

명세서

발명의 명칭: 신규한 프로모터 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 프로모터 및 이를 이용한 목적 산물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 기술의 발전에 따라 세포 내 메커니즘에 대한 이해도가 높아지면서, 세포의 대사작용을 조절하여 다양한 목적 산물을 생산하는 방법이 개발되고 있다. 현재, 에세리키아 속 또는 코리네박테리움 속 등의 미생물이 가장 많이 이용되고 있으며, 아미노산, 폴리페놀, 플라보노이드, 항체, 천연 고무 등 다양한 저분자, 고분자 화합물, 의약품 단백질 등의 생산에 직접 사용되고 있다.

[4]

- [5] 대사작용을 조절하는 다양한 방법 중에서도, 특히 목적 유전자의 과발현을 유도하기 위한 고효율의 유전자 발현 시스템이 주로 연구되고 있다. 예로서, 유전자 발현에 가장 크게 관여하는 요소는 프로모터임이 잘 알려져 있음에 따라, 대장균 유래의 몇몇 프로모터(Ptac, Ptrc, Plac)를 활용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 본 출원인은 선행 연구를 통해 대장균의 tac 프로모터 대비 296%의 강한 활성을 나타내는 코리네박테리움 암모니아게네스 유래의 cj1 프로모터를 발굴한바 있다(대한민국 공개특허공보 제10-2006-0068505호). 그러나, 효율적으로 고수율의 목적 산물을 생산할 수 있는 방법에 대한 연구는 여전히 필요하다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 목적 유전자의 발현을 증가시켜 결국 목적 산물을 효율적으로 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구한 결과, 활성이 높다고 알려진 기존 cj1 프로모터의 서열을 변이시켜 신규의 프로모터(cj2.2)를 제작하였으며, 이는 cj1 프로모터 보다 약 3배 이상의 높은 활성을 나타냄을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [10] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 상기 숙주 세포 또는 이를 배양한 배지에서 목적 물질을 분리하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[13]

발명의 효과

[14] 본 출원의 신규 프로모터는 미생물에 도입되어 이에 연결되어 있는 유전자의 발현 및 활성을 증가시킬 수 있으므로, 상기 프로모터 및 유전자의 영향을 받는 목적 산물을 효율적으로 생산하는데 유용하게 활용될 수 있다.

[15]

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 본 출원의 일 실시예에 따라 제조한, 재조합 벡터 변이 라이브러리의 개별 클론에서 발현된 녹색형광단백질의 형광 세기를 분석한 결과를 보여주는 그래프이다. cj1은 cj1 프로모터를 포함하는 클론, M1 내지 M20은 상기 변이 라이브러리의 각 개별 클론을 의미한다.

[17] 도 2는 본 출원의 일 실시예에서 제조한, cj2.2프로모터 및 metZ 유전자를 포함하는 벡터의 개열지도이다.

[18] 도 3은 본 출원의 일 실시예에서 제조한, cj2.2프로모터 및 opss 유전자를 포함하는 벡터의 개열지도이다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[21]

[22] 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[23]

[24] 본 출원에서 용어 "프로모터"는 폴리머라제(polymerase)에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 목적 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 코딩 영역의 상위(upstream)의 비 해독된 뉴클레오티드 서열, 즉 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 의미한다. 상기 프로모터는 mRNA 전사 개시부위의 5' 부위에 위치할 수 있다.

[25]

[26] 본 출원에서, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로모터

활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 "폴리뉴클레오티드" 또는 "cj2.2 프로모터"로 혼용되어 명명될 수 있으며, 본 명세서에서는 상기 기술된 용어가 모두 사용될 수 있다.

[27]

[28] 본 출원의 목적상, 상기 폴리뉴클레오티드는 종래의 프로모터에 비하여 증가된 프로모터 활성을 가질 수 있다. 또한, 목적하는 숙주 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 유전자의 발현 증가를 가져올 수 있으며, 상기 목적 유전자의 발현뿐만 아니라 상기 목적 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 및 활성을 증가시킬 수 있다.

[29] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 범용 프로모터로 사용될 수 있다.

