



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0067502
(43) 공개일자 2014년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0134805

(22) 출원일자 2012년11월26일

심사청구일자 2013년11월25일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

최원자

서울 서대문구 이화여대길 52, 자연과학대학 생명과학전공 (대현동, 이화여자대학교)

김완기

경기 수원시 영통구 월드컵로 206, 의과대학 의과학연구소 분자생물학실 (원천동, 아주대학교)

(74) 대리인

양부현

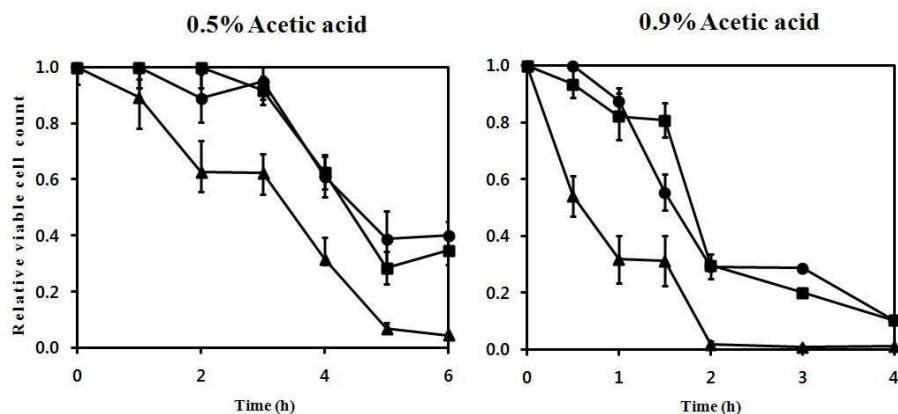
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 아세트산-저항성 효모 스트레인

(57) 요약

본 발명은 돌연변이(mutation)된 ScSPT15 유전자를 포함하는 아세트산-저항성 형질변형 스트레인을 제공한다. 본 발명의 효모 스트레인은 고농도 아세트산, 바람직하게는 0.5-0.9% 아세트산에서 성장할 수 있는 효모 스트레인이다. 고농도의 아세트산에 내성을 보이는 스트레인을 발명함으로써 바이오에탄올 생산공정 시 발생하는 여러 스트레스에 저항성을 가진 소망하는 산물들(바이오매스)의 산업적 생산에 매우 유용하게 적용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345072522

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망파이오니아사업

연구과제명 미생물 오닉스 융합기반 바이오에너지 생산 및 온실가스 저감 기술 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.07.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

돌연변이(mutation)된 ScSPT15 유전자를 포함하는 아세트산-저항성 형질변형 스트레인.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 0-0.9%(v/v) 아세트산-포함 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 0.5-0.9%(v/v) 아세트산-포함 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 세포내 ROS 레벨을 감소시킬 수 있는 개선된 능력을 가지는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 사카로마이세스 종(Saccharomyces spp.), 시조사카로마이세스 종(Schizosaccharomyces spp.), 피키아 종(Pichia spp.), 파피아 종(Paffia spp.), 클루이베로미세스 종(Kluyveromyces spp.), 칸디다 종(Candida spp.), 탈라로미세스 종(Talaromyces spp.), 브레타노미세스 종(Brettanomyces spp.), 파키솔렌 종(Pachysolen spp.) 또는 데바리오미세스 종(Debaryomyces spp.) 효모 스트레인인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 사카로마이세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 7

돌연변이된(mutated) SPT15 유전자 카피를 효모 스트레인에 도입하는 단계 또는 효모 세포의 지놈 DNA의 내인성 SPT15 유전자를 돌연변이시키는 단계를 포함하는 아세트산-저항성 효모 스트레인 제조방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 0-0.9%(v/v) 아세트산-포함 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인 제조방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 0.5-0.9%(v/v) 아세트산-포함 배양 조건에서 성장할 있는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인 제조방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 세포내 ROS 레벨을 감소시킬 수 있는 개선된 능력을 가지는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인 제조방법.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 스트레인인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아세트산-저항성 효모 스트레인 및 이를 이용한 아세트산 저항성 관련 효모 유전자의 스크리닝 방법에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 아세트산(Acetic acid)은 가장 간단한 천연의(naturally occurring) 카르복실산들 중 하나이다. 아세트산은 중요한 산업 화합물일 뿐 아니라 많은 미생물의 성장을 억제 또는 예방하기 위한 식품 방부제로서 가장 널리 이용되고 있다. 이러한 아세트산의 특성은 종종 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 의한 알코올 발효의 정상적인 최종 산물로서의 문제를 야기한다. 성장 배지 내 아세트산의 독성 레벨로의 축적은 에탄올 수율을 감소시켜 발효를 정체시킬 수 있다(Gibson, *et al.*, 2007). 또한, 아세트산은 바이오에탄올 생산에 이용되는 목질 섬유계 기질들(lignocellulosic substrates)의 전처리로부터 초래되는 주요 억제 화합물들 중 하나이다(Almeida, *et al.*, 2007). 아세트산의 독성 효과들은 세포내 pH의 감소, 성장 억제 및 아폽토시스 성 세포 사멸을 포함한다(Gibson, *et al.*, 2007; Ludovico, *et al.*, 2001). 따라서, 아세트산에 의해 야기되는 스트레스에 견딜 수 있는 사카로마이세스 세레비지에 스트레인들의 개발은 에탄올 발효 분야에서 매우 중요하다.

[0003] 최근까지 아세트산에 대해 증가된 저항성을 가지는 사카로마이세스 세레비지에 스트레인들을 개발하고자 하는 몇몇 시도들이 있었다. *FPS1*이 파괴(Zhang, *et al.*, 2011)되거나 또는 *Haa1* 과다발현(Tanaka, *et al.*, 2012)된 스트레인들은 0.6-0.7% 아세트산의 존재 하에서 개선된 세포 성장을 나타냈다. 에탄올 발효와 아세트산 저항성의 관련성에 있어서, 게놈 셔플링(genome shuffling)에 의해 구축된 스트레인이 0.5% 아세트산의 존재 하에서 증가된 에탄올 생산을 나타냈다(Zheng, *et al.*, 2011). 본 연구에서 아세트산 저항성 스트레인을 개발하기 위해, 본 발명자들은 gTME(global transcriptional machinery engineering)로 불리는 택일적 접근방법을 이용하였다.

