(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0081254
(43) 공개일자 2012년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01) *C12R 1/85* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0110215
(22) 출원일자 2010년11월08일
심사청구일자 2010년11월08일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
최원자
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 자연과학대학 생명과학전공 (대현동, 이화여자대학교)
김현수
경기도 안양시 동안구 귀인로 258, 꿈마을 라이프A 105동 2305호 (평촌동)
(74) 대리인
양부현

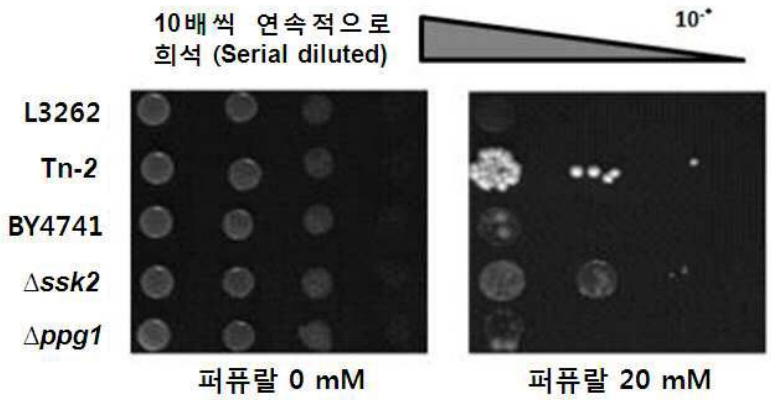
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **에탄올?, 열? 및 퍼퓨랄?저항성 효모 균주, 및 이의 유전자**

(57) 요 약

본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 유전자를 포함하는 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄(furfural)-저항성 형질변형 효모 균주 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 효모 균주는 고농도 에탄올, 바람직하게는 고농도 에탄올(예컨대, 10-15%)에서 성장할 수 있으며, 동시에 고온(예컨대, 42℃) 또는 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15-50 mM)에서 성장할 수 있는 효모 균주다. 따라서, 본 발명의 효모 균주는 기존의 비효율적인 다단계 공정을 극복하는 통합공정에 필요한 고온, 고농도 에탄올 및 고농도 퍼퓨랄 조건에서 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도11



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345072522
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래유망파이오니아사업
연구과제명	미생물 오닉스 융합기반 바이오에너지 생산 및 온실가스 저감 기술 개발 연구
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2008.07.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

불활성화된(inactivated) SSK2 유전자를 포함하는 퍼퓨랄(furfural)-저항성 형질변형 효모 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 SSK2 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 효모 균주는 15-50 ㎜ 퍼퓨랄 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 효모 균주는 에탄올 및 열에 대한 저항성을 추가적으로 가지는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 효모 균주는 5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 효모 균주는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 효모 균주는 30-43℃ 온도 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 효모 균주는 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 균주인 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 효모 균주는 사카로마이세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 효모 균주를 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 C6 당은 글루코오스인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에탄올?, 열? 및 퍼퓨랄?저항성 효모 균주 및 이의 용도에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 효모 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)는 바이오매스 자원으로부터 바이오에탄올의 생산을 포함하는 여러 산업 분야에서 다양하게 이용되어 왔다(Schubert, 2006). 효모 세포는 산업적 에탄올 발효 과정 동안 발생하는 고농도 에탄올 같은 여러 환경적 스트레스에 항상 노출되고, 이는 결국 세포 성장, 세포 생존율 및 에탄올 생산에 있어서의 감소를 초래한다(Casey & Ingledew, 1986; Suutari and Laakso, 1994). 따라서, 주로 고농도 에탄올에 의해 야기된 스트레스를 극복할 수 있는 효모 균주의 개발이 요구되어져 왔다. 한편, 새로운 기술로서 제안되어 지는 목질계 분해효소 생산라인과 목질계 분해라인, 발효라인이 한 반응기(reactor)에서 일어나도록 균주체계를 개발하고자 하는 통합공정(CBP: Consolidated BioProcess)은 목질계 분해효소의 적정 환경과 효모의 발효환경의 차이를 극복할 조건에 맞는 고에탄올 및 열 저항성을 보유한 효모균주를 개발하는 것이 향후 효율적인 에탄올 생산을 위한 가장 중요한 요소이다.

[0003] 에탄올 스트레스 저항성에 대한 기작을 조사하기 위해, 많은 연구들이 있었다. 특히, 막 유동성과 관계된 불포화 지방산은 효모에서 에탄올 저항성의 중요한 결정인자로 간주되어 보고되었다(Kajiwara, *et al.*, 2000; You, *et al*, 2003). 또한, 트리할로오스(Kim, *et al.*, 1996) 또는 프롤린(Takagi, *et al.*, 2005)의 세포내 축적이 효모의 에탄올 저항성을 개선시키고 에르고스테롤이 사카로미세스 세레비지에의 에탄올 저항성과 관련된 중요한 인자(Inoue, *et al.*, 2000)라는 것이 보고되었다.

[0004] 더 나아가, 마이크로어레이 및 포괄적 발현 패턴 분석 같은 지놈 전반에 걸친(genome-wide) 분석들의 이용이 에탄올 스트레스 관련된 신규한 유전자들을 동정하는 데 유용하였다(Hirasawa, *et al.*, 2007; Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 이러한 접근방법을 통해, 에탄올 저항성에 관련된 많은 유전자들이 비-필수(nonessential) 유전자들로 동정되었다. 또한, 에탄올 저항성에 관련된 결과들은 각각 매치하지 않았고, 이러한 불일치는 균주 및 성장 조건에 기인한다고 보고하였다(Teixeira, *et al.*, 2009). 따라서, 상술한 유전 정보로부터 구축된 균주는 항상 에탄올 스트레스 조건에 대한 변화를 초래하지 않는다(Yoshikawa, *et al.*, 2009). 또한, 상업적으로 유용한 사카로미세스 세레비지에의 결실 돌연변이 라이브러리는 에탄올 저항성에 관련된 유전자들의 지놈 전반에 걸친 스크리닝에 이용되었다(Fujita, *et al.*, 2006; Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 상술한 연구들은 주로 에탄올 민감성을 나타내는 돌연변이체들을 선택하여 상응하는 유전자를 고농도 에탄올 조건 하에서 성장에 필요한 유전자들로 동정하였다. 한편, 고온 조건에서는 주로 열충격 단백질(HSP: Heat shock protein)이 유도되어 성장을 유도한다고 보고 되었으며(Sanchez, *et al.*, 1990), 사카로미세스 지놈 결실 프로젝트에 의해 구축된 효모유전자 결실 돌연변이체들에 대한 온도를

포함한 여러 스트레스 민감조건에서 요구되어 지는 유전자들을 스크리닝 하였다(Auesukaree *et al.*, 2009).

[0005] 상술한 바와 같이, 에탄올- 및 열-민감성 돌연변이들의 스크리닝을 통해 에탄올 저항성을 책임지는 유전자들이 동정되었지만(Takahashi, *et al.*, 2001; Auesukaree *et al.*, 2009), 임의적 트랜스포존 삽입에 의해 에탄올 또는 열-저항성 효모 균주를 직접적으로 구축하고 이에 관계된 타겟 유전자들을 동정하는 방법에 대해서는 아직까지 보고되어 있지 않다.

[0006] 한편, 지속적인 대체 연료로서 바이오에탄올에 대한 요구가 증가하고 있다. 효모 사카로미세스 세레비지에는 강력한 에탄올 생산능 및 저항성으로 인해 에탄올-연관된 산업에서 폭넓게 이용되고 있다(Schubert 2006). 효모 세포는 고농도 에탄올, 고온 또는 고삼투압 같은 여러 환경 스트레스 및 및 산업적 에탄올 발효 동안 발생하는 억제인자들에 항상 노출되어 결국 세포 성장, 생존율 및 에탄올 생산률이 감소된다(Casey & Ingledew 1986; Suutari & Laakso 1994). 따라서, 다양한 스트레스를 견딜 수 있는 효모 스트레인의 개발이 절실하게 요구된다.

[0007] 연료 에탄올 생산을 위해 가장 강력하게 대두되는 기술들 중 하나가 동일 반응기에서 동시에 리그노셀룰로오스계 바이오매스(lignocellulosic biomass)의 당화(saccharification) 및 발효로 특징지을 수 있는 CBP(consolidated bio-processing)이다(Lynd, *et al.*, 2005). CBP에서는 당화를 위한 최적 온도(45~50℃)가 발효를 위한 온도(25-35℃)와 다르기 때문에, 열-저항성 스트레인의 이용이 반드시 필요하다(Edgardo, *et al.*, 2008; Weber, *et al.*, 2010). 또한, 열-저항성 효모 스트레인의 이용은 냉각 비용, 증류 비용 및 더 빠른 발효율을 감소시키는 데 유용하고 발효 동안 오염 기회를 감소시키는 데 도움이 된다. 자외선 돌연변이유발법(Sridhar, *et al.*, 2002), 에러-프론 PCR(error-prone polymerase chain reaction; Shimoda, *et al.*, 2006) 및 고온에 장기간 적응(long-term adaptation to high temperatures; Edgardo, *et al.*, 2008)을 이용한 여러 보고들에서 열-저항성 스트레인의 개발을 소개하고 있다.

[0008] 에탄올-저항성 효모 스트레인의 이용은 그 자체로 높은 에탄올 생산율을 위해 중요한데, 왜냐하면 에탄올 농도가 발효 과정 동안 세포에 해로운, 심지어는 치명적인 레벨까지 끊임없이 증가하기 때문이다. 트리할로오스(Kim, *et al.*, 1996), 프롤린(Takagi, *et al.*, 2005) 및 에르고스테롤(Inoue, *et al.*, 2000)의 세포내 축적을 포함하는 여러 생리학적 변화들이 에탄올-저항성 효모 스트레인에서 일어난다. 에탄올 저항성 스트레인들을 개발하기 위해, 진화적 적응(Stanley, *et al.*, 2010), 임의적 화학물질 돌연변이유발법(Mobini-Dehkordi, *et al.*, 2008) 및 유전자 셔플링(Hou, 2010) 같은 고전적인 전략 이외에 여러 전략들이 최근에 이용되고 있다. 상술한 대체 전략들은 지놈 전반에 걸친 DNA 마이크로어레이 분석(Hirasawa, *et al.*, 2007), 트랜스포존-매개된 결실 돌연변이 라이브러리(Takahashi, *et al.*, 2001) 또는 단일 유전자 넉-아웃(single gene knockout, SGKO) 라이브러리(Auesukaree, *et al.*, 2009; Fujita, *et al.*, 2006; Kubota, *et al.*, 2004; Teixeira, *et al.*, 2009; van Voorst, *et al.*, 2006; Yoshikawa, *et al.*, 2009) 스크리닝 및 gTME(global transcriptional machinery engineering; Alper, *et al.*, 2006)를 포함한다. 비록 gTME가 에탄올 저항성 스트레인을 양성적으로 선택하는 수단으로서 흥미로울지라도, 그 효용도가 논란이 되고 있다(Araki, *et al.*, 2009). 이와 대조적으로, 다른 3가지 대체 전략들은 대부분 간접적이다: 타겟 유전자의 동정에 따른 확인 단계가 추가적으로 필요한데, 이는 에탄올 민감성 유전자의 동정이 에탄올 저항성의 분자 기반을 이해하는 데 도움을 주지만 에탄올 저항성 스트레인의 생산을 확실하게 하는 것은 아니기 때문이다. 더욱이, 동정된 타겟 유전자들의 많은 수가 복잡하게 고려해야 하는데, 이는 효모 지놈에서 인코딩된 유전자들의 5-10%는 다른 스트레스 인자들(stressors)일 수 있기 때문이다.

[0009] 몇몇 연구들이 특이 유전자(들)의 파괴가 에탄올(Kubota, *et al.*, 2004; Yazawa, *et al.*, 2007)을 포함하는 여러 종류의 스트레인 인자들에 대한 저항성 스트레인의 창출로 이어진다는 것을 밝혔다. 최근에, 8% 에탄올에서 증가된 성장을 보이는 2개의 클론 및 10개의 삼투-저항성 클론들이 SGKO 라이브러리의 스크리닝을 통해 동정되었다(Yoshikawa, *et al.*, 2009). 특히, 본 연구는 특정 스트레스 인자에 대한 저항성(민감하지 않은)을 가지는 스트레인의 양성적(또는 직접적인) 분리를 위해 트랜스포존 또는 SGKO를 이용하여 구축된 결실 돌연변이 라이브러리의 이용하였다.

[0010] 어떠한 라이브러리를 이용하는 것이 현재 주된 이슈이다. 각 라이브러리는 대조적인 장점 및 단점들을 가지는데, 트랜스포존 돌연변이 라이브러리는 다양한 유전적 백그라운드를 가진 스트레인들에서 쉽게 구축될 수 있다. 상향- 또는 하향-조절된 유전자들을 가지는 돌연변이체들은 조절성 부위, 특히 발현 레벨에 있어서 중요한 부위(예컨대, 치사 유전자들)로의 트랜스포존 삽입에 의해 발생될 수 있다. 한편, 이러한 방법은 해당 유전자의 최종 동정을 위한 추가적인 단계(예컨대, 지놈 DNAs에 의해 플랭킹된 트랜스포존의 회복)를 필요로 한

다. 종종, 하나 이상의 유전자들이 영향 받을 수 있다.

[0011] 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

[0012] 본 발명자들은 고에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 보유한 효모 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 효모에서 트랜스포존-매개된 유전자 상동 재조합으로 효모 염색체 내에 돌연변이를 유발함으로써 에탄올- 열- 및 퍼퓨랄 저항성 효모 형질전환체를 동정하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10%, 12.5%, 15% 에탄올), 고온(예컨대, 42℃) 및 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM)에서 성장할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성 효모 균주 및 이와 관련된 유전자를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 에탄올 생산방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

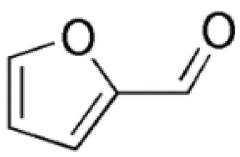
과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하는 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄(furfural)-저항성 형질변형 효모 균주를 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 고에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 보유한 효모 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 효모에서 트랜스포존-매개된 유전자 상동 재조합으로 효모 염색체 내에 돌연변이를 유발함으로써 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄 저항성 효모 형질전환체를 동정하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10%, 12.5%, 15% 에탄올), 고온(예컨대, 42℃) 및 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM)에서 성장할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0018] 발화성, 휘발성 무색 액체인 에탄올은 가장 널리 이용되는 용매이다. 산업적으로, 에탄올은 자동차 연료 및 연료 첨가제로서 이용되며, 향수(scents), 향료(flavorings), 착색제(colorings) 및 의약품(medicines)으로도 이용된다. 또한, 에탄올은 알코올 음료 내 주요 정신활성 구성성분으로 중추신경계에 진정 효능을 가진다. 에탄올은 에틸렌의 수화를 통해 석유화학적으로 생산될 수 있으며, 효모를 이용하여 당을 발효시킴으로써 생물학적으로 생산될 수 있는데, 이러한 생물학적 생산은 석유 및 곡물 사료제의 가격에 의존적인 석유화학적 과정에 의한 생산보다 훨씬 경제적이다. 따라서, 생물학적 에탄올의 생산을 위한 효모 균주의 개발은 매우 중요하다.

