

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 6월 1일 (01.06.2017)



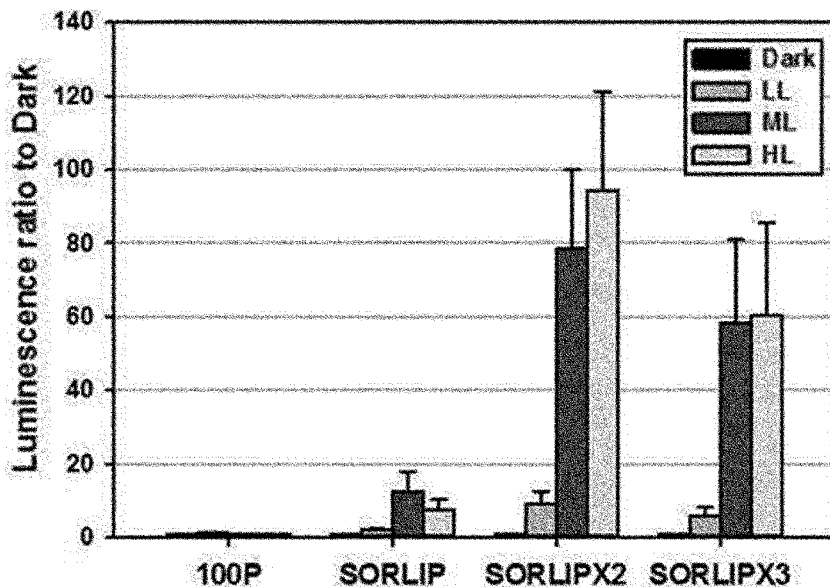
(10) 국제공개번호
WO 2017/091027 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) C12P 5/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/013683
- (22) 국제출원일: 2016년 11월 25일 (25.11.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0165780 2015년 11월 25일 (25.11.2015) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HAN-YANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 진언선 (JIN, Eon Seon); 04582 서울시 중구 퇴계로 90길 74, 103동 802호 (신당동, 래미안신당하이베르), Seoul (KR). 백광열 (BAEK, Kwang Ryul); 10449 경기도 고양시 일산동구 경의로 33, 현대밀라트 1차 B동 811호 (백석동), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE HAVING ACTIVITY TO PROMOTE LIGHT INDUCTION AND GENE EXPRESSION SYSTEM COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭 : 광유도를 증진하는 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템



(57) Abstract: The present invention relates to a modified promoter using a SORLIP element and a gene expression system comprising the same. The use of a polynucleotide for promoting the light inducing activity of the present invention can significantly promote the light inducing activity of the light-inducible promoter comprising the SORLIP element, and the use of a transformant of the present invention can effectively express a target protein while regulating the expression level of the target protein by light irradiation.

(57) 요약서: 본 발명은 SORLIP 엘리먼트를 이용한 개량 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 광유도 활성 증진용 폴리뉴클레오티드를 이용하는 경우, SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성을 크게 증진시킬 수 있고, 본 발명의 형질전환체를 이용하는 경우, 목적 단백질의 발현량을 광 조사에 의해 조절하면서 목적 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있다.



WO 2017/091027 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 광유도를 증진하는 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템

기술분야

- [1] 본 발명은 SORLIP 엘리먼트를 이용한 개량 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 바이오 연료 개발, 이산화탄소 발생 저감, 고부가가치 물질 생산 등 최신 생명공학 기술에 미세조류를 이용하고자 하는 시도와 함께 유전자의 염기서열을 분석하려는 노력들이 진행되고 있다. 이러한 노력의 일환으로서, 기존의 미세조류에 유용한 유전자를 도입하여 원하는 형질을 나타내도록 하려는 시도가 계속되고 있다. 그러나 미세조류는 형질전환 효율이나 도입된 유전자의 발현 효율이 낮은 형질전환 기술 상에 문제가 있다(Lumbreras et al., *Plnat J.* 1998; 14: 441-447).
- [3] 이러한 문제를 해결하기 위한 중요한 수단 중의 하나로 미세조류를 위한 각종 프로모터들이 개발되고, 미세조류에서 유래한 프로모터를 사용함으로써 기존에 알려진 고등식물용 프로모터를 사용하는 경우보다 효과적인 형질전환 및 유전자 발현을 유도할 수 있다(Walker et al., *J. Applied Phycol.* 2005; 17: 363-368). 최근에 발표되고 있는 클라미도모나스 속 조류(Schroda et al., *The Plant Journal* 2000; 21(2): 121-131)와 두날리엘라 속 조류(Li et al., *Mol Biol. Rep.* 2010; 37: 1143-1154)를 위한 프로모터에 대한 연구도 이러한 연구의 한 결과이다.
- [4] 상기 Schroda et al.에 개시된 클라미도모나스 속 조류 유래의 프로모터는 두 가지 서로 다른 프로모터를 융합시킨 것으로, 주로 열 충격에 의해 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 그러나, 상기 프로모터를 이용하는 경우, 유전자의 발현 유도를 위해 열을 가하게 되면, 조류의 생장이나 대사과정에 무리를 줄 수 있는 문제가 있다.
- [5] 상기 Li et al.에 개시된 두날리엘라 속 조류 유래의 프로모터는 높은 염농도 조건(2M NaCl)에서 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 그러나, 상기 프로모터는 호염성의 생물종에만 적용될 수 있을 뿐이어서, 여전히 활용 범위가 좁은 문제가 있다.
- [6] 이에, 다양한 종류의 생물체에 적용 가능하여 활용 범위가 넓으면서도, 생물체의 생장이나 대사과정에 무리를 주지 않고, 간편하게 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터의 개발이 절실한 실정이다.
- [7] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의

내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 광유도 활성이 증진된 광유도성 프로모터를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터에 있어서, SORLIP 엘리먼트 부분을 특정 서열을 갖는 둘 이상의 SORLIP 엘리먼트 반복 서열로 치환하는 경우, 광유도 활성이 크게 향상됨을 규명하여, 본 발명을 완성하였다.
- [9] 따라서, 본 발명의 목적은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성 증진용 폴리뉴클레오티드를 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터에서 상기 SORLIP 엘리먼트를 제 1 항의 폴리뉴클레오티드로 치환하는 것;을 포함하는 광유도 활성이 개선된 광유도성 프로모터의 제조 방법을 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 광유도성 프로모터를 제공하는데 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 광유도성 프로모터를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 제공하는데 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터를 제공하는데 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 광유도성 프로모터 및 다중클로닝부위(MCS)를 포함하는 발현벡터를 제공하는데 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 형질전환체를 이용한 외래 단백질의 생산 방법을 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [18] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 일반식 1의 폴리뉴클레오티드를 제공한다:
- [19] [일반식 1]
- [20] 5'-GCCAC-(X_a-GCCAC)_n-3'
- [21] 상기 일반식 1의 상기 G는 구아닌, 상기 C는 시토신, 상기 A는 아데닌을 나타내고, 상기 X_a는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 구성된 군으로부터 선택되는 15-25개의 뉴클레오티드이며, 상기 n은 1 내지 3의 정수이고, 상기 n이 2 이상인 경우, 상기 일반식 1에 포함되는 복수의 X_a 서열은 각각 동일하거나 동일하지 않다.