[0004] gTME는 이전에 치명적인 에탄올 농도에서 자랄 수 있는 것으로 보고된 SPT15 유전자에 의해 인코딩되는 TBP(TATA-binding protein)의 돌연변이를 유발함으로써 증가된 에탄올 저항성을 가지는 스트레인을 창출하는 데 처음으로 이용되었다(Alper, *et al.*, 2006). 비록 gTME를 통해 획득된 에탄올 저항성에 대한 논란의 여지가 존재할 지라도(Baerends, *et al.*, 2009), 본 발명자들은 동일한 접근방법을 이용하여 증가된 에탄올 저항성을 가지는 스트레인들을 성공적으로 얻었다(Yang, *et al.*, 2011). 유사하게도, 본 연구에서 본 발명자들은 SPT15 돌연변이 대립형질을 과다발현시키는 라이브러리를 스크리닝함으로써, 2개의 아세트산-저항성 스트레인들을 얻었다. 그 결과, 아세트산에 노출된 상기 스트레인들은 세포내 ROS(reactive oxygen species) 레벨의 현저한

감소를 보였다.

[0005] 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 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 아세트산 저항성을 보유한 산업적으로 유용한 효모 스트레인을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 PCR-매개된 임의적 돌연변이유발법(random mutagenesis)을 이용하여 돌연변이된 SPT15 유전자를 제작하고 이를 효모에 형질전환시켜 아세트산-저항성 형질변형 효모 스트레인을 분리하였으며, 이들이 고농도 아세트산(예컨대, 0.5% 또는 0.9%)에서 성장할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 아세트산-저항성 효모 스트레인을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 아세트산-저항성 효모 스트레인 제조방법을 제공하는 데 있다.

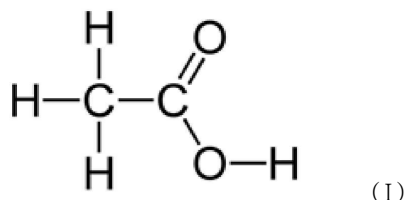
[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 돌연변이(mutation)된 ScSPT15 유전자를 포함하는 아세트산-저항성 형질변형 스트레인을 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 아세트산 저항성을 보유한 산업적으로 유용한 효모 스트레인을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 PCR-매개된 임의적 돌연변이유발법을 이용하여 돌연변이된 SPT15 유전자를 제작하고 이를 효모에 형질전환시켜 아세트산-저항성 형질변형 효모 스트레인을 분리하였으며, 이들이 고농도 아세트산(예컨대, 0.5% 또는 0.9%)에서 성장할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0012] 아세트산은 하기의 화학식 I로 표시되는 유기 화합물(CH_3COOH)로, 식초의 주요 구성성분으로 독특한 신맛과 특쓰는 냄새를 가진다:



[0013] 아세트산은 바이오에탄올 생산 과정에 있어서 발효를 억제시키는 화합물로, 이에 의해 야기되는 여러 스트레스에 의해 효모의 성장 및 생존에 해로운 영향을 미친다. 따라서, 효모를 이용한 에탄올 생산에 있어서 아세트산에 대한 저항성을 가지는 스트레인을 개발하는 것이 매우 중요하다.

[0014] 본 발명은 돌연변이된 ScSPT15로 형질전환된 효모에서 아세트산-저항성이 증가된 형질변형 효모 스트레인을 제공한다.

[0015] 본 발명에 따르면, 돌연변이된 ScSPT15로 형질전환된 효모 스트레인을 고농도 아세트산에서 배양하여 성장이 가능한 스트레인을 분리/동정한다. 본 발명에서는 다양한 농도의 아세트산(바람직하게는, 0-0.9%)에서 효모 스트레인의 성장 어세이(spot assay)를 실시하여 아세트산-저항성 스트레인들을 선택하였다.

- [0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 돌연변이된 ScSPT15 유전자로 형질전환된 효모 스트레인은 고농도 아세트산, 보다 바람직하게는 0-5% 아세트산, 보다 더 바람직하게는 0.3-1.5% 아세트산, 보다 더욱 더 바람직하게는 0.4-1.2% 아세트산, 그리고 가장 바람직하게는 0.5-0.9% 아세트산에서 성장할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 효모 스트레인은 세포내 ROS 레벨을 감소시킬 수 있는 개선된 능력을 가진다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 스트레인은 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 스트레인이며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 종이고, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시아(*Schizosaccharomyces cerevisiae*)이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 돌연변이된 ScSPT15 유전자는 플라스미드로 효모 세포에 도입될 수 있다. 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 돌연변이된 ScSPT15 유전자는 효모 세포의 지놈(genomic) DNA에 도입될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이된 ScSPT15 유전자는 서열목록 제1서열 내지 제4서열에 개시되어 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상술한 돌연변이된 ScSPT15 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 그의 전사체에 의해 감염된 세포 및 유전자 도입에 의한 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상술한 돌연변이된 ScSPT15 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 상술한 돌연변이된 ScSPT15 단백질에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0023] 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 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0024] 본 발명은 상술한 돌연변이된 SPT15 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 그의 전사체에 의해 감염된 세포 및 유전자 도입에 의한 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상술한 돌연변이된 SPT15 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 상술한 돌연변이된 SPT15 단백질에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 재조합 벡터는 서열목록 제5서열 내지 제8서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 및 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 원핵세포는 박테리아 세포 및 고세균을 포함하며, 진핵세포는 효모세포, 포유동물세포, 식물세포, 곤충세포, 줄기세포 및 곰팡이를 포함하고, 가장 바람직하게는 효모세포이다.
- [0026] 바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터는 (i) 상술한 본 발명의 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터를 포함하며, 보다 바람직하게는 (i) 상술한 본 발명의 서열목록 제6서열 내지 제10서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 동물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 재조합 발현벡터를 포함한다.
- [0027] 바람직하게는, 상술한 발현대상물질은 돌연변이된 SPT15 단백질, 보다 바람직하게는 서열목록 제5서열 내지 제8서열로 이루어진 돌연변이된 SPT15 단백질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 발현벡터에서 발현대상물질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.
- [0029] 본 발명의 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lac UV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp

프로모터, recA 프로모터, SP6 프로머터, trp 프로모터, T7 프로모터, 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 숙주 세포는 E. coli이며, 가장 바람직하게는 E. coli DH5a이다. 또한, 숙주 세포로서 E. coli가 이용되는 경우, E. coli 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158: 1018-1024(1984)) 그리고 파자지 의 좌향 프로모터(pL 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14: 399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pRS316, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4 · λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 재조합 벡터가 진핵세포, 바람직하게는 효모 세포에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 발현대상물질의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 효모 세포에서 유래된 프로모터, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, 효모(*S. cerevisiae*) GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터, 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 또는 AOX2 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아테노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).

[0032] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법(Cohen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.

[0033] 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 형질전환된 효모 세포의 제조는 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 리튬 아세테이트/DMSO 방법(Hill, et al., (1991), DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids Res. 19, 5791), 리포솜-매개 전이방법(Wong, et al., 1980), 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, et al., (1990), J. Reprod. Fert. 41:173-182; Kopchick, et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In Transgenic Animals, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. 16, 107-110) 등을 이용하여 실시하며, 가장 바람직하게는 리튬 아세테이트/DMSO 방법을 이용하여 실시한다.

[0034] 한편, 본 발명의 발현대상물질 단백질을 유효성분으로써 유전자 도입에 이용하기 위해 발현대상물질 단백질을 효과적으로 세포 내로 침투할 수 있어야 한다. 예를 들어, 상술한 돌연변이된 ScSPT15 단백질을 유효성분으로 이용하는 경우, 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 돌연변이된 ScSPT15 단백질에 부착시키는 것이 바람직하다. 즉, 유효성분으로서 본 발명의 돌연변이된 ScSPT15 단백질을 세포 내로 도입(permeable peptide transduction)하기 위하여 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 상기 단백질과 융합하여 융합 단백질을 만든다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 라이신/아르기닌 등 기본 아미노산 잔기들을 주로 포함하고 있어서 이와 융합된 단백질들을 세포막을 투과하여 세포 내로 침투시키는 역할을 한다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 바람직하게는 HIV-1 Tat 단백질, 드로소필라 안테나페디아의 homeodomain, HSV VP22 전사조절단백질, vFGF에서 유도된 MTS 펩타이드, 페네트라틴, 트랜스포탄 또는 Pep-1 펩타이드에서 유래된 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 형질전환은 사카로마이세스 종, 시조사카로마이세스 종, 피키아 종, 파피아 종, 클루이베로미세스 종, 칸디다 종, 탈라로미세스 종, 브레타노미세스 종, 파키슬렌 종 또는 데바리오미세스 종 효모 스트레인에서 실시하며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 종 또는 클루이베로미세스 종에서 실시하고, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지애에서 실시한다.

- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 돌연변이된 SPT15 유전자 카피를 효모 스트레인에 도입하는 단계 및/또는 효모 세포의 지놈 DNA의 내인성 SPT15 유전자를 돌연변이시키는 단계를 포함하는 아세트산-저항성 효모 스트레인 제조방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 돌연변이된 SPT15 유전자의 돌연변이 과정을 공통적으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0038] 한편, 본 발명의 효모 스트레인은 아세트산 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자의 대규모 동정에 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 동정은 () 본 발명의 형질전환된 효모 스트레인 및 형질전환되지 않은 정상 효모로부터 전사체 프로파일(transcriptome profiling)을 실시하는 단계; 및 () 상기 전사체 프로파일을 비교/분석하는 단계를 실시함으로써, 아세트산 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자를 대량으로 동정할 수 있다.
- [0039] 예를 들어, 전사체 프로파일의 비교/분석은 상기 정상 효모보다 상기 형질전환된 효모 스트레인에서 혼성화 시그널이 1.5배 이상의 증가 배수(fold increase)로 검출되면 아세트산 저항성을 상향-조절하는 유전자로 판단되고, 상기 시그널이 1.5배 이상의 감소 배수(fold decrease)로 검출되면 아세트산 저항성을 하향-조절하는 유전자로 판단될 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0041] (a) 본 발명은 돌연변이(mutation)된 ScSPT15 유전자를 포함하는 아세트산-저항성 형질변형 효모 스트레인에 관한 것이다.
- [0042] (b) 본 발명의 효모 스트레인은 고농도 아세트산, 바람직하게는 0.5-0.9% 아세트산에서 성장할 수 있는 효모 스트레인이다.
- [0043] (c) 고농도의 아세트산에 내성을 보이는 스트레인을 발명함으로써 바이오에탄올 생산공정 시 발생하는 여러 스트레스에 저항성을 가진 소망하는 산물들(바이오매스)의 산업적 생산에 매우 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 증가된 아세트산 저항성을 보여주는 스팟 어세이 결과이다. 세포는 YPD 액체 배지에서 1.0의 OD₆₀₀까지 배양시키고 10배씩 연속적으로 희석하였다. 상기 세포의 분취액(5 μ l)이 적정 농도의 아세트산(pH 4.5)을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅되어 30℃에서 20시간 또는 60시간 동안 배양하였다. 대조군 스트레인(MRRC 3247)은 pSPT15wt를 BY4741 스트레인에 형질전환시켜 구축하였다.
- 도 2는 돌연변이된 SPT15 대립형질의 위치를 도식적으로 보여주는 도면이다. 플라스미드들이 회수되어 시퀀싱되었다. 예측된 아미노산 서열과 SPT15wt의 비교를 통해, 점 돌연변이가 발생한 위치 및 서열이 화살표 및 아미노산으로 표시된다. 구조적 도메인들의 맵은 이전에 공개된 문헌에 기초한다(Alper, *et al.*, 2006).
- 도 3은 아세트산 민감성을 보여주는 결과이다. pSPT15-AA311 및 pSPT15-342를 BY4741에 형질전환시켜 각각 MRRC 3252 및 MRRC 3253 스트레인을 얻은 후, 대조군 스트레인 MRRC 3247과 함께 아세트산 민감성에 대해 어세이하였다. 세포는 YPD 액체 배지에서 1.0의 OD₆₀₀까지 배양시켰다. 지정된 시간 동안 0.5% 또는 0.9% 아세트산(pH 4.5)를 처리한 후 세포 분취액을 얻어 적절하게 희석시켜 고형 YPD 플레이트에서 성장시켰다. 콜로니의 수를 카운팅한 후, 생존율(viability)은 0시간의 값에 대한 상대적인 백분율로서 표현되었다. 모든 실험은 서로 독립적인 3쌍(triplicate)으로 실시하였다. 심볼(symbol): MRRC 3247, 삼각형; MRRC 3252, 원; 및 MRRC 3253, 사각형.
- 도 4는 ROS 축적을 보여주는 결과이다. 도 4a는 세포내 ROS 레벨을 측정한 결과이다. MRRC 3247(삼각형), MRRC 3252(원) 및 MRRC 3253(사각형) 스트레인의 지수 성장기 배양액에 0% 또는 0.9% 아세트산(pH 4.5)을 30℃