[0019] 또한, 퍼퓨랄은 옥수수, 귀리, 밀기울 및 톱밥 같은 다양한 농산 부산물들로부터 유래된 유기 화합물로써, 하기의 화학식 I (OC_4H_3CHO)로 표시되는 링 구조를 가진 방향족 알데하이드이다:



[0020] (I)

[0021] 퍼퓨랄은 아몬드 향을 가진 무색의 오일 액체이지만, 공기 중에 노출되면 빠르게 노란색으로 변한다. 보통, 퍼퓨랄은 다른 하이드로카본으로부터 디엔을 추출하는 석유화학적 정체 과정에서 용매로서 이용된다. 퍼퓨랄 및 이의 알코올 유도체들은 페놀, 아세톤 또는 우레아와 함께 고형 레진을 제조하는 데 이용된다. 이러한 레진들은 섬유유리, 비행기 구성성분 및 자동브레이크에 이용된다. 퍼퓨랄은 효모세포의 ADH, PDH, ALDH 등의 효소를 억제하고 해당과정을 억제하여 효모의 성장을 저해하는 활성을 지니는 억제인자로써, 효모를 이용한 에탄올 생산에 있어서 이에 대한 저항성을 가지는 스트레인을 개발하는 것이 매우 중요하다.

[0022] 본 발명은 효모에서 트랜스포존-매개된 돌연변이에 의해 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주를 제공한다.

[0023] 본 명세서의 용어 "트랜스포존(transposon)"은 단일 세포의 지놈 내에서 다른 위치로 이동(transposition)할 수 있는 DNA 서열로, 돌연변이를 유발하는 DNA 서열을 의미한다. 점핑 유전자(jumping genes)로 불리는 트랜스포존은 모바일 유전성 엘리먼트의 좋은 예이다. 다양한 종류의 모바일 유전성 엘리먼트들은 트랜스포지션 기작에 따라 다음과 같이 분류될 수 있다: (a) 그룹 I 레트로트랜스포존, RNA로 전사된 후 DNA로 역전사되어 이동해 가는 트랜스포존; 및 (b) 그룹 II 점핑 트랜스포존, 트랜스포사제에 의해 DNA의 한 위치에서 다른 위치로 점핑("cut and paste")하는 트랜스포존. 본 발명에서 이용된 트랜스포존 컨스트럭트는 mTn3-*lacZ/LEU2* 컨스트럭트로 유전자 상동 재조합(Homologous recombination)을 통해 효모 염색체 내로 도입된다.

[0024] 본 발명은 (a) 효모 염색체에 돌연변이(mutations)를 유발시키는 단계; 및 (b) 상기 돌연변이된 효모를 고농도 에탄올을 포함하는 배지에서 또는 고온으로 배양시키는 단계를 포함하는 에탄올- 및 열-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0025] 상기 (a) 단계는 다양한 방법, 바람직하게는 트랜스포존을 이용하여 실시한다. 본 발명자들은 예일지놈분석센터(Yale Genome Analysis Center, New Haven, CT: http://ygac.med.yale.edu/mtn/reagent)로부터 얻어진 mTn3-*lacZ/LEU2* 컨스트럭트를 포함하는 효모(*S. cerevisiae*) 라이브러리 풀을 이용하였다(참고: 도 1). 제한효소를 이용하여 트랜스포존 컨스트럭트를 플라스미드 DNA로부터 절단하고 그 단편을 효모 염색체로 유전자 상동 재조합을 통해 형질전환시킴으로써 돌연변이를 유발시켰다. 일반적인 재조합 과정으로 알려진 유전자 상동 재조합은 유사한 또는 동일한 두 개의 DNA 가닥 사이에서 발생하는 뉴클레오타이드 서열의 교환을 지칭하는 유전 재조합의 한 형태로, 대부분의 생명체에서 이용된다.

[0026] 형질전환된 효모 균주를 고농도 에탄올에서 배양하여 성장이 가능한 균주를 분리/동정한다. 본 발명에서는 다양한 농도의 에탄올(10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 효모 균주의 성장 어세이(spot assay)를 실시하였다. 선택된 에탄올-저항성 균주들을 대조군과 함께 30℃ 또는 42℃에서 배양하여 대조군과 비교하여 고온(42℃)에서도 성장할 수 있는 균주들을 에탄올- 및 열-저항성 형질변형 효모 균주로 선택하였다. 더 나아가, 선택된 에탄올-저항성 균주들을 대조군과 함께 다양한 농도의 퍼류랄 하에서 배양하여 대조군과 비교하여 고농도 퍼퓨랄(15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 또는 50 mM)에서도 성장할 수 있는 균주들을 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성 형질변형 효모 균주로 선택하였다.

[0027] 본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하는 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성 효모 균주들을 분리/동정하였다.

[0028] 본 명세서의 용어 "불활성화된(inactivated)"은 타겟 유전자의 기능이 차단되면 불활성화되었다고 표현하며, 예를 들어 트랜스포존-유발된 돌연변이, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 대체 돌연변이, 결실 돌연변이, 등을 포함하는 돌연변이에 의해서 유발된 타겟 유전자의 불활성화를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된 돌연변이를 통한 불활성화를 의미한다.

[0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 타겟 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된다.

[0030] 상술한 타겟 유전자인 SSK2 및 PPG1 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열, 그리고 서열목록 제3서열 및 서열목록 제4서열에 기재되어 있으며, 상기 유전자들의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 변형체도 이용될 수 있음은 당업계에서 자명하다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-15% 에탄올, 보다 바람직하게는 10-15% 에탄올 및 가장 바람직하게는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 30-43℃, 보다 바람직하게는 37-43℃, 보다 더 바람직하게는 40-43℃ 및 가장 바람직하게는 42-43℃ 온도 조건에서 성장할 수 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-100 mM 퍼퓨랄, 보다 바람직하게는 10-75 mM 퍼퓨랄 및 가장 바람직하게는 15-50 mM 퍼퓨랄 배양 조건에서 성장할 수 있다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 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 균주이며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 종이고, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에 L3262(*MAT-a ura3-52 leu2-3,112 his4-34*)이다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자가 삽입된 효모 균주를 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법을 제공한다. 보다 바람직하게는, 상술한 불활성화된(inactivated) SSK2 또는 PPG1 유전자가 삽입된 효모 균주를 이용하여 기존의 비효율적인 다단계 공정을 극복하는 통합공정에 필요한 고온 및 고에탄올 조건에서 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있는 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 상술한 효모 균주를 유효성분으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0037] 또한, 본 발명은 상술한 효모 균주에 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는 에탄올- 및 열-저항성 효모 균주 제조방법으로서 이용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하고, 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 C6 당은 글루코오스를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명은 상술한 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 그의 전사체에 의해 감염된 세포 및 유전자 도입에 의한 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상술한 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 상술한 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 단백질에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0040] 본 발명의 재조합 벡터는 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 유전자의 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.

[0041] 바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터는 (ⅰ) 상술한 본 발명의 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (ⅰ)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터를 포함하며, 보다 바람직하게는 (ⅰ) 상술한 본 발명의 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 유전자의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (ⅰ)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 상기 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 재조합 발현벡터를 포함한다.

[0042] 바람직하게는, 상술한 발현대상물질은 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 유전자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 명세서에서 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 제조합 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.

[0044] 본 발명의 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac*

프로모터, *lac* 프로모터, *lac* UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac*5 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로머터, *trp* 프로모터, T7 프로모터, 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 숙주 세포는 *E. coli*이며, 가장 바람직하게는*E. coli* DH5α이다. 또한, 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(p_L^{λ} 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: λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0045] 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, 아데노바이러스 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.

[0046] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아네닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).

[0047] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 트랜스덕션(transduction), 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.

[0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 발현대상물질-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 “프로모터-발현대상물질 인코딩 뉴클레오타이드 서열-폴리 아데닐화 서열”의 구조를 갖는다.

[0049] 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.

[0050] 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, J., et al., (1991), DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids Res. 19, 5791), 리포좀-매개 전이방법(Wong, 등, 1980), 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, H.Y., et al., (1990), J. Reprod. Fert. 41:173-182; Kopchick, J.J. 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.

[0051] 한편, 본 발명의 발현대상물질 단백질을 유효성분으로써 유전자 도입에 이용하기 위해 발현대상물질 단백질이 효과적으로 세포 내로 침투할 수 있어야 한다. 예를 들어, 상술한 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 단백질을 유효성분으로 이용하는 경우, 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 단백질에 부착시키는 것이 바람직하다. 즉, 유효성분으로서 본 발명의 불활성화된 SSK2 또는 PPG1 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 세포내로 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.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0053] (a) 본 발명은 불활성화된(inactivated) SSK2 유전자를 포함하는 에탄올- 및 열-저항성 형질변형 효모 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0054] (b) 본 발명의 효모 균주들은 고농도 에탄올, 바람직하게는 12.5-15% 에탄올에서 성장할 수 있으며, 고온(예컨대, 42℃) 뿐 아니라 고농도 퍼퓨랄(예컨대, 15-50 mM)에서 성장할 수 있는 효모 균주다.

[0055] (c) 본 발명의 효모 균주들은 고에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 보유함으로써 향후 통합공정에서 에탄올을 보다 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 트랜스포존에 의해 돌연변이 유발된 효모 DNA 라이브러리를 이용한 사카로마이세스 세레지비에 L3262의 형질전환 과정을 나타내는 도식이다.

도 2는 사카로마이세스 세레지비에 트랜스포존 돌연변이체들의 에탄올-저항성을 조사하기 위한 성장 어세이 결과이다.

도 3은 사카로마이세스 세레지비에 트랜스포존 돌연변이체들의 열-저항성을 조사하기 위한 성장 어세이 결과이다.

도 4는 트랜스포존 삽입 위치를 나타내는 도식이다. 트랜스포존 삽입 위치는 2개의 에탄올- 및/또는 열-저항성 스트레인으로부터 회복된 트랜스포존의 시퀀싱을 통해 결정하였다. 주변 유전자 위치(genetic loci)가 보여진다.

도 5는 트랜스포존에 의해 영향받은 유전자들의 발현을 나타내는 결과이다. 대조군 L3262로부터 추출한 총 RNA를 이용하여 노던 블롯 분석을 실시하였다. 스캐닝 밀도측정기(scanning densitometer)를 이용하여 시그널을 상대적으로 정량하고 ACT1으로 표준화하였으며, % 대조군으로 제시하였다.

도 6은 SGKO 돌연변이체들의 에탄올- 및/또는 열-저항성을 나타내는 성장 어세이 결과이다. 도 6A는 10배씩 연속적으로 희석된 SGKO 돌연변이체들을 0%, 10%, 12.5% 및 15% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%), 3일(10%), 4일(12.5%) 또는 5일(15%) 동안 성장시킨 결과이다. 도 6B는 스팟된 YPD 플레이트를 1일(30℃) 또는 3일(43℃) 동안 성장시킨 결과이다.

도 7은 보충(complementation)에 의한 스트레스 민감성 회복을 보여주는 성장 어세이 결과이다. 도 7A는 10배씩 연속적으로 희석된 보충된 스트레인들을 0% 및 10% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%) 또는 4일(10%) 동안 성장시킨 결과이다. 도 7B는 스팟된 YPD 플레이트를 1일(30℃) 또는 4일(42℃) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316을 Tn 돌연변이체들에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

도 8은 스트레스 민감성에 대한 과다-발현의 효과를 관찰한 결과이다. 도 8A는 10배씩 연속적으로 희석된 과다-발현 스트레인들을 0% 및 10% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%) 또는 4일(10%) 동안 성장시킨 결과이다. 도 8B는 스팟된 YPD 플레이트를 1일(30℃) 또는 4일(42℃) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316-GAPDH을 L3262에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

도 9은 Tn 돌연변이체들의 발효 프로파일을 보여주는 그래프이다. 지수적으로 성장하는 세포(0.5 OD_{600})를 30℃에서 30% 글루코오스 및 6% 에탄올이 보충된 YPD 배지에서 성장시켰다. 발효 동안 세포 성장(도 9A) 및 에

탄올 생산(도 9B)을 모니터링하였다. 에탄올이 없는 상태에서 실시한 유사한 실험을 42℃에서 실시하여 발효 동안 세포 성장(도 9C) 및 에탄올 생산(도 9D)을 모니터링하였다. 심볼: L3262, 빈 삼각형; Tn2, 채워진 원; 및 Tn3, 채워진 사각형.

도 10은 Tn2 돌연변이체의 퍼퓨랄 저항성을 보여주는 성장 어세이 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 Tn2 돌연변이체를 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 및 50 mM 퍼퓨랄이 보충된 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%), 4일(15 mM), 5일(20 mM), 7일(30 mM), 9일(40 mM) 또는 11일(50 mM) 동안 성장시킨 결과이다.

도 11은 SGKO 돌연변이체들의 퍼퓨랄-저항성을 나타내는 성장 어세이 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 SGKO 돌연변이체들을 0 mM 및 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0 mM) 또는 7일(20 mM) 동안 성장시킨 결과이다.

도 12는 보충(complementation)에 의한 스트레스 민감성 회복을 보여주는 성장 어세이 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 SGKO 돌연변이체들을 0 mM 및 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0 mM) 또는 7일(20 mM) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316을 Tn-2 돌연변이체에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

도 13은 스트레스 민감성에 대한 과다-발현의 효과를 관찰한 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 SGKO 돌연변이체들을 0 mM 및 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0 mM) 또는 7일(20 mM) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인은 pRS316-GAPDH을 L3262에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 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.

