



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0082138
(43) 공개일자 2012년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/31 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01) *C12R 1/865* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0003476

(22) 출원일자 2011년01월13일

심사청구일자 2011년01월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

한성욱

서울특별시 성북구 길음로 119, 대우푸르지오아파트 210동 201호 (길음동)

유경옥

서울특별시 강서구 양천로 391 (가양동)

김승욱

서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트 104-905

(74) 대리인

이처영

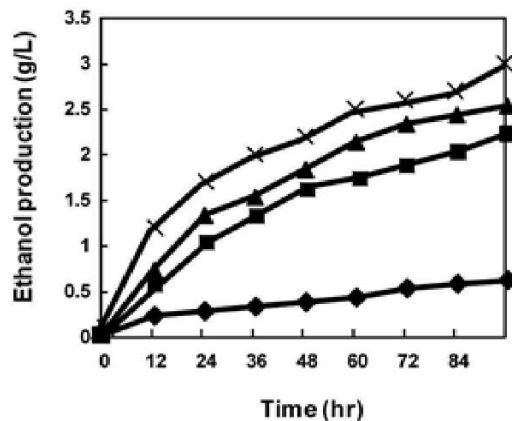
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 바이오 에탄올 생산 향상용 TATA 결합 단백질 SPT3 와 15가 유전자 삽입된 형질전환체 및 그 균주를 이용한 에탄올 생성방법

(57) 요약

본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 TATA 결합단백질 SPT3와 15의 과발현을 통한 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 효모 RNA 폴리머라제 인자, 예컨대 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 향상되어진 형질전환체 및 이들을 이용한 에탄올 생산 증대 방법에 대한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100027563

부처명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원_핵심연구(공동)

연구과제명 고효성 당화효소 생산 에탄올 발효균주 개발과 다양한 배양시스템의 공정최적화를 통한
고효율 수송용 바이오 에탄올 생산공정에 관한 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

사카로마이스 세레비지에 SPT(Suppressor of Ty)3와 SPT15 유전자를 함유하는 발현벡터 pGupSpt3.15.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 SPT3은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 발현벡터 pGupSpt3.15.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 SPT3은 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 발현벡터 pGupSpt3.15.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 SPT15는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 발현벡터 pGupSpt3.15.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 SPT15는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 가지는 발현벡터 pGupSpt3.15.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 3a에 기재된 개열지도를 가지는 발현벡터 pGupSpt3.15.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 형질전환체는 사카로마이스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)인 형질전환체.

청구항 9

제 1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 발현벡터를 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 형질전환체에 도입하여 제조된 형질전환체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM 11153P인 형질 전환체 효모 사카로마이스 세레비지에 YPH499(pGcyuDak, pGupSpt3.15Cas)인 형질전환체.

청구항 11

글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 형질전환체에 제 1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 발현벡터를 도입하는 단계를 포함하는 에탄올 생성용 형질전환체 제조방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 에탄올 생성용 형질전환체는 균주 기탁번호가 KCCM 11153P인 형질 전환체 효모 사카로마이스 세레비지에 YPH499(pGcyuDak, pGupSpt3.15Cas)인 에탄올 생성용 형질 전환체 제조방법.

청구항 13

글리세롤을 기질로 하여 제9항 또는 제10항의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 글리세롤을 이용한 에탄올 생산 방법.

청구항 14

제 9항 또는 제10항의 형질전환체를 포함하는 에탄올 생성용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 TATA 결합단백질 SPT3와 15의 과발현을 통한 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 효모 RNA 폴리머라제 인자, 예컨대 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 향상되어진 형질전환체 및 이들을 이용한 에탄올 생산 증대 방법에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 에탄올은 현재 산업 용매로써 거대한 시장을 형성하고 있으며, 앞으로 자동차 등의 수송연료로 사용 가능성이 현실화되고 있어 지속적인 수요 증가가 예상되고 있다.

[0003] 글리세롤은 C₃H₈O₃로 C₆H₁₂O₆인 글루코오스 (glucose)에 비하여 1단계 환원된 물질로서 미생물의 대사 과정에서 보다 향상된 환원력을 제공할 수 있다. 발효를 통하여 생산되는 많은 물질이 그 대사과정에서 환원력을 요구하는 경우가 많기 때문에 글리세롤을 기질로 효과적으로 이용할 수 있다면, 원하는 발효산물의 수율 및 생산성의 향상을 가져 올 수 있다. 현재 바이오 디젤의 생산량이 늘어남에 따라 글리세롤의 생산량 늘어났기 때문에 가격이 급격히 하락하고 있는 실정이다. 상기한 바와 같이 바이오디젤의 생산량이 급증함에 따라, 부산물인 글리세롤의 생산도 늘어나 글리세롤을 포함하고 있는 부산물을 효과적으로 처리하는 문제가 발생할 것이다. 따라서 글리세롤을 이용하여 효과적으로 발효에 의해 유용한 발효산물을 생산할 수 있다면 많은 부속 효과를 가져 올 수 있다.

[0004] 본 발명은 기존의 글리세롤을 효율적으로 이용하도록 개발되어진 균주의 개량을 통한 에탄올 생산능의 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비제의 TATA 결합단백질의 과발현을 통하여 에탄올 생산능의 증대를 이루었다.

[0005] 현재, 대사산물의 과다생산에 의한 생산 저해는 많은 유전자에 의해 영향을 받는다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다. 그러나, 대부분의 세포 및 대사 조작 접근법은 벡터 구축물 및 형질전환 효능에서의 실험적 한계로 인해 거의 단일 유전자의 결실 또는 과다발현에 의지한다. 이러한 한계는 다중 유전자 변형의 동시 탐구를 불가능하게 하며, 유전자 변형 연구를 단일 유전자가 한번에 변형되는 제한된 순차적 접근법에 국한시킨다. 본 연구에서 연구되어진 광역 전사 기구는 모든 세포 시스템 (원핵 및 진핵생물)에서 전사체를 제어하는 역할을 한다. 광역 전사 기구는 RNA 폴리머라제 분자와 상호작용하거나 그의 활성을 조절함으로써 유전자 전사에 영향을 끼치는 단백질일 수 있다. 광역 전사 기구는 또한 전사될 세포의 계능의 능력을 변경시키는 단백질일 수 있다 (예를 들어, 메틸트랜스퍼라제, 히스톤 메틸트랜스퍼라제, 히스톤 아세틸라제 및 데아세틸라제).

[0006] 박테리아 시스템에서, 시그마 인자는 RNA 폴리머라제 홀로효소의 프로모터 선호도에 초점을 맞추으로써 광역 전사를 조정하는데 중요한 역할을 수행한다 (R. R. Burgess, L. Anthony, Curr. Opin. Microbiol 4, 126-131 (2001)). 본 발명은 계능-범위 수준에서 프로모터에 대한 선호도를 변화시키면서 시그마 인자를 생성하는 능력을 개발하였다. 통상적인 균주 개선 패러다임은 주로 순차적인, 단일-유전자 변형의 생성에 의존하며, 이는 종종 광역 최대치에 도달하는데 실패하기도 한다. 그 이유는 대사 경로가 복잡하고 (H. Alper, K. Miyaoku, G. Stephanopoulos, Nat Biotechnol 23, 612-616 (2005); H. Alper, Y.-S. Jin, J. F. Moxley, G. Stephanopoulos, Metab Eng 7, 155-164 (2005)), 돌연변이가 동시에 도입되는 경우에만 유익한 합성 돌연변이체를 포괄하기 때문이다. 본 발명자들은 TATA 접합 단백질을 과발현 함으로써 여러 동시 유전자 발현 변화를 유사하게 도입하여 전세포 조작을 용이하게 하기 위한 시그마 인자의 광역 조절 기능을 개발하였다.