[30]

[31] 이때, 상기 용어 "목적 유전자"는 발현을 증가시키고자 하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 의미하며, 일 예로서 아미노산 생산에 관여하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[32] 구체적으로, 상기 유전자는 메치오닌 또는 시스테인 등의 아미노산 생산에 관여하는 단백질을 코딩하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 메치오닌의 생산에 관여하는 메치오닌 전환 효소 또는 시스테인의 생산에 관여하는 시스테인 전환 효소를 코딩하는 것일 수 있으며, 더욱 더 구체적으로 메치오닌의 생산에 관여하는 O-아세틸호모세린 설피드릴라제(O-acetylhomoserine sulfhydrylase) 또는 시스테인의 생산에 관여하는 O-포스포세린 설피드릴라제(O-phosphoserine sulfhydrylase: OPSS)를 코딩하는 것일 수 있으며, 가장 구체적으로 metZ 유전자 또는 opss 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 각 유전자의 서열은 미국 국립보건원의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스를 통하여 당업자가 용이하게 입수할 수 있다.

[33]

[34] 본 출원에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[35] 또한, 본 출원의 뉴클레오티드 서열은 종래 알려진 돌연변이 유발법, 예를 들면 방향성 진화법(direct evolution) 및 부위특이적 돌연변이법(site-directed mutagenesis) 등에 의하여 변형될 수 있다.

[36] 따라서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열에 대해서 적어도 60% 이상, 구체적으로는 70% 이상, 보다 구체적으로는 80% 이상, 보다 더 구체적으로는 83% 이상, 84% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 또는 97% 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 서열과 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 경우도 역시 본 출원의 범주에 포함됨은

자명하다.

[37]

[38] 본 출원에서 용어 "상동성"은 주어진 뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 상기 뉴클레오티드 서열에 대한 상동성은 예를 들면, 문헌에 의한 알고리즘 BLAST(참조: Karlin 및 Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873, 1993)나 Pearson에 의한 FASTA(참조: *Methods Enzymol.*, 183, 63, 1990)를 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다(참조: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

[39] 상기 "엄격한 조건"은 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 공지의 문헌에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성이 높은 유전자끼리, 60% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1×SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다. 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 뉴클레오티드가 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 상기 용어 "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있다.

[40] 구체적으로, 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).

[41]

[42] 특히, 상기에서 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진다는 표현은 해당 폴리뉴클레오티드를 프로모터로서 목적 유전자에 연결하여 사용할 때, 제한효소 사용과 같이 목적 유전자에 연결하는 과정 중에 발생할 수 있는

- 뉴클레오타이드의 추가, 및/또는 삭제, 및/또는 변이 등의 경우를 배제하지 않는다.
- [43] 또한, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드는, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화되어 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.
- [44]
- [45] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [46] 이때, 상기 "프로모터"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [47]
- [48] 본 출원에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 세포 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전 물질을 보유하는 인위적 DNA 분자로서, 적합한 유전자 발현 조절 서열; 및 이에 작동 가능하게 연결된 목적 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 제조물을 의미한다.
- [49]
- [50] 구체적으로, 상기 용어 "유전자 발현 조절 서열"은 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 이에 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 서열을 의미한다.
- [51]
- [52] 구체적으로, 상기 유전자 발현 조절 서열은 유전자의 전사를 실시하기 위한 프로모터 외에 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 DNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 원핵 생물에 적합한 조절 서열로서 프로모터, 및 리보솜 결합 부위를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 통상의 당업자에 의해 필요에 따라 상기한 바와 같은 유전자 발현 조절을 위한 서열을 구성할 수 있다.
- [53]
- [54] 또한, 상기 용어 "작동 가능하게 연결된"(operatively linked)은 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드가 목적 유전자의 전사를 개시 및 매개하도록 상기 목적 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [55]
- [56] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주 세포 내에서 발현 가능한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된

