

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 1월 2일 (02.01.2020)



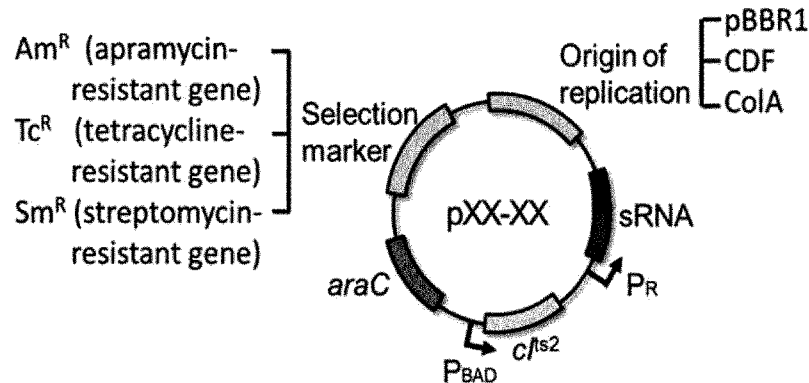
(10) 국제공개번호

WO 2020/004936 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/113* (2010.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01) *C12P 17/10* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/007729
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 26일 (26.06.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0073970 2018년 6월 27일 (27.06.2018) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이상엽 (LEE, Sang Yup); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 유승민 (YOO, Seung Min); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 양동수 (YANG, Dongsoo); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

(54) Title: MULTIPLEX TARGET GENE EXPRESSION INHIBITION SYSTEM BASED ON SYNTHESIS REGULATOR SRNA AND METHOD OF PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭: 합성조절 SRNA 기반 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템 및 그 제법



(57) Abstract: The present invention relates to a multiplex expression inhibition system based on a synthesis regulator sRNA and a method of producing same, and more specifically, to a combination of vectors comprising a variety of antibiotic-resistance genes, an origins of replication, and a synthesis regulator sRNA; a method of producing same; an sRNA library consisting of said combination of vectors; and a method of screening for a bacterial strain producing an useful substance by using same. The multiplex target gene expression inhibition system according to the present invention is a gene expression regulation system based on a synthesis regulator sRNA that, unlike existing gene knock-out methods, can effectively inhibit the expression of a specific gene without altering the sequence of a target gene; comprises various vectors and thus can be used compatibly with other plasmids usable in prokaryotes; and is designed to enable multiplex introduction, and thus is advantageous in a fast and efficient production of recombinant microorganisms. Furthermore, the present invention provides a technology that enables simple and fast transferring a genome-level synthesis regulation sRNA library to a new platform, and said technology is useful in selection of recombinant microorganisms producing useful substances in high capacity. Accordingly, the present invention is useful in the production of recombinant bacterial strains capable of dramatically increasing the production efficiency of a variety of medically useful metabolites.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 합성조절 sRNA 기반의 동시다중(multiplex) 표적유전자 발현억제 시스템 및 그 제법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 다양한 항생제 내성 유전자, 복제원점 및 합성조절 sRNA 를 포함하는 벡터의 조합 및 제법, 상기 벡터의 조합으로 구성된 sRNA 라이브러리 및 이를 이용한 유용물질 생산 균주의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템은 기존의 유전자 결실방법과는 달리 타겟 유전자의 서열을 변형하지 않으면서 특정 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 합성조절 sRNA 기반 유전자 발현조절 시스템으로서, 다양한 벡터를 포함하여 원핵생물에서 활용 가능한 다른 플라스미드들과 호환성 있게 사용될 수 있고 동시다중 도입이 가능하도록 설계하여 빠르고 효율적인 재조합 미생물 제조에 유용하다. 또한, 본 발명에서는 유전체 수준 합성 조절 sRNA 라이브러리를 간단하고 빠르게 새로운 플랫폼으로 이전할 수 있는 기술을 제공하며, 이는 유용물질을 고성능으로 생산하는 재조합 미생물 선별에 유용하다. 따라서, 본 발명은 산업적, 의학적으로 유용한 다양한 대사 산물의 생산 효율을 획기적으로 증가시킬 수 있는 재조합 균주의 제작에 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 합성조절 sRNA 기반 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템 및 그 제법

