(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월09일
(11) 등록번호 10-1392968
(24) 등록일자 2014년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0052221
(22) 출원일자 2012년05월16일
심사청구일자 2012년05월16일
(65) 공개번호 10-2012-0128116
(43) 공개일자 2012년11월26일
(30) 우선권주장
1020110045866 2011년05월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1019980070038 A
Yeast, Vol.10, pp.1621-1629(1994.)
Curr. Genet., Vol.24, pp.181-183(1993.)
Appl. Environ. Microbiol., Vol.74, pp.7514-7521(2008.)
전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
손정훈
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
성봉현
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

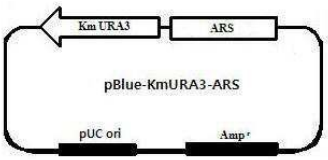
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **신규한 자기복제서열 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 클루이베로마이세스 마르시아누스로부터 유래된 신규한 자기복제서열, 상기 자기복제서열을 포함하는 플라스미드 벡터, 상기 플라스미드를 이용한 형질전환체의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 형질전환체, 상기 플라스미드 벡터에 목적 유전자가 도입된 유전자 라이브러리 및 상기 유전자 라이브러리를 이용하여 개량된 유전자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 자기복제서열을 이용하면, *K. marxianus*를 높은 효율로 형질전환 시킬 수 있고, 상기 형질전환된 *K. marxianus*로 부터 목적하는 유전자를 용이하게 회수할 수 있을 뿐만 아니라 유전자 라이브러리 구축 및 새로운 단백질, 고활성을 보이는 단백질 또는 강력한 프로모터를 스크리닝할 수 있으므로, *K. marxianus*를 이용한 산업적 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1c



(72) 발명자

김현진

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

김종현

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

배정훈

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 310006-05-1-SB010

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 비목재자원을 활용한 바이오신소재 개발: 고온성 효모(KM) 세포공장 플랫폼 구축 및 그린 바이오 신소재 생산기술 개발

기 여 율 40/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029737

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업

연구과제명 차세대 바이오매스 기반 원료유연형 에너지 복합 생산기술 개발

기 여 율 30/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.10.22 ~ 2011.08.21

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM0531113

부처명 교육과학기술부

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 저탄소 녹색성장을 위한 바이오매스/에너지 개발

기 여 율 30/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 4 내지 8의 염기서열로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열로 구성되는 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 염색체 유래인 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 에피좀 플라스미드 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서,

도 1c의 개열지도로 표시되는 에피좀 플라스미드 벡터인 것인 플라스미드 벡터.

청구항 5

(ⅰ) 목적 유전자를 제3항의 플라스미드 벡터에 클로닝하여 재조합 플라스미드 벡터를 수득하는 단계; 및,

(ii) 상기 재조합 플라스미드 벡터를 효모 균주에 도입하여 형질전환시키는 단계를 포함하는, 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 형질전환체의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 목적 유전자는 리파제를 코딩하는 유전자인 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 플라스미드 벡터는 서열번호 4 내지 8로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로 구성되는 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 효모 균주는 클루이베로마이세스 마르시아누스 균주인 것인 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되어, 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 형질전환체.

청구항 10

제3항의 플라스미드 벡터에 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 도입된 유전자 라이브러리.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 주형으로 하여 무작위적으로 변이시켜서 수득한 것인 유전자 라이브러리.

청구항 12

(ⅰ) 목적하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 주형으로 하여 무작위적으로 변이시켜서 다양한 변이를 가지는 하나 이상의 변이된 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계;

(ⅱ) 상기 하나 이상의 변이된 폴리뉴클레오티드를, 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제3항의 에피좀 플라스미드 벡터에 클로닝하여 유전자 라이브러리를 수득하는 단계;

(ⅲ) 상기 유전자 라이브러리를 효모 균주에 도입하여 목적 단백질을 발현시키는 단계; 및,

(ⅳ) 상기 발현된 목적 단백질의 활성을 비교하여, 변이되지 않은 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 대조군 단백질에 비해 개량된 활성을 나타내는 변이된 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 선별하는 단계를 포함하는, 개량된 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 효모 균주는 클루이베로마이세스 마르시아누스 균주인 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 자기복제서열 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 클루이베로마이세스 마르시아누스로부터 유래된 신규한 자기복제서열, 상기 자기복제서열을 포함하는 플라스미드 벡터, 상기 플라스미드를 이용한 형질전환체의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 형질전환체, 상기 플라스미드 벡터에 목적 유전자가 도입된 유전자 라이브러리 및 상기 유전자 라이브러리를 이용하여 개량된 유전자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고온성 효모인 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus, K. marxianus*)는 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)와 유사한 크라브트리-음성(Crabtree-negative) 효모로서 기초연구가 많이 진행되었으며 산업적 활용도가 매우 높은 균주이다(Fonseca 등, Appl. Microbial. Biotechnol. 79, 339, 2008). 상기 *K. marxianus*는 산업적 가치가 있는 이눌리나제, β-갈락토시다제, β-글루코시다제, 엔도폴리갈락투로나제, 단백질인산화효소, 카르복시펩티다제, 아미노펩티다제 등의 효소의 공급원으로 이용되어 왔다. 최근

K. marxianus 균주는 다양한 탄소원 사용능력, 고온에서의 빠른 성장능 등의 장점이 있어 최근 석유대체 바이오화학 이나 바이오에너지 분야에서 *K. marxianus* 균주를 활용하려는 시도가 늘어나고 있다. 상기 *K. marxianus* 균주는 종래의 효모(*S. cerevisiae*)에 비하여 고온에서의 에탄올 발효가 가능하여 바이오에탄올 발효시 냉각비용을 절감할 수 있고, 기질의 당화효율을 높게 유지할 수 있으며, 고온에서 배양함으로써 다른 미생물의 오염을 방지할 수 있으므로, 동시당화공정(simultaneous saccharification and fermentation) 이나 통합공정(consolidated bioprocessing) 개발에 매우 적합하다. 지금까지 *K. marxianus* 균주를 이용한 에탄올 생산 연구는 대부분 다양한 탄소원을 사용한 발효 또는 균주 고정화를 통한 발효 방법의 최적화 등 발효공정 개발에 집중되었으나 최근에는 유전자 재조합기술을 도입하여 *K. marxianus* 균주의 에탄올 생산능을 향상 시키려는 연구가 진행되고 있다.

