



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월10일
(11) 등록번호 10-1527802
(24) 등록일자 2015년06월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0070890
(22) 출원일자 2013년06월20일
심사청구일자 2013년06월20일
(65) 공개번호 10-2013-0143507
(43) 공개일자 2013년12월31일
(30) 우선권주장
1020120066625 2012년06월21일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090131845 A*
US20080102499 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
홍영수
대전광역시 유성구 과학로 125
최옥식
대전광역시 유성구 과학로 125
강선영
대전광역시 유성구 과학로 125
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 13 항

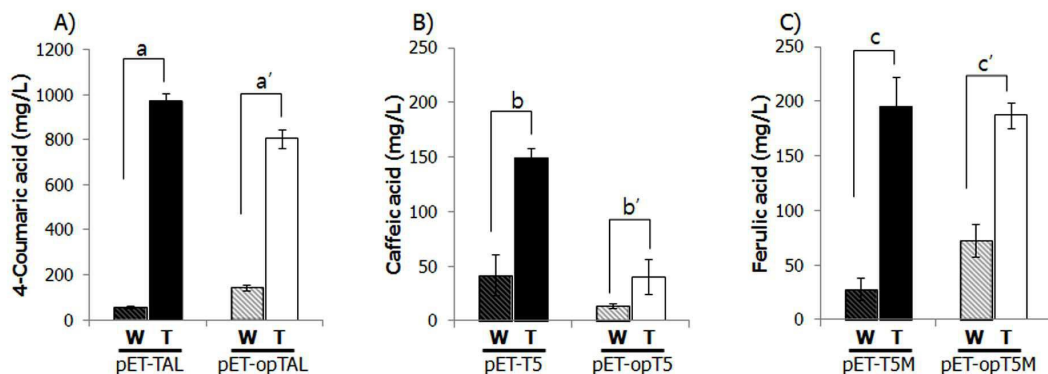
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 타이로신 고생산 균주에서의 인공대사 경로를 통한 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 타이로신 생산 균주에서의 인공대사 경로를 통한 4-쿠마린산(4-Coumaric acid), 카페인산(caffeic acid) 및 페룰린산(ferulic acid)의 대량 생산 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 전구체인 타이로신을 고생산하는 균주를 제작하고, 상기 균주에 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 생합성에 관여하는 각각의 유전자가 포함된 유전자 카세트를 도입하여 형질전환된 균주를 제작하였다. 상기 형질전환된 균주를 배양하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산이 고수율로 생산되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 생산 방법을 이용하여 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 대량 생산에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201204013056290010200
 부처명 농림수산식품부(농림부)
 연구관리전문기관 농촌진흥청
 연구사업명 차세대 바이오그린21사업
 연구과제명 페닐프로판노이드 인공대사경로구현을 위한 인공미생물개발
 기여율 40/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031947
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)
 연구과제명 바이오모듈 어셈블리 및 활용기술 개발
 기여율 40/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.09.29 ~ 2012.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0009078
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 기초연구사업(일반)
 연구과제명 바이오화합물의 모듈화된 인공생합성 경로개발
 기여율 20/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

타이로신 DNA-결합 전사 억제 인자(Tyrosine DNA-binding transcriptional repressor, tyrR)가 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f[코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, tyrA)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자] 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f[3-디옥시-D-아라비노-헵툴로스네이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, aroG)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자]가 동시에 삽입된 L-타이로신 고생산용 형질전환체.

청구항 2

서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(Tyrosine ammonia lyase, TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 L-타이로신을 고수율로 생합성할 수 있고, 타이로신 DNA-결합 전사 억제 인자(Tyrosine DNA-binding transcriptional repressor, tyrR)가 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f[코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, tyrA)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자] 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f[3-디옥시-D-아라비노-헵툴로스네이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, aroG)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자]이 삽입된 숙주세포를 형질전환시킨 4-쿠마린산(4-Coumaric acid) 생산용 형질전환체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하는 것을 특징으로 하는 4-쿠마린산 생산용 형질전환체.

청구항 4

삭제

청구항 5

- 1) 제 2항의 형질전환체를 배양하는 단계;
- 2) 단계 1)의 배양된 각각의 형질전환체의 단백질 발현을 유도한 후, 추가 배양하는 단계; 및,
- 3) 단계 2)의 배양액에서 4-쿠마린산을 수득하는 단계를 포함하는 4-쿠마린산의 생산 방법.

청구항 6

서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 1로 기재되는 4-쿠마린산 3-수산화효소(4-coumarate 3-hydroxylase, C3H)를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 L-타이로신을 고수율로 생합성할 수 있고, tyrR이 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는

aroG^f이 삽입된 숙주세포를 형질전환시킨 카페인산(caffeic acid) 생산용 형질전환체.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산 및 카페인산을 생산할 수 없는 것을 특징으로 하는 카페인산 생산용 형질전환체.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산을 생산할 수 있고, 카페인산을 생산할 수 없는 것을 특징으로 하는 카페인산 생산용 형질전환체.

청구항 9

삭제

청구항 10

- 1) 제 6항의 형질전환체를 배양하는 단계;
- 2) 단계 1)의 배양된 각각의 형질전환체의 단백질 발현을 유도한 후, 추가 배양하는 단계; 및,
- 3) 단계 2)의 배양액에서 카페인산을 수득하는 단계를 포함하는 카페인산의 생산 방법.

청구항 11

서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 1로 기재되는 4-쿠마린산 3-수산화효소를 암호화하는 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 카페인산 O-메틸전이효소(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT)를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 L-타이로신을 고수율로 생합성할 수 있고, tyrR가 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f가 삽입된 숙주세포를 형질전환시킨 페룰린산(ferulic acid) 생산용 형질전환체.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산을 생산할 수 없는 것을 특징으로 하는 페룰린산 생산용 형질전환체.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산을 생산할 수 있고, 카페인산 및 페룰린산을 생산할 수 없는 것을 특징으로 하는 페룰린산 생산용 형질전환체.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산 및 카페인산을 생산할 수 있고, 페룰린산을 생산할 수 없는 것을 특징으로 하는 페룰린산 생산용 형질전환체.

청구항 15

삭제

청구항 16

- 1) 제 11항의 형질전환체를 배양하는 단계;
- 2) 단계 1)의 배양된 각각의 형질전환체의 단백질 발현을 유도한 후, 추가 배양하는 단계; 및,
- 3) 단계 2)의 배양액에서 페룰린산을 수득하는 단계를 포함하는 페룰린산의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타이로신(tyrosine) 생산 균주에서의 인공대사 경로를 통한 4-쿠마린산(4-coumaric acid), 카페인산(caffeic acid) 및 페룰린산(ferulic acid)의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 4-쿠마린산(4-Coumaric acid), 카페인산(caffeic acid) 및 페룰린산(ferulic acid) 등의 페놀성 화합물(phenolic compound)들은 암을 억제하는 물질이다. 또한, 4-쿠마린산은 다수의 연구에 멜라닌 생산의 억제제로서 기재되어 있으며, 세균 증식의 억제효과가 있다. 카페인산은 발암억제제로서 작용하고, 생체 안과 밖에서 항산화제로 알려져 있으며, 다른 항산화제보다 효과가 우수한 것으로 나타났다. 또한, 95% 이상 아플라톡신(aflatoxin)의 생산을 줄여줄 뿐만 아니라, 산화 스트레스를 유발하며, 아플라톡신의 생산을 방해할 수 있다. 아울러, 페룰린산은 1866년 식물의 레진에서 추출하여 명명한 것으로서(Hlasiwetz H et al., Ann. 138:61, 1866), 산소분자로부터 유래 되는 다양한 활성 산소종들에 대해 온화한 항산화력을 가지며, 철 이온 및 구리 이온과 같은 산화성 전이금속들에 대한 강력한 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다(Smart MG et al., Aust. J. Plant Physiol. 6:485, 1979). 따라서, 페룰린산은 아마인유 등과 같은 천연오일 등의 자동산화 방지 및 전이금속이나 기타 유입된 활성 산소종에 의한 제품 내에 함유된 다른 유효성분들의 산화를 막아주기 위한 첨가제로서 사용되고 있다(Tsukiya T et al., Jpn. Kokai 75:18621, 1975).

[0003] 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산 등은 주로 식물에서 많이 생산되는 페닐프로판오이드(Phenylpropanoid) 계열 및 플라보노이드(Flavonoid)의 화합물의 중간체로 알려져 있다. 이에, 식물을 비롯한 많은 생물체에서 상기 중간체의 생합성에 관여하는 유전자들이 보고되어 있고, 최근 플라보노이드 생산을 위한 인공 생합성 경로 구축을 위해, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 플라보노이드 생합성 관련 유전자들을 대장균에 형질도입함으로써, 페룰린산의 중간체인 4-쿠마린산의 생합성에 성공한 사례가 보고되었다(Watts KT et al., Chembiochem 5(4):500-507, 2004).

[0004] 아미노산으로부터 페룰린산의 대표적인 생합성 경로에는 두 가지가 있다(도 1 참조): 1) L-타이로신(L-tyrosine)을 전구체로 하고, 상기 4-쿠마린산 및 카페인산을 중간체로 하여 최종적으로 페룰린산을 생합성하는 경로; 및, 2) L-페닐알라닌(L-phenylalanine)을 전구체로 하고, 상기 시나몬산(cinnamic acid) 및 카페인산을 중간체로 하여 최종적으로 페룰린산을 생합성하는 경로. 상기 Watts 외의 연구는 L-페닐알라닌으로부터 시나몬산을 거쳐 4-쿠마린산을 생합성하는 경로를 인위적으로 구축한 것에 관한 것이다.