[0058] **실시예**

[0059] **실험재료 및 실험방법**

[0060] **균주, 배지 및 배양 조건**

[0061] 본 연구에서 균주, 파괴된 유전자 및 트랜스포존-삽입위치는 표 1에 기재되어 있다. 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) L3262(*MAT-α ura3-52 leu2-3,112 his4-34*: 한국생명공학연구원 제공)를 숙주 균주로 이용하였다. 사카로미세스 세레지비에를 YPD 배지(1% 박토 효모 추출물, 2% 박토 펩톤, 2% 덱스트로오스, w/v; Difco, MI)에서 30℃로 배양하였다. 사카로미세스 세레지비에 형질전환체를 SD-루이신 배지[0.67% Difco YNB(yeast nitrogen base; 아미노산 부재), 2% 글루코오스, 0.069% 보충 혼합물(complete supplement mixture, CSM)-leu : MP, OH) 에서 선택하였다. 플라스미드 구축을 위해, *E. coli* DH5α (Stratagene, CA)를 숙주로 이용하여 100 mg/l의 암피실린(Sigma-Aldrich, MO)이 보충된 루리아-베르타니 배지(LB): Difco, MI)에서 37℃ 배양시켰다.

[0062] **트랜스포존 돌연변이법**

[0063] 트랜스포존의 임의적 삽입(random insertion)에 의해 mTn3-*lacZ/LEU2*를 가지는 사카로미세스 세레지비에 지놈 라이브러리 풀을 예일지놈분석센터(Yale Genome Analysis Center, New Haven, CT: http://ygac.med.yale.edu/mtn/reagent)로부터 얻었다. mTn3-돌연변이된 지놈 라이브러리 풀로부터 추출한 플라스미드 DNA를 *Not*I으로 절단하여 사카로미세스 세레지비에 L3262의 형질전환을 위해 이용하였다. 효모 형질전환을 리튬 아세테이트 방법으로 실시하였다. 형질전환체를 SD-루이신 배지에서 선택하였다(도 1).

[0064] **에탄올-/열-저항성 돌연변이체 또는 에탄올-/열-/퍼류랄-저항성(tolerant) 돌연변이체의 분리**

[0065] 에탄올 저항성 돌연변이체의 분리를 위해, 형질전환체들을 YPD 배지 및 10% 에탄올을 포함한 YPD 배지 플레이트에 두 쌍으로(replica) 플레이팅하여 30℃에서 2일 동안 배양하였다. 모든 배지 조건에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체들을 선택하였다. 이후, 상기 돌연변이체들을 42℃에서 4일 동안 배양하였으며, 잘 성장하는

돌연변이체들을 선택하였다. 이들 돌연변이체들을 확인하기 위해, 돌연변이체들을 YPD 배지에서 OD_{600}값 1까지 배양한 후, 살균 수로 연속적으로 10배씩 희석시켰다. 각 희석액의 분취액(5 ㎕)을 에탄올이 없거나, 또는 10%, 12.5%, 15% 에탄올을 함유한 YPD 아가 플레이트에 플레이팅하고, 30℃ 또는 42℃에서 3-6일 동안 배양하였다. 또한, 각 희석액의 분취액(5 ㎕)을 퍼퓨랄(furfural)이 없거나, 또는 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 또는 50 mM 퍼퓨랄을 함유한 YPD 아가 플레이트에 플레이팅하고, 30℃에서 4-11일 동안 배양하였다. 성장 어세이를 세 번에 걸쳐서(triplicate) 실시하였다. 대표적인 실험 결과들이 제시되었다. 대조군 스트레인과 비교하여 10%, 12.5%, 15% 에탄올을 포함하거나 또는 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 또는 50 mM 퍼퓨랄을 포함한 YPD 아가 플레이트에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체를 에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성 돌연변이체로 최종적으로 선택하였다.

[0066] **에탄올-저항성 표현형에 관련된 유전자의 동정**

[0067] 에탄올-저항성 돌연변이체에서 lacZ 서열에 인접한 lacZ 서열을 이용한 플라스미드 회수(plasmid rescuring)에 의해 mTn3-*lacZ/LEU2* 삽입 위치를 결정하였다. 복제 원점(origin of replication; *ori*)을 도입하기 위해, *URA3*로 표시된 플라스미드(회수 플라스미드; pRSQ2-URA3, 예일지놈분석센터 제공)가 lacZ 서열의 플라스미드-유래(borne) 카피 및 트랜스포존-유래 카피 간의 재조합에 의해 트랜스포존의 일부로 대체된다. 이들 형질전환체로부터 효모 DNA를 회수하여 적절한 효소(*EcoR*I, *Sal*I, *Hind*III, *Pst*I 또는 *Kpn*I)로 절단하였다. 이후 절단된 단편들을 원형화시켜 *E. coli* DH5α에서 회복시켰다. 얻어진 플라스미드를 트랜스포존의 5' 말단에 상보적인 *lacZ* 프라이머를 이용하여 시퀀싱하였으며 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'. 사카로미세스 지놈 데이터베이스의 BLAST 서버(http://www.yeastgenome.org/)를 이용하여 트랜스포존이 삽입된 유전자들을 분석하였다.

[0068] **노던 블롯 분석**

[0069] 총 RNAs가 추출되어 15 ㎍을 이용하였다. 프로브로 이용된 DNA 단편들은 L3263 게놈 DNA로부터 적절한 유전자-특이적 프라이머들을 이용한 PCR을 통해 제조하였다. 정제된 PCR 단편들은 랜덤 프라이머를 이용하여 ^{32}P-dCTP(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)로 표지되었다. 이후 과정들은 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다(Adams, A., D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, and T. Stearns. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.(1997)). ACT1은 내적 대조군으로 이용하였다. 밴드 강도는 NIH image J, version 1.61을 이용하여 정량하였다. 각 유전자에 대한 실험들은 세 번에 걸쳐서 실시하였다.

[0070] **유전자 클로닝 및 분석 방법들**

[0071] 과다발현 실험을 위해, 동정된 유전자들의 ORFs(open reading frames)가 pRS316-GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 내로 클로닝되었다. 보충 실험(complementation experiments)을 위해, 프로모터 및 종결 서열(terminator sequences)과 융합된 ORFs을 pRS316 벡터에 서브클로닝하였다. 증폭된 산물 및 벡터를 적합한 제한 효소로 절단한 후, *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 이용된 프라이머 쌍 및 얻어진 플라스미드는 표 2에 기재되어 있다. 클론들은 시퀀싱을 통해 확인하였으며, 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*) L3262 또는 상응하는 트랜스포존 돌연변이체들에 형질전환시켰다.

[0072] 유전자들은 표준 프로토콜에 의해 제조된 게놈 DNA를 템플레이트로 이용하여 *pfu* DNA 폴리머라제에 의해 PCR-증폭되었다(Adams, A., D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, and T. Stearns. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.(1997)). PCR 단편들을 QIAquick 젤 추출 키트(Qiagen, Valencia, CA)로 정제하였다. 모든 PCR 컨스트럭트를 시퀀싱하여 확인하였다. ORF 중간에 존재하는 인트론으로 인하여, IMD4의 ORF는 역전사 (Reverse transcription, RT)-PCR을 통해 제조하였다. 이후, 단일-가닥 cDNA는 분리된 총 RNA로부터 AMV(Avian Myeloblastosis virus) 역전사 효소(Promega, Madson, WI)에 의해 합성하였다. 일 ㎍의 총 RNA, 1X 역전사 완충액[10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% 트라이톤 X-100], 1 mM 디옥시뉴클레오시드 트리포스페이트(dNTPs), 0.5 유니트의 RNase 억제제, 100 pmol/㎕의 특이적인 다운스트림 프라이머(IMD4-R; 표 1)을 포함하는 20 ㎕의 역전사 반응 혼합물과 15 유니트의 AMV 역전사 효소

를 42℃에서 15분 동안 반응시키고, 99℃에서 5분 동안 열을 가한 후, 0-5℃에서 5분 동안 반응시켰다. PCR 조건은 다음과 같이 실시하였다: 95℃에서 3분 동안 변성시키는 단계; 35 사이클(95℃에서 1분 동안 변성, 65℃에서 1분 동안 어닐링, 및 72℃에서 2분 동안 연장하는 단계로 구성된 한 사이클)을 실시하는 단계; 및 72℃에서 10분 동안 최종적으로 연장하는 단계. 세포 성장은 Beckman DU730 분광광도계(Beckman Coulter, Fullerton, CA)를 이용하여 600 nm에서 측정하였으며, 혈구계측기(hemocytometry)로 모니터링하였다.

[0073] **발효**

[0074] 지수적으로 성장하는 세포를 수득하여 100 ml의 YPD30E6[30% 글루코오스 및 6%(v/v) 에탄올로 보충된 YP]로 옮겼다. 시작 세포 밀도는 0.3의 OD_{600} 값으로 조정하였다. 세포를 120 rpm으로 흔들면서 30℃에서 배양하였다. 시료를 12시간 마다 취한 후, 세포 성장 및 에탄올 농도를 각각 세포 밀도 측정 및 HPLC(high-pressure liquid chromatography)를 이용하여 결정하였다. 시료를 60℃로 세팅된 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 로딩하였다. 글루코오스 및 에탄올을 0.5 mM H_2SO_4를 이용하여 0.6 ml/분의 유동속도로 용출시켰다. 피크들은 굴절율(refractory index)에 의해 검출되고 지연시간(retention time)에 따라 동정되어 표준 곡선에 따라 정량화되었다. 세포 성장은 600 nm에서 광학밀도를 측정함으로써 모니터링하였다.

[0075] **실험결과**

[0076] **에탄올-저항성 돌연변이체들의 선택**

[0077] 약 3,000개의 형질전환체들을 루이신 원영양체(prototroph)로서 선택하였으며(도 1), YPD 배지 및 10% 에탄올을 포함한 YPD 배지 플레이트에 두 쌍으로(replica) 플레이팅하였다. 선택된 약 40개의 돌연변이체들을 30℃에서 3일 동안 배양한 후 대조군 균주(사카로미세스 세레비지에 L3262)과 비교하여 10% 에탄올을 포함한 YPD 플레이트에서 잘 성장한 돌연변이체들을 에탄올-저항성 스트레인으로 선택하였다. 선택된 40개의 돌연변이체들을 확인해 본 결과, 2개의 돌연변이체들이 에탄올-저항성 돌연변이체들로 최종 선택되어 Tn-2 및 Tn-3으로 명명되었다. 이들 돌연변이체들은 모두 대조군 균주와 비교하여 10%, 12.5% 또는 15% 에탄올을 포함한 YPD 플레이트에서 잘 성장하였다(도 2).

[0078] **에탄올 및 열-저항성 돌연변이체들의 선택**

[0079] 본 발명자들은 고온(42℃)에서 에탄올-저항성 돌연변이체들(Tn1-9)의 성장을 조사하였다. 도 3에서 확인할 수 있듯이, 돌연변이체들은 에탄올 저항성(tolerance)을 보임에도 불구하고 증가된 온도에서는 서로 다른 특성을 나타냈다. 두 개의 돌연변이체들(Tn-2 및 Tn-3)만이 대조군 균주와 비교하여 42℃ YPD 플레이트에서 성장할 수 있었다. 따라서, 이들 두 개의 돌연변이체들은 15% 에탄올 스트레스 및 42℃까지 고온 스트레스 양자에 대해서 동시에 저항성을 나타낼 수 있었다.

[0080] **저항성 돌연변이체들에서 트랜스포존 삽입 위치의 동정**

[0081] 각 저항성 돌연변이체들로부터 트랜스포존에 인접한 효모 염색체 DNA를 대장균에서 회수하여 시퀀싱(마크로젠, 한국)하였다. 모든 동정된 유전자들의 트랜스포존 삽입 위치 및 기능을 표 1 및 도 4에 요약하여 기재하고 있다.

표 1

[0082] 에탄올- 및 열-저항성 표현형을 야기할 수 있는 동정된 유전자들.

균주	파괴된 유전자	삽입 위치[a]	기능[b]
Tn-2	*YNR031C/SSK2* ~ *YNR032W/PPG1*	-552 bp -25 bp	SSK2: HOG1 마이토젠-활성화된 시그널링 경로의 MAP(mitogen-activated protein) 키나제 키나제 키나제로 Pbs2p를 인산화시키는 Ssk1p와 상호작용하여 Ssk2p의 자가인산화 및 활성화를 야기하며, 삼투 스트레스로부터 액틴 사이토스켈레톤 회복(recovery)도 매개한다. PPG1: 글라이코겐 축적에 필요한 잠재적인 세린/스레오닌 단백질 포스파타제로, 다른 단백질 포스파타제와 결합하여 조절하는 Tap42p와 상호작용한다.
Tn-3	*YDR251W/PAM1*	778 bp	PAM1: 기능이 알려지지 않은 필수 단백질; 콜로니 형성과정 동안 다양한 발현 양상을 나타내고, 과다발현시킨 경우, 단백질 포스파타제 2A 결핍에도 생존할 수 있게 하며, 성장을 억제하고 섬유성 표현형을 유발한다.

[0083] a: 삽입 위치는 각 코딩 서열의 개시 ATG로부터의 위치이다.

[0084] b: 효모 지놈 데이터베이스(YGD)의 주석.

[0085] **파괴된 유전자들의 동정**

[0086] 트랜스포존이 삽입된 위치는 다음과 같았다: Tn2, SSK2의 프로모터 부위 및 PPG1의 프로모터 부위; 및 Tn3, PAM1의 ORF 부위. Tn2에서 영향받은 유전자를 결정하고 Tn3에서 이의 파괴를 확인하기 위해, SSK2, PPG1 및 PAM1의 발현 레벨을 노던 블롯 분석을 통해 조사하였다(도 5). 대조군과 비교하여, SSK2 및 PPG1의 레벨은 각각 약 20% 및 50% 정도 더 낮았는데, 이는 PPG1이 SSK2보다 더 큰 정도로 영향을 받았다는 것을 의미한다. 예상한 바와 같이, PAM1의 발현은 검출되지 않았다. 따라서, 트랜스포존 삽입은 SSK2 및 PPG1의 발현에 부분적으로 영향을 미쳤으며, PAM1의 발현을 완전하게 억제시켰다.