- [22] 본 발명자들은 광유도 활성이 증진된 광유도성 프로모터를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터에 있어서, SORLIP 엘리먼트 부분을 특정 서열을 갖는 둘 이상의 SORLIP 엘리먼트 반복 서열로 치환하는 경우, 광유도 활성이 크게 향상됨을 규명하였다.
- [23] 따라서, 상기 상기 폴리뉴클레오티드는 광유도성 프로모터의 광유도를 증진시키는 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [24] 본 명세서에서의 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 프로모터 부위는 당업자라면 용이하게 인식할 수 있다. 즉, ATG 모티프를 포함하는 추정의 개시코돈이 확인되어 있고, 이 개시코돈으로부터 업스트림이 추정 프로모터 부위이다. 프로모터는 인접 및 원거리의 업스트림 엘리먼트(element)들로 구성되어 있다. 인접 엘리먼트로서는 통상적으로 RNA 중합효소 II가 적합한 전사 개시 위치에서 RNA의 합성을 개시할 수 있게 하는 TATA 박스를 포함한다. 원 거리 엘리먼트는 인핸서(enhancer)라고도 불리우는 조절 서열을 포함하는데, 이는 TATA 박스의 업스트림 부위에 조직 특이적 또는 시간 특이적 발현에 관여하는 추가 조절 엘리먼트이다. 인핸서는 프로모터의 활성을 촉진할 수 있는 DNA 서열이고, 프로모터의 고유의 엘리먼트이거나, 프로모터의 조직-특이성이나 발현 수준을 향상시키기 위해서 삽입되는 이종기원(heterologous)의 엘리먼트일 수 있다. 프로모터는 본래의 유전자로부터 그 전체가 유래한 것일 수 있고, 또는 자연계에서 발견된 상이한 프로모터들로부터 유래한 상이한 엘리먼트들로 구성될 수도 있으며, 심지어 합성 DNA를 포함할 수도 있다. 당업자라면 각각 상이한 프로모터는 각각 상이한 조직 또는 세포 타입에서, 또는 발달단계의 상이한 단계에서, 또는 상이한 환경조건에 대응하여서 유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 유전자를 대부분의 세포타입에서 대부분의 시간동안 발현시키는 프로모터를 "구성성(constitutive) 프로모터"라고 한다. 식물체 세포내에서 유용한 다양한 타입의 새로운 프로모터들이 계속적으로 발견되고 있다; 다수의 프로모터 예들이 Okamuro and Goldberg에 의한 편집물에 개시되어 있다(1989, *Biochemistry of Plants* 15:1-82). 대부분의 경우에서 조절 서열의 정확한 경계부분이 완벽하게 정해지지 않기 때문에 일정한 변이의 DNA 단편들이 동일한 프로모터 활성을 갖는다고 인식되어 있다.
- [25] 본 발명의 "SORLIP"은 "Hudson, Matthew E., and Peter H. Quail. "Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data." *Plant physiology* 133.4 (2003): 1605-1616."에 개시되어 있는 서열로서 종래 빛에 의해 유전자 발현이 조절되는 유전자군의 프로모터에 대한 통계적 분석을 통해 빈번히 존재하여 광유도 기작에 중요한 역할을 할 것으로 예측되던 업스트림 엘리먼트이다.
- [26] 본 발명자들은 두날리엘라에서 유래한 LIP 프로모터를 이용하여, -100 내지

-125 뉴클레오티드 위치의 서열에서 광유도 기작의 주요 역할을 담당하는 부위가 있음을 밝혔으며, 해당 영역에 SORLIP 엘리먼트인 GCCAC 서열이 존재함을 밝혔다. 이어서 본 발명자들은 해당 GCCAC 서열을 임의적으로 2회 이상 반복되는 서열로 치환하는 경우, 광유도 활성이 향상됨을 밝혔고, 반복되는 서열 간의 이격되는 거리가 광유도 활성의 향상에 중요한 영향을 준다는 결과를 도출하였다.

- [27] 본 발명의 "SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터"는 광 조사에 의해 프로모터에 작동적으로 결합된(operatively linked) 다른 핵산 서열의 발현이 유도되는 프로모터로서 SORLIP 엘리먼트로 알려진 GCCAC 염기 서열을 포함하는 프로모터를 의미한다. 구체적으로 예를 들면, 현재 알려진 LIP 프로모터(Park, Seunghye, et al. "Expression of the high light-inducible *Dunaliella* LIP promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta* 238.6 (2013): 1147-1156.), pkHMGR 프로모터(Kawoosa, Tabasum, et al. "The GATA and SORLIP motifs in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase promoter of *Picrorhiza kurroa* for the control of light-mediated expression." *Functional & integrative genomics* 14.1 (2014): 191-203.), PyHLIP 프로모터(Kong, Fanna, et al. "Cloning and characterization of the HLIP gene encoding high light-inducible protein from *Porphyra yezoensis*." *Journal of applied phycology* 24.4 (2012): 685-692.), AtELIP1,2 프로모터(Alvarez-Canterbury, Ana M. Rus, et al. "A double SORLIP1 element is required for high light induction of ELIP genes in *Arabidopsis thaliana*." *Plant molecular biology* 84.3 (2014): 259-267.)가 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [28] 본 명세서 상의 용어 "작동적으로 결합된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열, 예를 들어 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이와 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.
- [29] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 엘리먼트는 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 SORLIP 엘리먼트를 치환하여 상기 광유도성 프로모터에 포함된다. 본 발명자들은 기존의 SORLIP 엘리먼트를 대신하여, 일반식 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 엘리먼트로 치환하는 경우 광유도 활성이 크게 증가함을 확인하였다. 일반식 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 엘리먼트가 기존의 SORLIP 엘리먼트를 치환하는 경우, 기존의 SORLIP 엘리먼트의 5'-말단 측에 존재하는 서열의 일부 또는 전부가 함께 제거될 수 있다.
- [30] [일반식 1]
- [31] 5'-GCCAC-(X_a-GCCAC)_n-3'
- [32] 상기 일반식 1의 상기 G는 구아닌, 상기 C는 시토신, 상기 A는 아데닌을 나타내고, 상기 X_a는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 구성된 군으로부터 선택되는 15-25개의 뉴클레오티드로 구성된 핵산서열을 나타내며, 상기 n은 1

내지 3의 정수이고, n 이 2이상인 경우에 있어서, 상기 일반식 1 서열 내에 포함되는 복수의 X_a 서열은 각각 동일하거나 동일하지않은 서열이다. 본 발명자들은 복수 개의 SORLIP 엘리먼트, GCCAC 서열이 대략 15-25개의 뉴클레오티드 서열만큼 이격되어 있는 경우 가장 높은 광유도 활성 향상 효과를 나타냄을 규명하였다. 바람직하게는 17-21개의 뉴클레오티드 서열만큼 이격될 수 있다.

- [33] 본 발명의 일반식 1의 상기 n 은 1 내지 3의 정수이고, n 이 2이상인 경우에 있어서, 상기 일반식 1 서열 내에 포함되는 복수의 X_a 서열은 각각 동일하거나 동일하지않은 서열이다. 상기 n 이 1 내지 3의 정수인 것은 프로모터 내의 SORLIP 서열이 2-4회 반복될 수 있음을 의미한다. 상기 X_a 서열은 SORLIP 서열 간의 일정 거리를 이격시키기 위한 서열로서, 구체적인 서열 정보를 요하지 않고, 17-21개의 뉴클레오티드로 구성되어 일정 거리를 유지하는 것이 중요하다. 일 구체예로 상기 X_a 서열은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 자연상태의 프로모터 핵산 서열 중 SORLIP 엘리먼트의 5'말단에 결합된 첫 번째 뉴클레오티드에서부터 5'말단 방향으로 15-25번째의 뉴클레오티드까지를 포함하는 서열일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [34] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 일반식 1의 n 은 1 내지 2의 정수이다. 상술한 바와 같이 본 발명자들은 단일의 SORLIP 엘리먼트를 2회 이상 일정 거리로 이격된 상태로 반복 시킴으로써 광유도 활성이 증대됨을 규명하였고, 바람직하게는 SORLIP 엘리먼트를 2-3회 반복 시킬 수 있음을 규명하였다.
- [35] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 일반식 1의 n 은 1이다. 본 발명자들은 2회 반복 SORLIP 엘리먼트 또는 3회 반복 SORLIP 엘리먼트를 모두 바람직하게 이용할 수 있지만, 그 중에서도 SORLIP 엘리먼트가 2회 반복된 경우가 가장 높은 광유도 프로모터 활성을 보임을 규명하였다.
- [36] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터에서 상기 SORLIP 엘리먼트를 제 1 항의 폴리뉴클레오티드로 치환하는 것;을 포함하는 광유도 활성이 개선된 광유도성 프로모터의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 기존의 SORLIP 엘리먼트를 치환하는 경우, 기존의 SORLIP 엘리먼트의 5'-말단 측에 존재하는 서열의 일부 또는 전부가 함께 제거될 수 있다.
- [37] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 SORLIP 엘리먼트를 상술한 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 치환하는 단계를 포함하는, SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성 증진 방법을 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 기존의 SORLIP 엘리먼트를 치환하는 경우, 기존의 SORLIP 엘리먼트의 5'-말단 측에 존재하는 서열의 일부 또는 전부가 함께 제거될 수 있다.
- [38] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는

기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 본래의 SORLIP 엘리먼트를 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 치환하기 위해 종래 알려진 HR(homologous recombination) 및 NHEJ(nonhomologous end-joining), ZFNs(Zinc finger nucleases), TALENs(Transcription Activator-Like Effector Nucleases), CRISPR/Cas 시스템, 및/또는 엔지니어링된 메가뉴클레아제 재-엔지니어링된 호밍 엔도뉴클레아제(engineered meganuclease re-engineered homing endonucleases)를 이용할 수 있다(「Esvelt, KM.; Wang, HH. (2013). "Genome-scale engineering for systems and synthetic biology." Mol Syst Biol 9 (1): 641. doi:10.1038/msb.2012.66. PMC 3564264. PMID 23340847.」, 「Tan, WS.; Carlson, DF.; Walton, MW.; Fahrenkrug, SC.; Hackett, PB. (2012). "Precision editing of large animal genomes." Adv Genet 80: 37-97. doi:10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8. PMC 3683964. PMID 23084873.」, 및 「Puchta, H.; Fauser, F. (2013). "Gene targeting in plants: 25 years later." Int. J. Dev. Biol 57: 629-637. doi:10.1387/ijdb.130194hp.」).