[0005] 이와 같이 재조합 미생물 기술을 이용하여 유용한 화합물을 생산할 때, 유전정보가 잘 알려져 있으며 다양한 벡터 시스템을 구축하고 있고, 비교적 값싼 배지에서 빠르게 고농도로 배양할 수 있는 장점을 가진 대장균이 연구 또는 상업적 목적으로 많이 사용되고 있다. 특히, 페룰린산 생합성 경로의 시작물질인 L-타이로신을 생산하는 대장균을 대상으로 상기 페룰린산 생합성 경로를 구축할 경우 초기 출발 물질 생산량의 대사적 조절 없이 다량의 페룰린산의 생산도 가능할 것이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 대장균으로부터 L-타이로신을 고생산하는 균주를 제작하고, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산 각각의 생합성에 관여하는 유전자를 상기 L-타이로신 고생산 균주에 도입하여 인공 생합성 경로를 구축하고, 상기 인공 생합성 경로가 구축된 균주에서 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산을 대량으로 생합성할 수 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 4-쿠마린산(4-Coumaric acid) 생산용 벡터, 형질전환체 또는 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 카페인산(caffeic acid) 생산용 벡터, 형질전환체 또는 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 페룰린산(ferulic acid) 생산용 벡터, 형질전환체 또는 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 다른 목적은 L-타이로신(L-tyrosine) 고생산용 형질전환체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 4-쿠마린산(4-Coumaric acid) 생산용 벡터, 형질전환체 또는 생산 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 카페인산(caffeic acid) 생산용 벡터, 형질전환체 또는 생산 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 페룰린산(ferulic acid) 생산용 벡터, 형질전환체 또는 생산 방법을 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 타이로신 DNA-결합 전사 억제 인자(Tyrosine DNA-binding transcriptional repressor, tyrR)가 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f[코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, tyrA)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자] 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f[3-디옥시-D-아라비노-헵툴로스나이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, aroG)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자]가 동시에 삽입된 L-타이로신(L-tyrosine) 고생산용 형질전환체를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 타이로신 생산 균주에서의 인공대사 경로를 통한 4-쿠마린산(4-Coumaric acid), 카페인산(caffeic acid) 및 페룰린산(ferulic acid)의 대량 생산 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 전구체인 타이로신을 고생산하는 균주를 제작하고, 상기 균주에 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 생합성에 관여하는 각각의 유전자가 포함된 유전자 카세트를 도입하여 형질전환된 균주를 제작하였다. 상기 형질전환된 균주를 배양하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산이 고수율로 생산되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 생산 방법을 이용하여 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 대량 생산에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 페닐프로파노익 산(Phenylpropanoic acids) 계열의 화합물의 생합성 경로를 나타낸 도이다;
TAL: 타이로신 암모니아 리아제(Tyrosine ammonia lyase, TAL);

C3H: 4-쿠마린산 3-수산화효소(4-coumarate 3-hydroxylase, C3H); 및

COM: 카페인산 O-메틸전이효소(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT).

도 2는 pET-TAL, pET-T5 및 pET-T5M, 또는 pET-opTAL, pET-opT5 및 pET-opT5M 벡터의 유전자 지도를 나타낸 도이다(각각의 유전자는 T7 promoter, 라이보솜 결합자리 (RBS) 그리고 T7 terminator을 포함한다).

도 3는 pET-Tal과 pET-opTal이 형질전환된 일반대장균 (C41)에서 생산되는 쿠마린산(4-Coumaric acid)의 생산량을 나타낸 것이다;

C41(*E. coli* C41) : 막 단백질 발현이 우수한 대장균(Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol 260:289-298);

pET-Tal: C41 균주에 pET-Tal를 도입한 균주; 및

pET-opTal: C41 균주에 pET-opTal를 도입한 균주.

도 4는 Red/ET recombination 시스템을 통한 tyrR-유전자 결손(knockout) 돌연변이 균주의 구축 과정을 나타낸 도이다;

tyrR: 타이로신 DNA-결합 전사 억제 인자(Tyrosine DNA-binding transcriptional repressor, tyrR).

도 5는 *tyrR* 유전자 부위에 FRT-neo-FRT 카세트(cassette)가 삽입된 A37-1 균주에서 FRT 카세트를 FLPe 재조합 효소(recombinase) 발현 벡터를 통해 제거하여 카나마이신(kanamycin) 감수성 균주를 선택하는 것을 나타낸 도이다; 도 5A는 LB 플레이트(plate)에 배양한 경우를 나타낸 사진이고, 도 5B는 LB+카나마이신(kanamycin) 플레이트에 배양하여 내성이 사라진 균주를 나타낸 것이다.

도 6은 *tyrR1* 돌연변이(mutant)에서 *tyrR* 유전자 부위의 염기서열을 나타낸다.

도 7은 pET-AG 벡터를 클로닝하는 과정을 나타낸 도이다;

tyrA^f: 코리스믹산 뮤타제/프리페네산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, tyrA)로 피드백-저해-저항(feedback-inhibition-resistant, f)성을 가진 유전자; 및

aroG^f: 3-디옥시-D-아라비노-헵툴로스나이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabino- heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, aroG)의 피드백-저해-저항(feedback-inhibition-resistant, f)성을 가진 유전자.

도 8은 pET-AG/tyrR1 균주(AC-AF)에서 IPTG 유도에 따른 타이로신의 생산에 대하여 나타낸 도이다.

도 9은 pAD-AG 클로닝에 대한 과정을 나타낸 도이다.

도 10은 pET-Tal/C41, pET-Tal/AC-AF1, pET-T5/C41, pET-T5/AC-AF1, pET-T5M/C41 및 pET-T5M/AC-AF1, 또는 pET-opTal/C41, pET-opTal/AC-AF1, pET-opT5/C41, pET-opT5/AC-AF1, pET-opT5M/C41 및 pET-opT5M/AC-AF1 각각의 균주에서 생산되는 쿠마린산(4-Coumaric acid), 카페인산(caffeic acid) 및 페룰린산(ferulic acid)의 생산량을 나타낸 것이다;

W: C41 균주; 및

T: AC-AF1 균주 (tyrR1 균주에 pAD-AG 벡터를 도입한 균주).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은 서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(Tyrosine ammonia lyase, TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자를 포함하는 4-쿠마린산(4-Coumaric acid) 생산용 발현벡터를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 숙주세포를 형질전환시킨 4-쿠마린산 생산용 형질전환체를 제공한다.

- [0020] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 고수율로 생합성할 수 있는 것을 특징으로 하는 4-쿠마린산 생산용 형질전환체일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0021] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산을 생산할 수 있거나 없는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0022] 상기 숙주세포는 타이로신 DNA-결합 전사 억제 인자(Tyrosine DNA-binding transcriptional repressor, tyrR)가 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f[코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, tyrA)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자] 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f[3-디옥시-D-아라비노-헵툴로스나이트-7-인산염합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, aroG)의 피드백-저해-저항성(feedback-inhibition-resistant, f) 유전자]이 삽입된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 상기 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f이 삽입된 L-타이로신 고생산용 형질전환체는 다른 벡터시스템에서도 유의적인 생산 증가효과를 가지므로, 다양한 벡터를 상기 L-타이로신 고생산용 형질전환체에 형질전환하여 사용할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은
- [0024] 1) 서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계;
- [0025] 2) 단계 1)의 발현벡터를 숙주세포에 형질전환하는 단계;
- [0026] 3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하는 단계;
- [0027] 4) 단계 3)의 배양된 형질전환체의 단백질 발현을 유도한 후, 추가 배양하는 단계; 및,
- [0028] 5) 단계 4)의 배양액에서 4-쿠마린산을 수득하는 단계를 포함하는 4-쿠마린산의 생산 방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 1로 기재되는 4-쿠마린산 3-수산화효소(4-coumarate 3-hydroxylase, C3H)를 암호화하는 유전자를 포함하는 카페인산(caffeic acid) 생산용 발현벡터를 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 숙주세포를 형질전환시킨 카페인산 생산용 형질전환체를 제공한다.
- [0031] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 고수율로 생합성할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0032] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산 및 카페인산을 생산할 수 없는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0033] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산을 생산할 수 있고, 카페인산을 생산할 수 없는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 상기 숙주세포는 tyrR이 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f이 삽입된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은
- [0036] 1) 서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 1로 기재되는 4-쿠마린산 3-수산화효소를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계;
- [0037] 2) 단계 1)의 발현벡터를 숙주세포에 형질전환하는 단계;
- [0038] 3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하는 단계;

- [0039] 4) 단계 3)의 배양된 형질전환체의 단백질 발현을 유도한 후, 추가 배양하는 단계; 및,
- [0040] 5) 단계 4)의 배양액에서 카페인산을 수득하는 단계를 포함하는 카페인산의 생산 방법을 제공한다.
- [0041] 또한, 본 발명은 서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 1로 기재되는 4-쿠마린산 3-수산화효소를 암호화하는 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 카페인산 0-메틸전이효소(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT)를 암호화하는 유전자를 포함하는 페롤린산 생산용 발현벡터를 제공한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터로 숙주세포를 형질전환시킨 페롤린산 생산용 형질전환체를 제공한다.
- [0043] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 고수율로 생합성할 수 있는 것을 특징으로 하는 페롤린산 생산용 형질전환체일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0044] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산, 카페인산 및 페롤린산을 생산할 수 없는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0045] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산을 생산할 수 있고, 카페인산 및 페롤린산을 생산할 수 없는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0046] 상기 숙주세포는 L-타이로신을 전구체로 하고, 4-쿠마린산 및 카페인산을 생산할 수 있고, 페롤린산을 생산할 수 없는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 상기 숙주세포는 tyrR가 결손되고, 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 tyrA^f 및 서열번호 9의 염기서열로 구성되는 aroG^f가 삽입된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0048] 아울러, 본 발명은
- [0049] 1) 서열번호 11로 기재되는 타이로신 암모니아 리아제(TAL)를 암호화하는 유전자 또는 서열번호 4로 기재되는 합성 타이로신 암모니아 리아제(opTAL)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 1로 기재되는 4-쿠마린산 3-수산화효소를 암호화하는 유전자 및 서열번호 2로 기재되는 카페인산 0-메틸전이효소(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT)를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계;
- [0050] 2) 단계 1)의 발현벡터를 숙주세포에 형질전환하는 단계;
- [0051] 3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하는 단계;
- [0052] 4) 단계 3)의 배양된 형질전환체의 단백질 발현을 유도한 후, 추가 배양하는 단계; 및,
- [0053] 5) 단계 4)의 배양액에서 페롤린산을 수득하는 단계를 포함하는 페롤린산의 생산 방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 페닐프로파노의 산 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 벡터를, 구체적으로 pET-Ta1, pET-T5 및 pET-T5M, 또는 pET-opTa1, pET-opT5 및 pET-opT5M(도 2 참조)를 제작하였고, 타이로신 고생산 균주를 제작하였다(도 4 내지 도 8 참조).
- [0055] 또한, 본 발명자들은 상기 페닐프로파노의 산 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 벡터를 상기 제작한 타이로신 고생산 균주 또는 일반 대장균 균주에 도입하여 형질전환한 뒤에, 각각의 형질전환 균주에서 생산되는 페닐프로파노의 산 화합물의 생산 확인 및 비교한 결과, 일반 대장균에 pET-Ta1/C41, pET-T5/C41, pET-T5M/C41를 도입하였을 때보다 본 발명에서 제작한 타이로신 고생산 균주(pAD-AG/ Δ tyrR1 균주(AC-AF1))에 상기 벡터를 도입하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산, 페롤린산의 생산이 각각 16.5배, 3.5배, 7배 증가된 것을 확인하였다(도 10 참조). 또한, 일반 대장균에 pET-opTa1, pET-opT5, pET-opT5M를 도입하였을 때보다 본 발명에서 제작한 타이로신 고생산 균주(pAD-AG/ Δ tyrR1 균주(AC-AF1))에 상기 벡터를 도입하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산, 페롤린산의 생산이 각각 5.5배, 2.4배, 2.6배 증가된 것을 확인하였다(도 10 참조).
- [0056] 따라서, 본 발명에서 4-쿠마린산, 카페인산 및 페롤린산의 전구체인 타이로신을 고생산하는 균주를 제작하고, 상기 균주에 4-쿠마린산, 카페인산 및 페롤린산의 생합성에 관여하는 각각의 유전자가 포함된 유전자 카세트를 도입하여 형질전환된 균주를 제작하였으며, 상기 형질전환된 균주를 배양하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산 및