기술분야

- [1] 본 발명은 합성조절 sRNA 기반의 동시다중(multiplex) 표적유전자 발현억제 시스템 및 그 제법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 다양한 항생제 내성 유전자, 복제원점 및 합성조절 sRNA를 포함하는 벡터의 조합 및 제법, 상기 벡터의 조합으로 구성된 sRNA 라이브러리 및 이를 이용한 유용물질 생산 균주의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 전 세계적인 환경문제, 한정된 자원고갈, 친환경 에너지원에 대한 수요로 인해 재생산 가능한 생물체 기반의 세포 공장 구축에 대한 관심이 증가하고 있다. 이런 세포 공장은 세포 내의 대사회로 (metabolic network)를 목적대사산물 (바이오 에너지, 친환경 화학물질, 신약 제제 등) 생산에 최적화하여 제조할 수 있는데, 이 기술 과정에 다양한 분자생물학 기술이 요구되고 있다.
- [4] 생물체가 목적대사산물을 높은 효율로 생산하기 위해서는 대사 흐름의 최적화가 필수적이며, 이는 결국 필요한 효소의 발현을 최적화를 통해 가능하다. 반응이 빠르고 다량으로 일어나야 하는 경우 효소의 양이 많아야 하고, 반응성이 떨어지는 효소의 경우 반응속도 향상을 위해서는 다량으로 발현이 이루어져야 하며, 세포의 생존에는 필수적이거나 목적 산물의 생산을 저해하는 대사반응을 일으키는 효소의 발현은 낮은 수준으로 최적화를 해야 할 필요가 있다.
- [5] 최근 합성조절 sRNA 시스템들이 개발되고 이를 다양한 종류의 미생물에 적용함으로써 시스템적으로 대사회로상의 유전자들을 손쉽게 낙다운시킬 수 있게 되어 효율적인 유전자 발현 조절이 가능하게 되었다(KR 10-1575587 B1, US 9388417, EP 13735942.8, CN 201380012767.X, KR 10-1690780 B1, KR 10-1750855 B1, US 15317939, CN 201480081132.X, D. Na et al., Nat. Biotechnol. (2013), 31(2), 170-174, S.M. Yoo et al., Nat. Protoc. (2013), 8(9), 1694-707, C. Cho et al., Biotechnol. Bioeng. (2017), 11(2), 374-383, M. Noh et al., Cell Systems (2017), 5, 1-9).
- [6] 상기 기술은 낙아웃 기법을 포함한 기존의 게놈 기반 엔지니어링이 지닌 여러 단점 및 한계점들 (오랜 시간, 노동집약, 숙련된 기술 필요, 낮은 성공률 및 동시다발 대용량 실험의 어려움)을 획기적으로 극복한 기술로서, 소요되는 시간, 효율 및 대용량 실험 가능성을 모두 획기적으로 개선할 수 있었다(Datsenko et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), 97(12), 6640-6645). 또한, 기존의 유전자 결실 엔지니어링에서는 불가능하거나 어려웠던 생존 필수 유전자 (essential gene)에

대한 낙다운도 가능하여 시스템적인 적용을 통해 예상치 않게 타겟 화합물의 생산성을 증가시킬 수 있는 낙다운 목표 유전자의 발견도 가능하였다.