[0003] 클루이베로마이세스계열 효모의 유전자 조작 연구는 주로 대표 균주인 K. lactis를 중심으로 진행되어 왔으며 *K. marxianus* 유전자 조작 시스템은 상대적으로 열악한 상태이다. *K. marxianus*의 특성을 개량하기 위하여 1984년 처음으로 G418 저항성 유전자와 K. lactis 유래의 자기복제서열(ARS, autonomously replicating sequence)인 KARS2를 포함하는 pGL2 벡터와 *S. cerevisiae*의 리튬이온 방법을 사용하여 형질전환 방법이 개발되었으나 낮은 효율 때문에 널리 사용되지는 못하였다(Das et al., 1984. J Bacteriol 158: 1165). 클루이베로마이세스속에서 유일하게 발견된 플라스미드인 pKD1은 *S. cerevisiae*의 2um 플라스미드와 유사한 성질을 갖는다(Falcone 등, 1986. Plasmid 15: 248, Bianchi 등, 1991, Curr. Genet. 19, 155). 그러나, pKD1을 이용하여 *K. marxianus*를 형질전환할 수 있지만 형질전환 효율이나 세포내 안정성이 매우 낮은 것으로 보고되었다(Chen 등, 1989, Curr. Genet. 16, 95; Bartkeviciute 등, 2000, Enzyme Micro. Technol. 26, 653). *K. marxianus* 염색체 유래의 자기복제서열을 이용한 인공 플라스미드(Ball 등, 1999; Iborra 등, 1994, Zhanag 등, 2003)가 개발되어 형질전환 효율을 현저하게 증가시킬 수 있었으나, 세포내에서 유전자를 플라스미드 상태로 장기간 안정하게 유지시키는 문제는 여전히 해결되지 못하고 있다(Lane 등, 2010, Fungal Biology Reviews, 24, 17). 따라서 *K. marxianus*에서 외래유전자를 장기적으로 안정하게 유지시키기 위해서는 주로 염색체로 도입하는 유전자 도입 방법이 주로 이용되고 있으며 특히 외래유전자의 도입 복제수를 높이기 위하여 효모 염색체에 다수 존재하는 δ 서열을 유전자 도입의 표적으로 이용하고 있다(Pecota 등, 2007, J. Biotechnol. 127, 408; Yanase 등, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol. 88, 381).

[0004] 그러나, 향후 고온성 효모 *K. marxianus*를 바이오화학 분야에서 다양한 석유대체 화합물이나 바이오에너지를 생산하기 위한 플랫폼 균주로 활용하기 위해서는 동 균주를 보다 효율적으로 조작할 수 있어야 하며 특히 다양한 효소 유전자를 개량할 수 있도록 유전자 라이브러리의 구축과 고속선별 시스템이 필요하다. 이를 위해서는 형질전환 효율이 낮고 유전자의 회수가 어려운 염색체 도입 시스템은 한계가 있다. 따라서, *K. marxianus* 내에서 높은 형질전환 효율을 가지며 세포내에서 독자적으로 유지되고 또 쉽게 유전자 회수가 가능한 에피좀 플라스미드 벡터 시스템이 필요하다.

[0005] 이런 배경하에서, 본 발명자들은 *K. marxianus* 내에서 높은 형질전환 효율을 가지며 세포내에서 독자적으로 유지되고 또 쉽게 유전자 회수가 가능한 에피좀 플라스미드 벡터 시스템을 개발하기 위하여, 예의 연구노력한 결과, *K. marxianus* 염색체 유래의 자기복제서열(ARS)을 다수 선별하여 형질전환 효율 및 세포내 안정성이 뛰어난 자기복제서열을 확보하였으며 이를 포함하는 에피좀 플라스미드 벡터를 사용할 경우, *K. marxianus*를 높은 효율로 형질전환 시킬 수 있고, 목적하는 유전자를 용이하게 회수할 수 있을 뿐만 아니라 유전자 라이브러리 구축 및 새로운 단백질, 고활성을 보이는 단백질 또는 강력한 프로모터를 스크리닝할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라스미드 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라스미드 벡터에 목적 유전자가 도입된 유전자 라이브러리를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자 라이브러리를 이용하여 개량된 유전자를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 4 내지 8의 염기서열로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0013] 본 발명의 용어 "자기복제 활성"이란, 세포내에서 DNA 단편이 염색체에 이입되지 않고서도 자율적으로 복제되는 특성을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 *K. marxianus*로부터 유래된 자기복제서열(ARS, autonomously replicating sequence)일 수 있고, 이는 효모균주 바람직하게는 *K. marxianus*, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 등의 균주에 외래 유전자를 도입하여 발현시킬 때 발현효율을 향상시키기 위하여 사용될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, *K. marxianus*에 도입한 외래유전자를 안정적으로 발현시킬 수 있는 에피좀 플라스미드 벡터를 제조하기 위하여, *K. marxianus* 염색체 유래의 자기복제서열을 선택하고자 하였다. 우선, *K. marxianus* 유래의 선별표지인 URA3(orotidine 5-phosphate decarboxylase) 유전자를 확보하였다. 다음으로, 상기 *K. marxianus* 유래의 게놈 DNA 라이브러리를 제조하였으며, 상기 라이브러리의 각 유전자 단편을 우라실 영양요구성 변이균주인 Km7155u에 도입하여 42개의 형질전환체를 수득하였다. 이어, 상기 형질전환체를 YPD 고체배지 및 최소 배지에서 배양하여 수득한 집락의 수를 비교하여 플라스미드 안정성을 측정한 결과, 6종의 형질전환체가 35% 이상의 높은 플라스미드 안정성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0015] 이에, 상기 6종의 형질전환체로부터 각각 수득한 플라스미드를 Km7155u 및 Km25571 균주에 각각 형질전환한 후, 단위 플라스미드당 형성된 형질전환체 수를 산출한 결과, 상기 6종의 형질전환체로부터 각각 수득한 모든 플라스미드가 우수한 형질전환 효율을 나타내었으므로, 상기 6종의 플라스미드에 포함된 DNA 단편(KmARS 4, 13, 32, 33, 34 및 39)이 자기복제서열임을 확인하고, 상기 6종의 자기복제서열의 염기서열을 분석한 결과, 전체적으로 633 내지 1275 bp 크기를 가지는 DNA 절편임을 확인하였다.