페룰린산이 고수율로 생산되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 4-쿠마린산, 카페인산 또는 페룰린산 생산용 벡터, 각각의 벡터를 도입한 형질전환체 또는 상기 형질전환체들을 이용한 4-쿠마린산, 카페인산 또는 페룰린산 생산 방법을 4-쿠마린산, 카페인산 및 페룰린산의 대량 생산에 유용하게 사용할 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0058] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] <실시예 1> 페닐프로파노의 산(Phenylpropanoid) 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 벡터의 제작

[0060] L-타이로신(L-tyrosine)을 전구체로 하고, 4-쿠마린산(4-Coumaric acid) 및 카페인산(caffeic acid)을 중간체로 하여 최종적으로 페룰린산(ferulic acid)을 생합성하는 경로를 유전공학적 기술에 의해 인위적으로 대장균에 구축하고자 하였다(도 1).

[0061] <1-1> 페닐프로파노의 산 화합물 생합성 경로에 관여하는 유전자의 수득

[0062] 1) L-타이로신을 4-쿠마린산으로 변환하는 효소인 타이로신 암모니아 리아제(Tyrosine ammonia lyase, TAL)를 암호화하는 sam8을 방선균(*Saccharothrix espanaensis*) (KCTC9392)로부터 수득하였고, 염기서열을 분석하였으며, 서열번호 11로 구성되고(대한민국 등록특허 제10-1091155호 참조);

[0063] 2) 상기 4-쿠마린산을 카페인산으로 변환하는 효소인 4-쿠마린산 3-수산화효소(4-coumarate 3-hydroxylase, C3H)를 암호화하는 sam5를 방선균(*Saccharothrix espanaensis*) (KCTC9392)로부터 수득하였고, 염기서열을 분석하였으며, 서열번호 1로 구성되며(대한민국 등록특허 제10-1091155호 참조);

[0064] 3) 상기 카페인산을 페룰린산으로 변환하는 효소인 카페인산 0-메틸전이효소(Caffeic acid 0-methyltransferase, COMT)를 암호화하는 com을 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 수득하였고, 염기서열을 분석하였으며, 서열번호 2로 구성된다(대한민국 등록특허 제10-1091155호 참조).

[0065]

[0066] <1-2-1> 타이로신 암모니아 리아제 유전자 발현 벡터(pET-TAL)의 제조

[0067] 타이로신 암모니아 리아제 유전자를 발현하는 벡터를 제조하기 위하여, 대한민국 등록특허 제10-1091155호에 개시된 방법을 이용하여, 상기 실시예 <1-1>의 타이로신 암모니아 리아제를 암호화하는 유전자를 pET-28a(+) 벡터(Invitrogen, USA)에 삽입하여 pET-TAL 벡터를 제작하였다(도 2).

[0068] <1-2-2> 타이로신 암모니아 리아제 유전자 및 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자가 연결된 유전자 발현 벡터(pET-T5)의 제조

[0069] 타이로신 암모니아 리아제 유전자 및 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자가 연결된 유전자 발현 벡터를 제조하기 위하여, 대한민국 등록특허 제10-1091155호에 개시된 방법을 이용하여, 타이로신 암모니아 리아제 유전자 및 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자가 연결된 pET-T5 벡터를 제작하였다(도 2).

[0070] <1-2-3> 타이로신 암모니아 리아제 유전자, 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자 및 카페인산 0-메틸전이효소 유전자가 연결된 유전자 발현 벡터(pET-T5M)의 제조

[0071] 타이로신 암모니아 리아제 유전자, 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자 및 카페인산 0-메틸전이효소 유전자가 연결된 유전자 발현 벡터를 제조하기 위하여, 대한민국 등록특허 제10-1091155호에 개시된 방법을 이용하여, 타이로신 암모니아 리아제 유전자, 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자 및 카페인산 0-메틸전이효소 유전자가 연결된 pET-T5M 벡터를 제작하였다(도 2).

- [0072] <1-3> 페닐프로파노의 산 화합물 생합성 경로에 관여하는 유전자의 변형 및 발현 벡터의 제작
- [0073] 상기 <실시예 1>에서 수득한 유전자를 변형한 후, 상기 변형된 유전자를 포함하는 벡터를 제작하였다.
- [0074] <1-3-1> 타이로신 암모니아 리아제 유전자(opTAL) 합성
- [0075] 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 타이로신 암모니아 리아제(Tyrosine ammonia lyase, TAL)의 유전자(opTAL)를 합성하였다.
- [0076] 구체적으로, 방선균 *Saccharothrix espanaensis*(KCTC9392)에서 타이로신(Tyrosine)을 4-쿠마린산으로 변환하는 효소인 타이로신 암모니아 리아제(TAL)의 아미노산 서열을 토대로 대장균에서 타이로신 암모니아 리아제(TAL)의 아미노산 서열(서열번호 3) 각각에 대한 tRNA 비율에 따른 최적의 codon usage를 사용한 염기 서열(서열번호 4)을 결정하였으며, 결정된 서열은 바이오피아(주)에 주문 제작하였다. 상기 서열은 시작코돈 앞에 *NdeI* 제한효소의 인식서열을 가지고 있으며, 종결코돈 뒤에 *HindIII* 제한효소 인식서열을 가지고 있다. 제조된 타이로신 암모니아 리아제(TAL)의 유전자(opTAL)는 증폭을 위해 pGEM-T easy(promega, USA) 벡터에 삽입하였으며, 이를 pGEM-T opTAL이라 명명하였다.
- [0077] 그 결과, 방선균 *Saccharothrix espanaensis*(KCTC9392) 유래의 타이로신 암모니아 리아제(TAL)의 유전자(opTAL)를 합성하였다.
- [0078] <1-3-2> 합성 타이로신 암모니아 리아제 유전자(opTAL) 발현 벡터(pET-opTAL) 제조
- [0079] 상기 실시예 <1-3-1>에서 합성한 타이로신 암모니아 리아제(TAL)의 유전자(opTAL)를 발현하는 벡터를 제조하기 위해, 상기 타이로신 암모니아 리아제(TAL)의 합성 유전자(opTAL)를 벡터 pET-28a(+)에 삽입하였다.
- [0080] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3-1>에서 제작한 pGEM-T opTAL 벡터를 대장균에 형질전환하여 대량 확보한 후, 확보된 pGEM-T opTAL DNA를 제한 효소 *NdeI*과 *HindIII*로 동시에 절단한 단편 1.53 kb를, 대장균 발현 벡터인 pET-28a(+)의 *NdeI*과 *HindIII* 자리에 삽입하여 발현 벡터 pET-opTAL을 완성하였다(도 2).
- [0081] <1-3-3> 타이로신 암모니아 리아제 유전자(opTAL) 및 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자가 연결된 유전자 발현 벡터 제작(pET-opT5) 합성
- [0082] 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 4-쿠마린산 3-수산화효소(4-coumarate 3-hydroxylase, C3H)의 유전자인 서열번호 1로 구성되는 sam5을 이용하여 실시예 <1-3-1>에서 수득한 opTAL과 연결하여 유전자(opT5)를 합성하였다.
- [0083] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 4-쿠마린산 3-수산화효소의 유전자(sam5)는 시작코돈 앞에 *NdeI* 제한효소의 인식 서열을 가지고 있으며, 종결 코돈 뒤에 *HindIII* 제한효소 인식 서열을 가지고 있다. 제조된 4-쿠마린산 3-수산화효소(C3H)의 유전자를 실시예 <1-3-1>에서 수득한 opTAL과 연결하여 상기 실시예 <1-3-2>의 방법을 이용하여, pET-opT5를 제작하였다(도 2).
- [0084] 이 벡터에 삽입된 opTAL 유전자와 sam5 유전자는 각각의 프로모터와 리보솜 결합자리 및 전사종결 서열을 가지고 있어 독립적으로 발현 조절을 받도록 제작하였다.
- [0085] <1-3-4> 타이로신 암모니아 리아제 유전자(opTAL), 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자(opT5) 및 카페인산 0-메틸전이효소 유전자가 연결된 발현 벡터(pET-opT5M) 제조
- [0086] 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 카페인산을 페롤린산으로 변환하는 효소인 카페인산 0-메틸전이효소(Caffeic acid 0-methyltransferase; 이하, COMT)의 유전자 인 서열번호 2로 구성되는 com을 실시예 <1-3-3>에서 수득한 opT5과 연결하여 유전자(opT5M)을 합성하였다.
- [0087] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 카페인산을 페롤린산으로 변환하는 효소인 카페인산 0-메틸전이효소(Caffeic acid 0-methyltransferase; 이하, COMT)의 염기서열을 통한 com 유전자는 시작코돈 앞에 *NdeI* 제한효소의 인식 서열을 가지고 있으며, 종결 코돈 뒤에 *HindIII* 제한효소 인식 서열을 가지고 있다. 제조된 카페인산 0-메틸전이효소(COMT)의 유전자를 실시예 <1-3-3>에서 수득한 opT5와 연결하여 pET-opT5M를 제작하였다(도 2).

2).

[0088] 이 벡터에 삽입된 opTal 유전자, sam5 유전자 및 com 유전자는 각각의 프로모터와 리보솜 결합자리 및 전사종결 서열을 가지고 있어 독립적으로 발현 조절을 받도록 제작하였다.