- [39] 본래의 SORLIP 엘리먼트의 5'말단에 결합된 핵산 서열은 전부 제거되어도, 본 발명의 효과를 발휘하는데 큰 영향이 없고, 따라서 일부 또는 전부가 삭제될 수 있다.
- [40] 본 발명인 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성 증진 방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성 증진용 폴리뉴클레오티드를 이용하는 방법에 해당하는 바, 중복되는 내용에 대해서는 그 내용을 원용하며, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.
- [41] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 일반식 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 광유도성 프로모터를 제공한다:
- [42] [일반식 2]
- [43] $5'-X_b-GCCAC-(X_a-GCCAC)_n-X_c-3'$
- [44] 상기 일반식 2의 상기 G는 구아닌, 상기 C는 시토신, 상기 A는 아데닌이고, 상기 X_a 는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 구성된 군으로부터 선택되는 15-25개의 뉴클레오티드이며, 상기 X_b 는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 구성된 군으로부터 선택되는 0-15개의 뉴클레오티드이고, 상기 X_c 는 LIP 프로모터의 -1 내지 -101 뉴클레오티드이며, 상기 n은 1 내지 3의 정수이고, 상기 n이 2 이상인 경우, 상기 일반식 2 서열 내에 포함되는 복수의 X_a 서열은 각각 동일하거나 동일하지 않다.
- [45] 본 발명의 "광유도성 프로모터"는 광의 조사에 의해 상기 프로모터의 다운스트림(downstream), 즉 상기 프로모터 서열의 3'말단에 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도하고, 특히 조사되는 광의 세기에 따라 상기 유전자의 발현량을 조절할 수 있는 프로모터를 의미한다.
- [46] 본 발명의 일반식 2 서열에 있어서, 상기 일반식 2 서열에 포함되는

- 5'-GCCAC-(X_a-GCCAC)_n-3' 서열 부분은 상술한 일반식 1 서열에 대한 설명과 동일하다.
- [47] 본 발명의 일반식 2 서열 중 X_b는 임의적으로 포함되는 서열로서, 존재하지 않을 수 있고, 무작위로 구성된 1-15개의 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 구체적으로 예를 들면 상기 X_b 서열은 LIP(light inducible protein) 프로모터의 -107 위치의 뉴클레오티드 서열에서부터 5'말단 방향으로 1-15개의 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 또한 상기 X_a는 상술한 일반식 1 서열에 대한 설명과 동일한 것으로 설명하였고, 구체적으로 예를 들면, LIP 프로모터의 SORLIP 엘리먼트의 5'말단에 결합된 첫 번째 뉴클레오티드인 -107 위치의 뉴클레오티드에서부터 5'말단 방향으로 15-25번째의 뉴클레오티드까지를 포함하는 서열일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 X_a는 17-21개의 뉴클레오티드로 구성된 핵산서열이다. 상기 17-21개의 서열은 구체적으로 예를 들면, LIP 프로모터의 SORLIP 엘리먼트의 5'말단에 결합된 첫 번째 뉴클레오티드인 -107 위치의 뉴클레오티드에서부터 5'말단 방향으로 17-21번째의 뉴클레오티드까지를 포함하는 서열일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 일반식 2의 n은 1 내지 2의 정수이다. 이미 상술한 바와 같이 본 발명자들은 단일의 SORLIP 엘리먼트를 2회 이상 일정 거리로 이격된 상태로 반복 시킴으로써 광유도 활성이 증대됨을 규명하였고, 바람직하게는 SORLIP 엘리먼트를 2-3회 반복 시킬 수 있음을 규명하였다.
- [50] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 일반식 2의 n은 1이다. 이미 상술한 바와 같이 본 발명자들은 2회 반복 SORLIP 엘리먼트 또는 3회 반복 SORLIP 엘리먼트를 모두 바람직하게 이용할 수 있지만, 그 중에서도 SORLIP 엘리먼트가 2회 반복된 경우가 가장 높은 광유도 프로모터 활성을 보임을 규명하였다.
- [51] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 일반식 2로 표시되는 뉴클레오티드 서열은 서열목록 제 2 서열로 구성된다. 서열목록 제2서열은 두날리엘라 유래의 LIP 프로모터의 SORLIP 엘리먼트 부위로부터 5' 말단 쪽의 서열을 일반식 2로 표시되는 서열 중 특정의 서열로 치환한 일 구체예를 나타낸다.
- [52] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 광유도성 프로모터에 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 제공한다.
- [53] 본 발명의 "외래 단백질"은 생산하고자 하는 단백질을 의미하는 것으로서, 유전자의 염기서열이 알려진 모든 종류의 단백질일 수 있다. 특히, 상기 외래 단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소 저해제, 항체 및 이의 단편 등일 수 있다.
- [54] 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자는 본 발명의 광유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 상기 작동가능하게 연결된다는 것은 상기 외래

단백질의 발현이 상기 광 유도성 프로모터의 활성화에 의해 조절될 수 있도록 연결되는 것을 의미한다. 따라서, 상기 광 유도성 프로모터에 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결되어 형성되는 상기 "유전자 컨스트럭트"는 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트가 된다.

- [55] 상기 유전자 컨스트럭트는 발현벡터에 포함되어, 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 광 의존적으로 조절할 수 있다.
- [56] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [57] 본 명세서 상의 용어 "발현벡터"는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서와 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.
- [58] 본 발명의 발현벡터에는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선별하기 위한 선별 마커를 더 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 종래 공지된 모든 종류의 선별 마커일 수 있으며, 항생제 내성 유전자 또는 발광 유전자 등이 이용될 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 발현 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 발현벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*nptII*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등)를 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명의 발현벡터는 종래의 모든 발현벡터에 본 발명의 광유도성 프로모터를 도입한 것일 수 있고, 공지의 방법에 의하여 인위적으로 디자인된 재조합 발현벡터일 수 있다. 상술한 광유도성 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시가능하다.
- [60] 상기 발현벡터의 제조를 위한 벡터는 본 발명의 광유도성 프로모터를 도입할 수 있는 것이라면 무엇이든 사용가능하고, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등 일 수 있다. 특히, 미세조류 또는 고등식물과 같은 숙주세포 내에서 안정하게 존재하고 카피수가 많은 벡터를 사용하는 것이 바람직하다.
- [61] 본 발명의 발현벡터는 숙주세포에 도입되어, 상기 숙주세포를 형질전환할 수 있다.
- [62] 상기 형질전환은 종래 공지된 형질전환 기술에 의해 당업자가 용이하게 수행할 수 있고, 상기 형질전환 기술은 Kindle(1990)에 의해 공지된 글라스 비드를

이용한 형질전환법, 칼슘/폴리에틸렌 글리콜법을 이용한 원형질체의 형질전환법, 전기천공법, 미량주사법, 입자 충격 투입법(**particle bombardment**), 전기충격법(**electrophoration**), 아그로박테리움을 매개로 한 방법, 유전자 총 또는 물리적 도입법 등이 있다. 상기 형질전환 기술은 숙주세포의 종류 및 특성에 맞게 당업자가 적절히 선택하여 수행할 수 있다.

[63] 상기 발현벡터로 형질전환시키기 위한 숙주세포는 미세조류 또는 고등식물인 것이 바람직하고, 클라미도모나스 또는 두날리엘라인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 프로모터를 인식할 수 있는 **RNA 중합효소**를 가진 세포는 모두 사용가능하다. 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 **Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)**에 개시되어 있다.

[64] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 형질전환체는 본 발명의 다른 일 양태인 발현 벡터에 대한 상세한 설명에서 설명한 바와 같이 미세조류 또는 고등식물을 숙주로하여, 상술한 발현 벡터로 형질전환시킨 형질전환체인 것이 바람직하다.

[65] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 외래 단백질의 생산 방법을 제공한다:

[66] (a) 본 발명의 다른 일 양태에서 설명한 형질전환체를 배양하는 단계; 및

[67] (b) 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 단계.

[68] 본 발명의 형질전환체는 본 발명의 다른 일 양태에서 설명한 광유도성 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 형질전환체로서, 이를 배양하여, 형질전환체의 개체 수를 증폭시키고, 이에 광을 조사하여, 광유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 유도할 수 있다. 상기 광유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산 서열은 대량 생산을 위한 외래 단백질을 코딩하는 핵산 서열일 수 있다.

[69] 상기 단계(a)의 배양은 상기 형질전환체의 종류 및 특성에 따라 배양 방법, 배양 배지, 배양 조건 등을 달리하여 당업자가 적절히 수행할 수 있다.

