(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월20일
(11) 등록번호 10-1358663
(24) 등록일자 2014년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7018581(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년02월23일
심사청구일자 2012년07월16일
(85) 번역문제출일자 2012년07월16일
(65) 공개번호 10-2012-0106979
(43) 공개일자 2012년09월27일
(62) 원출원 특허 10-2007-7021821
원출원일자(국제) 2006년02월23일
심사청구일자 2011년02월21일
(86) 국제출원번호 PCT/AT2006/000079
(87) 국제공개번호 WO 2006/089329
국제공개일자 2006년08월31일
(30) 우선권주장
A 304/2005 2005년02월23일 오스트리아(AT)
(56) 선행기술조사문헌
WO2002081650 A2
Acta Genetica Sinica, Vol. 27, pp. 641-646 (2000)
Methods in Enzymology, Vol. 306, pp. 154-169 (1999)
전체 청구항 수 : 총 17 항

(73) 특허권자
브이티유 홀딩 게엠베하
오스트리아 그람바흐 파르크링 18 (우: 8074)
테크니쉐 우니베르지테트 그라츠
오스트리아 그라츠 레히바우어슈트라쎄 12 (우: 아-8010)
(72) 발명자
하르트너, 프란츠
오스트리아 아-8010 그라츠 야코미니슈트라쎄 14/6
그리더, 안톤
오스트리아 아-8200 글라이스도르프 웻자윈켈 20
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

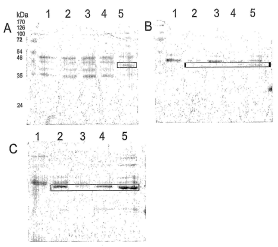
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **돌연변이 AOX1 프로모터**

(57) 요 약

본 발명은, a) 전사 인자 결합 부위 (TFBS), b) Seq ID No. 1의 누클레오티드 170 내지 235 (-784 내지 -719), 누클레오티드 170 내지 191 (-784 내지 -763), 누클레오티드 192 내지 213 (-762 내지 -741), 누클레오티드 192 내지 210 (-762 내지 -744), 누클레오티드 207 내지 209 (-747 내지 -745), 누클레오티드 214 내지 235 (-740 내지 -719), 누클레오티드 304 내지 350 (-650 내지 -604), 누클레오티드 364 내지 393 (-590 내지 -561), 누클레오티드 434 내지 508 (-520 내지 -446), 누클레오티드 509 내지 551 (-445 내지 -403), 누클레오티드 552 내지 560 (-402 내지 -394), 누클레오티드 585 내지 617 (-369 내지 -337), 누클레오티드 621 내지 660 (-333 내지 -294), 누클레오티드 625 내지 683 (-329 내지 -271), 누클레오티드 736 내지 741 (-218 내지 -213), 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216), 누클레오티드 726 내지 755 (-228 내지 -199), 누클레오티드 784 내지 800 (-170 내지 -154) 또는 누클레오티드 823 내지 861 (-131 내지 -93), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 야생형 피키아 파스토리스 AOX1 프로모터 (Seq ID No. 1)의 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

야생형 피키아 파스토리스 AOX1 프로모터에 비해, 탈억제 조건하에서의 높은 발현을 위한 Seq ID No. 1의 누클레오티드 694 내지 723 (-260 내지 -231) 전체 영역이 결실된 돌연변이를 포함하는 야생형 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터 (SEQ ID No. 1)의 돌연변이 피키아 파스토리스 AOX1 프로모터.

청구항 2

제 1항에 있어서, 프로모터가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 170 내지 235 (-784 내지 -719) 또는 누클레오티드 729 내지 763 (-225 내지 -191) 또는 전사 인자 결합 부위 (TFBS)가 결실된 돌연변이 또는 누클레오티드 170 내지 191 (-784 내지 -763), 누클레오티드 192 내지 213 (-762 내지 -741), 누클레오티드 192 내지 210 (-762 내지 -744), 누클레오티드 207 내지 209 (-747 내지 -745), 누클레오티드 214 내지 235 (-740 내지 -719), 누클레오티드 304 내지 350 (-650 내지 -604), 누클레오티드 364 내지 393 (-590 내지 -561), 누클레오티드 434 내지 508 (-520 내지 -446), 누클레오티드 509 내지 551 (-445 내지 -403), 누클레오티드 552 내지 560 (-402 내지 -394), 누클레오티드 585 내지 617 (-369 내지 -337), 누클레오티드 621 내지 660 (-333 내지 -294), 누클레오티드 625 내지 683 (-329 내지 -271), 누클레오티드 736 내지 741 (-218 내지 -213), 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216), 누클레오티드 726 내지 755 (-228 내지 -199), 누클레오티드 784 내지 800 (-170 내지 -154) 및 누클레오티드 823 내지 861 (-131 내지 -93)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상이 결실된 돌연변이를 추가로 포함함을 특징으로 하는 프로모터.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 2항에 있어서, 전사 인자 결합 부위 (TFBS)가 Hap1, Hsf, Hap234, abaA, Stre, Rap1, Adr1, Mat1MC 및 QA-1F로 구성된 군으로부터 선택되고, 여기서, 전사 인자 결합 부위 (TFBS) Hap1이 Seq ID No. 1의 누클레오티드 54 내지 58을 포함하고, Hsf가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 142 내지 149 및 517 내지 524를 포함하고, Hap234가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 196 내지 200, 206 내지 210 및 668 내지 672를 포함하고, abaA가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 219 내지 224를 포함하고, Stre가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 281 내지 285를 포함하고, Rap1이 Seq ID No. 1의 누클레오티드 335 내지 339를 포함하고, Adr1이 Seq ID No. 1의 누클레오티드 371 내지 377을 포함하고, Mat1MC가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 683 내지 687을 포함하고, QA-1F가 Seq ID No. 1의 누클레오티드 747 내지 761을 포함함을 특징으로 하는 프로모터.

청구항 5

제 1항에 따른 하나 이상의 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터 및 단백질 (펩티드) 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 핵산 분자로서, 상기 프로모터 및 상기 핵산이 작동가능하게 함께 연결되어 단일-카피 또는 다중-카피 발현 카세트를 형성함을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 6

제 1항에 따른 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터를 포함하는 벡터.

청구항 7

제 1항에 따른 하나 이상의 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터, 하나 이상의 제 5항에 따른 핵산 단편 또는 하나 이상의 제 6항에 따른 벡터를 포함하는 세포.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 세포가 진핵생물 세포임을 특징으로 하는 세포.

청구항 9

ⅰ) 제 6항에 따른 벡터, 및 ii) 제 1항에 따른 프로모터의 제어하에서 선택 단백질을 발현시킬 수 있는 세포를 포함하는, 상기 선택 단백질의 발현을 위한 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 세포가 효모 세포임을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

세포 내에서 재조합 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 발현시키기 위한 방법으로서,

- 제 1항에 따른 AOX1 프로모터, 및 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 핵산을 포함하는, 제 5항에 따른 핵산 분자 또는 제 6항에 따른 벡터를 제공하는 단계로서, 상기 프로모터가 상기 핵산에 작동가능하게 연결되는 단계,

- 상기 벡터 또는 상기 핵산 분자로 상기 세포를 형질전환시키는 단계,

- 상기 형질전환된 세포를 배지에서 배양하는 단계,

- 임의로, 상기 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현을 유도하는 단계, 및

- 상기 발현된 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 단리시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 세포가 효모 세포임을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

과발현 클론을 단리시키기 위한 방법으로서,

a) 제 1항에 따른 하나 이상의 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터 및 단백질 (펩티드) 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산 및 마커 내성 유전자를 포함하는 핵산 분자로서, 상기 프로모터 및 상기 핵산이 작동가능하게 함께 연결되어 단일-카피 또는 다중-카피 발현 카세트를 형성하는, 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터를 세포에 도입시키는 단계,

b) 단계 a)의 세포를 선택 마커 및 비-억제 탄소원을 포함하나 과발현 클론의 선택적 성장을 위한 메탄올을 포함하지 않는 탈억제 조건 하의 배지로 이동시키는 단계,

c) 상기 배지 상에서 단계 b)로부터의 세포를 인큐베이션시키는 단계,

d) 단계 c)로부터 수득된 세포의 콜로니를 단리시키는 단계, 및

e) 상기 세포의 발현 속도를 결정함으로써 과발현 클론을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 선택 마커가 항생제임을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 선택 마커가 제오신이고, 마커 내성 유전자가 sh ble 유전자임을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 세포가 효모 세포 임을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 11항에 있어서, 비-억제 탄소원이 알라닌, 만니톨, 소르비톨, 트레할로오스, 락토오스 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 11항에 있어서, 핵산 분자 또는 벡터가 형질전환에 의해 세포로 도입됨을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 내용

[0001] 본 발명은 돌연변이 피키아 파스토리스 (Pichia pastoris) AOX1 프로모터에 관한 것이다.

[0002] S. 세레비지애 (S. cerevisiae)는 진핵생물 모델 유기체 및 생성 시스템으로서 과학 및 생명기술 용도에서 우세하였고, 여전히 우세하다. 과거 1세기에 또 다른 효모인 분열 효모 스키조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*)가 매우 주목을 받았다. 모델 유기체로서 많은 주목을 받은 분열 S. 폼베에 의해서만 재현되는 특성으로 인해, 이는 오늘날 S. 세레비지애와 함께 분자유전학 및 세포생물학과 관련하여 가장 잘 연구된 효모종이 되었다. 지금까지 700종 이상으로 공지된 다양한 효모종 중에서 상기 언급된 두개의 효모만이 기술적 및 과학적 적용에 대해 제한된 일련의 흥미로운 특성을 제공할 수 있다. 1970년대 또는 1980년대 이래로, 생물공학 및 연구를 위해 뛰어난 특성을 지닌 효모종이 더욱 더 연구되었다. 이들 소위 비-통상적 효모 (NCY) 또는 비-사카로마이세스 효모 (이경우, 용어 사카로마이세스는 효모 스키조사카로마이세스 폼베를 포함함)가 여러 이유로 인해 개발되었다: 이들은 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*)와 같은 의학적 중용성을 지니거나 특정 기질 (예를들어, n-알칸, 락토오스) 상에서 성장하는 능력을 지니는 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolytica*) 및 클루이베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*)와 같은 기술적 관련성을 지닌다. 예를들어, 가장 일반적인 인간 진균 병원체인 C. 알비칸스는 질병 발생과 관련된 독성 인자의 특성을 나타내므로 병원성 효모에 대한 모델 유기체가 되는 것으로 광범위하게 연구되고 있다. NCY의 또 다른 잘 확립된 그룹은 재조합 단백질 생성 및 퍼옥시좀 생체발생의 연구와 관련하여 S. 세레비지애보다 우수한 메탄올자화 (methylotrophic) 효모인 피키아 파스토리스 및 한세눌라 폴리모르파 (Hansenula polymorpha) (피키아 앙구스타 (Pichia angusta))이다. 이들은 유일한 기술적 또는 학술적 매력을 지니는 유일한 비-통상적 효모의 가장 두드러진 일원이다. 현재, 기타 여러 종이 또한 특히 흥미가 있고, 이들 그룹은 내년에 신속하게 성장할 것이다.

[0003] 천연에서 가장 풍부한 분자 부류인 당은 모든 공지된 효모에 의해 이용된다. 종마다 기질 수용에 있어서 큰 차이가 존재하지만 (표 1 참조), 이들의 물질대사에서 글루코오스 6-포스페이트 또는 프룩토오스 6-포스페이트로부터 피루베이트의 전환은 공통된 주제이다. 좌우간, 해당 경로를 위한 효소적 장치는 다양한 효모에서 현저하게 다양하다. S. 세레비지애에서 대부분의 효소는 적어도 부분적으로는 공지되고 특성규명되어 있는 반면, NCY에서는 단지 소수의 효소만이 기술되어 있다. 해당에 필요한 기능의 일부는 몇몇 효모의 여러 유전자/효소, 특히 물질대사의 제어 또는 조절에서 추가적인 역할을 하는 유전자/효소 및/또는 글루코키나아제/헥소키나아제, 포스포프룩토키나아제 및 글리세랄데히드 3-포스페이트 탈수소효소와 같은 분기점에서 존재하는 유전자/효소에 의해 매개된다. 일반적으로, 동종효소는 변화하는 환경적 필요조건 하에서 다양한 기능을 나타내도록 특이적으로 조절된다. 해당 효소를 엔코딩하는 유전자중 일부는 예를들어 S. 세레비지애 *PGK1* (포스포글리세레이트 키나아제) 또는 P. 파스토리스 *GAP* 유전자 (글리세랄데히드 3-포스페이트 탈수소효소)와 같이 구성적이고 고도로 발현되는 반면, 기타 효소는 S. 세레비지애의 *ENO1* (에놀라아제) 유전자와 같이 엄격하게 조절된다.

[0004] **표 1**: 글루코오스 및 프룩토오스가 아닌 관련 상업적 기질을 지니는 생물공학적 대상의 선택 효소.

효모	에너지 물질대사	선택 기질
S. 세레비지애	양성적 크래브트리	수크로오스, 말토오스, 라피노오스, 에탄올
S. 폼베	양성적 크래브트리	수크로오스, 말토오스, 라피노오스
자이고사카로마이세스 바일리이 (*Zygosaccharomyces bailii*)	양성적 크래브트리	아세트산, 에탄올, 글리세롤
야로위아 리폴리티카	음성적 크래브트리	n-알칸, 지방산, 에탄올
피키아 스티피티스 (*Pichia stipitis*)	음성적 크래브트리	자일로오스
피키아 파스토리스	음성적 크래브트리	메탄올, 글리세롤
한세눌라 폴리모르파	음성적 크래브트리	메탄올, 글리세롤
슈와니노마이세스 옥시덴탈리스 (*Schwanninomyces occidentalis*)	음성적 크래브트리	전분, n-알칸, 자일로오스, 수크로오스, 라피노오스, 트레할로오스, 락토오스, 에탄올
클루이베로마이세스 락티스	음성적 크래브트리	락토오스, 수크로오스, 말토오스, 라피노오스, 에탄올, 글리세롤, 자일리톨, 락테이트

[0005]

[0006] 물질대사에서의 피로베이트의 운명은 효모종 및 배양 조건 사이에서 매우 다양하다. S. 세레비지애 및 기타 소위 양성적 크래브트리 효모에서, 호흡은 글루코오스 및 관련 당에 의해 억제된다. 이는 많은 양의 산소하에서도 피루베이트 데카르복실라아제를 통해 피루베이트로부터 에탄올 및 CO_2로의 전환을 야기시키고, 이는 발효로도 공지되어 있다. NCY 대부분이 속하는 음성적 크래브트리 효모에서, 피루베이트로부터 에탄올로의 전환은 혐기 조건하에서만 발생한다. 호기 조건하에서, 피루베이트는 피루베이트 탈수소효소 및 트리카르복실산 (TCA) 사이클을 통해 CO_2로 산화된다. TCA 사이클은 당의 CO_2로의 산화를 위한 유일한 경로라는 사실로 인해 세포 물질대사에서 매우 흥미롭다. CO_2로의 산화는 에너지 생성에 사용되는 NADH를 생성시킨다. 더욱이, TCA 사이클 중간 생성물은 생합성 목적을 위한 대사산물의 주요 공급원이다. 중간 생성물의 제거로 인해, TCA 사이클은 계속 작동하기 위해 보충되어야 한다. 효모에서의 주요 보전 반응은 피루베이트 카르복실라아제 및 글리옥실레이트 사이클이다. 피루베이트 카르복실라아제는 단일한 질소 공급원으로서 암모니아에서 성장하는 경우 주요 경로이고, 글리옥실레이트 사이클은 3개 미만의 탄소 원자를 지닌 탄소원에서 성장하는 경우에 필요하다. 이러한 유명한 관심 대상과는 대조적으로, NCY에서의 TCA 사이클과 관련된 유전자 또는 효소에 관해서는 거의 공지되어 있지 않다. 세포질액 또는 미토콘드리아에서 이화 반응에 의해 생성된 NADH는 반응을 계속 작동시키기 위해 NAD^+로 다시 산화되어야 한다. 음성적 크래브트리 효모 (예를들어, 피키아 파스토리스)에서는 호기성 조건하에서 NADH가 주로 호흡 사슬을 통해 재산화된다. 이러한 상황은 호흡 및 발효가 공존하는 S. 세레비지애와 같은 양성적 크래브트리 효모에서는 매우 상이하다. 호기성 조건하에서 글루코오스에서 성장하는 경우, 글루코오스에 의해 호흡이 억제되고, 발효가 발생한다. 이러한 조건하에서, NAD^+는 에탄올 (해당에 의해 NADH가 생성됨) 또는 글리세롤의 형성에 의해 재생된다. 효모에서의 호흡은 각각의 생화학 교재에 기술된 바와 같이 상기 경로의 동물 범례와는 상이하다. 우선, S. 세레비지애 및 클루이베로마이세스 락티스와 같은 몇몇 효모는 호흡 사슬의 복합체 I이 결핍되어 있다. 이들 효모에서, NAD^+ 재생은 외부 및 내부 NADH 탈수소효소에 의한 미토콘드리아 내막을 통한 양성자 펌프 없이 수행된다. 음성적 크래브트리 효모, 진균 및 식물에서 발견되는 두번째 주요 차이점은 시토크롬 사슬의 복합체 III 및 IV와 병존하는 대안적 호흡 경로이다. 이러한 대안적 호흡은 미토콘드리아 내막을 통한 양성자 펌프 없이 유비퀴논으로부터 산소로 직접 전자를 이동시키는 소위 대안적 산화효소에 의해 매개된다.

[0007] 생합성 목적을 위한 NADPH는 펜토오스 포스페이트 경로 (PPP)의 산화 부분에서 생성된다. 이러한 경로에 의해 제공되는 기타 매우 중요한 대사물질은 핵산과 누클레오티드 보조인자의 합성 및 방향족 아미노산의 합성에서 각각 요구되는 리보오스 5-포스페이트 및 에리트로오스 4-포스페이트이다. 비-통상적 효모의 PPP와 관련된 유전자 및 이에 상응하는 효소에 관한 정보에는 여전히 많은 갭이 존재한다. 캔디다 유틸리스 (*Candida utilis*), S. 폼베 및 K. 락티스로부터 소수의 효소가 단리되었다. 구성적 및 동력학적 특성 규명은 상기 효소들 사이에 여러 차이점을 나타내었다. 정보 결핍으로 인해, 상기 효모의 PPP에서의 영향은 추정될 수 없으나, S. 세레비지애와는 대조적으로 예를들어 당화가 불충분한 K. 락티스의 포스포글루코오스 이소머라아제 돌연변이는 글루코

오스 배지에서 성장할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 관찰은 K. 락티스에서의 펜토오스 포스페이트 경로의 능력이 탄소원으로서 글루코오스에서 성장하기에 충분하다는 것을 나타낸다. 메탄올자화 효모에서, 추가의 트랜스케톨라아제 (디히드록시아세톤 합성효소)가 발견되었다. 이 효소는 퍼옥시좀에 위치하여 있고, 디히드록시아세톤 및 글리세랄데히드 3-포스페이트의 형성에 있어서 자일룰로오스 5-포스페이트와의 축합에 의해 세포 물질대사로의 포름알데히드의 동화를 부여한다.

[0008] 단세포 진핵생물 유기체로서 효모는 재조합 단백질 생성을 위한 매력적인 발현 시스템을 제공한다. 이들은 진핵세포 발현 시스템의 주요 이점, 즉 진핵세포 단백질 프로세싱과 함께 잘 발달된 유전학적 조작 기술, 간단하고, 안전하고, 따라서 저렴한 (대규모) 배양 기술과 같은 박테리아의 장점을 겸비한다. 상기 언급된 이유로 인해, 여러해 동안 상기 유기체에서 생성된 다수의 단백질 (예를들어, 인슐린, HBsAg, HSA)을 생성시키기 위한 상기 분야에서 S. 세레비지애가 우세하였다. S. 세레비지애는 과당화 (hyperglycosylation), 원형질막 주위공간에서의 분비 단백질의 유지, 플라스미드 불안정성 및 낮은 생산량으로 인해 다소의 한계를 나타낸다. 이러한 단일 유기체의 한계를 극복하기 위해, 이종유래 유전자 발현을 위한 숙주로서 작은 일련의 비-통상적 효모가 개발되었다. 특히, K. 락티스, Y. 리폴리티카 및 메탄올자화 효모인 캔디다 보이디니이 (*Candida boidinii*), H. 폴리모르파 및 P. 파스토리스가 사용되나, H. 폴리모르파 및 P. 파스토리스만이 많은 상업적 관심을 얻었다. 스키조사카로마이세스 폼베는 (1) 전사 개시 메커니즘이 보다 고등한 진핵생물의 메커니즘과 보다 유사하고, (2) 몇몇 포유동물 프로모터가 S. 폼베에서 기능적이고, (3) 스플리코솜 (splicosome)의 성분이 포유동물의 것과 유사한 것이 두드러지는 RNA 스플라이싱의 능력, (4) 포유동물 소포체 유지 신호 KDEL이 인지될 수 있고, (5) 당단백질에서 갈록토오스 잔기의 존재 및 (6) 단백질의 아세틸화 및 단백질지질화와 같은 몇몇 기타 전사후 변형이 효모 세포보다 포유동물에 더 유사한 방식으로 수행된다는 점에서, 상기 효모를 이종유래 단백질 생성을 위한 매우 매력적인 숙주로 만드는 보다 고등한 진핵생물에 근접한 몇몇 특성을 나타낸다. 상기 언급된 특징중 여러 특징은 구조 유전체학 및 기능 유전체학과 같이 진정한 이종유래 단백질의 생성 및 이의 고속처리 적용과 관련하여 가까운 미래에 재조합 단백질 생성에서 S. 폼베의 중요성을 증가시킬 것이다.

[0009] 모든 미생물은 환경에서 이용가능한 영양소의 최적의 이용을 위한 물질대사를 적응시키기 위한 메커니즘을 지닌다. 이러한 환경적 압박에 대한 신속하고 정확한 적응은 모든 유기체의 성장 및 기타 생리학적 파라미터를 제어하는 주요 인자이다. 효모는 대부분의 미생물과 같이 글루코오스가 바람직한 탄소원 및 에너지원이다. 따라서, 자연계에서 가장 풍부한 단당류인 글루코오스가 대개 유전자 발현의 조절 (오로지 전사 제어 수준에 대한 것만은 아님)에 의해 상기 유기체의 성장 및 발달에 영향을 미치는 세포에 대한 주요 메신저임이 놀라운 일은 아니다. 유전체 전사 분석은 다량의 유전자가 환경적으로 결정된 글루코오스 수준에 의해 조절됨을 나타낸다. 저친화성 글루코오스 전달체 및 해당효소 뿐만 아니라 리보솜 단백질을 엔코딩하는 유전자와 같이 글루코오스 이용에서 공지된 대사 기능을 지니는 유전자가 글루코오스에 의해 유도된다. 다른 한편으로, 글루코오스는 대안적 탄소원의 이용, 글루코오스신생합성, 글리옥실레이트 사이클, 퍼옥시좀 기능 및 호흡과 관련된 유전자를 포함하는 다수의 일련의 유전자를 억제한다. 호흡의 억제 (크래브트리 효과)는 사카로마이세스 세레비지애와 같은 소수의 효모종 (발효 효모, 양성적 크래브트리)에서만 발생하는 반면, 대부분의 효모종에서 글루코오스는 호흡을 억제하지 않는다 (음성적 크래브트리). 글루코오스 억제 기구에 대한 광범위한 지식이 주로 효모 사카로마이세스 세레비지애를 기초로 지난 20세기에 걸쳐 수득되었으나, 이의 실질적 메커니즘, 특히 글루코오스 감지 및 신호전달의 업스트림 부분은 완전히 이해되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 보다 나은 이해를 위해, S. 세레비지애에 대해 기술된 바와 같은 탄소 이화대사산물 억제의 소수의 주요 작용제를 하기에 간단히 기술하였다.

[0010] *SNF1*은 효모 세포에서 고분자량 복합체에서 발견될 수 있는 Ser/Thr 단백질 키나아제를 엔코딩한다. 이는 Snf1p의 조절 서브유닛에서의 인산화에 의해 야기된 복합체 내의 입체형태적 변화에 의해 조절된다. 지금까지 3개의 업스트림 키나아제 (Pak1p, Elm1p 및 Tos3p)가 Snf1p를 인산화하여 활성화시키는 것으로 확인되었다. 이의 활성은 글루코오스에 의해 억제되는 광범위한 유전자의 탈억제에 절대적으로 필요하다. 그러므로, Snf1p 또는 이의 동족체가 진핵생물에서 광범위하게 보존되어 있는 것이 놀라운 것은 아니다.

[0011] 아연 손가락 (zink finger) 단백질인 Mig1p는 글루코오스에 의해 억제된 광범위한 유전자의 프로모터 영역에 결합할 수 있다. 이는 필시 일반적인 억제인자 복합체인 Ssn6(Cyc8)-Tup1p을 보충함으로써 작용할 것이다. Mig1p의 기능은 단백질 키나아제 Snf1에 의해 제어되나, 직접적인 인산화에 대한 명백한 증거는 존재하지 않는다. Mig1p은 이의 비-인산화 형태로 핵에 위치한다. 글루코오스 고갈은 Mig1p의 인산화 후, 세포질로의 전위를 야기한다. 글루코오스가 세포로 첨가되는 경우, Mig1p는 신속하게 핵으로 다시 이동하고, 전사를 억제한다.

[0012] Adr1p는 또한 아연 손가락 단백질 일원에 속하고, 퍼옥시좀 단백질 및 글루코오스에 의해 억제되는 알코올 탈수

소효소 Ⅱ를 엔코딩하는 *ADH2* 유전자의 가효과체인 것으로 밝혀졌다. *ADR1* 발현은 높은 cAMP 수준에서 고리 AMP (cAMP) 의존 단백질 키나아제를 통해 글루코오스에 의해 하향조절된다. 주요 조절 효과는 mRNA 번역 수준에서 나타나지만, 전사에서의 조절 효과 뿐만 아니라 mRNA 안정성이 또한 분석되는 S. 세레비지애 균주에 따라 관찰된다.

[0013] 호흡 물질대사와 관련된 다수의 유전자를 포함하는 매우 다수의 유전자에 대해, 전사는 Hap2/3/4/5 복합체에 의해 비-발효성 탄소원에서 활성화된다. *CYC1* (이소-1-시토크롬 c를 엔코딩함) 및 *COX6* (시토크롬 c 산화효소 서브유닛 VI)과 같은 호흡과 관련된 소수의 유전자에 대해서, Snf1이 글루코오스에서의 성장 후의 탈억제에 필요한 것이 확립되었다. 탈억제에서의 Hap4p 또는 Snf1p의 직접적 관련이 밝혀지지 않았음에도 불구하고, *HAP4*의 전사는 글루코오스 존재시에 억제된다.

[0014] Gcr1p은 해당 유전자의 주요 전사 활성인자 단백질 (예를들어, 에놀라아제, 글리세랄데히드 3-포스페이트 탈수소효소)이다. 일반 전사 인자인 Rap1p와 함께 Gcr1p는 전사의 협동과 관련하여 해당 유전자 발현의 주요 항목으로, 이는 높은 수준의 발현에 절대적으로 필요하다. 다양한 탄소원에서 성장하는 야생형 및 S. 세레비지애 *gcr1* 돌연변이의 유전체 발현 패턴은 Gcr1p 의존 (Gcr1p dependent)과 같이 해당 유전자를 포함하여 53개의 열린 해독틀 (open reading frame, ORF)를 나타내었다.

[0015] 몇몇 전사 인자 및 Snf1p와 Mig1p 경로의 이러한 기술은 글루코오스 억제 네트워크에서 몇몇 작용제의 짧은 개관을 제공한다. 글루코오스 억제에 대해서 Snf1p-경로보다 많은 조절 사이클이 존재함을 인지해야 한다. 글루코오스 감지 및 신호전달에 대한 광범위한 지식이 지난 20세기에 달성되었으나, 글루코오스 신호의 특성은 무엇이고, 공지된 신호전달 경로가 어떻게 조절되고 통합되는 지와 같은 주요 의문점이 여전이 밝혀지지 않고 있다.