[0089] <실시에 2> 페닐프로파노익 산 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 벡터가 형질전환된 균주의 제조

[0090] <2-1> 타이로신 암모니아 리아제 유전자 발현 벡터가 형질전환된 균주의 제조

[0091] 상기 실시예 <1-2-1>에서 제작한 pET-TAL 벡터 및 상기 실시예 <1-3-2>에서 제작한 pET-opTAL 벡터가 각각 형질 전환된 대장균(*E. coli* C41, Miroux B & Walker JE)으로부터 4-쿠마린산 생산을 확인하기 위해, pET-TAL 벡터 및 pET-opTAL 벡터를 각각 대장균에 형질전환하여 각각 pET-TAL/C41 및 pET-opTAL/C41 형질전환 균주를 제조하였다.

[0092] <2-2> 타이로신 암모니아 리아제 유전자 및 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자가 연결된 유전자의 발현 벡터가 형질전환된 균주의 제조

[0093] 상기 실시예 <1-2-2>에서 제작한 pET-T5 벡터 및 상기 실시예 <1-3-3>에서 제작한 pET-opT5 벡터를 상기 <2-1>과 동일한 방법으로, 대장균에 형질전환하여 각각 pET-T5/C41 및 pET-opT5/C41 형질전환 균주를 제조하였다.

[0094] <2-3> 타이로신 암모니아 리아제 유전자, 4-쿠마린산 3-수산화효소 유전자 및 카페인산 O-메틸 전이효소 유전자가 연결된 유전자 발현 벡터가 형질전환된 균주의 제조

[0095] 상기 실시예 <1-2-3>에서 제작한 pET-T5M 및 상기 실시예 <1-3-4>에서 제작한 pET-opT5M 벡터를 상기 <2-1>과 동일한 방법으로, 대장균에 형질전환하여 각각 pET-T5M/C41 및 pET-opT5M/C41 형질전환 균주를 제조하였다.

[0096]

[0097] <실시에 3> 페닐프로파노익 산 생산 효과 확인

[0098] <3-1> 4-쿠마린산 생산 효과 확인

[0099] 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 형질전환한 대장균주 pET-TAL/C41 또는 pET-opTAL/C41의 4-쿠마린산 생산 효과를 확인하였다.

[0100] 구체적으로, 상기 대장균을 LB 배지(50 $\mu\text{g}/\ell$ Kanamycin) 30 ml에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀ 0.6까지 배양하였고, 10분 저온 충격(cold shock) 이후 1 mM IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 그 후, 26°C에서 5시간 동안 추가로 배양하고 세포를 수득하여 30 ml M9C(modified M9 minimal media; added CaCO₃ 25 g/ ℓ , glucose 15 g/ ℓ 또는 40 g/ ℓ ; 50 $\mu\text{g}/\ell$ Kan, 1 mM IPTG) 배지에 옮기고 26°C에서 36시간 동안 배양하였다. 상기 배양액의 일부를 분취하여 초음파로 세포를 파쇄한 후, 막분리(Sartorius Minisart RC 4, 0.2 μm)하여 그 용액 20 μl 를 아래의 HPLC 조건으로 분석하였다. YMC J'sphere ODS-H80, 150x4.6 mm I.D.,(YMC, 일본) 컬럼을 이용하여 CH₃CN-H₂O(J.T.Baker, USA)(0.05% TFA; Sigma-Aldrich, USA) 이동상을 1 ml/min의 속도로 기울기(gradient)로 흘려주어 HPLC 분석을 수행하였다. 이때, 4-쿠마린산 표준품은 Sigma(C9008; USA)에서 구입하여 분석하였다.

[0101] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 pET-TAL/C41 또는 pET-opTAL/C41 균주 배양액의 추출물에서 4-쿠마린산 표준품과 동일한 시간대(Rt, 5.8 분)에 동일한 UV 스펙트럼을 가진 피크를 확인하였으며, 이를 통해 상기 형질전환된 균주가 4-쿠마린산 생산 효과가 있음을 확인하였다(도 3).

[0102] <3-2> 카페인산 생산 효과 확인

[0103] 상기 실시예 <2-2>에서 제조한 형질전환한 대장균주 pET-T5/C41 또는 pET-opT5/C41의 카페인산 생산 효과를 확인하였다.

[0104] 구체적으로, YMC J'sphere ODS-H80, 150x4.6 mm I.D.,(YMC, 일본) 컬럼을 이용하여 CH₃CN-H₂O(J.T.Baker,

USA)(0.05% TFA; Sigma-Aldrich, USA) 이동상을 1 ml/min의 속도로 15%에서 60%까지 15분간 HPLC 분석을 수행하였다. 이때, 카페인산 표준품은 Sigma(USA)에서 구입하여 분석하였다.

[0105] 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 상기 pET-T5/C41 또는 pET-opT5/C41 균주 배양액의 추출물에서 카페인산 표준품과 동일한 시간대(Rt, 6.0 분)에 동일한 UV 스펙트럼을 가진 피크를 확인하였으며, 이를 통해 상기 형질전환된 균주가 카페인산 생산 효과가 있음을 확인하였다(표 1).

[0106] 또한, 표 1에 나타낸 바와 같이, pET-T5/C41 또는 pET-opT5/C41의 카페인산 생산 효과를 확인한 결과, 형질전환한 대장균주 pET-T5/C41는 유의적으로 카페인산만을 생산하는 것을 확인하였다(표 1).

[0107]

표 1

Engineered <i>E. coli</i> strains	4-Coumaric acid (mg/L)	Caffeic acid (mg/L)	Ferulic acid (mg/L)
pET-T5	ND	42 ± 19	-
pET-opT5	26 ± 8	14 ± 2	-
pET-T5M	ND	ND	28 ± 10
pET-opT5M	ND	ND	73 ± 15

ND: 불검출.

[0108]

[0109] <3-3> 페룰린산 생산 효과 확인

[0110] 상기 실시예 <2-3>에서 제조한 형질전환한 대장균주 pET-T5M/C41 또는 pET-opT5M/C41의 페룰린산 생산 효과를 확인하였다.

[0111] 구체적으로, J'sphere ODS-H80, 4.6x150 mm I.D.,(Waters, Ireland) 컬럼을 이용하여 CH₃CN-H₂O(J.T.Baker, USA)(0.05% TFA; Sigma-Aldrich, USA) 이동상을 1 ml/min의 속도로 20%에서 25%까지 15분간 HPLC 분석을 수행하였다. 이때, 페룰린산 표준품은 Sigma(USA)에서 구입하여 분석하였다.

[0112] 그 결과, 상기 표 1에 나타낸 바와 같이 상기 pET-T5M/C41 또는 pET-opT5M/C41 균주 배양액의 추출물에서 페룰린산 표준품과 동일한 시간대(Rt, 11.7 분)에 동일한 UV 스펙트럼을 가진 피크를 확인하였으며, 이를 통해 상기 형질전환된 균주가 페룰린산 생산 효과가 있음을 확인하였다(표 1).

[0113] 또한, 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 형질전환한 대장균주 pET-T5M/C41 또는 pET-opT5M/C41의 페룰린산 생산 효과를 확인한 결과, 형질전환한 대장균주 pET-T5M/C41 또는 pET-opT5M/C41는 유의적으로 페룰린산만을 생산하는 것을 확인하였다(표 1).

[0114] <실시예 4> 타이로신 고생산 균주 제작

[0115] <4-1> tyrR이 결손된 돌연변이 균주의 제작

[0116] 페닐프로파노익 산 생합성 경로의 전구체인 타이로신을 고생산하는 대장균 균주를 제작하기 위해 Appl Microbiol Biotechnol(2007) 75:103.110에 기재된 방법과 유사하게 대장균 C41(DE3)에서 tyrR(타이로신 DNA-결합 전사 억제 인자(Tyrosine DNA-binding transcriptional repressor, tyrR)을 녹아웃(knockout)시킴으로써, tyrR이 결손된 돌연변이(이하 ΔtyrR1로 기재) 대장균 균주를 제작하였다. 도 4에 ΔtyrR1 균주의 구축 과정을

나타내었다(도 4).

[0117] 구체적으로, Appl Microbiol Biotechnol(2007) 75:103.110에서는 *E. coli* K12 균주를 기반으로 타이로신 생산 균주를 제작하였지만, 본 발명은 단백질 발현 호스트로 주로 사용되는 *E. coli* B 균주인 C41 (DE3)을 기반으로 하였다. *E. coli* B 균주는 한국생명공학연구원에서 발표한 전체 서열(genome sequence)을 토대로 *tyrR* 유전자 (ACT43188.1)를 확인하였다.

[0118] 유전자 제거 변이주 제작은 Gene Bridges 사의 Quick & Easy *E. coli* gene deletion kit을 이용하여 Red/ET 재조합(recombination) 시스템을 사용하였다(도 4). 먼저 *tyrR* 유전자의 in-frame deletion mutant 제작을 위하여 *tyrR* (ACT43188.1)의 5' 와 3' 말단의 유전자 염기서열을 사용하여 유전자 제거 프라이머(gene deletion primers)를 (Tyr-Rf: gtcatatcatcatattaattgttctttttcagggtgaaggttcccatg**cgctAATTAACCCT** CACTAAAGGGCG(서열번호 5) 와 Tyr-Rr: **atcaggcatatctcgcgcttactcttctgcttcttctctgactcagaccataTAATACG** ACTCACTATAGGGCTC(서열번호 6); 소문자는 *tyrR* 염기서열, bold 문자는 *tyrR*의 시작코돈과 종결코드, 대문자는 FRT 염기서열) 제작하였다. 이 프라이머 세트(primer set)(Tyr-Rf 와 Tyr-Rr)을 사용하고 FRT-neo-FRT 카세트(cassette)을 주형으로 pfu Taq 폴리머라제(polymerase)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이 PCR 산물을 Red/ET 재조합효소(recombinase)을 발현하는 pRedET 벡터(vector)가 형질전환된 *E. coli* B 균주(strain)에 전기천공법(electroporation)으로 형질전환한 후 카나마이신(kanamycin) 저항성 균주만을 선택하였다. 이 내성 균주(A37-1)는 *tyrR* 유전자 부위에 FRT-neo-FRT 카세트가 삽입된 상태를 PCR 단편의 염기서열 분석으로 확인할 수 있었다. 이 A37-1 균주에서 FRT-neo-FRT 카세트 부위(region)를 제거한 in-frame deletion 균주 제작을 위해 FLPe 재조합효소(recombinase) 발현 벡터(707-FLPe)를 다시 형질전환한 후 카나마이신 내성이 제거된 균주(Δ tyrR1)를 선택하였다(도 5).