[0016] 상기 KmARS 4(서열번호 4)는 633 bp로서 일반적으로 진핵세포 자기복제서열에서 관찰되는 AT-풍부서열(서열번호 4)로 구성되어 있었으며, 먼저 이들 서열중 단백질을 코딩하는 서열이 있는지 확인하기 위하여 NCBI BLASTX 검색을 통해 단백질 데이터베이스를 검색한 결과 124-240 bp에서 Erwinia pyrifoliae Ep1/96 유래의 단백질과 부분적으로 상동성을 나타내었다.

[0017] 상기 KmARS 13(서열번호 5)은 763 bp의 AT-풍부서열(서열번호 5)로서, 단백질 데이터베이스에서 상동성을 나타내는 서열은 존재하지 않았으며 전체서열에 자기복제서열을 포함하고 있는 것으로 판단된다.

[0018] 상기 KmARS 32(서열번호 6)는 1275 bp의 AT-풍부서열(서열번호 6)이며 3-452 bp, 1085-1270 bp에서 K. lactis NRRL Y-1140 유래의 단백질과 상동성을 나타냈으며, 자기복제서열은 453-1084 bp에 존재할 것으로 판단되었다.

[0019] 상기 KmARS 33과 34(서열번호 7)는 동일서열으로서 719 bp(서열번호 7)이며, 1-384 bp에서 K. lactis NRRL Y-1140 유래의 단백질과 상동성을 나타내었으며 ORF를 제외한 385-719 bp에 자기복제서열이 존재하는 것으로 판단되었다.

[0020] 상기 KmARS 39(서열번호 8)는 680 bp(서열번호 8)이고, 599-679 bp에서 K. lactis NRRL Y-1140 유래의 단백질과 상동성을 나타내며 자기복제서열은 1-598 bp에 존재하는 것으로 판단되었다(도 3).

[0021] 다른 실시양태에 의하면, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 에피좀 플라스미드 벡터를 제공한다.

[0022] 본 발명의 용어 "플라스미드 벡터"란, 적당한 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물인 발현벡터의 일종을 의미한다. 본 발명의 플라스미드 벡터는 통상적인 플라스미드 벡터에 포함된 요소로서 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈 같은 발현조절 요소들을 포함할 수 있다. 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 플라스미드 벡터가 숙주세포에 되입되었을 때 반드시 작용을 나타내야만 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0023] 또한, 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

[0024] 플라스미드 벡터의 구체적인 예로는 pUC18, pIDTSAMRT-AMP, pBluescript KS+ 등의 상업적인 플라스미드 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 효모-유래 에피좀 플라스미드 벡터가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0025] 본 발명의 용어 "에피좀(episome)"이란, 세포질내에 존재하고 염색체와 독립적으로 증식하는 외래성의 유전자를 의미하는데, 염색체와 독립적(autonomous state, 자율적 상태)으로 존재할 수도 있고, 경우에 따라서는 염색체 내로 도입될 수도 있으며, 독립적으로 존재하거나 또는 염색체에 도입되더라도 원래의 기능을 그대로 유지할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명자들은 상기 6종의 플라스미드가 다른 효모에서도 작동하는지 확인한 결과, 사카로마이세스 세레비지와 같은 다른 효모에서도 형질전환 효율이 우수함을 확인하였으므로, 본 발명의 자기복제서열을 포함하는 에피좀 플라스미드 벡터는 *K. marxianus* 뿐만 아니라 다른 효모의 형질전환에도 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 본 발명의 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 *K. marxianus*에서 목적 단백질을 코딩하는 다양한 폴리뉴클레오티드 중에서 가장 우수한 활성을 나타내는 단백질을 스크리닝하여 유전자를 개량하는데 이용될 수도 있다.

[0027] 또 다른 실시양태에 의하면, 본 발명은 상기 플라스미드 벡터를 이용하여 형질전환체를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 형질전환체를 제공한다.

[0028] 구체적으로, 본 발명의 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 형질전환체의 제조방법은 (ⅰ) 목적 유전자를 제3항의 플라스미드 벡터에 클로닝하여 재조합 플라스미드 벡터를 수득하는 단계; 및, (ii) 상기 재조합 플라스미드 벡터를 효모 균주에 도입하여 형질전환시키는 단계를 포함한다. 이때, 목적 유전자는 특별히 이에 제한되지 않으나, 리파제를 코딩하는 유전자가 될 수 있고, 서열번호 4 내지 8로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열인 K. marxianus 염색체 유래의 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수도 있다.

[0029] 본 발명의 용어, "형질전환"이란, 상기 뉴클레오타이드 절편이 숙주 유기체의 게놈 안으로 이동하여 목적하는 펩타이드를 발현할 수 있도록, 유전적으로 안정한 유전을 일으키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트,

리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.

[0030] 상기 형질전환시 사용되는 숙주는 특별히 제한되지 않으나, 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*)속 세균 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)같은 바실러스(*Bacillus*)속 세균 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 세균 사카로마이세스 세레비지애, 스키조사카로마이세스 폼베 같은 효모, 동물세포 및 곤충 세포가 될 수 있고, 바람직하게는 효모 균주가 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 *K. marxianus*가 될 수 있다.

[0031] 또 다른 실시양태에 의하면, 본 발명은 상기 플라스미드 벡터에 폴리뉴클레오티드가 도입된 유전자 라이브러리 및 상기 유전자 라이브러리를 이용하여 개량된 유전자를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 용어 "유전자 라이브러리"란, 목적하는 개체의 세포에 포함된 모든 염색체의 전 DNA를 제한효소 등으로 절단하여 얻게 된 단편을 벡터에 도입한 집합을 의미하는데, 유전자 은행, 염색체상의 모든 DNA 영역을 포함하도록 고안되어 있으므로, 목적으로 하는 유전자의 클론을 스크리닝하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 유전자 라이브러리는 목적하는 유전자 단편을 효모 균주의 하나인 *K. marxianus*에서 발현시킬 수 있도록 상술한 플라스미드 벡터에 도입된 형태가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0033] 또한, 본 발명의 개량된 유전자를 스크리닝하는 방법은 (ⅰ) 목적하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 무작위적으로 변이시켜서 다양한 변이를 가지는 하나 이상의 변이된 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계; (ⅱ) 상기 변이된 폴리뉴클레오티드를, 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 에피좀 플라스미드 벡터에 클로닝하여 유전자 라이브러리를 수득하는 단계; (ⅲ) 상기 유전자 라이브러리를 효모 균주에 도입하여 목적 단백질을 발현시키는 단계; 및, (ⅳ) 상기 발현된 목적 단백질의 활성을 비교하여, 변이되지 않은 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 대조군 단백질에 비해 개량된 활성을 나타내는 변이된 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 선별하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 효모 균주는 *K. marxianus*가 될 수 있다.