[0016] 제한된 수의 효모종이 단독 탄소원 및 에너지원으로서 메탄올에서 성장할 수 있다. 이들은 네개의 속 (genus)인 피키아, 한세눌라, 캔디다 및 토룰로프시스중 하나에 속하고, 탈억제 또는 메탄올을 이용한 유도 후에 발현되는 일반적인 메탄올 이용 경로를 공유한다 (참조 1.3.1). 이러한 경로의 최초 반응은 퍼옥시좀 내에서 구획화되고, 이러한 세포소기관이 또한 유도된다. 퍼옥시좀의 강한 유도로 인해, 효모 캔디다 보이디니이, 피키아 메타놀리카 (*Pichia methanolica*), 피키아 파스토리스 및 한세눌라 폴리모르파가 퍼옥시좀 생체발생 및 기능을 연구하기 위해 세포생물학에서 빈번하게 사용된다.

[0017] 상기 언급된 바와 같이, 메탄올자화 효모는 공통적인 메타올 이용 경로를 공유한다. 첫번째 단계는 알코올 산화효소 (AOX, EC 1.1.3.13)에 의해 촉매되는 메탄올의 포름알데히드 및 과산화수소로의 산화이다. 독성 H_2O_2는 카탈라아제의 작용에 의해 산소 및 물에 대해 무해화된다. 둘 모두의 효소는 퍼옥시좀에 격리되어 있다. 포름알데히드는 두개의 이후의 탈수소효소 반응에 의해 산화되거나 자일룰로오스 5-포스페이트 (Xu5P)와의 축합에 의해 세포 대사물질로 동화된다. 포름알데히드는 세포질에 위치한 글루타티온 (GSH) 의존 포름알데히드 탈수소효소 및 포르메이트 탈수소효소에 의해 포르메이트로 산화되고 추가로 이산화탄소로 산화된다. 둘 모두의 반응에 의해 성생된 NADH는 메탄올에서의 성장을 위한 에너지를 생성하기 위해 사용된다. 축합 반응은 퍼옥시좀 내에서 발생하고, 상기 언급된 트랜스케톨라아제 디히드록시아세톤 합성효소에 의해 촉매된다. 생성된 C3-화합물인 디히드록시아세톤 (DHA) 및 글리세랄데히드 3-포스페이트 (GAP)는 세포질에서 추가로 물질대사된다. DHA의 인산화 후, 프룩토오스 1,6-비스포스페이트 (FBP)가 디히드록시아세톤 포스페이트 (DHAP) 및 GAP의 알돌라아제 반응에 의해 형성된다. FBP는 포스파타아제에 의해 프룩토오스 6-포스페이트로 전환되고, 자일룰로오스 5-포스페이트 (Xu5P)는 펜토오스 포스페이트 경로에서 재생된다. 생성된 GAP의 3분의 1은 세포 성분 합성을 위해 글루코오스신생합성 경로로 진입한다.

[0018] 메탄올 이용 경로의 주요효소인 알코올 산화효소 및 포르메이트 탈수소효소는 메탄올을 이용한 유도 후에 매우 높은 수준으로 생성된다. 알코올 산화효소는 전체 가용성 단백질의 30% 이상을 차지할 수 있고, 디히드록시아세톤 합성효소 및 포르메이트 탈수소효소는 20% 이하를 차지할 수 있다. 또한 유도된 퍼옥시좀은 세포 부피의 약 80%를 차지할 수 있다. 여러 메탄올 이용 유전자의 프로모터 서열이 재조합 단백질 생성을 위해 개발되었다. 특히, 이러한 강력하고 유도성인 프로모터는 단백질 생성 숙주로서 피키아 파스토리스 및 한세눌라 폴리모르파를 광범위하게 이용하기 위한 주요 이유이다.

[0019] H. 폴르모르파 및 C. 보이디니이에서, 하나의 유전자가 알코올 산화효소를 엔코딩한다: *MOX* (메탄올 산화효소, H. 폴리모르파) 및 *AOD1* (알코올 산화효소, C. 보이디니이). 2개의 유전자가 두개의 피키아 종인 P. 파스토리스 (*AOX1* 및 *AOX2*) 및 P. 메타놀리카 (*AUG1* 및 *AUG2*, 알코올 이용 유전자, 또는 MOD1 및 MOD2)에서 발견되었고, Aox1p 및 Aug1p가 주요 알코올 산화효소이다. 코딩 영역의 비교는 메탄올자화 효모 사이의 아미노산 수준에서 73-85%의 유사성을 나타내었다 [1]. P. 파스토리스 *AOX1* 및 *AOX2* ORF (열린 해독틀) 사이의 상동

성은 누클레오티드 및 아미노산 서열 수준에서 각각 92% 및 97%였다 [2, 3]. 알코올 산화효소는 서브유닛당 하나의 비공유적으로 결합된 FAD 또는 변형된 유사체 (mFAD)를 함유하는 8개로 이루어진 플라보단백질이다. AOX 번역이 자유 리보솜에서 발생한 후, 퍼옥시좀으로의 전사후 유입이 발생한다. 퍼옥시좀으로의 전위는 이의 극단의 C-말단의 PTS1 (타입 1 퍼옥시좀 표적 서열) 서열에 의해 표적화된다. Aox 올리고머는 퍼옥시좀 기질로의 유입 후에 형성된다.

[0020] C. 보이디니이 및 P. 파스토리스에서, 퍼옥시좀 기질로의 전위 전에 세포질에서 이합체를 형성하는 디히드록시아세톤 합성효소와는 대조적으로 Aox 올리고머는 세포질에서 발견되지 않는다. 피키아 파스토리스의 알코올 산화효소 1 프로모터 서열 뿐만 아니라 상기 효소도 광범위한 기질 범위 (사슬 길이를 경감시키기에는 짧은 불포화 및 포화 일차 알코올) 및 다양한 반응 조건하에서의 높은 안정성으로 인해 생물공학적 관심 대상이다. 모든 알코올 산화효소 유전자의 조절은 전사 수준에서 발생하고, 대개 전사 개시 단계에서 발생하는 듯하다. *AOX1* 및 *AOX2*는 유사하게 조절되나 (mRNA는 글리세롤 또는 글루코오스 상에서 검출되지 않고, 탄소 고갈 단계에서 검출되고, 메탄올 상에서 많은 양이 검출된다), 이들의 5-플랭킹 (flanking) 영역은 유의한 상동성을 공유하지 않는다 [2, 4].

[0021] 각각의 AOX 유전자좌는 최초 전사 개시 부위에 대해 -43 위치에 추정적인 RNA 중합효소 결합 부위 (TATAAA; 골드베르그-호그네스 (Goldberg-Hogness) 또는 TATA box)를 나타낸다. 둘 모두의 P. 파스토리스 AOX mRNA 서열은 A 잔기가 극도로 풍부하고, 효모에 대해 유난히 길다 (AOX1에 대해 115 누클레오티드 (nt) 및 AOX2에 대해 160 nt). ATG 시작 코돈 주위의 전사 개시 영역 (코작 (Kozak) 서열; *AOX1*: CGAAACG ATG GCT, *AOX2*: GAGAAAA ATG GCC)은 S. 세레비지애 및 보다 고등한 진핵생물에 대해 이전에 기술된 공통 서열과 일치한다. P. 파스토리스 및 P. 메타놀리카에서 제 2의 알코올 산화효소 유전자의 생리학적 역할은 여전히 밝혀지 있지 않다. *AOX1* 또는 *AUG1*의 붕괴는 상기 균주 (소위 메탄올 이용 슬로우 (Mut^s) 표현형)에서 심한 성장 결함을 야기하는 반면, *aox2* 및 *aug2* 균주는 야생형 균주에 필적하는 성장 속도를 나타낸다. 2개의 유전자 생성물 Aug1p 및 Aug2p의 무작위 올리고머화를 나타내는 P. 메타놀리카에서 알코올 산화효소의 9개의 다형태가 발견되었다. *AUG1* 및 *AUG2*는 탄소 고갈 및 낮은 메탄올 농도에서 Aug1p 만이 검출되고, 증가하는 메탄올 농도에서 Aug1p에 대한 Aug2p의 비가 증가하는 바와 같이 차별적으로 조절된다. 상승된 Aug2p 함량을 지닌 8합체로의 전환은 전사 수준에서 조절되는 *AUG2* 발현의 증가에 기인된다. Aug1p 및 Aug2p의 두개의 동종 8합체의 메탄올에 대한 Km 값은 각각 약 0.56 및 5.6 mM이다. AUG1의 붕괴가 낮은 메탄올 농도에서 성장 결함을 야기한다는 발견 [5]과 함께, 상기 결과는 보다 높은 메탄올 농도에서 성장시 AUG2가 P. 메타놀리카에 유리하다는 것을 의미한다. 피키아 파스토리스에서, *AOX2* 유전자의 역할이 추가로 상세하게 분석되거나 제 2의 알코올 산화효소 유전자를 지니기 위한 바람직한 조건은 분석되지 않았다. 실험실 조건은 자유생활 미생물이 직면하는 조건의 매우 작은 단편만에 해당하므로, *AOX2* 유전자가 P. 파스토리스에 대해 선택적으로 중요한 사실상의 환경이어야 한다.

[0022] C. 보이디니이 *AOD1* 및 H. 폴리모르파 *MOX* 발현은 단일 탄소원으로서 글루코오스 또는 에탄올에서 성장 동안 엄격하게 억제되고, 글리세롤에서 탈억제되고, 메탄올에서 강하게 유도된다. 이들 두 효소의 발현은 또한 글루코오스 및 메탄올이 배지에 존재하는 경우에 억제된다. 글리세롤이 존재하는 경우, 메탄올은 유전자 발현을 유도할 수 있다. *AOD1* 및 *MOX*의 전사는 또한 탄소 고갈시에 탈억제되고, 에탄올이 존재하는 경우 억제된다 [6-9]. 두개의 별개의 조절 메커니즘이 에탄올 또는 글루코오스에 의한 메탄올 이용 물질대사의 억제를 책임진다 [10, 11]. 피키아 파스토리스에서, 상기 상황은 현저하게 상이하다: *AOX1*은 글루코오스, 에탄올 또는 글리세롤이 배지에 존재하는 경우 (비-성장 제한 농도) 억제된다. 탄소 고갈시의 탈억제 및 메탄올에 의한 유도는 *AOD1* 및 *MOX*에 대해 유사하다. *AOX1* 발현이 탈억제되는 탄소원은 예를들어 소르비톨, 만니톨, 트레할로오스 및 알라닌이다 [12].

[0023] 메탄올로부터 글루코오스 또는 에탄올과 같은 억제 탄소원으로의 전환후, 퍼옥시좀은 새로운 탄소원에 대한 적응 동안 수시간 이내에 분해된다. 효모 액포에서의 단백질 분해성의 분해는 글루코오스 또는 에탄올에 적응시 각각 미세자가포식 (microautophagy) 및 거대자가포식 (macroautophagy)으로 언급되는 두개의 별개의 메커니즘에 따른다.

[0024] 상기 언급된 바와 같이, 메탄올자화 효모인 피키아 파스토리스 및 한세눌라 폴리모르파는 재조합 단백질 생성에 널리 사용된다. 지금까지, 500개 이상의 단백질이 P. 파스토리스에서 제작되었다. 이들의 개발은, 1) 이들이 유전학적 조작 및 배양 기술 (실험실 규모 및 대규모)과 관련하여 효모의 일반적인 장점을 공유하고; 2) 극도로 높은 세포 밀도로 성장하는 능력; 및 3) 고수준의 재조합 단백질 (분비 단백질 또는 세포내 단백질)의 생성과 같은 약간의 특성에 의해 추진되었으며, 이는 이들을 재조합 발현 숙주중에서도 유리하게 만들었다. 메탄올 이

용 경로의 반응물을 엔코딩하는 유전자의 강한 유도성 프로모터가 재조합 단백질 생성을 위해 개발되었다. 가장 광범위하게 사용되는 것은 P. 파스토리스 및 H. 폴리모르파 각각의 알코올 산화효소 유전자 *AOX1* 및 *MOX*의 프로모터 영역이다. 그러나 또한 H. 폴리모르파 및 C. 보이디니이의 FMD (포르메이트 탈수소효소) 및 *DAS1* (디히드록시아세톤 합성효소) 프로모터 및 P. 파스토리스의 *FLD1* (포름알데히드 탈수소효소) 프로모터와 같은 메탄올 이용 경로 유전자의 기타 프로모터 영역이 재조합 단백질 생성을 유도하기 위해 사용된다. P. 파스토리스의 *FLD1*은 또한 탄소원으로서 글루코오스와 함께 단일 질소원으로서 메틸아민을 이용하여 유도될 수 있다. 외래 유전자의 구성적 발현을 위해 P. 파스토리스의 GAP (글리세랄데히드 3-포스페이트 탈수소효소) 프로모터 성분 및 H. 폴리모르파의 *PMA1* (원형질막 H+ -ATPase를 엔코딩함) 프로모터와 같은 프로모터가 또한 이용가능하다. 여러 영양요구 숙주 균주/마커 유전자-조합이 P. 파스토리스 (예를들어, *HIS4*) 및 H. 폴리모르파 (예를들어, *LEU2* 및 *URA3*)에 대해 개발되었다. 우세한 선택 마커가 또한 이용가능하다 (예를들어, 제오신 (Zeocin™), G418 내성). 메탄올자화 효모로의 유전자 통합은 주로 (다른 것을 제외시키는 것은 아님) 동종성 통합에 의해 이루어진다. ARS (자가복제서열) 영역을 지니는 벡터가 또한 이용가능하나, 이들은 이들의 한정된 기술적 적용을 야기시키는 선택압이 해제되는 경우 보통 매우 불안정하다. P. 파스토리스에서 외래 유전자는 *AOX1* 또는 *HIS4* 유전자좌에 부위 특이적으로 통합된다. 기타 가능한 통합 부위는 예를들어 GAP 유전자좌 (GAP 발현을 위한 것임) 또는 임의의 기타 선택 마커 유전자좌 (예를들어, *ADE1*, *URA3*, *ARG4* 및 *LEU2*)이다. H. 폴리모르파에서 발현 카세트는 높은 카피수 (100 이하)를 지니는 유사분열적으로 안정한 구성요소를 발생시키는 머리-꼬리 (head-to-tail) 배열로 무작위적으로 통합된다. 그러나, 높은 카피수는 종종 높은 수준의 발현을 발생시키지 않는다. 큰 영향을 지니는 추가의 요인은 통합 카세트의 구조, 발현되는 단백질의 특성 및 구조, 및 통합 부위이다. 특히, 통합 카세트 구조는 유전자량의 매우 큰 영향을 미친다. 발현 카세트 및 유전자량을 최적화시키는 방법에 관한 추가의 논의는 [13, 14]에 제공되어 있다. 메탄올자화 효모는 음성적 크래브트리 효모의 그룹에 속하고, 따라서 호기성 조건하에서 성장시 에탄올 생성이 매우 낮은 수준으로 발생한다. 이러한 사실로 인해 이들 효모는 높은 생산량을 발생시키는 발효기 배양으로 매우 높은 세포 밀도로 성장될 수 있다. *AOX1* 구동 단백질 생성은 생체반응기의 메탄올 농도가 성장-제한 구체인 경우 3-5배로 추가로 증가될 수 있다. 표준 조건하에서의 P. 파스토리스가 단지 적은 양의 내인성 단백질을 분비한다는 사실은 모든 분비되는 재조합 단백질을 배지에서 가장 풍부하게 만든다. 분비는 다운스트림 정제 과정에서 실질적으로 첫번째 단계로 작용할 수 있다. 단백질 분비를 위해, S. 세레비지애 MFα1 (메이팅 (mating) 인자 α) 프리프로 (prepro) 선도 서열 및 산 포스파타아제 (*PHO1*)로부터 유래된 서열이 P. 파스토리스 및 H. 폴리모르파에서 널리 사용된다. 몇몇 경우, 충분한 분비가 천연 분비 신호를 지니는 식물, 진균 및 포유동물 단백질을 이용하여 수득된다. 상기 언급된 바와 같이, 효모는 이황화결합 형성, 신호 서열의 프로세싱 (예를들어, MFα1의 프리프로 선도 서열), 지질 첨가 및 N-결합 및 O-결합 당화와 같은 번역후 변형을 수행할 수 있다. 포유동물 세포에서 다양한 당 (예를들어, N-아세틸글루코사민, 갈락토오스, 및 살리실산)으로 구성된 고도로 복잡한 N-결합 및 O-결합 올리고당-구조가 생성되는 반면, 대부분의 효모는 갈락토오스 또는 살리실산과 같은 몇몇 당 부분이 결핍된 높은 만노오스 유형 구조를 발생시킨다. 이들 비-포유동물 구조는 이들의 높은 잠재적 면역원성으로 인해 치료 적용시 심한 문제를 발생시킬 수 있다. S. 세레비지애와는 대조적으로 H. 폴리모르파 및 P. 파스토리스에서는 과만노오실화 (hypermannosylation)가 덜 풍부하고, 과면역원성 말단 α-1,3-결합 만노오스가 N-결합 올리고당에 통합되지 않는다. 면역원성의 문제 (및 혈류에서의 낮은 안정성과 같은 기타 몇몇 문제점)를 극복하기 위해, 특히 P. 파스토리스에서 최근의 논문에서 나타나는 바와 같이 효모 유래 올리고당 구조를 인간화시키는 방식이 노력되고 있다. 지금까지는, 주로 대부분의 연구 주제 및 상업적 방법은 널리 공지된 효모 S. 세레비지애에 의존하고 있다. 대규모의 발효 및 당화 문제와 관련한 명백한 장점과 함께 비-통상적 효모에 관한 지식의 증가로 인해, H. 폴리모르파 및 P. 파스토리스가 급속하게 선택 효모가 되고 있다. 이는 여러 생성 과정이 산업적으로 충족된다는 사실에 의해 강조된다.

[0025] WO 02/081650에는 *AOX1* 프로모터 영역의 확인이 기술되어 있고, 이는 돌연변이 *AOX1* 프로모터의 제작에 사용될 수 있다. 상기에 기술된 *AOX1* 프로모터의 결실된 서열 영역이 매우 길기 때문에, 프로모터의 명백한 조절 서열의 단일한 영향이 아닌 축적된 영향이 관찰될 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 매우 향상된 프로모터의 개발을 가능케 하지 않을 것이다. 특히, 본래의 프로모터의 부분을 결실시키거나 중복시킴으로써 향상된 특징을 가지는 신규한 프로모터를 제작하는 경우, 정확한 조절 서열 범위의 지식이 요구된다.

[0026] 본 발명의 목적은 단백질 생성에서 다운스트림 프로세싱을 촉진하고, 시간-장소(place)-수율을 증가시키고, 생산 품질을 높이는 것을 돕기 위해 향상된 특성을 지니는 개선된 *AOX1* 프로모터를 제공하는 것이다.

[0027] 또 다른 목적은 부분적 또는 완전한 글루코오스 억제를 예상하는 벡터 또는 숙주 균주에서 강한 *AOX1* 프로모터를 제공하는 것이다. 높은 글루코오스 농도의 존재하에서 강한 발현을 구동시키는 프로모터를 지니는 것이 유

리하다.

[0028] 본 발명의 추가 목적은 감소된 양의 메탄올을 이용하거나 메탄올을 이용하지 않고 단백질의 생성을 가능케 하는 *AOX1* 프로모터를 제공하는 것이다. 이러한 프로모터는 산업적 생산 과정에서 현저한 영향력을 지닐 것이다. 안정성 문제로 인해, 유도자로서 메탄올을 사용하는 생산 공장은 특별한 장비가 요구된다. 이는 다수의 덜 특수화된 생산 공장에서의 피키아 파스토리스 적용과 반대된다. 또한, 메탄올의 존재하에서 단백질 안정성은 단백질 발현의 메탄올 기재 유도를 방해할 수 있다. 이는 강한 산업적 단백질의 생성에는 덜 치명적이나, 예를들어 분비된 치료 단백질에 대해서는 중요한 문제가 된다.

[0029] 상기 프로모터의 제작은 어떻게든지 돌연변이화 되는 경우 발현 작용에서 영향을 나타내는 야생형 피키아 파스토리스 *AOX1* 프로모터의 특정 부분 (예를들어, 조절 성분, 전사 인자 결합 부위)의 지식을 필요로 한다. 따라서, 본 발명의 목적은 이러한 부분을 확인하고, 이에따라 향상된 특성을 지니는 *AOX1* 프로모터를 생성시키는 수단을 제공하는 것이다.

[0030] 따라서, 본 발명은, a) 전사 인자 결합 부위 (TFBS), b) Seq ID No. 1의 누클레오티드 170 내지 235 (-784 내지 -719), 누클레오티드 170 내지 191 (-784 내지 -763), 누클레오티드 192 내지 213 (-762 내지 -741), 누클레오티드 192 내지 210 (-762 내지 -744), 누클레오티드 207 내지 209 (-747 내지 -745), 누클레오티드 214 내지 235 (-740 내지 -719), 누클레오티드 304 내지 350 (-650 내지 -604), 누클레오티드 364 내지 393 (-590 내지 -561), 누클레오티드 434 내지 508 (-520 내지 -446), 누클레오티드 509 내지 551 (-445 내지 -403), 누클레오티드 552 내지 560 (-402 내지 -394), 누클레오티드 585 내지 617 (-369 내지 -337), 누클레오티드 621 내지 660 (-333 내지 -294), 누클레오티드 625 내지 683 (-329 내지 -271), 누클레오티드 736 내지 741 (-218 내지 -213), 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216), 누클레오티드 726 내지 755 (-228 내지 -199), 누클레오티드 784 내지 800 (-170 내지 -154) 또는 누클레오티드 823 내지 861 (-131 내지 -93), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 야생형 피키아 파스토리스 *AOX1* 프로모터 (SEQ ID No. 1)의 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터에 관한 것이다. 본 발명의 기술을 통한 괄호 내의 (마이너스) 수는 번역 시작 코돈 (예를들어, ATG)에 대한 프로모터의 해당 부위를 나타낸다. 예를들어, Nx**GACT**ATGNy를 포함하는 핵산 서열에서 "ATG"의 "A"는 위치 +1에 해당하고, "ATG"의 "A"에 앞선 "T"는 위치 -1에 해당한다.

[0031] 본 발명에 따르면, 돌연변이 *AOX1* 프로모터는 전사 인자 결합 부위 및/또는 상기 기재된 핵산 서열 범위중 하나에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특히, *AOX1* 프로모터의 상기 영역이 이의 특성을 변화시키기 위해 상기 프로모터를 변형시키기에 적합한 것으로 판명되었다. 물론, 또한 *AOX1* 프로모터의 특성을 향상시키기 위해 상기 기술된 돌연변이의 조합물이 도입될 수 있다 (예를들어, a)로부터 선택된 두개의 TFBS 돌연변이, a)로부터 선택된 하나의 TFBS 돌연변이 및 b)로부터 선택된 하나의 돌연변이, a)로부터 선택된 하나의 돌연변이 및 b)로부터 선택된 두개의 돌연변이). 예를들어, TFBS의 돌연변이는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216) 및/또는 누클레오티드 207 내지 209 (-747 내지 -745) 내의 돌연변이와 조합될 수 있다. 피키아 파스토리스의 *AOX1* 프로모터의 제어하에서의 단백질의 발현은 일반적으로 배지 내의 메탄올의 첨가에 의해 유도되고, 글루코오스의 존재에 의해 억제된다. 단백질 발현에 대한 상기 배지 첨가물의 영향을 향상시키거나 감소시키기 위해, 바람직하게는 프로모터는 상기 기술된 프로모터 영역 내에서 돌연변이화된다. 관심 단백질을 생성하기 위한 돌연변이된 *AOX1* 프로모터의 효능은 숙주의 염색체로 통합된 벡터의 양 (즉, 카피)에 따라 다양하다. 특히, 다중카피 균주는 향상된 프로모터 효과를 나타내는 것으로 판명되었다. 피키아 균주의 항생제 내성은 상기 숙주의 염색체로 통합된 항생제 내성 카세트 (숙주로 통합된 벡터는 바람직하게는 숙주가 선택 마커로 항생제를 포함하는 배지 상/중에서 성장가능하게 하는 항생제 내성 카세트를 포함함)의 수에 좌우되기 때문에, 선택압을 증가시키기 위해 선택 아가 플레이트 상의 항생제의 농도를 증가 (사용되는 항생제에 따라 10μg/ml 내지 10mg/ml, 바람직하게는 50μg/ml 내지 1000μg/ml의 범위내, 예를들어 제네티신 (geneticin): 0.1 내지 10mg/ml, 바람직하게는 0.2 내지 5mg/ml, 특히 0.25 내지 4mg/ml, 제오신: 10 내지 5000μg/ml, 바람직하게는 50 내지 3000μg/ml, 특히 100 내지 2000μg/ml)시킴으로써 다중카피 균주가 생성될 수 있다 (예를들어, [14]; 문헌[Scorer, C.A. et al. (1994) Bio/Technology 12:181-184]). 그러나, 다수의 항생제 내성 카세트를 지니는 세포의 성장은 항생제의 농도에 의존될 뿐만 아니라 시간 의존성인 것으로 밝혀졌다. 따라서, 다중카피 균주는 단일카피 균주보다 짧은 기간에 동일한 농도의 항생제를 함유하는 배지상에서 검출가능한 콜로니로 성장할 수 있다. 이러한 작용은 당업자가 단일카피 균주가 성장을 시작하기 전에 다중카피 균주를 검출하고, 단리시키는 것을 가능케 한다. 예를들어, 항생제 내성 카세트의 하나의 단일 카피를 지니는 균주는 72시간에 검출가능한 콜로니 크기로 아가 플레이트에서 성장하는 반면, 상기 카세트의 하나 이상의 카피를 지니는 동일한 균

주는 24 내지 48시간에 동일한 크기로 성장한다.

[0032] 특히, 누클레오티드 694 내지 723 (-260 내지 -231) 및 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216) 내에 돌연변이를 지니는 *AOX1* 프로모터를 지니는 다중카피 균주는 놀랍게 향상된 발현 속도를 나타내었다.

[0033] 메탄올의 존재하에서 숙주의 단백질 발현 효능을 증가시키기 위해, 바람직하게는 *AOX1* 프로모터 (Seq ID No. 1)의 누클레오티드 170 내지 235 (-784 내지 -719)가 돌연변이화된다. 이러한 영역의 돌연변이는 야생형 *AOX1* 프로모터에 비해 120 내지 130%로 단백질 발현을 증가시키나, 단, 돌연변이 *AOX1* 프로모터를 지니는 플라스미드는 숙주의 염색체/유전체로 단지 한번 통합된다 (단일 카피 돌연변이). 그러나, 상기 언급된 모든 기타 영역 내의 돌연변이는 단백질 발현을 유도하는 메탄올의 효능을 감소시키거나 영향을 주지 않는다. 이에 대조적으로, 야생형 *AOX1* 프로모터의 프로모터 영역 내의 돌연변이 (상기 기술된 바와 같음)는 돌연변이에 따라 탈억제 조건하에서 단백질 발현을 증가시키고 감소시킨다 (예를들어, 표 13, 실시예 1).