- 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다.
- [57] 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λLB3, λBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다.
- [58] 또한, 숙주 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 내재적 프로모터를 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 예를 들면, pECCG117, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pCES208, pXMJ19 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [60] 본 출원의 벡터는 상동재조합을 일으켜서 염색체 내로 삽입될 수 있으므로 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 폴리뉴클레오티드의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [61]
- [62] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다.
- [63] 이때, 상기 "벡터"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [64]
- [65] 본 출원에서 용어, "숙주 세포"는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 의미한다.
- [66] 이때, 상기 용어 "형질전환"은 프로모터 활성을 갖는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 상기 벡터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드의 조절을 받는 목적 유전자가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다.
- [67] 구체적으로, 상기 숙주 세포는, 상기 폴리뉴클레오티드가 도입되고 프로모터로서 작동할 수 있으며, 이에 따라 상기 폴리뉴클레오티드의 조절을 받는 목적 유전자의 발현이 증가하는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 일 예로서, 미생물, 식물 세포, 동물 세포 등이 될 수 있고, 구체적으로 에세리키아 속 또는 코리네박테리움 속 등의 미생물일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 에세리키아 속의 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [68]
- [69] 상기 형질전환의 방법은 상기 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 모든 방법을

포함하며, 숙주 세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[70]

[71] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 상기 숙주 세포 또는 이를 배양한 배지에서 목적 물질을 분리하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공한다.

[72] 이때, 상기 "숙주 세포"에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[73]

[74] 본 출원에서, 상기 목적 물질은 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 아미노산은 다른 언급이 없는 한 L-형태의 아미노산일 수 있으며, 글리신, 알라닌, 발린, 로이신, 아이소로이신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 글루타민, 메치오닌, 아스파라트산, 아스파라긴, 글루탐산, 라이신, 알지닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 프롤린 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로, 상기 아미노산은 메치오닌 또는 시스테인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[75]

[76] 본 출원에서 용어 "배양"은 숙주 세포를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원에서 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 이용하여 목적 물질을 생산하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정, 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다.

[77] 배지 중에서 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[78] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는

상응하는 나트륨을 함유하는 염이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.

- [80] 상기 숙주 세포의 배양 중 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [81] 배양물(배지)의 온도는 보통 20°C 내지 45°C, 구체적으로는 25°C 내지 40°C일 수 있다. 배양 시간은 원하는 목적 물질의 생성량이 얻어질 때까지 계속할 수 있으나, 구체적으로는 10 내지 160시간일 수 있다.
- [82]
- [83] 배양물(배지)로부터의 목적 물질의 회수는 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 분리되어 회수될 수 있다. 이러한 분리 방법에는, 원심분리, 여과, 크로마토그래피 및 결정화 등의 방법이 이용될 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [84] 상기 회수 단계는 정제 공정을 추가로 포함할 수 있다.
- [85]

발명의 실시를 위한 형태

- [86] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.
- [87]
- [88] 실시예 1: cj1 프로모터 서열을 포함하는 재조합 벡터의 변이 라이브러리 제작
- [89] 미생물 균주에서 유전자 발현을 강하게 유도할 수 있는 프로모터를 발굴하기 위하여, 강력한 활성을 나타낸다고 알려진 기존의 cj1프로모터(대한민국 공개특허공보 제10-2006-0068505호)를 기반으로 변이 라이브러리를 제작하였다.
- [90] 구체적으로, cj1 프로모터의 서열을 포함하는 재조합 벡터 pCL-cj1-gfp를 주형으로 하여 변이 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리는 error-prone PCR 키트(clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit)를 이용하여 제작하였다. 변이가 발생할 수 있는 조건에서, 서열번호 2 및 3의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 1000bp 당 1개의 변이가 발생하는 조건은 다음과 같다: MnSO₄(8

mM)를 넣지 않고 dGTP를 40 μ M(final rxn) 첨가하여 94°C에서 30초 동안 선-열처리(pre-heating) 후, 94°C에서 30초, 68°C에서 1분의 과정을 25회 반복 수행하였다. 이 때 얻어진 PCR 산물을 메가프라이머(500~125 ng)를 이용하여 95°C에서 50초의 변성(denaturation), 60°C에서 50초의 어닐링(annealing), 및 68°C에서 12분의 연장(extension) 과정을 25회 반복 수행한 후 DpnI 처리 과정을 거쳐 대장균 DH5 α 균주에 형질 전환하여 라이브러리를 제작하였다.

[91]

[92] 실시예 2: 제조합 벡터의 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP) 활성 세기 평가

[93] 상기 실시예 1에서 제작한 제조합 벡터 변이 라이브러리의 활성을 평가하기 위하여 이의 GFP 활성을 비교하였다.

