341	2.4082	2.4658
12DAY	LB:10ml+CF:40ml	0.3842	1.2456	1.7407	1.7236	1.6631
	LB:30ml+CF:20ml	0.663	1.5348	2.1072	2.2054	2.2601
15DAY	LB:10ml+CF:40ml	0.4165	1.1294	1.507	1.4775	1.3278
	LB:30ml+CF:20ml	0.6392	1.5476	2.1727	2.301	2.3457
18DAY	LB:10ml+CF:40ml	0.4073	1.2391	1.6654	1.5348	1.2446
	LB:30ml+CF:20ml	0.6727	1.5513	2.114	2.2413	2.2507

## *E. coli*

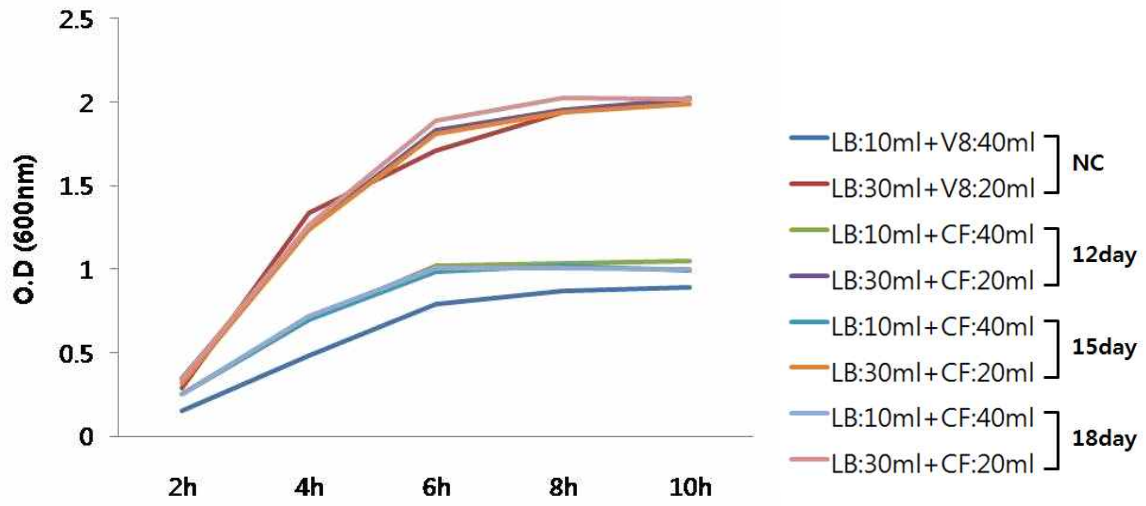


Figure 62. *E. coli* of toxic test using culture filtrate of *C. phlei*

## *B. subtilis*

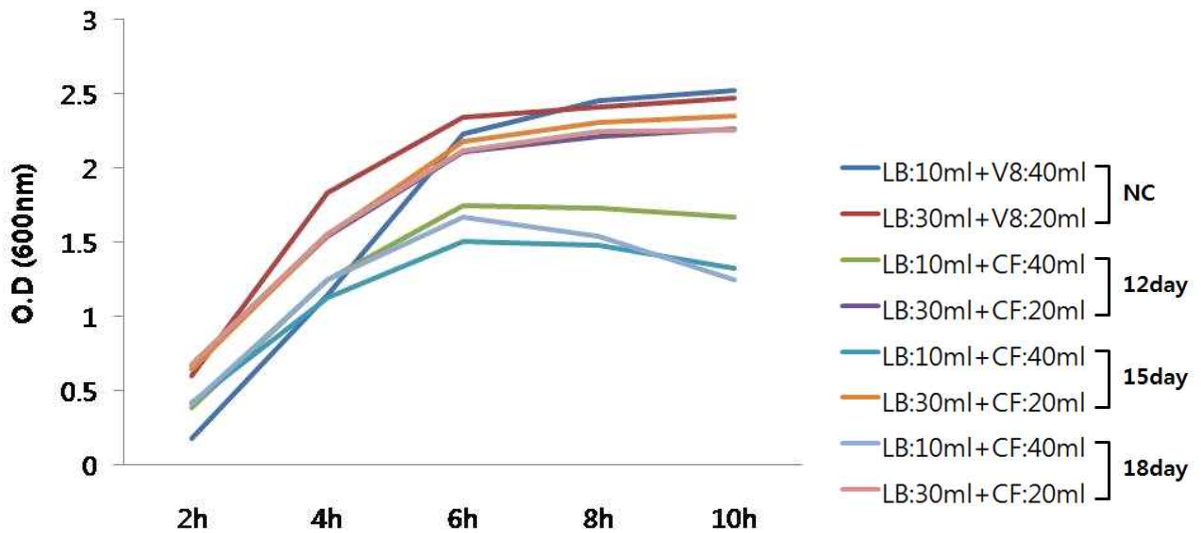


Figure 63. *B. subtilis* of toxic test using culture filtrate of *C. phlei*

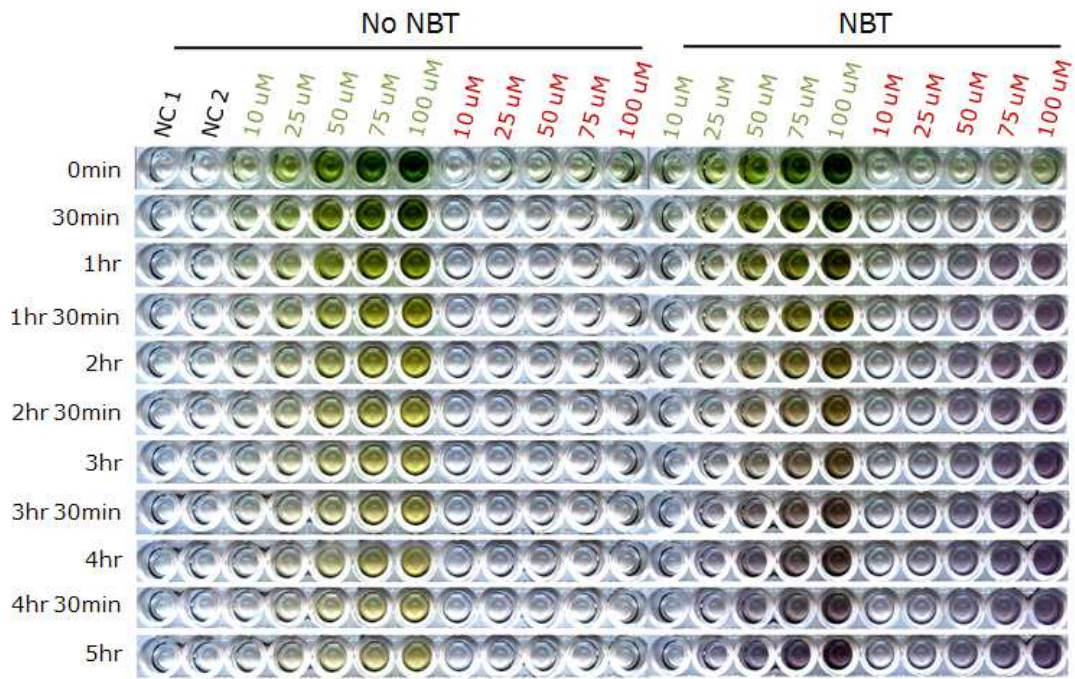


Figure 64. Color indications of reduction of NBT (560 nm) by illuminated cercosporin and phleichrome.

Green characters and red characters represent cercosporin and phleichrome respectively.

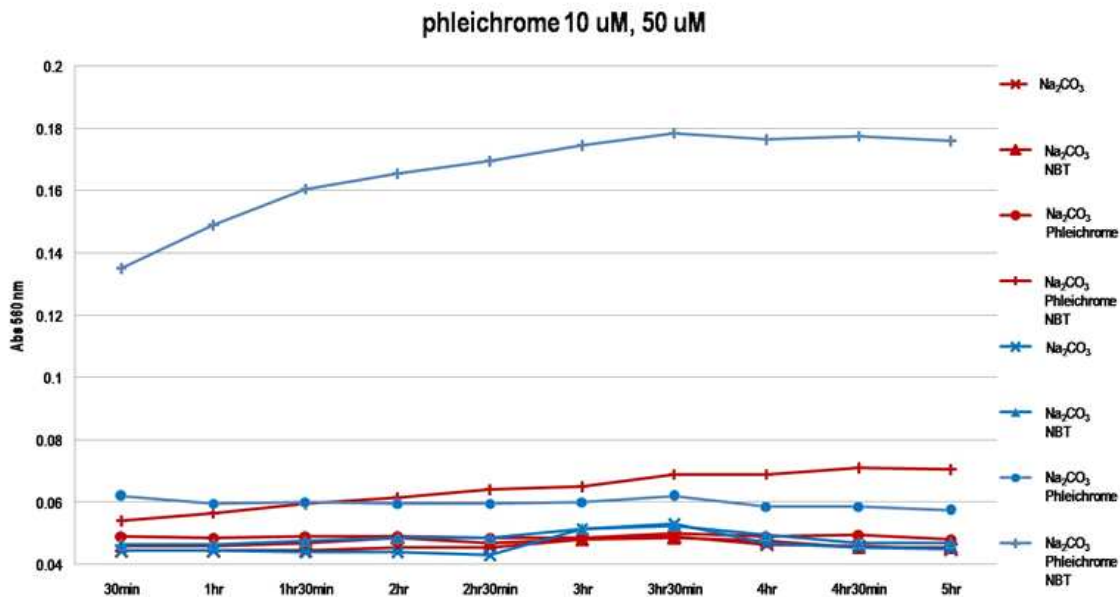


Figure 65. Reduction of NBT by illuminated 10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M phleichrome.