[0087] **에탄올- 및 열-저항성에 대한 기여**

[0088] 상술한 결과에 따르면, Tn2에서 SSK2 및 PPG1이 동시에 하향-조절되고, Tn3에서 PAM1이 파괴되었음을 확인할 수 있었다. SSK2, PPG1 및 PAM1의 하향-조절 또는 결실의 에탄올- 및/또는 열-저항성에 대한 기여도를 알아보기 위해, BY4741 백그라운드의 사카로미세스 세레비지에 단일 유전자 넉-아웃(single gene knockout, SGKO) 라이브러리(collection library)로부터 얻어진 3개 유전자에 대한 넉-아웃 돌연변이체들을 이용하여 개별적으로 조사하였다. 상기 라이브러리가 허원기 박사(Seoul National University, Seoul, Korea)로부터 친절하게도 제공되었으며, 동정된 유전자의 확인에 이용되었다. 사카로미세스 세레비지에 BY4741 스트레인이 상술한 결실 돌연변이체들의 모 스트레인(mother strain)이었다. *ssk2*, *ppg1* 및 *pam1*의 배양물을 10%, 12.5% 및 15% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에서 성장(spot-assay)시켰을 경우, 모든 결실 돌연변이체들의 성장이 대조군 BY4741 스트레인과 비교하여 조사된 모든 에탄올 농도에서 증대되었다(도 6A). 스팟된 YPD 플레이트가 43℃에서 성장된 경우, Tn2 및 Tn3가 성장할 수 없는 온도에서 *ssk2*, *ppg1* 및 *pam1*이 증가된 성장을 나타냈다(도 6B). 하지만, 상기 돌연변이체들은 44℃에서 성장하지 않았다(결과를 보이지 않음). 성장에 대한 최대 온도에서 1도의 차이는 BY4741이 L3262보다 더 열-저항성 스트레인이기 때문일 수 있다(결과를 보이지 않음). 그러므로, SSK2, PPG1 및 PAM1에 대한 SGKOs이 에탄올-저항성 뿐 아니라, 열-저항성도 나타냈다. SSK2 또는 PPG1, 또는 양 유전자의 하향-조절은 에탄올 및 열 모두에 대한 저항성을 부여하였다는 것이 중요하다. 상술한 결과들은 RNA 발현 레벨 및 아마도 단백질 레벨(비록 확인되지 않았을 지라도)이 에탄올- 및 열-저항성을 부여하는 데 중요하다는 것을 의미한다.

[0089] **보충(complementation)에 의한 저항성 확인**

[0090] Tn2 및 Tn3가 특정 유전자들의 결실 또는 동시에 하향-조절을 통해 에탄올- 및 열-저항성을 획득한다는 사실은 상술한 유전자들의 보충이 상기 스트레스에 대한 세포의 민감성으로 다시 나타낼 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 고찰을 확인하기 위해, 프로모터, ORF 및 종결자(ORF +/ 700 bp)를 포함하는 증폭된 DNA 단편들을 pRS316 벡터에 클로닝하여 상응하는 Tn2 및 Tn3 돌연변이체에 형질전화시킴으로써, 각 유전자들을 자가적으로 발현시켰다. 대조군은 pRS316 벡터를 형질전환시킴으로써 구축하였다. 스팟 어세이(Spot assay)가 10% 에탄올을 포함하는 YPD 아가에서 실시하는 경우, 보충된 세포의 저항성은 Tn 돌연변이체들과 비교하여 현저하게 감소하였다(도 7a). SSK2 또는 PPG1으로 개별적으로 보충된 Tn2 및 PAM1으로 보충된 Tn3이 42℃에서 배양된 경우, 감소된 열-저항성이 관찰되었다(도 7b).

표 2

[0091] 본 연구에서 이용된 올리고뉴클레오타이드.

올리고뉴클레오타이드	서열(5' -> 3')
과다-발현 실험	
SSK2-F	CGCGGATCCATGTCGCATTCAGACTACTTC
SSK2-R	CGGGTCGACCTACTCTCTTTCCTCAGTATC
PPG1-F	CGCGGATCCATGGAATTGGACGAATGT
PPG1-R	CGGGTCGACCTACAAGAAGTAATCAAC
PAM1-F	CGCGGATCCATGACATCTGCATTAAGG
PAM1-R	CGGGTCGACAAAGACAAGGGCTCGCGT
보충(complementation) 실험	
SSK2-FU	CGCGGCCGCCATGCATATCCCCCACGACTG
SSK2-RL	CGGGTCGACAGCCAACCGCCTCTCAAT
PPG1-FU	CGCGGATCCCGCCCTAAACTTTCCGACCTT
PPG1-RL	CGGGTCGACTCCTGGGCCAACAACGATAGC
PAM1-FU	CGCGGATCCCAAGATGAAACGCGCTGTATG
PAM1-RL	CGGGTCGACCTTCGGCAACGTTTTCAATGG

[0092] * 밑줄 친 서열은 제한효소 위치이다.

[0093] SSK2(20%까지) 및 PPG1(50%까지)의 동시 하향-조절이 에탄올 저항성 뿐 아니라 열-저항성을 부여한다는 사실은 스트레스 저항성이 특정 유전자(들)의 발현 레벨이 중요하다는 것으로 추측될 수 있다. 이를 위해, 각 유전자의 ORF를 PCR-증폭되고 과다발현용 pRS316-GAPDH 벡터로 클로닝되어 L3262 스트레인으로 형질전환시켰다. pRS316-GAPDH 벡터는 대조군으로서 형질전환되었다. 에탄올(도 8a) 및 열(도 8b)에 대한 스팟 어세이를 실시한 경우, 과다발현된 스트레인들은 일반적으로 대조군보다 에탄올 및 열 모두에 대해 더 민감하였는데, 이는 에탄올- 및/또는 열-민감성에 대한 유전자량 효과(dosage effect)를 의미한다.

[0094] **Tn 돌연변이체들의 에탄올 및 열에 대한 발효 능력**

[0095] 일반적으로 에탄올-저항성 세포들은 고농도의 에탄올에서 세포 생존율이 높기 때문에 비-저항성 스트레인에 비해 더 많은 에탄올을 생산한다는 것으로 알려져 있다. 발효능력(fermentation capacity)을 30% 글루코오스를 포함하는 배치 배양에서 30℃로 조사하였을 때, 돌연변이체들의 증가된 성장(약 20%)에도 불구하고 대조군 스트레인과 돌연변이체들간에 유의한 차이점이 발견되지 않았다(결과를 보이지 않음). 대조군 스트레인은 기본적으로 30% 글루코오스로부터 최대 9%의 에탄올을 생산할 수 있을 것으로 판단되며, 이는 증가된 에탄올 저항성의 효과로 보기 어렵다. 따라서, 최종적인 에탄올 역가(titer)가 9%를 초과하는 조건을 확립하는 것이 필요하였다. 이러한 면에서, 본 발명자들은 0.5의 OD_{600} 값을 가지는 개시 세포 및 6% 에탄올을 포함하는 배양액에서 발효를 시작하였다. 도 9A 및 도 9B에서 볼 수 있듯이, Tn 돌연변이체들은 대조군과 비교하여 보다 빠르게 성장하였으며 더 많은 에탄올을 생산하였다.

[0096] 본 발명자들은 42℃에서 열-저항성 스트레인인 Tn-2 및 Tn-3의 에탄올 생산 능력을 조사하였다. 상기 온도에

서 에탄올 증발이 최종 역가에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 배치 발효 도중 증발된 에탄올의 양이 4-10% 에탄올을 표준으로 제작된 보정곡선(calibration curve)에 따라 산출되었다(Abdel-Banat, *et al.*, 2010). 에탄올의 농도가 4%인 경우 천천히 증발되는 반면에, 4%를 초과하는 경우는 빠르게 증발하였다. 예를 들어, 8% 에탄올은 2일 째에 3.7%로 감소하였으며, 10% 에탄올은 보다 더 현저하게 감소하였다(결과를 보이지 않음). 발효 프로파일이 42℃에서 산출된 경우, Tn-2 및 Tn-3는 대조군에 비해 더 빠르게 성장하였다(도 9C). Tn-2 및 Tn-3의 경우 대조군에 비해 약 1.6배 정도 높은 에탄올 생성능력을 보여 주었다. (도 9D). 열에 의해 야기되는 증발 및 손상된 성장 때문에, 에탄올의 농도는 3일 후에 지속적으로 감소하였다.

[0097] **에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성 돌연변이체들의 선택**

[0098] 또한, 본 발명자들은 퍼퓨랄에 대한 저항성을 조사하였다. 도 10에서 볼 수 있듯이, 하나의 돌연변이체(Tn-2)가 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM 및 50 mM 퍼퓨랄이 보충된 YPD 플레이트에서 성장할 수 있었다. 결론적으로, 1개의 돌연변이체(Tn-2)가 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-스트레스 모두에 대한 저항성을 동시에 가졌다.

[0099] **에탄올-/열-/퍼퓨랄-저항성에 대한 기여**

[0100] 상술한 결과에 따르면, Tn-2에서 *SSK2* 및 *PPG1*이 동시에 하향-조절됨을 확인할 수 있었다. *SSK2* 및 *PPG1*의 하향-조절의 퍼퓨랄-저항성에 대한 기여도를 알아보기 위해, BY4741 백그라운드의 사카로미세스 세레비지에 단일 유전자 넉-아웃 single gene knockout(SGKO) 라이브러리(collection library)로부터 얻어진 2개 유전자에 대한 넉-아웃 돌연변이체들을 이용하여 개별적으로 조사하였다. 상기 라이브러리가 허원기 박사(Seoul National University, Seoul, Korea)로부터 친절하게도 제공되었으며, 동정된 유전자의 확인에 이용되었다. 사카로미세스 세레비지에 BY4741 스트레인이 상술한 결실 돌연변이체들의 모 스트레인(mother strain)이었다. *ssk2* 및 *ppg1*의 배양물을 20 mM 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 플레이트에서 성장(spot-assay)시켰을 경우, *SSK2* 결실 돌연변이체의 성장이 대조군 BY4741 스트레인과 비교하여 조사된 20mM 퍼퓨랄 농도에서 증대되었다(도 11). 반면 *PPG1* 결실 돌연변이체의 경우는 대조군과 차이가 없었다. 한편, 본 발명에서 얻은 Tn-2 균주가 *SSK2* 결실 돌연변이체 보다 성장이 우수하였다. 그러므로, *SSK2*에 대한 SGKOs이 에탄올- 및 열-저항성 뿐 아니라, 퍼퓨랄-저항성도 나타냈다. *SSK2* 유전자의 하향-조절은 에탄올, 열 및 퍼퓨랄 모두에 대한 저항성을 부여하였다는 것이 중요하다. 상술한 결과들은 RNA 발현 레벨 및 아마도 단백질 레벨(비록 확인되지 않았을 지라도)이 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 부여하는 데 중요하다는 것을 의미한다.

[0101] **보충(complementation)에 의한 저항성 확인**

[0102] Tn-2가 특정 유전자들의 결실 또는 동시에 하향-조절을 통해 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 획득한다는 사실은 상술한 유전자들의 보충이 상기 스트레스에 대한 세포의 민감성으로 다시 나타낼 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 고찰을 확인하기 위해, 프로모터, *SSK2* ORF 및 종결자(ORF +/ 700 bp)를 포함하는 증폭된 DNA 단편들을 pRS316 벡터에 클로닝하여 상응하는 Tn-2 돌연변이체에 형질전화시킴으로써, 유전자를 자가적으로 발현시켰다. pRS316 벡터를 형질전환시킴으로써 구축하였다. 스팟 어세이 (Spot assay)가 20 mM의 퍼퓨랄을 포함하는 YPD 아가에서 실시하는 경우, 보충된 세포의 저항성은 Tn 돌연변이체와 비교하여 현저하게 감소하였다(도 12). *SSK2*의 하향-조절이 에탄올 및 열 저항성 뿐 아니라 퍼퓨랄-저항성을 부여한다는 사실은 스트레스 저항성이 특정 유전자(들)의 발현 레벨이 중요하다는 것으로 추측될 수 있다. 이를 위해, *SSK2* 유전자의 ORF를 PCR-증폭되고 과다발현용 pRS316-GAPDH 벡터로 클로닝되어 L3262 스트레인으로 형질전환시켰다. pRS316-GAPDH 벡터는 대조군으로서 L3262 스트레인에 형질전환되었다. 20 mM농도의 퍼퓨랄(도 13)에 대한 스팟 어세이를 실시한 경우, 과다발현된 스트레인은 일반적으로 대조군보다 퍼퓨랄에 대해 더 민감하였는데, 이는 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄 민감성에 대한 유전자량 효과(dosage effect)를 의미한다.

[0103] **추가논의사항**

[0104] 효모 및 다른 생명체에서, 스트레스에 대한 대부분의 세포내 경로는 조절되는 많은 유전자들로 재프로그래밍된다(K, 2005). 현재까지 많은 수의 연관 유전자들이 동정되었을 지라도, 시그널링 경로의 관점에서 에탄올

및 열을 포함하는 많은 스트레스 유발자들에 대한 저항성이 어떻게 획득되는 지에 대해서 거의 알려져 있지 않다. 일반적으로, 에탄올- 또는 열-저항성의 기작은 매우 복잡하고 전체적으로 조절되며, 연관된 경로들의 포괄적 관점을 통해 이해될 필요가 있는 것으로 받아들여 진다(Ma, *et al.*, 2010; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 에탄올 및 열 스트레스 모두는 세포막 지질 조성을 유사하게 변화(Okuyama, *et al.*, 1979; Suutari, *et al.*, 1994)시키고 세포막 H^+-ATPase 활성(Coote, *et al.*, 1994) 열충격 단백질들을 인코딩하는 유전자들의 상향-조절(Ma, *et al.*, 2010)을 감소시키다. 상술한 결과들은 에탄올-저항성에 필요한 경로들이 열-저항성에 필요한 경로들과 중첩된다는 것을 나타낸다. 하지만, 지놈 전반에 걸친(genome-wide) 분석에 기반하여 제조된 스트레인들은 에탄올-저항성 또는 열-저항성 만을 나타냈다(Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 본 연구에서, 본 발명자들은 3,000개의 트랜스포존-매개된 파괴 돌연변이들을 스크리닝하여 에탄올에 대한 증가된 저항성을 가지는 다섯 개의 스트레인들을 분리하였다. 이후, 두 개의 돌연변이들이 열에 대해도 증가된 저항성을 가진다는 것을 발견하였다. 상기 두 개의 스트레인들은 에탄올-저항성과 열-저항성 간의 가능한 연결점(interconnection)을 설명하는 데 유용할 것이다.