[94] 구체적으로, 약 10,000주 이상의 라이브러리를 M9 배지에 접종하여 약 24시간 동안 37°C, 900rpm에서 배양하였다. 배양한 대장균을 4000rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 수득한 후, PBS(phosphate buffered saline)에 현탁하고 형광세포분석기를 통하여 녹색형광단백질의 세기가 강한 변이주를 선별하였다.

[95] 1차 스크리닝으로 cj1 프로모터와 비교하여 GFP 활성이 약 1.1배 내지 5배 높은 변이주를 20종 선별하였다(도 1). 이 중에 GFP 활성이 가장 높은 변이 프로모터 M11을 cj2.2 프로모터(서열번호 1)로 명명하고, 서열을 분석하였다.

[96]

[97] 실시예 3: cj2.2 프로모터의 발현 벡터 제작

[98] 상기 실시예 2에서 제조합 벡터 라이브러리 중 cj2.2 프로모터의 활성이 가장 높음을 확인한바, 이를 미생물 균주에 도입하기 위하여 pCL_Pcj1 벡터를 사용하여 위치선택적 돌연변이(Site-directed mutagenesis)를 수행하였다.

[99] 구체적으로, 서열번호 4 및 5의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 상기 PCR은 94°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링, 및 68°C에서 12분의 연장 과정을 포함하며, 상기 과정들은 18회 반복 수행하였다.

[100] 상기 과정을 통해 얻어진 산물에 DpnI를 처리한 후, DH5 α 균주에 형질 전환하여 상기 cj2.2 프로모터를 포함하는 pCL_Pcj2.2 벡터를 제작하였다.

[101]

[102] 실시예 4: cj2.2 프로모터의 활성 측정

[103] 실시예 4-1: 메치오닌 전환 효소(O-아세틸호모세린 설피드릴라제)의 발현량 측정

[104] cj2.2 프로모터의 활성 및 이에 따른 유전자 발현 유도능을 확인하기 위하여, cj2.2 프로모터에 메치오닌 전환 효소(O-아세틸호모세린 설피드릴라제)를 연결하고 이의 발현량을 확인하였다.

[105] 구체적으로, 상기 실시예 3에서 제작한 pCL_Pcj2.2 벡터에 O-아세틸호모세린 설피드릴라제를 암호화하는 metZ 유전자(대한민국 등록특허공보 제10-1250651호)를 클로닝하였다. PCR은 로도박터 스페로이드의 염색체를

주형으로, 서열번호 6 및 7의 프라이머를 이용하여 수행하였으며, 94°C에서 30초의 변성, 55°C에서 30초의 어닐링, 및 72°C에서 2분의 연장 과정을 30회 반복 수행하였다. 상기 PCR 반응으로 획득한 DNA 절편을 BamHI/SalI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단한 pCL_P2.2 벡터에 클로닝하였다. 상기 방법으로 제작된 벡터를 pCL-Pcj2.2-metZ라 명명하였으며, 상기 벡터의 모식도는 도 2에 나타내었다.

- [106] 상기 pCL-Pcj2.2-metZ 벡터를 대장균 K12 균주에 형질전환 시키고, 50 μ g/L의 스펙티노마이신이 포함된 LB 평판배지에서 배양한 후 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 50 μ g/L의 스펙티노마이신이 포함된 LB 배지 3 ml에 접종하여 37°C, 200rpm 조건으로 16시간 배양하였다. 이를 다시 새로운 25 ml LB 액체배지(250 ml 용량의 플라스크)에 재접종하여 OD₆₀₀이 0.5~0.6 되도록(2~3시간) 동일 배양 조건에서 키운 직후, 포도당 4%가 첨가된 LB배지 500 ml(1L 용기)를 포도당이 고갈되는 시점까지 배양하였다. 배양이 완료된 후, 배양액 1 ml을 회수하고 원심분리기로 상등액을 제거하여 세포를 획득하였다. 상기 세포를 0.1M 포타슘포스페이트 완충액(potassium phosphate, pH7.5)으로 세척한 후, 1 ml의 포타슘포스페이트 완충액에 현탁하고, 초음파를 이용하여 세포를 파쇄하였다.
- [107] 이후, 상기 파쇄물 내 메치오닌 전환 효소(O-아세틸호모세린 설피드릴라제)의 활성을 측정하였다. 효소 활성을 측정하기 위하여, 80 g/L의 O-아세틸호모세린 1 ml에 소듐메칠머캅탄(15%, w/v) 0.01 ml, O-아세틸호모세린 설피드릴라제 0.01 ml, 및 피리독살포스페이트(pyridoxal 5'-phosphate) 0.1 mM을 혼합한 기질 용액에, 상기 파쇄물을 5 μ l 첨가한 후, 800rpm 교반 하에 33°C에서 효소 반응을 수행하였다. 상기 반응이 완료된 후, 메치오닌 및 O-아세틸호모세린의 농도를 분석하기 위하여 HPLC를 이용하였으며, HPLC에서 분석된 결과를 이용하여 종래의 방법을 통해 단백질 활성을 계산하였다. 그 결과는 하기의 표 1에 나타내었다.