All samples were measured at OD 560 nm. Red lines and blue lines represent 10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M phleichrome respectively. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer supplemented with NBT and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer supplemented with phleichrome were used as negative controls.

## 제 4 절 고찰

사상성 진균의 대사물질인 색소체는 농·수·의·약학 뿐 아니라 다양한 산업적 활용도를 가지고 있다. 농작물을 비롯한 다양한 식물체를 기주로 하는 사상성 진균 *Cladosporium phlei*에서 생산하는 phleichrome은 중요한 식물 병원성 물질이지만, 산업적으로는 광에너지에 의해 활성산소를 배출하는 광감각제일 뿐 아니라, 다른 광감각제들의 주요전구물질로 최근 알려졌다. 광감각제는 각종 암 및 여러 난치성 질병의 새로운 치료법인 광역동치료(PDT)에서 빼놓을 수 없는 중요한 소재이다. 그러나 현재 사용되는 hypocrellin B와 같은 광감각제는 *Hypocrella bambusae*라는 희귀곰팡이에서 극히 제한적으로 생산되고, 사용상 여러 문제점이 드러나 그 유도체개발에 매진하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 hypocrellin B 합성의 주요 전구물질인 phleichrome 소재의 실용화를 위하여 생합성과정을 분자수준에서 이해하고, 이를 바탕으로 전통적인 방법 뿐 아니라, 유전자를 이용하는 다양한 균주육종을 통해 phleichrome의 대량생산을 위한 균주를 제조하고, 농작물 폐기물을 활용한 유용물질 생산을 위한 최적 배양 조건을 확립하고자 하였다.