[0105] 본 발명자들은 증가된 에탄올-저항성을 책임지는 3개의 유전자들(SSK2, PPG1 및 PAM1)를 동정하고 트랜스포존 돌연변이유발법 및 SGKO 돌연변이체들의 조합을 통해 증가된 열-저항성을 가짐을 확인하였다. 또한, SSK2 및/또는 PPG1의 하향-조절은 에탄올 및 열 모두에 대한 저항성을 부여하였다. 도 4에서 볼 수 있듯이, 트랜스포존은 영향받은 유전자들의 예상되는 조절 부위에 삽입되었다. 이는 트랜스포존 돌연변이유발법에 의해 발생된 라이브러리는 이론적으로 ORFs에만 영향을 가지는 SGKO 라이브러리에 포함된 클론의 수와 유사한 4,500개 이상의 클론들로 구성된다는 것을 의미한다. 본 연구에서, 본 발명자들은 이론적으로 필요한 클론 수보다 더 적은 3,000개의 클론으로 구성된 라이브러리를 이용하여 증가된 에탄올 저항성을 가지는 다섯 개의 스트레인(Tn1-5)을 분리하였다. 따라서, 적절한 클론 수를 포함하는 라이브러리를 스크리닝한다면, 증가된 저항성을 가지는 더 많은 수의 스트레인을 분리하는 것이 가능할 것이다. 영향받은 유전자들의 하향-조절을 나타내는 Tn2의 분리는 트랜스포존 삽입방법이 아닌 SGKO 라이브러리를 이용하였다면 불가능했을 것이다. 본 발명자들의 지식으로는, 본 발명자들의 연구가 RNA 레벨이 에탄올- 및/또는 열-저항성에 대한 결정 인자라는 것을 처음으로 규명한 것이다.

[0106] 하향-조절되는 Tn2의 경우, 본 발명자들은 하나의 유전자만 하향-조절되는 스트레인의 부재로 인해, 상기 유전자가 실제로 스트레스 저항성을 담당하는 지 여부를 결정할 수 없었다.

[0107] SSK2는 HOG1 경로의 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 키나제(MAPKKK)를 인코딩하는데(Posas, *et al.*, 1998), 이는 고삼투압을 포함하는 다양한 환경 스트레스들에 대한 효모 생존에 필수적이다(Albertyn, 1994; Brewster, *et al.*, 1993). HOG1 경로는 두 개의 막-결합된 삼투센서(osmosensor) 단백질인 Sln1p 및 Sho1p에 의해 서로 독립적으로 조절된다. Sln1p에 의해 발생된 시그널들이 S나2p로 전달되는 반면에, Sho1p에 의해 발생된 시그널들은 MAPKKK인 Ste11p로 전달된 후, 두 개의 경로는 다운스트림 Pbs2p로 합쳐진다(Winkler, *et al.*, 2002). 에탄올 스트레스에서 SSK2의 포함은 거의 기술되어 있지 않다. 반면에, 열 스트레스는 SSK2와는 무관한 SHO1 경로를 포함한다(Winkler, *et al.*, 2002). 상술한 사실을 고려해볼 때, SSK2의 파괴가 어떻게 에탄올-, 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 유도하는 지가 주요 관심사이다. 본 발명자들의 가설은 SSK2 파괴에 의해 야기된 SLN1 경로의 차단이 열에 대한 또 다른 경로인 SHO1 경로의 시그널링 기능을 증가시킨다는 것이다. 에탄올 저항성이 SHO1 경로에 의해 매개되는 지 여부는 흥미로운 주제일 것이다. PPG1은 글라이코겐 축적에 필요한 잠재적인 세린/트레오닌 단백질 포스파타제를 인코딩한다(Posas, *et al.*, 1993). 글라이코겐 생합성 유전자들은 에탄올 충격에 반응하여 고발현된다(Hirasawa, *et al.*, 2007). PPG1에 대한 관련 데이터는 본 연구에서 제시되지 않았기 때문에, PPG1의 파괴가 에탄올 열 및 퍼퓨랄 모두에 대한 저항성을 부여하는 본 발명자들의 데이터와의 불일치성을 고려하는 것은 시기상조이다. SSK2 및 PPG1에 대한 퍼퓨랄과의 관련성이 알려진 바가 없다.

[0108] PAM1의 넉-아웃은 에탄올 및 열 모두에 대한 저항성을 부여하였다. PAM1은 기능이 알려지지 않은 필수 단백질을 인코딩하는 데, 이는 아마도 단백질 포스파타제 2A 멀티카피 억제인자(suppressor)일 것으로 판단된다. 이 유전자의 과다-발현은 성장을 억제하고 세포형태를 조절하는 조절 경로를 방해함으로써 섬유성 표현형(filamentous phenotype)을 유발한다(Hu, *et al.*, 1994). 아직까지, 상술한 유전자들이 스트레스 저항성과 연관되어 있다는 어떠한 증거도 없었다.

[0109] 본 연구는 증가된 에탄올- 및 열-저항성을 책임지는 3개의 유전자들(SSK2, PPG1 및 PAM1)을 밝혔다. 그 중에서 에탄올- 열- 및 퍼퓨랄-저항성을 책임지는 2개의 유전자들 SSK2 및 PPG1을 밝혔다. 상술한 표현형을 나타낸다는 보고는 아직까지 없었다. 상술한 유전들 간의 내적연관성(interrelationship)은 기재된(annotated) 기

능들로부터 유추될 수 없었다. 하지만, SSK2는 세포 경로에 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 에탄올, 열 및 퍼퓨랄 저항성에 관계된 분자 기작을 이해하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다. 또한, SSK2, PPG1에 대한 연구는 어떻게 에탄올- 열- 및 퍼퓨랄 저항성을 동시에 획득할 수 있는 지를 분자 레벨에서 이해하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다.

[0110] 결론적으로, 에탄올, 열 및 퍼퓨랄 스트레스에 대한 증가된 저항성을 가지는 스트레인을 개발하고자 하는 목적들 중 하나는 스트레스에 대한 저항성에 포함된 기작을 이해하는 것 이외에 산업적 적용에 대한 정보를 제공하는 것이다. 본 연구에서 동정된 신규한 유전자들은 에탄올 생산 능력의 측면에서 산업적 효모 스트레인을 개선하는 데 유용할 것이다. 또한, 본 연구는 트랜스포존 돌연변이유발법이 발현 레벨이 저항성 결정인자(tolerance determinant)인 유전자들의 동정에 특히 유용하다는 것을 실증하였다.

[0111] 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.

[0112] **참고문헌**

[0113] Abdel-Banat, B.M., H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang, and R. Akada. 2010. High-temperature fermentation: how can process for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 85: 861-867(2010).

[0114] Albertyn, J., S. Hohmann, J. M. Thevelein, and B. A. Prior. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. ***Mol. Cell. Biol.***, 14: 4135-4144(1994).

[0115] Alper, H., J. Moxley, E. Nevoigt, G. R. Fink, and G. Stephanopoulos. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. ***Science***, 314: 1565-1568(2006).

[0116] Araki, Y., H. Wu, H. Kitagaki, T. Akao, H. Takagi, and H. Shimoi. Ethanol stress stimulates the Ca^{2+}-mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. ***J. Biosci. Bioeng.***, 107: 1-6(2009).

[0117] Auesukaree, C., *et al.*, Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in Saccharomyces cerevisiae. ***J Appl Genet***, 50(3): 301310(2009).

[0118] Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. ***Science***, 259: 1760-1763(1993).

[0119] Casey, G. P., *et al.*, ETHANOL TOLERANCE IN YEASTS. ***Critical Reviews in Microbiology***, Vol 13(3): 219-280(1986).

[0120] Coote, P. J., M. V. Jones, I. J. Seymour, D. L. Rowe, D. P. Ferdinando, A. J. McArthur, and M. B. Cole. Activity of the plasma membrane H^{+}-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae. ***Microbiology***, 140: 1881-1890(1994).

[0121] Edgardo, A., P. Carolina, R. Manuel, F. Juanita, and B. Jaime. Selection of thermotolerant yeast strains Saccharomyces cerevisiae for bioethanol production. ***Enzyme Microb. Technol.***, 43: 120-123(2008).

[0122] Fujita, K., A. Matsuyama, A. Kobayashi, and H. Iwahashi. The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. ***FEMS Yeast Res.***, 6: 744-750(2006).

[0123] Hirasawa, T., *et al.*, Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to Saccharomyces cerevisiae based on DNA microarray data analysis. ***Journal of Biotechnology***, 131:

3444(2007).

[0124] Hou, L. Improved production of ethanol by novel genome shuffling in Saccharomyces cerevisiae. ***Appl. Biochem. Biotechnol.***, 160: 1084-1093(2010).

[0125] Hu, G. Z., and H. Ronne. Overexpression of yeast PAM1 gene permits survival without protein phosphatase 2A and induces a filamentous phenotype. ***J. Biol. Chem.***, 269: 3429-3435(1994).

[0126] Inoue, T., *et al.*, Cloning and Characterization of a Gene Complementing the Mutation of an Ethanol-sensitive Mutant of Sake Yeast. ***Biosci. Biotechnol. Biochem.***, 64(2): 229-236(2000).

[0127] Kajiwara, S., *et al.*, Overexpression of the OLE1 gene enhances ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae. ***Appl Microbiol Biotechnol***, 53: 568-574(2000).

[0128] Kim, J., *et al.*, Disruption of the Yeast ATH1 Gene Confers Better Survival after Dehydration, Freezing, and Ethanol Shock: Potential Commercial Applications. ***APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY***, Vol 62(5): 15631569(1996).

[0129] Kubota, S., I. Takeo, K. Kume, M. Kanai, A. Shitamukai, M. Mizunuma, T. Miyakawa, H. Shimoi, H. Lefuji, and D. Hirata. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. ***Biosci. Biotechnol. Biochem.***, 68: 968972(2004).

[0130] K, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. ***Annu. Rev. Physiol.***, 67: 225257(2005).

[0131] Lynd, L. R., W. H. van Zyl, J. E. McBride, and M. Laser. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. ***Curr. Opin. Biotechnol.***, 16: 577-583(2005)

[0132] Ma, M., and Z. L. Liu. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 87: 829-845(2010).

[0133] Mobini-Dehkordi, M., I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani, K. Ghaedi, M. Tavassoli, and R. Akada. Isolation of a novel mutant strain of Saccharomyces cerevisiae by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. ***J. Biosci. Bioeng.***, 105: 403-408(2008).

[0134] Okuyama, H., and M. Saito. Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. ***J. Biol. Chem.***, 254: 12281-12284(1979).

[0135] Posas, F., J. Clotet, M. T. Muns, J. Corominas, A. Casamayor, and J. Arino. The gene PPG encodes a novel yeast protein phosphate involved in glycogen accumulation. ***J. Biol. Chem.***, 268: 1349-1354(1993).

[0136] Posas, F., and H. Saito. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. ***EMBO J.***, 17: 1385-1394 (1998).

[0137] Sanchez, Y., *et al.*, Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. ***EMBO J.***, 11(6): 23572364(1992).

[0138] Shimoda, C., A. Itadani, A. Sugino, and M. Furusawa. Isolation of thermotolerant mutants by using proofreading-deficient DNA polymerase as an effective mutator in Saccharomyces cerevisiae. ***Genes Genet. Syst.***, 81:391-397(2006).

[0139] Sridhar, M., N. Kiran Sree, and L. Venkateswar Rao. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of Saccharomyces cerevisiae VS1 and VS3 strains. ***Bioresource Technol.***, 83: 199-202(2002).

[0140] Stanley, D., S. Fraser, P. J. Chambers, P. Rogers, and G. A. Stanley. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of Saccharomyces cerevisiae. ***J. Ind. Microbiol. Biotechnol.***, 37: 139-149(2010).

[0141] Suutari, M. and S. Laakso. Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation. ***Critical Reviews in***

Microbiology, 20(4): 255-328(1994).

[0142] Takagi, H., M. Takaoka, A. Kawaguchi, and Y. Kubo. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8656-8662(2005).

[0143] Takahashi, T., H. Shimoi, and K. Ito. Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Genet. Genomics*, 265:1112-1119(2001).

[0144] Teixeira, MC., *et al.*, Genome-Wide Identification of Saccharomyces cerevisiae Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 75(18): 57615772(2009).

[0145] van Voorst, F., J. Houghton-Larsen, L. Jønson, M. C. Kielland-Brandt, and A. Brandt. 2006. Genome-wide identification of genes required for growth of Saccharomyces cerevisiae under ethanol stress. *Yeast*, 23: 351-359(2006).

[0146] Weber, C., A. Farwick, F. Benisch, D. Brat, H. Dietz, T. Subtil, and E. Boles. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87: 1303-1315(2010).

[0147] Winkler, A., C. Arkind, C. P. Mattison, A. Burkholder, K. Knoche, and I. Ota. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. Eukaryot. *Cell*, 1: 163-173(2002).

[0148] Yazawa, H., H. Iwahashi, and H. Uemura. Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 24: 551-560(2007).

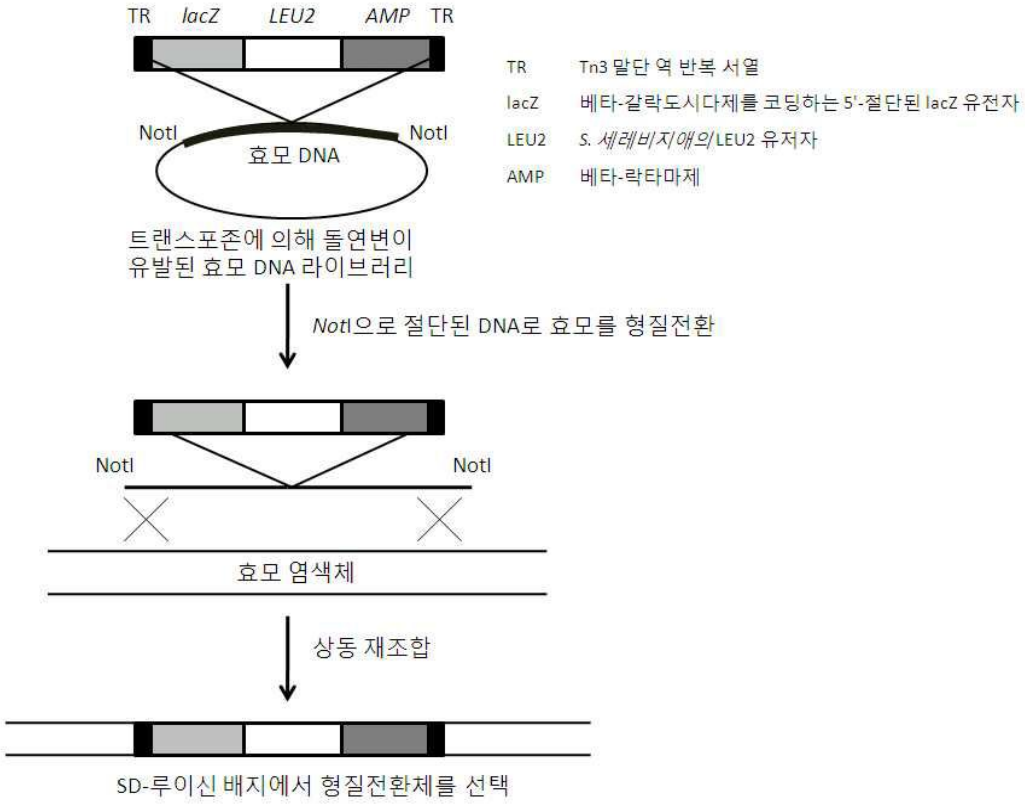
[0149] Yoshikawa, K., *et al.*, Genome-Wide Analysis of the Effects of Location and Number of Stress Response Elements on Gene Expression in Saccharomyces cerevisiae. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, vol 106(5): 507-510(2008).