에서 24시간 동안 처리하였다. 시료들은 지정된 시간에 취하고 동일한 수의 살아있는 세포가 ROS 지시 다이(indicator dye; CM-H₂DCFDA)로 염색되었다. 상대적인 DCF 형광 강도는 NIH ImageJ, version 1.61를 이용하여 측정하고 AU(arbitrary units)으로 표현된다. 세 개의 서로 독립적인 값의 평균이 제시되었다. 도 4b는 10시간째에 얻은 대표적인 이미지들을 보여주는 결과이다. 도 4c는 10시간째의 MRRC 3247의 값에 대해 상대적으로 표현된 형광 강도의 평균값을 의미하는 결과이다. 실험들은 서로 독립적인 3쌍(triplicate)으로 실시되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 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.

[0046] 실시예

[0047] 실험재료 및 실험방법

[0048] 효모 스트레인 및 배지

[0049] S. 세레비지에 BY4741(*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)를 발현 숙주(transformation recipients)로 이용하였다. 특별히 언급되지 않는 한, 비-선택적 증식을 위해 효모 세포는 YPD(1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 글루코오스; 및 고형 플레이트를 이용하는 경우, 1.5% 아가 첨가)에서 배양하였으며, 선택적 증식을 위해 효모 세포는 YSCD(YSCD) 배지[아미노산을 포함하지 않는 0.67% 효모 나이트로젠 베이스(yeast nitrogen base), 아미노산 보충 혼합물(amino acid supplement mixture), 2% 텍스트로오스; 및 고형 플레이트를 이용하는 경우, 1.5% 아가 첨가]에서 배양하였다. 아세트산-포함 배지는 pH 4.5로 맞추었다.

[0050] 효모 형질전환

[0051] 효모 형질전환을 위한 모든 플라스미드들은 RNA 절단 없이 수작업으로 제조되었다. DNA 농도는 알려진 농도의 대조군 DNA의 밴드 강도와 비교함으로써 대략적으로 측정하였다. DNAs 및 RNAs의 혼합물이 이전에 기재된 바와 같이 효모 형질전환에 이용하였다(Gietz and Woods, 2002).

[0052] 분자생물학적 방법

[0053] 플라스미드 제조, 클로닝 및 시퀀싱은 이전에 기술된 것과 동일하게 실시하였다(Sambrook J and Russell D, 2001). 대장균(*Escherichia coli*) 스트레인인 DH5α는 플라스미드 제조를 위한 숙주로 이용하였다.

[0054] 스팟 어세이

[0055] 스팟 어세이를 위해, YSCD-Ura 배지에서 1.0의 광학밀도(OD₆₀₀)까지 성장한 세포의 분취액(5 μl)이 10배씩 연속적으로 희석되어 적정 농도의 아세트산을 포함하는 고형 YPD 플레이트에 스팟팅되었다. 상기 플레이트들이 20-60시간 동안 30℃에서 배양되었다.

[0056] 민감성 어세이(susceptibility assay)

[0057] OD₆₀₀ 값 1로 배양된 세포를 수득하여 적정 농도의 아세트산을 포함하는 신선한 YSCD-Ura 배지에 동일하게 분주하고 30℃에서 배양시켰다. 적절한 시간에, 분취액을 희석하여 고형 YSCD-Ura 플레이트에 플레이트팅하였다. 세포 생존율을 시간에 따라 측정하고 상대적인 CFU(colony forming units) 수로 표현하였다.

[0058] 세포내 ROS의 측정

[0059] 세포내 ROS는 CM-H₂DCFDA(5,6-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 종래에 기재된 방법(Madeo, *et al.* 1999)에 따라 측정하였다. 효모 세포의 분취액은 24시간의 배양 기간 동안 다양한 시간점에서 얻었다. 상기 세포들은 1 ml의 증류수로 세척한 후, 0.1 ml PBS(phosphate buffered saline)에 녹여진 10 µM CM-H₂DCFDA와 30분 동안 배양시켰다. PBS로 세척한 후, 세포들은 형광현미경을 이용하여 시각화되었다. 최종적으로, 100개 이상 세포들의 형광 강도는 NIH ImageJ, version 1.61(<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)을 이용하여 측정하여 평균값을 얻었다.