Phleichrome의 생합성에 관여하는 유전자를 확보하기 위하여 *C. phlei* genomic library를 제작하였으며, 보다 용이한 screening을 위하여 ordered library를 성공적으로 제작하였다. 다른 종들의 PKS유전자를 참고하여 degenerated primer를 제작하였으며, 3차 screening을 통하여 4개의 관련 유전자를 확보하였다. 차후 이들 각 유전자의 특성화 작업을 위해서 유전자 발현을 확인하였다. 또한 확보된 phleichrome 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 조절하기 위한 vector를 설계하였으며, 이를 통해서 재조합 균주를 확보하였다.

Survival test를 통한 *C. phlei*의 UV-mutatgenesis 표준화 조건을 확립하였다. 이를 통해서 phleichrome 2개의 과발현 돌연변이체를 확보하였으며, 이들 각각의 과발현 돌연변이체의 배양조건을 최적화하였다. 또한 phleichrome 생산에 대한 빠른 역가 검증법을 개발하였으며 이는 산업화시에 제품관리를 보다 용이하게 해줄 것이라 사료된다.

*C. phlei* 성장 곡선에 따른 phleichrome 생산성을 조사하여 최적의 조건을 확인하였다. 차후 phleichrome의 효율적인 순수분리정제 방법을 구축하였으며, 정제된 phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체를 합성하였다. 또한 phleichrome 유도물질을 개발하여 *C. phlei*의 metabolites의 profile을 확보하였으며, 이는 phleichrome 대사체학 연구의 기반을 다질 것이다.

*C. phlei* 균주의 성장과정별로 배양액을 회수한 후, 배지에 첨가하여 세균을 이용한 성



장 제한실험을 진행하였으며 이를 통해서 *C. phlei*의 독성생성 여부를 확인하였다. 또한 phleichrome의 ROS 활성을 검증하였다. 농업폐기물을 활용하여 *C. phlei*의 대량생산이 가능한지를 확인하고자 *C. phlei*의 기주 농작물을 탐색하고, 각 농작물들을 배지에 첨가하여 균주의 배양조건을 구축하였으며, 이를 통해서 저가비용의 *C. phlei* 대량생산이 가능해질 것이라 예상된다.

## 제 4 장 목표달성 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여
1차 연도 (2010)	[제 1 세부과제] 식물병원진균 <i>Cladosporium phlei</i> 을 활용한 의료용 약리핵심 소재의 생산에 관한연구	<i>C. phlei</i> 성장 곡선에 따른 phleichrome 생산성 조사	100	· 성장에 따른 phleichrome의 발현양 결정
		<i>C. phlei</i> 의 genomic library 제작 및 관련 perylenequinone 합성 관련 유전자 확보	100	· <i>C. phlei</i> 의 genomic library 제작 · <i>C. phlei</i> 의 phleichrome 생합성 관련 유전자의 확보
		<i>C. phlei</i> 의 UV- mutagenesis 및 screening 방법 확립	100	· <i>C. phlei</i> 의 UV-mutagenesis방법 구축
	[제 2 세부과제] <i>Cladosporium phlei</i> 을 활용한 의료용 약리핵심 소재 생산량 분석에 관한 연구	Phleichrome의 효율 적인 분리정제 방법 구축	100	· <i>C. phlei</i> 의 대량 배양을 통한 phleichrome의 대량 정제법 확립 · <i>C. phlei</i> 의 대사체학 연구
2차 연도 (2011)	[제 1 세부과제] 식물병원진균 <i>Cladosporium phlei</i> 을 활용한 의료용 약리핵심 소재의 생산에 관한연구	<i>C. phlei</i> 의 perylenequinone 합성 관련 유전자 특성화 및 이를 이용한 진균의 분자 육종	90	· 주요 관련 유전자의 발현 특성화 · 관련 유전자의 발현 조절을 위한 vecotr 설계 · 재조합 균주의 제조
		<i>C. phlei</i> 의 perylenequinone 관련 유전자 발현 조절에 의한 분자 육종	90	· Comparative genomics에 의한 생합성 유전자의 발현 조절 regulator 유전자 확보

		우수 형질의 돌연변이체 확보	100	· Phleichrome 생산량이 증가된 돌연변이체 확보
	[제 2 세부과제] <i>Cladosporium phlei</i> 을 활용한 의료용 약리학심 소재 생산량 분석에 관한 연구	우수한 개량균주의 선별을 위한 phleichrome 생산량 분석 기술의 개발	100	· Beer 법칙을 이용한 미량의 phleichrome 신속분석기술개발
		<i>Cladosporium phlei</i> 균주의 phleichrome 생산량 증대를 위한 유도물질 (inducer)의 합성	100	· 다양한 구조의 diketopiperazine 유도체의 합성 및 유도물질의 phleichrome 생산 유도 활성 검증
3차 연도 (2012)	[제 1 세부과제] 식물병원진균 <i>Cladosporium phlei</i> 을 활용한 의료용 약리학심 소재의 생산에 관한연구	<i>C. phlei</i> 의 perylenequinone 합성 관련 유전자의 추가적인 특성화 및 이를 이용한 진균의 분자 육종	90	· 주요 관련 유전자의 발현 특성화 · 관련 유전자의 발현 조절을 위한 vecotr 설계 · 재조합 균주의 제조
		<i>C. phlei</i> 의 perylenequinone 관련 유전자 발현 조절에 의한 분자 육종	90	· Comparative genomics에 의한 생합성 유전자의 발현 조절 regulator 유전자 확보
		<i>C. phlei</i> 의 perylenequinone 과발현 형질전환체 및 돌연변이체의 발효 최적화	80	· 발효를 위한 최적배지 탐색 · 발효를 위한 최적양조건 탐색
		농업폐기물을 활용한 <i>C. phlei</i> 의 phleichrome 생산량조사 및 배양조건 확립	80	· <i>C. phlei</i> 배양 가능한 농업폐기물 탐색 · phleichrome 분비율을 증가시키는 농작물의 효과 정도 분석
		<i>C. phlei</i> 의	100	· <i>C. phlei</i> 성장과정별로 배양액을