[0119] 그리고, 카나마이신 내성이 제거된 균주(Δ tyrR1)에서 FRT-neo-FRT 카세트가 제거된 것을 프라이머(primer)(*tyr-v1*과 *tyr-v2*)를 사용하고 Δ tyrR1 균주의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR 산물의 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 염기서열 분석에서 예상한 대로 *tyrR* 유전자 대신 *tyrR* 유전자의 ATG 시작 코돈 뒤에 FRT 염기서열을 포함하여 97 bp의 염기서열만 남아있었다(도 6의 FR라고 표시된 부분)(도 6). 이 Δ tyrR1 균주에서는 기존의 발표된 결과와 일치하게 HPLC 상으로는 타이로신 생산을 확인할 수 없었다.

[0120]

[0121] <4-2> pET-AG 벡터의 클로닝(cloning)

[0122] 타이로신을 고생산하는 균주를 제작하고자, 타이로신의 생산에서 피드백에 관여하는 효소인 *tyrA* 및 *aroG*의 유도체를 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 각각 제작하고, 이들 두 유도체를 모듈화된 형태로 제작하여 상기 <4-1>에서 제작된 Δ tyrR1 균주에 도입하였다.

[0123] 타이로신과 같은 방향족(aromatic) 아미노산의 생합성 효소들은 최종 산물인 타이로신과 같은 방향족 아미노산에 의해 효소의 활성이 저해되는 것으로 보고되어 있어, 이들 피드백-저해-저항성 효소의 발현으로 최종산물의 생산성이 향상된 것으로 알려져 있다. Appl Microbiol Biotechnol(2007) 75:103.110에서는 피드백-저해-저항성 효소 중 코리스믹산 뮤타제/프리페닉산 탈수소효소 유전자(chorismate mutase/prephenate dehydrogenase gene, *tyrA*)의 피드백-저해-저항성을 가진 유전자(*tyrA^f*) 및 3-디옥시-D-아라비노-헵툴로스나이트-7-인산염 합성효소 유전자(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase, *aroG*)의 피드백-저해-저항성을 가진 유전자(*aroG^f*)를 사용하였다.

[0124] 본 발명에서는 이와 유사하게 이들 피드백-저해-저항 효소의 전장 단백질에서 하나 또는 두 개의 아미노산을 치환한 것을 암호화하는 유전자인 *tyrA^f*(서열번호 7) 및 *aroG^f*를 사용하였다. *aroG^f*의 경우, applied and environmental microbiology(1997) 63(2) 761-762에 보고된 AroG15 변이주(146 Asp → Asn)을 사용하였다. 아울러, 상기 *aroG^f*에 대해서는 상기 실시예 <1-3-1>에 기재된 바와 같이, 대장균에서 발현이 최적화되도록 코돈 최적화(codon optimized) *aroG^f*를 사용하였다. 구체적으로, *aroG^f*의 아미노산 서열을 토대로 대장균에서 *aroG^f*의 아미노산 서열(서열번호 8) 각각에 대한 tRNA 비율에 따른 최적의 codon usage를 사용한 염기 서열(서열번호 9)을 결정하였으며 결정한 서열은 미국 DNA 2.0사에 주문 제작하였다. 상기 서열은 시작코돈 앞에 *MdeI* 제한효소의 인식 서열을 가지고 있으며, 종결코돈 뒤에 *HindIII* 제한효소 인식 서열을 가지고 있다. 이로 인하여 타이로신 생산에 의해 각각의 효소 활성이 그대로 유지되어 타이로신의 고생산을 유도할 수 있었다. 한편,

TyrA의 경우, 변이주 중 코리스믹산 뮤타제(chorismate mutase) 활성과 저항성은 그대로 유지하면서 프리페닉산 탈수소효소(prephenate dehydrogenase) 활성과 내성을 동시에 가지고 있는 TyrAmut-20를 사용하였다. 이 TyrAmut-20는 53Met → Ile 와 354Ala → Val을 가지고 있다(applied and environmental microbiology(2005) 71(11) 7224-7228)(서열번호 10). 상기와 같은 아미노산 치환 과정을 통해 각 효소는 타이로신 농도에 따른 활성 감소 효과가 상실된 효소로 변형되었다.

[0125] 본 발명에서의 구체적인 실시예는 Appl Microbiol Biotechnol(2007) 75:103.110에 기재된 방법과 유사하게 실시하였으며, 이때 상기 두 유전자를 모듈화하기 위하여 사용한 벡터는 상기 참조 논문의 경우, low-copy-vector인 pCL1920이고, 본 발명의 실시예에서는 피드백-저해-저항성 유전자 $tyrA^f$ 및 $aroG^f$ 의 발현을 증가시키기 위하여 high-copy vector인 pET-28(+)를 사용하였다.

[0126] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, $tyrA^f$ 및 $aroG^f$ 이 모듈화된 형태인 pET-AG를 제작하였다(도 7).

[0127] <4-3> pET-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주(AC-AF)에서 IPTG 유도에 따른 타이로신의 생산 확인

[0128] 상기 실시예 <4-1>에서 제작한 $\Delta tyrR1$ 균주에 상기 실시예 <4-2>에서 제작한 pET-AG 벡터를 도입하였고, IPTG 유도에 따른 타이로신의 생산을 확인하였다. 상기 실시예 <3-1>의 방법을 이용하여 타이로신의 생산을 확인하였다. 이때, 타이로신 표준품은 Sigma(USA)에서 구입하여 분석하였다.

[0129] 그 결과, 상기 pET-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주(AC-AF)는 본 연구실 배양 조건에서 600 mg/L 정도의 타이로신 생산 효과가 있음을 확인하였다(도 8B). 이는 Appl Microbiol Biotechnol(2007)에서의 유사한 균주에서의 346 mg/L 보다 높은 효율을 나타내는 것을 확인하였다.

[0130] <4-4> pAD-AG 클로닝(cloning) 및 pAD-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주(AC-AF1)의 제작

[0131] pET-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주에서 페닐프로파노의 산 초기 전구체인 아미노산 타이로신(tyrosine)이 고생산 되는 것을 확인하였다. 하지만, 본 명세서에서 구축된 나린제닌 인공생합성 경로 벡터를 발현하여 프로파노이드 생산을 실험하기 위해서는 프로파노이드 인공생합성 경로 벡터에 $aroG$ 와 $tyrA$ 피드백 저해(feedback inhibition) 변이 유전자 발현벡터가 동시에 발현하는 two vector 시스템을 개발하여야 한다.

[0132] 이러한 two vector system을 위해 $aroG$ 와 $tyrA$ 피드백 저해 변이 유전자 발현벡터를 pET vector에서 벡터 기원(vector origin)이 다른 pACYCDuet-1로 변환하여 사용하였다. 이를 위해 pET28- $tyrA^*$ 을 NcoI/HindIII에 삽입하고 pET22- $aroG^*$ 는 NdeI/XhoI 삽입하여 pAD-AG 벡터를 제작하였다(도 9). 아울러, 상기 제작된 pAD-AG 벡터를 상기 실시예 <4-1>에서 제작한 $\Delta tyrR1$ 균주에 도입하여, pAD-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주(AC-AF1)를 제작하였다. 이 pAD-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주를 M9 배지에서 배양한 결과 pET-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주보다는 낮지만 Appl Microbiol Biotechnol (2007)에서의 유사한 균주 400 mg/L의 타이로신 생산을 확인하였다.

[0133] <실시예 5> 페닐프로파노의 산 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 벡터를 타이로신 고생산 균주 또는 일반 대장균 균주에 도입하여 형질전환한 뒤에, 각각의 형질전환 균주에서 생산되는 페닐프로파노의 산 화합물의 생산 확인 및 비교

[0134] 상기 <실시예 3>에서, 일반 대장균에 각각

[0135] 1) pET-Tal, pET-T5, pET-T5M 벡터; 또는

[0136] 2) pET-opTal, pET-opT5, pET-opT5M 벡터를 도입하여, 각각의 벡터에 대한 형질전환된 균주인

[0137] 1) pET-Tal/C41, pET-T5/C41, pET-T5M/C41; 또는

[0138] 2) pET-opTal/C41, pET-opT5/C41, pET-opT5M/C41를 제작하고, 각각의 균주에서 4-쿠마린산, 카페인산, 페롤린산의 생산을 확인하였다.

[0139] 상기 페닐프로파노의 산 생산 결과와 상기 실시예 <4-4>에서 제작한 pAD-AG/ $\Delta tyrR1$ 균주(AC-AF1)에

[0140] 1) pET-Tal, pET-T5, pET-T5M 벡터; 또는

- [0141] 2) pET-opTal, pET-opT5, pET-opT5M를 도입하여 제작된
- [0142] 1) pET-Tal/AC-AF1, pET-T5/AC-AF1, pET-T5M/AC-AF1 균주; 또는
- [0143] 2) pET-opTal/AC-AF1, pET-opT5/AC-AF1, pET-opT5M/AC-AF1 균주 각각에서 4-쿠마린산, 카페인산, 페룰린산의 생산을 비교하였다.
- [0144] 형질전환된 균주의 구체적인 정보는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0145]

도입된 벡터	사용된 균주	
	일반 대장균	pAD-AG/ Δ tyrR1 균주(AC-AF1) :Tryrosine 고생산균주
pET-Tal	pET-Tal/C41	pET-Tal/AC-AF1
pET-opTal	pET-opTal/C41	pET-opTal/AC-AF1
pET-T5	pET-T5/C41	pET-T5/AC-AF1
pET-opT5	pET-opT5/C41	pET-opT5/AC-AF1
pET-T5M	pET-T5M/C41	pET-T5M/AC-AF1
pET-opT5M	pET-opT5M/C41	pET-opT5M/AC-AF1

[0146] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 일반 대장균에 pET-Tal/C41, pET-T5/C41, pET-T5M/C41를 도입하였을 때보다 본 발명에서 제작한 타이로신 고생산 균주(pAD-AG/ Δ tyrR1 균주(AC-AF1))에 상기 벡터를 도입하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산, 페룰린산의 생산이 각각 16.5배, 3.5배, 7배 증가된 것을 확인하였다(도 10).