[0150] Yoshikawa, K., T. Tadamasa, C. Furusawa, K. Nagahisa, T. Hirasawa, and H. Shimizu. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res.*, 9:32-44(2009).

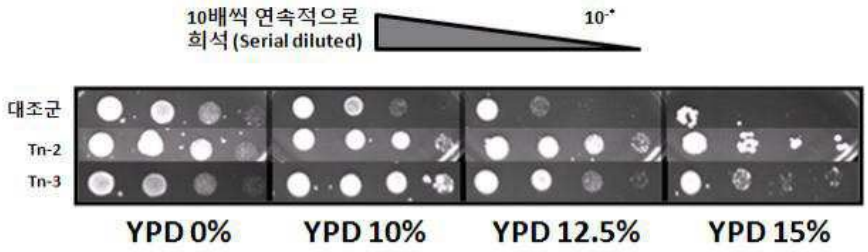
[0151] You, K. M., *et al.*, Ethanol Tolerance in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 69(3): 14991503(2003).

도면

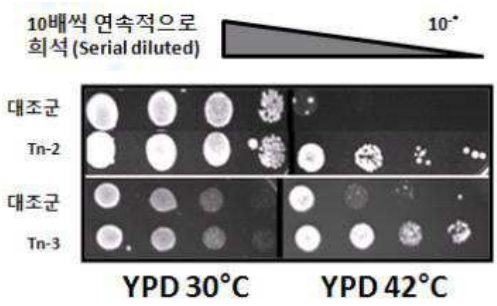
도면1



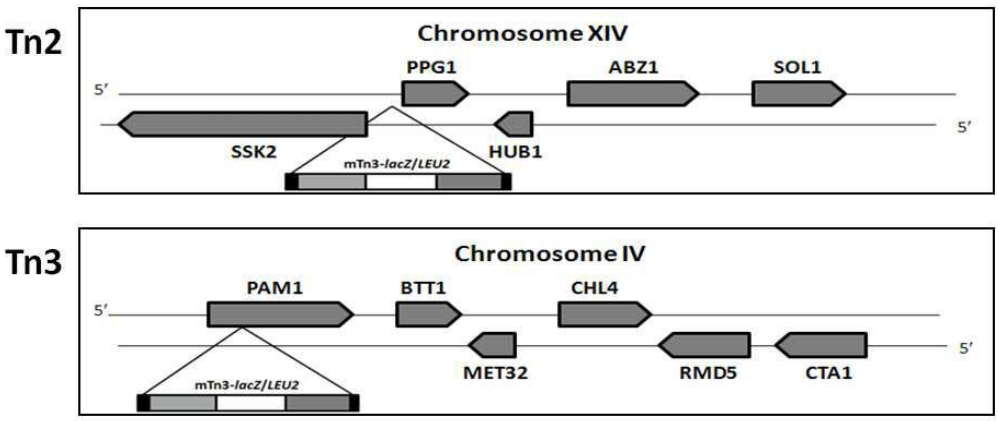
도면2



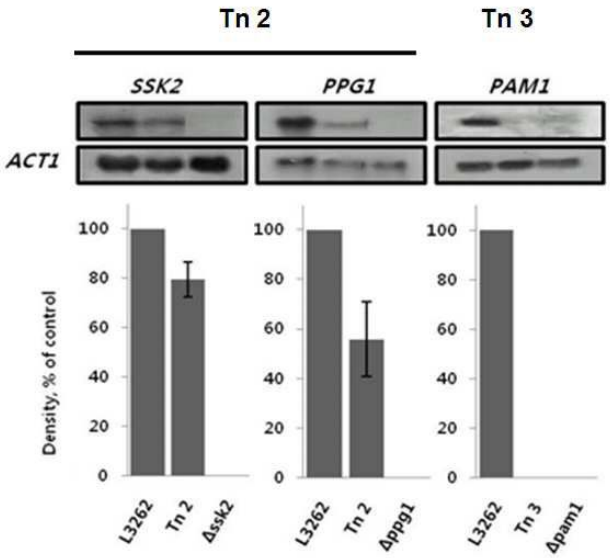
도면3



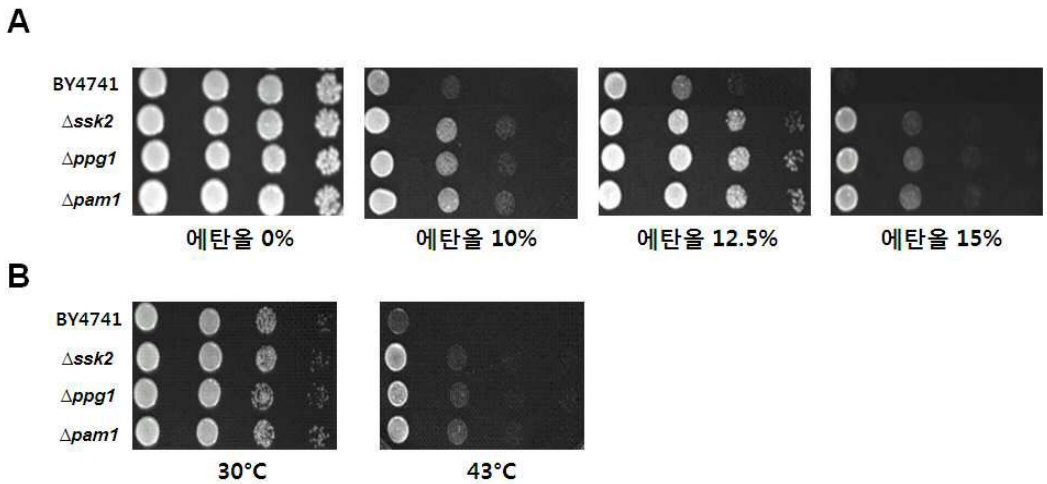
도면4


Tn2
Chromosome XIV
PPG1
ABZ1
SOL1
5′
5′
SSK2
HUB1
mTn3-lacZ/LEU2
Tn3
Chromosome IV
PAM1
BTT1
CHL4
5′
5′
MET32
RMD5
CTA1
mTn3-lacZ/LEU2

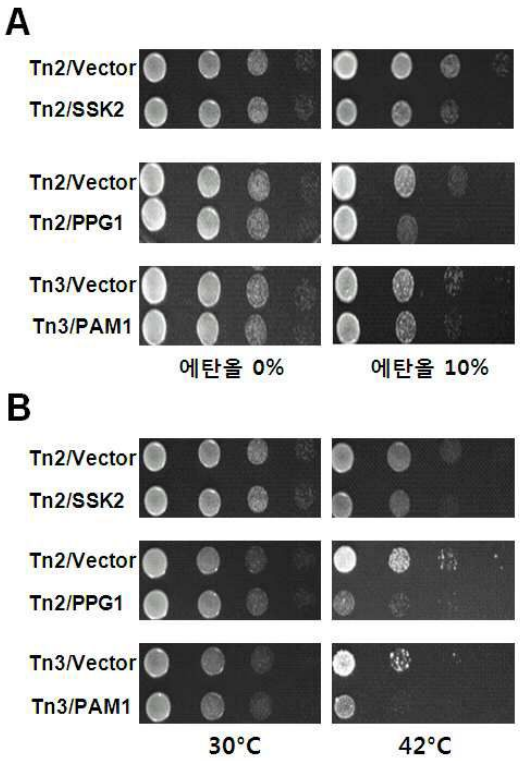
도면5


Tn 2
Tn 3
SSK2
PPG1
PAM1
ACT1
Density, % of control
100
80
60
40
20
0
L3262
Tn 2
Δssk2
Δppg1
Tn 3
Δpam1

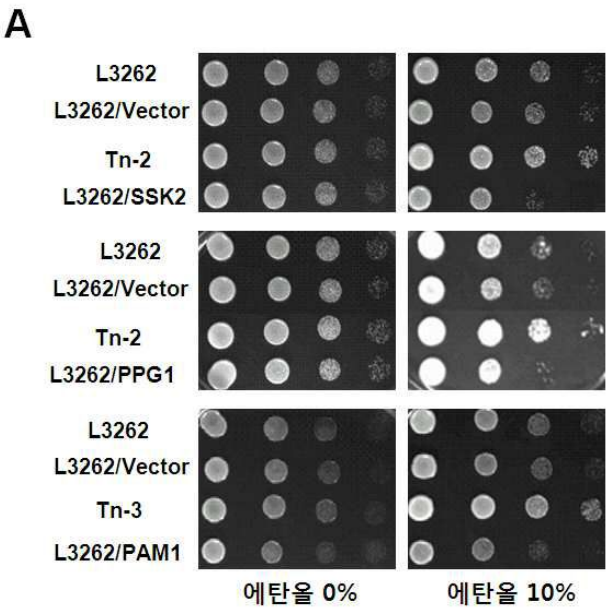
도면6


A
BY4741
Δssk2
Δppg1
Δpam1
에탄올 0%
에탄올 10%
에탄올 12.5%
에탄올 15%
B
BY4741
Δssk2
Δppg1
Δpam1
30°C
43°C

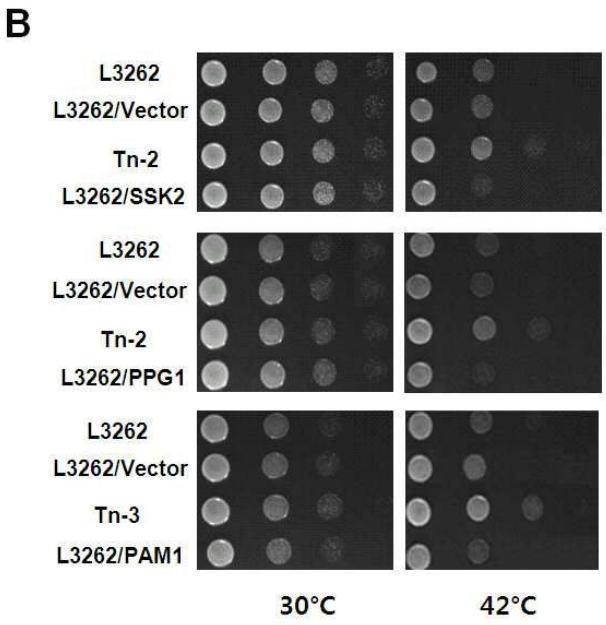
도면7


A
Tn2/Vector
Tn2/SSK2
Tn2/Vector
Tn2/PPG1
Tn3/Vector
Tn3/PAM1
에탄올 0%
에탄올 10%
B
Tn2/Vector
Tn2/SSK2
Tn2/Vector
Tn2/PPG1
Tn3/Vector
Tn3/PAM1
30°C
42°C

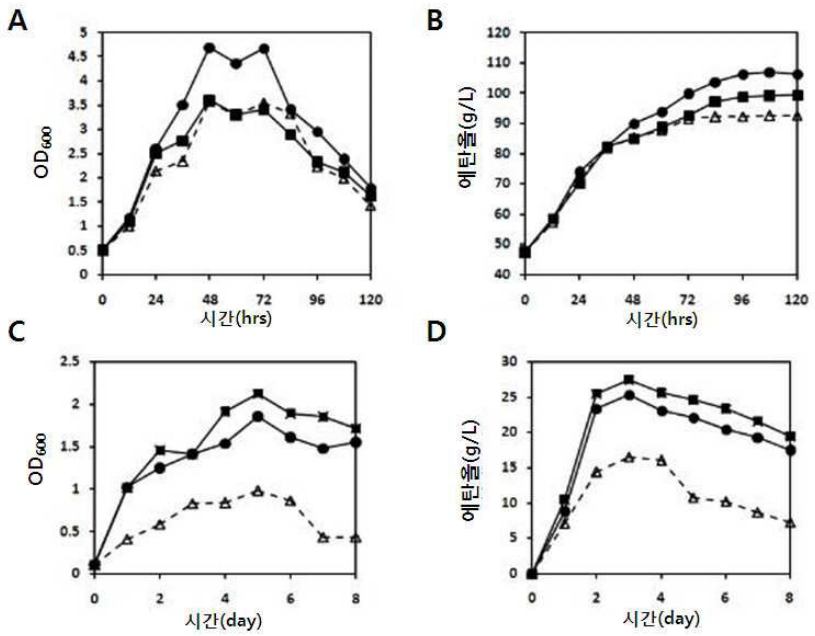
도면8a


A
L3262
L3262/Vector
Tn-2
L3262/SSK2
L3262
L3262/Vector
Tn-2
L3262/PPG1
L3262
L3262/Vector
Tn-3
L3262/PAM1
에탄올 0%
에탄올 10%

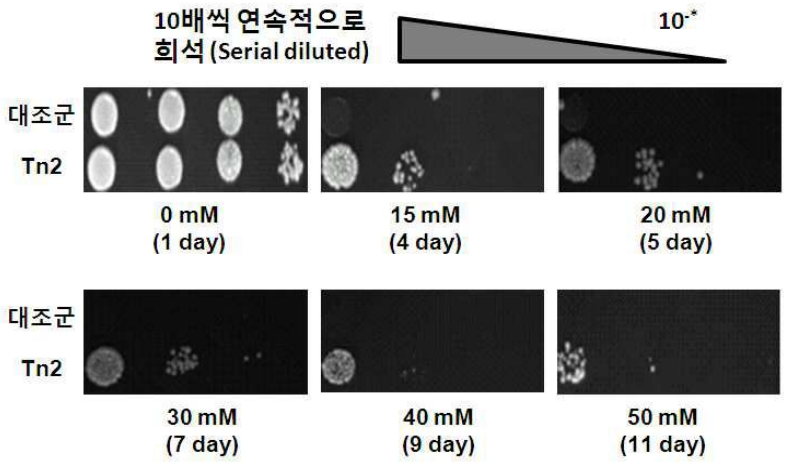
도면8b


B
L3262
L3262/Vector
Tn-2
L3262/SSK2
L3262
L3262/Vector
Tn-2
L3262/PPG1
L3262
L3262/Vector
Tn-3
L3262/PAM1
30°C
42°C