[0007] 특히 에탄올 생성과 관계된 경우 진균, 및 그러한 진핵 세포에 관련된 RNA 폴리머라제 II 인자에 대해 광범위하게 적용될 수 있다. 표현형 특성, 특히 배양 배지에서 글리세롤(및 다른 당) 및/또는 에탄올의 내성, 및/또는 당업계에 공지된 다양한 공급원료로부터 세포에 의한 에탄올 생성의 개선을 위한, 다른 진핵 세포 및 이리

한 세포의 상응하는 광역 전사 기구의 용도를 포함할 수 있다.

[0008] 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지에에서의 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산 증대를 위하여 TATA 결합 단백질(SPT3,15)를 과 발현 하여 에탄올 생산량 증대를 이루었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 글리세롤을 발효원으로 이용시 바이오 에탄올 제조에 있어서 생산균주인 효모에서 바이오에탄올 생산량이 증대될 수 있도록 개량되어진 균주를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 포함하는 에탄올 생성용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사카로마이시스 세레비지에 SPT(Suppressor of Ty)3와 SPT(Suppressor of Ty) 15(이하 각각 'SPT 3', 'SPT15'라 함) 유전자를 함유하는 발현벡터 pGupSpt3.15를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구체예에 있어서, TATA 결합단백질 SPT3는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 1에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 SPT3 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 SPT15에 포함된다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT3는 서열번호 1에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 2에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 SPT3 유전자에 포함된다.

[0016] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT15 는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 3에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 TATA 결합단백질 SPT15 활성을 가진 돌연변이체도 본 발명의 TATA 결합단백질 SPT15에 포함된다.

[0017] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT15는 서열번호 4에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 4에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명의 TATA 결합단백질 SPT15 유전자에 포함된다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 본 발명의 발현벡터는 도 3a에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 TATA 결합단백질 SPT3와 SPT15 유전자가 삽입된 형질전환체는 바람직하게는 효모, 더욱 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 속 미생물 유래인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 발현벡터를 글리세롤 디히드로게나제, 디히드로시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 단백질 유전자를 포함하는 형질전환체에 도입하여 제조된 형질전환체를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 5에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 글리세롤 디히드로게나제 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase) 유전자는 서열번호 6에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호

호 6에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 디히드록시아세톤 키나아제(dihydroxyacetone kinase)는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 7에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 디히드록시아세톤 키나아제 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 디히드록시아세톤 카나아제 유전자는 서열번호 8에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 8에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 업테이크 프로테인은 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 서열번호 9에 기재된 단백질에 하나 이상의 치환, 결손, 부가 등의 돌연변이가 유발된 디히드록시아세톤 키나아제 활성을 가진 돌연변이체도 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자는 서열번호 10에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 10에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 포함할 수 있다.

[0028] 또한 본 발명은 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 및 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자를 포함하는 형질전환체에 상기 본 발명의 발현백터를 도입하는 단계를 포함하는 에탄올 생성용 형질전환체 제조방법을 제공한다.

[0029] 상기 본 발명의 형질전환체 제조방법의 일 구체예에 있어서, 상기 재조합된 벡터 pGupSpt3.15Cas 및 pGcyDak는 도 3a 및 3b에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0030] 또한 본 발명은 글리세롤을 기질로 하여 상기 본 발명의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 글리세롤을 이용한 에탄올 생산 방법을 제공한다.

[0031] 또한 본 발명은 본 발명의 형질전환체를 포함하는 에탄올 생산용 조성물을 제공한다. 본 발명의 에탄올 생성물 조성물은 예를 들어 상기 형질전환체를 배양하여 글리세롤을 기질로 하여 에탄올을 생성하는데 적합한 폴리펩타이드, 브로쓰, 세포 용해물, 정제 또는 정제되지 않은 효소 추출물 또는 폴리펩타이드 등을 포함한다.

[0032] 본 발명에서 효모를 숙주로서 사용하는 경우는, 발현벡터로서, 예를 들면 YEp13, YCp50, pRS계, pYEX계 벡터 등이 이용가능하다. 프로모터로서는, 예를 들면 GAL프로모터, AOD프로모터 등을 사용할 수 있다. 효모에의 재조합체 DNA의 도입방법으로서, 예를 들면 일렉트로포레이션법(Method Enzymol., 194, 182-187(1990)), 스펙로플라스트법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933(1978)), 아세트산리튬법(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 등이 이용가능하다.

[0033] 또, 재조합벡터에는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 각종의 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체밖으로의 분비를 목적으로 한 시그널을 코딩하는 유전자 등을 또 가진 것도 가능하다.

[0034] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다.

[0035] 또 배양방법은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 대장균 등의 세균을 숙주로 해서 얻게 된 형질전환체를 배양하는 배지로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB배지, NB배지 등을 들 수 있다. 또, 배양온도는 상기 언급한 적온의 범위에서 배양함으로써 SPT3, SPT15을 균체 내에 축적시키고, 회수한다.

[0036] 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 이용할 수 있다.

[0037] 질소원으로서, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄 등의 암모늄염 외에, 펩톤,

고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물유래의 것을 들 수 있다. 또, 무기물로서는, 예를 들면 인산제 1칼륨, 인산제 2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가해도 된다.

- [0038] 또, 프로모터가 유도성의 발현백터를 사용해서 형질전환한 미생물을 배양하는 경우는, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가하면 된다. 예를 들면, 이소프로필-D-티오갈락토피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.
- [0039] SPT3, SPT15의 취득은, 얻게 되는 배양물 중으로부터, 균체 또는 상청액을 원심 회수하여, 균체파쇄, 추출, 친화성크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다.
- [0040] 얻게 된 정제물질이 목적의 효소인 것의 확인은, 통상의 방법, 예를 들면 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동, 웨스턴블로팅등에 의해 행할 수 있다.
- [0041] 이하, 본 발명을 설명한다.
- [0042] 본 발명은 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 조작되어진 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT3의 과발현을 통한 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 효모 RNA 폴리머라제 인자, 예컨대 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 향상되어진 형질전환체 및 이들을 이용한 에탄올 생산 증대 방법에 대한 것이다.
- [0043] 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 유래한 TATA 결합단백질 SPT3와 SPT15를 인코딩하는 유전자의 과발현을 통한 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성을 증대시킴으로써 에탄올 생산능이 증가된 이 균주에 글리세롤을 효율적으로 이용하는 유전자를 형질 전환시켜 기존의 형질전환체와 비교시 에탄올 생산능이 증가됨을 확인하였다. 또한, 본 발명에 따라 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 제작되어진 사카로마이세스 세레비지에 속 미생물로부터 생산되어지는 글리세롤의 생산을 저해한 효모 형질 전환체는 공정에 유용하게 사용될 수 있다. 글리세롤을 기질로 한 발효결과 상기 유전자 삽입된 효모 형질 전환체가 그렇지 않은 효모 균주보다 많은 양의 에탄올을 생성하였다.
- [0044] 본 발명의 실시예에서는 사카로마이세스 세레비지에를 주형으로 한 PCR반응을 통하여 SPT3와 SPT15 각각 1.0kb, 0.7kb의 PCR product를 얻었고, 얻어진 PCR product를 효모에 형질전환 함으로써 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 과발현 균주를 제작하였다. 이후, 상기 Gcy와 Dak을 양방향 삽입한 재조합 백터를 이용하여 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, Gup1의 유전자 삽입을 위하여 효모-유전자 삽입벡터(yeast-integration vector)에 구축하였으며 이를 사카로마이세스 세레비지에에 유전자 삽입하였다. 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산을 조사하였다.
- [0045] 이로써, 본 발명에 따라 재조합되고 형질 전환 된 YPH499(pGcyDak, pGupSpt3.15Cas)에 의하여 에탄올 생산이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0046] 따라서 대표적인 에탄올 생산균주인 효모 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산량의 증대를 위하여 본 발명자는 사카로마이시스 세레비지에로부터 유래한 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통한 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 효모 RNA 폴리머라제 인자, 예컨대 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현 벡터, 그 글리세롤을 이용하도록 유전자 도입된 재조합 벡터의 형질 전환 및 글리세롤 업테이크 단백질(Gup1)의 도입을 통하여 효모 형질 전환체를 개발하여 이를 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 소재 한국미생물보존센터(KCCM)에 2010년 12월 17일 기탁번호 KCCM11153P로 기탁하였다. 뿐만 아니라 상기 효모 형질 전환체가 탄소원으로 글리세롤을 효율적으로 이용하여 에탄올 생산이 효율적으로 증가한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 효과