[108]

[109] [표1]

벡터	활성(Unit/ml)	상대적인 활성
pCL-Pcj1-metZ	9.3	1.0
pCL-Pcj2.2-metZ	29.2	3.1

[110]

- [111] 상기 표 1에서 볼 수 있듯이, 종래에 미생물 균주에서 유전자 발현을 강하게 유도한다고 알려진 cj1 프로모터에 비하여, 본 출원의 cj2.2 프로모터는 그보다 유전자(O-아세틸호모세린 설피드릴라제)의 활성을 약 3.1배 더 증가시키는 것을 확인하였다.

- [112] 따라서, 상기 cj2.2 프로모터는 종래의 프로모터에 비하여 더 강한 활성을 가지며, 그에 따라 이에 연결된 유전자가 코딩하는 목적 효소의 활성도 더 증가될 수 있음을 확인하였다.
- [113]
- [114] 실시예 4-2: 시스테인 전환 효소(O-포스포세린 설파이드릴라제)의 발현량 측정
- [115] cj2.2 프로모터의 활성 및 이에 따른 유전자 발현 유도능을 확인하기 위하여, cj2.2 프로모터에 시스테인 전환 효소(O-포스포세린 설파이드릴라제)를 연결하고 이의 발현량을 확인하였다.
- [116] 구체적으로, 상기 실시예 3에서 제작한 벡터에 O-포스포세린 설파이드릴라제(O-phosphoserine sulphydrylase; 이하 "OPSS"로 지칭함, 대한민국 등록특허공보 10-1208267)를 클로닝하였다. PCR은 마이코박테리움 스페그마티스의 염색체를 주형으로, 서열번호 8 및 9의 프라이머를 이용하여 수행하였으며, 상기 실시예 4-1과 유사한 방법으로 벡터를 제작하였다. 제작한 벡터는 pCL-Pcj2.2-opss라 명명하였으며, 상기 벡터의 모식도는 도 3에 나타내었다.
- [117] 상기 pCL-Pcj2.2-opss 벡터를 대장균 K12 균주에 형질전환 시키고, 50 $\mu\text{g/L}$ 의 스펙티노마이신이 포함된 LB 평판 배양한 후 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 50 $\mu\text{g/L}$ 스펙티노마이신이 포함된 LB 배지 5 ml에 접종하여 37°C, 200rpm 조건으로 16시간 배양하였다. 이를 다시 새로운 25 ml LB 액체배지(250 ml 용량의 플라스크)에 250 ml 재접종하여 OD₆₀₀이 0.5~0.6 되도록(2~3시간) 동일 배양 조건에서 키운 직후, 포도당 4%가 첨가된 LB 배지 500 ml(1L 용기)를 포도당이 고갈되는 시점까지 배양하였다. 배양액에 자일렌 2%(v/v)를 첨가하여 파쇄하였고, 이를 활성평가에 사용하였다.
- [118] 이후, 상기 pCL-Pcj2.2-opss 벡터를 이용하여 제조된 OPSS 효소의 활성 평가 조건 및 방법은 기존의 문헌(Mino K 및 Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; BurnsKE 외, J. Am.Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD 외, J. Biol.Chem., 281: 25062-25075, 2006)을 인용하였다. 기질의 첨가 단위는 ml이며, 효소 활성을 측정하기 위한 조건은 하기 표 2와 같다.
- [119]