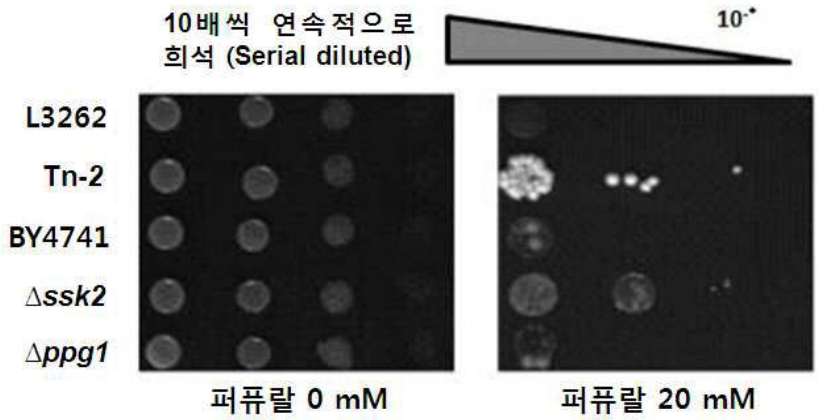
도면9


A
OD600
시간(hrs)
B
에탄올(g/L)
시간(hrs)
C
OD600
시간(day)
D
에탄올(g/L)
시간(day)

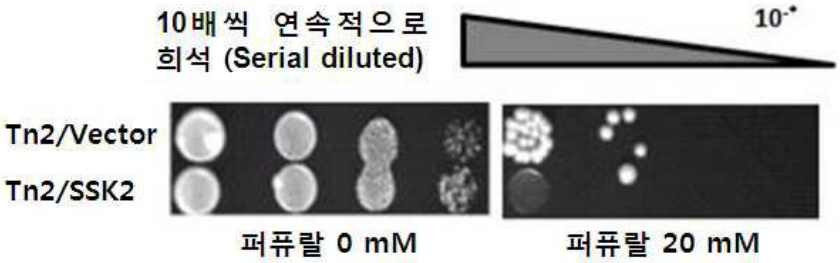
도면10



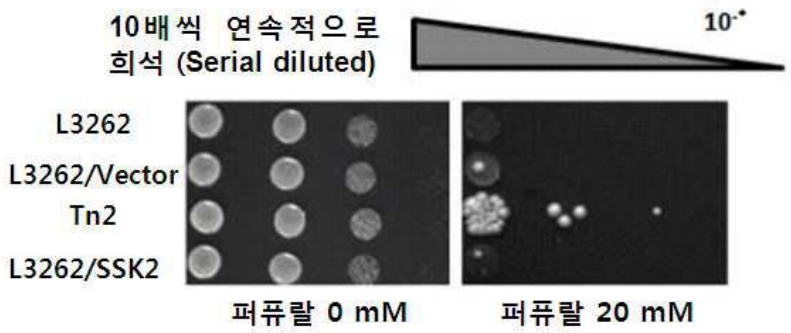
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

<110> Ewha Womens University

<120> Ethanol-, Thermo- and Furfural-Tolerant Yeast Strains and Genes Thereof

<130> PN100628

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 4737

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

atgtcgcatt cagactactt caattataag ccttacggcg attccacgga aaagcccagc 60

agctccaaga tgaggcagtc atcttcatca tcttcatcta gactaaggtc ggaaagttta 120

gggcgaaatt ccaatactac gcaggctcga gtagcgtcat cgcccatcag cccagggctg 180

cattctaccc agtactttag atcaccaaac gctgtttaca gccctggaga gtctccatta 240

aatacagtac agctattcaa tcgtcttccg ggtatacctc aaggtcagtt ttttcatcaa 300

aatgccattt ctgggtcctc cagctcctcg gcaagatcta gtagacggcc ctcgaatatt 360

ggtcttcctc taccaaaaaa tcctcagcag tctctaccga agttgtctac tcaacctgtt 420

cctgtacata agaaagttga ggctagtaaa acagagagcg agattattaa gaagcccgct 480

cccgtgaata gtaatcaaga tccattattg acgaccccaa cgttagtgat atcaccagaa 540

ctggcttcac taaatacaac gaatacatcg attatgtcaa cgccacaaaa tattacaaac 600

caaacttcga acaaacacat tcccaccaga tcgcaaccaa atgggtcaac aagttcctcc 660

actttgcagg atattgtcac gacaaatagc tcgcaacggt ctgtaggcca ccatggtgga 720

agcacaacga gcctccgaac atacaaaaaa caatatgtat taaatgaaca gttatattta 780

agaaaaatga gaaaccgtgc taatgatgat tattacacta gaggtatagt cgcatcatcc 840

aactttgaag atgacgaaga aaattttagt aacaaaggtg aagatgactt agaactagaa 900

atggatgatc ttttaaaggt agaaggtgag gataaagata acgacttcaa ttttggttat 960

aattttatta cgtcgagcac aaaaaataat gaaaatgttg tttcgatgag cctaaattat 1020

ctaaagggca aattggattg gttgagggat gtgaacaatg atcaaccgtg tgaaatagaa 1080

gatgaggagt ggcattccat actggggagc gaggatttgc tgtcaaaatt gttacaaaat 1140

cctatggtga acaaccgatt tgaatggcaa acaatgttat ctaaggtact gaagggagat 1200

attgtgagga atgaaaaaac gaagattgca aatcaaggga aaggccctgg cttcaatact 1260

cagttttcag atgacatttg gattgagttg aaggcatgga tgaatgggag gaccgtggaa 1320

gatcagaaca aatctctgag gatttttagg gattctactg actccgtatt tcaagaaatc 1380

atggccttta aactagaaga taatatgagc gctgacgagg ctgcagagac tatcaaatca 1440

ctagtagaca aatattatag agtcttaaat ctatggccta acattaaaag aatgcatgct 1500

gaaaaaccca ttactaaaac agaagcattc aggaatcgaa tagatacttt gaatagttgg 1560

cttaatttca aatttaactt tgatactaat attgcgtacc tgaaaaaatg gatagttggc 1620

aataaagagc tagaaagcac taccgaagtg gataacacca ccgtgaattt ggatgatcca 1680

gccgttttcg ccactaattg taaacgcttt gcggagcaaa ttatgaagga aaaggatatt 1740

gaactgatat ttcaaaaaaa aatattcttt ccattagcac catggatttt gaaggccaaa 1800

tttttcttct tgaaatacca aaaaacttgg aatgaattga atctatctta tttggatcaa 1860

gatctggaat ttttattgat gtttccaatg cgtttggtaa aagatataat actaattcgc 1920

ctatcttacg cgaagaaaat acagaatcca accttgatga tgatcgatca aatgatggac 1980

gattttagta catatattaa gttggcagtc caaatgaaat tcactgttgc ttcttactgt 2040

aatgactggt tttttaaagt gaaaatcgat cccgaatttg atcataccgt tgttgaagga 2100

ttggaatatt ttttctccat tttggaactg agaatattat atagtggcaa aaactcattc 2160

aagacttcta aagaacctga tctgttatta aaatattggg aaatgtttag aaacgtcggc 2220

tattatattg atgatgcagg cgaactgatc gcagcagaat ttacgaagtt gacacttaga 2280

ttggttcaca gattgcacgc ttacctttta aggcagcaaa acactccgcc aaaattagag 2340

aatgaagctg ctgctgaaaa atggctggtg caaatattcg aaatacttgg atccatgaaa 2400

agaaaactca atagattcac caatattttg acaaaagcat ttcaaaattt tgtccgctac 2460

aagatagaag atcacaacta tctgctaaag caactaaaag aaacaggcca ctttcttata 2520

tacacaggag gttacctaga gcaaaatggt acttatttaa ttggtagccc agagctatta 2580

ggctgtaaag atgatgatat tttaagaatc attaagaatt cagacatcgg ttgtgattta 2640

gtgcctaagc tagaaattaa taacagtctg acaatttata atgctttgga tgataattgg 2700

aactccaact catcactggg ttcagatatc tcgaatgatg gtaccccatt ttattatatc 2760
aaaaacgatt tgaccaccca gcctagatct tataacggta atagagtcaa tcgtgaaccg 2820
gattttgaaa acagcaggag cacggaggaa gagttttatg aactggagac aagattgaac 2880
tctcttggtt atgtattggt attgactccg caagagccat tactttggga gggtgagatg 2940
tataatctat ccgataacaa aacaattaaa ccagagggat tgaacttgaa agtaattcct 3000
aattcaatag atttgatgtg ccaaggatcc agttatgcct tagaatacca atgtgacagg 3060
ttccaacaga tatctggtag ctcagtttct ttcttggaaa aaaaatcttc ctcagaaacg 3120

gttaaaaaca acttacaaag gataaataaa gcatatttca gatgcacgta cagtgttctg 3180
aagaactata caaagattgt gaccacgttc aagaaggtaa gtcctgtcaa tgatttattg 3240
aataatattt tccttttttgg gagggatttt ggtctgaact ttttgagaat taatgttgcc 3300
aacaatgaaa aaagatccat tataatactt ttaatgatgc ggttaagtat cggatggctg 3360
aagttcttag ctgaagactg tgatccgact gatcaaaggg tatttaggtg gtgtgtcacg 3420
tcaatggagt tcgcgatgca tatggtaagc ggttggaaca tactagctct tgatgaatgc 3480
caattttctt ctttaaaaca aaaaatttca gaatgcatgt cattacttat ttctcatttt 3540

gatataatag gcgcacgctc catagaagtt gagaaaatca atcaacaagc tagatcaaat 3600
cttgatttgg aagatgtgtt tgacgatgat atgatgctac aagtgaattc cgagttccga 3660
gtacaaagta taatggaatt ggaagaaagg ataaagcgga atcctcatca aactggtaaa 3720
gtaattgatg atagtgacaa aggtaacaag taccttgttt ctttggcatc ttccatatcg 3780
aacgtttcta tgagatggca aaagaggaac tttattggtg gcggtacttt tggaagggta 3840
tattctgctg ttgatttgga taatggtgag attttagcag tcaaggaaat caatattcaa 3900
gatagcaaat caatgcaaaa aatattcccc ttaatcaagg aggaaatgag tgtcttagag 3960

atattgaacc atccaaatat agtttcatat tacggtgttg aagttcatcg tgataaagtt 4020
aacatcttta tggaatattg tgaaggcggt tccctagcag ctcttttgga gcatggtcgt 4080
attgaagatg aaatggtcac tcaagtctac actttacaat tgctagaagg acttgcatat 4140
ttgcatgaat ccggcattgt tcaccgtgat gttaaacccg aaaacatcct actagatttt 4200
aatggtgtta ttaagtatgt tgattttggt gctgctaaaa aaattgctaa taatggaact 4260
agattggcaa gtatgaacaa aatcgaaaac gcagatggtg aacacgaaga tgttacccat 4320
gtttctgatt caaaggcagt gaaaaataac gaaaatgctc tattagacat gatgggaact 4380

cctatgtaca tggctccaga atccatcact ggatctacca ccaaaggcaa acttggggca 4440

gacgatgttt ggtcgttagg ctgcgtggta ttagaaatga tcactggtag acggccatgg 4500

gctaacttag ataatgaatg ggctatcatg taccatgttg ctgcaggaca taccccacaa 4560

ttccctacta aggatgaagt gtcgtctgct ggtatgaaat ttctggaaag atgtcttatt 4620

caaaacccct ccaagagagc cagtgcggtt gagctgttga tggatccttg gattgtacaa 4680

attagagaaa tagcctttgg cgacgattct tcctctacag atactgagga aagagag 4737

<210> 2

<211> 1104

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

atggaattgg acgaatgttt agaaaggcta tacaaggccc agttactacc tgaagtgact 60

gtaagggcac tctgctttaa gctgaaggaa atgctagtga aggagtcaaa cgtgattcac 120

attcagaccc ctgtcacagt cgtgggggat atgcatggac agtttcacga tatgctggag 180

atcttccaaa taggcggccc tgttcctgat acgaattatc tgttcttggg cgactatgta 240

gacaggggt tgtacagtgt ggaaacaatt atgctattga ttgtgcttaa gcttcgatat 300

cctagtagaa ttcatctttt gaggggaaac cacgagtcac gtcaaatcac gcagagctat 360

ggtttctaca cggagtgctt gaacaagtac ggtggcaatt caagagtttg gcaatatttg 420

acagatatat ttgactatct agtgttatgc tgtattatcg acgacgaaat tttttgtgtt 480

catggtgggc tctcgcccaa tgttcaaacc atagatcaga tcaagattat tgatagattt 540

cgagaaattc cacacgatgg cgccatggca gacttggttt ggtctgatcc ggaagaaaac 600

aataacccca cgttagatca tccagataac tctggacaac atttccaggt gtcacctcgt 660

ggagcaggtt atactttcgg aagaagcgtg gtggagaaat tcttacgtat gaacgatatg 720

aacagaatat acagagccca tcagttatgt aacgaaggtt accagatata ttttgatgga 780

ttggttacta ctgtatggtc ggcgccaaac tattgttatc ggtgcggcaa taaagcatct 840

attctggagc tgtatagtaa agatcaattc tacttcaacg ttttcgaaga ggcacctgaa 900

aataaactgt tgaaagagaa cagtatgaac gacaatgcct tagaagatag catatctaat 960

ccggtagcca acaggaaatt gattgcagat tatttcgaag acgactctgc ctccgcagat 1020

ggctccacgg accctgaaat gtacatattt tcagatgtat accaagccag atctgcttct 1080

aacagacatg ttgattactt cttg 1104

<210> 3

<211> 1579

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 3

Met Ser His Ser Asp Tyr Phe Asn Tyr Lys Pro Tyr Gly Asp Ser Thr
1 5 10 15

Glu Lys Pro Ser Ser Ser Lys Met Arg Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Arg Leu Arg Ser Glu Ser Leu Gly Arg Asn Ser Asn Thr Thr Gln
35 40 45