[0047] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 속 미생물 유래의 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통한 바이오 에탄올 생산능이 향상된 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 더욱 상세하게는 글리세롤을 발효원으로 이용하도록 제작되어진 형질전환체에서의 에탄올 생산능 및 삼투압에 대한 내성 증대를 위하여 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 효모 RNA 폴리머라제 인자, 예컨대 TATA 결합단백질인 SPT3와 SPT15의 과발현을 통하여 에탄올 생산능이 향상되어진 형질전환체와 또한 글리세롤 디히드로게나제 (glycerol dehydrogenase)와 디히드록시아세톤 키나아제 (dihydroxyacetone kinase) 유전자가 도입된 형질전환체에 글리세롤 업테이크 프로테인 (glycerol uptake protein)을 유전자 삽입한 재조합 벡터를 효모 균주에 도입하였다. 이후, 상기 효모균주에 비하여 에탄올 생산수율이 높아진 것을 확인하였다. 본 발명에 따라 글리세롤을 탄소원으로 이용하도록 조작되어진 균주에의 글리세롤 생산 유전자를 차단함으로써 제작되어진 효모 형질 전환체는 바이오디젤의 부산물로 생성이 되는 글리세롤을 이용하여 많은 양의 에탄올을 생산할 수 있어 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 TATA 결합 단백질 SPT3와 SPT15의 유전자 확인을 위한 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, SPT3 이며, Lane 3, SPT15을 확인한 그림을 나타낸다.

도 2(A)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 글리세롤 디히드로게나제 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Gcy PCR 산물이며,

도 2(B)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 디히드록시아세톤 키나아제 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Dak PCR 산물이며,

도 2(C)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, Lane 1, 1kb DNA 마커; Lane 2, Gup PCR 산물을 나타낸다.

도 3a는 본 발명에서 제시된 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15가 글리세롤 업테이크 프로테인 유전자가 구축 재조합 벡터 pGup에 삽입된 재조합 벡터 pGupSpt3.15Cas의 재조합 과정을 나타낸 모식도이고,

도 3b는 본 발명에서 제시된 글리세롤 디히드로게나제 유전자와 디히드록시아세톤 키나아제 유전자가 양방향으로 삽입된 재조합 벡터 pGcyDak의 재조합 과정을 나타낸 모식도이고,

도 4는 본 발명에서 제시된 TATA 결합단백질 SPT3, SPT15의 과발현 벡터에 pGcyDak를 형질전환하여 glycerol 을 기질로 하여 에탄올 생산량이 증대됨을 생산함을 확인한 그래프이다. 도 4에서 심벌은 ◆, YPH499 (pESC-TRP); ■, YPH499 (pGcyDak, pGupCas); ▲, YPH499 (pGcyDak, pGupSpt3Cas); X, YPH499(pGcyDak, pGupSpt3.15Cas)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0050] <실시예 1> 효모의 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자의 형질전환

[0051] <실시예 1-1> 효모의 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자의 증폭

[0052] 글리세롤을 기질로 이용한 에탄올 생산시에 저해 인자인 에탄올 내성 및 삼투압에 대한 내성의 증대를 위하여 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이세스 세레비지에의 지노믹디엔에이 (BY4741)로부터 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 SPT3의 클로닝을 위하여 *Spe*(5-actagtcccg ccgccaccaa ggagatgatg gacaagcata agta-3; 서열번호 11), *Spe*(5-actagtgttac atgataattg gtttag-3; 서열번호 12), SPT15는 *Bgl*(5-agatctcccg ccgccaccaa ggagatggcc gatgaggaac gttt-3; 서열번호 13), *Bgl*(5-agatcttcac atttttctaa attcactta-3; 서열번호 14) 으로 각각의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 1.5kb, 0.7kb의 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 1에 각각 도시하였다.

- [0053] <실시예 1-2> 효모의 TATA 결합 단백질 SPT3, SPT15 유전자의 클로닝
- [0054] 상기 실시예 1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [0055] 그 후, SPT3은 *Spe* Dak는 *Bgl*로 절단한 후 제한효소 *Spe*1, *Bgl*으로 절단한 후 글리세롤 업테이크 단백질에 삽입되어진 pGup1 에 라이게이션(ligation) 시켜 대장균(*E. coli*) DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation) 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각pGupSpt3, pGupSpt3.15이라 명명하였으며 이를 3a에 도식화 하였다.
- [0056] 또한 pGupSpt3.15을 유전자 삽입하기 위하여 *Bam*H1 인식서열을 포함하도록 sense primer (5-ggatccatgt cagcatttttaggtaaattccgtg-3;서열번호 15) 그리고 anti-sence primer (5-ggatccataatgtcgctgatcagcatcctg tct-3;서열번호 16)를 제작하여 효모 유전자 삽입 벡터 (yeast integration vector)인 YIP-5(ATCC)에 클로닝하여 이를 pGupSpt3.15Cas이라 명명하였으며 3a에 도식화하였으며 이를 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이에 유전자 삽입하였다. 재조합된 벡터 pGupSpt3.15Cas를 야생형의 균주(YPH499, Clontech Laboratories Inc.)에 클론테크 (clontech)사의 이스트메이커 이스트 트랜스포메이션 키트 (YEASTMAKER yeast transformation kit2) 에서 제공하는 실험방법에 따라 효모 숙주세포를 형질 전환시켰다. 이후, 트립토판 결핍 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 0.067% yeast nitrogen base w/o trp, 2% agar)을 이용하여 형질 전환체를 선별하였으며, 이를 사카로마이시스 세레비지에 YPH499 (pGcyDak, pGupSpt3.Spt15Cas)라 명명하였다.
- [0057] <실시예 2> 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 형질전환
- [0058] <실시예 2-1> 효모의 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 증폭
- [0059] 글리세롤을 해당과정의 중간물질인 DHAP로 효율적으로 전환하기 위하여 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제 유전자를 클로닝하기 위하여 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이 (BY4741)로부터 펩타이드 부분의 염기서열을 참고로 하여 Gcy의 클로닝을 위하여 *Bam*H (5-ggatccatgcctgctactttacatga ttct-3;서열번호 17), *Sal*(5-gtcgacatacttgaatacttcgaaaggag-3;서열번호 18), Dak는 *Spe* (5-actagtatgtccgctaaatcggttgaagtc-3;서열번호 19), *Cla*(5-atcgatatacaaggcgctttgaacccctt-3;서열번호 20) 그리고 Gup1에는 *Eco*R(5-gaattcatgtcgctgatcagcatcctg-3;서열번호 21), *Spe*(5-actagtccagca ttttaggtaaattccgtg-3;서열번호 22)으로 각각의 인식서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 각각 936bp, 1755bp 그리고 1683bp의 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 도면 2에 각각 도식하였다.
- [0062] <실시예 2-2> 글리세롤 디히드로게나제, 디히드록시아세톤 키나아제, 글리세롤 업테이크 단백질 유전자의 클로닝
- [0063] 상기 실시예 1에서 얻은 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Biospin gel extraction kit (Bioflux)를 사용하여 회수하였다.
- [0064] 그 후, Gcy는 *Bam*H, *Sal*, Dak는 *Spe*, *Cla*그리고 Gup1은 *Eco*R, *Spe*으로 절단한 후 효모-대장균 셔틀 벡터 (yeast-*E. coli* shuttle vector)인 pESC-trp (Clontech) 에 라이게이션 (ligation) 시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E. coli*) DH5a에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 (ligation) 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 각각pESC-Gcy, pESC-Dak, pESC-Gup이라 명명하였다. 그 후 pESC-Gcy를 벡터로 하여 Dak를 클로닝하여 에스세리시아 콜라이 DH5a(인비트로젠(Invitrogen)에 형질 전환을 하였다. 이어 형질 전환체로부터 라이게이션 된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pGcyDak이라 명명하였고 도면 3b에 도식하였다. 또한 pESC-Gup1을 유전자 삽입하기 위하여 *Bam*H1 인식서열을 포함하도록 sense primer (5-ggatccatgt cagcatttttaggtaaattccgtg-3;서열번호 15) 그리고 anti-sence primer (5-ggatccataatgtcgctgatcagcatcctg tct-3;서열번호 16)를 제작하여 효모 유전자 삽입 벡터 (yeast integration vector)인 YIP-5에 클로닝하여 이를 사카로마이시스 세레비지에의 지노믹디엔에이에 유전자 삽입