[120] [표2]

	블랭크(Blank)	OPSS 반응액
효소	-	과쇄물 40 ml(또는 조단백질 50 mg)
1M HEPES (pH7.4)	100 ml	100 ml
0.5M Na ₂ S	20 ml	20 ml
10mM PLP	20 ml	20 ml
100mM OPS	0	50 ml
DW	790 ml	750 ml
Total	1000 ml	1000 ml

[121]

[122] 상기 표 2에서 효소를 제외한 혼합물을 37°C에서 5분간 선-인큐베이션한 후, OPSS 효소 50 mg을 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 상기 반응액에 33.2% TCA 0.1 ml를 추가하여 반응을 중지시킨 후, 0.1N HCl에 희석하여 LC 분석을 통해 시스테인과 시스틴을 분석하였다. 측정된 활성 결과는 하기의 표 3에 나타내었다.

[123]

[124] [표3]

벡터	활성 (Unit/ml)	상대적인 활성
pCL-Pcj1-opss	6.0	1.0
pCL-Pcj2.2-opss	12.0	2.0

[125]

[126] 상기 표 3에서 볼 수 있듯이, 종래에 미생물 균주에서 유전자 발현을 강하게 유도한다고 알려진 cj1 프로모터에 비하여, 본 출원의 cj2.2 프로모터는 그보다 유전자(O-포스포세린 설피드릴라제)의 활성을 약 2배 더 증가시키는 것을 확인하였다.

[127] 따라서, 상기 cj2.2 프로모터는 종래의 프로모터에 비하여 더 강한 활성을 가지며, 그에 따라 이에 연결된 유전자가 코딩하는 목적 효소의 활성도 더 증가될 수 있음을 확인하였다.

[128]

[129] 실시예 5: cj2.2 프로모터에 의해 생산된, 효소를 이용한 목적 산물의 생산

[130] 실시예 5-1: 메치오닌의 생산

[131] 상기 실시예 4-1을 통해 cj2.2 프로모터를 이용하면 메치오닌 전환 효소(O-아세틸호모세린 설피드릴라제)의 활성을 증가시킬 수 있음을 확인한바,

상기 효소를 이용하여 목적 산물인 메치오닌을 생산함으로써 이의 활성 및 반응기 시스템에서의 메치오닌 생산 효율을 확인하였다.

[132] 한편, O-아세틸호모세린 설파이드릴라제는 O-아세틸호모세린을 메치오닌으로 전환한다.

[133] 구체적으로, 먼저 효소 반응의 기질인 O-아세틸호모세린은 기존의 특허(대한민국 등록특허 제10-1250651호)에 기재된 미생물 균주를 발효하여 생산한 것을 사용하였으며, 배양한 발효액으로부터 원심분리기를 이용하여 세포를 제거한 후 약 70 g/L 농도의 배양액 500 ml을 기질로 사용하였다. 효소인 O-아세틸호모세린 설파이드릴라제로는 상기 실시예 4-1에서 생산한 파쇄물(효소액) 50 ml를 사용하였다. 효소 반응에는 소듐메칠머캅탄 약 50 ml를 사용하였고, 피리독살포스페이트(pyridoxal: 5'-phosphate, 미국 Sigma)는 0.1 mM 농도로 투입하였다. 반응은 pH7.0, 33°C, 교반은 700rpm으로 설정하였다. 반응 시간은 소듐메칠머캅탄을 공급하며 3시간 동안 수행하였다. O-아세틸호모세린과 L-메치오닌의 시간별 농도 분석은 HPLC를 이용하여 수행하였고, 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[134]

[135] [표4]

시간[분]	Cj1		Cj2.2	
	O-아세틸호모세린[g/L]	L-메치오닌[g/L]	O-아세틸호모세린[g/L]	L-메치오닌[g/L]
0	66.1	0	66.1	0
30	20.6	24.1	9.2	35.5
90	9.5	42.0	2.8	47.7
120	3.1	47.2	0	49.4
180	0	49.5	-	-

[136]

[137] 표 4에서 볼 수 있듯이, 종래에 미생물 균주에서 유전자 발현을 강하게 유도한다고 알려진 cj1 프로모터에 비하여, 본 출원의 cj2.2 프로모터를 이용하는 경우에는 O-아세틸호모세린이 L-메치오닌으로 전환되는 속도가 더 빠르며, 따라서 L-메치오닌이 보다 더 빠르게 생산되는 것을 확인하였다.