		phleichrome 생산 과정 중 독소생성 여부 확인		회수하여 세균을 이용한 성장제한실험 실행 · phleichrome의 ROS활성 검증
		<i>C. phlei</i> 의 phleichrome 대량 생산 균주의 대사체 특성화	90	· phleichrome 대량생산균주의 대사체 특성화
	[제 2 세부과제] <i>Cladosporium phlei</i> 을 활용한 의료용 약리핵심 소재 생산량 분석에 관한 연구	<i>C. phlei</i> 의 phleichrome 최대 생산을 유도하기 위한 신규 유도물질 (inducers) 의 추가 5종 합성 및 적용	100	· 다양한 치환기의 변화를 가지는 diketopiperazine 유도체들의 합성
		phleichrome으로부 터 약리활성을 가지는 다양한 perylenequinone 계열의 화합물 반합성	100	· Phleichrome을 출발물질로 한 hypocrellin B의 반합성법 개발 : · Phleichrome을 출발물질로 한 aminated 유도체 합성

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

### 제 1 절 연구개발 성과

구분	특허		논문		학술대회		기타
	출원	등록	SCI	비SIC	국외	국내	
목표	2	2	5				
성과	1		8		2	16	

#### 1. 국내외 논문 발표

· Characterization of a mutant strain of a filamentous fungus *Cladosporium phlei* for the mass production of the secondary metabolite phleichrome Min-Hee Yi, Jung-Ae Kim, Jung-Mi Kim, Jin-Ah Park, Beom-Tae Kim, Seung-Moon Park, Moon-Sik Yang, Ki-Jun Hwang, Dae-Hyuk Kim. 2011, *J Microbiol.* Vol. 49, No. 4, 680-683.

· Functional Pentameric Formation via Coexpression of the *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit and Its Fusion Protein Subunit with a Neutralizing Epitope of ApxIIA Exotoxin Improves the Mucosal Immunogenicity and Protection against Challenge by *Actinobacillus pleuropneumoniae* Jung-Mi Kim, Seung-Moon Park, Jung-Ae Kim, Jin-Ah Park, Min-Hee Yi, Nan-Sun Kim, Jong-Lye Bae, Sung Goo Park, Yong-Suk Jang, Moon-Sik Yang, Dae-Hyuk Kim. 2011, *Clin Vaccine Immunol.* Vol. 18, No. 12, 2168-2177.

· Synthesis of Versatile 1-Indanones and their Conversion to 1,2-Naphthoquinones, Key Precursors for the Construction of Perylenequinone Core. Ki-Jun Hwang, Young-Min Shin, Dae-Hyuk Kim, and Beom-Tae Kim. 2012, *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol. 33, No. 9, 3095-3098.

- Synthesis of Heterocyclic Chalcone Derivatives and Their Radical Scavenging Ability Toward 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Free Radicals. Ki-Jun Hwang, Ho-Seok Kim, In-Cheol Han, and Beom-Tae Kim. 2012, *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol. 33, No. 8, 2585-2591.
  
- Comparative proteomic analysis of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, under tannic-acid-inducing and hypovirus-regulating conditions Jung-Mi Kim, Jin-Ah Park, Dae-Hyuk Kim. 2012, *Can J Microbiol.* Vol. 58, No. 7, 863
  
- Rapid screening of an ordered fosmid library to clone multiple polyketide synthase genes of the phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei* Kum-Kang So, Jung-Mi Kim, Nguyen Ngoc Luong, Jin-Ah Park, Beom -Tae Kim, Seung-Mun Park, Ki-Jun Hwang, Dae-Hyuk Kim. 2012, *J Microbiol Methods.* Vol. 91, No. 3, 412-419
  
- Biological function of a novel chrysovirus, CnV1-BS122, in the Korean *Cryphonectria nitschkei* BS122 strain Jung-Mi Kim, Ji-Eun Jung, Jin-Ah Park, Seung-Moon Park, Byeong-Jin Cha, Dae-Hyuk Kim. 2013, *J Biosci Bioeng.* Vol. 115, No. 1, 1-3
  
- Expression and purification of an immunogenic dengue virus epitope using a synthetic consensus sequence of envelope domain III and *Saccharomyces cerevisiae* Ngoc-Luong Nguyen, Jung-Mi Kim, Jin-Ah Park, Seung-Moon Park, Yong-Suk Jang, Moon-Sik Yang, Dae-Hyuk Kim. 2013, *Protein Expr Purif.* Vol. 88, No. 2, 235-242.

## 2. 국내외 학술 발표

- Improved Strains for Fungal Metabolite, Phleichrome from a Phytopathogenic Fungus *Cladosporium phlei*. MH Yi, KK SO, JE Jung, JM Kim, DH Kim.