[0034] 그러나, 돌연변이된 *AOX1* 프로모터의 하나 이상의 카피를 지니는 재조합 균주는 탈억제 및 메탄올 유도 조건하에서 향상된 활성을 지니는 균주를 발생시킨다 (다중카피 균주, 예를들어 도 7, 실시예 2 참조). 상세하게는, Seq ID No. 1 (d6)의 누클레오티드 694 내지 723 내, Seq ID No. 1 (d6)의 누클레오티드 694 내지 723 (-260 내지 -231) 내, Seq ID No. 1 (d2d6)의 누클레오티드 694 내지 723 (-260 내지 -231) 및 누클레오티드 304 내지 350 (-650 내지 -604) 내, TFBS 내, 특히 Rap1, Gcr1, QA-1F, Hsf_1, Adr1, Hsf_2, Mat1MC, abaA 및 Hap2345 내에 돌연변이를 지니는 다중카피 균주는 야생형 *AOX1* 프로모터의 제어하의 단백질의 발현에 비해 탈억제 조건 및/또는 메탄올 유도하에서 증가된 발현을 나타낸다. 탈억제 조건하에서, 이들 다중카피 균주의 일부는 야생형 프로모터의 제어하에서의 발현에 비해 약 10배 증가된 단백질 발현을 나타낸다. 유도자로서 메탄올의 존재하에서, 발현 효능은 본 발명의 따른 프로모터가 사용되는 경우에 5배 이상으로 향상된다. 따라서, 특히 다중카피 형태로 숙주에 존재하는 경우 상기 돌연변이는 바람직하게는 단백질의 발현에 사용된다. 두개 이상의 상기 언급된 돌연변이의 조합은 프로모터 강도를 추가로 향상시킬 수 있다 (예를들어, 도 7, 실시예 2 참조).

[0035] 전사 인자 결합 부위는 실험적 (예를들어, 이동성 전환 (mobility shift) 또는 풋프린트 (footprint) 분석)으로 확인될 수 있거나, 공지된 전사 인자 결합 부위와의 서열 비교 (예를들어, 컴퓨터 분석, [15])에 의해 확인될 수 있다.

[0036] 상기 프로모터의 강도 및 특성에 영향을 미치는 프로모터 영역의 지식은 명백한 특성 (탈억제 조건하에서의 높은 단백질 발현 및/또는 메탄올의 존재하에서의 높은 단백질 발현)을 지니는 프로모터를 고안하기 위해 사용될 수 있다. 더욱이, 이들 특성은 이들 돌연변이 프로모터가 숙주의 유전체로 1회 이상 통합되는 경우 향상되거나 전환될 수 있다 (예를들어, 실시예 1 내지 3 참조).

[0037] 그러나, 몇몇 경우, 프로모터 활성은 증가하는 대신 감소되어야 한다. 특히, 키나아제, 포스포릴라아제 및 도움 단백질, 예를들어 샤페론, 단백질 이황화물 이소머라아제, 시스-트란스 이소머라아제, 폴다아제, 단백질 이황화물 이소머라아제 및 프로테아제와 같은 조절 단백질의 공동 발현이 많은 경우 야생형 프로모터 또는 본 발명에 따른 향상된 프로모터하에서 세포에 의해 생성될 수 있는 주요 생성물에 비해 낮은 것이 요구된다. 특히, 증가된 활성을 지닌 AOX1 프로모터 및 감소된 활성을 지닌 AOX1 프로모터 (야생형 활성에 비해서임) 각각의 제어하에서의 두개의 상이한 생성물 (예를들어, 도움 단백질 및 주요 생성물)의 조합된 발현이 유리한 것으로 판명되었는데, 이는 주요 생성물 및 이차 생성물의 발현 속도가 야생형 AOX1 프로모터를 사용하는 것보다 더욱 상이하기 때문이다. 감소된 활성은 바람직하게는 HSF 또는 HAP와 같은 활성인자 결합 부위를 결실시키거나 야생형 AOX1 프로모터로 억제인자 결합 부위를 삽입시킴으로써 획득될 수 있다. 그러므로, 감소된 활성을 지닌 AOX1 프로모터의 사용은 세포의 단백질 발현 기구의 과부하를 방지하고, 이는 주요 단백질의 수율이 감소되는 결과를 지니게 된다. 예를들어, 문헌[Bessette PH et al. (PNAS USA (1999) 96:13703-13708)]은 활성 폴리펩티드의 발현이 티오레독신의 공동발현에 의해 현저하게 증가될 수 있다는 것을 보여준다.

[0038] 한 바람직한 구체예에 따르면, 프로모터는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 694 내지 723 (-260 내지 -231) 및/또는 누클레오티드 729 내지 763 (-225 내지 -191) 내에 추가의 돌연변이를 포함한다.

[0039] 상기 기술된 돌연변이와 조합되어 상기 누클레오티드 범위에 영향을 미치는 돌연변이는 프로모터 활성을 더욱 향상되게 한다. 예를들어, Seq ID No. 1의 누클레오티드 694 내지 723 (-260 내지 -231) 및 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216)에 영향을 미치는 이중 돌연변이는 야생형 프로모터의 동일한 조건하에서의 발현 수준에 비해 탈보호 및 유도 조건하에서 보다 높은 발현 수준을 나타내는 프로모터를 발생시킨다. 이러한 이중

돌연변이의 효과는 상기 프로모터를 포함하는 핵산이 하나 이상의 카피로 세포로 도입되는 경우에 향상될 수 있다 (다중카피 클론을 야기시킴).

[0040] 돌연변이는 바람직하게는 결실, 치환, 삽입, 역위 및/또는 다중화 (multiplication)이다.

[0041] 피키아 파스토리스의 야생형 *AOX1* 프로모터의 특성을 변형시키기 위해, 여러 돌연변이 타입이 가능하다. 상기 언급된 영역 (전사 인자 결합 부위 (TFBS), Seq ID No. 1의 누클레오티드 170 내지 235 (-784 내지 -719), 170 내지 191 (-784 내지 -763), 192 내지 213 (-762 내지 -741), 192 내지 210 (-762 내지 -744), 207 내지 209 (-747 내지 -745), 214 내지 235 (-740 내지 -719), 304 내지 350 (-650 내지 -604), 364 내지 393 (-590 내지 -561), 434 내지 508 (-520 내지 -446), 509 내지 551 (-445 내지 -403), 552 내지 560 (-402 내지 -394), 585 내지 617 (-369 내지 -337), 621 내지 660 (-333 내지 -294), 625 내지 683 (-329 내지 -271), 694 내지 723 (-260 내지 -231), 729 내지 763 (-225 내지 -191), 736 내지 741 (-218 내지 -213), 737 내지 738 (-217 내지 -216), 726 내지 755 (-228 내지 -199), 784 내지 800 (-170 내지 -154) 또는 823 내지 861 (-131 내지 -93))을 포함하는 프로모터 스트레치 (stretch)가 부분적으로 또는 완전히 결실되거나, 부분적으로 또는 완전히 다른 누클레오티드 또는 핵산 서열로 치환되거나, 단일 누클레오티드 또는 핵산 서열의 삽입에 의해 붕괴되거나, 부분적으로 또는 완전히 역위되거나, 다중화될 수 있다. 이러한 모든 돌연변이는 프로모터 활성을 변화시키는데, 이는 구조적 특징 및/또는 예를들어 전사 인자에 대한 인지/결합 부위가 상기 돌연변이에 의해 영향을 받기 때문이다. 그러나, 이러한 변화는 야생형 프로모터에 비해 상기 프로모터의 활성을 증가시키거나 감소시킬 수 있다.

[0042] 특정 핵산 스트레치의 다중화/중복화는 프로모터 활성을 증가시킬 수 있다는 것이 종래 분야에 널리 공지되어 있다. 다수의 진핵생물 프로모터, 특히 효모 프로모터의 유전자 발현의 조절은 프로모터 내의 전사 인자 결합 사이의 다수의 상호작용을 포함한다. 가장 작은 시스-작용 성분의 기능화에 다수의 부위가 요구될 수 있다. 효모 세포에서, 업스트림 활성인자 서열 (UAS)가 전사에 필요하다. 이들은 TATA box 및 전사 시작 부위와 관련하여 배향 및 다양한 거리에서 작용하나, 보다 고등한 진핵생물의 인핸서와는 대조적으로, 이들은 상기 기본 요소로부터 업스트림에 존재하야 한다. UAS는 여러 전사 활성인자의 표적이다.

[0043] 효모 세포에서의 대부분의 억제 현상은 전사 인자의 비활성화 또는 부재로부터 발생한다. 그러나, 몇몇 음성 조절 부위 (업스트림 억제 서열 (UAS)가 또한 확인될 수 있다.

[0044] P. 파스토리스 *AOX1* 프로모터의 결실 분석에 기초하여, 두개의 음성 작용 영역 (URS1 및 URS2) 및 하나의 양성 작용 도메인 (UAS)인 세개의 조절 영역이 발견되었다 [3]. H. 폴리모르파 *MOX* 프로모터에 대해, 두개의 업스트림 활성화 서열 (UAS1 및 UAS2) 및 하나의 억제 결합 부위 (URS1)가 또한 기재되어 있다 [8]. 상응하는 서열이 또한 *AOX1* 프로모터 상에서 확인될 수 있다 (*AOX2* UAS [3] 뿐만 아니라 누클레오티드 622 내지 656 (-332 내지 -298) [8]에 대해 유사성을 나타내는 누클레오티드 585 내지 614 (-369 내지 -340) 및 725 내지 756 (-229 내지 -198). 상기 핵산 스트레치의 다중화 ((2, 3, 4, 5, 6 또는 7배의 UAS)는 더욱 더 강력한 단백질 발현을 야기하는 향상된 스트레치를 지니는 프로모터를 발생시킬 수 있다. 따라서, 다중 UAS를 포함하는 프로모터, 바람직하게는 *AOX2* 및 *MOX* UAS에 유사한 상기 언급된 서열 영역, 또는 기타 다중 서열 스트레치 (예를들어, 상기 기술된 핵산 서열 영역)를 포함하는 프로모터의 제작이 또한 본 발명의 범위에 해당하고, 바람직한 구체예로 간주된다. 활성화 서열은 보통 프로모터의 수백개의 염기쌍 내에 존재한다. 예를들어, 대부분의 활성화 서열은 향상되는 프로모터의 약 200 내지 400 염기쌍 내에 존재한다. 또한, 프로모터의 업스트림에 보통 추가의 인핸서 및 전사 인자 결합 부위를 함유한다.

[0045] AOX1 프로모터의 하나 이상의 돌연변이가 당업자에게 공지된 표준 방법에 의해 도입될 수 있다 (참고: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition), J. Sambrook and D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0046] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, 전사 인자 결합 부위 (TFBS)는 Hap1, Hsf, Hap234, abaA, Stre, Rap1, Adr1, Mat1MC, Gcr1 및 QA-1F로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0047] 하나 이상의 상기 TFBS의 돌연변이는 다양한 특성을 지니는 돌연변이 프로모터를 발생시킨다 (실시예 2 참조).

[0048] 바람직하게는, 전사 인자 결합 부위 (TFBS) Hap1은 Seq ID No. 1의 누클레오티드 54 (-900) 내지 58 (-896)을 포함하고, Hsf는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 142 (-812) 내지 149 (-805) 및 517 (-437) 내지 524 (-430)를 포함하고, Hap234는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 196 (-758) 내지 200 (-754), 206 (-748) 내지 210 (-744) 및 668 (-286) 내지 672 (-282)를 포함하고, abaA는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 219 (-735) 내지 224 (-

730)를 포함하고, Stre는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 281 (-673) 내지 285 (-669)를 포함하고, Rap1는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 335 (-619) 내지 339 (-615)를 포함하고, Adr1는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 371 (-583) 내지 377 (-577)을 포함하고, Mat1MC는 Seq ID No. 1의 누클레오티드 683 (-271) 내지 687 (-267)을 포함하고, Gcr1은 Seq ID No. 1의 누클레오티드 702 (-252) 내지 706 (-248)을 포함하고, QA-1F은 Seq ID No. 1의 누클레오티드 747 (-207) 내지 761 (-193)을 포함한다.

[0049] 이들 TFBS는 실험적으로 확인될 수 있거나, 컴퓨터 프로그램 (예를들어 실시예 1 참조)의 도움으로 기타 프로모터 (예를들어, 진핵생물의 프로모터)의 공지된 TFBS와 비교함으로써 확인될 수 있다.

[0050] 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현에 대한 돌연변이 AOX1 프로모터의 영향의 요약은 표 2 (야생형 활성과 비교함)에 제공된다.

[0051] 표 2: 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현에 대한 야생형 AOX1 프로모터의 돌연변이의 영향

돌연변이	단일카피 클론		다중카피 클론	
	탈억제 조건[1]	메탄올 유도 조건[1]	탈억제 조건[1]	메탄올 유도 조건[1]
ΔHap1		+		
ΔHsf_1	-	+	+	+
Δ1	+	+		
ΔHap2345_1		+		+
ΔHap2345_2	-	+		+
ΔabaA	-		+	+
ΔStre	+	+		
Δ2		-		
ΔRap1	-		+	+
Δ3	-	-		
ΔAdr1	-	-	+	+
Δ4	-	-		
ΔHsf_2				
Δ5	-	-		
ΔHap2345_3			+	+
ΔMat1MC				
Δ6	+	+	+	+
Δ6*	+	-	+	+
ΔGcr1	-	+	+	+
Δ7	-	-		
ΔQA-1F	+		+	+
ΔQA-1Fzus	+	-		
Δ Hsf_2_dHap 2345_1		+	+	+
Δ Hsf_2_dHap 2345_1zus		+		

[0052]

돌연변이	단일카피 클론		다중카피 클론	
	탈억제 조건[1]	메탄올 유도 조건[1]	탈억제 조건[1]	메탄올 유도 조건[1]
ΔHsf_2_Mat1MC	-		+	+
Δ8	-	-		
Δ9	-	-		
Δ2Δ6		-	+	+
Δ736-41		-		
Δ737-38				
ΔInD-d4m				
ΔD-d4				
Δ1-1				
Δ1-2				
Δ1-3				
Δ1-SacI				

[0053]

[0054] [1] 야생형 AOX1 프로모터와 비교한 발현 속도: - 감소, + 증가.

[0055] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (AOX1) 프로모터 및 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 핵산을 포함하는 핵산 분자에 관한 것으로, 상기 프로모터 및 핵산은 함께 작동 가능하게 연결된다.

[0056] 돌연변이 *AOX1* 프로모터는 단백질 (예를들어, 효소), 펩티드 (예를들어, 호르몬) 또는 기능성 핵산 (예를들어, siRNA)를 엔코딩하는 유전자에 연결될 수 있다. 생성된 핵산 단편은 유기체, 바람직하게는 효모, 특히 피키아 파스토리스 균주에 도입되는 경우 예를들어 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 핵산 분자의 제작은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 표준 분자생물학 방법으로 수행될 수 있다 (예를들어, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition), J. Sambrook and D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press; manual "Pichia Expression Kit", Invitrogen Corp.).

[0057] "작동가능하게 연결된"은 첫번째 서열(들)이 두번째 서열(들)에 충분히 근접하게 위치하여, 첫번째 서열(들)이 두번째 서열(들) 또는 두번째 서열의 제어하의 영역에 걸쳐 영향을 미칠 수 있는 것을 의미한다. 예를들어, 프로모터는 유전자에 작동가능하게 연결될 수 있어, 상기 유전자는 상기 프로모터의 제어하에서 발현될 것이고, 이는 통상적으로 유전자에 대해 5' 위치일 것이다. 보통, 코어 프로모터는 번역 시작 부위로부터 수백개의 염기쌍 내에 존재할 것이다. 약 30 bp 다운스트림에 다운스트림 프로모터 성분이 존재한다.

[0058] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (*AOX1*) 프로모터 또는 상기 기술된 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0059] 숙주, 바람직하게는 메탄올자화 효모 균주 (예를들어, 피키아 파스토리스 균주)로, 임의로 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 돌연변이 프로모터를 도입시키기 위해, 상기 프로모터는 상기 숙주의 형질전환을 위해 사용될 수 있는 벡터로 제공되어야 한다. 예를들어, 상기 벡터는 효모 에피솜 플라스미드 (YEp), 효모 통합 플라스미드 (YIp) 또는 효모 인공 염색체 일 수 있다. 이러한 벡터는 보통 복제 기점 (미생물 숙주에서의 증폭이 필요한 경우) 및 대장균 (E. coli)에서의 벡터의 증식을 위한 선택 마커, 효모에서의 재조합 단백질 발현을 위한 프로모터 및 종결자 및 효모용의 선택 마커를 포함한다. 비통합 벡터는 세포내에서의 벡터의 안정성을 보장하는 자동 복제 서열 (ARS)를 추가로 포함한다 (참고: Myers, A. M., et al. (1986) Gene 45: 299-310). AR 서열을 지니지 않은 통합 벡터는 유전체의 영역과 상동성인 서열 영역을 포함한다. 대안적으로, 예를들어 PCR로부터 유래된 선형 DNA가 형질전환에 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기술된 하나 이상의 돌연변이 피키아 파스토리스 알코올 산화효소 1 (*AOX1*) 프로모터, 하나 이상의 핵산 단편 또는 하나 이상의 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 돌연변이 *AOX1* 프로모터를 지니는 핵산 분자 (예를들어, 프로모터가 단백질을 엔코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 벡터)의 숙주로의 도입은 예를들어 전기천공에 의해 수행될 수 있다. 상기 핵산 분자는 단일 카피 또는 다중 카피로 이의 숙주로의 도입 후에 염색체로 통합되거나 단일 카피 또는 다중 카피 자동 복제 플라스미드로서 세포 내에 존재

한다. 여러 돌연변이 프로모터가 사용되는 경우, 이들은 모두 하나의 단일 유전자 (단백질 또는 기능성 핵산 (예를들어, 리보자임, 안티센스 RNA 등)을 코딩함), 동일한 단백질 또는 상이한 단백질 (예를들어, 1개의 프로모터 변이체가 선택 마커로 연결되고, 또 다른 돌연변이 프로모터가 발현되어야 하는 또 다른 단백질에 연결됨)과 함께 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위 내에서, 바람직하게는 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 AOX1 프로모터의 하나의 카피를 포함하는 단일카피 균주 뿐만 아니라 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 AOX1 프로모터의 하나 이상, 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20 카피 이상을 포함하는 다중카피 균주가 생성된다.

[0061] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, 상기 세포는 진핵생물 세포, 특히 효모 세포, 바람직하게는 메탄올자화 효모 세포이다.

[0062] 바람직하게는, 메탄올자화 효모 세포는 캔디다, 한세눌라, 피키아 및 토루플로시스, 특히 피키아 파스토리스 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0063] *AOX1* 프로모터 뿐만 아니라 이로부터의 돌연변이된 변이체는 메탄올자화 (예를들어, 피키아 파스토리스) 및 비-메탄올자화 (예를들어, 사카로마이세스 세레비지애) 세포를 포함하는 매우 다수의 상이한 효모 세포가 기능적으로 도입될 수 있다. 기타 유기체에 대한 프로모터, 특히 *AOX1* 및 *MOX* 프로모터의 전이성은 당업자에게 공지되어 있다. 기질 특이성 및 몇몇 조절 특성은 여러 효모 (예를들어, 피키아 파스토리스, 한세눌라 폴리모르파 및 사카로마이세스 세레비지애)에서 다양하나, 외래 프로모터의 인식은 입증되었다 (참고: Raschke, W.C, et al., Gene, 1996. 177:163-7; Pereira, G.G. and C.P. Hollenberg, Eur J Biochem, 1996. 238:181-91). 예를들어, H. 폴리모르파 *MOX* 프로모터가 S. 세레비지애에서 인지되고, 글루코오스의 존재하에서 억제되고, 탄소원 제한하에서 탈억제된다. 유사하게, *AOX1* 프로모터가 H. 폴리모르파에서 사용될 수 있고, 이는 *MOX* 프로모터와 동일한 방식으로 조절된다. AOX1 프로모터와 밀접하게 관련된 *ZZA1* 프로모터가 또한 S. 세레비지애에서 성공적으로 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태는, i) 상기 기술된 벡터, 및 ii) 본 발명에 따른 프로모터의 제어하에서 상기 단백질 또는 기능성 RNA를 발현할 수 있는 세포를 포함하는, 선택 단백질의 발현 또는 기능성 RNA로의 전사를 위한 키트에 관한 것이다.

[0065] 본 발명에 따른 벡터가 선택 단백질의 발현 또는 기능성 RNA (예를들어, 리보자임, 안티센스 RNA, RNAi)의 전사를 위한 키트에서 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, 상기 세포는 효모 세포, 바람직하게는 메탄올자화 효모 세포이다.

[0067] 바람직하게는, 메탄올자화 효모 세포는 캔디다, 한세눌라, 피키아 및 토루플로시스, 특히 피키아 파스토리스 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0068] 본 발명의 또 다른 양태는,

[0069] - 본 발명에 따른 AOX1 프로모터, 및 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 엔코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 핵산 분자를 제공하는 단계로서, 상기 프로모터가 상기 핵산 분자에 작동가능하게 연결되는 단계,

[0070] - 상기 벡터 및 상기 핵산 분자로 세포를 형질전환시키는 단계,

[0071] - 상기 형질전환된 세포를 적절한 배지에서 배양하는 단계,

[0072] - 임의로, 상기 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현을 유도하는 단계, 및

[0073] - 상기 발현된 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 단리시키는 단계를 포함하여, 세포 내에서 재조합 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산을 발현시키는 방법에 관한 것이다.

[0074] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, 상기 세포는 효모 세포, 바람직하게는 메탄올자화 효모 세포이다.

[0075] 바람직하게는, 메탄올자화 세포는 캔디다, 한세눌라, 피키아 및 토루플로시시스로 구성된 군으로부터 선택되고, 특히 피키아 파스토리스 세포이다. 본 발명의 또 다른 양태는 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현을 위한 본 발명에 따른 핵산 분자, 벡터 또는 세포의 용도에 관한 것이다.

[0076] 본 발명에 따른 핵산 분자, 벡터 또는 세포가 단백질, 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현에 사용되는 경우, 발현을 위한 필요조건 (예를들어, 탈억제 조건 (배지로의 글루코오스의 첨가가 없음) 또는 메탄올 유도 조건하에서의 높거나 구성적인 발현)을 이행하는 적절한 AOX1 프로모터를 선택하는 것이 유리하다. 적절한 돌연변이 AOX1

프로모터가 표 2의 도움으로 선택될 수 있다.

[0077] 본 발명의 또 다른 양태는,

[0078] a) 단백질을 엔코딩하는 핵산 또는 기능성 핵산 및 마커 내성 유전자에 작동가능하게 연결된, 돌연변이된 메탄올 유도 프로모터, 바람직하게는 AOX1 프로모터를 포함하는 핵산 분자 또는 벡터를 세포에 도입시키는 단계,

[0079] b) 단계 a)의 세포를 적절한 선택 마커, 비-억제 탄소원 및 과발현 클론의 선택적 성장을 위한 메탄올을 포함하는 유도 조건 하의 배지, 또는 적절한 선택 마커 및 비-억제 탄소원을 포함하나 과발현 클론의 선택적 성장을 위한 메탄올을 포함하지 않는 탈억제 조건 하의 배지로 이동시키는 단계,

[0080] c) 상기 배지 상에서 단계 b)로부터의 세포를 인큐베이션시키는 단계,

[0081] d) 단계 c)로부터 수득된 세포의 콜로니를 단리시키는 단계, 및

[0082] e) 상기 세포의 발현 속도를 결정함으로써 과발현 클론을 검출하는 단계를 포함하여, 과 발현 클론을 단리시키는 방법에 관한 것이다.

[0083] 돌연변이된 메탄올 유도성 프로모터를 포함하는 벡터 또는 핵산을 지니는 과발현 또는 고발현 클론의 제작은 당업자가 상기 클론을 단리하는 것을 가능케 하는 방법을 필요로 한다. 이러한 방법은 본원에 제공된다. 상기 방법의 첫번째 단계는 프로모터를 포함하는 핵산 (예를들어, 벡터)을 이러한 프로모터를 조절하는 것이 가능한 적절한 세포로 도입시키는 것이다. 프로모터 그 자체가 유전 공학 또는 화학적 (예를들어, 비설파이트, 니트라이트, 푸마르산, 히드라진) 또는 물리적 (예를들어, 방사선, 특히 UV 방사선) 돌연변이유발에 의해 돌연변이화될 수 있다. 한 추가 단계에서, 상기 돌연변이된 프로모터를 지니는 세포는 배지, 바람직하게는 고형 배지로 직접 이동되거나, 고발현 클론의 성장을 위한 항생제 (예를들어, 제오신) 및 소르비톨 (또는 예를들어 [12]에 기술된 또 다른 비-억제 탄소원, 특히 알라닌, 만니톨 또는 트레할로오스)를 포함하는 액체 배지 및 유도 조건 하에서 고 발현 클론이 밝혀져야 하는 경우 이에 메탄올을 추가로 포함하는 액체 배지를 통해 이동된다. 글루코오스를 메탄올과 함께 배지에 포함시킴으로써, 글루코오스 비-억제되고 메탄올 유도된 형질전환주가 단리될 수 있다 (메탄올 휘발을 방지하기 위해, 배지는 인큐베이션 동안 메탄올 포화되거나 메탄올을 포함하는 환경에 보관될 수 있음). 적절한 배지 중 또는 배지 상에서 세포의 배양 후, 상기 세포는 상기 배지로부터 단리되고, 추가의 분석 (예를들어, 정확한 발현 속도의 결정, 야생형 프로모터에 비한 프로모터의 핵산 서열에서의 변화를 분석하기 위한 프로모터의 단리)에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법에 사용되고, 예를들어 [12]에 기술되어 있는 비-억제 탄소원은 0.1 내지 10%의 양, 바람직하게는 0.2 내지 5%의 양, 더욱 바람직하게는 0.3 내지 3%의 양, 특히 0.5 내지 1%의 양으로 사용된다. 바람직한 비-억제 탄소원은 알라닌, 만니톨, 소르비톨, 트레할로오스, 락토오스 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0084] 적절한 마커 내성 유전자의 선택은 형질전환주를 선택하기 위해 사용되는 마커에 따른다. 예를들어, 제오신이 마커로 사용되는 경우, 돌연변이 AOX1 프로모터의 제어하에서 벡터로 도입되는 마커 내성 유전자는 Sh ble 유전자이다. 핵산이 단백질 또는 펩티드를 엔코딩하는 경우, 생성된 단백질/발현된 단백질은 융합 단백질일 수 있다. 돌연변이 AOX1 프로모터의 제어하의 마커 내성 유전자를 제공하는 것이 특히 이로운데, 이는 이러한 경우 마커 내성 유전자 생성물의 발현 속도가 또한 돌연변이된 프로모터의 프로모터 강도 및 작용에 좌우되기 때문이다. 예를들어, 핵산 생성물의 높은 발현을 책임지는 강한 프로모터는 또한 마커 내성 유전자 생성물의 발현 속도를 증가시킬 것이다. 이러한 클론은 감소된 프로모터 강도를 나타내는 프로모터를 지닌 클론에 비해 선택적인 장점을 지닌다. 이는 세포의 형질전환으로부터의 재생 후에 직접적인 과 발현 클론의 선택을 가능케 한다.

[0085] 발현 속도는 바람직하게는 젤 전기영동 (예를들어, SDS-PAGE), 항체 결합 (예를들어, ELISA), 정량 (역전사효소) PCR (예를들어, 실시간 RT-PCR), 효소 활성 (예를들어, 발현 단백질이 효소인 경우) 또는 형광 (녹색 형광 단백질과 같은 특징적인 방출 스펙트럼을 지니는 단백질)과 같은 방법에 의해 결정된다.

[0086] 다른 억제 탄소원 (AOX1 프로모터의 경우 글루코오스)의 부재하에서 증가된 발현을 나타내는 프로모터 (형질전환주)는 비-억제 탄소원을 함유하는 배지 중/배지 상에서의 형질전환된 세포의 선택적 성장에 의해 선택된다. 유도자 (예를들어, 메탄올)의 존재하의 다른 억제 탄소원 (AOX1 프로모터의 경우 글루코오스)의 부재하에서 증가된 발현을 나타내는 프로모터 (형질전환주)는 비-억제 탄소원 및 유도자 (예를들어, 메탄올)을 함유하는 배지 중/배지 상에서 형질전환된 세포의 선택적 성장에 의해 선택된다. 유도자는 또한 비-억제 탄소원일 수 있다. 과발현 클론은 항생제 (예를들어, 제오신)에 대한 높은 내성 또는 필수 배지 성분 (예를들어, Leu, His, Arg, Ura)의 보다 높은 생산성을 발생시키는 다중카피와 상기 기술된 조절 선택을 조합시킴으로써 선택된다.