[0060] 실험결과

[0061] 아세트산-저항성 스트레인들의 동정

[0062] 본 발명자들의 이전 연구(Yang, *et al.*, 2011)에서 구축된 효모 SPT15 돌연변이 라이브러리에 대한 스크리닝을 통해 아세트산-저항성 스트레인들을 얻기 위해, 본 발명자들은 상기 라이브러리로부터 제조된 플라스미드들을 BY4741로 형질전환시켰다. 500만개의 CFU들이 0.7% 아세트산이 보충된 고형 YSCD-Ura 배지에 뿌려져 30℃에서 배양되었다. 본 발명자들은 수일 후 성장된 수십 개의 콜로니들로부터 가장 큰 콜로니 크기를 나타내는 4개의 스트레인들(MRRC 32483251)을 선택하여 0, 0.5% 및 0.9% 아세트산을 포함하는 고형 YPD 배지를 이용한 아세트산 저항성에 대한 스팟 어세이에 이용하였다. 상기 4개의 콜로니들은 야생형 SPT15(SPT15wt) 유전자가 라이브러리 구축에 이용된 벡터(pRS316-GCYH2gR)에 클로닝된 대조군 플라스미드를 가지고 있는 대조군 스트레인인 MRRC3247보다 훨씬 더 좋은 성장능을 나타냈다(도 1).

[0063] 증가된 아세트산 저항성이 돌연변이된 SPT15의 존재에 의해 부여되는 지 여부를 확인하기 위해, MRRC 3248-3251들로부터 각각 pSPT15-AA311, -AA313, -AA342 및 AA343 플라스미드들이 회수되었다. 각 SPT15 대립형질에 대한 시퀀싱 결과, *SPT15-AA311*는 SPT15 ORF:H179Y, *SPT15-AA313*는 SPT15 ORF:K97R 및 A176V, *SPT15-AA342*는 SPT15 ORF:R90C 및 F148S, 그리고 *SPT15-AA343*는 SPT15 ORF:K120R에 돌연변이 서열을 포함하였다(도 2). 특정 위치에서의 공통 돌연변이는 확인되지 않았다. *SPT15-AA342*에서 보여지는 K의 R로의 대체가 어떻게 증가된 저항성을 부여하는지는 불명확하다. 다른 2개의 클론들보다 더 우수한 저항성을 나타낸 2개의 클론들(MRRC 3248 및 MRRC 3250)이 이후 실험을 위해 선택되었다. 본 발명자들은 pSPT15-AA311 및 pSPT15-AA342를 BY4741에 형질전환시켜 각각 MRRC 3252 및 MRRC 3253 스트레인을 얻었다. 대조군 스트레인인 MRRC 3247과 함께 스팟 어세이를 실시한 경우, MRRC 3252 및 MRRC 3253 스트레인은 MRRC 3248 및 MRRC 3250 스트레인에서 보여지는 아세트산 저항성과 동일한 정도의 저항성을 나타냈다(결과를 보이지 않음). 따라서, MRRC 3252 및 MRRC 3253 스트레인의 증가된 아세트산 저항성은 돌연변이된 SPT15의 효과일 것으로 예측되었다.

[0064] 상기 스팟 어세이 결과들은 민감성 어세이를 통해 추가적으로 확인되었다. MRRC 3247, MRRC 3252 및 MRRC 3253 스트레인(1×10^7 세포)을 각각 0, 0.5% 및 0.9% 아세트산을 포함하는 YPD 배지에서 80 rpm의 교반 속도로 배양하면서 24시간까지 매시간 분취액을 취하여 고형 YPD 플레이트에 스프레딩하였다. 이후, 생존 세포의 수를 나타내는 콜로니의 수를 카운팅하였다. 예상한 대로, MRRC 3252 및 MRRC 3253 스트레인들이 대조군 MRRC 3247 스트레인보다 더욱 높은 생존율을 나타냈다(도 3). 상술한 도 1 내지 도 3의 결과들은 *SPT15-AA311* 또는 *SPT15-AA342*의 존재가 아세트산에 대한 증가된 저항성을 담당하는 유일한 엘리먼트라는 것을 증명한다.

[0065] 돌연변이된 SPT15의 세포내 ROS의 축적 상의 효과

[0066] 아세트산-저항성 사카로마이세스 세레비지에 스트레인들 중 일 개체군에서 세포내 ROS의 레벨이 대조군 스트레인과 비교하여 현저하게 감소하였다는 보고가 매우 최근에 있었다(Zheng, *et al.*, 2011). 따라서, 아세트산 저항성의 획득이 세포내 ROS 레벨의 감소시키는 능력과 밀접하게 연관되어 있고, 이를 통해 높은 레벨의 세포내 ROS에 의해 야기되는 다양한 손상들로부터 세포를 보호할 가능성이 매우 높다. 본 연구에서, 본 발명자들은 아세트산-저항성 스트레인들인 MRRC 3252 및 MRRC 3253이 세포내 ROS 레벨을 감소시킬 수 있는 개선된 능력을 가지는 지 여부를 조사하였다. 도 4a는 아세트산의 배지 첨가(0.9%, pH 4.5) 후 24시간 동안 측정된 상대적인 ROS 축적의 프로파일을 보여준다. BY4741에 아세트산 처리한 후, ROS는 초기 10시간 동안 13 AU(arbitrary units)/h의 속도(rate)로 약 130 AU까지 축적되었으며, 이후 24시간까지 80 AU로 지속적으로 감소하였다. 이와 대조적으로, 2개의 아세트산-저항성 스트레인들의 ROS 축적 비율은 초기 10시간 동안 약 4 AU/h였으며, 24시

간까지 20-30 AU로 감소하였다. 축적된 ROS에 대한 대표적인 이미지들은 10시간째에 얻어졌으며(도 4b), 이들의 상대적인 형광 강도는 도 4c에 제시된다. 결과적으로, 아세트산-저항성 스트레인들에서 조사된 기간 동안 ROS의 축적 속도 및 농도는 대조군 스트레인들과 비교하여 현저하게 낮았는데, 이는 낮은 ROS 축적이 증가된 아세트산-저항성에 적어도 부분적으로 기여한다는 것을 의미한다.