[70] 상기 단계(b)의 광은 외래 단백질의 목표 생산량에 따라 그 광도를 당업자가 적절히 선택할 수 있고, 상기 광의 광도는 10 내지 1000 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 또한 상기 단계 2)의 광은 외래 단백질의 목표 생산량에 따라 그 조사 시간을 당업자가 적절히 선택될 수 있다. 상기 외래 단백질의 생산 방법은 상기 형질전환체로부터 발현된 외래 단백질을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[71] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 다른 일 양태에서 설명한 광유도성 프로모터 및 (b) 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터에 작동가능하게 삽입될 수 있는 다중클로닝부위(**multiple cloning site**,

MCS)를 포함하는 발현백터를 제공한다. 상기 다중클로닝부위를 이용하여, 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 발현백터 내로 손쉽게 삽입할 수 있다. 본 발명의 "외래 단백질"에 관하여는 상술한 바와 같다.

[72] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 다중클로닝부위를 포함하는 발현 백터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 형질전환 및 형질전환체에 대하여는 본 발명의 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현백터 및 상기 발현백터를 이용한 숙주세포의 형질전환, 이에 따른 형질전환체에 대하여 설명한 바와 동일하다.

[73] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면 본 발명은 다음 단계를 포함하는 외래 단백질의 생산 방법을 제공한다:

[74] (a) 본 발명인 MCS를 포함하는 발현백터로 형질전환된 상술한 형질전환체를 배양하는 단계; 및

[75] (b) 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 단계.

[76] 본 발명인 외래 단백질의 생산 방법은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현백터로 형질전환시킨 형질전환체를 이용한 단백질의 생산 방법에서 설명한 바를 인용하며, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

발명의 효과

[77] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[78] (a) 본 발명은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성 증진용 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[79] (b) 본 발명은 SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성이 개선된 광유도성 프로모터의 제조방법을 제공한다.

[80] (c) 본 발명은 신규한 광유도성 프로모터를 제공한다.

[81] (d) 본 발명은 신규한 광유도성 프로모터를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 제공한다.

[82] (e) 본 발명은 상술한 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현백터를 제공한다.

[83] (f) 본 발명은 신규한 광유도성 프로모터 및 다중클로닝부위(MCS)를 포함하는 발현백터를 제공한다.

[84] (g) 본 발명은 상술한 발현 백터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[85] (h) 본 발명은 상술한 형질전환체를 이용한 외래 단백질의 생산 방법을 제공한다.

[86] (i) 본 발명의 광유도 활성 증진용 폴리뉴클레오티드를 이용하는 경우, SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터의 광유도 활성을 크게 증진시킬 수 있다.

[87] (j) 본 발명의 형질전환체를 이용하는 경우, 목적 단백질의 발현량을 광 조사에 의해 조절하면서 목적 단백질을 효과적으로 발현 시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [88] 도 1은 광유도 프로모터인 LIP의 광유도 엘리먼트를 찾기 위해 빛의 세기에 따라 각각의 프로모터의 루시퍼라아제를 측정한 실험 결과를 나타낸다.
- [89] 도 2는 100p와 200p 사이의 프로모터 시퀀스를 PLACE의 시그널 스캔 서치(Signal scan search)로 분석한 결과를 나타낸다.
- [90] 도 3은 LIP 프로모터의 200p와 100p 사이에서의 절단 분석(Truncation analysis) 결과를 나타낸다.
- [91] 도 4a는 SORLIP 엘리먼트 영역을 2개와 3개씩 반복시켜 만든 새로운 프로모터의 구조도를 나타낸다.
- [92] 도 4b는 상기 프로모터의 광유도능을 측정한 결과를 나타낸다.
- [93] 도 5a는 SORLIPX2 프로모터의 두 SORLIP 엘리먼트 사이를 각각 0, 7, 17, 24, 34 튜클레오티드의 간격으로 변화시켜 만든 새로운 프로모터의 구조도를 나타낸다.
- [94] 도 5b는 상기 프로모터의 광유도능을 측정한 결과를 나타낸다.
- [95] 도 6은 빛의 세기에 따른 SORLIPX2와 LIP-400P, AR 프로모터의 세기를 측정하여 비교한 실험 결과를 나타낸다.
- [96] 도 7은 SORLIPX2 프로모터의 서열을 나타낸다.
- [97] 도 8은 SORLIPX2 프로모터를 활용한 벡터의 지도를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [98] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [99]
- [100] 실시예
- [101] 실시예 1: 광유도성 프로모터의 광유도 기작에 결정적인 역할을 하는 SORLIP 모티프(motif)의 발견
- [102]
- [103] 해양 미세조류인 두날리엘라(Kim, Minjung, et al. "Gene expression profiling of *Dunaliella* sp. acclimated to different salinities." *Phycological research* 58.1 (2010): 17-28.)로 부터 유래한 광유도 프로모터인 LIP 프로모터의 길이를 줄여나감으로써 광유도 기작에서 어떤 부분이 중요한 역할을 하는지 밝히고자 하는 실험을 하였다(참조: 도 1). 프로모터에 루시퍼라아제를 붙여 그 활성을 관찰하는 것을 통해 프로모터의 작동을 측정하는 실험을 실시하였다. 선행 연구를 통해 광유도성이 확인된 약 400 bp 길이의 프로모터를 대상으로 100p 단위로 크기를 줄여나가는 절단 분석(truncation analysis)을 하여 300p, 200p, 100p의 새로운 프로모터를 만들었고 루시퍼라아제를 연결하여 두시간 동안의

광유도 활성을 측정해본 결과, 100p와 200p 사이에서 광유도 기작이 사라지는 것을 발견하였고, 상기 100p와 200p 사이에서 LIP 프로모터의 광유도 기작의 결정적인 역할을 하는 부분이 존재함을 확인하였다. 이를 PLACE(A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) 웹 사이트(<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>)에서 신호 스캔 서치(Signal scan search)를 해본 결과 피토크롬(phytochrome)과 관련된 광반응 엘리먼트(Element)인 SORLIP 시퀀스가 존재함을 확인할 수 있었다(참조: 도 2).

[104]

[105] 실시예 2: 확보된 SORLIP 엘리먼트의 광유도 기작 확인

[106]

[107] 확보된 SORLIP 엘리먼트가 LIP 프로모터에서 광유도 기작에서 결정적인 역할을 함을 확인하기 위해 200p와 100p 사이의 프로모터에서 25 bp 간격으로 다시 절단 분석(truncation analysis)을 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과 125p와 100p 사이에 존재하는 SORLIP 엘리먼트가 LIP 프로모터에서 광유도 기작을 일으키는 엘리먼트임을 확인할 수 있었다(참조: 도 3).

[108]

[109] 실시예 3: SORLIP 엘리먼트를 이용한 기능이 향상된 새로운 광유도 프로모터의 제작

[110]

[111] 상기 확보된 SORLIP 엘리먼트를 이용하여 새로운 프로모터를 제작하였다. 선행연구를 통해 알려진 LIP 프로모터(Park, Seunghye, et al. "Expression of the high light-inducible *Dunaliella* LIP promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta* 238.6 (2013): 1147-1156.)에 1개 존재하던 SORLIP 엘리먼트 영역을 19 뉴클레오티드 간격으로 2회, 또는 3회 반복시켜 만든 결과 SORLIP을 두 번 반복한 프로모터가 가장 강력한 광유도성 활성 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 4a, 4b). SORLIP을 두 번 반복한 프로모터(SORLIPX2)를 바탕으로 두 SORLIP 엘리먼트 영역 사이의 간격이 프로모터의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 두 SORLIP 엘리먼트 간의 간격을 각각 2, 9, 19, 26, 36 뉴클레오티드의 간격이 발생하도록 디자인 하여 동일한 실험방법으로 루시퍼라아제의 활성을 측정한 결과 19 뉴클레오티드 간격의 SORLIPX2 프로모터(19 gap SORLIPX2 promoter)가 가장 강력한 활성을 보였다(참조: 도 5a, 5b). 본 실험을 통해 SORLIP 엘리먼트가 광유도성 기작에 결정적인 역할을 하는 것을 확인할 수 있었으며 SORLIP 엘리먼트를 19 뉴클레오티드 간격으로 두 번 반복한 SORLIPX2 프로모터는 기존의 프로모터보다 훨씬 강력한 광유도성 활성 증대를 가지게 된다는 결과를 도출하였다.

[112]

[113] 실시예 4: 새로운 SORLIP 프로모터와 기존의 프로모터와의 비교 실험

[114]

[115] 상기 확보된 SORLIPX2 프로모터의 향상된 광유도성 활성 증가를 확인하고 그 세기를 관찰하기 위해 기존의 벡터들과의 비교실험을 수행하였다. 비교군으로서 개량전의 형태인 LIP 400P 광유도 프로모터와 현재 미세조류에 대한 프로모터로서 상용화된 프로모터 중 가장 강력한 활성을 갖는 것으로 알려진 프로모터 중 하나인 AR 프로모터를 이용하였다. 실험 결과 SORLIPX2 프로모터의 경우 기존의 LIP 400P 프로모터에 비해 광유도성 활성이 향상되었을 뿐 아니라 항상 발현하는 형태인 AR 프로모터와 비교해도 미디엄 라이트(medium Light, ML)(600 μ E) 이상의 광조건에서는 더욱 강력하다는 것을 알수 있었다(참조: 도 5a, 5b). 향후 미세조류에서 SORLIPX2 프로모터를 강력한 광유도 프로모터로서 활용하기 위하여 다음과 같은 형태로 벡터를 제작하였다(참조: 도 6).