[0087] 본 발명에 따른 방법에 사용되는 배지 조성물은 피키아 파스토리스와 관련된 키트 (예를들어, Invitrogen), 세포 및 벡터로부터 제조업체 또는 판매자로부터 직접적으로 입수할 수 있다. 배지 중의 메탄올 농도는 바람직하게는 0.05 내지 15%, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 10%, 특히 0.3 내지 5%일 수 있다. 과학 문헌에서, 다양한 배양 조건에 대한 다양한 메탄올 농도가 기술되어 있다. 예를들어, 진탕 플라스크는 1% 이하의 메탄올을 함유할 수 있고 (Guarna MM, et al. (1997) Biotech. Bioeng. 56:279-286), 발효 방법은 0.5% 메탄올을 함유할 수 있다 (Damasceno LM, et al. (2004) Protein Expr Purif 37:18-26; Hellwig S., et al. (2001) Biotechnol Bioeng 74:344-352; Hellwig S., et al. (1999) Biotechnol Appl Biochem 30:267-275).

[0088] 다중카피 클론의 향상된 발현은 세포내에서의 돌연변이된 프로모터의 하나 이상의 카피의 존재에 좌우될 뿐만 아니라, 여러 전사 인자가 상기 세포 내의 많은 수의 전사 인자 결합 부위에 결합될 수 있기 때문에 상기 전사 인자가 존재하지 않는다는 사실에 기인될 수 있다. 이는 메탄올 유도 조건하에서의 발현 속도와 탈억제 조건하에서의 발현 속도에 비교에 의해 나타낼 수 있고, 여기서 향상된 발현 속도가 세포 내에서의 돌연변이된 AOX1 프로모터의 카피수의 영향 만이 아니라는 것이 발견될 수 있다 (선형 효과는 아님). 예를들어, 균주 d6*F10은 상기 특성을 나타낸다.

[0089] 과발현 클론을 단리하기 위해 사용된 배지는 루신, 우라실, 아르기닌, 히스티딘 및/또는 아데닌과 같은 추가의 배지 성분을 포함할 수 있고, 야생형 프로모터 변이체에 비해 글루코오스의 존재하에서 감소된 억제를 나타내는 프로모터 변이체를 확인하기 위해 소르비톨은 글루코오스로 교체될 수 있다.

[0090] 영양요구 균주가 사용되는 경우, 세포는 영양요구 마커를 사용하는 탈억제 조건하에서의 과 발현 클론의 선택적 성장을 위해 소르비톨 (또는 기타 비-억제 탄소원)을 포함하고, 개별적 배지 성분 (예를들어, 루신, 우라실, 아르기닌, 히스티딘 및 아데닌)을 함유하는 배지로 이동될 수 있다 (단계 b).

[0091] AOX1 프로모터 포함 벡터에서 통상적으로 사용되는 P(TEF)-Zeo 내성 마커는 제오신 내성 단백질의 구성적 발현을 일으키고, 따라서 보다 높은 농도의 항생제에 대한 내성에 의해 다중카피 클론의 단리를 가능케 한다. 기술된 신규한 방법은 특정 제어가능한 조절 환경하에서 보다 높은 발현을 일으키는 프로모터 및 다중카피 클론을 검출하기 위해 상기 효과와 조절 특성을 조합시키는 것을 가능케 한다. 이는 변환된 조절 특성을 지니는 신규한 프로모터 및 다중카피 클론이 상기 특정 조절 조건하에서 향상된 발현을 일으키는 클론을 검출하는 것을 가능케 한다.

[0092] "과 발현 클론"은 야생형 프로모터의 제어하 보다 돌연변이된 프로모터의 제어하에서 보다 많은 단백질 또는 기능성 핵산을 발현하는 발현 벡터, 또는 P(TEF)-Zeo와 같은 보통 사용되는 프로모터-선택 마커 조합을 지닌 벡터를 적용시키는 것 보다 많은 단백질 또는 기능성 핵산을 발현하는 발현 벡터이다. 본 발명에 따른 "과 발현 클론"의 발현 속도는 야생형 프로모터의 제어하에서 동일한 단백질 또는 펩티드 또는 기능성 핵산의 발현 속도에 비해 20% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 더욱 바람직하게는 100% 이상, 특히 500% 이상 증가될 수 있다 (평균값 + 2 내지 3배의 표준 편차). "과 발현 클론"은 바람직하게는 본 발명에 따른 돌연변이된 프로모터 또는 핵산 분자의 하나 이상의 카피를 포함할 수 있다. 대안적으로, "과 발현 클론"은 또한 "고 발현 클론"으로 명명될 수 있다.

[0093] 본 발명에 따른 "메탄올 유도 프로모터"는 프로모터의 활성이 배지 내의 메탄올의 존재하에서 조절되는 프로모터이다. 이러한 프로모터는 바람직하게는 *AOX1* (피키아 파스토리스 유래) 또는 *MOX* (한세눌라 폴리모르파로부터 유래) 프로모터 또는 메탄올자화 효모로부터 유래된 임의의 기타 메탄올 유도 프로모터 및 글루코오스 억제 프로모터, 예를들어 FMD, FLD, DAS이다 (예를들어, 표 6, 실시예 1 참조).

[0094] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, 선택 마커는 항생제, 바람직하게는 제오신이다.

[0095] 배지 내에서 사용되는 선택 마커는 돌연변이되거나 야생형인 메탄올 유도 프로모터를 포함하는 핵산 또는 벡터를 지니는 세포를 상기 핵산 또는 벡터를 지니지 않는 세포와 구별하기 위해 세포의 분자 특성이 이용될 수 있다는 사실에 따른다. 따라서, 선택 마커는 항생제일 수 있다 (항생제 내성을 위한 유전자는 상기 세포에 도입된 벡터 또는 핵산에서 발견될 수 있음). 특정 균주의 영양요구성을 보충하기 위해, 배지 내의 선택 마커는 영양요구성의 유형에 따라 루신, 우라실, 아르기닌, 히스티딘 및 아데닌과 같은 물질일 수 있다.

[0096] 바람직하게는, 핵산 분자, 벡터 및 세포는 본 발명에 따른 핵산, 벡터 및 세포이다.

[0097] 본 발명의 한 바람직한 구체예에 따르면, 핵산 분자 또는 벡터는 당업자에게 공지된 표준 방법, 바람직하게는 전기천공, 화학적 형질전환, 원형질 융합에 의한 형질전환, 또는 입자 봄바르드먼트 (bombardment)에 의해 세포

내로 도입된다 (참조: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Edited by: Fred M. Ausubel et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) , J. Sambrook and D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0098] 본 발명은 하기 도면 및 실시예에 의해 추가로 예시되며, 본 발명은 이에 제한되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0099] 도 1은 메탄올 유도 전(A) 및 유도 후 24 시간(B) 및 72 시간(C)에서 GFP-Zeo 발현 P. 파스토리스 균주의 미세규모의 SDS-PAGE를 도시한다. 샘플을 실시예 1 h)에서 기재된 바와 같이 제조하였다. 레인 1은 X-33 (음성대조군)이고, 레인 2-4는 X-33 GFP-Zeo 균주 Mut^{s} A9, D2 및 E2이고, 레인 5는 X-33 d6*F10이다. 42 kDa에서의 강한 밴드는 모든 GFP-Zeo 클론에 존재한다.

도 2는 *AOX1* 프로모터 영역 및 몇몇 전사 인자 결합 부위 내의 서열 결실의 개략도이다. 영역 델타-9를 중첩 신장 PCR에 의해 제거하였다.

도 3은 탈억제 (탄소 고갈) 후 미세규모의 *AOX1* 프로모터 변이체의 형광 강도의 막대 차트를 도시한다. 세포를 미세규모로 1% 글루코오스 상에서 성장시켰다. 상기 데이타는 4 번의 독립적 측정으로부터의 평균 ± SD를 나타낸다. RFU는 상대적 형광 단위이며; WT는 야생형 *AOX1* 프로모터의 제어하의 GFP-Zeo를 지니는 P. 파스토리스 균주 GFP-Zeo D2이고; D1-D9는 GFP-Zeo 유전자의 앞쪽에 결실 작제물 *AOX1* Δ1-Δ9를 지진 P. 파스토리스 균주이며; EM는 방출 파장이다.

도 4는 메탄올 유도 후 미세규모의 *AOX1* 프로모터 변이체의 형광 강도의 막대 차트를 도시한다. 세포는 미세규모로 1% 글루코오스 상에서 성장시켰다. 상기 데이타는 4 번의 독립된 측정으로부터의 평균 ± SD를 나타낸다. RFU는 상대적 형광 단위이며; WT는 야생형 *AOX1* 프로모터의 제어하의 GFP-Zeo를 지니는 P. 파스토리스 균주 GFP-Zeo D2이고; D1-D9는 GFP-Zeo 유전자의 앞쪽에 결실 작제물 *AOX1* Δ1-Δ9를 지닌 P. 파스토리스 균주이며; EX는 여기 파장이고; EM는 방출 파장이다.

도 5는 미세규모의 선택 *AOX1* 프로모터 변이체의 형광 강도의 막대 차트를 도시한다. 야생형 및 Δ6 프로모터 변이체를 지닌 단일카피 균주 및 다중카피 균주의 탈억제 조건 뿐만 아니라 유도 조건 하에서의 발현 수준을 나타낸다. 상기 데이타는 4 번의 독립된 측정으로부터의 평균 ± SD를 나타낸다. WT는 야생형 *AOX1* 프로모터를 가진 단일 카피 GFP-Zeo 균주 (GFP-Zeo D2)이고; D6는 단일 카피 AOX1Δ6* 클론이며; WT_E2는 야생형 *AOX1* 프로모터를 가진 다중카피 GFP-Zeo 클론이고; D6* F10는 다중카피 AOX1Δ6* 클론 (X-33 d6F10)이다.

도 6은 별개의 제오신™ 농도를 가진 MD 및 MDM 아가 플레이트에서의 P. 파스토리스 균주의 드롭 (drop) 테스트의 결과를 도시한다. 세포를 BMD (1%) 배지 상에서 1.5의 OD_{595}로 성장시키고, 10^{5}의 최종 희석률로 10 단계로 희석시키고, 48 핀 레플리케이터 (replicator)를 사용하여 아가 플레이트로 이동시켰다. 그림의 상부의 수는 모든 플레이트에서 희석률을 나타낸다. MD 배지를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. MDM-Zeo 플레이트에 메탄올을 약 0.5%의 최종 농도가 되도록 첨가하였다. 제오신™ 를 각각 100, 200 및 500 μg/ml의 최종 농도가 되도록 첨가하였다. X-33는 P. 파스토리스 X-33이고, A9는 P. 파스토리스 GFP-Zeo Mut^{s} A9이며, D2는 P. 파스토리스 GFP-Zeo D2이고, E2는 P. 파스토리스 GFP-Zeo E2이다.

도 7은 참고 균주에 비한 여러 다중카피 균주의 발현 수준을 도시한다; a) 탈억제 조건 하에서의 활성; b) 메탄올 유도 후의 활성.

도 8은 참고 균주에 대한 탈억제 및 유도된 조건 하에서의 Δ6* 다중 카피 균주의 발현 수준을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100] **실시예**

[0101] **실시예 1:**

[0102] 재료 및 방법

[0103] a) DNA 제조 / 정제 키트:

[0104] 여러 시판되는 DNA 제조 및 정제 키트를 제공된 설명서에 따라 사용하였다 (표 3 참조).

[0105] 표 3: DNA 제조 및 정제 키트

키트	제조업체
Easy-DNA™ 키트	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
QIAprep® 스핀 미니프렙 키트	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Wizard® 플러스 SV 미니프렙 DNA 정제 키트	Promega GmbH, Mannheim, Germany
GenElute™ 고성능 (HP) 플라스미드 미디프렙 키트 독일	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Vienna, Austria
QIAquick® 젤 추출 키트	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

[0106]

키트	제조업체
Quantum Prep™ 동결 N 서열 DNA 젤 추출 스핀 컬럼	Bio-Rad Laboratories GmbH, Vienna, Austria
QIAquick® PCR 정제 키트	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

[0107]

[0108] b) TOPO® 클로닝:

[0109] (pCR®4Blunt-TOPO®로의 클로닝 및 pCR®-Blunt II-TOPO®로의 클로닝을 위한) TOPO® 클로닝을 제공된 설명서에 따라 수행하였다. 항상 4 ㎕의 PCR 생성물을 클로닝을 위해 사용하였다. 2 및 4 ㎕의 모든 클로닝 반응물을 상기 언급된 프로토콜에 따라 원 샷 (One Shot®) 화학적격 대장균 (E. coli) TOP10F' 세포 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)로 형질전환시켰다.

[0110] c) 대장균 형질전환:

[0111] 라이게이션 반응물 및 플라스미드의 대장균으로의 형질전환을 SEM(간단하고 효율적인 방법) 프로토콜 [16]에 따라 수행하였다. 화학적격 대장균 TOP10F' 세포를 형질전환에 사용하였다.

[0112] d) 피키아 파스토리스 형질전환 :

[0113] 적격 피키아 파스토리스 세포의 제조: 요망되는 피키아 파스토리스 숙주 균주의 단일 콜로니를 300 ml의 차단된 넓은목 에를렌마이어 (baffled wide-necked Erlenmeyer) 플라스크 중의 50 ml의 YPD (2% 글루코오스)에 접종시켰다. 30℃, 60% 습도 및 130 rpm (Pilot Shake® RC-2 TE)에서 밤새 인큐베이션 후, 이러한 예비 배양물의 특정량을 2 l의 차단된 넓은목 에를렌마이어 플라스크 중의 200 ml의 YPD (2% 글루코오스)에 595 nm (OD595)에서 약 0.1의 광학 밀도로 접종시켰다. 배양물을 예비 배양과 동일한 조건하에서 1.0 내지 1.5의 광학 밀도로 성장시켰다. 세포를 10 분 동안 4℃ 및 4000 rpm에서 침전시키고 200 ml의 빙냉 멸균수에 재현탁시켰다. 이 과정을 각각 100 ml의 물, 10 ml의 1M 소르비톨 및 0.5 ml의 1M 소르비톨에서 각각 세포를 재현탁시켜 3회 반복하였다.

[0114] 10 ㎍의 요망되는 플라스미드를 300 ㎕의 최종 부피로 밤새 BglⅡ 및 Not I (각각 50 u)으로 선형화시켰다. 제한 분해 후, DNA를 표준 프로토콜 [16]에 따라 EtOH 및 0.3 M 소듐 아세테이트에서 침전시켰다. DNA를 11 ㎕의 멸균 ddH_2O에 용해시키고 약 1-2시간 동안 MF-밀리포어 (MF-Millipore™) 막 필터 (표 12 참조)를 사용하여 탈염시켰다. PCR-생성물을 형질전환에 사용하는 경우, 약 4-5 ㎍의 DNA를 EtOH 침전으로 시작하는 상기 기재된 방법과 같이 처리하였다.

[0115] 각각의 형질전환을 위해 80 ㎕의 제조 세포를 상기 기재된 바와 같이 10 ㎍ DNA와 혼합시키고, 얼음 상에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 혼합물을 빙냉 전기적-형질전환 큐벳(Bio-Rad)으로 이동시키고, 200 Ω, 25 μF 및 2.5 kV에서 펄스를 주었다. 1 ml의 빙냉 1 M 소르비톨을 즉시 첨가하였다. 현탁액을 멸균된 12 ml의 PP-튜브 (Greiner, Frickenhausen, Germany, #184261)로 이동시키고, 진탕시키지 않고 30℃에서 2 시간 동안 인큐베이

션시켰다. 이 재생 단계 후, 분취량을 선택 플레이트에 플레이팅시켰다. 유도 조건 하에서 높은 발현을 지니는 형질전환주의 선택을 위해, 세포를 소르비톨 (또는 임의의 다른 비-억제 탄소원) 메탄올 및 제오신을 지닌 최소 배지를 함유하는 MSM-Zeo 플레이트에 플레이팅시켰다. 탈억제 조건 하에서 높은 발현을 나타내는 클론의 선택을 위해, 세포를 메탄올이 결핍된 최소 소르비톨 제오 플레이트에 플레이팅시킬 수 있다. 메탄올 함유 선택 플레이트로의 글루코오스의 포함은 글루코오스 비억제 발현 클론 및 이의 프로모터의 검출을 가능케 한다.

[0116] e) 콜로니 PCR:

[0117] 요망되는 피키아 균주의 단일 콜로니를 100 ㎕ 마이크로튜브 중의 100 ㎕의 ddH_2O에 재현탁시키고, 95℃에서 5 내지 10 분 동안 가열하였다. 1분 동안 13,200 rpm에서 원심 분리 후, 10 ㎕의 상층액을 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였다. 5 ㎕의 이러한 첫번째 PCR 라운드를 두번째 PCR 라운드를 위한 주형으로 사용하였다. 5 ㎕의 두번째 PCR 라운드를 대조군 젤을 위해 사용하였다. PCR 반응물은 제공된 설명서에 따른 완충조건 하에서 50 ㎕의 최종 부피로 10 pmol의 각각의 프라이머 (AOX1_col 및 GF-Prev), 200 μM의 각각의 dNTP 및 2.5 유닛의 핫 스타 택 (Hot Star Taq®) DNA 중합효소 (QIAGEN) 또는 Taq DNA 중합효소(Promega)를 함유하였다. 서열분석을 위해 두번째 PCR 생성물을 키아퀵 (QIAquick®) PCR 정제 키트를 사용하여 정제시켰다.

[0118] 표 4 : 콜로니 PCR을 위한 온도 프로그램

[0119]

온도	Taq	핫 스타 택®	주기
95℃	5 분	15 분	1
95℃	30 초	30 초	
57℃	30 초	30 초	
72℃	1 분 30 초	1 분 30 초	30
72℃	10 분	10 분	1

[0120] f) 피키아 파스토리스 유전체 DNA 단리:

[0121] 요망되는 P. 파스토리스 균주를 30℃에서 회전 배럴 상에서 멸균된 12 ml PP-튜브 중의 5 ml의 YPD에서 5-10의 최종 OD595으로 밤새 성장시켰다. 1.5 ml의 배양물을 제공된 프로토콜에 따라 Easy-DNA™ 키트를 사용하여 DNA 단리에 사용하였다.

[0122] g) 단백질 분석:

[0123] 용액 내 단백질 농도의 측정은 생화학에서 오래전부터 사용해오고 있다. 이의 주요 적용중 하나는 산소 소모율에 대한 현재의 경우에서 수행되는 총 단백질 양으로 매우 다양한 생화학적 방법을 표준화시키는 것이다. 단백질 농도를 결정하는 가장 일반적으로 사용되는 방법은 브래드포드 (Bradford) 방법, 로우리 (Lowry) 방법 및 BCA™ 방법이다. 이 방법은 특정 시약에 대한 민감도, 동적 범위 및 적합성과 관련하여 일정한 제한을 지닌다. 이 3 가지 검사에서, 브래드포드 및 로우리 방법은 BCA™ 방법 보다 더욱 신뢰도가 높고 재현가능하다. 다른 한편으로, 로우리 및 브래드포드 방법은 세제 및/또는 환원제가 존재하는 경우에 높은 블랭크(blank) 값을 야기하는 심한 제한을 가진다. 따라서, BCA™ 분석은 화학적 용해 후의 선택 방법이다. 단백질 농도를 설명서 (Pierce Biotechnology Inc.)에 따른 표준과 같이 Y-Per® 및 BSA를 이용한 화학적 세포 용해 후 BCA™-검사를 이용하여 결정하였으며, 따라서 단지 주요 단계만 간략하게 아래에 기재할 것이다. 200 ㎕의 배양액을 5 분동안 4000 rpm 및 4℃에서 원심분리시켰다. 상층액을 버린 후 펠렛을 상하로 피펫팅(pipetting)하여 100 ㎕의 Y-Per®에 재현탁시켰다. 현탁액을 20 분 동안 600 rpm 및 실온에서 열혼합기(Thermomixer) 내의 1.5 ml 미세튜브에서 인큐베이션시켰다. 세포 데브리스를 13,200 rpm 및 실온에서 10 분동안 펠렛화시킨 후 상층액을 새로운 미세튜브로 이동시키고, BCA™ 분석 또는 SDS-PAGE을 위해 4℃에 보관하였다. 25 ㎕의 샘플을 마이크로플레이트 웰에서 200 ㎕의 BCA™ 작용제(시약 A: 시약 B = 50:1)과 혼합시키고, 30 초 동안 완전히 교반시키고, 플레이트 밀봉기 (sealer)(Promega)로 완전히 덮었다. 30분 동안 37℃에서 배양하고, 실온으로 냉각시킨 후 스펙트라맥스 플러스 (Spectramax Plus) 384 플레이트 판독기를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 필요시, 샘플을 BCA 검사 전에 ddH_2O으로 희석시켰다.

[0124] h) SDS-PAGE:

[0125] SDS-PAGE를 위한 샘플을 상기 섹션에서 기재된 시약과 같이 Y-Per®을 사용하여 화학적 세포 용해에 의해 제조하였다. 10 ㎕의 용해질을 10 ㎕의 2 x SSB (sigma sample buffer)와 혼합시키고, 95℃에서 5-10분 동안 인큐베이션시키고, 이 혼합물의 15 ㎕를 단백질 젤에 로딩하였다. 전기영동을 약 1 시간 동안 180 V로 수행하였고, 단백질 밴드를 쿠마시 블루 (Coomassie™ blue) 염색을 이용하여 검출하였다.

[0126] 표 5: SDS-PAGE를 위한 젤 제조

	농축 젤(4%)	분리 젤 (12%)
ddH_2O	3.05 ml	3.35 ml
30% 아크릴아미드/비스	650 ㎕	4 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml	
1.5 M Tris-HCl pH 8.8		2.5 ml
10% (w/v) SDS	50 ㎕	100 ㎕
TEMED	5 ㎕	10 ㎕
10% APS	25 ㎕	50 ㎕

[0127]

[0128] i) 글루코오스 분석:

[0129] 글루코오스 농도를 탈단백질화(deproteinisation) 없이 글루코오스-UV 헥소키나아제 방법을 이용하여 결정하였다 (DIPRO med Handels GmbH, Weigelsdorf, Austria, Prod. no. D590522). 50 ㎕의 피키아 배양물을 PCR 마이크로플레이트에 이동시키고, 5 분 동안 4000 rpm에서 원심분리시켰다. 10 ㎕의 상층액을 UV-스타 (UV-Star) 마이크로플레이트 중의 190 ㎕의 헥소키나아제 시약에 첨가하고, 15 분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 스펙트라맥스 플러스 384 플레이트 판독기로 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0130] j) 드롭 테스트:

[0131] P. 파스토리스 균주를 BMD (1%)에서 1.5의 최종 OD595로 성장시키고, 10^5의 최종 희석율로 10단계로 희석시켰다. 48 핀 레플리케이터로 아가 플레이트로의 이동을 수행하였다. 플레이트를 콜로니가 나타날 때까지 (MD 플레이트 상에서 보통 2일), 30℃에서 인큐베이션시켰다.

[0132] k) 서열 정렬:

[0133] 모든 서열 정렬을 INRA 홈페이지(Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France) (prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) [17]의 MultAlin 또는 유럽 생물정보학 연구소 (EBI, www.ebi.ac.ch/clustalw) [18]의 ClustalW를 이용하여 수행하였다. MultAlin을 이용한 서열 비교를 위해, 항상 DNA 서열 유사성 매트릭스를 비교에 사용하였다.

[0134] 메탄올 이용 경로 유전자 및 대부분의 퍼옥시좀 유전자는 글루코오스 억제, 탄소 고갈시의 탈억제 및 메탄올을 통한 유도와 관련하여 유사한 방법으로 조절된다. 규정된 일련의 전사 인자 (억제인자 뿐만 아니라 유도자)를 이용한 유사한 전사 제어는 이 조절 패턴의 원인이어야 한다. 이 프로모더 영역 내의 전사 인자 결합 부위는 다소 보존된 영역을 나타내야 한다. 공동 조절된 유전자의 프로모터 영역 사이에 다중 서열 정렬은 일치하는 유전자의 조절과 관련된 전사 인자의 보전된 결합 부위를 나타내야 한다. 메탄올자화 효모 P. 파스토리스, H. 폴리모르파 및 C. 보이디니이의 여러 유전자는 공동조절되는 것으로 보고되어 있고, 이의 프로모터 서열은 단리되었다 (표 6).

[0135] 표 6: 메탄올자화 효모 P. 파스토리스, H. 폴리모르파 및 C. 보이디니이로부터의 메탄올 이용 경로의 공동조절 유전자 또는 퍼옥시좀 유전자.

효모	유전자	효소	유전자은행 등록번호	문헌
P. 파스토리스	*AOX1*	알코올 산화효소		www.invitrogen.com
	AOX2	알코올 산화효소	X79871	
	ZZA1	알코올 산화효소	S62281	
	FLD1	포름알데히드 탈수소효소	AF066054	

[0136]

효모	유전자	효소	유전자은행 등록번호	문헌
H. 폴리모르파	*MOX*	메탄올 산화효소	A11156	
	DAS	디히드록시아세톤 합성효소	A11168	
	CAT	카탈라아제	X56501	
C. 보이디니이	*AOD1*	알코올 산화효소	M81702	
	FLD1	포름알데히드 탈수소효소	AB085186	
	FDH1	포르메이트 탈수소효소	AB035095	
	DAS1	디히드록시아세톤 합성효소	AB035094	
	PMP20	퍼옥시좀 막 단백질	AB035096	
	PMP47	퍼옥시좀 막 단백질	AB035097	
	CTA1	카탈라아제	AB064338	

[0137]

[0138] 1) 전사 인자 분석:

[0139] 전사 인자 분석을 지노매트릭스 소프트웨어 (Genomatix Software) GmbH 서버의 지노매틱스슈트 (GenomatixSuite) 1.6.1 내의 매트인스펙터 릴리스 프로페셔널 (MatInspector Release professional) 6.1 (2003년 1월)로 수행하였다. pPICZ B로부터의 PAOX1 서열을 group ALL fungi. lib (www.genomatix.de)의 매트릭스 패밀리 라이브러리 버전 (Matrix Family Library Version) 3.1.1 (2003년 4월)을 사용하여 전사 인자 결합 부위에 대한 검색에 사용하였다.