[0034] 본 발명은 폴리뉴클레오티드가 도입된 유전자 라이브러리를 효모 균주에 도입하여 상기 폴리뉴클레오티드로부터 유래된 목적 단백질을 발현시키고, 이들 발현된 단백질의 활성을 비교하여 증강된 활성을 가지는 단백질을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 단백질 또는 펩티드를 코딩할 수 있는 한 특별히 제한되지 않으나, 세포의 게놈 DNA를 제한효소에 의해 무작위적으로 절단된 단편 등이 될 수도 있고, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 무작위적으로 돌연변이시켜 수득한 다양한 변이를 가지는 변이된 폴리뉴클레오티드 등이 될 수도 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 유전자 라이브러리는 상기 폴리뉴클레오티드를 본 발명의 자기복제 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 에피좀 플라스미드 벡터의 다클로닝 좌위(multi-cloning site)에 클로닝하여 수득할 수도 있고, 상동재조합에 의해 상기 폴리뉴클레오티드가 염색체에 도입될 수 있도록 상기 에피좀 플라스미드 벡터에 도입되어 수득할 수도 있으나, 상기 폴리뉴클레오티드가 숙주에서 발현될 수 있도록 구성되는 한, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 효모균주는 특별히 이에 제한되지 않으나, *K. marxianus*, 사카로마이세스 세레비지애, 스키조사카로마이세스 폼베 등을 사용할 수 있고, 상기 목적 단백질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 리파제가 될 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 종래의 리파제보다도 활성이 우수한 리파제를 스크리닝하기 위하여, 플라스미드 벡터 pBTEF-KmArs를 제작하고(도 5), 변이유도중합효소연쇄반응(error-prone PCR) 방법을 이용하여 변이주 라이브러리를 수득하였으며, 상기 변이주 라이브러리를 *K. marxianus*에 도입하여 약 900개의 형질전환체를 수득하고(도 6), 상기 형질전환체에서 발현된 변이된 리파제의 활성을 비교한 결과, 2개의 형질전환체에서 종래의 리파제보다도 우수한 활성을 나타내는 리파제가 발현됨을 확인하였다(표 5).

발명의 효과

[0036] 본 발명의 신규한 자기복제서열을 이용하면, *K. marxianus*를 높은 효율로 형질전환 시킬 수 있고, 상기 형질전

환된 *K. marxianus*로 부터 목적하는 유전자를 용이하게 회수할 수 있을 뿐만 아니라 유전자 라이브러리 구축 및 새로운 단백질, 고활성을 보이는 단백질 또는 강력한 프로모터를 스크리닝할 수 있으므로, *K. marxianus*를 이용한 산업적 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1a는 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 URA3 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pBlue-KmURA3의 개열지도이다.

도 1b는 재조합 플라스미드 pBlue-KmURA3에 기반한 자기복제서열(ARS, autonomously replicating sequence) 라이브러리인 pBlue-KmURA3-ARS lib의 개열지도이다.

도 1c는 재조합 플라스미드 pBlue-KmURA3에 ARS가 도입된 재조합 플라스미드인 pBlue-KmURA3-ARS의 개열지도이다.

도 2는 비교군으로 사용한 플라스미드 pBlue-FR A 및 pBlue-FR B의 개열지도이다.

도 3은 5종의 ARS 염기서열 분석 결과를 개략도이다.

도 4는 클루이베로마이세스 마르시아누스에서 리파제 유전자를 발현시키기 위한 발현벡터의 제조 과정을 도식적으로 나타낸 개략도이다.

도 5는 플라스미드 벡터 pBTEF-KmArs의 구조를 도식적으로 나타낸 개략도이다.

도 6은 리파제 유전자 초고속 개량을 위한 발현벡터의 제조 과정과 고활성 리파제의 선별과정을 도식적으로 나타낸 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1: 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 선별표지 KmURA3의 확보**

[0040] 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)유래의 *URA3*(orotidine 5-phosphate decarboxylase) 유전자 클로닝을 위하여 대전 한국생명공학연구원 소재 유전자은행에서 *K. marxianus* KCTC 7155 균주를 분양 받아 YPD(1% 효모추출물, 2% 펩톤 및 2% 포도당)배지에서 배양한 후 게놈성 DNA를 추출하였다. 추출된 시료 1㎕를 주형으로 서열번호 1과 서열번호 2 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응(94℃에서 5분동안 1회; 94℃ 30초간, 55℃ 30초간, 72℃ 1분간 반응을 25회; 72℃에서 7분간 1회)을 수행하였고, 증폭된 유전자를 아가로스젤 전기영동을 통해 1.4kb 절편을 회수하였다. 중합효소연쇄반응 산물을 pBluescript KS+에 클로닝하여 플라스미드 pBlue-KmURA3를 제조하고(도 1a), 삽입된 유전자의 염기서열을 분석한 결과 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 URA3 유전자를 포함하는 1.4 kb의 유전자임을 확인하였다(Bergkamp 등, 1993, Yeast, 9, 677)(서열번호 3). 도 1a는 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 URA3 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pBlue-KmURA3의 개열지도이다.

[0041] **실시예 2: 클루이베로마이세스 마르시아누스의 게놈 DNA 라이브러리 제조**

[0042] 클루이베로마이세스 마르시아누스의 게놈 DNA를 분리한 후 제한효소 *Sau3A* I 으로 부분 절단하여 DNA 절편을 얻었다. 이 DNA 절편에 클레나우 DNA 중합효소(Klenow DNA polymerase)로 G와 A의 2개의 뉴클레오티드를 첨가한 후 전기 영동하여 500-1,000bp 크기의 DNA 절편들을 분리하였다. 한편, 실시예 1에서 제조한 플라스미드 pBlue-KmURA3를 제한효소 *Xho* I 로 절단한 후, 클레나우 DNA 중합효소로 C와 T의 2개의 뉴클레오티드를 첨가하였다. 상기 분리한 클루이베로마이세스 마르시아누스의 DNA 절편을 절단된 pBlue-KmURA3에 삽입하여, 클루이베로마이세스 마르시아누스 게놈 DNA 라이브러리(library)를 제조하였다(도 1b). 도 1b는 재조합 플라스미드 pBlue-KmURA3에 기반한 ARS 라이브러리인 pBlue-KmURA3-lib의 개열지도이다.