[116]

[117] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

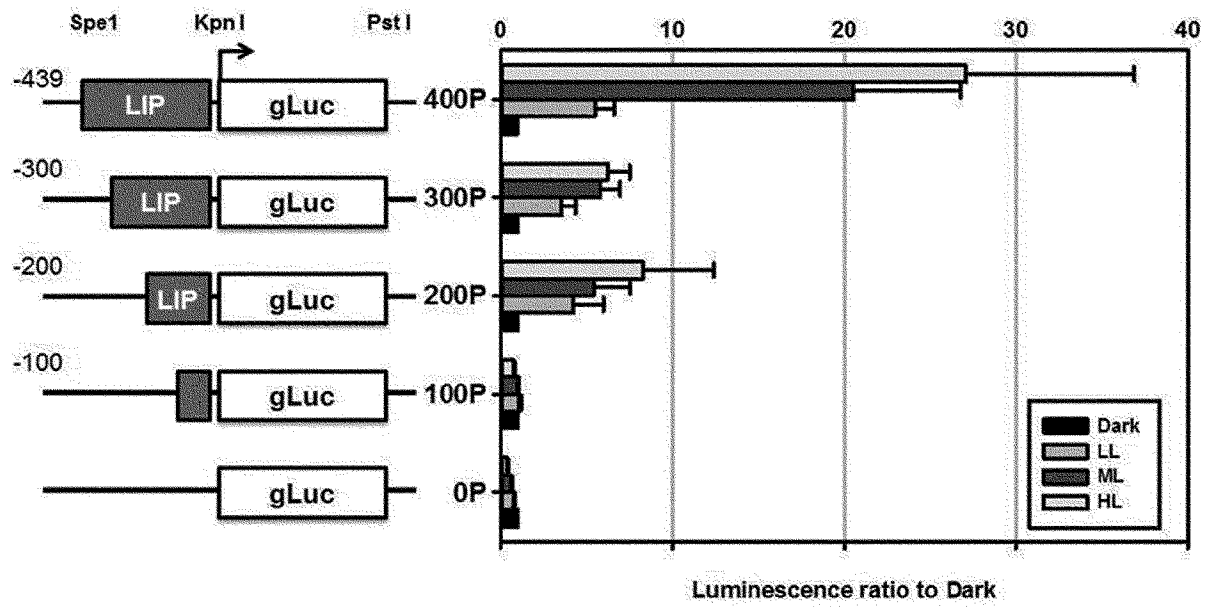
[118]

청구범위

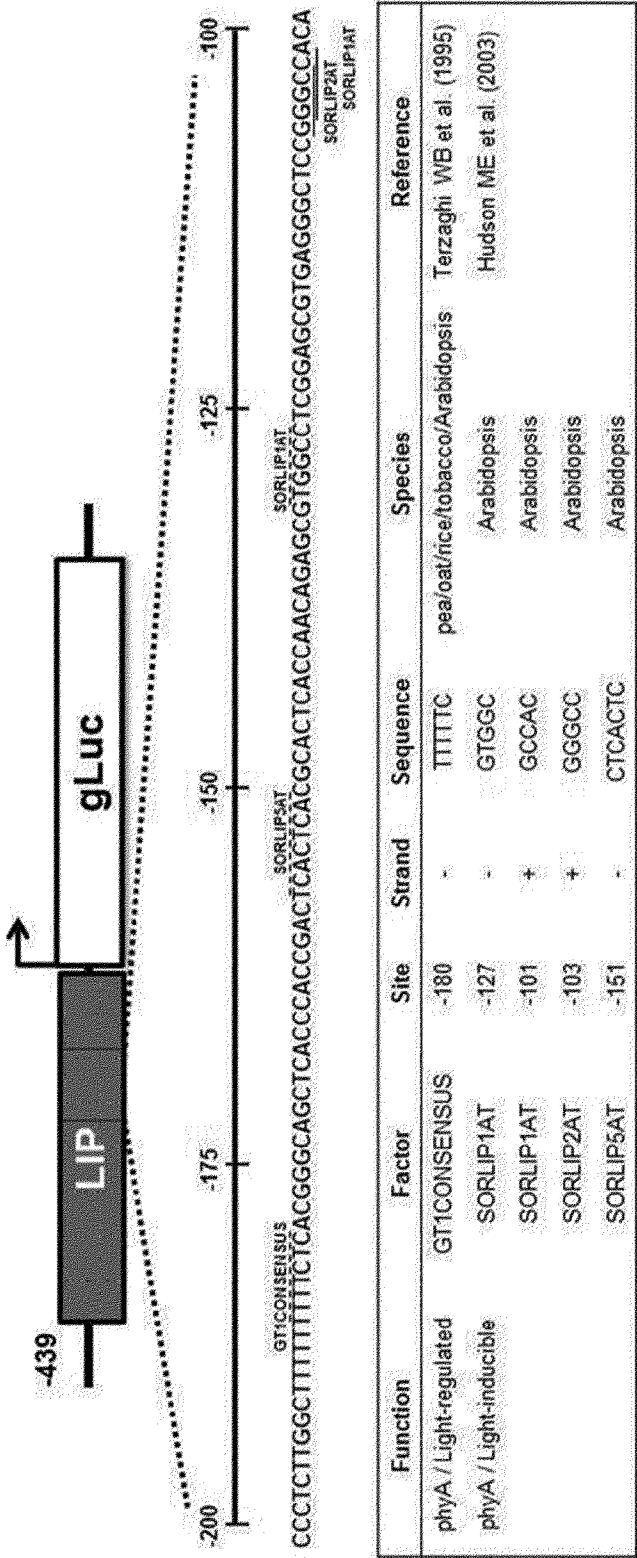
- [청구항 1] 다음 일반식 1의 폴리뉴클레오티드:
 [일반식 1]
 $5'\text{-GCCAC-(X}_a\text{-GCCAC)}_n\text{-3'}$
 상기 일반식 1의 상기 G는 구아닌, 상기 C는 시토신, 상기 A는 아데닌이고, 상기 X_a는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 15-25개의 뉴클레오티드이며, 상기 n은 1 내지 3의 정수이고, 상기 n이 2 이상인 경우, 상기 일반식 1의 복수의 X_a는 각각 동일하거나 동일하지 않다.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 광유도성 프로모터의 광유도를 증진시키는 활성을 갖는 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 X_a는 17-21개 뉴클레오티드인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 n은 1 내지 2의 정수인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 n은 1인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 일반식 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 광유도성 프로모터:
 [일반식 2]
 $5'\text{-X}_b\text{-GCCAC-(X}_a\text{-GCCAC)}_n\text{-X}_c\text{-3'}$
 상기 일반식 2의 상기 G는 구아닌, 상기 C는 시토신, 상기 A는 아데닌이고,
 상기 X_a는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 15-25개의 뉴클레오티드이며,
 상기 X_b는 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 0-15개의 뉴클레오티드이고,
 상기 X_c는 두날리엘라 유래의 LIP 프로모터(서열번호 3)의 -1 내지 -101 뉴클레오티드 서열이며,
 상기 n은 1 내지 3의 정수이고, 상기 n이 2 이상인 경우, 상기 일반식 2의 복수의 X_a 서열은 각각 동일하거나 동일하지 않다.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 X_a는 17-21개의 뉴클레오티드인, 광유도성 프로모터.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서, 상기 n은 1 내지 2의 정수인, 광유도성 프로모터.
- [청구항 9] 제 6 항에 있어서, 상기 n은 1인, 광유도성 프로모터.
- [청구항 10] 제 6 항에 있어서, 상기 일반식 2의 뉴클레오티드는 서열목록 제 2 서열인, 광유도성 프로모터.
- [청구항 11] SORLIP 엘리먼트를 포함하는 광유도성 프로모터에서 상기 SORLIP 엘리먼트를 제 1 항의 폴리뉴클레오티드로 치환하는 것;을 포함하는 광유도 활성이 개선된 광유도성 프로모터의 제조 방법.
- [청구항 12] 제 7 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 광유도성 프로모터에 의해

- 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트.
- [청구항 13] 제 12 항의 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 14] 제 13 항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 15] 다음을 포함하는 외래 단백질의 생산 방법:
(a) 제 14 항의 형질전환체를 배양하는 것; 및
(b) 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 것.
- [청구항 16] (a) 제 7 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 광유도성 프로모터 및 (b) 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터에 작동가능하게 삽입될 수 있는 다중클로닝부위(multiple cloning site, MCS)를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 17] 제 16 항의 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체.
- [청구항 18] 다음 단계를 포함하는 외래 단백질의 생산 방법:
(a) 제 17 항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및
(b) 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 단계.