[0140] m) 프라이머 :

[0141] 표 7: 기재된 실시예에 사용된 프라이머 목록 (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany에 의해 합성됨)

SEQ ID No.	명칭	서열	온도 [°C]
2	P(AOX1)forw	AAGGTACCAGATCTAACATCCAAAGACGAAAG	70
3	P(AOX1)rev	CTAGCCATGGTTGAATTCTTTCGAATAATTAGT-	67

[0142]

SEQ ID No.	명칭	서열	온도 [°C]
		TGTTTTTTG	
4	GFPZeo forw	GAAAGAATTCAACCATGGCTAGCAAAGGAG	70
5	GFPZeo rev	GATGATGGTCTAGAACGTGTCAGTCCTGCTCCTC	70
6	AOX1TT forw	GACACGTTCTAGACCATCATCATCATCATCATTG	67
7	AOX1TT rev	ATAGCGGCCGCACAAACGAAGGTCTC	72
8	AOX1Δ1forw	CAACACCCACTTTAGGCTACTAACACCAT-GACTTTATTAG	71
9	AOX1Δ1rev	GTTAGTAGCCTAAAGTGGGTGTTGAGGAGAAGAG	70
10	AOX1Δ2forw	GTTCATGTTTGTAGATGAGGGCTTTCTGAGTG	67
11	AOX1Δ2rev	GCCCTCATCTACAAACATGAACCTCGCCAG	71
12	AOX1Δ3forw	GAGGGCTTTCCCAAATGGCCCAAAACTG	70
13	AOX1Δ3rev	CCATTTGGGAAAGCCCTCATCTGGAGTG	70
14	AOX1Δ4forw	CGGCCAGTTGTTGGTATTGATTGACGAATGC	69
15	AOX1Δ4rev	CAATACCAACAACTGGCCGTTAGCATTTC	71
16	AOX1Δ5forw	GCTTCTGAACCTTGTCTCCACATTGTATGCTTC	68
17	AOX1Δ5rev	GTGGAGACAAGGTTCAGAAGCGATAGAGAGAC	68
18	AOX1Δ6forw	GTCTCCACACTGCTGATAGCCTAACGTTC	66
19	AOX1Δ6rev	GGCTATCAGCAGTGTGGAGACAATGCATAATCATC	71
20	AOX1Δ7forw	GGAATACTGCTCTAACCCCTACTTGACAGC	65
21	AOX1Δ7rev	GTAGGGGTTAGAGCAGTATTCCCACCAGAATC	67
22	AOX1Δ8forw	CTTGACAGCAAGCTGCCCTGTCTTAAACC	66
23	AOX1Δ8rev	GGGCAGCTTGCTGTCAAGTAGGGGTTAG	68
24	AOX1Δ9forw	CTGTCTTAAACCTTACTGGTTCCAATTGACAAGC	68
25	AOX1Δ9rev	GGAACCAGTAAGGTTTAAGACAGGGCAGC	69
26	423forw	GATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAG-GACCTCCACTCC	87*
27	1372forw	GTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCT-TAAATTTATTTGC	81*
28	2325forw	CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTTCTAGACCAT-	86*

[0143]

SEQ ID No.	명칭	서열	온도 [°C]
		CATC	
29	AOX1_col	TCCAAAGACGAAAGGTTGAATG	72
30	GFPrev	CCGTATGTAGCATCACCTTCACC	74

[0144]

[0145] * 방정식 2 (QuikChange® multi site-directed mutagenesis kit)를 이용하여 계산된 Tm

[0146] **실시예 1.1**: 리포터 작제물의 클로닝

[0147] GFP-Zeo를 AOX1 프로모터 변이에 의해 구동된 유전자 발현에 대한 리포터로 사용하였다. 효모에서 고도로 발현된 유전자에 대한 코작 공통 서열 (Kozak consensus sequence)의 최소 필요조건을 달성하기 위해 ATG 시작 코돈 주위의 서열을 제작하였다. GFP-Zeo 유전자 앞쪽의 프로모터 영역을 변화시키기 위해, 중첩 신장 PCR로 EcoRI 제한 부위를 삽입시켰다 (표 8).

[0148] 표 8: 본 실시예에서 사용된 *AOX1* 서열 (pPICZ에 의해 구동됨)과 P. 파스토리스 균주 NRRL Y-11430 (유전자은행 AN: U96967, [2])의 *AOX1* 서열 사이의 번역 개시 부위 및 주위 서열의 비교. EcoRI 제한 부위를 밑줄로 나타내고, 위치 -3 및 +4에서의 최소 코작 필요조건을 굵은 글씨로 표시하였다.

[0149]

		-3 +1 +4
P(AOX1)-GFP	AAAACAACTA ATTATTgaAa	gaattcA**A**Cc ATG**G**CTAgCa
AOX1 (U96967)	AAAACAACTA ATTATTcgA-	------A**A**Cg ATG**G**CTAtCc

[0150] 리포터 시스템 성분 P(*AOX1*)의 PCR 기재 생성물을 주형으로 10 ng의 pPICZ-B ARS1을 이용하여 증폭시켰다. 상기 반응물은 또한 50 ㎕의 최종 부피로 적절한 완충 조건하에서 10 pmol의 각각의 프라이머 (각각 P(*AOX1*) forw 및 P(*AOX1*) rev), 200 μM의 각각의 dNTP 및 2.5 U의 시너지 (Synergy™) 중합효소를 함유하였다.

[0151] AOX1 TT를 AOX1 프로모터와 유사하게 증폭시켰다. 본 반응에서 AOX1TTforw 및 AOX1TTrev를 프라이머로 사용하였다. 둘 모두의 PCR 반응을 써모사이클러 (thermocycler)에서 95℃에서 5분의 최초 변성 단계 및 68℃에서 10분의 최종 신장 단계와 30주기 (95℃, 1 분; 55℃, 30 초; 68℃, 2 분 30 초)로 수행하였다. 2 ㎕의 첫번째 PCR 라운드를 상기와 동일한 조건하의 두번째 라운드에서의 증폭을 위해 사용하였다. 유일한 차이점은 신장 온도를 72℃로 증가시켰다.

[0152] 주형으로 25 ng의 벡터 pTracer™-CMV2를 이용하여 GFP-Zeo [19]를 증폭시켰다. 상기 반응물은 또한 50 μl의 최종 부피로 적절한 완충 조건하에서 10 pmol의 각각의 프라이머 (각각 GFP-Zeo forw 및 GFP-Zeo rev), 200 μM의 각각의 dNTP 및 2.5 U의 시너지™ 중합효소를 함유하였다. PCR을 써모사이클러에서 95℃에서 5분의 최초 변성 단계 및 72℃에서 10분의 최종 신장 단계와 30주기 (95℃, 1분; 55℃, 30초; 72℃, 2분 30초)로 수행하였다 (표 8 참조).

[0153] 모든 PCR 생성물을 아가로오스 젤 전기영동으로 정제시킨 후, 중첩 신장 PCR을 수행하였다. 상기 반응물은 50 μl의 최종 부피로 적절한 완충 조건하에서 10 ng의 P(*AOX1*), 주형으로서 상기 기술된 바와 같이 제조된 5 ng의 AOX1 TT 및 50 ng의 GFP-Zeo, 200 μM의 각각의 dNTP 및 2.5 U의 시너지™ 중합효소를 함유하였다. PCR을 써모사이클러에서 95℃에서의 5분의 최초 변성 단계 및 68℃의 10분의 최종 신장 단계와 30주기 (95℃, 1분; 53℃, 50초; 68℃, 3분 30초)로 수행하였다 (표 8 참조). 10주기 후, 적절한 완충 조건하에서 10 pmol의 외부 프라이머 P(AOX1) forw 및 AOX1TTrev, 및 200 μM의 각각의 dNTP 및 2.5 U의 시너지™ 중합효소를 함유하는 10 μl의 혼합물을 첨가하였다. 첨가후, 프로그래밍된 바에 따라 PCR을 지속시켰다. 약 2.4 kb의 요망되는 크기를 지닌 수득된 PCR 생성물을 아가로오스 젤 상에서 정제시켰다. 정제된 생성물을 pCR®4Blunt-TOPO® 벡터에 클로닝시키고, 서열분석하였다. 서열분석은 리포터 작제물 내에 4개의 돌연변이 및 1개의 결실을 나타내었다.

[0154] 염기쌍 결실 부위는 본래의 프로모터 서열의 -15 위치에서 발견되었다. 이러한 위치는 모든 pPICZ 벡터의 다중 클로닝 부위 내 (A, B 및 C; *Sfu I* 제한 부위 내)에 존재하므로, 결실은 프로모터 활성에 영향을 주지 않고, 이에 따라 교정하지 않았다. 첫번째 돌연변이 (T-->C)가 -828 위치의 프로모터 영역에서 발견되었다. 다른 3개의 돌연변이가 각각 +122, +507 및 +1075의 위치의 GFP-Zeo 코딩 서열 내에서 발견되었다.

[0155] +122 위치에서의 G-->A 전환은 Gly의 GGA 코돈을 GAA 코돈으로 변화시켰고, 이는 G41A 아미노산 변화를 야기시켰다. +507 위치에서의 T-->C 전환은 R169의 코돈만 변화시키는 침묵 돌연변이였다. +1075 위치에서의 마지막 돌연변이 (T-->C)는 TGA 정지 코돈을 아르기닌 코돈 CGA로 변화시켰다. 돌연변이 -828, +122 및 +1075를 pAOX 벡터를 제작한 후에 퀵체인지 (QuikChange®) 다중 부위 특이적 돌연변이유발 키트로 복구시켰다. +507 위치의 침묵 돌연변이 및 폴리링커의 돌연변이는 변경되지 않았는데, 이는 희귀 코돈이 도입되지 않았기 때문이다.

[0156] *Kpn I* 및 *Not I*을 이용하여 pCR®4Blunt-TOPO® 벡터로부터 P_{AOX1}-GFP-Zeo-AOX1TT 단편을 절제하고, 이를 pBlueScript® SK- 벡터의 *Kpn I* 및 *Not I* 부위 사이에 삽입함으로써 pAOX를 제작하였다.

[0157] 돌연변이가 *AOX1* 프로모터 내에서 발견되었고, GFP-Zeo 서열을 퀵체인지 (QuikChange®) 다중 부위 특이적 돌연변이유발 키트 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)를 이용하여 교정하였다. PCR 반응을 제공된 설명서에 따라 써모사이클러에서 95℃에서 1분의 최초 변성 단계와 함께 30주기 (95℃, 1 분; 55℃, 1 분; 65℃, 10분 30 초)로 25 μl의 최종 부피로 적절한 완충조건하에서 100 ng의 pAOX, 100 ng의 돌연변이유발 프라이머 (각각 423forw, 1372forw 및 2325forw) 및 1 μl의 퀵체인지® 다중 효소 블렌드를 함유하는 혼합물로 수행하였다. *Dpn I* 분해 및 대장균 XL10-GOLD® (Invitrogen Corp.) 세포로의 화학적 형질전환을 제공된 설명서에 따라 수행

하였다. 모든 3개의 돌연변이의 교정을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0158] **실시예 1.2**: *AOX1* 프로모터 결실의 제작

[0159] *AOX1* 프로모터의 좌측 암 (arm)을 정방향 프라이머로 P(AOX1)forw 및 역방향 프라이머로 AOX n rev (n=1...9)를 이용하여 합성하였다. 우측 암을 정방향 프라이머로 10 pmol의 AOX n forw (n=1...9) 및 역방향 프라이머로 P (AOX1) rev로 합성하였다. 모든 암을 주형으로서 12 ng의 벡터 pAOX 및 10 pg의 각각의 프라이머를 이용하여 합성하였다. 반응물은 또한 50 μl의 최종 부피로 적절하게 완충된 조건하에서 10 pmol의 각각의 프라이머, 200 μM의 각각의 dNTP 및 0.6 U의 *Pwo* DNA 중합효소를 함유하였다. PCR을 써모사이클러에서 95℃에서 5분의 최초 변성 단계 및 68℃에서 10분의 최종 신장 단계와 30주기 (95℃, 1 분; 55℃, 1 분; 68℃, 1 분 30 초)로 수행하였다. 모든 암을 아가로오스 젤로 정제하고, 중첩 신장 PCR에 대한 주형으로 사용하였다.

[0160] 표 9: 프로모터 결실을 위한 중첩 프라이머 및 암 길이

작제물	좌측 암 (arm)		우측 암	
	내부 프라이머	암 길이 [bp]	내부 프라이머	암 길이 [bp]
PAOX1Δ1	AOXΔ1 rev	184	AOXΔ1 forw	738
PAOX1Δ2	AOXΔ2 rev	315	AOXΔ2 forw	624
PAOX1Δ3	AOXΔ3 rev	374	AOXΔ3 forw	578
PAOX1Δ4	AOXΔ4 rev	519	AOXΔ4 forw	421
PAOX1Δ5	AOXΔ5 rev	636	AOXΔ5 forw	290
PAOX1Δ6	AOXΔ6 rev	708	AOXΔ6 forw	247
PAOX1Δ7	AOXΔ7 rev	742	AOXΔ7 forw	209
PAOX1Δ8	AOXΔ8 rev	794	AOXΔ8 forw	171
PAOX1Δ9	AOXΔ9 rev	833	AOXΔ9 forw	115

[0161]

[0162] 반응물은 50 μl의 최종 부피로 적절하게 완충된 조건하에서 주형으로서 상기 기재된 바와 같이 제조된 10 ng의 각각의 암, 200 μM의 각각의 dNTP 및 0.6 U의 *Pwo* DNA 중합효소를 함유하였다. PCR을 써모사이클러에서 95℃에서 5분의 최초 변성 단계 및 68℃에서 10분의 최종 신장 단계와 함께 30주기 (95℃, 45 초; 60℃, 45 초; 68℃, 2 분)로 수행하였다. 10주기 후, 적절한 완충 조건하에서 10 pmol의 외부 프라이머 P(AOX1) forw 및 P(AOX1) rev, 200 μM의 각각의 dNTP 및 0.6 U의 *Pwo* DNA 중합효소를 함유하는 20 μl의 혼합물을 첨가하였다. 혼합물의 첨가후 프로그래밍된 바와 같이 PCR을 지속시켰다.

[0163] 약 898-947 bp의 요망되는 크기를 지닌 수득된 PCR 생성물을 아가로오스 젤에서 정제시키고, pCR®4Blunt-TOPO® (Δ2, Δ4, Δ5, Δ7 및 Δ8) 또는 pCR®-Blunt II- TOPO® 벡터 (Δ1, Δ3, Δ6 및 Δ9)로 클로닝시키고, 서열분석하였다.

[0164] *Bgl II* 및 *EcoRI*을 이용하여 TOPO® 벡터로부터 P_{AOX1}Δ 단편을 절제하고, 이를 야생형 *AOX1* 프로모터 대신에 pAOX 벡터의 *Bgl II* 및 *EcoRI* 사이로 삽입시킴으로써 pAOXΔ 벡터를 제작하였다. 생성된 벡터를 서열분석에 의해 확인하였다.

[0165] **실시예 1.3**: 피키아 파스토리스 형질전환 및 형질전환주의 분석

[0166] 상기 기술된 바와 같이 피키아 파스토리스 형질전환을 수행하였다. 형질전환되고 재생된 피키아 세포를 MSM-Zeo 아가 플레이트 상에 분취량을 스프레딩시킴으로써 P_{AOX1} (또는 P_{AOX1}Δ)-GFP-Zeo-AOX1 TT의 통합을 위한 선택을 수행하였다.

[0167] 피키아 파스토리스 균주를 실온에서 60시간 동안 28℃, 320 rpm 및 80% 습도에서 웰마다 300 μl의 BMD (1%)를 함유하는 딥 웰 플레이트 (deep well plate)에서 성장시켰다. 이 기간 후, GFP-형광의 결정을 위해 50 μl를 취했다. 웰당 250 μl의 BMM2를 첨가한 후, 72시간 동안 추가로 인큐베이션시킴으로써 유도를 수행하였다. 10, 24 및 48 시간 후, 50 μl의 BMM10을 첨가함으로서 메탄올을 보충시켰다. 메탄올 유도후 72시간 후에 1회 더 GFP 형광을 측정하였다.

[0168] 리포터 효소 발현 분석. 피키아 파스토리스에서의 GFP-Zeo의 발현을 395 nm에서의 여기 및 507 nm에서의 방출

을 이용하여 스펙트라맥스 제미니 (Spectramax Gemini) XS 플레이트 판독기에서 GFP의 형광 검출에 의해 분석하였다. 상기 기술된 바와 같이 딥 웰 플레이트에서 배양된 50 μl의 P. 파스토리스 배양물을 FIA 미세역가 플레이트에서 ddH_2O를 이용하여 1+3 희석시켰다. 제한된 샘플 양으로 인해, 1회의 측정만을 수행하였다. 제공된 모든 평균 ± 표준 편차를 3개 이상의 상이한 배양물 (웰)로부터 계산하였다.

[0169] 통합 카세트가 *AOX1* 유전자를 대체하지 않고 *AOX1* 유전자좌로 통합되는 경우, 재조합 피키아 균주는 야생형 속도로 메탄올에서 성장할 수 있는 반면, 이중 교차에 의한 *AOX1* 유전자의 대체는 메탄올에서 훨씬 느린 성장 속도로 성장한다. 이러한 두개의 성장 표현형을 각각 메탄올 이용 플러스 (Mut^+) 및 메탄올 이용 슬로우 (Mut^S)로 명명하였다. 메탄올 이용 표현형의 분석을 위해, 피키아 파스토리스의 미세규모 배양물을 96-핀 레플리케이터를 이용하여 MM 및 MD 아가 플레이트로 옮기고, 2일 동안 30℃에서 인큐베이션시켰다. 2일후, 피키아 균주가 Mut+ 표현형을 지니는 경우 둘 모두의 플레이트에 콜로니가 나타나는 반면, Mut^S 표현형 균주는 MD 플레이트에서만 콜로니가 발생한다.

[0170] pAOX 또는 pAOXΔ 플라스미드중 하나의 형질전환으로부터 유래된 모든 피키아 균주를 콜로니 PCR에 의해 분석하고, 리포터 유전자 (GFP-Zeo)의 앞쪽의 프로모터 서열을 확인하기 위해 서열분석에 의해 결실 작제물을 분석하였다.

[0171] **실시예 1.4**: *AOX1* 프로모터의 방향적 진화

[0172] 유전자의 코딩 영역에서의 PCR 돌연변이 유발은 잘 개발된 반면, 프로모터 영역에서의 돌연변이유발에 관해서는 공개된 것이 없는 것으로 공지되어 있다. 지식의 부족으로 인해, 여러 돌연변이유발 조건을 수행하였다: 돌연변이 스펙트럼에서의 편향을 최소화시키기 위해, Taq DNA 중합효소 및 뮤타자임 (Mutazyme®) DNA 중합효소 (Stratagene Inc.)의 두개의 상이한 중합효소를 사용하였다. 프로모터 서열의 진화에 대한 돌연변이 빈도에 대한 지식이 완전히 부족하기 때문에, 여러 돌연변이 빈도 (이론적으로 1 내지 ~14/kb)를 시험하였다.

[0173] 핫 스타 택 (Hot Star Taq®) DNA 중합효소를 이용한 돌연변이유발: [20]에 따라서 100 μl의 반응 부피로 프로모터 서열에 대한 돌연변이 PCR을 수행하였다. 반응물은 적절한 완충 조건하에서 12 ng의 pAOX, 40 pmol의 각각의 프라이머 (P (AOX1) forw 및 P (AOX1) rev), dNTP (200 μM의 dGTP, 200 μM의 dATP, 1 mM의 dTTP, 1 mM의 dCTP) 및 5 U의 핫 스타 택® DNA 중합효소를 함유하였다. 중합효소의 오차율을 변화시키기 위해 $MgCl_2$ 농도를 7 mM (보통 3 mM)로 증가시켰다. PCR을 써모사이클러에서 95℃에서 15분의 최초 변성 단계 및 72℃에서 10분의 최종 신장 단계와 함께 30주기 (95℃, 45 초; 55℃, 45 초; 72℃, 1 분 30 초)로 수행하였다.

[0174] 진모르프 (GeneMorph®) 무작위 돌연변이유발 키트를 제공된 설명서에 따라 50 μl의 최종 부피로 프로모터 서열에 대해 수행하였다. 주형으로 다양한 양의 벡터 pAOX를 사용하였다 (표 10 참조). 12.5 pmol의 각각의 프라이머, P(AOX1) forw 및 P(AOX1) rev을 사용하였다. PCR 반응을 써모사이클러에서 95℃에서 1분의 최초 변성 단계 및 68℃에서 10분의 최종 신장 단계와 30주기 (95℃, 30 초; 55℃, 30 초; 68℃, 1 분 30 초)로 수행하였다.

[0175] 표 10: 진모르프® PCR 반응에 사용된 주형의 양

[0176]

번호	돌연변이 빈도	pAOX 양	예상 돌연변이/kb
1	낮음-중간	12 ng	~3 이하
2	중간	1.2 ng	3-7
3	중간-높음	120 pg	~7 이상

[0177] 상기 기술된 조건 (Taq, 3x GeneMorph®)을 이용한 돌연변이 유발의 첫번째 라운드를 수행하였다. 보다 높은 돌연변이 빈도를 수득하기 위해, 진모르프® 반응 #3을 두번째 PCR 라운드를 위한 주형으로 사용하였다. 택 및 진모르프® #2 및 #3 조건을 사용하였다.

[0178] 피키아 파스토리스 X-33 GFP-Zeo Mut^S A9 세포로의 형질전환 전에, 모든 PCR 반응물을 침전시키고, 상기 기술된 바와 같이 탈염시켰다. 표준 형질전환 및 재생 방법을 이용하였다. 100-500 μg/ml의 제오신™을 함유하는 MD 아가 플레이트에서 150 μl의 분취량의 형질전환된 세포 현탁액을 스프레딩시킨 후, 2일 동안 30℃에서 인큐베이션시킴으로써 글루코오스 배지에서 유도된 프로모터의 선택을 수행하였다.

[0179] **실시예 1.5**: 결과 및 논의

[0180] Ⅰ) 리포터 시스템의 특성규명

[0181] 지금까지, 광범위한 GFP 변이체가 분자생물학에서 이용되고 있다. 소수의 점 돌연변이에서 약간의 상이함에도 불구하고, 이들의 특성은 매우 다양하다. 개선된 폴딩 특성을 별개로 치더라도, 이들의 형광 스펙트럼 뿐만 아니라 이들의 양적 수율 및 이에따른 밀도는 매우 다양하다. 녹색 형광 단백질은 이들의 여기 최대량에 따라 두 개의 그룹으로 나눌 수 있다: 야생형 GFP 변이체는 395 nm에서 최대 여기를 지니고, 470 nm에서 보다 작은 최대 여기를 지니고, 적색-전환된 GFP 변이체는 480-490 nm에서 최대 여기를 지닌다. 이의 아미노산 서열에 따르면, cycle-3-GFP는 395 nm에서 최대 여기를 지니는 야생형 GFP 변이체에 속한다.

[0182] 피키아 파스토리스에서 발현시 스펙트럼 특성을 제어하기 위해, 형광 스펙트럼을 결정하였다. GFP-Zeo에서의 cycle-3-GFP의 전체 최대 여기는 395 nm인 반면, 478 nm에서의 두번째 최대 여기는 순간적으로 소실된다. 방출 스펙트럼은 510 nm의 최대 방출을 나타낸다. 두개의 여기중, 수작업의 395 nm에 의해 제시된 파장이 바람직하고, 모든 추가 측정에 대해 사용하였다.

[0183] 자가 흡수는 형광 분광법에서 매우 빈번한 현상이다. 높은 농도의 형광단에서, 흡수 (여기) 스펙트럼과 중첩되는 영역에서 방출된 광자가 흡수될 수 있다 (방사성 에너지 이동). 자가 흡수 (방출 내부 필터 효과)가 발생하는 경우 보다 낮은 형광 강도가 관찰될 수 있다. 이는 프로모터 활성의 과소평가를 야기할 수 있다. 형광단이 증가함에 따라 내부 필터 효과 형광 강도는 선형 방식으로 증가하지 않는다. 따라서, GFP-Zeo를 발현하는 피키아 파스토리스 세포의 부피 증가를 이들의 형광 활성에 대해 시험하였다.

[0184] 3000 RFU까지 방출 내부 필터 효과가 세포 수준에 대해 검출되지 않았다. GFP의 축적에 의해 야기된 세포 내의 자가 흡수는 평가할 수 없었다. 전체 72시간에 걸친 유도 단계에서의 형광의 선형 증가를 검출하였다. 상기 이유로 인해, 세포 내의 내부 필터 효과가 존재하지 않은 듯하다. 따라서, 핵 내의 GFP-Zeo의 축적은 이의 양에 대해 문제가 되지 않는다. 본 연구에서는 단일 카피 프로모터 활성의 범위 내에서 내부 필터 효과가 발생하지 않는 것으로 결정되었다. 자가 흡수의 결핍으로 인해, 프로모터 활성의 과소평가는 발생하지 않는 것으로 보인다. 그 밖의 것에 의해 관찰된 내부 필터 효과는 훨씬 적은 스톡스 이동 (Stokes shift)을 지님으로써 여기 및 방출 스펙트럼이 중첩되는 다양한 GFP 변이체의 사용에 의해 주로 야기되는 듯 하다. GFP 발현 실험의 결과 비교시 이는 주의를 요한다. 별개의 스펙트럼 특성을 지니는 여러 GFP 변이체의 이용, 뿐만 아니라 최적화된 코돈 활용 및 이에따른 다양한 발현 숙주에서의 매우 다양한 발현 수준은 다양한 실험실의 결과의 비교를 복잡하게 한다.

[0185] Ⅱ) 미세규모의 *AOX1* 프로모터 활성

[0186] 미생물 세포 (예를들어, 효모, 박테리아)의 소규모의 배양은 보통 진탕 플라스크 배양으로 수행된다. 진탕 플라스크에서의 대량의 미생물 라이브러리의 접종 및 배양은 고된 일이고, 시간 소모적이어서 비용을 증가시킨다. 근년에, 대안으로서 딥-웰 미세역가 플레이트를 이용하는 미세규모 배양 시스템이 개발되었다. 예를들어 96 또는 384 균주/배양물 및 보다 적은 요구 물질의 병행 취급으로 인해, 미세역가 시스템은 노동, 시간 및 이에따른 비용의 정도와 관련하여 진탕 플라스크보다 우수하다. 여러 이유로 인해, 미세역가 시스템의 주요 결점인 적은 샘플량 및 적은 통기 효율이 덜 관련된다: (1) 분석 시스템의 기술적 진보는 매우 다수의 화합물의 검출 한도를 낮추었고, 이는 매우 적은 샘플량을 요구한다; (2) 딥-웰 미세역가 플레이트에서의 성장을 위한 방법 및 장치가 또한 개선되었다. 통기율 및 이에따른 미세역가 플레이트에서의 성장 조건이 진탕 플라스크와 유사하다는 것이 몇몇 연구에서 밝혀졌다. 리포터 단백질로서 cycle-3-GFP를 이용하는 S. 세레비지애에서의 *GAL1* 프로모터에 대한 실시간 연구가 진탕 플라스크 연구와 일치한다는 것이 또한 입증되었다.

[0187] GFP-Zeo 발현을 구동시키는 *AOX1* 프로모터를 상기 기술된 바와 같이 딥-웰 미세역가 플레이트에서 연구하였다. 글루코오스에서의 세포 성장후, 탄소원 및 에너지원으로서 메탄올을 이용한 유도 단계를 후속으로 연구하였다. PAOX1-GFP-Zeo-AOX1 TT 발현 카세트를 지니는 피키아 파스토리스 세포에서의 메탄올을 이용한 *AOX1* 프로모터의 유도는 GFP 형광을 신속하게 증가시켰다. 72시간까지 GFP 형광이 선형 방식으로 증가하였다. 메탄올이 첨가되는 경우 GFP-Zeo의 발현이 지속되었다. 메탄올이 첨가되지 않는 경우, 24시간 이내에 증발 및 소모를 통해 메탄올이 고갈되었고, GFP-Zeo 발현이 탈억제 수준으로 감소하였다.

[0188] GFP-Zeo 형광의 증가는 또한 SDS-PAGE에 의해 나타나는 바와 같이 GFP-Zeo 단백질과 일치하였다. 메탄올 유도시, 약 42 kDa의 단백질 밴드가 형광이 증가함에 따라 보다 강해지는 것으로 나타났다. 42 kDa에서의 강한 밴드는 모든 GFP-Zeo 클론에서 발견된 반면, 음성 대조군 (X-33 야생형)에서는 밴드가 나타나지 않았다. 또한, 메탄올 유도후 72시간 후에 X-33 d6*F10의 샘플에서, 강한 밴드가 발견되었다 (도 1C, 레인 5). 비록 표준화시

키지 않았지만, 42 kDa 밴드의 강도와 적절한 형광 수준 사이의 명백한 상관 관계가 측정가능했다.

[0189] Ⅲ) 전사 인자 결합 부위

[0190] 상기 기술된 바와 같이, 여러 전사 인자의 결합 부위에 대한 공통 서열이 공지되어 있다. AOX1 프로모터 서열의 서열 분석은 특히 관심있는 소수의 히트 (hit)를 지니는, 여러 추정적인 전사 인자 결합 부위를 나타내었다. 열충격 인자 및 스트레스 반응 성분 모티브 중에서, 일반적으로 글루코오스 조절과 관련된 것으로 공지된 소수의 전사 인자의 결합 부위가 발견되었다. 가장 흥미로운 결합 부위를 표 11 및 도 2에 요약하였다.