[0043] 플라스미드 라이브러리를 대장균 DH5α에 형질전환 시킨 후, 이 형질전환체를 암피실린 100㎍/㎖이 함유된 2YT 배지(1.6% 트립톤, 1% 효모 추출액, 0.5% 소디움 클로라이드 및 2% 박토아가)에 도말하고 37℃에서 하룻밤 배양하여, 약 5×10^4의 콜로니를 얻었다. 이들 콜로니로부터 DNA를 추출하여, 증폭된 플라스미드 라이브러리 DNA를 얻었다.

[0044] **실시예 3: 클루이베로마이세스 마르시아누스의 형질전환 및 자기복제서열 선별**

[0045] 실시예 2에서 제조된 클루이베로마이세스 마르시아누스의 라이브러리 DNA를 리튬 초산법에 따라 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 우라실 영양요구성 변이균주인 Km7155u에 형질전환시킨 후, 이를 최소 배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물, 2% 글루코오스 및 2% 박토아가)에 도말하고 37℃에서 2일간 배양하여 42개의 형질전환체를 얻었다. 플라스미드가 클루이베로마이세스 마르시아누스로 도입되었는지 확인하기 위하여, 무작위 선별된 10개의 형질전환체로부터 추출한 전체 DNA를 대장균 DH5α를 형질전환시켰다. 암피실린을 함유하는 2YT 배지에서 대장균 형질전환체를 선별하였고, 대장균 형질전환체로부터 재조합 플라스미드인 pBlue-KmURA3-ARS를 분리 후 제한효소 분석 결과 형질전환된 대장균의 플라스미드에는 약 500-1,000bp 크기의 DNA 절편이 포함되어 있는 것을 확인하였다(도 1c). 도 1c는 재조합 플라스미드 pBlue-KmURA3에 ARS가 도입된 재조합 플라스미드인 pBlue-KmURA3-ARS의 개열지도이다.

[0046] **실시예 4: ARS의 자기복제 활성**

[0047] 실시예 3에서 수득한 DNA 절편의 자기복제 활성을 확인하기 위하여, 플라스미드 안정성 및 형질전환 효율을 확인하였다.

[0048] **실시예 4-1: 플라스미드 안정성 확인**

[0049] 각각의 형질전환체를 YPD 복합 배지(1% 효모추출물, 2% 펩톤 및 2% 포도당)에서 약 20세대 동안 배양한 후 동일한 세포수를 YPD 고체 배지(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 포도당 및 2% 박토아가)와 최소 배지(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.77% 우라실이 결핍된 영양보충물, 2% 글루코오스 및 2% 박토아가)에 각각 도말하고, 30℃에서 48시간 동안 배양하여 나타난 집락의 수를 비교하여 세대당 선택 표지의 안정성을 결정하였다(표 1). 또한 비교군으로서 자기복제활성을 보이는 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 자기복제서열(Iborra 등, 1994, Yeast, 10, 1621)을 함유하는 플라스미드 pBlue-FR A, pBlue-FR B를 사용하였다(도 2). 도 2는 비교군으로 사용한 플라스미드 pBlue-FR A 및 pBlue-FR B의 개열지도이다.

표 1

[0050] 각 형질전환체들의 플라스미드 안정성

형질전환체	플라스미드 안정성 (%)	형질전환체	플라스미드 안정성 (%)
1	32.3	23	25.8
2	15.7	24	25.2
3	32.9	25	33.7
4	42.6	26	27.5
5	33.2	27	32.3
6	27.2	28	19.4
7	31.5	29	21.9
8	26.4	30	17.4
9	16.1	31	31.7
10	16.8	32	37.6
11	11.3	33	70.0
12	15.2	34	67.8
13	38.1	35	9.4
14	28.4	36	19.1
15	19.4	37	19.7

16	9.4	38	24.7
17	24.1	39	51.2
18	11.5	40	1.1
19	30.4	41	27.7
20	12.6	42	17.3
21	23.5	FR A	65.9
22	31.6	FR B	70.9

[0051] 상기 표 1 및 도 2에서 보듯이, 플라스미드 안정성이 1~70%까지 다양하게 나타났으며, 특히 33번 형질전환체의 경우 비교군 플라스미드와 유사한 70%의 안정성을 나타내었다. 플라스미드 안정성이 35% 이상되는 형질전환체 6개를 선별하여 추가적인 연구를 수행하였다.

[0052] **실시예 4-2: 형질 전환 효율 조사**

[0053] 선별된 6개의 형질전환체로부터 플라스미드를 분리하여 다시 Km7155u 및 Km25571 균주에 각각 형질전환한 후 플라스미드 ㎍당 형질전환체 수를 결정하였다. 플라스미드 농도는 분광광도계를 사용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 또한, 대조군으로서 자기복제서열을 함유하지 않는 pBlue-KmURA3와 ARS를 포함하는 pBlue-FRA를 대조군으로 사용하였다(표 2).