[0067] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였는 바, 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.

[0068] 참고문헌

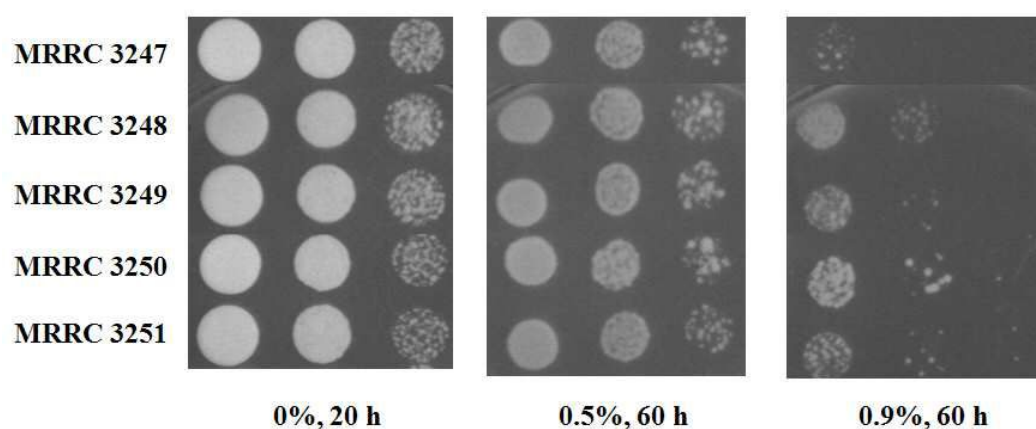
- [0069] Gibson BR, Lawrence FM, Leclaire JPR, Powell CD & Smart KA (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 535-569.
- [0070] Almeida JRM, Tobias M, Anneli P, Barbel HH, Gunnar L & Marie FGG (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 82: 340-349.
- [0071] Hong SP & Carlson M (2007) Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem* 282: 16838-16845.
- [0072] Tanaka K, Ishii Y, Ogawa J & Shima J (2012) Overexpression of HAA1 gene encoding transcriptional activator enhances acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, vol. 78 no. 22: 8161-8163
- [0073] Semchyshyn HM, Abrat OB, Miedzobrodzki J, Inoue Y & Lushchak VI (2011) Acetate but not propionate induces oxidative stress in bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep* 16: 15-23.
- [0074] Zheng D-Q, Wu X-C, Wang P-M, Chi X-Q, Tao X-L, Li P, Jiang X-H & Zhao Y-H (2011) Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 415-422.
- [0075] Yang J, Bae JY, Lee YM, Kwon H, Moon H, Kang HA, Yee S, Kim W & Choi W (2011) Construction of strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance. *Biotechnol Bioeng* 108: 1776-1787.
- [0076] Fujitomi K, Sanda T, Hasunuma T & Kondo A (2012) Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. *Biosour Technol* 111: 161-166.
- [0077] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR & Stephanopoulos G (2006) Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 314: 1565-1568.
- [0078] Mollapour M & Piper PW (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6: 1274-1280.
- [0079] Mollapour M & Piper PW (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* 27: 6446-6456.
- [0080] Baerends RJ, Qiu JL, Rasmussen S, Nielsen HB & Brandt A (2009) Impaired uptake and/or utilization of leucine by *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by the SPT15-300 allele of the TATA-binding protein gene. *Appl Environ Microbiol* 75: 6055-6061.
- [0081] Guaragnella N, Antonacci L, Passarella S, Marra E & Giannattasio S (2011) Achievements and perspectives in yeast acetic acid-induced programmed cell death pathways. *Biochem Soc Trans* 39: 1538-

1543.

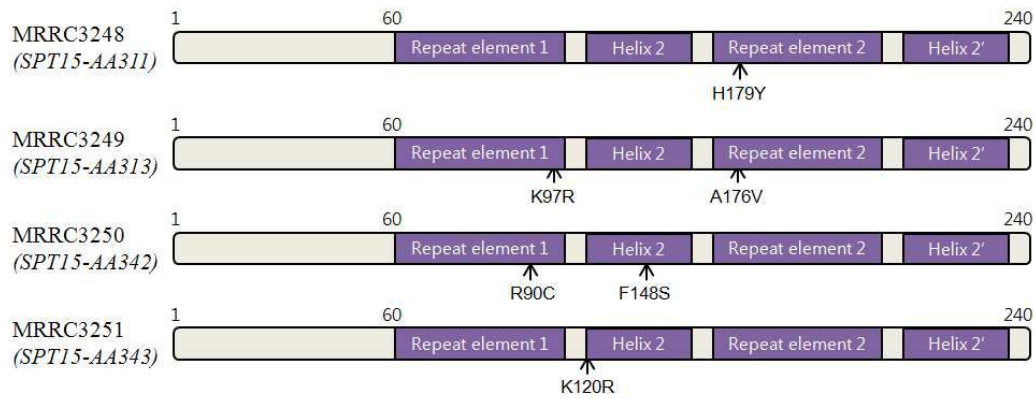
- [0082] Madeo F, Herke E., Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T & Frohlich KU (2004) Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7: 655-660.
- [0083] Frohlich KU, Fussi H & Ruckstuhl C. (2007) Yeast apoptosis-From genes to pathways. *Semin Cancer Biol* 17: 112-121.
- [0084] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA & Stearns T (1997) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- [0085] Gietz RD & Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96.
- [0086] Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Silva MT, Barrientos A & Corte-Real M (2002) Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13: 2598-2606.
- [0087] Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leao C & Corte-Real M (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147: 2409-2415.
- [0088] Guaragnella N, Antonacci L, Passarella S, Marra E & Giannattasio S (2007) Hydrogen peroxide and superoxide anion production programmed cell death. *Folia Microbiol* 52: 237-240.
- [0089] Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, Yoshimura K, Ishii J & Kondo A (2011) Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 10, 2.
- [0090] Liu H, Yan M, Lai C, Xu L, Ouyang P (2010) gTME for improved xylose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*. 160:574-582.
- [0091] Liu H, Liu K, Yan M, Xu L, Ouyang P (2011) gTME for improved adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to corn cob acid hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*. 164: 1150-1159.