[0191] 표 11: AOX1 프로모터 서열 내에서 발견된 전사 인자 (TF) 결합 부위. 대문자의 염기쌍은 코어 서열 (기질의 4개의 가장 보존된 연속 잔기)을 나타내고, 밑줄친 염기쌍은 높은 정보량 (최대 100의 Ci>60)을 나타낸다.

TF 기질	위치(5)*	결실 변이체	코어 유사성	기질 유사성	서열	Seq ID No.
HAP1.01	52-66 (-902 내지 -888)		1.000	0.802	ctgtg-gat gtCGGAt	31
HSF.01	135 내지 155 (-819 내지 -799)		1.000	0.784	AGAAgag-gagtg-gag-gtcctg	32
HAP234.01	193 내지 205 (-761 내지 -749)	Δ1	1.000	0.895	caagc-CCAAtaac	33
HAP234.01	203 내지 215 (-751 내지 -739)	Δ1	1.000	0.923	gagctCCAAtcaa	34
ABAA.01	213 내지 227 (-741 내지 -727)	Δ1	1.000	0.949	ctcgct-CATTccaat	35
STRE.01	279 내지 287 (-675 내지 -667)		1.000	1.000	ccAGGGggg	36
RAP1.01	332 내지 346 (-622 내지 -608)	Δ2	1.000	0.845	tacAC-CCgaa-catca	37
ADR1.01	371 내지 377 (-583 내지 -577)	Δ3	1.000	1.000	tGGGGtc	38
HSF.03	516 내지 536 (-438 내지 -418)	Δ4	1.000	0.862	AGAAacttccaaaagtcggc	39
HAP234.01	665 내지 677 (-289 내지 -277)	Δ5	1.000	0.883	at-catCCAAaaag	40
MAT1MC.01	680 내지 690 (-274 내지		1.000	0.901	tgcaT-TGTctc	41

[0192]

TF 기질	위치(5)*	결실 변이체	코어 유사성	기질 유사성	서열	Seq ID No.
	-264)					
GCR1.02	699 내지 713 (-255 내지 -241)	Δ6	1.000	0.872	at-gCTTCcaagattc	42
QA-1F.01	743 내지 763 (-211 내지 -191)	Δ7	0.785	0.775	acagt-taaatttTGATcatga	43

[0193]

[0194] * 제공된 위치는 GFP-Zeo 유전자의 전사 시작점 (ATG)에 대해 기록하였다; 추정적 전사 인자 결합 부위의 코어 서열은 대문자로 나타내었다.

[0195] c는 상보성 가닥에 대한 상동성을 나타낸다.

[0196] IV) 메탄올 조절 유전자에서의 조절 서열

[0197] 여러 서열이 메탄올 유도 유전자의 조절과 관련된 문헌에 기재되어 있다. P. 파스토리스 *AOX2* 프로모터의 결실 분석을 기초로 하여, 2개의 음성 작용 영역 (URS1 및 URS2, 업스트림 억제 서열) 및 1개의 양성 작용 도메인 (UAS, 업스트림 활성화 서열)인 3개의 조절 서열을 기재하였다 [3]. H. 폴리모르파 *MOX* 프로모터에 대해, 두개의 업스트림 활성화 서열 (UAS1 및 UAS2) 및 한개의 억제 결합 부위 (URS1)를 또한 기재하였다 [8].

[0198] V) *AOX1* 프로모터의 결실 작제물

[0199] 전사 인자 분석 및 다중 서열 정렬을 기초로 하여, 상기 기술된 바와 같은 중첩 신장 PCR에 의한 결실을 위해 9개의 프로모터 영역을 선택하였다. *AOX1* 프로모터 결실 작제물을 "야생형 *AOX1*" 프로모터 5를 리포터 유전자 GFP-Zeo로 대체시키기 위해 pAOX 벡터로 클로닝시켰다. 플라스미드를 선형화시키고, 피키아 파스토리스 유전체로 통합시켰다.

[0200] 표 12: AOX1 프로모터 작제물 내에서 결실된 서열

작제물	위치*		서열	Seq ID No.
	5' 말단	3' 말단		
PAOX1Δ1	170 -784	235 -719	tttgccatcgaaaaaccagcccagt-tattgggcttgattggagctcgct-cattccaattccttcta	44
PAOX1Δ2	304 (-650)	350 (-604)	ttatttccgaatgcaacaagctccgc-attacacccgaacatcactcc	45
PAOX1Δ3	364 (-590)	393 (-561)	ctgagtgtggggtcaaatagtttcat-gttc	46
PAOX1Δ4	509 (-445)	551 (-403)	gtcaaaaagaaacttccaaaagtcg-gcataccgtttgtcttgt	47
PAOX1Δ5	625 (-329)	683 (-271)	ccggtgcacctgtgc-cgaaacgcaaatggggaaacac-ccgctttttggatgattatgca	48
PAOX1Δ6	694 (-260)	723 (-231)	attgtatgcttccaagattctggtgg-gaat	49
PAOX1Δ7	729 (-225)	763 (-191)	tgatagcctaacgttcatgat-caaaatttaactgt	50
PAOX1Δ8	784 (-170)	800 (-154)	aatatataaacagaagg	51
PAOX1Δ9	823 (-131)	861 (-93)	ttttttttatcatcattattagct-tactttcataattgcg	52

[0201]

[0202] * 제공된 위치는 Seq ID No. 1에 대해서 나타내었다.

[0203] 상기 기술한 바와 같이 GFP-Zeo 발현 및 GFP-Zeo 유전자의 앞쪽의 정확환 프로모터 서열의 통합에 대해 통합체(Integrant)를 분석하였다. 단일 카피 통합체를 미세규모의 다양한 탄소원에서의 이들의 GFP-Zeo 발현 수준에 대해 추가로 상세하게 분석하였다. 모든 작제물 (결실 및 야생형)에서, 글루코오스 또는 글리세롤이 배지 (메탄올을 지니거나 지니지 않음) 내에 존재하는 한 GFP 형광이 검출되지 않았다. 탈억제 조건을 의미하는 탄소 고갈시, GFP 형광에서의 약간의 증가가 검출되었다. 야생형에 비해, 약간의 프로모터 변이체는 현저한 차이를 나타내었다 (도 3). 탈억제 조건하에서 6개의 작제물 (Δ3, Δ4, Δ5, Δ7, Δ8 및 Δ9, 도 3 참조)에서 현저하게 낮은 프로모터 활성이 발견되었다. Δ1은 야생형 활성을 지니는 반면에, 작제물 Δ2 및 Δ6*은 현저하게 높은 GFP-Zeo 발현을 발생시켰다. Δ6*의 발현 수준은 야생형 수준 보다 현저하게 높았다.

[0204] 메탄올 유도후, 모든 변이체는 야생형에 비해 활성이 약 20% 증가한 Δ1을 제외하고는 현저하게 감소된 프로모터 활성을 나타내었다. 모든 기타 변이체의 활성에서의 감소는 도 4에서 볼수 있는 바와 같이 매우 현저하였다.

[0205] 메탄올 유도 야생형 활성에 대해 표준화된 모든 변이체 및 야생형 작제물의 프로모터 활성을 표 13에 요약하였다.

[0206] 표 13: 미세규모의 *AOX1* 프로모터 변이체의 형광 강도. 데이터는 4개의 독립된 측정의 평균 SD를 나타낸다. 72시간의 야생형 프로모터 (100%)의 메탄올 유도 후의 형광 강도는 987 ± 81이었다. 배지 내에 글루코오스가 존재하는 한 형광이 검출되지 않았다.

작제물	상대 형광 강도 [%]	
	탈억제	메탄올
PAOX1	2.8 ± 0.1	100
PAOX1Δ1	3.0 ± 0.5	120 ± 12
PAOX1Δ2	4.4 ± 0.8	40 ± 3
PAOX1Δ3	0.7 ± 0.2	68 ± 8
PAOX1Δ4	1.9 ± 0.1	72 ± 4
PAOX1Δ5	0.23 ± 0.04	30 ± 4
PAOX1Δ6*	9.1 ± 0.6	42 ± 2
PAOX1Δ7	2.2 ± 0.4	31.3 ± 0.5
PAOX1Δ8	0.3 ± 0.2	17.1 ± 0.7
PAOX1Δ9	1.3 ± 0.1	61 ± 3

[0207]

[0208] 작제물 Δ8의 TATA box의 결실은 탈억제 및 유도 조건에서 각각 약 90% 및 80%의 활성의 심한 감소를 지닌 대량의 파괴된 프로모터를 발생시켰다. 실험적으로 결정된 (Ellis, S.B., et al., Mol. Cell. Biol. (1985) 5:1111-1121) 전사 개시 시작부를 제거함으로써 (Δ9), 발현 수준에서의 상기의 강한 효과가 관찰되지 않았다. 이는 메탄올 유도 후의 최적의 결실 작제물중 하나이다. 예상되는 바와 같이, TATA box는 전사 수준에서 강한 영향력을 지닌다. 대조적으로, 전사 개시 시작부는 TATA box 만큼 중요하지는 않는 듯 하다. TATA box에 대해 규정된 거리의 또 다른 영역이 본래의 영역의 결실 후에 전사 시작부로 작용할 수 있다. mRNA의 5' 말단이 결실에 의해 변경되었으므로, 발현 과정의 여러 단계에서의 상기 결실의 영향 (예를들어, 전사 개시, mRNA 안정성, 번역 개시)을 추측할 수 있다.

[0209] 단지 두개의 작제물 Δ2 및 Δ6*는 탈억제 후에 현저하게 높은 발현 수준을 나타낸다. Rap1p 및 Gcr1p의 추정적 전사 인자 결합 부위가 상기 결실된 서열에 포함된다. 또한, QA-1F의 추정적 전사 인자 결합 부위는 Δ6*의 결실된 서열에 매우 근접하여 있다. 주목할 만한 것은, Rap1p 및 Gcr1p 결합 부위가 프로모터 서열에 존재하는 경우 상승작용적인 방식으로 작용하는 것으로 공지되어 있다 [21]. 일반 전사 인자 Rap1p는 이의 결합 부위와 관련한 서열 및 적절한 전사 인자에 따라 다양한 세포 기능 (예를들어, 종말체 구조, 메이팅 (mating), 번역, 해당)을 지닌다 [22-24]. 상기 언급한 바와 같이, Gcr1p는 해당 유전자의 조절 및 협동의 주요 항목으로, 이는 S. 세레비지애에서의 높은 수준의 발현에 절대적으로 필요하다. Rap1p 및 Gcr1p의 결합 부위는 해당 유전자의 업스트림 활성화 서열 (UAS)의 코어 영역에 매우 근접하여 있는 것으로 밝혀졌고, Gcr1p 결합은 Rap1p에 의해 DNA가 굽혀짐으로써 완화된다. 다른 한편으로, 인접한 Rap1p 결합 부위는 유전자의 Gcr1p 의존 활성화에 절대적으로 필요하지는 않다. Gcr1p는 보다 많은 수의 CT-box가 존재하는 경우 Gcr1p의 결합 부위로의 결합을 촉진

할 수 있는 것으로 보인다. Rap1p과 Gcr1p 및 Gcr1p과 Gcr1p의 명백한 상호작용이 기술되어 있으나, 몇몇 기타 인자가 Gcr1p 및/또는 Rap1p와 상호작용하여 복합체의 활성을 조절하는 것이 제안되었다. 유도 메커니즘에 대한 광범위한 지식이 지난 30년 동안 달성되었다.

[0210] 상기 기술된 기능성 UAS에서의 Gcr1p 및 Rap1p 결합 부위의 기술된 필수적인 밀접한 근접성이 *AOX1* 프로모터 서열에서 발결할 수 없었다. 대조적으로, 두개의 결합 부위는 367 bp 떨어져 있었다. 추정적 Gcr1p 결합 부위 중에서, 이의 코어 서열인 CTTCC가 *AOX1* 프로모터 서열에 2배로 존재하였지만, 이들중 어느 것도 Rap1p 결합 부위 또는 또 다른 CTTCC 모티프에 인접하지 않았다. 따라서, 다수의 해당 유전자에서 발견된 것과 같은 상기 두 결합 부위의 상승작용적 효과는 존재하지 않는 것으로 보인다. Rap1p 및 Gcr1p의 추정적 역할이 탈억제 조건하에서의 *AOX1*의 억제 단백질이라는 사실로 인해, 상기 추정적인 신규한 세포 기능에 대한 두개 단백질의 (상호)작용의 신규한 방식이 가능하다.

[0211] 탄소 고갈시의 발현에서 Δ6* 결실 (추정적 Gcr1p 결합 부위를 포함함)의 관련성은 메탄올 유도 없이 매우 높은 GFP-Zeo 발현을 지닌 다중카피 균주의 관찰에 의해 강조된다. 소위 P. 파스토리스 X-33 d6*F10의 Δ1-Δ9 시리즈의 최적의 클론의 GFP-Zeo 발현을 도 5에 나타내었다. GFP-Zeo 발현은 메탄올 유도 후 단일 카피 야생형 프로모터 균주 (X-33 GFP-Zeo D2)에서 보다 상기 Δ6* 다중카피 균주에서의 탈억제 (미세규모로 60시간)후 약 10%가 높았다. 메탄올 유도 후의 P. 파스토리스 X-33 d6*F10의 발현 수준은 또한 야생형 프로모터를 지닌 다중카피 균주 (X-33 GFP-Zeo E2) 보다 훨씬 높았다.

[0212] P. 파스토리스 *AOX1* 및 *DAS1* 및 H. 폴리모르파 *MOX* 프로모터 영역은 S. 세레비지애에서 리포터 효소인 베타-갈락토시다아제 (대장균의 lacZ)의 발현을 촉진한다 [9]. S. 세레비지애에서의 상기 유전자의 조절 패턴은 이들의 천연 숙주와 유사하다: 글루코오스는 유전자 발현을 억제한다. 탄소 고갈 조건에서, 발현은 약간 탈억제되고, 탄소원으로서의 글리세롤은 발현을 유도한다. S. 세레비지애에서 *AOX1* 및 *DAS1* 조절 영역의 제어하에서 발현된 베타-갈락토시다아제 수준은 강한 S. 세레비지애 *CYC1* (구성적) 및 *GAL2* (유도성) 프로모터를 이용하여 수득된 것에 필적한다 [9]. *MOX* 프로모터에 의해 구동된 발현이 또한 S. 세레비지애에서 에타올, 메탄올 및 올레산에 의해 유도된다는 것이 입증되었다. 또 다른 매우 중요한 발견은 프로모터의 탈억제/유도에서의 Adr1p의 관련성이다. S. 세레비지애에서의 *ADH2* (알코올 탈수소효소 2)의 양성 효과기인 Adr1p 및 몇몇 퍼옥시좀 단백질이 또한 글루코오스가 배지에 결핍된 경우 *MOX* 프로모터의 양성 효과기이다.

[0213] 상기 언급한 바와 같이, 글리세롤이 존재하는 경우 *MOX*의 탈억제로 인해 *AOX1* 및 *MOX* 유전자의 조절 패턴은 이의 천연 숙주에서 현저하게 상이하다. H. 폴리모르파의 *AOX1* 프로모터 영역의 이용은, *AOX1* 프로모터가 이종성 숙주에서 글리세롤에 의해 억제되지 않음을 나타내었다 [26]. 따라서, 이종성 *AOX1* 프로모터는 동종성 *MOX* 프로모터와 같이 조절되는 듯 하다. 이는 P. 파스토리스와 H. 폴리모르파 사이의 조절 패턴에서의 현저한 차이가 상기 두 효모의 상이한 탄소원에 대한 전체적인 전사 반응에 기인된다는 것을 암시한다. 한편, P. 파스토리스에서는 글리세롤 및 글루코오스 억제 기구가 (부분적으로) 동일하지만, H. 폴리모르파 (S. 세레비지애와 같음)에서는 상기 상황은 상이하고, 글리세롤은 글루코오스 억제 기구를 이용하지 않는다.

[0214] *AOX1* 프로모터 서열에서 발견된 세개의 추정적인 HAP2/3/4/5 결합 부위중 두개가 Δ1 결실 작제물에 존재하고, 세번째는 Δ5에 존재하였다. Δ1의 서열 결실은 메탄올 유도후 프로모터 활성을 증가시킨 반면, 탈억제 프로모터 수준에 대한 효과는 관찰되지 않았다. 대조적으로, Δ5의 결실은 탈억제 조건 뿐만 아니라 유도 조건하에서 프로모터 활성을 심각하게 감소시켰다. Δ1 결실에서, 추정적인 아스퍼길루스 니둘란스 abaA 결합 부위가 발견되었다. abaA 유전자 생성물은 A. 니둘란스에서 발달된 분생포자병 (무성 생식 기구)과 관련된 전사 활성인자이다 [27]. 모든 추정적 결합 부위가 가능한 활성인자 서열이므로 [27], 이들의 결실은 Δ5 작제물에서 발견되는 바와 같이 발현 수준에 대해 음성 효과를 지녀야 한다. 둘 모두의 결실이 매우 길다는 사실로 인해, 또 다른 결합 부위가 관찰된 효과의 원인이 될 수 있다. Δ1의 결실이 발현 수준에 대해 반대 효과를 지닌다는 사실은 추정 결합 부위중 하나가 억제 모티프이거나, 추정적 HAP 및 abaA 결합 부위의 결실의 효과를 초과하는 또 다른 결합 부위가 존재함으로써 발현 수준을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0215] 그럼에도 불구하고, HAP 복합체는 S. 세레비지애에서의 호흡 및 에너지 물질대사와 관련된 유전자의 상향조절을 책임지는 것으로 공지되어 있다. 호흡의 조절은 Hap 복합체에 의해 매개되는, 배지에 존재하는 산소 수준 뿐만 아니라 탄소원에 의해 조절된다. 발효성 효모 S. 세레비지애에서, 여러 유전자 및 이에따른 호흡사슬 뿐만 아니라 시트르산 사이클의 기능은 글루코오스에 의해 억제된다. 호흡의 글루코오스 억제는 Hap 복합체, 즉 글루코오스가 존재하는 한 Hap4p의 부재에 의해 부분적으로 매개된다. 대조적으로, 산소 의존성 조절은 Hap1p에 의해 조절되는 듯 하다 [28]. Hap 복합체 유전자의 동족체가 호흡성 효모 K. 락티스에서 단리되었다. 호흡과 관

련된 유전자는 글루코오스의 존재하에서도 호흡성 효모에 의해 구성적으로 발현된다. 지금까지, 거의 모든 호흡사슬 유전자는 Hap 복합체로부터 독립적으로 조절되는 것으로 밝혀졌다 [29]. Hap 복합체의 역할은 탄소 및 질소 동화와 통합되어 있는 듯 하고, 이는 또한 S. 세레비지애 [30] 및 아스퍼길루스 니둘란드 [29]에서 밝혀졌다.

[0216] 주로 P. 파스토리스의 *AOX1* 유전자 생성물에 의해 촉매되는 메탄올 이용 경로에서의 첫번째 단계는 산소 소모이다. 에너지 물질대사와 관련된 대부분의 유전자 및 산소-소모 효소를 엔코딩하는 거의 모든 유전자는 산소, 주로 Hap1p 및/또는 Hap2/3/4/5p에 의해 조절된다 [28]. 단독 에너지 및 탄소원으로서 메탄올에서 성장하는 경우, 메탄올 이용 경로는 탄소 동화 및 에너지 생성을 일으킨다. *AOX1* 프로모터의 조절에서의 Hap 복합체 인지 모티프인 TTCCAA의 관련성이 직관적 감각으로 판단된다.

[0217] 두번째 추정적 HSF 결합 부위를 포함하는 Δ4 작제물은 탈억제 및 유도 후에 프로모터 활성을 30% 감소시켰다. 따라서, HSF는 탈억제 뿐만 아니라 유도 조건하에서 *AOX1* 유전자 발현의 일반적인 인핸서이다. S. 세레비지애에서, 열쇼크, 산화적 스트레스 및 글루코오스 고갈과 같은 여러 스트레스 조건은 HSF의 활성화를 야기시킨다. "물질대사 주요 스위치 (metabolic master switch)"중 하나인 단백질 키나아제 Snf1p가 인산화 및 이에따른 탄소고갈시 HSF의 활성화와 관련된다는 것이 또한 입증되었다 [31]. 따라서, 글루코오스 고갈 (유도 존재 또는 부재)시 *AOX1*의 완전한 활성화에서 HSF의 참여가 발생한다.

[0218] 트렁케이션된 형태 뿐만 결실된 서열을 지니는 변이체를 이용한 *AOX1* 프로모터의 발현 연구가 기존의 당 분야에 공개되어 있다 [32, 33].

[0219] 표 14: 아이넌 등 (Inan et al.)에 의한 프로모터 연구 결과 [32, 33]; 유도를 탄소원으로 0.5% 메탄올을 이용하여 수행하였고, 억제를 0.5% 메탄올 및 0.5% 에탄올을 이용하여 수행하였다; 시작 위치는 전사 시작점 (ATG)와 관련하여 *AOX1* 프로모터 내의 서열의 5' 말단을 나타낸다.

프로모터 단편	SEQ ID No.1을 참고로 한 결실	상대 활성[%]	
		유도	억제
InanABCDEF	-	100	3.1 ± 0.3
Inan_BCDEF	7 내지 152 (-947 내지 -802)	76 ± 5	1.9 ± 0.2
Inan__CDEF	1 내지 292 (-947 내지 -661)	49 ± 4	2.2 ± 0.5
Inan___DEF	1 내지 432 (-947 내지 -521)	14 ± 3	1.3 ± 0
Inan____EF	1 내지 559 (-947 내지 -394)	24 ± 7	1.8 ± 0
Inan_____F	1 내지 798 (-947 내지 -245)	7 ± 2	1.8 ± 0.2
InanA_CDEF	153 내지 292 (-801 내지 -661)	63 ± 3	2.1 ± 0.2
InanAB_DEF	293 내지 432 (-660 내지 -521)	109 ± 12	3.8 ± 0.4
InanABC_EF	433 내지 559 (-520 내지 -394)	128 ± 6	5.0 ± 0.6
InanABCD_F	560 내지 798 (-393 내지 -245)	16 ± 1	0.8 ± 0.2

[0220]

[0221] 153 (-801)에서 시작하는 작제물 Inan_BCDEF (표 14)는 153 (-801)의 하나 이상의 활성인자 단백질 업스트림의 결합 부위를 나타내었다. 이러한 활성인자 결합 부위의 후보자는 매트인스펙터 (MatInspector)를 이용하여 발견된 상보성 가닥 상의 Hap1p (52 내지 66, -902 내지 -888) 및 HSF (135 내지 155, -819 내지 -799)의 결합 부위이다. Sac I 제한 부위 (210-215 (-744 내지 -739))에서의 트렁케이션은 야생형 프로모터 활성에 거의 근접한 프로모터를 발생시켰다 (Geoff Lin Cereghino, Poster, Sixth Meeting on "Current Topics in Gene expression and Proteomics", San Diego, October 19-22, 2003). Sac I 트렁케이션된 프로모터 작제물 (pHWGO, Geoff Lin Cereghino, poster)을 이용하여 야생형 프로모터 수준에 도달시키기 위해, 억제 단백질에 대한 두번째 결합 부위가 210 (-744)의 업스트림에 존재할 수 있으며, 이의 결실은 프로모터 활성에 대해 동일한 영향 (반대 방향)을 지닌다. Δ1 작제물 (Δ 169 (-784) 내지 234 (-719))이 억제 결합 부위를 지니므로, 억제 단백질의 위치는 169 (-784) 내지 210 (-744)에 존재한다. Δ1의 결실은 프로모터 활성을 20% 증가시켰고 (표 14), 이는 활성인자 단백질 결합 부위의 결실에 의한 감소 범위이다.

[0222] Δ4 (Δ 508 (-445) 내지 550 (-403))와 비교함으로써, 억제 단백질 결합 부위의 위치가 433 (-520) 내지 508 (-445) 사이의 서열로 추가로 상세화될 수 있는데, 이는 Δ4 결실이 516 내지 536 (-438 내지 -418)에 양성적으로 작용하는 전사 인자인 HSF를 포함하기 때문이다. 양성적으로 작용하는 HSF (HSF인 경우)가 제시된 영역 내에 위치하는 경우, 433 내지 508 (-520 내지 -445) 사이의 억제인자 결합 부위의 강력한 영향이 암시될 수 있다. HSF에 대한 결합 부위가 508 내지 536 (-445 내지 -418) 사이의 영역에 위치하는 경우, 또 다른 활성인자 결합 부위가 536 내지 560 (-418 내지 -393)에 위치한다. 그렇지 않은 경우, 동일한 결합 부위일 것이다. InanABCD_F (Δ 560 내지 709 (-393 내지 -245)) 변이체가 단지 16%의 야생형 활성을 지닌 바와 같이, Δ5 작제물 (624 내지 682 (-329 내지 -271)) 또한 야생형 수준의 약 70%로 감소하였다. 예상되는 바와 같이, 완전한 길이의 프로모터로부터의 Inan B 단편의 결실 (InanA_CDEF 생성) 뿐만 아니라 Inan_BCDEF로부터의 Inan B 단편의 결실 (Inan_CDEF 생성)은 각각 긴 단편의 63 및 64%로 감소하였다. 대조적으로, 완전한 길이의 프로모터로부터의 C 단편의 결실은 프로모터 활성의 약 10%가 증가한 반면, 트렁케이션된 Inan_CDEF 단편으로부터의 결실은 49 내지 14% 감소하였다 (표 14). 상기에 대한 해석은 이들의 결합 부위의 상황에 따른 전사 인자의 상승작용적 결합이다. 713 내지 760 (-241 내지 -194) 사이에, 마지막 활성인자 단백질 결합 부위가 위치한다 (Geoff Lin Cereghino, Poster San Diego). 또한, Δ7 작제물 (Δ 729 내지 763, -225 내지 -191)에 의해, 활성인자의 위치가 729 (-225)에 대해 다운스트림으로 상세화될 수 있다.

[0223] 결론적으로, *AOX1* 프로모터의 발현 수준에 강한 영향을 지니는 여러 영역이 밝혀졌다. TATA box 및 전사 개시 부위를 제외하는 본원에 제공되고 기타 저자에 의해 제공된 모든 공지된 조절 부위의 조합에 의해, 10개 이상의 조절 부위가 P_{AOX1} 프로모터 서열에 존재한다.

[0224] 제공된 데이터는 *AOX1* 프로모터의 협동적인 조절을 나타내었다: 여러 인자가 최대 발현 수준을 위해 DNA에 결합하는 것이 필요하다. 유도 조건하에서, 여러 양성 작용 전사 인자 (활성인자)는 DNA에 결합하는 반면, 대부분의 억제 단백질은 결합하지 않아 매우 높은 수준으로 발현이 된다. 탈억제 동안, 프로모터 활성은 유도 수준의 단지 작은 퍼센트 (~3%)에 도달하였다. 이는 주로 프로모터 영역에 대한 보다 적은 활성인자 및 보다 많은 억제 단백질의 결합으로 인한 것으로 보인다. 억제 조건하에서, 활성인자는 DNA에 결합하지 않고 여러 억제인자가 DNA에 결합하여, 억제 조건하에서 활성인자에 대한 억제인자의 비가 추가로 증가하는 것으로 추정할 수 있다.

[0225] 누클레오솜에 매우 인접한 활성인자 단백질 (예를들어, Adr1p)의 결합이 불안정화를 야기하여, 이에따라 탈억제 후에 크로마틴의 재배열이 발생한다는 것이 S. 세레비지애의 글루코오스 억제된 *ADH2* (알코올 탈수소효소 2) 프로모터에 대해 입증되었다. 재배열은 TATA box의 영역에서 발생하고, 따라서 전사 개시 부위는 이들의 접근성을 증가시킨다. 따라서, 보다 높은 접근성으로 인해, 안정한 개시전 복합체의 형성이 프로모터 활성을 기본 수준으로 증가시킨다. P_{AOX1} 구동 발현을 향상시키는 여러 전사 인자의 결합 중에서, 적어도 탈억제에 대해서는 유사한 메커니즘이 가정될 수 있다. 모든 데이터 및 가정을 함께 취합하면, *AOX1* 프로모터의 조절은 매우 복잡하며, 여러 (양성 작용 및 음성 작용) 전사 인자의 추정적 결합 부위는 *AOX1* 프로모터의 조절을 위한 광범위한 신호를 통합할 수 있는 매우 협동적인 기구임을 나타낸다.