표 2

[0054] 각 플라스미드의 형진전환 효율

ARS	서열번호	형질전환체의 수/1㎍ DNA		
		KM 7155u	KM 25571	*S. cerevisiae*
4	4	1.2×10^5	7.5×10^4	3.0×10^4
13	5	1.3×10^5	7.6×10^4	3.0×10^4
32	6	1.4×10^5	7.5×10^4	0
33	7	1.1×10^5	7.5×10^4	3.0×10^4
34	7	1.1×10^5	7.5×10^4	8.0×10^3
39	8	1.2×10^5	7.4×10^4	6.0×10^3
FR-A	-	1.3×10^5	7.7×10^4	6.0×10^3
pBlue-KmURA3	-	0	0	0

[0055] 상기 표 2에서 보듯이, 본 발명에서 확보된 6개의 자기복제서열을 포함하는 모든 플라스미드는 자기복제서열을 포함하지 않는 대조군 플라스미드 pBlue-KmURA3보다 월등히 높은 형질전환 효율을 보여 자기복제서열임을 확인하였으며 기존 문헌상 보고된 클루이베로마이세스 마르시아누스와 유사한 형질전환 효율을 보였다. 따라서 본 발명에서 얻은 클루이베로마이세스 마르시아누스 염색체로부터 얻은 유전자를 포함하는 모든 플라스미드는 형질전환 효율을 크게 향상시켰고 또 계대배양후 세포로부터 플라스미드를 회수할 수 있으므로 세포내에서 에피좀 상태로 자기복제되고 있음을 확인하여 확보된 6가지 DNA 절편이 클루이베로마이세스 마르시아누스의 자기복제서열임을 확인하였다. 이러한 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 자기복제서열이 다른 효모에서도 작동하는지 확인한 바 표 2에서 보는 바와 같이 효모 사카로마이세스 세레비지에서도 비슷한 수준으로 형질전환되었고 형질전환체의 전체 유전자를 분리한 후 대장균에 재형질전환하여 플라스미드를 회수할 수 있었다. 따라서 본 발명에서 확보된 자기복제서열이 타 효모에서도 작동할 수 있는 것으로 판단되었다.

[0056] **실시예 5: 확보된 자기복제서열의 염기서열 분석**

[0057] 자기복제능력을 가지는 6개 플라스미드의 뉴클레오티드 서열을 분석한 결과 633 내지 1275bp 크기의 DNA 절편이 포함되어 있는 것을 확인하였다. KmARS 4는 633 bp로서 일반적으로 진핵세포 자기복제서열에서 관찰되는 AT-rich 서열(서열번호 4)로 구성되어 있었으며, 먼저 이들 서열중 단백질을 코딩하는 서열이 있는지 확인하기 위하여 NCBI BLASTX 검색을 통해 단백질 데이터베이스를 검색한 결과 124 내지 240bp에서 *Erwinia pyrifoliae* Ep1/96 유래의 가상 단백질(hypothetical protein)과 부분적으로 상동성을 나타내었다. 따라서 ORF와 상동성을 나타내는 영역을 제외한 1 내지 123bp, 241 내지 633bp에 클루이베로마이세스 마르시아누스 유래의 자기복제서열이 존재하는 것으로 판단되며 진핵세포 자기복제서열 상 관찰되는 ARS core consensus 서열(5'-(A/T)TTTA(C/T)(A/G)TTT(A/T)-3')도 발견되었다. KmARS 13은 763bp의 AT-rich 서열(서열번호 5)로서, 단백질 데이터베이스에서 상동성을 나타내는 서열은 존재하지 않았으며 전체서열에 자기복제서열을 포함하고 있는 것으로 판단된다. KmARS 32는 1275bp의 AT-rich 서열(서열번호 6)이며 3 내지 452bp, 1085 내지 1270bp에서 *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 유래의 가상 단백질과 상동성을 나타냈으며, 자기복제서열은 453 내지 1084bp에 존재할 것으로 판단되었다. KmARS 33과 34는 동일서열으로서 719bp(서열번호 7)이며, 1 내지 384bp에서 *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 유래의 가상 단백질과 상동성을 나타내었으며 ORF를 제외한 385 내지 719bp에 자기복제서열이 존재하는 것으로 판단되었다. KmARS 39는 680bp(서열번호 8)이고, 599 내지 679bp에서 *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 유래의 가상 단백질과 상동성을 나타내며 자기복제서열은 1 내지 598bp에 존재하는 것으로 판단되었다(도 3). 도 3은 5종의 ARS 염기서열 분석 결과를 개략도이다.

[0058] **실시예 6: 자기복제서열을 포함한 벡터이용 외래단백질 발현**

[0059] 클루이베로마이세스 마르시아누스의 자기복제서열을 이용하여 효모 캔디다 앤탁티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파제인 CalB14를 발현하기 위하여 CalB14 유전자를 포함하는 플라스미드에 자기복제서열을 도입하였다. 먼저 서열번호 9, 10 프라이머를 이용하여 KmARS 4 유전자(서열번호 4)를, 서열번호 11, 12 프라이머로 KmARS 13 유전자(서열번호 5)를, 서열번호 13, 14 프라이머로 KmARS 32 유전자(서열번호 6)를, 서열번호 15, 16 프라이머로 KmARS 33 유전자(서열번호 7)를, 서열번호 17, 18 프라이머로 KmARS 39 유전자(서열번호 8)를 각각 중합효소 연쇄반응(94℃에서 5분동안 1회; 94℃ 30초간, 55℃ 30초간, 72℃ 1분간 반응을 25회; 72℃에서 7분간 1회)을 수행하여 아가로스젤 전기영동을 통해 절편을 회수하였다. 중합효소 연쇄반응 산물을 제한효소 Sal I으로 절단하여 제한효소 *Xho* I으로 절단한 pBGAP-ST3-CalB14 벡터에 결합하여 대장균 DH5α에 형질전환하였으며, 형질전환체로부터 KmARS 유전자가 삽입된 플라스미드를 얻었다(도 4). 도 4는 클루이베로마이세스 마르시아누스에서 리파제 유전자를 발현시키기 위한 발현벡터의 제조 과정을 도식적으로 나타낸 개략도이다.

[0060] 이러한 재조합 플라스미드를 Km7155u 및 Km25571 균주에 각각 형질전환하여 형질전환체로부터 단일콜로니를 선별하였다. 각각의 형질전환체가 리파제를 분비생산하는지 확인하기 위하여 배양배지내 리파제 활성을 분석하였다. 활성분석은 각 세포를 YPD(1% 효모추출액, 2% 펩톤, 2% 포도당)에 접종하여 30℃에서 배양 후 배양상등액을 pNPP 측정법으로 각각의 리파제 활성을 비교하였다. 반응액(50 mM pNPP 100 ㎕, 에틸 알콜 950 ㎕ 및 50 mM 트리스 완충액, pH 7.5) 1㎖에 20㎕의 효소용액을 넣고 5분간 반응후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다(표 3 및 표 4).