도면

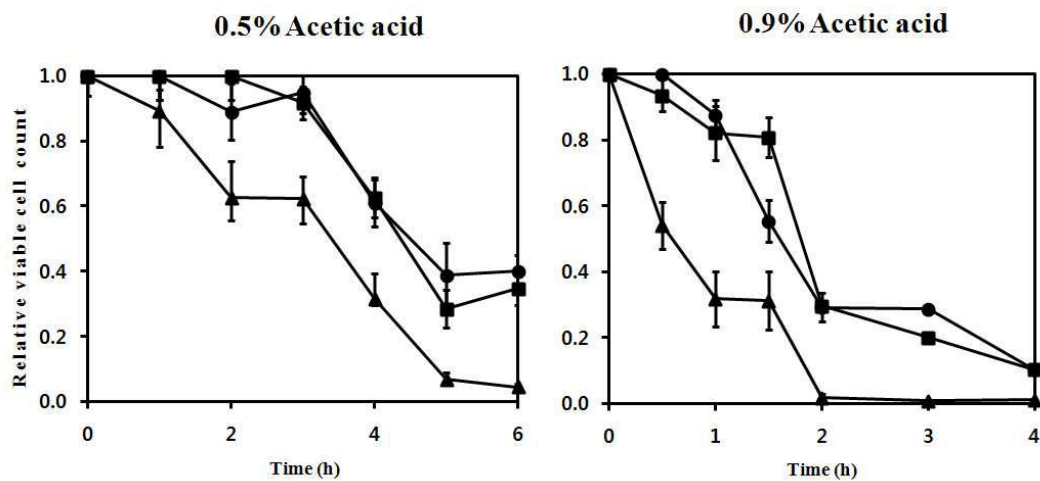
도면1



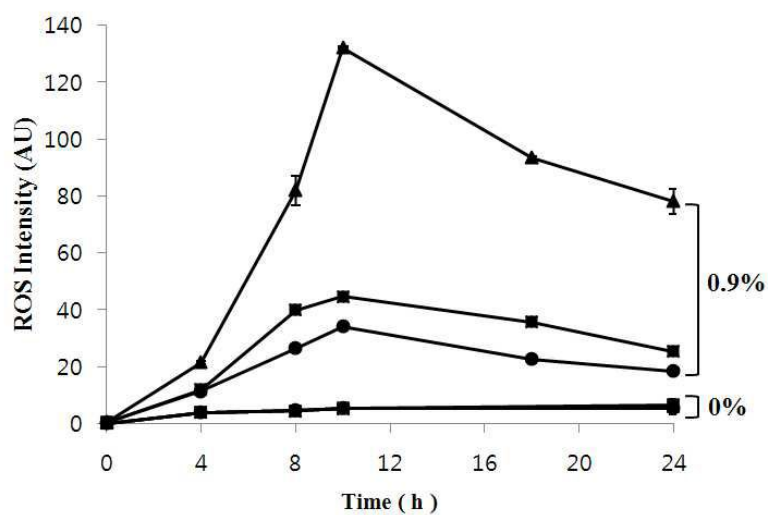
도면2



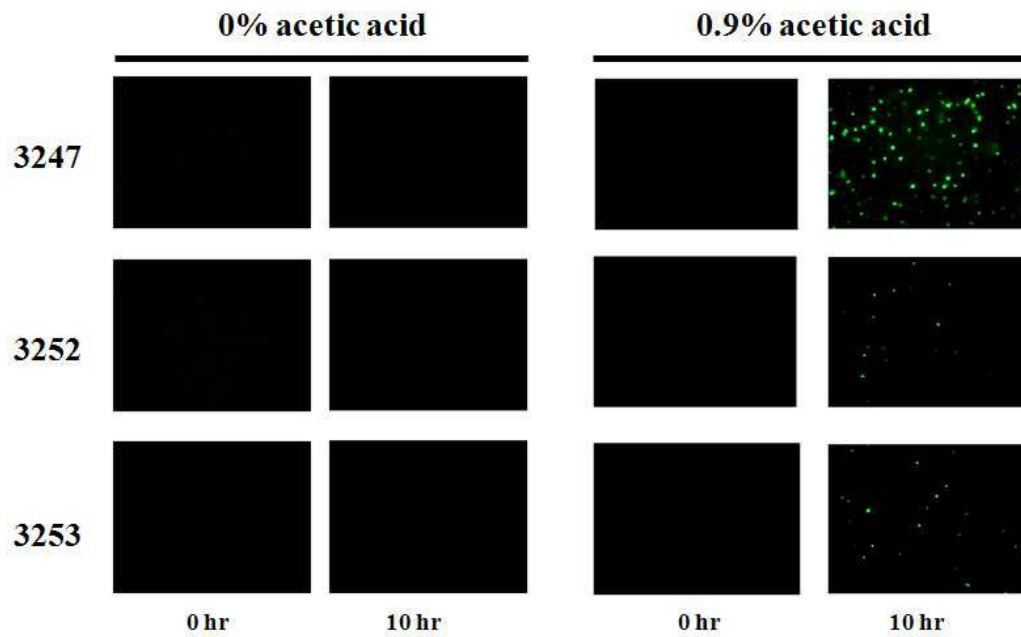
도면3



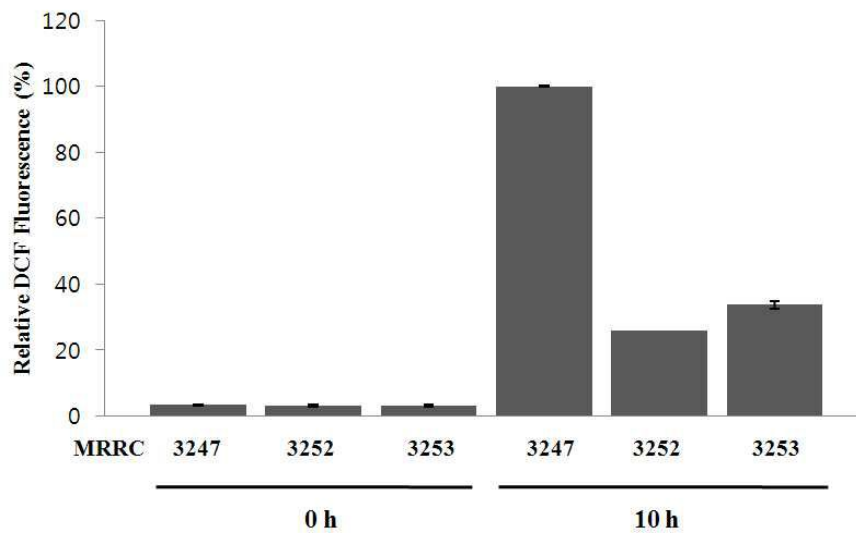
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

- <110> Ewha Womens University
- <120> Acetic Acid-Tolerant Yeast Strains
- <130> PN120651
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 720
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MRRC3248

<400> 1

atggccgatg aggaacgttt aaaggagttt aaagaggaaa 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 acatgcccggt aatgcagaat ataaccceaa gcgttttgc	300
gctgtcatca tgcgtattag agagccaaaa actacagctt taatttttgc ctccaggaaa	360
atggttggtta ccggtgcaaa aagtgaggat gactcaaagc tggccagcag aaaatatgca	420
agaattatcc aaaaaatcgg gtttgcctgt aaattcacag atttcaaaat acaaaatatt	480
gtcggttcgt gtgacgttaa attccctata cgtctagaag ggtagcatt cagttatggt	540
actttctcct cctatgagcc agaattgttt cctggtttga tctatagaat ggtgaagccg	600
aaaattgtgt tgtaatttt tgtttcagga aagattgttc ttactggtgc aaagcaaagg	660

gaagaaattt accaagcttt tgaagctata tacctgtgc taagtgaatt tagaaaaatg	720
	720

<210> 2

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MRRC3250

<400> 2

atggccgatg aggaacgttt aaaggagttt aaagaggaaa 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 acatgcctgt aatgcagaat ataaccceaa gcgttttgc	300
gctgtcatca tgcgtattag agagccaaaa actacagctt taatttttgc ctccaggaaa	360
atggttggtta ccggtgcaaa aagtgaggat gactcaaagc tggccagtag aaaatatgca	420
agaattatcc aaaaaatcgg gtctgctgct aaattcacag atttcaaaat acaaaatatt	480
gtcggttcgt gtgacgttaa attccctata cgtctagaag ggtagcatt cagtcaggt	540
actttctcct cctatgagcc agaattgttt cctggtttga tctatagaat ggtgaagccg	600

aaaatttgtg tgtaatttt tgtttcagga aagattgttc ttactggtgc aaagcaaagg	660
gaagaaattt accaagcttt tgaagctata tacctgtgc taagtgaatt tagaaaaatg	720
	720
<210> 3	
<211> 720	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MRRC3249	
<400> 3	
atggccgatg aggaacgttt aaaggagttt aaagaggaaa 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 cagtgcgct acatgccct aatgcagaat ataaccccag gcgttttgca	300
gctgtcatca tgcgtattag agagccaaaa actacagctt taatttttgc ctccaggaaa	360
atggttgta cgggtgcaaa aagtgaggat gactcaaagc tggccagtag aaaatatgca	420