[0226] VI) *AOX1* 프로모터의 PCR 돌연변이유발

[0227] 본원에서, 전사 인자 결합 부위의 코어 서열 내의 특정 돌연변이가 이들의 효과기 효력을 현저하게 변화시키는 것이 입증되었다. 추정적으로, 소수의 활성인자 및 억제인자 단백질은 *AOX1* 프로모터에서 작용하여 이의 매우 강한 조절 (대부분 글루코오스 하에서 활성이 없고, 메탄올에서 매우 강한 활성이 있음)을 야기한다. 따라서, *AOX1* 프로모터의 무작위 돌연변이유발은 파괴되거나 감소된 억제인자 결합 부위 활성을 지니는 여러 프로모터 변이체를 발생시켜야 한다. 다양한 돌연변이율을 지니는 일련의 PCR 반응을 수행하였다. 생성된 프로모터 변이체를 *AOX1* 유전자가 GFP-Zeo로 대체된 균주인 P. 파스토리스 GFP-Zeo Mut^{S} A9 균주로 형질전환시켰다. 돌연변이된 프로모터 변이체에 의한 야생형 *AOX1* 프로모터의 대체는 특정 비율로 발생시켜야 한다. 글루코오스가 배지 내에 존재하는 경우 보다 높은 발현 속도를 지니는 프로모터 변이체에 대한 스크리닝을 MD-Zeo 아가 플레이트 상에서 수행하였다.

[0228] 100 μg/ml의 제오신™을 함유하는 MD 아가 플레이트 상의 스프레딩은 피키아 파스토리스 세포가 얼룩진 플레이트를 생성시켰고, 단일 콜로니가 명백하지 않았다. 이는 선택압이 야생형 균주의 성장을 억제하기에 충분하지 않은 것으로 보인다. 글루코오스가 존재하는 경우 형광이 P. 파스토리스 GFP-Zeo Mut^{S} A9 균주에서 검출되지 않았으나, 소수의 GFP-Zeo 단백질은 제오신™ 내성을 부여하는 세포에서 발현될 수 있었다. GFP-Zeo Mut^{S} A9

균주의 성장 억제를 위한 보다 높은 제오신™ 농도를 시험하기 위해, 상기 기술된 바와 같은 점적 테스트를 수행하였다.

[0229] 도 6에서 명백하게 확인할 수 있는 바와 같이, 200 μg/ml로의 증가는 *AOX1* 프로모터의 제어하에서 GFP-Zeo 유전자를 지니는 P. 파스토리스 균주의 세포 생활성을 감소 (100 μg/ml에 비해서)시키지 않았다. 프로모터의 돌연변이유발은 단지 약간의 증가된 발현 수준을 야기시키므로, 500 μg/ml의 제오신™의 선택압은 너무 높은 것으로 보인다. 최종적으로, 돌연변이 프로모터 변이체의 모든 추가의 스크리닝을 위해 350 μg/ml을 선택하였다.

[0230] 관련된 다수의 프로모터 영역과의 매우 복잡한 전사 조절로 인해, 높은 돌연변이유발률을 이용하는 무작위 돌연변이 방법이 유리하다.

[0231] **실시예 2**: 프로모터 결실 생성

[0232] 실시예 1의 결과에 기초하여, 두번째 결실 변이체를 생성시켰다. 첫번째 시리즈와는 대조적으로, 이러한 신규한 결실 작제물은 단지 작았고, 추정적 전사 인자 결합 부위 (5-15 bp)의 특정 서열 스트레치가 결실되었다 (표 15).

[0233] 표 15: 탈억제 (글루코오스 고갈) 및 메탄올 유도 후의 발현 수준에 대한 특정 전사 인자 결합 부위의 결실의 효과. 돌연변이 Δ1-Δ9 뿐만 아니라 단일 돌연변이의 조합물이 또한 사용된다. 모든 수는 동일한 조건 하에서의 야생형 프로모터 활성에 비한 상대 프로모터 활성이다.

결실	바라이크 폰 (Bereich von) Seq ID No. 1	영역	결실 (진하고 밑줄친 글씨로 나타냄) 및 인접 5′ 누클레오티드 (5′ 및 3′)	양성적 영향
ΔHap1	-900 내지 -896	Inan A	GCCATCGGACATCCA	유도 조건 하에서 발현 증가
ΔHsf_1	-812 내지 -805	Inan A	GGACCTCGACTCCTCTTC	다중카피 균주의 생성, 유도 조건 하에서 발현 증가
Δ1	-784 내지 -719	Inan B	CCACTTTGGCATCGAAAAGCGAGCCAGTTATTGGGCTTGATTG-GAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGG	유도 조건 하에서 발현 증가
ΔHap2345_1	-758 내지 -754	Inan B, Δ1	CAGTTATTGGGCTTG	다중카피 균주의 생성
ΔHap2345_2	-748 내지 -744	Inan B, Δ1	GCTTCATTGGAGCTC	다중카피 균주의 생성
ΔabaA	-735 내지 -730	Inan B, Δ1	TCGCTCGATTCCAATTC	다중카피 균주의 생성
ΔStre	-673 내지 -669	Inan B	TGGCCCCCCTGGCGA	유도 조건 하에서 발현 증가
Δ2	-650 내지 -604	Inan C	TTTGTTTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTTACACCCGAAGAT-CACTCCAGATG	탈억제 조건 하에서의 보다 높은 발현
ΔRap1	-619 내지 -615	Inan C, Δ2	ATTACACCCGAACAT	다중카피 균주의 생성
Δ3	-590 내지 -561	Inan C	GCTTTTGTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCCAA	
ΔAdr1	-583 내지 -577	Inan C, Δ3	GAGTCTGGGGGTCAAATA	다중카피 균주의 생성
Δ4	-445 내지 -403	Inan D	AGTTCAGAAGCAAAACGGTATGCCGACTTTTG-GAAGTTTCTTTTTGACTTTGGT	
ΔHsf_2	-437 내지 -430	Inan D, Δ4	AAAAAGAAACTTCCAAAA	

[0234]

Δ5	-329 내지 -271	Inan E	GAACCCGGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACAC-CCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTC	다중카피 균주의 생성
ΔHap2345_3	-286 내지 -282	Inan E, Δ5	CGCTTTTTGGATGAT	
ΔMat1MC	-271 내지 -267	Inan E, Δ5°	TATGCATTGTCTCCA	
Δ6	-260 내지 -231	Inan E & F	TCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAAATACTGC	
Δ6*	-260 내지 -231	Inan E & F	TCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAAATACTGC	탈억제 조건 하에서의 보다 높은 발현,
	-217 내지 -216	Inan F	TAGCCTAACGTT	탈억제 조건 하에서 높은 발현을 지닌 수퍼 클론의 생성
				다중카피 균주의 생성
ΔGcr1	-252 내지 -248	Inan E, Δ6	GTATGCTTCCAGAT	
Δ7	-225 내지 -191	Inan F	ACTGCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAA	
ΔQA-1F	-207 내지 -193	Inan F, Δ7	TTCATGATCAAAATTTAACTGTTCT	다중카피 균주의 생성, 탈억제 조건 하에서 활성 증가
ΔQA-1Fzus	-218 내지 -213	Inan F, Δ7	ATAGCCTTAACGTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCT	탈억제 조건 하에서 활성 증가
	-207 내지 -193			
ΔHsf_2_dHap2345_1	-758 내지 -754	Inan B, Δ1	CAGTTATTGGCTTG	다중카피 균주의 생성
	-437 내지 -430	Inan D, Δ4	AAAAAGAAACTTCCAAAA	
	-758 내지 -754	Inan B, Δ1	CAGTTATTGGCTTGATTGGAGCT	
Δ Hsf_2_dHap2345_1zus	-747 내지 -745	Inan B, Δ1	AAAAAGAAACTTCCAAAA	

[0235]

	-437 내지 -430	Inan D, Δ4		
ΔHsf_2_ MatlMC	-437 내지 -430	Inan D, Δ4	AAAAAGAAACTTCCAAAA	다중카피 균주의 생성
	-271 내지 -267	Inan E, Δ5°	TATGCATTGTCTCCA	
Δ8	-170 내지 -154	Inan F	ACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCT	
Δ9	-131 내지 -93	Inan F	ACCTTTTTTTTTTAATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAAT-TGCGACTGG	
Δ2Δ6	-650 내지 -604	Inan C	TTTGTTTATTTTCGGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCGAACAT-CACTCGAGATG	
	-260 내지 -231	Inan E & F	TCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGC	
Δ736-41	-218 내지 -213	Inan F, Δ7	ATAGCGTTAAGGTTCAT	
Δ737-38	-217 내지 -216	Inan F, Δ7	TAGCCTTAACGTT	
ΔInD-d4m	-402 내지 -394	Inan D	CTTGTTTTGGTATTGATTGA	
ΔD-d4	-520 내지 -446	Inan D	CTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGAATCTCATCCAAGAT-GAACTAAGTTTGGTTCGTTTGAAAATGCTAAACGGCCAGTTGCTTGG	
Δ1-1	-784 내지 -763	Inan B, Δ1	CCACTTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTA	
Δ1-2	-762 내지 -741	Inan B, Δ1	AGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAAGCTCGCT	
Δ1-3	-740 내지 -719	Inan B, Δ1	GGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGG	
Δ1-SacI	-762 내지 -744	Inan B, Δ1	CCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGAT-TGGAGCTC	
Ohi, et al, AOX2 UAS	-228 내지 -199	Inan F, Δ7	AATACTGCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTAATAC	
Ohi, et al, AOX2 UAS	-369 내지 -337	Inan E	TAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTTAATC	

[0236]

Ohi, et al, AOX2 URS2	-333 내지 -294	Inan E CGC	TTCTCAACCCCGGTGCACGTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACC

[0237]

[0238] 재료 및 방법:

[0239] a) 돌연변이유발:

[0240] 문헌[Wang et al.][34]에 따른 2 단계 부위 특이적 돌연변이유발 프로토콜을 이용하여 모든 결실을 도입시켰다. 첫번째 단계에서, 두개의 별개의 반응물 (하나는 정방향 프라이머이고, 다른 하나는 역방향 프라이머임)을 평가하였다 (50 μl의 전체 부피로 적절한 완충 조건하에서 100 ng의 pAOX 주형, 15 pmol의 프라이머, 200 μM의 각각의 dATP, dTTP, dCTP 및 dGTP, 2.5 U의 *PfuUltra™* 중합효소). 25 μl의 이러한 2 PCR 반응물을 조합시키고, 두번째 PCR 반응 단계를 수행하였다.

[0241] 1 μl의 *Dpn I* 제한 효소 (10 u/μl)를 30 μl의 두번째 PCR 반응 단계에 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1-5 μl의 *Dpn I* 분해된 PCR 반응물을 전기적격 대장균 세포 [16]로 형질전환시키고, SOC 배지에서 1시간의 재생 후에 LB-Amp 플레이트에 플레이팅시켰다.

[0242] 표 16: 전사 인자 결합 부위 결실의 부위 특이적 돌연변이유발을 위한 프라이머

결실	명칭	서열(5'-->3')	SEQ ID No.
Hap1	Hap1fw	GAATGAAACCTTTTTGCCATA-TCCACAGGTCCATTCTCAC	53
	Hap1rv	GAATGGACCTGTGGATATGGCAAAAAG-GTTTCATTCAACC	54
Hsf_1	Hsf_1fw	CCGTTGCAAACGCAG-GACCTCTTCTCCTCAACACCCAC	55
	Hsf_1rv	GTGTTGAGGAGAAGAGGTCCT-GCGTTTGCAACGGTCTG	56
Hap2345_1	Hap2345_1fw	CGAAAAACCAGCCCAGTTGCTTGATTG-GAGCTCGCTCATTCC	57
	Hap2345_1rv	GAGCGAGCTCCAATCAAGCAACTGG-GCTGGTTTTTCGATG	58
Hap2345_2	Hap2345_2fw	CAGCCCAGTTATTGGGCT-TGAGCTCGCTCATTCCAATTCC	59
	Hap2345_2rv	GGAATTGGAATGAGCGAGCTCAAGC-CCAATAACTGGGCTG	60
ABAA	ABAAfw	GGCTTGATTG-GAGCTCGCTAATTCCTTCTATTAGGC-TAC	61
	ABAArv	GTAGCCTAATAGAAGGAATTAGC-	62

[0243]

결실	명칭	서열(5'-->3')	SEQ ID No.
		GAGCTCCAATCAAGCC	
Stre_1	Stre_1fw	GCCTGTCTATCCTGGCCGGCGAG-GTTCATGTTTGTTTATTTC	63
	Stre_1rv	CAAACATGAACCTCGCCGGCCAG-GATAGACAGGCTAATAAAG	64
Rap1	Rap1fw	GCAACAAGCTCCGCATTACAACAT-CACTCCAGATGAGG	65
	Rap1rv	CCTCATCTGGAGTGATGTTGTAATGCG-GAGCTTGTTGC	66
Adr1	Adr1fw	CCAGATGAGGGCTTTCTGAGT-GAAATAGTTTCATGTTCCC	67
	Adr1rv	GGGAACATGAAACTATTTCACT-CAGAAAGCCCTCATCTGG	68
Hsf_2	Hsf_2fw	GCCAGTTGGTCAAAAACAAAAGTCG-GCATACCGTTTGTC	69
	Hsf_2rv	CGGTATGCCGACTTTTGTTTTTGAC-CAACTGGCCGTTAGC	70
Hap2345_3	Hap2345_3fw	CAAATGGGGAAACACCCGCTTATGAT-TATGCATTGTCTCCAC	71
	Hap2345_3rv	GAGACAATGCATAATCATAAGCGGGT-GTTTCCCCATTTGCG	72
Mat1MC	Mat1MCfw	GCTTTTTGGATGATTATGCCTCCACAT-TGTATGCTTCCAAG	73
	Mat1MCrv	CTTGGAAGCATACAATGTGGAG-GCATAATCATCCAAAAAGC	74
Gcr1	Gcr1fw	CATTGTCTCCACATTGTAT-GAAGATTCTGGTGGGAATACTGC	75
	Gcr1rv	GTATTCCCACCAGAATCTTCATACAAT-GTGGAGACAATGC	76
QA-1F	QA-1Ffw	GCTGATAGCCTAACGTTCAT-GTTCTAACCCCTACTTGACAGC	77
	QA-1Frv	GTCAAGTAGGGGTTAGAACATGAACGT-TAGGCTATCAGCAG	78
736-741	d736-41fw	GGAATACTGCTGATAGCTTCATGAT-CAAAATTTAACTGTTC	79
	d736-41rv	GTTAAATTTTGATCATGAAGCTAT-CAGCAGTATTCCCACC	80
737-738	d737-38fw	GGAATACTGCTGATAGCCACGTTCATG-ATCAAAATTTAACTG	81

[0244]

[0245]

결실	명칭	서열(5'-->3')	SEQ ID No.
	d737-38rv	GTTAAATTTTGATCATGAACGTG-GCTATCAGCAGTATTCC	82

[0246] b) 피키아 파스토리스 형질전환 및 클론의 특성규명:

[0247] 상기 기재된 바와 같이 제작되는 플라스미드를 제조하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 피키아 파스토리스로 형질전환시켰다.

[0248] 결과 및 논의:

[0249] 실시예 1의 보다 대량의 결실에 대해 이미 기술된 바와 같은 실시예 2의 짧은 돌연변이를 이용하는 경우 발현 수준에 대한 강한 효과가 관찰되었고, 여기서 모든 돌연변이는 프로모터 활성에 대해 현저한 양성적 또는 음성적 효과를 지닌다. 특정 전사 인자 결합 부위의 짧은 결실은 프로모터 활성에 대해 강한 영향을 지니고, 개별적 조절 부위 (예를들어, 전사 인자 결합 부위)의 조절 특성에 관한 보다 정밀한 정보를 제공한다. Gcr1이 특히 흥미로운데, 이는 이의 결합 부위가 Δ6 결실 내에 포함되기 때문이다. pAOXΔ6 결실 돌연변이의 프로모터 영역 및 피키아 파스토리스 클론의 유전체 DNA의 콜로니 PCR 생성물의 서열분석은 프로모터 영역 내에 추가의 결실을 나타내었다 (Seq ID No. 1의 누클레오티드 737 내지 738 (-217 내지 -216)의 결실). 이러한 프로모터 변이체가 이후에 탈억제 조건하에서 보다 높은 발현 속도를 생성시키는 증가된 프로모터 활성을 야기시킨다는 사실로 인해, 추가의 돌연변이가 본 발명에 따른 프로모터에 도입되어 상기 조건하에서 단백질 발현을 증가시킬 수 있다.

[0250] 추가의 결실 (Seq ID No. 1의 누클레오티드 736 내지 741 (-218 내지 -213)의 결실)을 지닌 QA-1F 클론의 프로모터 활성은 이러한 추가 결실을 지니지 않은 ΔQA-1F 프로모터에 비해 현저하게 상이하였다: 이러한 활성은 야생형 활성의 ~30% (탈억제) 및 ~100% (유도) (AOX1ΔQA-1F, 표 15 참조)로부터 각각 ~140% 및 ~70% (AOX1ΔQA-1Fzus, 표 15 참조)로 변화되었다. 이들 6개의 누클레오티드의 추가 결실은 프로모터 활성에 극적인 영향을 지니는 것으로 보인다. 따라서, 이러한 돌연변이 (Δ736-741)를 지니는 신규한 프로모터 변이체를 상기 기술된 바와 같은 부위 특이적 돌연변이유발 프로토콜에 의해 도입시켰다. 이러한 영역에서 우연적 및 독립적으로 2배에 이른 둘 모두의 돌연변이는 탈억제 조건하에서 프로모터 활성을 증가시켰다. 둘 모두의 작제물에서 두번째의 가장 음성적으로 영향을 미치는 돌연변이가 존재하였으나, 프로모터 활성에서 증가가 있었다는 것이 주목할 만하다.

[0251] Δ2 및 Δ6의 조합물 (Δ2Δ6)을 중첩 신장 PCR에 의해 단일 결실과 유사하게 생성시켰다. 둘 모두의 단편의 결실이 탈억제 뿐만 아니라 유도 조건하에서 프로모터 활성의 매우 강한 감소를 야기시킨다는 것이 표 17에 명백히 나타나 있다. 상기 언급된 Δ6* 작제물에 비해 상기 작제물에서는 추가의 TA 결실이 존재하지 않기 때문에, 상기 결과는 우연하게 발생된 추가 돌연변이 (Δ737-38)가 탄소 고갈 후의 프로모터 활성에서의 증가를 책임진다는 추측을 뒷받침한다.

[0252] 여러 결실은 프로모터 활성을 극적으로 감소시켰다 (예를들어, Hsf 뿐만 아니라 Hap1 및 Hap2345_1). 이러한 추정적 결합 부위는 프로모터 활성을 증가시키기 위한 서열 중복화에 대한 우수한 표적이다.

[0253] 흥미롭게도, 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 생성된 Δ736-741 변이체의 4개의 클론중 2개에서, 위치 552 내지 560 (-402 내지 -394)에서 9개의 누클레오티드 (TTGGTATTG)의 신규한 결실이 발견되었다. 별개의 영역에서 발견된 결실의 효과가 또한 ΔHsf_2 작제물에서 발견되었다. 이러한 효과는 국소적인 서열 상동성에 기인되는 것으로 예상된다. 따라서, 이러한 추가의 결실된 영역 (Δ552-560, Δ737-38 및 Δ736-41) 및 근접한 서열 (5 bp의 업스트림 및 다운스트림)이 또한 추정적인 전사 인자 결합 부위이고, 이에따라 결실 및 중복화에 대한 매우 흥미로운 표적이다. 결실 변이체 Δ736-41은 메타올 유도 조건하에서 발현 수준의 감소를 향상시켰다.

[0254] *다중카피-균주:*

[0255] 대부분의 경우에서, 다중카피 균주의 생성은 GFP-Zeo 과발현 균주를 생성시켰다. 다수의 경우에서, 이들 균주는 주로 메탄올 유도 조건하에서 d6*F10 균주보다 높은 발현 수준을 지닌다. 다중카피 균주의 생성은 여러 작제물, 특히 Δ6* 작제물, 이중결실 d2d6, Δ1, Δ2 및 Δ6* 결실 및 예를들어 Gcr1, Rap1, abaA, Hap2345_1 뿐만 아니라 예를들어 QA-1F, Adr1, Hsf_2_Mat1MC 및 Hsf_2_Hap2345_1을 포함하는 작제물을 이용하여 달성가능하다 (도 7 참조). 이러한 균주에서, d6*F10 균주에 비해 유도 조건하에서의 보다 높은 발현 속도가 발견되었다. 대조적으로, d6*F10 균주는 탈억제 조건하에서 공지되어 있는 임의의 기타 균주 보다 더욱 GFP-Zeo를 생성시킬

수 있었다. 피키아 파스토리스로의 Δ6* 작제물의 반복된 형질전환은 특히 탈억제 조건하에서 d6*F10 균주에 필적하는 활성을 지닌 다수의 다중카피 균주를 생성시켰다 (도 8).

[0256] 야생형 프로모터 작제물을 이용시, 프로모터 변이체를 이용하는 경우 보다 훨씬 낮은 빈도의 다중카피 균주 (예를들어, E2 균주)가 관찰되었다. 2-4회 이상의 형질전환주를 분석하였으나, 최적의 형질전환주 E2의 발현 수준은 단일 카피 형질전환주보다 단지 2배였다. 결론적으로, 프로모터 변이체의 형질전환은 보다 높은 빈도의 다중카피 균주를 생성시키고, 이러한 균주는 다중카피 야생형 프로모터 균주 보다 다양하고, 더욱 생산적이다.

[0257] **실시예 3**: 대안적 리포터 단백질

[0258] 기타 기본적으로 잘 발현되고 산업적으로 적절한 단백질 (예를들어, 효소)에 대한 모든 GFP-Zeo 결과의 실시 가능성을 시험하기 위해, 몇몇 프로모터 변이체를 상기 리포터 효소 (예를들어, PaHNL5α 및 HRP)의 앞쪽에 클로닝시켰다.

[0259] *클로닝:*

[0260] 프로모터 변이체를 벡터 pPICZαB-HRP-WT [35] 및 pGAPZ A-PaHNL5α로 클로닝시켰다. pPICZαB-HRP-WT에서의 프로모터 교환을 위해, *Nde I* 제한 부위를 부위 특이적 돌연변이유발 (주형으로 100 ng의 벡터, 프라이머 Nde1PICZfor 및 Nde1PICZrev - 표 18 참조)에 의해 프로모터의 5' 말단에 삽입시켰다. 생성된 벡터를 pPICZαB-*Nde I*-HRP-WT로 명명하였다.

[0261] 표 18: pPICZαB-HRP-WT내의 *Nde I* 제한 부위의 도입 및 프로모터 교환을 위한 부위 특이적 돌연변이유발을 위한 프라이머

[0262]

명칭	서열(5'-->3')	Seq ID No.
Nde1PICZfor	GAGATCAGATCTAACATATGCCAAAGACGAAAG-GTTG	83
Nde1PICZrev	CAACCTTTCGTCTTTGGCATATGTTAGATCTG-ATCTC	84
AOX1NDE1	AAACATATGAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGG	85
AOX1rev	TGGTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTG	86

[0263] pGAPZ A-PaHNL5α 발현 클론을 위해, 우선 PaHNL5α 유전자를 pHIL-D2 벡터 (Glieder, A., et al. Angew. Chemie Int. Ed. 2003)로부터 pGAPZ A 벡터로 클로닝시켜, 플라스미드 pGAPZA-PaHNL5α를 생성시켰다. pGAPZ A-PaHNL5α로의 프로모터 변이체의 클로닝은 pGAPZ A-PaHNL5α 및 pAOXΔ 플라스미드의 *EcoR I/Bgl II* 분해 후에 직접 수행될 수 있다. pPICZαB-*Nde I*-HRP-WT에서의 교환을 위해, 프로모터 변dl체를 프라이머 AOX1NDE1 및 AOX1rev (표 18 참조, 50 μl의 전체 부피로 적절한 완충 조건하에서 10 ng의 pAOXΔ, 10 pmol의 프라이머 AOX1NDE1 및 AOX1rev, 200 μM의 각각의 dNTP, 0.6 u의 퓨전 (Phusion™) 중합효소)를 이용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 생성물 및 pPICZαB-*Nde I*-HRP-WT 플라스미드를 *Nde I/HindIII* 제한 부위를 이용하여 클로닝시켰다.

[0264] *형질전환, 성장 및 효소 분석:*

[0265] 피키아 파스토리스 형질전환을 위해, 모든 HRP 벡터를 *Nde I*으로 선형화시키고, 모든 PaHNL5α 플라스미드를 *Bgl II*로 선형화시켰다. 실시예 1에 기술된 바와 같이 형질전환을 수행하였다. P. 파스토리스 균주의 성장을 또한 단지 약간의 차이를 제외하고는 실시예 1에 기술된 바와 같이 수행하였다. 최초 BMD (1%)의 양을 350 μl로 증가시키고, 60시간 후, 100 μl의 배양물을 원심분리 (4000 rpm, 4℃, 10 분)를 위해 취득하였다. 메탄올 유도를 실시예 1에 기술된 바와 같이 정확하게 수행하였다.

[0266] 원심분리로부터의 상층액의 50 μl (탈억제) 또는 10 μl (유도)를 HNL 분석을 위해 취득하고, HRP 분석을 위해 둘 모두의 조건에서 15 μl를 취득하였다.

[0267] HRP 분석 ([35]에 따름):

[0268] 15 μl의 상층액을 PS 미세역가 플레이트 내의 50mM의 NaOAc 완충용액 (pH 4.5)중 150 μl의 1mM ABTS/2,9mM H_2O_2에 첨가하였다. 스펙트라맥스 플러스 384 플레이트 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 405 nm에서 5분 동안 흡광도를 측정하였다.

[0269] HNL 분석 ([36]에 따름):

[0270] 50 μl 또는 10 μl의 상층액을 UV-스타 (UV-Star) 미세역가 플레이트 중의 100 또는 140 μl의 0.05M 포스페이트-시트레이트 완충용액 (pH 5.0)에 첨가하였다. 50 μl의 0.06 M 만델로니트릴 용액 (0.003 M 포스페이트-시트레이트 완충용액 (pH 3.5) 중)을 첨가함으로써 반응을 시작시킨 후, 스펙트라맥스 플러스 384 플레이트판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 280 nm에서 5분 동안 흡광도를 측정하였다.

[0271] 결과 및 논의:

[0272] 대안적 리포터 단백질 PaHNL5α 및 HRP를 이용한 결과는 GFP-Zeo를 이용하여 검출된 프로모터 활성의 전이성 (transferability)을 명백하게 나타낸다 (표 17).

[0273] HRP 분석의 낮은 민감성으로 인해, 탈억제 조건에서의 발현 수준은 검출 한도 미만이었다. 따라서, HRP 발현은 탈억제 조건하에서 결정될 수 없었다.

[0274] 표 17: 대안적 리포터 효소를 이용한 여러 *AOX1* 프로모터 변이체의 프로모터 활성 (괄호에서, 동일한 조건하에서 야생형 프로모터에 비한 상대 활성이 언급된다 (각각 탈억제 및 유도))

[0275]

	GFP-Zeo		*Pa*HNL5α		HRP	
프로모터	탈억제	메탄올	탈억제 [mU/분]	메탄올 [mU/분]	탈억제 [mU/분]	메탄올 [mU/분]
P(AOX1)	27.3 (100%)	987 (100%)	2.58 (100%)	69.5 (100%)	n.d.	20.3 (100%)
P(AOX1)Δ1	29.5 (108%)	1188 (120%)	2.37 (92%)	100 (144%)	n.d.	26.9 (132%)
P(AOX1)Δ2	43.0 (157%)	399 (40%)	n.d.	91.7 (132%)	n.d.	9.6 (47%)
P(AOX1)Δ6*	89.9 (329%)	422 (42%)	8.65 (335%)	51.7 (74%)	n.d.	17.5 (86%)
P(AOX1)Δ2Δ6	9.9 (36%)	336 (34%)	1.29 (50%)	37.5 (54%)	n.d.	9.9 (49%)

[0276] n.d.: 검출되지 않음

[0277] 다중카피 선택을 대안적 리포터 시스템로 전이시키기 위해, *AOX1* 프로모터 변이체를 적절한 HRP 및 PaHNL5 플라스미드의 제오신 내성 유전자의 앞쪽에 클로닝시키켜, TEF1 프로모터를 대체시켰다.