표 3

[0061] Km7155u 형질전환체들의 리파제 활성 분석

ARS number	Lipase activity(U/L)	ARS numer	Lipase activity(U/L)
ARS4-1	42	ARS33-1	19
ARS4-2	41	ARS33-2	20
ARS4-3	42	ARS33-3	20
ARS4-4	42	ARS33-4	22
ARS4-5	43	ARS33-5	21
ARS13-1	27	ARS39-1	20
ARS13-2	27	ARS39-2	21
ARS13-3	26	ARS39-3	19
ARS13-4	27	ARS39-4	20
ARS13-5	27	ARS39-5	20
ARS32-1	20	FR A-1	62

ARS32-2	20	FR A-2	63
ARS32-3	20	FR A-3	63
ARS32-4	19	FR A-4	63
ARS32-5	19	FR A-5	62

표 4

[0062] Km25571 형질전환체들의 리파제 활성 분석

ARS number	Lipase activity(U/L)	ARS numer	Lipase activity(U/L)
ARS4-1	40	ARS33-1	19
ARS4-2	40	ARS33-2	20
ARS4-3	41	ARS33-3	20
ARS4-4	41	ARS33-4	21
ARS4-5	40	ARS33-5	20
ARS13-1	68	ARS39-1	19
ARS13-2	66	ARS39-2	19
ARS13-3	67	ARS39-3	19
ARS13-4	66	ARS39-4	20
ARS13-5	67	ARS39-5	20
ARS32-1	20	FR A-1	21
ARS32-2	20	FR A-2	22
ARS32-3	19	FR A-3	21
ARS32-4	19	FR A-4	20
ARS32-5	18	FR A-5	21

[0063] 상기 표 3 및 표 4에서 보듯이, 대부분 형질전환체에서 리파제의 활성을 보여 자기복제서열를 함유한 벡터가 세포내에서 유지되면서 외래단백질인 리파제를 발현 및 분비생산하는 것을 확인하였다. 그러나 리파제의 활성은 사용한 균주 및 자기복제서열에 따라서 상이한 결과를 얻었다. 표 3에서 보듯이 Km7155u의 경우 ARS4 및 FR-A가 우수한 리파제 활성을 보였고, 표 4에서 보듯이 Km25571에서는 ARS4와 13이 우수한 리파제 활성을 보였다. 특이하게 대조구로 사용한 FR-A는 Km25571 균주에서는 매우 낮은 활성을 보여 균주에 따른 차이가 큼을 확인할 수 있었다.

[0064] **실시예 7: 에피좀 플라스미드를 이용한 리파제 유전자 초고속 개량**

[0065] 고활성 리파제 스크리닝을 위한 과정으로 ST3-CalB14 유전자가 제거된 벡터 제조를 위해 pBTEF-ST3-CalB14-KmARS를 주형으로 *Eco*R Ⅰ 인식서열을 갖는 서열번호 19와 20의 염기서열을 가지는 프라이머를 사용한 PCR 반응을 수행하여 1.2kb의 KmARS 유전자를 수득하였다. 상기 수득한 KmARS 유전자를 제한효소 *Eco*R Ⅰ으로 절단하고 동일한 제한효소로 절단하여 얻어진 ST3-wt CalB-KmARS가 제거된 벡터에 삽입하여 플라스미드 벡터 pBTEF-KmArs를 제조하였다(도 5). 도 5는 플라스미드 벡터 pBTEF-KmArs의 구조를 도식적으로 나타낸 개략도이다.

[0066] 한편 변이유도중합효소연쇄반응(error-prone PCR) 방법을 이용하여 변이주 라이브러리를 얻기 위해 pBTEF-ST3-wt CalB-KmARS를 주형으로 하고 서열번호 21과 22의 염기서열을 가지는 프라이머를 사용한 변이유도 효소연쇄중합반응(PCR random mutagenesis kit, Clontech)을 수행하였다. 변이유도는 제품에 포함된 설명서에 의거하여 1kb당 2개의 변이를 유도하도록 하였으며 94℃에서 30초동안 1회; 94℃ 30초간, 68℃ 1분 30초간 반응을 25회; 68℃에서 1분간 1회 반응조건으로 수행하였다. 아가로스젤 전기영동을 통해 회수된 절편은 1% 트리뷰티린(tributyrin)이 첨가된 UD배지에 *Pst* Ⅰ과 *Bam*H Ⅰ으로 처리된 pBTEF-KmARS 벡터와 함께 *in vivo* 재조합 방법을 이용하여 Km7155u균주에 도입하여 약 900개의 형질전환체를 얻었다(도 6). 도 6은 리파제 유전자 초고속 개량을 위한 발현벡터의 제조 과정과 고활성 리파제의 선별과정을 도식적으로 나타낸 개략도이다.

[0067] 도 6에서 보듯이, 발현벡터를 함유한 경우에는 대부분의 균주 주변에 활성환이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0068] 상대적으로 활성환이 큰 10개의 균주를 선별하여 1% 트리뷰티린이 첨가된 UD배지와 pNPP 측정법으로 각각의 리

파제 활성을 비교하였다(도 7). 도 7은 서로 다른 형질전환체에서 나타나는 리파제의 활성을 비교한 결과를 나타내는 사진 및 도표이다. 도 7에서 보듯이, 2번 균주의 경우 wt보다 약 2배, 7번 균주의 경우 wt보다 약 4.6배의 활성이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 상기 활성이 증가된 2번 균주와 7번 균주의 뉴클레오티드 서열을 분석하여, 리파제의 시그널 펩티드 부위(ST3) 및 아미노산 서열(wt CalB)상에 변이가 발생하였는지의 여부를 확인하였다(표 5).

표 5

[0070] 선별된 변이주의 시그널 펩티드 부위 및 아미노산 서열상의 변이

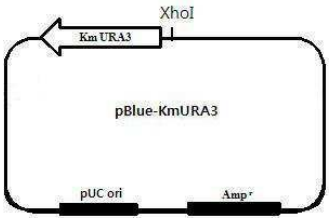
균주번호	ST3	wt CalB
2	Q2L	G41V
7	-	L278R

[0071] 상기 표 5에서 보듯이, 상기 각 균주는 아미노산 서열의 일부가 변이된 리파제를 생산함을 확인할 수 있었다.

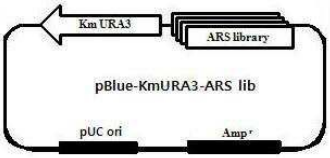
[0072] 따라서, 본 발명에서 확보된 자기복제서열을 활용하여 클루이베로마이세스 마르시아누스에서 유전자 라이브러리를 직접 구축할 수 있으므로 새로운 단백질의 발굴이나 고활성을 보이는 단백질을 직접 스크리닝을 하거나 강력한 프로모터를 스크리닝하는 등 다양한 응용이 가능할 것이다.