하였다.

[0065] <실시예 3> 효모 형질 전환체를 이용한 바이오 에탄올의 생산

[0066] YPH499(pGcyuDak, pGupCas)와 YPH499(pGcyuDak, pGupSpt3.15Cas)를 갈락토오스로 발현 유도되는 SG배지에서 24시간 전배양 후 48시간 진탕 배양하여 2%의 글리세롤이 기질로 첨가된 발효배지에 600nm파장에서 흡광도를 측정했을 때 각각 1가 되도록 한다. 상기 발효배양액을 30℃, 100rpm에서 배양하며 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 가스 크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올을 측정하였다. 상기 방법대로 실행결과 TATA 결합 단백질이 과발현되어진 균주에서의 에탄올 생산수율이 YPH499 (pGcyuDak, pGupCas)보다 높게 측정이 되었다. 이 결과를 도면 4에 도시하였다.

수탁번호

[0067]

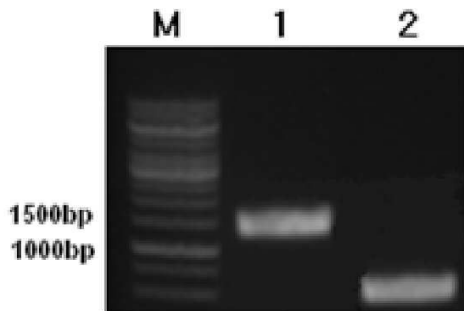
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11153P