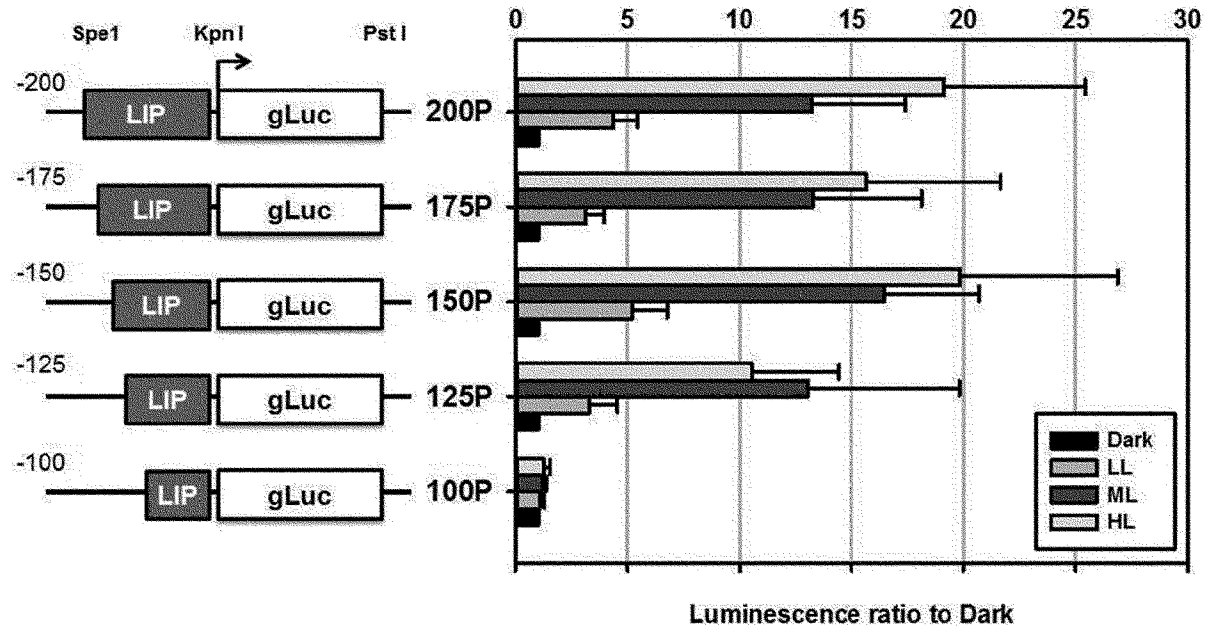
[도1]



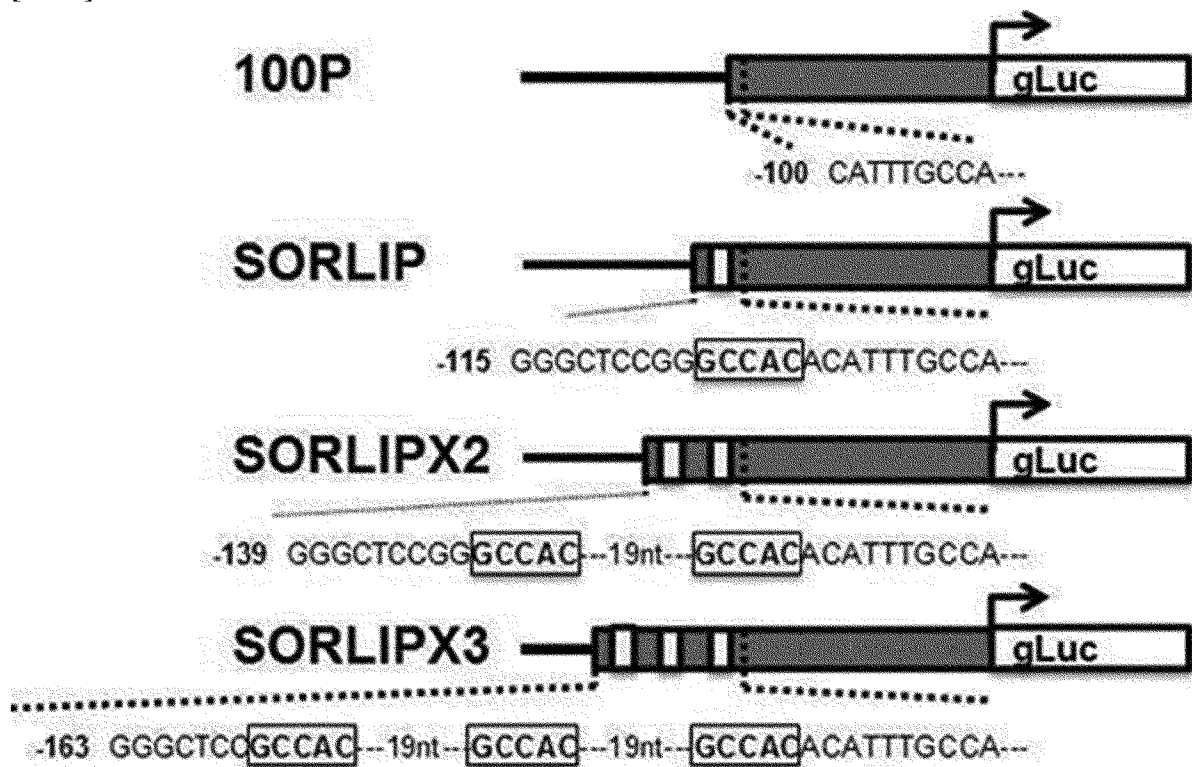
[도2]



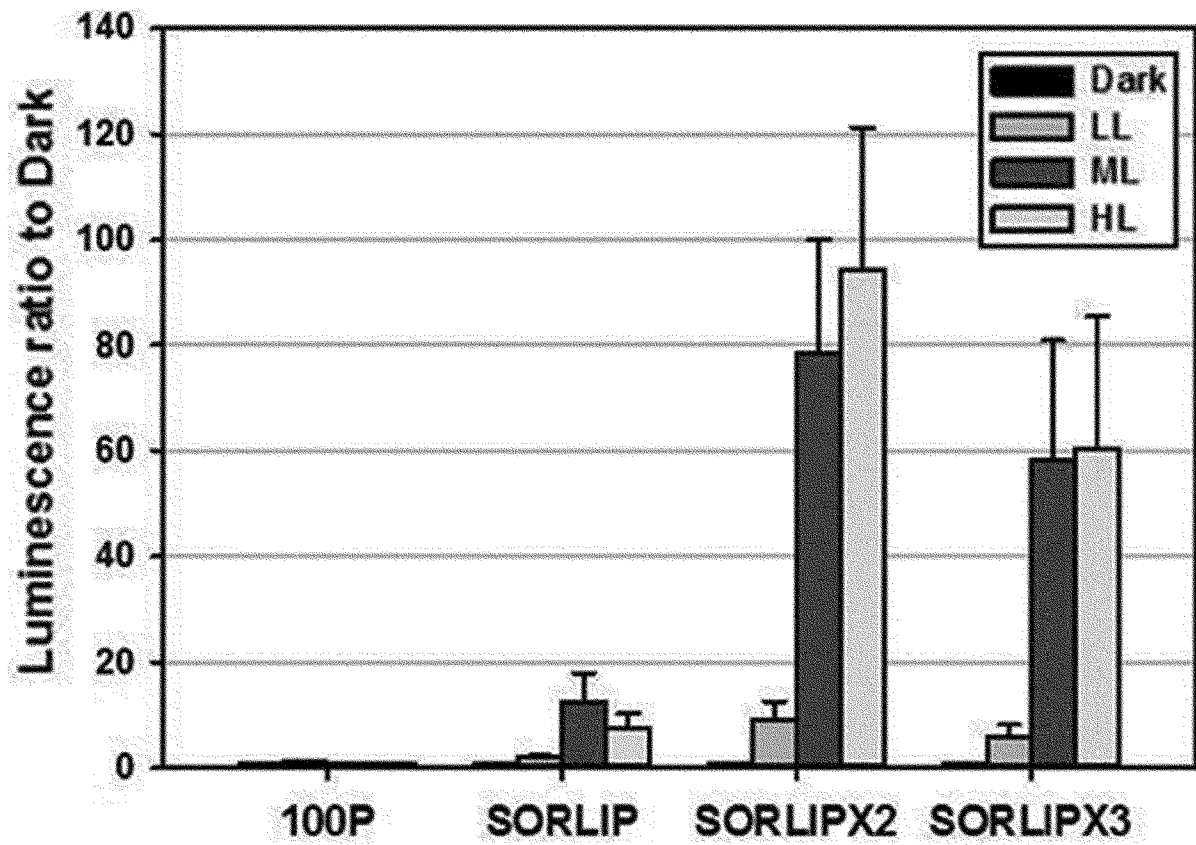
[도3]