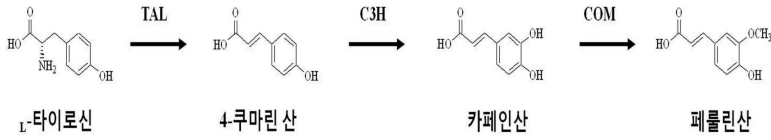
표 3

Engineered tyrosine overproducing <i>E. coli</i> (pAD-AG/ Δ tyrR)	4-Coumaric acid (mg/L)	Caffeic acid (mg/L)	Ferulic acid (mg/L)
pET-TAL	974 ± 30	-	-
pET-opTAL	805 ± 41	-	-
pET-T5	307 ± 8	150 ± 8	-
pET-opT5	511 ± 69	40 ± 16	-
pET-T5M	113 ± 12	22 ± 3	196 ± 26
pET-opT5M	150 ± 17	46 ± 7	187 ± 12

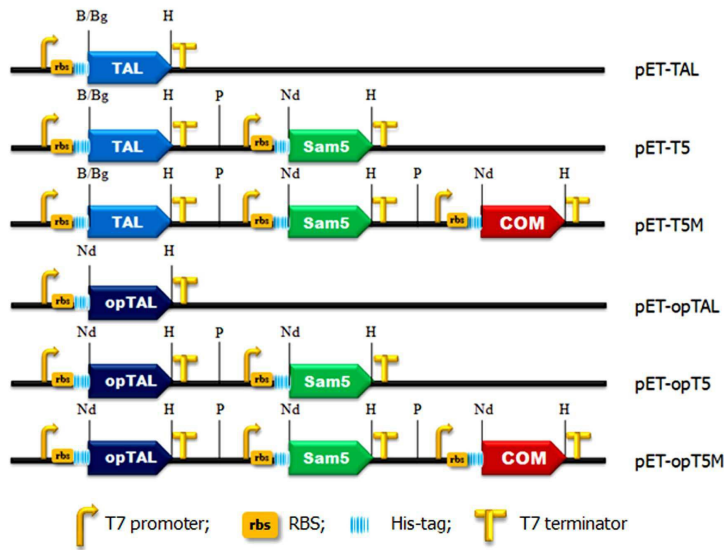
- [0147]
- [0148] 또한, 도 10 및 표 3에 나타낸 바와 같이, 일반 대장균에 pET-opTal, pET-opT5, pET-opT5M를 도입하였을 때보다 본 발명에서 제작한 타이로신 고생산 균주(pAD-AG/ Δ tyrR1 균주(AC-AF1))에 상기 벡터를 도입하였을 때, 4-쿠마린산, 카페인산, 페룰린산의 생산이 각각 5.5배, 2.4배, 2.6배 증가된 것을 확인하였다(도 10 및 표 3).
- [0149] 따라서, 본 발명에서 제작한 타이로신 고생산 균주에 페닐프로파노익 산 생합성에 관여하는 유전자를 포함하는 벡터를 형질전환 한 경우, 4-쿠마린산, 카페인산, 페룰린산을 대량으로 생합성할 수 있음을 확인하였다.

도면

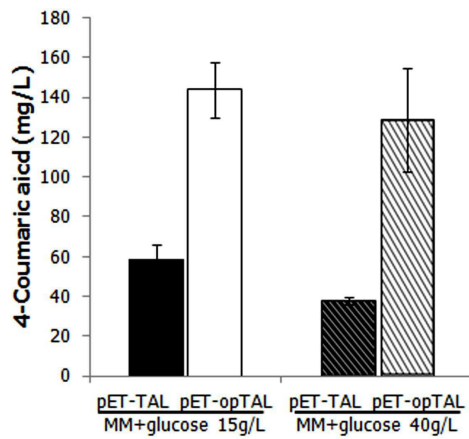
도면1



도면2

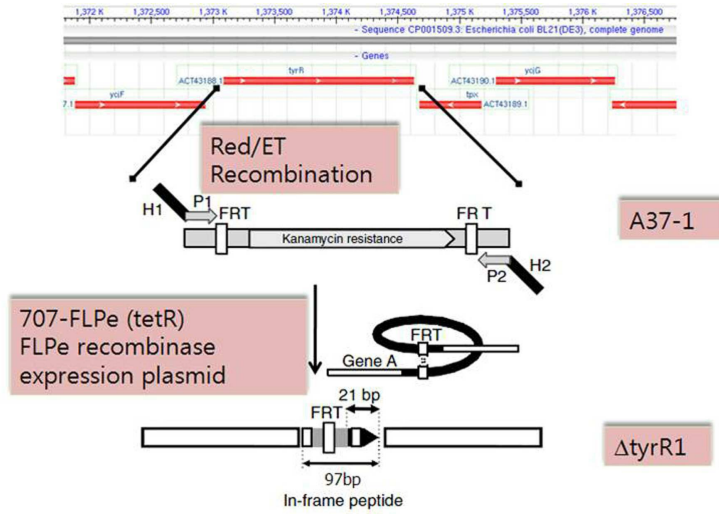


도면3

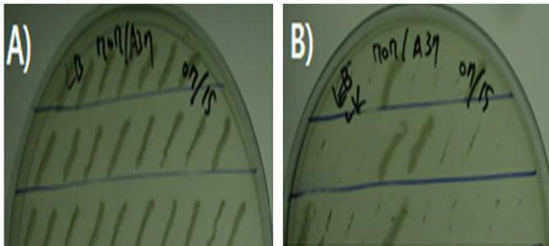


Engineered <i>E. coli</i> strains	4-Coumaric acid (mg/L)	
	MM (+ glucose 15 g/L)	MM (+ glucose 40 g/L)
pET-TAL	59 ± 7*	38 ± 2**
pET-opTAL	144 ± 14*	129 ± 26**