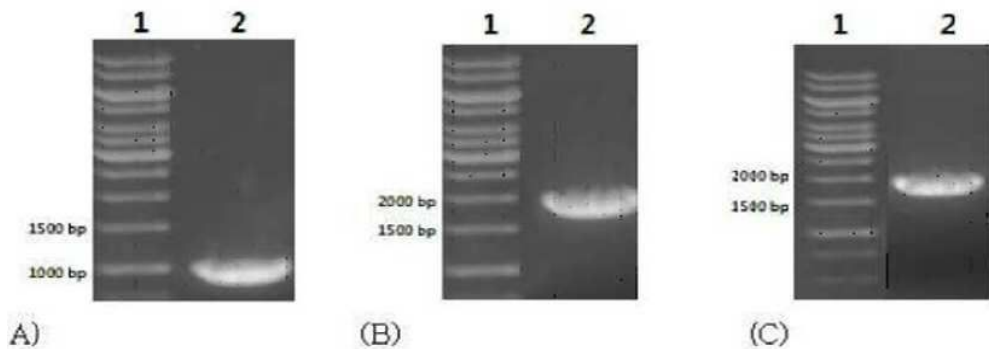
수탁일자 : 20101217

도면

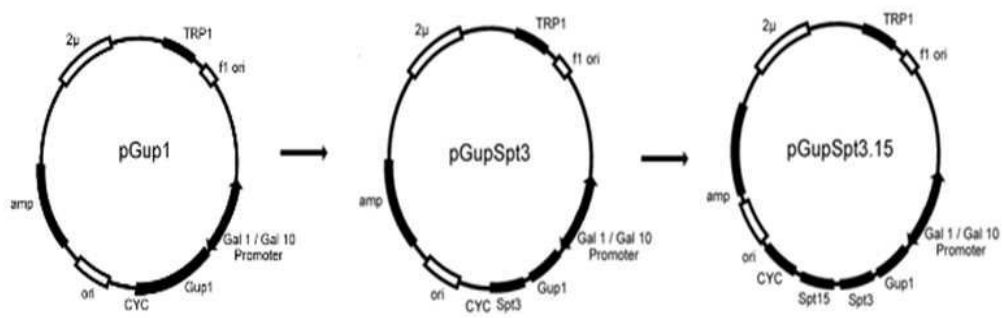
도면1



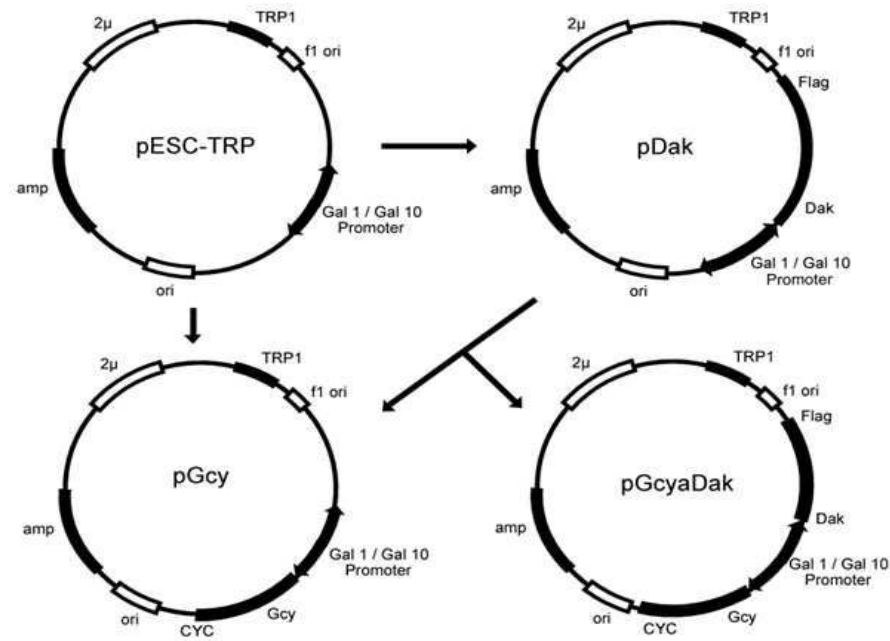
도면2



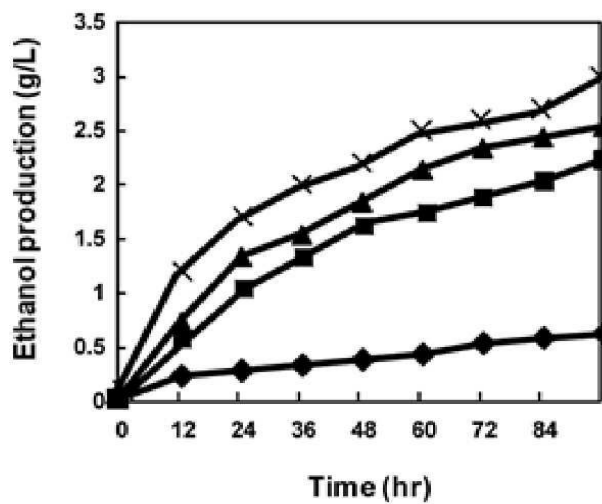
도면3a



도면3b



도면4



<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> Recombinant yeast by overexpression of SPT3 and SPT15 for
 improving productivity of bioethanol and Method for producing
 ethanol using the same
 <160> 22
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 1

Met Met Asp Lys His Lys Tyr Arg Val Glu Ile Gln Gln Met Met Phe
 1 5 10 15
 Val Ser Gly Glu Ile Asn Asp Pro Pro Val Glu Thr Thr Ser Leu Ile
 20 25 30
 Glu Asp Ile Val Arg Gly Gln Val Ile Glu Ile Leu Leu Gln Ser Asn
 35 40 45
 Lys Thr Ala His Leu Arg Gly Ser Arg Ser Ile Leu Pro Glu Asp Val
 50 55 60
 Ile Phe Leu Ile Arg His Asp Lys Ala Lys Val Asn Arg Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Tyr Leu Ser Trp Lys Asp Leu Arg Lys Asn Ala Lys Asp Gln Asp Ala
 85 90 95
 Ser Ala Gly Val Ala Ser Gly Thr Gly Asn Pro Gly Ala Gly Gly Glu
 100 105 110
 Asp Asp Leu Lys Lys Ala Gly Gly Gly Glu Lys Asp Glu Lys Asp Gly
 115 120 125
 Gly Asn Met Met Lys Val Lys Lys Ser Gln Ile Lys Leu Pro Trp Glu
 130 135 140
 Leu Gln Phe Met Phe Asn Glu His Pro Leu Glu Asn Asn Asp Asp Asn
 145 150 155 160
 Asp Asp Met Asp Glu Asp Glu Arg Glu Ala Asn Ile Val Thr Leu Lys
 165 170 175

Arg Leu Lys Met Ala Asp Asp Arg Thr Arg Asn Met Thr Lys Glu Glu
 180 185 190
 Tyr Val His Trp Ser Asp Cys Arg Gln Ala Ser Phe Thr Phe Arg Lys
 195 200 205
 Asn Lys Arg Phe Lys Asp Trp Ser Gly Ile Ser Gln Leu Thr Glu Gly
 210 215 220
 Lys Pro His Asp Asp Val Ile Asp Ile Leu Gly Phe Leu Thr Phe Glu
 225 230 235 240

Ile Val Cys Ser Leu Thr Glu Thr Ala Leu Lys Ile Lys Gln Arg Glu
 245 250 255
 Gln Val Leu Gln Thr Gln Lys Asp Lys Ser Gln Gln Ser Ser Gln Asp
 260 265 270
 Asn Thr Asn Phe Glu Phe Ala Ser Ser Thr Leu His Arg Lys Lys Arg
 275 280 285
 Leu Phe Asp Gly Pro Glu Asn Val Ile Asn Pro Leu Lys Pro Arg His
 290 295 300
 Ile Glu Glu Ala Trp Arg Val Leu Gln Thr Ile Asp Met Arg His Arg

305 310 315 320
 Ala Leu Thr Asn Phe Lys Gly Gly Arg Leu Ser Ser Lys Pro Ile Ile
 325 330 335

<210> 2

<211> 1014

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

atgatggaca agcataagta tcgtgtggag attcaacaga tgatgtttgt ctctggtgaa	60
attaacgacc caccgtaga aaccacatca ctgatagaag atatagtgag ggggtcaagtg	120
atagaaattc ttttacagtc aaacaaaacg gcgcattctta ggggaagtag gagcattctc	180
cctgaagacg tcattttctt gatcagacac gacaaggcca aagtcaatcg tttgagaaca	240
tatctgtcat ggaaggattt gcgtaaaaac gccaaggacc aagatgctag tgccggtgta	300
gcgagtggca ctggaaatcc tggggcaggt ggtgaagatg atttgaaaaa agcaggtggt	360
ggcgagaaaag acgaaaaaga tgggtggaaac atgatgaagg tcaagaaatc ccaaattaag	420

ctgccatggg aattgcagtt tatgttcaat gaacatcctt tagaaaataa tgacgacaat 480
gatgatattg atgaggatga acgagaagct aatatagtca ctttgaaaag gctgaaaatg 540
gctgacgata gaacacgaaa catgactaaa gaggagtacg tgcattggtc cgattgtcga 600

caggcaagtt ttacatttag gaagaataaa aggttcaagg actggtcttg aatttcgcaa 660
ttaactgagg ggaaccccca tgatgatgtg attgatatac tggggtttct aacttttgag 720
attgtctgtt ctttgacgga aacagctctg aaaatcaaac aaagagaaca ggtattacag 780
actcaaaagg acaaatccca gcaatctagc caagataata ctaactttga atttgcacat 840
tccacattac atagaaagaa aagattatit gatggacctg aaaatgttat aaaccgctc 900
aaaccaaggc atatagagga agcctggaga gtactacaaa caattgacat gaggcattag 960
gctttgacca actttaagg tggtagactc agttctaaac caattatcat gtaa 1014

<210> 3

<211> 240

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

Met Ala Asp Glu Glu Arg Leu Lys Glu Phe Lys Glu Ala Asn Lys Ile

1 5 10 15

Val Phe Asp Pro Asn Thr Arg Gln Val Trp Glu Asn Gln Asn Arg Asp

20 25 30

Gly Thr Lys Pro Ala Thr Thr Phe Gln Ser Glu Glu Asp Ile Lys Arg

35 40 45

Ala Ala Pro Glu Ser Glu Lys Asp Thr Ser Ala Thr Ser Gly Ile Val

50 55 60

Pro Thr Leu Gln Asn Ile Val Ala Thr Val Thr Leu Gly Cys Arg Leu

65 70 75 80

Asp Leu Lys Thr Val Ala Leu His Ala Arg Asn Ala Glu Tyr Asn Pro

85 90 95

Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu Pro Lys Thr Thr

100 105 110

Ala Leu Ile Phe Ala Ser Gly Lys Met Val Val Thr Gly Ala Lys Ser

115 120 125

Glu Asp Asp Ser Lys Leu Ala Ser Arg Lys Tyr Ala Arg Ile Ile Gln
 130 135 140
 Lys Ile Gly Phe Ala Ala Lys Phe Thr Asp Phe Lys Ile Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu Gly Leu Ala
 165 170 175
 Phe Ser His Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu Phe Pro Gly
 180 185 190
 Leu Ile Tyr Arg Met Val Lys Pro Lys Ile Val Leu Leu Ile Phe Val

195 200 205
 Ser Gly Lys Ile Val Leu Thr Gly Ala Lys Gln Arg Glu Glu Ile Tyr
 210 215 220
 Gln Ala Phe Glu Ala Ile Tyr Pro Val Leu Ser Glu Phe Arg Lys Met
 225 230 235 240