2010 한국미생물연합회 추계학술대회

2010. 10. 14-15, Seoul, Korea, 포스터

· Synthesis of 3-alkylamino-1,2-naphthoquinones as the key intermediate for the construction of perylenequinone core. BT Kim, CH Song, IC Han, SJ Bang, IS Jo, KJ Hwang

2010. 대한화학회 106회 총회, 학술발표회 및 기기전시회

2010. 10. 14-15, Daegu, Korea, 포스터

· Strain improvement for the mass production of the fungal secondary metabolite phleichrome from a phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. MS Yang, MH Yi, JM Kim, YS Jeong, DH Kim.

2011 26th fungal genetics conference at Asilomar

2011. 3. 15-20. Asilomar America, 포스터

- Synthesis of structurally diverse perylenequinone derivatives. BT Kim, SJ Bang, IC Han, IS Jo, KJ Hwang

2011. 대한화학회 107회 총회 및 학술발표회

2011. 4. 28-29, Jeju, Korea, 포스터

· Mutagenesis of *Cladosporium phlei* for overproduction of phleichrome and investigation of its metabolism by molecular tools. KK So, NL Nguyen, JE Jung, JM Kim, DH Kim.

2011 Asian mycological congress 2011 & the 12th international marine and freshwater mycology symposium

2011. 8. 7-11. Incheon Korea, 포스터

- Synthesis of a new class of taurine derivarives. BT Kim, IS Jo, SJ Bang, IC Han, HY Kim, KJ Hwang

2011. 대한화학회 108회 총회 및 학술발표회

2011. 9. 28-30, Daejeon, Korea, 포스터

· Observation of phleochrome overproducing mutants and investigation of its metabolism by molecular tools in *Cladosporium phlei*. So, K.K, NL Nguyen, JM Kim, DH Kim.

2011 한국미생물연합회 국제학술대회

2011. 10. 13-14. Seoul, Korea, 포스터

· Production of a key pharmacophore-phleochrome from a phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. KK So, NL Nguyen, JH Baek, JM Kim, DH Kim.

2012 한국미생물학회 제 15회 사상성진군 학술분과 학술발표대회

2012. 1. 5-6. Cheonan, Korea, 구두발표

· Report on the investigation of phleochrome production and polyketide synthase genes from a phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. NL Nguyen, KK So, K.K, JM Kim, DH Kim.

2012 한-일 공동심포지움

2012. 3. 27-28. Fukuoka, Japan, 포스터

· Synthesis of a new class of taurine derivatives as antioxidants. BT Kim, IS Jo, MS Chae, KJ Hwang

2012. 대한화학회 109회 총회 및 학술발표회

2012. 4. 25-27, Ilsan, Korea, 포스터

· Construction of new perylenequinone core, 1,12-bis((benzoylamino)methyl)-3,10-perylenequinone. BT Kim, HY Kim, YA LEE, KJ Hwang

2012. 대한화학회 109회 총회 및 학술발표회

2012. 4. 25-27, Ilsan, Korea, 포스터

· Rapid screening of an ordered fosmid library to clone the polyketide synthase genes of the phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. NL Nguyen, KK So, SH



Yun, JH Baek, HY Ko, JM Kim, DH Kim.

2012 KSPP international conference

2012. 10. 24-27. Seoul, Korea, 포스터

· Overproduction of phleichrome by synthetic diketopiperazines and cloning of polyketide synthase genes in phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. KK So, NL Nguyen, YH Ko, JM Kim, DH Kim.

2013. 한국 미생물학회 제 16회 사상성진균 학술분과 학술발표대회

2013. 2. 8-9 Cheonan, Korea, 포스터

· Overproduction of phleichrome by synthetic inducers and cloning of polyketide synthase genes in phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. KK So, NL Nguyen, JM Kim, YS Jang, DH Kim.

2013. 27th fungal genetics conference at Asilomar

2013. 3. 12-17. Asilomar, America, 포스터

- Semi-synthesis of Hypocrellin B from Phleicrome produced from *Cladosporium phlei*. BT Kim, KJ Hwang, MS Chae

2013. 대한화학회 111회 총회 및 학술발표회

2013. 4. 17-19, Ilsan, Korea, 포스터

- Copper and solvent free, and rapid Sonogashira reaction using heterogeneous Pd/graphene catalyst. BT Kim, KJ Hwang, JB Park, YA Lee

2013. 대한화학회 111회 총회 및 학술발표회

2013. 4. 17-19, Ilsan, Korea, 포스터

· Application of synthetic diketopiperazines and cloning of polyketide synthase genes for overproduction of phleichrome in phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. KK So, NL Nguyen, SH Yun, JH Baek, JM Oh, JM Kim, DH Kim.

2013. 한국식물병리학회 임시총회 및 춘계학술발표회

2013. 4. 25-26 Daejeon, Korea, 포스터

· Application of Synthetic Inducers and Cloning of Polyketide Synthase Genes for Overproduction of Phleichrome in Phytopathogenic Fungus *Claodsporium phlei*. KK Kim, NL Nguyen, YH Ko, JM Kim, DH Kim.