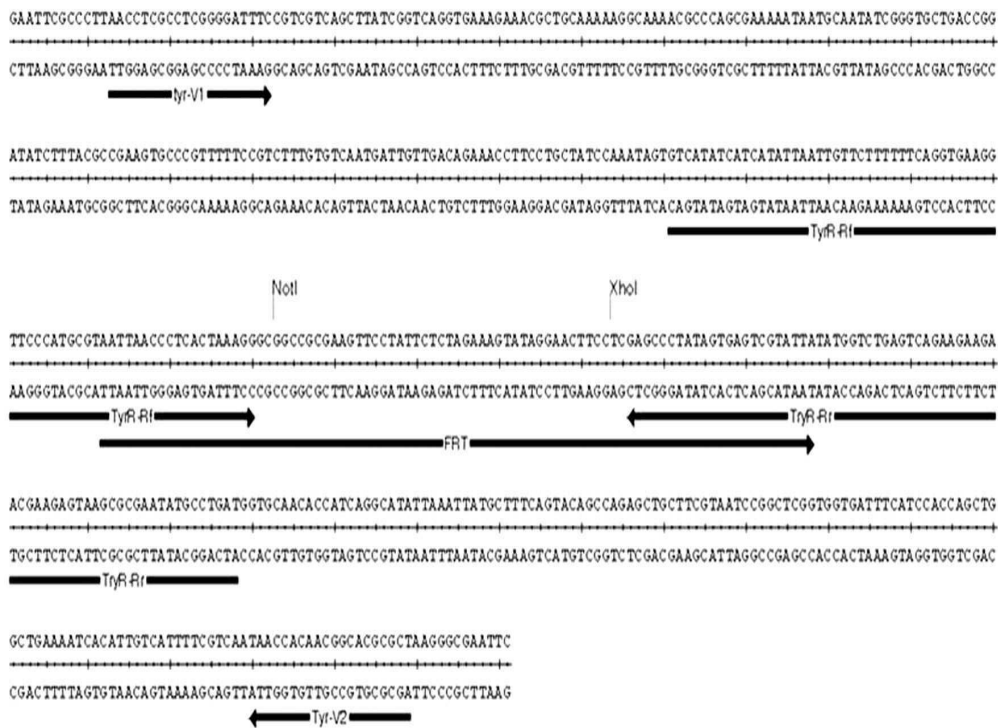
도면4



도면5

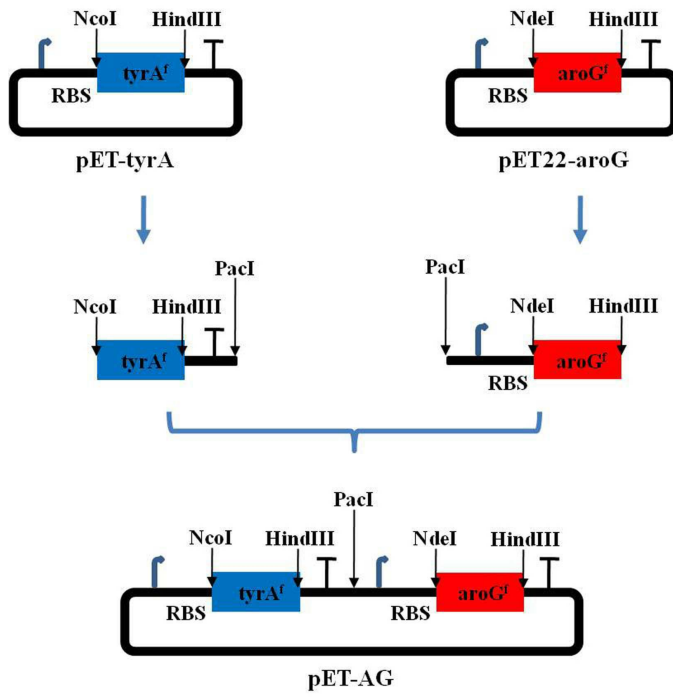


도면6

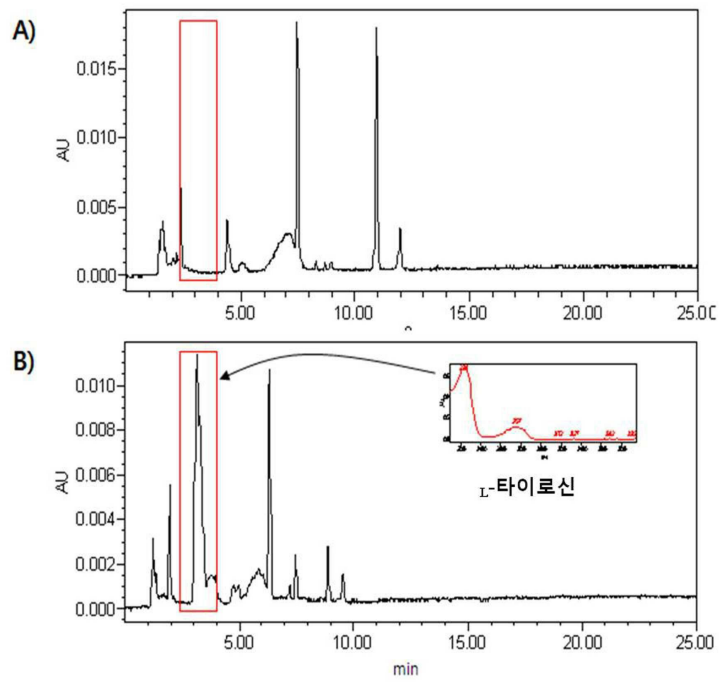


도면7

pET-AG 클로닝

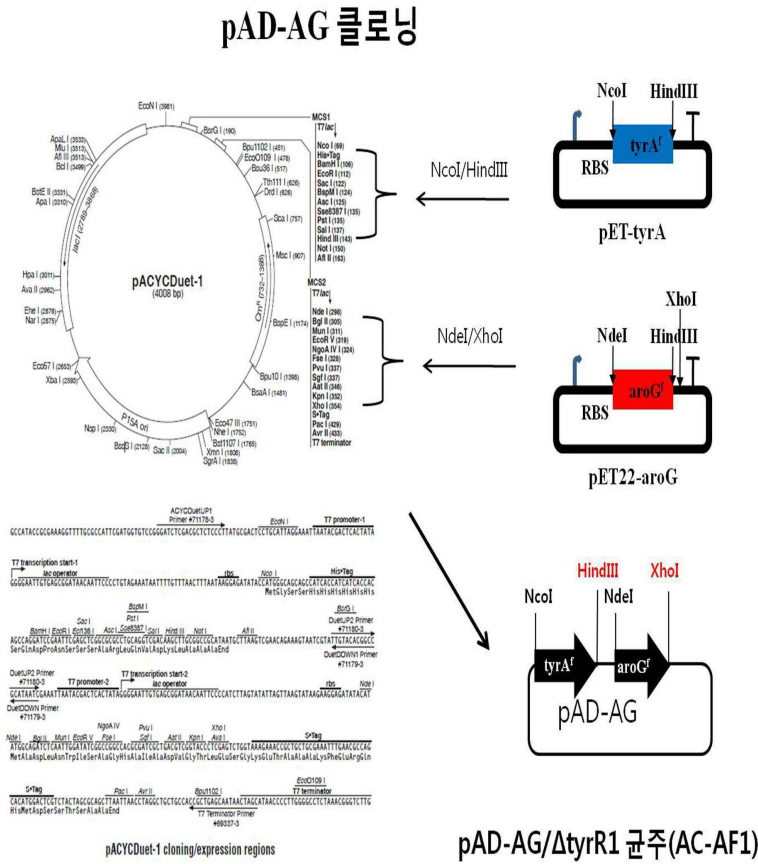


도면8

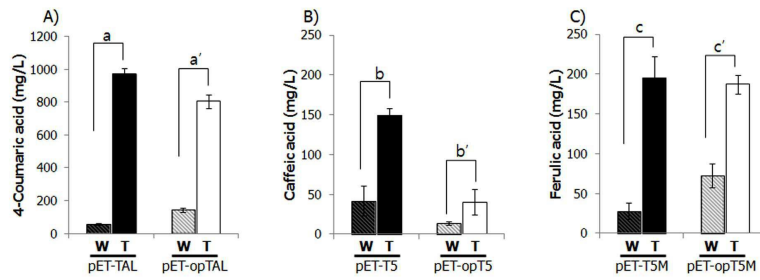


pET-AG/ Δ tyrR1 균주(AC-AF)에서 IPTG 유도에 따른 타이로신 생산 확인. A) 유도되지 않음; B) 1mM IPTG 로 유도

도면9



도면10



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Method of production of 4-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid by artificial metabolism pathway in strain producing high tyrosine
- <130> 13p-04-41
- <160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1539

<212> DNA

<213> Saccharothrix espanaensis

<400> 1

atgaccatca cgtcacctgc gccggcgggc cggctcaaca acgtccgcc gatgacgggc 60

gaggagtacc tggaaact cgcgggacggc cgagaggtct acatctacgg cgagcgggtc 120

gacgacgtca ccacgcacct ggccttccgc aacagcgtgc gctccatcgc gcggctctac 180

gacgtgctgc acgaccggc gtccgaaggt gtgtgcggg tgcccaccga caccggcaac 240

ggcgggttca cccaccgtt cttcaagacc gcccggctgt cggaggacct ggtcgccg 300

cgcgaggcca tcgtcggctg gcagcggctg gtgtacgggt ggatgggccc caccgggac 360

tacaaggcgg cgttcttcgg cacgctcgc gccaacgcc agttctacgg gccgttcgag 420

gccaacgccc gccgtggta ccgcgacgcc caggaacggg tgctgtactt caaccacgcg 480

atcgtgcacc cgccggctga ccgggaccgg cccgccgacc ggaccgccga catctgcgtg 540

cacgtggagg aggagaccga cagcgggttg atcgtctccg gcgccaaggt ggtcgcgacc 600

ggctccgca tgaccaacgc gaacctcacc gcgcactacg ggcttccgg gcgggacaag 660

aagtccggcc tgggtttcac ggtcccgatg aactcgccc gcctcaagct catctgccgc 720

acctcctacg agctgatggt cgcgacgcag ggctgcctc tcgactacc gctgtcgagc 780

cggtcgcagc agaacgactc gatcatgatc ttcgaccggg tgctgggtgcc ctgggagAAC 840

gtgttcatgt acgacgcggg cgcggccaac tccttcgcca ccgggtcagg cttctcga 900

cgcttcaact tccacggctg caccgcctc gcggtcaagc tggacttcat cgccggctgc 960

gtcatgaagg cggaggagg caccggcacc acgcacttcc gggcgtgca ggcgcaggtc 1020

ggcgaagtgc tcaactggcg cgactgttc tggggcctgt ccgacgcgat ggccaagtgc 1080

ccgaactcgt gggtcggcgg ctcgggtcag ccgaacctca actacgggct cgcgtaccgc 1140

accttcatgg gcgtgggcta cccgcgcatc aaggagatca tccagcagac cctcggcagc 1200

gggttgatct acctgaactc ctcggcccgc gactggaaga accccgacgt ccgcccgta 1260

ctcaccgct acctgcgcgg ctcgcggggc atccaggcga tcgaccgggt caagctgctg 1320

aagctgctgt gggacgcggc cggcaccgag ttcgccggcc ggcacgagct ctacgagcgc 1380

aactacggcg gcgaccacga gggcatccgg gtgcagacc tgcaggcgtta ccaggcgaac 1440

ggccaagcgg ccgcgctcaa gggtttcgcc gagcagtga tgtccgagta cgacctcgac 1500

ggctggacga ggccccacct gatcaacccc ggcacctga 1539

<210> 2

<211> 1092

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

atgggttcaa cggcagagac acaattaact cgggtgcaag tcaccgacga cgaagctgcc 60

ctcttcgcca tgcaactagc cagtgtctcc gttcttccga tggttttaa atccgcctta 120

gagcttgacc ttcttgagat tatggccaag aatggttctc ccatgtctcc taccgagatc 180

gcttctaaac ttccgaccaa aaacctgaa gctccggta tgctcgaccg tatectccgt 240

cttcttacgt cttactccgt cttaacctgc tccaaccgta aactttccgg tgatggcggt 300

gaacggattt acgggcttgg tccggtttgc aagtattga ccaagaacga agatgggtgt 360

tccattgctg ctctttgtct tatgaaccaa gacaaggctc tcatgaaag ctggtaccat 420

ttgaaggatg caattcttga tgggtgggatt ccattcaaca aggcttatgg aatgagcgcg 480

ttcgagtacc acgggactga ccctagatc aacaaggctc ttaacaatgg aatgtctaac 540

cattccacaa tcaccatgaa gaagattctt gagacctata agggttttga aggattgact 600

tctttggttg atgttgggtg tggcattggt gctacactca aatgattgt ctccaagtac 660

cctaacttta aaggcatcaa cttgatctc ccacatgca ttgaagatgc tccttctcat 720

cctggatttg agcatgttgg aggagatag tttgtaagtg tcctaaagg tgatgccata 780

ttcatgaagt ggatgtgca tgactggagt gacgaacatt gcgtgaaatt cttgaaaaac 840

tgctacgagt cacttccaga ggatggaaaa gtgatattag cagagtgtat acttccagag 900

acaccagact caagcctctc aaccaacaa gtagtccatg tcatgtgat tatgttggt 960

cacaatcccg gaggcaaaga acgaaccgag aaagagtttg aggcattagc caaagcatca 1020

ggcttcaagg gcatcaaagt tgtctcgac gcttttgggt ttaaccttat tgagttactc 1080

aagaagctct aa 1092

<210> 3

<211> 510

<212> PRT

<213> Saccharothrix espanaensis

<400> 3

Met Thr Gln Val Val Glu Arg Gln Ala Asp Arg Leu Ser Ser Arg Glu

1 5 10 15

Tyr Leu Ala Arg Val Val Arg Ser Ala Gly Trp Asp Ala Gly Leu Thr
 20 25 30
 Ser Cys Thr Asp Glu Glu Ile Val Arg Met Gly Ala Ser Ala Arg Thr
 35 40 45
 Ile Glu Glu Tyr Leu Lys Ser Asp Lys Pro Ile Tyr Gly Leu Thr Gln
 50 55 60
 Gly Phe Gly Pro Leu Val Leu Phe Asp Ala Asp Ser Glu Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Leu Ile Ser His Leu Gly Thr Gly Gln Gly Ala Pro Leu
 85 90 95
 Ala Pro Glu Val Ser Arg Leu Ile Leu Trp Leu Arg Ile Gln Asn Met
 100 105 110

 Arg Lys Gly Tyr Ser Ala Val Ser Pro Val Phe Trp Gln Lys Leu Ala
 115 120 125
 Asp Leu Trp Asn Lys Gly Phe Thr Pro Ala Ile Pro Arg His Gly Thr
 130 135 140
 Val Ser Ala Ser Gly Asp Leu Gln Pro Leu Ala His Ala Ala Leu Ala
 145 150 155 160
 Phe Thr Gly Val Gly Glu Ala Trp Thr Arg Asp Ala Asp Gly Arg Trp
 165 170 175
 Ser Thr Val Pro Ala Val Asp Ala Leu Ala Ala Leu Gly Ala Glu Pro
 180 185 190
 Phe Asp Trp Pro Val Arg Glu Ala Leu Ala Phe Val Asn Gly Thr Gly
 195 200 205
 Ala Ser Leu Ala Val Ala Val Leu Asn His Arg Ser Ala Leu Arg Leu
 210 215 220
 Val Arg Ala Cys Ala Val Leu Ser Ala Arg Leu Ala Thr Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala Asn Pro Glu His Tyr Asp Val Gly His Gly Val Ala Arg Gly Gln
 245 250 255