Ala Arg Val Ala Ser Ser Pro Ile Ser Pro Gly Leu His Ser Thr Gln
50 55 60

Tyr Phe Arg Ser Pro Asn Ala Val Tyr Ser Pro Gly Glu Ser Pro Leu
65 70 75 80

Asn Thr Val Gln Leu Phe Asn Arg Leu Pro Gly Ile Pro Gln Gly Gln
85 90 95

Phe Phe His Gln Asn Ala Ile Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ala Arg
100 105 110

Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asn Ile Gly Leu Pro Leu Pro Lys Asn Pro
115 120 125

Gln Gln Ser Leu Pro Lys Leu Ser Thr Gln Pro Val Pro Val His Lys

130 135 140

Lys Val Glu Ala Ser Lys Thr Glu Ser Glu Ile Ile Lys Lys Pro Ala
145 150 155 160

Pro Val Asn Ser Asn Gln Asp Pro Leu Leu Thr Thr Pro Thr Leu Val
165 170 175

Ile Ser Pro Glu Leu Ala Ser Leu Asn Thr Thr Asn Thr Ser Ile Met
180 185 190

Ser Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asn Gln Thr Ser Asn Lys His Ile Pro
195 200 205

Thr Arg Ser Gln Pro Asn Gly Ser Thr Ser Ser Ser Thr Leu Gln Asp

210 215 220

Ile Val Thr Thr Asn Ser Ser Gln Arg Ser Val Gly His His Gly Gly

225 230 235 240

Ser Thr Thr Ser Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Gln Tyr Val Leu Asn Glu

245 250 255

Gln Leu Tyr Leu Arg Lys Met Arg Asn Arg Ala Asn Asp Asp Tyr Tyr

260 265 270

Thr Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Asn Phe Glu Asp Asp Glu Glu Asn

275 280 285

Phe Ser Asn Lys Gly Glu Asp Asp Leu Glu Leu Glu Met Asp Asp Leu

290 295 300

Leu Lys Val Glu Gly Glu Asp Lys Asp Asn Asp Phe Asn Phe Gly Tyr

305 310 315 320

Asn Phe Ile Thr Ser Ser Thr Lys Asn Asn Glu Asn Val Val Ser Met

325 330 335

Ser Leu Asn Tyr Leu Lys Gly Lys Leu Asp Trp Leu Arg Asp Val Asn

340 345 350

Asn Asp Gln Pro Cys Glu Ile Glu Asp Glu Glu Trp His Ser Ile Leu

355 360 365

Gly Ser Glu Asp Leu Leu Ser Lys Leu Leu Gln Asn Pro Met Val Asn

370 375 380

Asn Arg Phe Glu Trp Gln Thr Met Leu Ser Lys Val Leu Lys Gly Asp

385 390 395 400

Ile Val Arg Asn Glu Lys Thr Lys Ile Ala Asn Gln Gly Lys Gly Pro

405 410 415

Gly Phe Asn Thr Gln Phe Ser Asp Asp Ile Trp Ile Glu Leu Lys Ala

420 425 430

Trp Met Asn Gly Arg Thr Val Glu Asp Gln Asn Lys Ser Leu Arg Ile

435 440 445

Phe Arg Asp Ser Thr Asp Ser Val Phe Gln Glu Ile Met Ala Phe Lys

450 455 460

Leu Glu Asp Asn Met Ser Ala Asp Glu Ala Ala Glu Thr Ile Lys Ser

465 470 475 480

Leu Val Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Leu Asn Leu Trp Pro Asn Ile Lys

485 490 495

Arg Met His Ala Glu Lys Pro Ile Thr Lys Thr Glu Ala Phe Arg Asn
500 505 510
Arg Ile Asp Thr Leu Asn Ser Trp Leu Asn Phe Lys Phe Asn Phe Asp
515 520 525
Thr Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Lys Trp Ile Val Gly Asn Lys Glu Leu
530 535 540
Glu Ser Thr Thr Glu Val Asp Asn Thr Thr Val Asn Leu Asp Asp Pro
545 550 555 560
Ala Val Phe Ala Thr Asn Cys Lys Arg Phe Ala Glu Gln Ile Met Lys

565 570 575
Glu Lys Asp Ile Glu Leu Ile Phe Gln Lys Lys Ile Phe Phe Pro Leu
580 585 590
Ala Pro Trp Ile Leu Lys Ala Lys Phe Phe Phe Leu Lys Tyr Gln Lys
595 600 605
Thr Trp Asn Glu Leu Asn Leu Ser Tyr Leu Asp Gln Asp Leu Glu Phe
610 615 620
Leu Leu Met Phe Pro Met Arg Leu Val Lys Asp Ile Ile Leu Ile Arg
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Ala Lys Lys Ile Gln Asn Pro Thr Leu Met Met Ile Asp
645 650 655
Gln Met Met Asp Asp Phe Ser Thr Tyr Ile Lys Leu Ala Val Gln Met
660 665 670
Lys Phe Thr Val Ala Ser Tyr Cys Asn Asp Trp Phe Phe Lys Val Lys
675 680 685
Ile Asp Pro Glu Phe Asp His Thr Val Val Glu Gly Leu Glu Tyr Phe
690 695 700
Phe Ser Ile Leu Glu Leu Arg Ile Leu Tyr Ser Gly Lys Asn Ser Phe

705 710 715 720
Lys Thr Ser Lys Glu Pro Asp Leu Leu Leu Lys Tyr Trp Glu Met Phe
725 730 735

Arg Asn Val Gly Tyr Tyr Ile Asp Asp Ala Gly Glu Leu Ile Ala Ala
740 745 750

Glu Phe Thr Lys Leu Thr Leu Arg Leu Val His Arg Leu His Ala Tyr
755 760 765

Leu Leu Arg Gln Gln Asn Thr Pro Pro Lys Leu Glu Asn Glu Ala Ala
770 775 780

Ala Glu Lys Trp Leu Val Gln Ile Phe Glu Ile Leu Gly Ser Met Lys
785 790 795 800

Arg Lys Leu Asn Arg Phe Thr Asn Ile Leu Thr Lys Ala Phe Gln Asn
805 810 815

Phe Val Arg Tyr Lys Ile Glu Asp His Asn Tyr Leu Leu Lys Gln Leu
820 825 830

Lys Glu Thr Gly His Phe Leu Ile Tyr Thr Gly Gly Tyr Leu Glu Gln
835 840 845

Asn Gly Thr Tyr Leu Ile Gly Ser Pro Glu Leu Leu Gly Cys Lys Asp

850 855 860

Asp Asp Ile Leu Arg Ile Ile Lys Asn Ser Asp Ile Gly Cys Asp Leu
865 870 875 880

Val Pro Lys Leu Glu Ile Asn Asn Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Ala Leu
885 890 895

Asp Asp Asn Trp Asn Ser Asn Ser Ser Leu Gly Ser Asp Ile Ser Asn
900 905 910

Asp Gly Thr Pro Phe Tyr Tyr Ile Lys Asn Asp Leu Thr Thr Gln Pro
915 920 925

Arg Ser Tyr Asn Gly Asn Arg Val Asn Arg Glu Pro Asp Phe Glu Asn
930 935 940

Ser Arg Ser Thr Glu Glu Glu Phe Tyr Glu Leu Glu Thr Arg Leu Asn
945 950 955 960

Ser Leu Gly Tyr Val Leu Val Leu Thr Pro Gln Glu Pro Leu Leu Trp
965 970 975

Glu Gly Glu Met Tyr Asn Leu Ser Asp Asn Lys Thr Ile Lys Pro Glu
980 985 990

Gly Leu Asn Leu Lys Val Ile Pro Asn Ser Ile Asp Leu Met Cys Gln

995 1000 1005

Gly Ser Ser Tyr Ala Leu Glu Tyr Gln Cys Asp Arg Phe Gln Gln Ile

1010 1015 1020

Ser Gly Ser Ser Val Ser Phe Leu Glu Lys Lys Ser Ser Ser Glu Thr

1025 1030 1035 1040

Val Lys Asn Asn Leu Gln Arg Ile Asn Lys Ala Tyr Phe Arg Cys Thr

1045 1050 1055

Tyr Ser Val Leu Lys Asn Tyr Thr Lys Ile Val Thr Thr Phe Lys Lys

1060 1065 1070

Val Ser Pro Val Asn Asp Leu Leu Asn Asn Ile Phe Leu Phe Gly Arg

1075 1080 1085

Asp Phe Gly Leu Asn Phe Leu Arg Ile Asn Val Ala Asn Asn Glu Lys

1090 1095 1100

Arg Ser Ile Ile Ile Leu Leu Met Met Arg Leu Ser Ile Gly Trp Leu

1105 1110 1115 1120

Lys Phe Leu Ala Glu Asp Cys Asp Pro Thr Asp Gln Arg Val Phe Arg

1125 1130 1135

Trp Cys Val Thr Ser Met Glu Phe Ala Met His Met Val Ser Gly Trp

1140 1145 1150

Asn Ile Leu Ala Leu Asp Glu Cys Gln Phe Ser Ser Leu Lys Gln Lys

1155 1160 1165

Ile Ser Glu Cys Met Ser Leu Leu Ile Ser His Phe Asp Ile Ile Gly

1170 1175 1180

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

1185 1190 1195 1200

Leu Asp Leu Glu Asp Val Phe Asp Asp Asp Met Met Leu Gln Val Asn

1205 1210 1215

Ser Glu Phe Arg Val Gln Ser Ile Met Glu Leu Glu Glu Arg Ile Lys

1220 1225 1230

Arg Asn Pro His Gln Thr Gly Lys Val Ile Asp Asp Ser Asp Lys Gly

1235 1240 1245

Asn Lys Tyr Leu Val Ser Leu Ala Ser Ser Ile Ser Asn Val Ser Met

1250 1255 1260

Arg Trp Gln Lys Arg Asn Phe Ile Gly Gly Gly Thr Phe Gly Arg Val

1265 1270 1275 1280

Tyr Ser Ala Val Asp Leu Asp Asn Gly Glu Ile Leu Ala Val Lys Glu

1285 1290 1295

Ile Asn Ile Gln Asp Ser Lys Ser Met Gln Lys Ile Phe Pro Leu Ile

1300 1305 1310

Lys Glu Glu Met Ser Val Leu Glu Ile Leu Asn His Pro Asn Ile Val

1315 1320 1325

Ser Tyr Tyr Gly Val Glu Val His Arg Asp Lys Val Asn Ile Phe Met

1330 1335 1340

Glu Tyr Cys Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Leu Glu His Gly Arg

1345 1350 1355 1360

Ile Glu Asp Glu Met Val Thr Gln Val Tyr Thr Leu Gln Leu Leu Glu

1365 1370 1375

Gly Leu Ala Tyr Leu His Glu Ser Gly Ile Val His Arg Asp Val Lys

1380 1385 1390

Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Phe Asn Gly Val Ile Lys Tyr Val Asp

1395 1400 1405

Phe Gly Ala Ala Lys Lys Ile Ala Asn Asn Gly Thr Arg Leu Ala Ser

1410 1415 1420

Met Asn Lys Ile Glu Asn Ala Asp Gly Glu His Glu Asp Val Thr His

1425 1430 1435 1440

Val Ser Asp Ser Lys Ala Val Lys Asn Asn Glu Asn Ala Leu Leu Asp

1445 1450 1455

Met Met Gly Thr Pro Met Tyr Met Ala Pro Glu Ser Ile Thr Gly Ser

1460 1465 1470

Thr Thr Lys Gly Lys Leu Gly Ala Asp Asp Val Trp Ser Leu Gly Cys

1475 1480 1485

Val Val Leu Glu Met Ile Thr Gly Arg Arg Pro Trp Ala Asn Leu Asp

1490 1495 1500

Asn Glu Trp Ala Ile Met Tyr His Val Ala Ala Gly His Thr Pro Gln
1505 1510 1515 1520
Phe Pro Thr Lys Asp Glu Val Ser Ser Ala Gly Met Lys Phe Leu Glu
1525 1530 1535
Arg Cys Leu Ile Gln Asn Pro Ser Lys Arg Ala Ser Ala Val Glu Leu
1540 1545 1550
Leu Met Asp Pro Trp Ile Val Gln Ile Arg Glu Ile Ala Phe Gly Asp
1555 1560 1565
Asp Ser Ser Ser Thr Asp Thr Glu Glu Arg Glu

1570 1575

<210> 4
<211> 368
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 4
Met Glu Leu Asp Glu Cys Leu Glu Arg Leu Tyr Lys Ala Gln Leu Leu
1 5 10 15
Pro Glu Val Thr Val Arg Ala Leu Cys Phe Lys Leu Lys Glu Met Leu
20 25 30
Val Lys Glu Ser Asn Val Ile His Ile Gln Thr Pro Val Thr Val Val
35 40 45
Gly Asp Met His Gly Gln Phe His Asp Met Leu Glu Ile Phe Gln Ile

50 55 60
Gly Gly Pro Val Pro Asp Thr Asn Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val
65 70 75 80
Asp Arg Gly Leu Tyr Ser Val Glu Thr Ile Met Leu Leu Ile Val Leu
85 90 95
Lys Leu Arg Tyr Pro Ser Arg Ile His Leu Leu Arg Gly Asn His Glu
100 105 110
Ser Arg Gln Ile Thr Gln Ser Tyr Gly Phe Tyr Thr Glu Cys Leu Asn
115 120 125

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

195 200 205
Asp Asn Ser Gly Gln His Phe Gln Val Ser Pro Arg Gly Ala Gly Tyr
210 215 220
Thr Phe Gly Arg Ser Val Val Glu Lys Phe Leu Arg Met Asn Asp Met
225 230 235 240
Asn Arg Ile Tyr Arg Ala His Gln Leu Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Ile
245 250 255
Tyr Phe Asp Gly Leu Val Thr Thr Val Trp Ser Ala Pro Asn Tyr Cys
260 265 270

Tyr Arg Cys Gly Asn Lys Ala Ser Ile Leu Glu Leu Tyr Ser Lys Asp
275 280 285
Gln Phe Tyr Phe Asn Val Phe Glu Glu Ala Pro Glu Asn Lys Leu Leu
290 295 300
Lys Glu Asn Ser Met Asn Asp Asn Ala Leu Glu Asp Ser Ile Ser Asn
305 310 315 320
Pro Val Ala Asn Arg Lys Leu Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Asp Asp Ser
325 330 335
Ala Ser Ala Asp Gly Ser Thr Asp Pro Glu Met Tyr Ile Phe Ser Asp

340 345 350
Val Tyr Gln Ala Arg Ser Ala Ser Asn Arg His Val Asp Tyr Phe Leu
355 360 365