[0278] **실시예 4**: 대안적 리포터 단백질 GFP

[0279] GFP를 지닌 프로모터 변이체를 시험하기 위해, 실시예 1 및 2에 기술된 프로모터 변이체를 cycle-3 GFP 유전자의 앞쪽에 클로닝시켰다.

[0280] *클로닝:*

[0281] 벡터 pAOX 내의 cycle-3 GFP 내의 내부 *BamH I* 및 *Xho I* 제한 부위를 프라이머 Bam-del-f 및 Xho-del-f (표 19) 및 주형으로서 100 ng의 벡터를 이용하는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 결실시켰다. 적절한 조건하에서 프라이머 GFP-Zeo forw (Seq. ID No. 4, 표 7, 10 pmol) 및 wtGFP-XhoI-r (표 19, 10 pmol) 및 퓨전 (Phusion™) 중합효소를 이용하는 PCR에 의해 생성된 플라스미드 (10 ng)로부터 GFP 단편을 증폭시켰다. 생성된 PCR 생성물을 *EcoRI/XhoI* 제한 절단을 이용하여 벡터 pPICZ B로 클로닝시키고, T4 DNA 리가아제를 이용하여 라이게이션시켰다. 생성된 플라스미드를 pPICZ-GFP로 명명하였다.

[0282] pPICZ-GFP로의 모든 프로모터 변이체의 클로닝을 pPICZ-GFP 및 pAOX□ 플라스미드의 *BglII/EcoRI* 절단 후에 직접 수행할 수 있었다.

[0283] 표 19: 벡터 pAOX 내의 cycle-3-GFP의 부위 특이적 돌연변이유발 및 이의 GFP 단편의 증폭을 위한 프라이머

명칭	서열(5′→3′)	Seq. ID No.
Bam-del-f	cgccacaacattgaagatggttccgttcaactagcagac-cattatc	87
Xho-del-f	ggaaacattctcggacacaaact-tgagtacaactataactcacacaatg	88
wtGFP-XhoI-r	atctcgagttacttgtacaattcatccatgccatgt-gtaatccc	89

[0284]

[0285] *형질전환, 성장 및 GFP 검출:*

[0286] 피키아 파스토리스 형질전환을 위해, 모든 플라스미드를 *Bgl II*로 선형화시켰다. 실시예 1에 기술된 바와 같이 형질전환을 수행하였다. 형질전환 및 2시간의 재생 단계 후, 세포를 100 μg/ml의 제오신을 함유하는 YPD-Zeo 아가 플레이트에 플레이팅시켰다.

[0287] 피키아 파스토리스의 성장, 메탄올 유도 및 GFP 형광의 측정을 실시예 1에 기술된 바와 같이 정확하게 수행하였다.

[0288] 결과 및 논의:

[0289] 리포터 시스템으로 GFP를 이용한 결과는 또한 GFP-Zeo를 이용하여 검출된 프로모터 활성의 전이성을 나타낸다 (표 20).

[0290] 다중카피-균주:

[0291] 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같이, 선택 마커로서 제오신을 이용한 다중카피-균주의 발생은 매우 통상적이다. 다중카피-균주의 빈도는 선택 플레이트 상의 제오신의 농도를 각각 500 및 1000 μg/ml으로 증가시킴으로써 극도로 증가될 수 있다.

[0292] 표 20: 동일한 조건하에서 야생형 프로모터에 비한 리포터 유전자로서 GFP 및 GFP-Zeo를 지닌 여러 *AOX1* 프로모터 변이체의 상대 프로모터 활성 (각각 탈억제 및 유도).

	GFP		GFP-Zeo	
프로모터 변이체	균주 번호	메탄올 RFU	균주 번호	메탄올 RFU
WT	E1	100 %	D2	100 %
ΔHap1	C9	89 %	A2	84 %
Δ1	4E6	79 %	A9	134 %
Δ1-3	8-F12	75 %	D5	67 %
Δ2	G12	37 %	F2	40%
ΔRap1	D6	27 %	B9	34 %
Δ3	H3	26 %	H2	70 %
ΔAdr1	A9	50 %	A2	56 %
Δ4	C7	66 %	H9	71 %
Δ5	38E6	28 %	D4	31 %
ΔMat1MC	6C2	31 %	F6	32 %
Δ6	37F5	79 %	H3	91 %
Δ6*	E11	23 %	A5	40 %
ΔGcr1	A9	60 %	A2	55 %
Δ7	D12	38 %	A7	25 %
ΔQA-1F	7A3	61 %	E2	61 %
ΔQA-1Fzus	7A6	15 %	H7	25 %
Δ8	E1	11 %	H1	17 %
Δ9	3E5	23 %	A12	61 %
Δ2Δ6	4B10	22 %	F3	21 %
Δ736-41	5A7	8.8 %	C6	6 %
Δ737-38	1G11	5.0 %	A3	8 %
다중카피 균주				
Δ1-3	8B10	400 %		
Δ6	37A3	650 %		

[0293]

[0294] **실시예 5**: GFP를 이용한 자족 (sufficiency) 시리즈

[0295] 전사 인자 결합 부분이 거의 존재하지 않는 시스템에서의 AOX1 프로모터의 작은 부분을 시험하기 위해, TATA box의 앞쪽의 기초 프로모터 성분 AOX176 및 AOX194를 발생시키는 위치 -176 내지 -194의 몇몇 염기쌍을 절단하여 AOX1 프로모터를 절단하였다 (표 21). 기본 프로모터의 앞쪽의 프로모터 성분의 차후의 클로닝 뿐만 아니라 기본 프로모터의 클로닝을 가능케 하기 위해, *BspTI* 및 *EcoRI* 제한 부위를 5' 및 3' 말단 각각에 삽입시켰다.

[0296] 표 21: 기본 프로모터 변이체의 앞쪽에 첨가되는 기본 AOX1 프로모터 성분 AOX176 및 AOX194 및 프로모터 단편 737 및 201-214의 서열. 제한 부위 *BspTI* 및 *EcoRI*은 밑줄로 나타내었다.

명칭	서열 (5′→3′)	Seq. ID No.
AOX176	CTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCT- GTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT- TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAAT- TGACAAGCTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACT- TGAGAAGATCAAAAAACAACTAATTATTGAAAGAATTC	90
AOX194	CTTAAGTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATA- TAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCT- TAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT- TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAAT- TGACAAGCTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACT- TGAGAAGATCAAAAAACAACTAATTATTGAAAGAATTC	91
737	TAGCCTAACGTT	92
201-214	CATGATCAAAATTT	93

[0297]

[0298] *클로닝:*

[0299] 기본 AOX1 성분을 프라이머 AOX1basalrv (표 21, 10 pmol) 및 AOXbasalfwn (10 pmol, AOX194) 및 AOX176fw (10 pmol, AOX176) 각각을 이용하여 pAOX (10 ng)로부터 증폭시켰다. 50 μl의 전체 부피로 적절한 조건하에서 퓨전 (Phusion™) 중합효소 (0.6 u)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0300] 프로모터 변이체 AOX176-737을 상기 기술된 바와 같이 프라이머 AOX1basalrv 및 737-38AOX176을 이용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. 프로모터 변이체 AOX176-201-214를 상기 기술된 바와 같이 프라이머 AOX1basalrv 및 201-214AOX176을 이용하는 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0301] 생성된 PCR 생성물을 *BglⅡ/EcoRI* 제한 절단을 이용하여 벡터 pPICZ-GFP로 클로닝시키고, T4 DNA 리가아제를 이용하여 라이게이션시켜, 야생형 *AOX1* 프로모터를 대체시켰다.

[0302]
```
BglII  BspTI                                                    EcoRI
~~~~~~  ~~~~~~~                                                ~~~~~~~
AGATCTCGAC TTAAGCAATC GTCTTACTTT CTAACTTTTC TTACCTTTTA CATTTCAGCA ATATATATAT ATATTTCAAG GATATACCGA ATTC
TCTAGAGCTG AATTCGTTAG CAGAATGAAA GATTGAAAAG AATGGAAAAT GTAAAGTCGT TATATATATA TATAAAGTTC CTATATGGCT TAAG
```

[0303] 4개의 올리고누클레오티드 Leu2basal1f, Leu2basal2f, Leu2basal1r 및 Leu2basal2r (각각 25pmol)를 20 μl의 전체 부피로 혼합시키고, 2분 동안 95℃로 가열시키고, 실온으로 천천히 냉각시켰다. 3 μl의 혼합물을 16℃에서 6시간 동안 159 ng의 pPICZ-GFP *BglⅡ/EcoRI* 단편으로 라이게이션시켰다. 대장균으로의 형질전환 후, 생성된 벡터를 pLeu2basal-GFP로 명명하였다.

[0304] 프로모터 변이체 Leu2-737을 상기 기술된 바와 같이 프라이머 LEU2basalrv 및 737-38Leu2와 주형으로서 pLeu2basal-GFP를 이용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. 생성된 PCR 생성물을 *BglⅡ/EcoRI* 제한 절단을 이용하여 벡터 pPICZ-GFP로 클로닝시키고, T4 DNA 리가아제를 이용하여 라이게이션시켜, 야생형 *AOX1* 프로모터를 대체시켰다. 생성된 플라스미드를 pLeu2-GFP-737로 명명하였다.

[0305] 표 22: 기본 프로모터 성분 및 자족 작제물의 생성을 위한 프라이머.

명칭	서열(5'→3')	Seq ID No.
AOX1basalrv	TTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTGTTTTTTG	94
AOX176fw	TTAGATCTCGACTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAG-GAAG	95
AOX1basalfwn	TTAGATCTCGACTTAAGTGTTCTAACCCCTACTTGACAG	96
737-38AOX176	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGGACAGCAATATA-TAAACAGAAGGAAG	97
201-214AOX176	AAAGATCTCATGATCAAAATTTCTTAAGGACAGCAATA-TATAAACAGAAGGAAG	98
LEU2basal1f	GATCTCGACTTAAGCAATCGTCT-TACTTTCTAACTTTTCTTACCTTTTACATTTCAG	99
LEU2basal2f	CAATATATATATATATTTCAAGGATATACCG	100
LEU2basal1r	AATTCGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCT-GAAATGTAAAAG	101
LEU2basal2r	GTAAGAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTTAAGTCGA	102
LEU2basalrv	GGTTGAATTCGGTATATCCTTG	103

[0306]

737-38Leu2	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGCAATCGTCT-TACTTTCTAAC	104

[0307]

[0308] *형질전환, 성장 및 GFP 검출:*

[0309] 피키아 파스토리스 형질전환을 위해, 모든 플라스미드를 *BamH I* 으로 선형화시켰다. 형질전환을 실시예 1에 기술된 바와 같이 수행하였다. 형질전환 및 2시간의 재생 단계 후에, 세포를 100 μg/ml의 제오신을 함유하는 YPD-Zeo 아가 플레이트 상에 플레이팅시켰다.

[0310] 피키아 파스토리스의 성장, 메탄올 유도 및 GFP 형광의 측정을 실시예 1에 기술된 바와 같이 정확하게 수행하였다.

[0311] 결과 및 논의:

[0312] 이러한 실험은 실시예 1 및 2에서 확인된 작은 성분의 첨가가 *AOX1* 프로모터 또는 사카로마이세스 세레비지애 *LEU2* 프로모터로부터 유래된 기초 프로모터 성분의 프로모터 강도를 증가시키기 위해 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0313] 다중카피-균주:

[0314] 형질전환 후에 발견된 다중카피 균주의 발생 및 빈도는 실시예 4에서 기술된 바와 정확하게 동일하였다. 플라스미드 내에서 선형화의 상이한 부위는 다중카피 균주의 생성에 어떠한 영향도 미치지 않았다.

[0315] 표 23: 조절인자 결합 부위로 작용하는 것으로 제안된, 작은 AOX1 프로모터 단편을 지니지 않거나, 이러한 AOX1 프로모터 단편의 첨가 후의 기초 프로모터 성분의 프로모터 활성. GFP는 리포터 단백질로 사용되었다. 단일카피 균주 뿐만 아니라 다중카피 균주도 나타내었다.

	단일카피		멀티카피	
	억제	메탄올	억제	메탄올
	RFU	RFU	RFU	RFU
pAOX176-GFP	n.d.	22.1 ± 0.2	-	-
pAOX194-GFP	n.d.	16.9 ± 2.9	-	-
pAOX176-GFP-737	n.d.	21.2 ± 1.1	59 ± 6	265 ± 38
pAOX176-GFP-201-214	69.6 ± 6.0	44.9 ± 4.8	-	-
pLeu2basal-GFP	n.d.	11.3 ± 3.6	-	-
pLeu2-GFP-737	n.d.	19.2 ± 1.9	55 ± 5	138 ± 11

[0316]

[0317] 참고문헌:

[1] Nakagawa, T., et al. (1999) Yeast 15(12), 1223-30.
[2] Koutz, P., et al. (1989) Yeast 5(3), 167-77.
[3] Ohi, H., et al. (1994) Mol. Gen. Genet. 243(5), 489-99.
[4] Cregg, J. M., et al.(1989) Mol. Cell. Biol. 9(3), 1316-23.
[5] Nakagawa, T., et al. (2002) Yeast 19(12), 1067-73.
[6] Sakai, Y., et al. (1998) J. Bacteriol. 180(22), 5885-5890.
[7] Genu, V., et al. (2003) Eur. J. Biochem. 270(11), 2467-2475.
[8] Goedecke, S., et al. (1994) Gene 139(1), 35-42.
[9] Tschopp, J. F., et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15(9), 3859-76.
[10] Parpinello, G., et al. (1998) J. Bacteriol. 180(11), 2958-67.
[11] Alamae, T. et al. (1994) Yeast 10(11), 1459-66.
[12] Inan, M. et al. (2001) J. Biosci. Bioeng. 92(6), 585-589.
[13] Sreekrishna, K., et al. (1997) Gene 190(1), 55-62.
[14] Romanos, M., et al. (1998) Methods Mol. Biol. 103(55-72.
[15] Quandt, K., et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23(23), 4878-84.
[16] Ausubel, F. M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 2003.
[17] Corpet, F. (1988) Nucleic Acids Res. 16(22), 10881-90.
[18] Chenna, R., et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31(13), 3497-500.
[19] Bennett, R. P., et al. (1998) BioTechniques 24(3), 478-82.
[20] Farinas, E. T., et al. (2001) Adv. Synth. Catal. 343(6), 601-606.
[21] Huie, M. A. et al. (1996) Yeast 12(4), 307-17.
[22] Lopez, M. C., et al. (1998) PNAS U. S. A. 95(24), 14112-7.
[23] Zeng, X., et al. (1997) Genetics 147(2), 493-505.
[24] Del Vescovo, V., et al. (2004) J. Mol. Biol. 338(5), 877-93.
[25] Simon, M., et al. (1992) Yeast 8(4), 303-9.
[26] Raschke, W. C., et al. (1996) Gene 177(1-2), 163-7.
[27] Andrianopoulos, A. et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14(4), 2503-15.
[28] Kwast, K. E., et al. (1998) J. Exp. Biol. 201 (Pt 8)(1177-95.

[0318]

[29] Bourgarel, D., et al. (1999) Mol. Microbiol. 31(4), 1205-15.
[30] Dang, V. D., et al. (1996) J. Bacteriol. 178(7), 1842-9.
[31] Hahn, J. S. et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(7), 5169-76.
[32] WO 02/081650
[33] US 6,699,691
[34] Wang, W. et al. (1999) Biotechniques 26(4), 680-2.
[35] Morawski, B., et al. (2000) Protein Eng 13(5), 377-84.
[36] Weis, R., et al. (2004) FEMS Yeast Res. 5 , 179-189.

[0319]

[0320] 서열 목록:

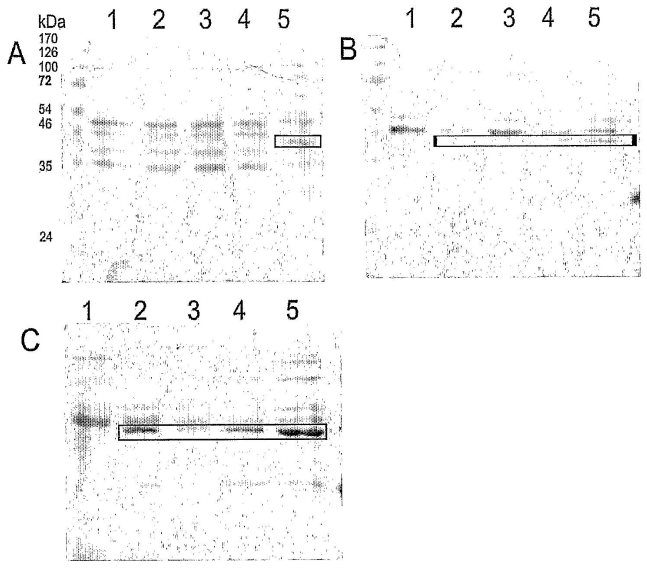
[0321] Seq ID No. 1: 피키아 파스토리스의 AOX1 프로모터

ggtaccagatctaacatccaaagacgaaaggttgaatgaaacctttttgccatccgacatc-
cacaggtccattctcacacataagtgccaaacgcaacaggaggggatacactagcagcagac-
cgttgcaaacgcaggacctccactcctcttctcctcaacacccactttgccatcgaaaaac-
cagcccagttattgggcttgattggagctcgctcattccaattccttctattaggctactaa-
caccatgactttattagcctgtctatcctggcccccctggcgaggttcatgtttgtttatttc-
cgaatgcaacaagctccgcattacacccgaacatcactccagatgagggctttct-
gagtgtggggtcaaatagtttcatgttccccaaatggcccaaaactgacagtttaaa-
cgctgtcttggaacctaatatgacaaaagcgtgatctcatccaagatgaactaagtttggtt-
cgttgaaatgctaacggccagttggtcaaaaagaaacttccaaaagtcggcatac-
cgtttgtcttgtttggtattgattgacgaatgctcaaaaataatctcattaatgcttagcg-
cagtctctctatcgcttctgaaccccggtgcacctgtgccgaaacgcaaatggggaaacacc-
cgctttttggatgattatgcattgtctccacattgtatgcttccaagattctggtgggaa-
tactgctgatagcctaacgttcatgatcaaaatttaactgttctaacccctacttgacagcaa-
tatataaacagaaggaagctgccctgtcttaaacctttttttttatcatcattattagct-
tactttcataattgcgactggttccaattgacaagcttttgattttaacgacttttaacga-
caacttgagaagatcaaaaaacaactaattattgaaagaattcaacc

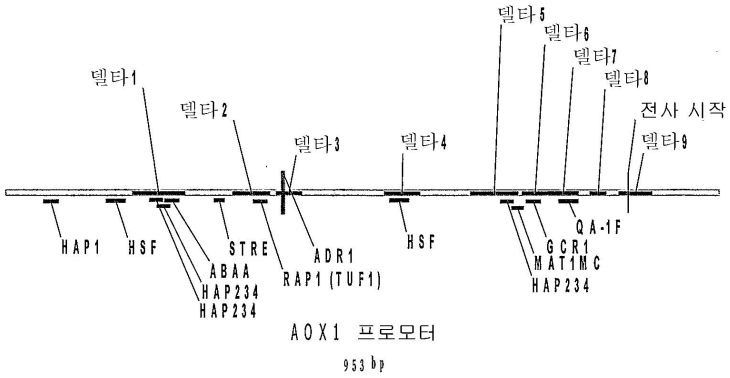
[0322]

도면

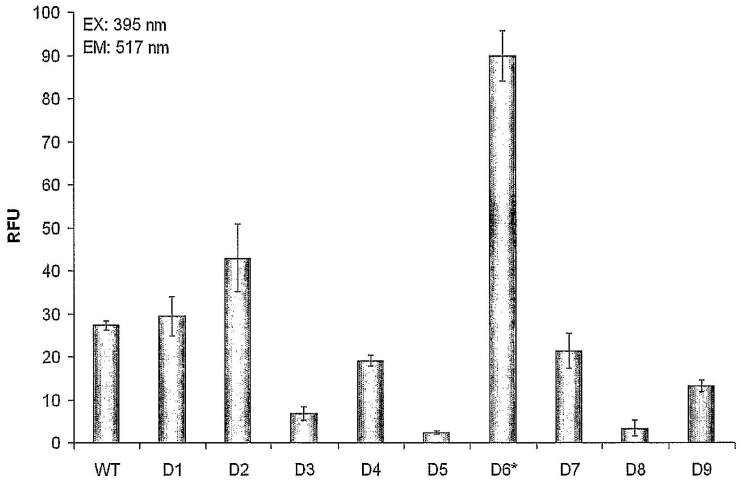
도면1



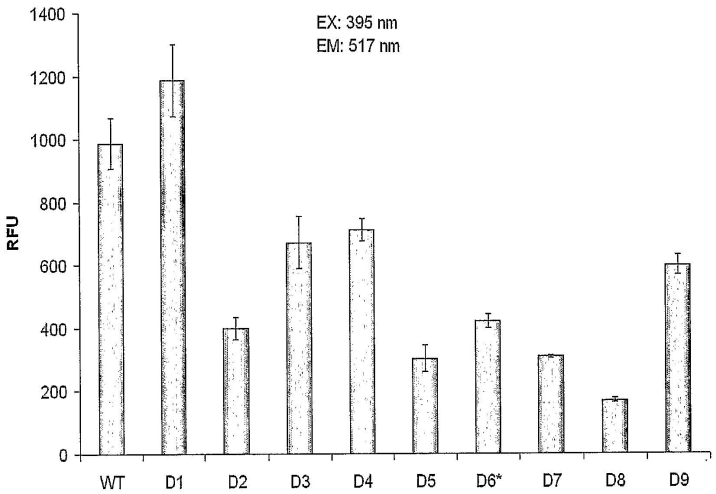
도면2


델타1
델타2
델타3
델타4
델타5
델타6
델타7
델타8
델타9
전사 시작
HAP1
HSF
STRE
ABAA
HAP234
HAP234
ADR1
RAP1 (TUF1)
HSF
QA-1F
GCR1
MAT1MC
HAP234
AOX1 프로모터
953 bp

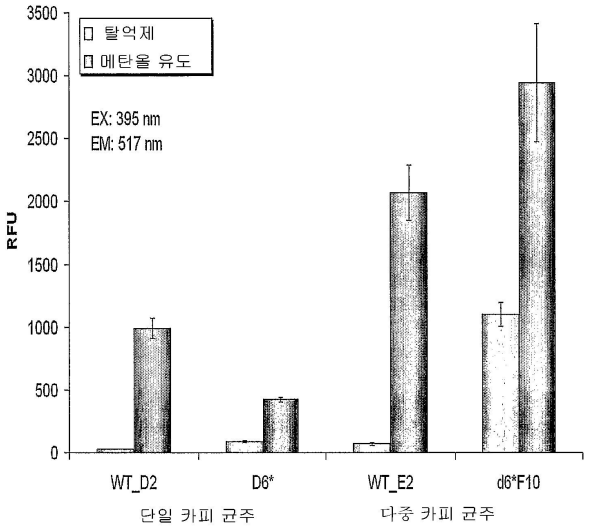
도면3


EX: 395 nm
EM: 517 nm
RFU
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WT
D1
D2
D3
D4
D5
D6*
D7
D8
D9

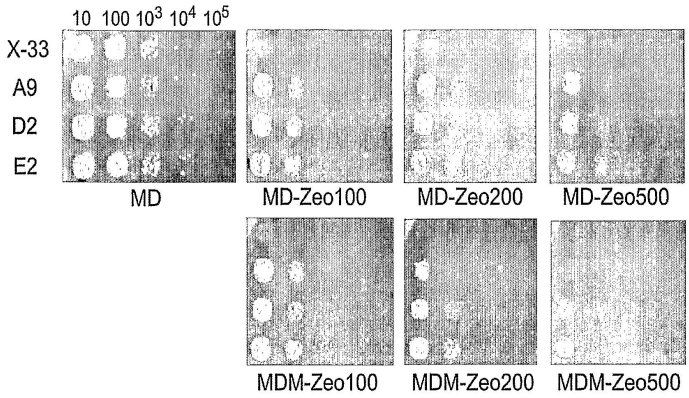
도면4


EX: 395 nm
EM: 517 nm
RFU
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
WT
D1
D2
D3
D4
D5
D6*
D7
D8
D9

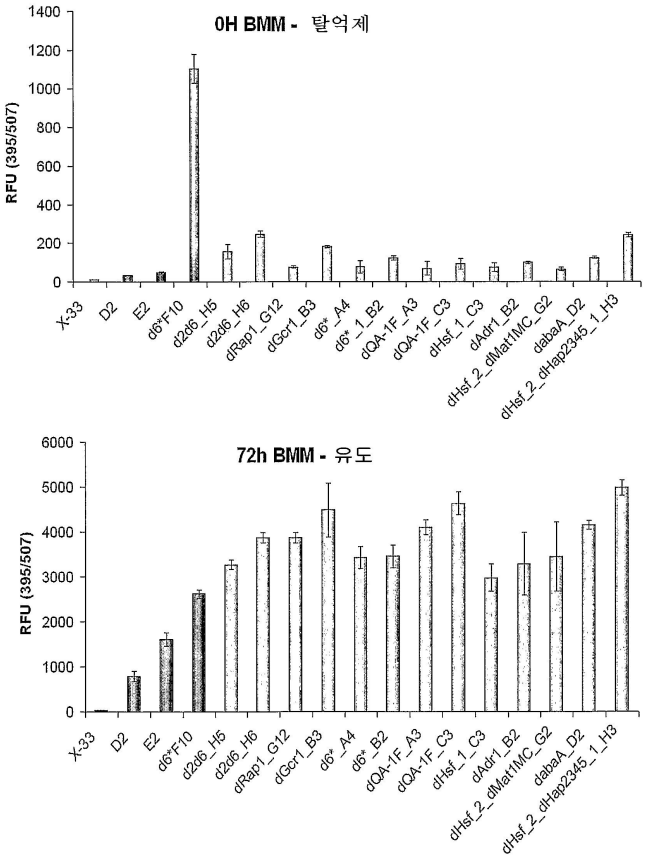
도면5


탈억제
메탄올 유도
EX: 395 nm
EM: 517 nm
RFU
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
WT_D2
D6*
WT_E2
d6*F10
단일 카피 균주
다중 카피 균주

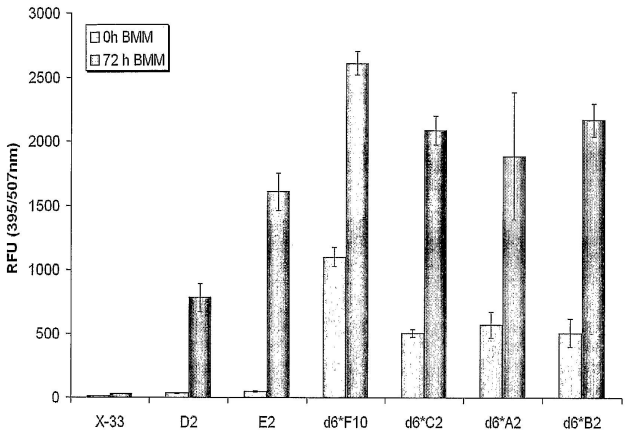
도면6


10 100 10³ 10⁴ 10⁵
X-33
A9
D2
E2
MD
MD-Zeo100
MD-Zeo200
MD-Zeo500
MDM-Zeo100
MDM-Zeo200
MDM-Zeo500

도면7



도면8



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부