2013. International meeting of the microbiological society fo Korea

2013. 5. 1-3 Jeonju, Korea, 포스터

### 3. 특허 출원

· 플레아이크롬의 대량 생산을 위한 돌연변이 클레도스포리움 플레아이

출원번호 10-2011-0058488

출원일자 2011-06-16

### 4. 기술이전 및 산업화

본 연구진의 *C. phlei*가 생산하는 phleichrome의 산업성 가치가 높게 평가되어 캐나다 알버타주 에드먼트시에 위치한 제약회사 "퀘스트파마텍"과 본 연구진들이 연구원으로 활약한 전북대학교의 생리활성물질연구소가 광역학치료제인 광감각제의 전구체인 phleichrome을 활용한 신약개발에 대해 2006년도에 MOU를 체결한 바 있으며, 현재 재 MOU 체결이 확정되어 확정서를 본 연구팀에 전달한 상황이며 협약을 추진 중이다. 본 연구진의 연구결과들을 토대로 성공적인 산업화가 추진될 것이라 사료된다.

## 제 2 절 성과활용 계획

### 1. 핵심 연구성과 활용 계획

#### 가. Phleichrome 생산에 대한 빠른 역가검증법 구축

고체배양의 plate의 색소체인 phleichrome 생성량의 차이를 빠르게 screening하는 방법과 소량의 균사 용매 추출액을 TLC방법을 통해 분석하는 표준화된 방법을 개발함. 이를 통해서 phleichrome 산업화시 보다 빠르게 phleichrome의 양을 측정할 수 있는 방법에 기여함.

#### 나. 분자 육종을 통한 phleichrome 과발현 균주 확보 및 배양조건 확립

본 연구팀은 Survival test를 통한 *C. phlei*의 UV-mutatgenesis 표준화 조건을 확립함. 이를 통해서 phleichrome 2개의 과발현 돌연변이체를 확보하였으며, 이들 각각의 과발현 돌연변이체의 배양조건을 최적화함. 또한 확보된 phleichrome 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 조절하기 위한 vector를 설계하였으며, 이를 통해서 재조합 균주를 확보함. 이렇게 확보된 균주와 배양조건 확립을 통해서 산업화시 보다 많은 양의 phleichrome을 용이하게 획득할 수 있을 것이라 사료됨.

#### 다. 농가폐기물을 활용한 균주배양의 적용가능성을 확인하여 저가비용의 균주 대량생산 기술에 적용

농업폐기물을 활용하여 *C. phlei*의 배양조건을 확인하여 보다 저렴한 가격의 배지를 이용하여 의료용 약리핵심소재 물질을 획득할 수 있을 것이라 예상됨.

#### 라. Phleichrome의 효율적인 순수 분리정제 방법 구축

*Cladosporium phlei*의 대량 배양을 통한 phleichrome의 대량 정제법 확립은 본 연구진이 처음 보고한 순도 높은 이차대사물질인 phleichrome을 매우 효율적으로 분리정제할 수 있는 방법으로 본 정제법을 통하여 얻어진 phleichrome은 HPLC 순도 > 95%이며, 이를 출발물질로 하여 다양한 유도체 합성에 기여할 것이라 예상됨.

#### 마. *C. phlei*의 phleichrome 최대 생산을 유도하기 위한 유도물질(inducers)의 합성 및 적용

다양한 구조의 diketopiperazine 유도체를 성공적으로 합성하고, 이 물질이 *C. phlei*의 phleichrome 생산을 유도한다는 사실을 확인하였으며 이 유도체들의 구조가 *C.*

*phlei*의 phleichrome 생산 유도에 미치는 영향에 대해 구조-활성간 상관 관계를 규명하는 중요한 기초 정보를 제공할 것이라 기대됨.

#### **바. Phleichrome으로부터 다양한 활성 유도체의 합성**

##### **(1) Phleichrome을 출발물질로 한 hypocrellin B의 반합성법 개발**

Hypocrellin B는 perylenequinone 계열의 대표적인 감광감제 후보물질이며, 이를 이용한 유도체의 개발이 활발히 진행되고 있어 이 물질의 안정적 공급이 시급한 실정임. 그러나 이 물질의 전합성은 그 반응단계가 매우 길고 (15 단계 이상), 입체화학의 조절이 어려워 사실상 어려운 반면, 본 연구진이 개발한 균주를 이용한 발효를 통해 대량으로 얻어지는 phleichrome을 출발물질로하여 hypocrellin B의 반합성법으로 합성할 수 있는 합성법의 개발은 perylenequinone 계열 감광감제의 합성 및 응용 분야 연구에 큰 기여를 하리라 사료됨.

##### **(2) Phleichrome을 출발물질로 한 aminated 유도체 합성**

Aminated perylenequinone 계열의 화합물은 hypocrelline이 가지는 광특성상의 한계점을 극복할 수 있는 대안 물질로 활발히 합성 및 연구 되어 온 바, 본 연구에서 확보한 phleichrome을 출발물질로 한 다양한 aminated perylenequinone 유도체를 합성하는 합성법을 정립하고, 이를 통하여 다양한 유도체를 확보하면, 구조 및 활성간의 상관관계에 대한 매우 중요한 정보를 제공할 수 있어, 우수한 감광감제 후보물질의 도출에 기여할 수 있음.

#### **사. 추가 연구 및 타연구에 활용 계획**

##### **(1) Phleichrome을 출발물질로 한 hypocrellin B의 반합성법 개발 및 유도체 합성**

Hypocrellin B는 perylenequinone 계열의 대표적인 감광감제 후보물질이며, 이를 이용한 유도체의 개발이 활발히 진행되고 있어 이 물질의 안정적 공급이 시급한 실정임. 그러나 이 물질의 전합성은 그 반응단계가 매우 길고 (15 단계 이상), 입체화학의 조절이 어려워 사실상 어려운 반면, 본 연구진이 개발한 균주를 이용한 발효를 통해 대량으로 얻어지는 phleichrome을 출발 물질로하여 hypocrellin B의 반합성법으로 합성할 수 있는 합성법의 개발을 지속적으로 추진 예정.