도면

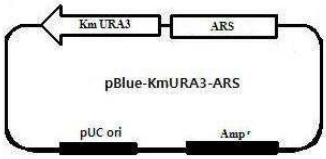
도면1a



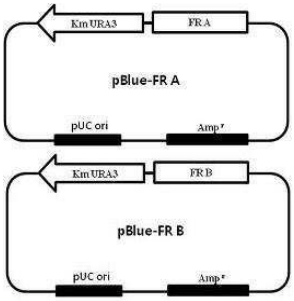
도면1b



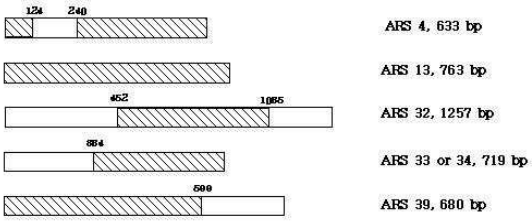
도면1c



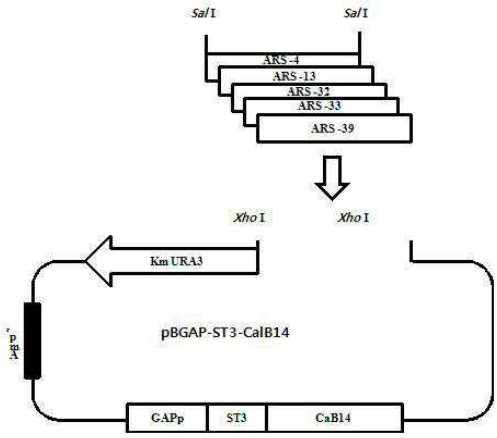
도면2


Km URA3
FR A
pBlue-FR A
pUC ori
Amp r
Km URA3
FR B
pBlue-FR B
pUC ori
Amp r

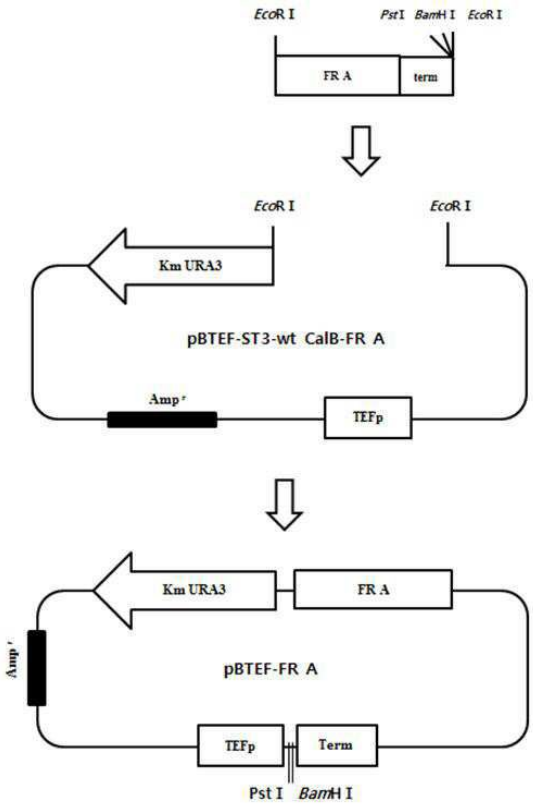
도면3


124
240
ARS 4, 633 bp
ARS 13, 763 bp
852
1085
ARS 32, 1257 bp
884
ARS 33 or 34, 719 bp
500
ARS 39, 680 bp

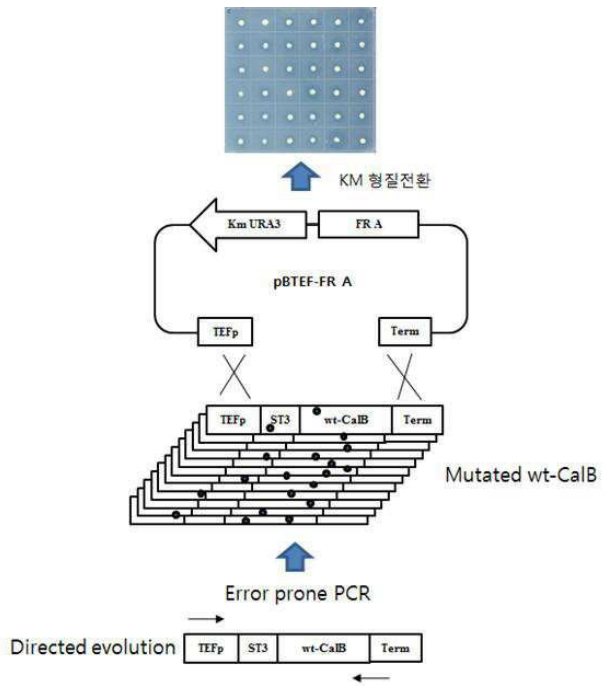
도면4


Sal I
Sal I
ARS -4
ARS -13
ARS -32
ARS -33
ARS -39
Xho I
Xho I
Km URA3
pBGAP-ST3-CalB14
GAPp
ST3
CaB14

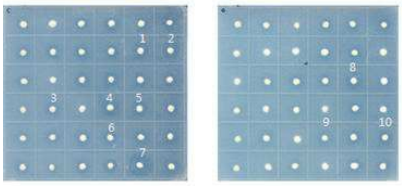
도면5


EcoR I
PstI BamH I EcoR I
FR A
term
EcoR I
EcoR I
Km URA3
pBTEF-ST3-wt CalB-FR A
Amp r
TEFp
Km URA3
FR A
Amp r
pBTEF-FR A
TEFp
Term
Pst I BamH I

도면6


KM 형질전환
Km URA3
FR A
pBTEF-FR A
TEFp
Term
TEFp
ST3
wt-CalB
Term
Mutated wt-CalB
Error prone PCR
Directed evolution
TEFp
ST3
wt-CalB
Term

도면7



strain	Lipase activity (U/l)
1	25
2	40
3	18
4	21
5	19
6	24
7	88
8	21
9	19
10	19
Control	19

서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부