agaattatcc aaaaaatcgg gtttctgct aaattcacag acttcaaaat acaaaatatt	480
gtcggttcgt gtgacgttaa attccctata cgtctagaag ggtagtatt cagtcaggt	540
actttctcct cctatgagcc agaattgttt cctggtttga tctatagaat ggtgaagccg	600
aaaatttgtg tgtaatttt tgtttcagga aagattgttc ttactggtgc aaagcaaagg	660
gaagaaattt accaagcttt tgaagctata tacctgtgc taagtgaatt tagaaaaatg	720
	720
<210> 4	
<211> 720	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MRRC3251	
<400> 4	
atggccgatg aggaacgttt aaaggagttt aaagaggaaa acaagatagt gtttgatcca	60
aataccagac aagtatggga aaaccagaat cgggatggta caaaaccagc aactactttc	120
cagagtgaag aggacataaa aagagctgcc ccagaatctg aaaaagacac ctccgccaca	180

tcaggtattg ttccaacact acaaaacatt gtggcaactg tgactttggg gtcaggtta 240

gatctgaaaa cagttgcgct acatgcccggt aatgcagaat ataaccctaa gcgttttgct 300

gctgtcatca tgcgtattag agagccaaaa actacagctt taatttttgc ctcagggaga 360

atggttggtta ccggtgcaaa aagtgaggat gactcaaagc tggccagtag aaaatatgca 420

agaattatcc aaaaaatcgg gtttctgct aaattcacag acttcaaat 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

720

<210> 5

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SPT15-AA311

<400> 5

Met Ala Asp Glu Glu Arg Leu Lys Glu Phe Lys Glu Glu 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 Tyr 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> 6
 <211> 240

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SPT15-AA342
 <400> 6
 Met Ala Asp Glu Glu Arg Leu Lys Glu Phe Lys Glu Glu 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 Cys 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 Ser 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> 7
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SPT15-AA313
 <400> 7
 Met Ala Asp Glu Glu Arg Leu Lys Glu Phe Lys Glu Glu 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
 Arg 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 Val
 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> 8
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SPT15-AA343
 <400> 8
 Met Ala Asp Glu Glu Arg Leu Lys Glu Phe Lys Glu Glu 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 Arg 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