##### **(2) Phleichrome을 출발물질로 한 aminated 유도체 합성 및 활성간의 상관관계 규명**

Aminated perylenequinone 계열의 화합물은 hypocrelline이 가지는 광특성상의 한계

점을 극복할 수 있는 대안 물질로 활발히 합성 및 연구 되어 온 바, 본 연구에서 확보한 phleochrome을 출발물질로 한 다양한 aminated perylenequinone 유도체를 합성하는 합성법을 정립하고, 이를 통하여 다양한 유도체를 확보하면, 구조 및 활성간의 상관관계 규명에 관한 연구를 지속적으로 추진하고자 함.

#### 아. 연구종료 후 예상연구 성과

##### (1) 국내외 논문발표

본 연구에 대한 결과를 바탕으로 투고중이거나 투고 준비중인 논문이 있으므로, 연구종료 2년 후에는 국내외 논문 발표 총 3 건 예상.

##### (2) 특허 출원 및 등록

Phleochrome의 생산을 유도하는 유도물질의 용도특허 출원 예상.

##### (3) 실용화 및 산업화

캐나다 알버타주 에드먼트시에 위치한 제약회사 "퀘스트파마텍"과의 MOU 체결을 통한 성공적인 산업화가 추진될 예정.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1절 NBT reduction에 따른 ROS 활성 검증

NBT의 경우, 환원이 됨에 따라 색이 푸르게 변하는 특징을 지니는데 이를 통해서 ROS의 활성을 검증하는데 사용될 수 있다고 보고 되었다. 본 연구팀에서는 NBT가 ROS와 반응을 하여 환원이 되면 암청색을 띄는 formazan 입자로 변하게 되는 것에서 착안하여 이를 phleichrome에 접목시켜 ROS 활성을 측정하였다. Phleichrome은 빛과 반응하여 ROS가 생성되면서 반응시약이 푸르게 변화하는 것을 육안으로 구분이 가능했으며 spectrophotometer를 통해서 정량화시킬 수 있었다 [30].

### 제 2절 Perylenequinone 계열간의 구조 변이 및 치환 합성

최근에 간단한 화학적 반응을 통하여 핵심구조인 perylenequinone 계열간의 구조 변이 및 치환 합성이 가능하게 되어 phleichrome이 다른 perylenequinone 계열 화합물보다 효율적인 전구물질임을 확인하였고 (특허; US 7,816,563 B1), 따라서 대규모 화학적 유도체 생산의 가능성을 제시함으로써 phleichrome에 대한 폭 넓은 활용성을 토대로 그 중요성이 더욱 높아짐을 확인하였다 .

### 제 3절 Phleichrome 유도물질의 화학적 특성 및 구조 규명

*C. phlei*의 기주인 Timoth crop (*Phleum pretense* L.)에 내생균인 *Epichloe typhina*가 같이 기생할 경우, phleichrome의 생산을 유도하는 물질을 *E. typhina*가 생산한다는 실험 결과가 보고되었다. 이들 물질의 구조를 분리하여 분석해 보았을 시, cyclo-(L-Pro-L-Leu)와 cyclo-(L-Pro-L-Phe)라는 물질이었다. 따라서 본 연구팀은 이 실험결과에 근거하여 *E. typhina*이 생산해 내는 두 유도물질을 실험실내에서 합성하였으며, *C. phlei*의 phleichrome 생산을 촉진시키는데 기여할 수 있다 [31].

## 제 4절 Elsinochrome 생합성을 encoding 하는 EfPKS1 유전자

Elsinochrome은 citrus scab을 일으키는 *Elsino fawcettii*에서 생산되는 perylenequinone 물질로 붉은색 색소체라는 점이 phleichrome과 매우 유사하다. *E. fawcettii*가 가지고 있는 PKS유전자 중에서 EfPKS1 유전자가 elsinochrome의 생합성에 관여하는 유전자로 보고되었다. Phleichrome과 화학구조와 그 기능이 매우 유사하기 때문에 phleichrome 생합성에 관련된 유전자 역시 EfPKS1 유전자와 유사성이 클 것으로 예상되어 phleichrome 생합성에 관련된 유전자를 확보하는데 있어서 보다 명확한 방향성을 제시하였다 [22].

## 제 7 장 연구시설 · 장비 현황

해당사항 없음



## 제 8 장 참고문헌

1. Lee, J.K., Kim, B.T., Kim, J.A., Chung, H.J., Park, S.M., Yang, M.S., Hwang, K.J. and Kim, D.H. 2007. Cultural characteristics and extraction of the fungal pigment phleochrome from the phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 12, 508–515.
2. Kim, J.A., J.M. Kim, H.G. Kim, B.T. Kim, K.J. Hwang, S.M Park, M.S. Yang, and D.H Kim. 2009. Protoplast-mediated transformation of the filamentous fungus *Cladosporium phlei*: Evidence of tandem repeats of the integrative transforming vector. Plant Pathol. J. 25, 179–183.
3. Lee, H. Y., Zhou, Z. X., Chen, S., Zhang, M. H. and Shen, T. 2006. New long-wavelength ethanalamino-substituted hypocrellin: photodynamic activity and toxicity to MGC803 cancer cell. Dyes Pigments, 68, 1–10.
4. Wu, T., Xu, S., Shen, J., Song, A., Chen, S., Zhang, M. and Shen, T. 2000a. New potential photodynamic therapeutic anti-cancer agents: synthesis and characterization of demethoxy amino-substituted hypocrellins. Anticancer Drug Des. 15: 287–293.
5. Wu, T., Shen, J., Song, A., Chen, S., Zhang, M. and Shen, T., 2000b. Photodynamic action of amino substituted hypocrellins: EPR studies on the photogenerations of active oxygen and free radical species. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 57, 14–21.
6. Yoshihara, T., Shimanuki, T., Araki, T. and Sakamura, S. 1975. Phleochrome, a new phytotoxic compound produced by *Cladosporium phlei*. Agr. Biol. Chem. 39, 1683–1684.
7. Shimanuki, T. 1987. Studies on the mechanisms of the infection of timothy with purple spot disease caused by *Cladosporium phlei*. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. 148, 1–56.
8. Olivo, M. and W. Chin. 2006. Perylenequinones in photodynamic therapy: Cellular versus vascular response. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 25, 223–237.
9. Kroken, S., Glass, N.L., Taylor, J.W., Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 2003.

- Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15670–15675.
10. Schumann, J., Hertweck, C., 2006. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. *J. Biotechnol.* 124, 690–703.
  11. Deacon, J., 2006. *Fungal Biology*, fourth ed. Blackwell Publishing, Malden.
  12. Crawford, J.M., Townsend, C.A., 2010. New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 879–889.
  13. Bingle, L.E., Simpson, T.J., Lazarus, C.M., 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* 26, 209–223.
  14. Nicholson, T.P., Rudd, B.A., Dawson, M., Lazarus, C.M., Simpson, T.J., Cox, R.J., 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. Biol.* 8, 157–178.
  15. Kim, C.G., Fujiyama, A., Saitou, N., 2003. Construction of a gorilla fosmid library and its PCR screening system. *Genomics* 82, 571–574.
  16. Martinez–Castro, M., Solera, E., Martin, J.F., Barreiro, C., 2009. Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: rapid screening of genes of the tacrolimus producer *Streptomyces sp.* ATCC 55098. *J. Microbiol. Methods* 78, 150–154.
  17. Amnuaykanjanasin, A., Punya, J., Paungmoung, P., Rungrod, A., Tachaleat, A., Pongpattanakitshote, S., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M., 2005. Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood–decay fungus *Xylaria sp.* BCC 1067. *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 125–136.
  18. Blanco, G., Brian, P., Pereda, A., Mendez, C., Salas, J.A., Chater, K.F., 1993. Hybridization and DNA–sequence analyses suggest an early evolutionary divergence of related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces spp.* *Gene* 130, 107–116.
  19. So, K.K., Kim, J.M., Nguyenl, N.L., Park, J.A., Kim, B.T., Park, S.M., Hwang, K.J., Kim, D.H., 2012. Rapid screening of an ordered fosmid library to clonemultiple polyketide synthase genes of the phytopathogenic fungus *Cladosporium phlei*. *J. Microbiol. Methods.* 91, 412–419.

20. Bruchez, J.J.P., Eberle, J., Russo, V.E.A., 1993. Regulatory sequences in the transcription of *Neurospora crassa* genes: CAAT box, TATA box, Introns, Poly(A) tail formation sequences. *Fungal Genet. Newsl.* 40, 89-97.
21. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
22. Liao, H.L., Chung, K.R., 2008. Genetic dissection defines the roles of elsinochrome phytotoxin for fungal pathogenesis and conidiation of the citrus pathogen *Elsinoe fawcettii*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 469-479.
23. Witteveen, C.F.B., P. van de Vondervoort, K. Swart, and V. Jaap. 1990. Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*. *Microbiol. Biotechnol.* 33, 683-686.
24. Yi, M.H., Kim, J.A., Kim, J.M., Park, J.A., Kim, B.T., Park, S.M., Yang, M.S., Hwang, K.J., Kim, D.H., 2011. Characterization of a mutant strain of a filamentous fungus *Cladosporium phlei* for the mass production of the secondary metabolite phleochrome. *J. Microbiol.* 49, 680-683.
25. Lee, J.K., Son, H.K., Lee, S.H., Park, A.R., Lee, Y.W., 2010. Development of a Conditional Gene Expression System Using a Zearalenone-Inducible Promoter for the Ascomycete Fungus *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3089-3096.
26. Seto, Y., Kogami, Y., Shimanuki, T., Takahashi, K., Matusuura, H. and Yoshihara, T. 2005. Production of phleochrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperadines of *Epichloe typhina*. *Biosci. Biotechnol. Biocheml.* 69: 1515-1519.
27. Zhou, W., Peng, Y. and Li, S. S. 2010. Semi-synthesis and anti-tumor activity of 5,8-O-dimethyl acylshikonin derivatives. *Eup. J. Med. Chem.* 45, 6005-6011.
28. Lown, J.W. 1997. Hoffman-LaRoche Award Lecture. Photochemistry and photobiology of perylenequinones. *Can. J. Chem.* 75, 99-119.
29. Xu, S., Chen, S., Zhang, M. and Shen, T. 2001. A novel method for the preparation of amino-substituted hypocrellin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11,

2045–2047.

30. Hartman, P.E., Suzuki, C.K., Stack, M.E., 1989. Photodynamic Production of Superoxide In Vitro by Alertoxinsin the Presence of Reducing Agents. Appl. Environ. Microbiol. 55. 7–14.
31. Seto Y, Kogami Y, Shimanuki T, Takahashi K, Matsuura H, Yoshihara T. 2005. Production of phleichrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperadines of *Epichloe typhina*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69. 1515–1519.