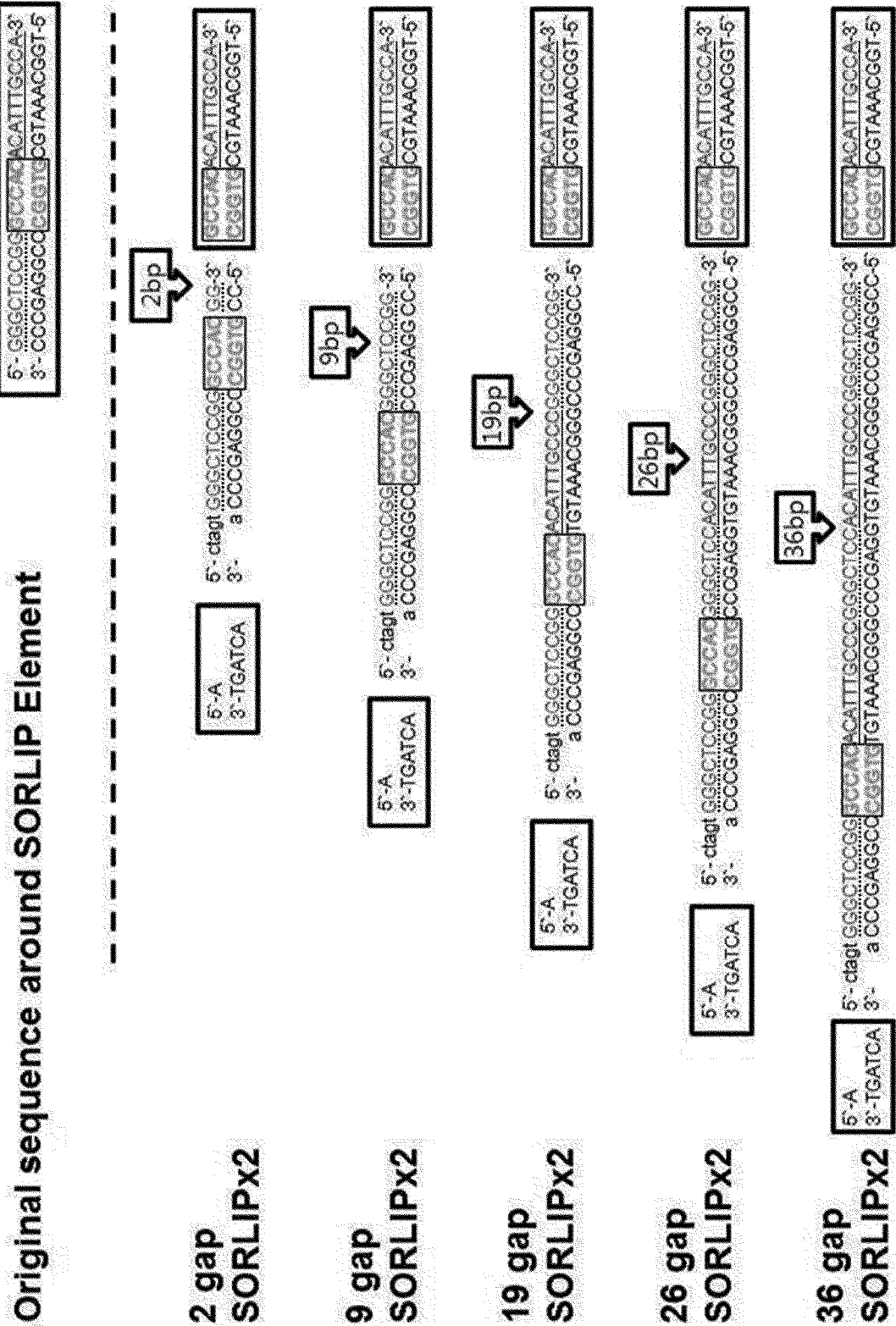
[도4a]



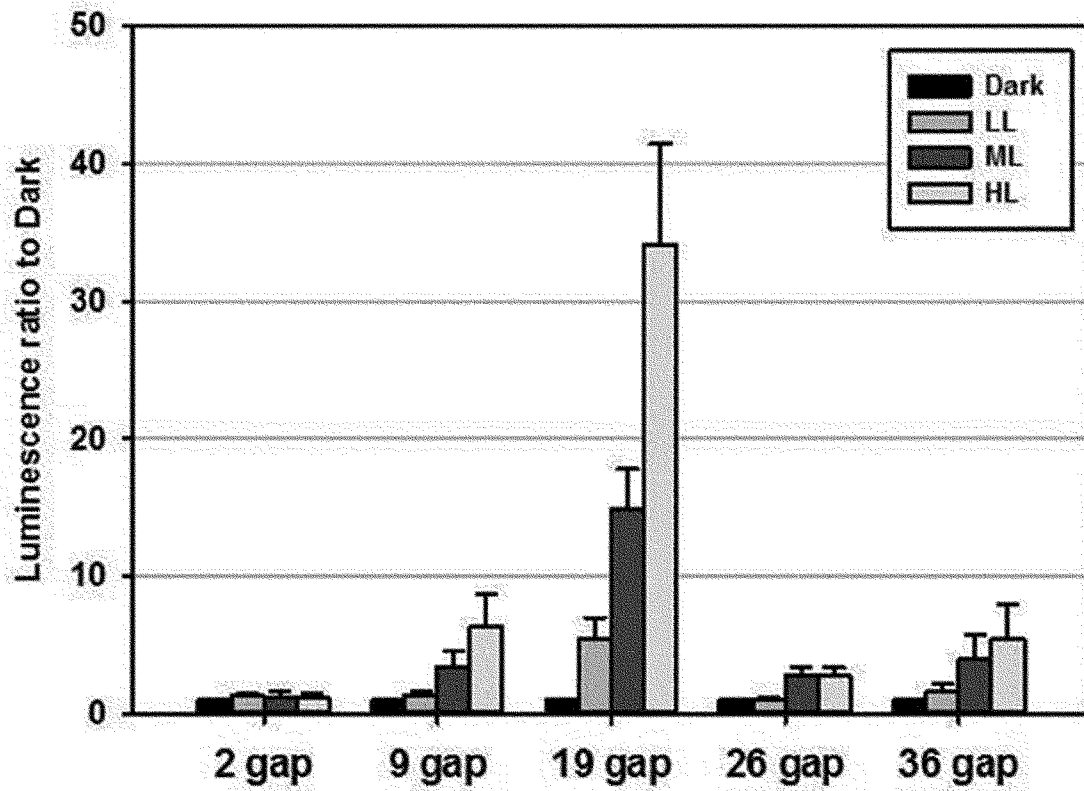
[도4b]



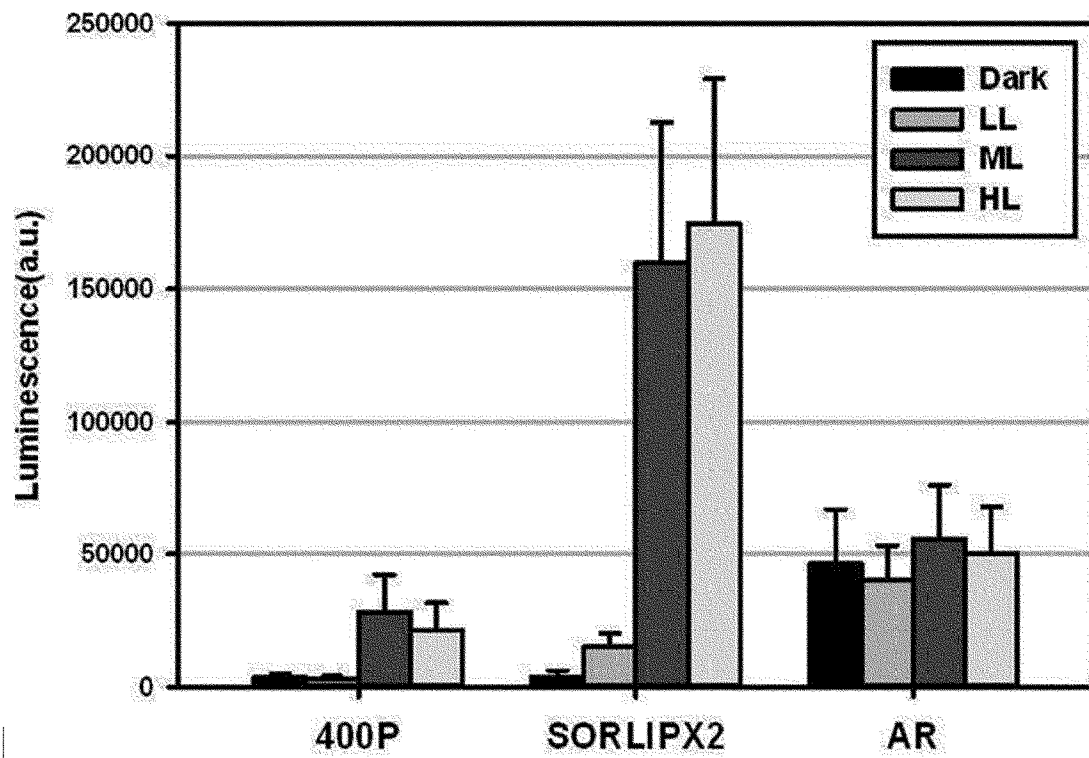
[도5a]