- [7] 이러한 장점들을 가지고 있는 합성조절 sRNA 시스템을 보다 다양한 균주 개발에 활용하기 위해서는 다양한 발현 플랫폼이 필수적이다. 만약, 합성조절 sRNA 발현 플랫폼내의 복제원점 또는 항생제 마커가 대사공학적으로 이미 개량된 균주 내에 존재하는 플라스미드의 복제원점 또는 항생제 마커와 동일하다면 sRNA 라이브러리 시스템을 바로 적용하기가 어렵기 때문이다. 따라서 기존의 합성 조절 sRNA 플랫폼 하에서는, 다양한 균주에 바로 적용이 어려웠고 상황에 따라 새롭게 클로닝을 진행해야 했다. 또한, 하나의 세포 내에 여러 유전자의 동시 낙다운 효과를 확인하기 위해서는 그에 해당하는 합성조절 sRNA 라이브러리를 한꺼번에 적용하는 것이 바람직하나, 이 라이브러리 내 복제원점과 항생제 마커가 모두 동일하기 때문에 이를 위해서는 하나의 플라스미드에 여러 합성조절 sRNA를 일일이 클로닝하는 추가적인 작업이 필요하다. 이 역시 상황에 따라 새로운 클로닝 작업이 필요하였으므로 경우에 따라 많은 시간이 소요되는 어려움이 있었다.
- [8] 이러한 한계들은 1) 자주 사용되는 대부분의 플라스미드들과 호환성 있고 동시다중 도입 가능한 다양한 합성조절 sRNA 발현 플랫폼을 개발하고 2) 대장균 유전체 수준의 합성조절 sRNA 라이브러리를 다양한 합성조절 sRNA 발현 플랫폼에 쉽고 간편하게 이전하는 기술이 개발된다면 극복 가능할 것이다. 이러한 기술들이 개발이 된다면, 보다 다양한 환경에서의 유전자 발현 조절이 가능하고, 더 나아가 보다 손쉽고 간편하게 빠른 시일 내에 유용한 화합물질을 효율적으로 생산할 수 있는 미생물 세포 공장 개발 역시 가능할 것이며, 합성조절 sRNA의 활용성을 극대화시킬 수 있을 것이다. 본 발명에서는 다양한 복제 원점 및 항생제 마커들을 선별하고 이들을 조합하여 기존의 벡터 사용에 있어서 호환성이 있는 합성조절 sRNA 발현 플라스미드들을 구축하였다.
- [9] 이에 본 발명자들은 다양한 합성조절 sRNA 발현 플랫폼을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 합성조절 sRNA 발현 벡터마다 항생제 내성 유전자 및 복제원점을 서로 달리하여 합성조절 sRNA 발현벡터를 깃슨 어셈블리(Gibson assembly), 골든게이트 어셈블리(golden gate assembly), 라이게이션(ligation), 상동재조합(homologous recombination), SLIC(sequence and ligation-independent cloning), SLiCE(seamless ligation cloning extract), CPEC(circular polymerase extension cloning) 또는 유전자 합성 방법을 이용하여 제조할 경우, 동시다중 표적유전자의 효율적인 발현억제가 가능할 뿐만 아니라, 대상 미생물의 성장에도 영향을 끼치지 않으며, 대상 미생물 내에서 안정성이 높은 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [10] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수

있다.

[11]

[12] 발명의 요약

[13] 본 발명의 목적은 합성조절 sRNA 기반의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 재조합 미생물 및 상기 시스템이 도입되어 있는 재조합 미생물을 이용한 트레오닌, 프롤린, 인디고 또는 비올라세린 생산능이 향상된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포 도입되어 있는 재조합 미생물로,

[15] 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적 유전자와 제p표적 유전자는 서로 각각 상이하며,

[16] n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,

[17] 상기 항생제는 앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라라시클린(oxytetracycline), 팩리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고,