 Val Gly Gln Leu Thr Ala Ala Glu Trp Ile Arg Gln Gly Leu Pro Arg

<211> 1533

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> codon optimized tal dna

<400> 4

```

atgacccagg tggttgaacg ccaggccgat cgcctgagta gtcgtgaata cttagctcgc      60

gtcgttcgta gtgccggctg ggatgcgggc ctaacctctt gtacagatga agaaattgtt      120
cgcatgggcg cgtcagcccg caccatcgag gaatatttaa aaagtataa accgatttat      180
ggtttaaccg aaggcttcgg cccgctgcta ctgtttgatg cggatagcga attagaacag      240
ggtggtagcc tgattagcca tctgggcacc ggtcaggcgc cgccgctggc gccggaagtg      300
agtcgtttaa ttcctggct gcgtattcaa aacatgcga aagttatag cgccgttagc      360
ccggttttct ggcaaaaact ggcagaccta tggaataaag gctttacccc ggcaattccg      420
cgtcatgta cgtttccgc ctcgggtgat ctgcaaccgc tggcgcgatgc cgcgctggca      480

ttcaccggcg tgggtgaagc gtggaccgc gatgcagatg gccgctggag caccgttccg      540
gctgttgatg ccctggcagc gctgggtgcc gaaccgtttg attggcctgt ccgcgaagca      600
ctggcgtttg ttaatggcac cggagccagc ctggcggttg ctgttttaa tcatcgttct      660
gccctgcgcc tggttcgcgc gtgtgcggta ctgagcgcac gcctggcgac cctgctgggc      720
gcaaatccgg aacattatga cgttggctcat ggcgttgccc gcggtcaggt tggccagctg      780
accgcggcgg aatggattcg tcagggcctg ccacgtgta tggcgcgca tgggaagcgt      840
ccgttgcagg aacctatag ccttcgctgc gctccgcagg ttctaggcgc tgttctggat      900

cagctggacg gtgcgggtga cgtgctggcc cgcaagtig atggttgcca ggataaacct      960
attacctagc aaggtgaatt gctgcatggc ggtaacttcc atgcatgcc ggttggtttt      1020
gcaagtgatc agattggtct ggcgatgcac atggcggcct acctggctga acgccagctg      1080
ggcctgctgg ttagcccggt aaccaatggt gattaccac cgatgctgac cccgctgcc      1140
ggcctggtg cgggtcttgc tggcgtccag atttctgcca ccagcttctg ttctcgtatt      1200
cgccaactgg ttttcccgc gtctctgacc acctgcccga ccaacggttg gaatcaagac      1260
catgtaccga tggcactgaa tggcgctaat agcgttttgc aagcactgga actgggttgg      1320

ttaaccgttg gaagcctggc ggtgggcgtt gcacagctgg cggcgatgac cggcatgacg      1380
gctgaagggg tttgggcaga actggcaggc atttcccgc cgttagatgc cgaccgtccg      1440
ctgggtgcgg aagttcgcgc agcccgtgat ctgctgagcg cgcacgctga tcagctgttg      1500
gtggacgaag ccgatggtaa agactttggc taa      1533

```

<210> 5
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tyr-Rf
 <400> 5
 gtcatatcat catattaatt gttctttttt caggtgaagg ttcccatgcg taattaacct 60
 tcactaaagg gcg 73

<210> 6
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tyr-Rr
 <400> 6
 atcaggcata ttcgcgctta ctcttcgttc ttcttctgac tcagaccata taatacgact 60
 cactataggg ctc 73

<210> 7
 <211> 1122
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> two nucleotide mutated feedback resistance tyra dna
 <400> 7
 atggttgctg aattgaccgc attacgcat caaattgatg aagtcgataa agcgtgctg 60
 aatttattag cgaagcgtct ggaactggtt gctgaagtgg gcgaggtgaa aagccgcttt 120

 ggactgccta tttatgttcc ggagcgcgag gcatctatat tggcctcgcg gcgcgcagag 180
 gcggaagctc tgggtgtacc gccagatctg attgaggatg ttttgcgtcg ggtgatgcgt 240
 gaatcttact ccagtgaaaa cgacaaagga tttaaaacac tttgtccgtc actgcgtccg 300
 gtggttatcg tcggcgggtg cggtcagatg ggacgcctgt tcgagaagat gctgacacta 360
 tcgggttatc aggtgcggat tctggagcaa catgactggg atcgagcggc tgatattggt 420
 gccgatgccg gaatggtgat tgttagtgtg ccaatccacg ttactgagca agttatcggc 480
 aaattaccgc ctttaccgaa agattgtatt ctggttgatc tggcatcagt gaaaaatgga 540

 ccattacagg ccatgctggc ggcgcacgat ggccccgtac tggggttaca cccgatgttc 600

ggccccgaca gcgtagcct ggcaaagcaa gttgtgtct ggtgtgatgg acgtaagccg 660
 gaagcatacc aatggtttct ggagcaaatt caggtctggg gcgctcgct gcatcgtatt 720
 agcgtgtcg agcacgatca gaatatggcg tttattcagg ctctcgcca ctttgctact 780
 tttgcttatg ggctgcatct ggcagaagaa aatgttcagc ttgagcaact tctggcgctc 840
 tcttcgccga tttaccgct tgagctggcg atggtcgggc gactgtttgc tcaggatccg 900
 cagctttatg ccgacattat tatgtcgtca gagcgtaatc tggcgtaat caaacgttac 960

tataagcgtt tcggcgaggc gattgagttg ctggagcagg gcgataagca ggcgtttatt 1020
 gacagtttcc gcaaggtgga gcaactggtc ggcgattacg tacagcgttt tcagagttaa 1080
 agcccggtgt tattgctca ggccaatgac aaccgccagt aa 1122

<210> 8

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> arog feedback inhibition resistant amino acid sequence

<400> 8

Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
 20 25 30

Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
 35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
 50 55 60

Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
 85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
 100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
 115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe

130 135 140
 Leu Asn Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
 145 150 155 160

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

 225 230 235 240
 Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
 245 250 255
 Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
 260 265 270
 Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
 275 280 285
 Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
 290 295 300

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

 <210> 9
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> codon optimized feedback resistance arog dna

<

400> 9

atgaactacc aaaacgacga tctgcgcac aaggaaatca aagagctgct gccgcctgtc 60
 gctctgctgg agaagttccc ggcaaccgag aatgctgcta ataccgtggc acacgcgcgt 120
 aaagccattc acaagattct gaagggaac gatgaccgtc tgctggctgt tattgggtccg 180
 tgctccatcc atgacccggg ggcggcgaag gaatatgcca cccgtctgtt ggcgctgctg 240
 gaagaattga aagatgaact ggagattgtg atgcgcgtct attttagaa gccgcgcacg 300
 actgttggtt ggaagggcct gattaacgat cgcacatgg ataactcgtt tcagattaac 360
 gacggcctgc gtatgcgccg caaactgctg ctggacatca atgacagcgg tttgccggca 420

gcgggcgagt tctgaacat gattacgccg cagtacttgg cagatctgat gagctggggt 480
 gcgattgtg cccgtacgac cgagagccag gtccatcgcg aactggcgag cggctctgtct 540
 tgtccggtcg gtttcaaaaa cggcaccgat ggtacgatca aagtgcgat cgacgctatt 600
 aacgcagcag gtgccccga ttgcttctg tctgtgacca agtgggtca cagcgcgatt 660
 gttaatacga gcgtaaatgg cgattgtcac atcatcctgc gtggtggtaa agagccgaat 720
 tacagcga aacatgttgc ggaagtgaag gaaggcctga ataaagccgg tttgccagcc 780
 caagtaatga tcgactttag ccacgcaaac agcagcaagc agtitaagaa acaaatggat 840

gtttgcgcgg atgtgtgcca acaaatgctg ggtggtgaga aagcgatcat cgggtgtgatg 900
 gtcgagagcc acctggttga aggcaatcag tccctggaat ccggcgagcc actggcgtat 960
 ggcaagagca tcaccgacgc gtgtattggc tgggaggaca ccgacgcact gctgcgtcag 1020
 ttggcgaatg ctgtgaaagc gcgtcgtggt taa 1053

<210> 10

<211> 373

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> trya feedback-inhibition-resistant amino acid sequence

<400> 10

Met Val Ala Glu Leu Thr Ala Leu Arg Asp Gln Ile Asp Glu Val Asp

1 5 10 15
 Lys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Ala Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Glu
 20 25 30
 Val Gly Glu Val Lys Ser Arg Phe Gly Leu Pro Ile Tyr Val Pro Glu
 35 40 45

Arg Glu Ala Ser Ile Leu Ala Ser Arg Arg Ala Glu Ala Glu Ala Leu
 50 55 60
 Gly Val Pro Pro Asp Leu Ile Glu Asp Val Leu Arg Arg Val Met Arg
 65 70 75 80

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

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

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

atcacctacg agggcgagct gctgcacggc ggcaacttcc acgccatgcc ggtgggtttc	1020
gcctccgacc agatcgggtt ggccatgcac atggccgect acctggccga gcgccagctg	1080
ggtctgctgg tcagcccggg gaccaacggc gacctgccc ccatgctcac cccgcgcgcc	1140
gggcgcggtg cgggctggc cggggtgcag atcagcgcga cctcgttctg ctgcgggatc	1200
cggcagctgg tgttccccgc ctgctgacc accctgccga ccaacggctg gaaccaggac	1260
cacgtgccga tggcgtcaa cggggcgaac tcggtgttcg aggcgttggg gctcggctgg	1320
ctgacggtcg ggtcgtggc ggtgggcgtc gcgcagctcg cggccatgac cggccacgcc	1380
gcgaggggcg tctgggcgga gctggccggg atctgccgc cgctggacgc cgaccgccg	1440
ctgggcgccg aggtgcgcgc cgcgcgcgac ctgctgtccg cgcacgcgga ccaactgctc	1500
gtcgacgagg cagacgggaa ggatttcgga tga	1533