[138] 이는, 본 출원의 cj2.2 프로모터로 유전자를 발현시키는 경우, 해당 유전자가 코딩하는 목적 산물, 즉 메치오닌 전환 효소(O-아세틸호모세린 설파이드릴라제)의 활성 증가에 의한 것임을 알 수 있었다.

[139]

[140] 실시예 5-2: 시스테인의 생산

- [141] 상기 실시예 4-2를 통해 cj2.2 프로모터를 이용하면 시스테인 전환 효소(O-포스포세린 설피드릴라제)의 활성을 증가시킬 수 있음을 확인한바, 상기 효소를 이용하여 목적 산물인 시스테인을 생산함으로써 이의 활성 및 반응기 시스템에서의 시스테인 생산 효율을 확인하였다.
- [142] 한편, O-포스포세린 설피드릴라제는 OPS를 시스테인(또는 이의 산화물인 시스틴)으로 전환한다.
- [143] 구체적으로, 전환 반응액의 시스테인 농도는 Gaitonde 방법 및 LC 분석으로 정량하였다. 또한 시스테인이 산화되어 생성된 시스틴은 LC 분석으로 정량하였다. 먼저, 1L 용기 스케일에서의 전환 반응에 앞서, 1L 용기 스케일 발효를 통해 획득한 OPS 발효액에 대하여 원심분리(10000rpm, 10분, 4°C)를 수행하여 상등액을 수득하고 이를 막투과(0.45 μm)하여 균체를 제거하였다. 상기 OPS 발효액(19.317 g/L)에 72g Na₂S을 투입하고 이로부터 생기는 침전물은 와트만 여과지(6 μm)을 이용하여 제거하였다. 이후 10 mM PLP(pyridoxal 5'-phosphate)을 투입하고, 37°C, 200rpm, 5분간 선-인큐베이션하고 최종적으로 50 mg OPS 설피드릴라제를 첨가하여 1L 용기 스케일에서 전환 반응을 수행하였다. 효소 활성을 측정하기 위한 조건은 하기 표 5와 같다.
- [144]
- [145] [표5]

반응액 구성	반응액 내 농도 (또는 중량)	혼합된 양 (중량 또는 부피)
OPS 설피드릴라제(2.59 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	50 mg	19 ml
Na ₂ S	300 mM	72g
10 mM PLP	0.1 mM	10 ml
균체 제거된 OPS 발효액 (19.317 g/l)	104.42 mM	1000 ml
Total	-	1029 ml

- [146]
- [147] 이후, 반응 0, 10, 30, 60, 120분에 각각 시간별로 상기 반응액을 100 μl 씩 취하여 33.2% TCA 100 μl 와 섞어서 반응을 중지시켰고, 반응액을 0.1N HCl에 희석하여 LC 분석을 통해 시스테인과 시스틴을 분석하였다. 또한 Gaitonde 방법을 통해서 시스테인과 시스틴을 정량하였다. 분석된 결과는 하기 표 6에 나타내었다.
- [148]

[149] [표6]

시간[분]	시스테인 및 시스틴 [g/L]	
	Cj1	Cj2.2
0	1.36	2.5
10	3.58	4.76
30	6.45	7.65
60	8.57	8.98
120	9.07	-

[150]

[151] 표 6에서 볼 수 있듯이, 종래에 미생물 균주에서 유전자 발현을 강하게 유도한다고 알려진 cj1 프로모터에 비하여, 본 출원의 cj2.2 프로모터를 이용하는 경우에는 시스테인 및 시스틴이 보다 더 빠르게 생산되는 것을 확인하였다.

[152] 이는, 본 출원의 cj2.2 프로모터로 유전자를 발현시키는 경우, 해당 유전자가 코딩하는 목적 산물, 즉 시스테인 전환 효소(O-포스포세린 설피드릴라제)의 활성 증가에 의한 것임을 알 수 있었다.

[153]

[154] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.