<210> 4

<211> 723

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

atggccgatg aggaacgttt aaaggagttt aaagaggcaa acaagatagt gtttgatcca 60

aataccagac aagtatggga aaaccagaat cgagatggta caaaaccagc aactactttc 120

cagagtgaag aggacataaa aagagctgcc ccagaatctg aaaaagacac ctccgccaca 180

tcaggtattg ttccaacact acaaaacatt gtggcaactg tgactttggg gtgcaggtta 240

gatctgaaaa cagttgcgct acatgccccg aatgcagaat ataacccaa gcgttttgct 300

gctgtcatca tgcgtattag agagccaaaa actacagctt taatttttgc ctgagggaaa 360

atggttgtaa ccggtgcaaa aagtgaggat gactcaaagc tggccagtag aaaatatgca 420

agaattatcc aaaaaatcgg gtttctgct aaattcacag acttcaaaat acaaaatatt 480

gtcggttcgt gtgacgttaa attccctata cgtctagaag ggtagcatt cagtcatggt 540

actttctcct cctatgagcc agaattgttt cctggtttga tctatagaat ggtgaagccg 600

aaaattgtgt tgtaatttt tgtttcagga aagattgttc ttactggtgc aaagcaaagg 660

gaagaaattt accaagcttt tgaagctata taccctgtgc taagtgaatt tagaaaaatg 720

tga 723

<210> 5
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 5
 Met Pro Ala Thr Leu His Asp Ser Thr Lys Ile Leu Ser Leu Asn Thr
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Ile Pro Gln Ile Gly Leu Gly Thr Trp Gln Ser Lys Glu
 20 25 30
 Asn Asp Ala Tyr Lys Ala Val Leu Thr Ala Leu Lys Asp Gly Tyr Arg
 35 40 45
 His Ile Asp Thr Ala Ala Ile Tyr Arg Asn Glu Asp Gln Val Gly Gln
 50 55 60
 Ala Ile Lys Asp Ser Gly Val Pro Arg Glu Glu Ile Phe Val Thr Thr
 65 70 75 80
 Lys Leu Trp Cys Thr Gln His His Glu Pro Glu Val Ala Leu Asp Gln
 85 90 95
 Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Leu Tyr Leu Met His
 100 105 110
 Trp Pro Ala Arg Leu Asp Pro Ala Tyr Ile Lys Asn Glu Asp Ile Leu
 115 120 125
 Ser Val Pro Thr Lys Lys Asp Gly Ser Arg Ala Val Asp Ile Thr Asn
 130 135 140
 Trp Asn Phe Ile Lys Thr Trp Glu Leu Met Gln Glu Leu Pro Lys Thr
 145 150 155 160
 Gly Lys Thr Lys Ala Val Gly Val Ser Asn Phe Ser Ile Asn Asn Leu
 165 170 175
 Lys Asp Leu Leu Ala Ser Gln Gly Asn Lys Leu Thr Pro Ala Ala Asn
 180 185 190
 Gln Val Glu Ile His Pro Leu Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ile Asn Phe
 195 200 205
 Cys Lys Ser Lys Gly Ile Val Val Glu Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser

210 215 220
Thr Asp Ala Pro Leu Leu Lys Glu Pro Val Ile Leu Glu Ile Ala Lys

225 230 235 240
Lys Asn Asn Val Gln Pro Gly His Val Val Ile Ser Trp His Val Gln

245 250 255
Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Val Asn Pro Asp Arg Ile Lys

260 265 270
Thr Asn Arg Lys Ile Phe Thr Leu Ser Thr Glu Asp Phe Glu Ala Ile

275 280 285
Asn Asn Ile Ser Lys Glu Lys Gly Glu Lys Arg Val Val His Pro Asn

290 295 300

Trp Ser Pro Phe Glu Val Phe Lys

305 310

<210> 6

<211> 939

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 6

atgcctgcta cttacatga ttctacgaaa atcctttctc taaatactgg agcccaaadc 60

cctcaaatag gtttaggtac gtggcagtcg aaagagaacg atgcttataa ggctgtttta 120

accgctttga aagatggcta ccgacacatt gatactgctg ctatttaccg taatgaagac 180

caagtcggtc aagccatcaa ggattcaggt gtctctcggg aagaaatctt tgttactaca 240

aagttatggt gtacacaaca ccacgaacct gaagtagcgc tggatcaatc actaaagagg 300

ttaggattgg actacgtaga cttatatattg atgcattggc ctgccagatt agatccagcc 360

tacatcaaaa atgaagacat cttgagtgtg ccaacaaaga aggatggttc tcgtgcagtg 420

gatatcacca attggaattt catcaaaacc tgggaattaa tgcaggaact accaaagact 480

ggtaaaacta aggccgttgg agtctccaac ttttctataa ataacctgaa agatctatta 540

gcatctcaag gtaataagct tacgccagct gtaaccaag tcgaaataca tccattacta 600

cctcaagacg aattgattaa tttttgtaa agtaaaggca ttgtggttga agcttattct 660

ccgttaggta gtaccgatgc tccactattg aaggaaccgg ttatccttga aattgcgaag 720

aaaaataacg ttcaaccggg acacgttggt attagctggc acgtccaaag aggttatgtt 780

gtcttgccaa aatctgtgaa tcccgatcga atcaaacga acaggaaaat atttactttg 840
tctactgagg actttgaagc tatcaataac atatcgaagg aaaagggcga aaaaagggtt 900
gtacatccaa attggtctcc tttcgaagta ttcaagtaa 939

<210> 7

<211> 584

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 7

Met Ser Ala Lys Ser Phe Glu Val Thr Asp Pro Val Asn Ser Ser Leu
1 5 10 15

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

Lys Ile Leu Phe Arg Lys Thr Asp Ser Asp Lys Ile Ala Leu Ile Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly His Glu Pro Thr His Ala Gly Phe Ile Gly Lys
50 55 60

Gly Met Leu Ser Gly Ala Val Val Gly Glu Ile Phe Ala Ser Pro Ser
65 70 75 80

Thr Lys Gln Ile Leu Asn Ala Ile Arg Leu Val Asn Glu Asn Ala Ser

85 90 95

Gly Val Leu Leu Ile Val Lys Asn Tyr Thr Gly Asp Val Leu His Phe
100 105 110

Gly Leu Ser Ala Glu Arg Ala Arg Ala Leu Gly Ile Asn Cys Arg Val
115 120 125

Ala Val Ile Gly Asp Asp Val Ala Val Gly Arg Glu Lys Gly Gly Met
130 135 140

Val Gly Arg Arg Ala Leu Ala Gly Thr Val Leu Val His Lys Ile Val
145 150 155 160

Gly Ala Phe Ala Glu Glu Tyr Ser Ser Lys Tyr Gly Leu Asp Gly Thr
165 170 175

Ala Lys Val Ala Lys Ile Ile Asn Asp Asn Leu Val Thr Ile Gly Ser
180 185 190

Ser Leu Asp His Cys Lys Val Pro Gly Arg Lys Phe Glu Ser Glu Leu
195 200 205

Asn Glu Lys Gln Met Glu Leu Gly Met Gly Ile His Asn Glu Pro Gly
210 215 220

Val Lys Val Leu Asp Pro Ile Pro Ser Thr Glu Asp Leu Ile Ser Lys
225 230 235 240

Tyr Met Leu Pro Lys Leu Leu Asp Pro Asn Asp Lys Asp Arg Ala Phe
245 250 255

Val Lys Phe Asp Glu Asp Asp Glu Val Val Leu Leu Val Asn Asn Leu
260 265 270

Gly Gly Val Ser Asn Phe Val Ile Ser Ser Ile Thr Ser Lys Thr Thr
275 280 285

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Tyr Asn Ile Thr Pro Val Gln Thr Ile Ala
290 295 300