[도5b]



[도6]

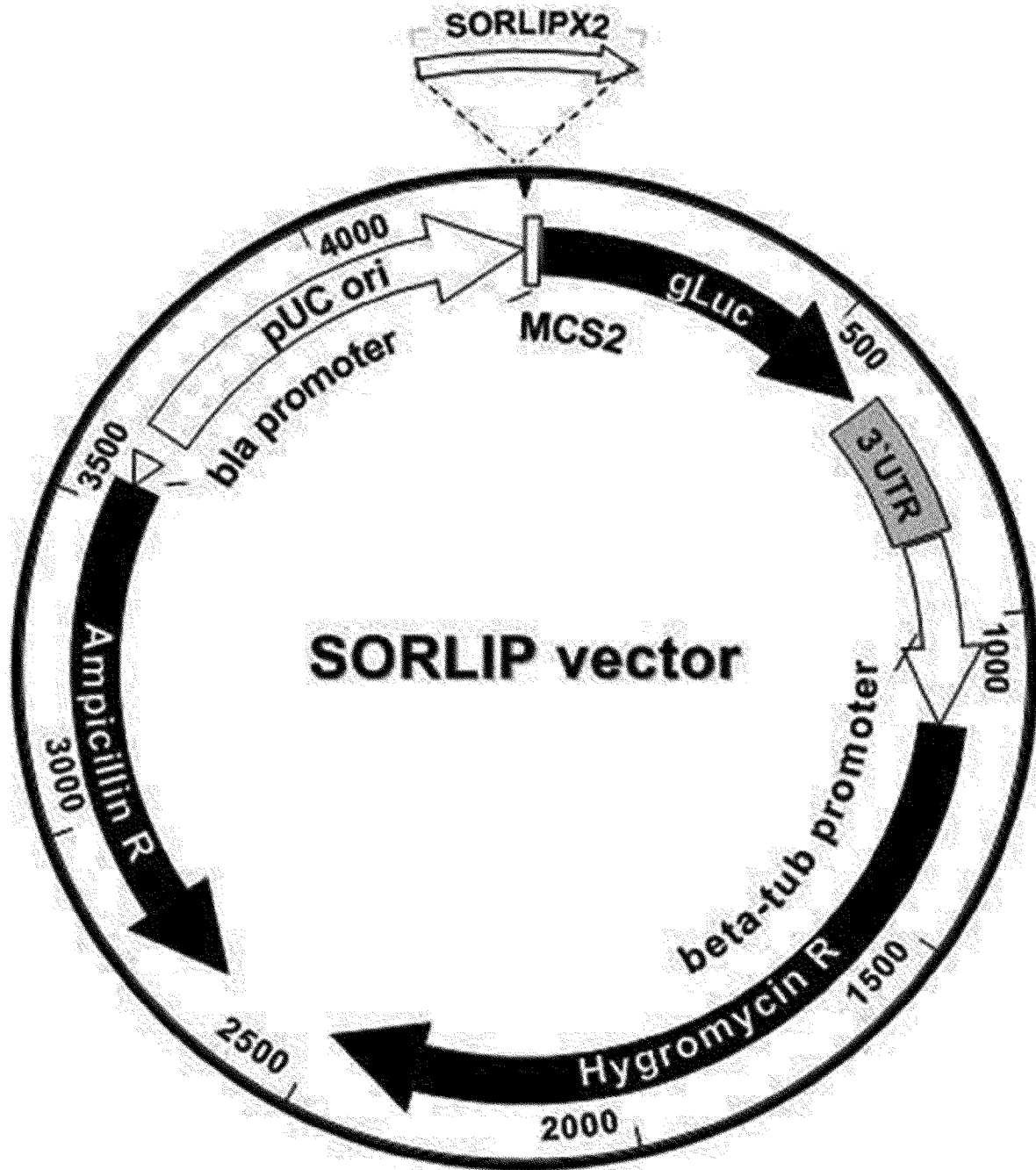


[도7]

-139
GGGCTCCGGGCGCACACATTTGCCCGGGCTCCGGGCCACA
CCCGAGGCCCGGTGTGTAAACGGGCCCGAGGCCCGGTGT
-101

-100
CATTGCCAGCCTGAAAACCTTGCCAAAAACCACTCATCAAAACAAAGCTTCAATCAAACTCGTTCCCTACACCCACACGAACCGACCCGAACA
GTAACGGTCGGACTTTGAACGGTTTTGGTGAGTAGTTTTGTTGTTTTGAGCAAGGATGCGGTGTGCTTGGCTGGGCTTGT
0

[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/013683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/74(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C12P 5/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/74; C12N 15/63; C12N 15/70; C12N 15/11; C12P 21/02; C12N 9/02; C12N 9/88; C12P 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: light induced, SORLIP element, GCCAC, promoter

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALVAREZ-CANTERBURY et al., "A Double SORLIP1 Element is Required for High Light Induction of ELIP Genes in Arabidopsis Thaliana", Plant Molecular Biology, vol. 84, pp. 259-267 (2014) See abstract; and pages 262-264.	1-18
A	HAYAMI et al., "The Responses of Arabidopsis Early Light-induced Protein2 to Ultraviolet B, High Light, and Cold Stress are Regulated by a Transcriptional Regulatory Unit Composed of Two Elements", Plant Physiology, vol. 169, pp. 840-855 (September 2015) See pages 840, 848-849.	1-18
A	PARK et al., "Expression of the High Light-inducible Dunaliella LIP Promoter in Chlamydomonas Reinhardtii", Planta, vol. 238, pp. 1147-1156 (2013) See the entire document.	1-18
A	KR 10-2013-0135722 A (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 11 December 2013 See the entire document.	1-18
A	EP 0310619 B1 (UNIVERSITY OF WARWICK) 06 April 1994 See the entire document.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 FEBRUARY 2017 (21.02.2017)

Date of mailing of the international search report

21 FEBRUARY 2017 (21.02.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013683

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0135722 A	11/12/2013	KR 10-1495276 B1 US 2015-0147782 A1 WO 2013-180488 A1	09/03/2015 28/05/2015 05/12/2013
EP 0310619 B1	06/04/1994	AU 7542187 A CA 1321563 C EP 0310619 A1 WO 87-07909 A1	12/01/1988 24/08/1993 12/04/1989 30/12/1987

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/74(2006.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C12N 9/88(2006.01)i, C12P 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/74; C12N 15/63; C12N 15/70; C12N 15/11; C12P 21/02; C12N 9/02; C12N 9/88; C12P 5/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 광유도, SORLIP 엘리먼트, GCCAC, 프로모터

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ALVAREZ-CANTERBURY 등, 'A double SORLIP1 element is required for high light induction of ELIP genes in Arabidopsis thaliana' Plant Molecular Biology, Vol.84, pp.259-267 (2014) 요약; 및 페이지 262-264 참조.	1-18
A	HAYAMI 등, 'The responses of Arabidopsis early light-induced protein2 to ultraviolet B, high light, and cold stress are regulated by a transcriptional regulatory unit composed of two elements' Plant Physiology, Vol.169, pp.840-855 (2015.09) 페이지 840, 848-849 참조.	1-18
A	PARK 등, 'Expression of the high light-inducible Dunaliella LIP promoter in Chlamydomonas reinhardtii' Planta, Vol.238, pp.1147-1156 (2013) 전체 문헌 참조.	1-18
A	KR 10-2013-0135722 A (한양대학교 산학협력단) 2013.12.11 전체 문헌 참조.	1-18
A	EP 0310619 B1 (UNIVERSITY OF WARWICK) 1994.04.06 전체 문헌 참조.	1-18

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 02월 21일 (21.02.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 02월 21일 (21.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



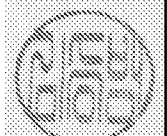
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0135722 A	2013/12/11	KR 10-1495276 B1 US 2015-0147782 A1 WO 2013-180488 A1	2015/03/09 2015/05/28 2013/12/05
EP 0310619 B1	1994/04/06	AU 7542187 A CA 1321563 C EP 0310619 A1 WO 87-07909 A1	1988/01/12 1993/08/24 1989/04/12 1987/12/30