Gly Thr Leu Met Thr Ser Phe Asn Gly Asn Gly Phe Ser Ile Thr Leu
305 310 315 320

Leu Asn Ala Thr Lys Ala Thr Lys Ala Leu Gln Ser Asp Phe Glu Glu
325 330 335

Ile Lys Ser Val Leu Asp Leu Leu Asn Ala Phe Thr Asn Ala Pro Gly
340 345 350

Trp Pro Ile Ala Asp Phe Glu Lys Thr Ser Ala Pro Ser Val Asn Asp
355 360 365

Asp Leu Leu His Asn Glu Val Thr Ala Lys Ala Val Gly Thr Tyr Asp
370 375 380

Phe Asp Lys Phe Ala Glu Trp Met Lys Ser Gly Ala Glu Gln Val Ile
385 390 395 400

Lys Ser Glu Pro His Ile Thr Glu Leu Asp Asn Gln Val Gly Asp Gly
405 410 415

Asp Cys Gly Tyr Thr Leu Val Ala Gly Val Lys Gly Ile Thr Glu Asn
420 425 430

Leu Asp Lys Leu Ser Lys Asp Ser Leu Ser Gln Ala Val Ala Gln Ile
435 440 445

Ser Asp Phe Ile Glu Gly Ser Met Gly Gly Thr Ser Gly Gly Leu Tyr
450 455 460

Ser Ile Leu Leu Ser Gly Phe Ser His Gly Leu Ile Gln Val Cys Lys
465 470 475 480

Ser Lys Asp Glu Pro Val Thr Lys Glu Ile Val Ala Lys Ser Leu Gly
485 490 495

Ile Ala Leu Asp Thr Leu Tyr Lys Tyr Thr Lys Ala Arg Lys Gly Ser
500 505 510

Ser Thr Met Ile Asp Ala Leu Glu Pro Phe Val Lys Glu Phe Thr Ala

515 520 525

Ser Lys Asp Phe Asn Lys Ala Val Lys Ala Ala Glu Glu Gly Ala Lys
530 535 540

Ser Thr Ala Thr Phe Glu Ala Lys Phe Gly Arg Ala Ser Tyr Val Gly
545 550 555 560

Asp Ser Ser Gln Val Glu Asp Pro Gly Ala Val Gly Leu Cys Glu Phe
565 570 575

Leu Lys Gly Val Gln Ser Ala Leu
580

<210> 8

<211

> 1755

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 8

atgtccgcta aatcgtttga agtcacagat ccagtcatt caagtcctca agggtttgcc	60
cttgtaacc cctccattac gctggtcct gaagaaaaaa ttctcttcag aaagaccgat	120
tccgacaaga tcgcattaat ttctggtggt ggtagtgac atgaacctac acacgccggt	180
ttcattggta agggatatgtt gaggggccc gtggttgccg aaatttttgc atccccctca	240
acaaaacaga ttttaaagtc aatccgttta gtcaatgaaa atgcgtctgg cgttttattg	300
attgtgaaga actacacagg tgatgttttg cattttggtc tgtccgctga gagagcaaga	360

gccttgggta ttaactgccg cggttgctgtc ataggatgat atgttgagcagg tggcagagaa	420
aagggtggta tgggtggttag aagagcattg gcaggtaccg ttttggttca taagattgta	480

gggtgccttcg cagaagaata ttctagtaag tatggcttag acggtacagc taaagtggct 540
 aaaattatca acgacaattt ggtgaccatt ggatcttctt tagaccattg taaagttcct 600
 ggcaggaat tcgaaagtga attaaacgaa aaacaaatgg aattgggtat ggggtattcat 660
 aacgaacctg gtgtgaaagt tttagacctt attccttcta ccgaagactt gatctccaag 720
 tatatgctac caaaactatt ggatccaaac gataaggata gagcttttgt aaagtttgat 780

gaagatgatg aagttgtctt gttagttaac aatctcggcg gtgtttctaa ttttgttatt 840
 agttctatca cttccaaaac tacggatttc ttaaaggaaa attacaacat aaccccggtt 900
 caaacaattg ctggcacatt gatgacctcc ttcaatggta atgggttcag tatcacatta 960
 ctaaacgcca ctaaggctac aaaggctttg caatctgatt ttgaggagat caaatcagta 1020
 ctagacttgt tgaacgcatt tacgaacgca ccgggctggc caattgcaga ttttgaaaag 1080
 actttcgccc catctgttaa cgatgacttg ttacataatg aagtaacagc aaaggccgtc 1140
 ggtacctatg actttgacaa gtttgctgag tggatgaaga gtggigtctga acaagttatc 1200

aagagcgaac cgcacattac ggaactagac aatcaagttg gtgatggga ttgtggttac 1260
 actttagtgg caggagttaa aggcacacc gaaaaccttg acaagctgtc gaaggactca 1320
 ttatctcagg cggttgcccc aatttcagat ttcatggaag gctcaatggg aggtacttct 1380
 ggtgggttat attctattct tttgtcgggt ttttcacacg gattaatca ggtttgtaaa 1440
 tcaaaggatg aacccgtcac taaggaaatt gtggctaagt cactcggaat tgcattggat 1500
 actttataca aatatacaaa ggcaaggaag ggatcatcca ccatgattga tgctttagaa 1560
 ccattcgtta aagaatttac tgcactaag gatttcaata aggcggtaaa agctgcagag 1620

gaaggtgcta aatccactgc tacattcgag gccaaatttg gcagagcttc gtatgtcggc 1680
 gattcatctc aagtagaaga tcctgggtgca gtaggcctat gtgagttttt gaaggggggtt 1740
 caaagcgctt tgtaa 1755

<210> 9

<211> 560

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 9

Met Ser Leu Ile Ser Ile Leu Ser Pro Leu Ile Thr Ser Glu Gly Leu

1 5 10 15

Asp Ser Arg Ile Lys Pro Ser Pro Lys Lys Asp Ala Ser Thr Thr Thr

Lys Pro Ser Leu Trp Lys Thr Thr Glu Phe Lys Phe Tyr Tyr Ile Ala
 35 40 45
 Phe Leu Val Val Val Pro Leu Met Phe Tyr Ala Gly Leu Gln Ala Ser
 50 55 60
 Ser Pro Glu Asn Pro Asn Tyr Ala Arg Tyr Glu Arg Leu Leu Ser Gln
 65 70 75 80
 Gly Trp Leu Phe Gly Arg Lys Val Asp Asn Ser Asp Ser Gln Tyr Arg
 85 90 95

 Phe Phe Arg Asp Asn Phe Ala Leu Leu Ser Val Leu Met Leu Val His
 100 105 110
 Thr Ser Ile Lys Arg Ile Val Leu Tyr Ser Thr Asn Ile Thr Lys Leu
 115 120 125
 Arg Phe Asp Leu Ile Phe Gly Leu Ile Phe Leu Val Ala Ala His Gly
 130 135 140
 Val Asn Ser Ile Arg Ile Leu Ala His Met Leu Ile Leu Tyr Ala Ile
 145 150 155 160
 Ala His Val Leu Lys Asn Phe Arg Arg Ile Ala Thr Ile Ser Ile Trp

 165 170 175
 Ile Tyr Gly Ile Ser Thr Leu Phe Ile Asn Asp Asn Phe Arg Ala Tyr
 180 185 190
 Pro Phe Gly Asn Ile Cys Ser Phe Leu Ser Pro Leu Asp His Trp Tyr
 195 200 205
 Arg Gly Ile Ile Pro Arg Trp Asp Val Phe Phe Asn Phe Thr Leu Leu
 210 215 220
 Arg Val Leu Ser Tyr Asn Leu Asp Phe Leu Glu Arg Trp Glu Asn Leu
 225 230 235 240

 Gln Lys Lys Lys Ser Pro Ser Tyr Glu Ser Lys Glu Ala Lys Ser Ala
 245 250 255
 Ile Leu Leu Asn Glu Arg Ala Arg Leu Thr Ala Ala His Pro Ile Gln
 260 265 270
 Asp Tyr Ser Leu Met Asn Tyr Ile Ala Tyr Val Thr Tyr Thr Pro Leu
 275 280 285

Phe Ile Ala Gly Pro Ile Ile Thr Phe Asn Asp Tyr Val Tyr Gln Ser
 290 295 300
 Lys His Thr Leu Pro Ser Ile Asn Phe Lys Phe Ile Phe Tyr Tyr Ala

 305 310 315 320
 Val Arg Phe Val Ile Ala Leu Leu Ser Met Glu Phe Ile Leu His Phe
 325 330 335
 Leu His Val Val Ala Ile Ser Lys Thr Lys Ala Trp Glu Asn Asp Thr
 340 345 350
 Pro Phe Gln Ile Ser Met Ile Gly Leu Phe Asn Leu Asn Ile Ile Trp
 355 360 365
 Leu Lys Leu Leu Ile Pro Trp Arg Leu Phe Arg Leu Trp Ala Leu Leu
 370 375 380

 Asp Gly Ile Asp Thr Pro Glu Asn Met Ile Arg Cys Val Asp Asn Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ser Ser Leu Ala Phe Trp Arg Ala Trp His Arg Ser Tyr Asn Lys
 405 410 415
 Trp Val Val Arg Tyr Ile Tyr Ile Pro Leu Gly Gly Ser Lys Asn Arg
 420 425 430
 Val Leu Thr Ser Leu Ala Val Phe Ser Phe Val Ala Ile Trp His Asp
 435 440 445
 Ile Glu Leu Lys Leu Leu Leu Trp Gly Trp Leu Ile Val Leu Phe Leu

 450 455 460
 Leu Pro Glu Ile Phe Ala Thr Gln Ile Phe Ser His Tyr Thr Asp Ala
 465 470 475 480
 Val Trp Tyr Arg His Val Cys Ala Val Gly Ala Val Phe Asn Ile Trp
 485 490 495
 Val Met Met Ile Ala Asn Leu Phe Gly Phe Cys Leu Gly Ser Asp Gly
 500 505 510
 Thr Lys Lys Leu Leu Ser Asp Met Phe Cys Thr Val Ser Gly Phe Lys
 515 520 525

 Phe Val Ile Leu Ala Ser Val Ser Leu Phe Ile Ala Val Gln Ile Met

530	535	540	
Phe	Glu	Ile	Arg
Glu	Glu	Glu	Lys
Arg	His	Gly	Ile
Tyr	Leu	Lys	Cys
545	550	555	560
<210>	10		
<211>	1683		
<212>	DNA		
<213>	Saccharomyces cerevisiae		
<400>	10		
atgtcgtga	tcagcatcct	gtctccccta	attacttccg
agggttaga	ttcaagaatc	60	
aaaccttcac	caaaaaagga	tgcctctact	accactaagc
catcactatg	gaaaactact	120	
gagttcaaat	tctactacat	tgcatctctg	gtcgtgggtc
ccttgatgtt	ctatgctggg	180	
ttacaagcta	gttcgccga	aaatccaaac	tatgcaagat
acgaacgtct	cctatctcaa	240	
ggttgggttat	ttggcagaaa	agtagacaat	agtgattctc
aatatagggtt	tttcagggac	300	
aattttgcgc	tattgtcagt	tttaatgcta	gtccacactt
ctataaaacg	cattgtactt	360	
tattcaacaa	atatcactaa	attgaggttt	gatctgatat
ttggtttgat	cttttttagtg	420	
gccgctcatg	gtgtcaattc	gataagaatt	ttagcccata
tgctaatttt	atatgccatc	480	
gccccatgtac	taaagaactt	tagaagaata	gccaccatca
gcatttggat	ttatggattt	540	
tctacgcttt	ttattaacga	caacttcaga	gcatatccat
ttggtaatat	ttgctctttt	600	
ttaagcccat	tggaccattg	gtatagaggt	atcattccaa
gatgggatgt	ctttttcaat	660	
tttactcttt	tgagagtctt	aagttacaac	ttggacttct
tagagagggtg	ggagaattta	720	
caaaagaaga	aaagtccatc	ctatgaatca	aaagaagcta
aatcagccat	tttgctcaat	780	
gaacgtgcta	gattaactgc	tgcacacccc	atacaggact
acagcttaat	gaattatatt	840	
gcatatgtta	cttacacgcc	acttttcatt	gccggcccca
ttataacatt	caatgattat	900	
gtttaccaat	cgaaacatac	cttgccatca	ataaatttca
aattcatctt	ttactatgcg	960	
gtgagattcg	ttattgctct	cttatctatg	gagttcattt
tacactttct	ccacgttgtg	1020	
gcaatctcaa	aaaccaaaagc	gtgggaaaat	gacacacctt
tccagatttc	catgattggc	1080	
ttatttaatt	tgaatattat	ttggctaaaa	ctactgattc
cgtggaggct	gtttaggctg	1140	
tgggctttgc	tagacggaat	cgatacacct	gaaaaatga
tcaggtgtgt	tgataacaat	1200	
tacagttcac	tagcattctg	gagagcttgg	catagaagct
acaataagtg	ggttgtccgt	1260	
tacatatata	ttcctctagg	tggttcaaaa	aatagagttt
tgacatcact	agcagctttt	1320	
tccttcgtag	ctatatggca	tgacatcgaa	ctaaagtat
tattatgggg	ttggctaata	1380	
gttttgcttc	tcttaccaga	aatttttgct	acccaaattt
tctctcatta	taccgacgca	1440	

gtctggtaca gacacgtttg cgctgtcggg gctgttttca acatatgggt tatgatgac 1500
gctaattctt ttggattctg cttgggctct gacggtacta aaaaattact aagcgatatg 1560
ttctgtaccg tatctggttt caaatgttga attttggcaa gcgttagttt attcatcgca 1620
gtacaaataa tgtttgaaat cagagaagaa gaaaagaggc acggaattta cctaaatgc 1680
tga 1683

<210> 11

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

actagtcctc cgccaccaa ggagatgatg gacaagcata agta 44

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

actagtttac atgataattg gtttag 26

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

agatctcccg cgccaccaa ggagatggcc gatgaggaac gttt 44

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

agatcttcac atttttctaa attcactta

29

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

ggatccatgt cagcatttta ggtaaattcc gtg

33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ggatccataa tgcgctgat cagcatcctg tct

33

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

ggatccatgc ctgctacttt acatgattct

30

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gtcgacatac ttgaatactt cgaaaggag

29

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400>	19	
actagtatgt ccgctaaatc gtttgaagtc		30
<210>	20	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	20	
atcgatatac aaggcgcttt gaaccccctt		30
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	21	
gaattcatgt cgctgatcag catcctg		27
<210>	22	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	22	
actagtcag cattttaggt aaattccgtg		30