[18] 상기복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,

[19] 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하는 것을 특징으로 하는

[20] 동시다중 표적 유전자 발현 억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

- [21] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 유용물질 생산균주의 개량방법을 제공한다:
- [22] (a) 20~50bp 크기를 가지는 임의의 염기서열을 제조하는 단계;
- [23] (b) 상기 염기서열을 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터의 표적유전자 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 삽입하여 제1 sRNA 라이브러리를 포함하는 제1벡터 라이브러리를 제조하는 단계;
- [24] (c) 상기 제1벡터 라이브러리를 유용물질을 생산하고자 하는 대상 균주에 도입하여, 유용물질 생산량이 향상되는 경우, 발현이 억제된 유전자 후보군을 동정하여, 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자로 결정하는 단계;
- [25] (d) 상기 결정된 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자를 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 상기 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터에 각각 삽입하는 단계; 및
- [26] (e) 상기 발현억제 대상 유전자를 포함하는 q개의 벡터가 도입된 제조합 균주를 제조하는 단계,
- [27] 여기서,
- [28] 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자는 서로 각각 상이하며,
- [29] n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, q는 2 내지 500의 정수인 것을 특징으로 함.
- [30] 본 발명은 또한, 트레오닌(Threonine) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에,
- [31] 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 제조합 미생물로,
- [32] 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며,
- [33] n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,
- [34] 상기 항생제는앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin),

- 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 팍리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고,
- [35] 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,
- [36] 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하고,
- [37] 상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 tktA, aroF, pta, ilvH, ilvE, glnA, fur 또는 chpA 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, tktA, aroF, pta, ilvH, ilvE, glnA fur 및 chpA로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있어 트레오닌 생산능력이 향상된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물을 제공한다.
- [38] 본 발명은 또한, 프롤린(proline) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에,
- [39] 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 제조합 미생물로,
- [40] 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며,
- [41] n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,
- [42] 상기 항생제는앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin),

- 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 팍리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고,
- [43] 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,
- [44] 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하고,
- [45] 상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 serC, murE, aspC, metB, fadR, fur 또는 chpA 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, serC, murE, aspC, metB, fadR, fur 및 chpA 로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있어 프롤린 생산능력이 향상된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물을 제공한다.
- [46] 본 발명은 또한, 상기 제조합 미생물을 트레이스 메탈 용액(trace metal solution)을 포함하는 배지에서 유가식 발효를 통해 배양하는 단계를 포함하는 프롤린 생산 방법을 제공한다.
- [47] 본 발명은 또한, 인디고(indigo) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 asnA, hisJ, yneH, napG, kdsA, ygfA, ftsI, aceF 또는 ostB 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, asnA, hisJ, yneH, napG, kdsA, ygfA, ftsI, aceF 및 ostB 로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 인디고 생산능력이 향상된 제조합 미생물을 제공한다.
- [48] 본 발명은 또한, 인디고(indigo) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에,
- [49] 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 제조합 미생물로,
- [50] 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며,
- [51] n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,
- [52] 상기 항생제는앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin),

- 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라라시클린(oxytetracycline), 팍리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고,
- [53] 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,
- [54] 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하고,
- [55] 상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 asnA, hisJ, yneH, napG, kdsA, ygfA, ftsI, aceF 또는 ostB 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, asnA, hisJ, yneH, napG, kdsA, ygfA, ftsI, aceF 및 ostB 로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있어 인디고 생산능력이 향상된 것을 특징으로 하는 재조합 미생물을 제공한다.
- [56] 본 발명은 또한, 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1 벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 재조합 미생물로,
- [57] 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며,
- [58] n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,
- [59] 상기 항생제는앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin),

- 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액티노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 팩리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고,
- [60] 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,
- [61] 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하는 것을 특징으로 하는
- [62] 동시다중 표적 유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물에서,
- [63] 상기 숙주세포는 비올라세인(violacein) 생합성 경로를 가지고,
- [64] 상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 ytfR, hybG, ampG, potG, caiF, minD, ilvM, yfbR, rfe, atpH, tiaE 또는 murI 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, ytfR, hybG, ampG, potG, caiF, minD, ilvM, yfbR, rfe, atpH, tiaE 및 murI로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 비올라세인/디옥시비올라세인 생산능력이 향상된 재조합 미생물을 제공한다.
- [65] 본 발명은 또한 상기 재조합 미생물을 트레이스 메탈 용액(trace metal solution)을 포함하는 배지에서 유가식 발효를 통해 배양하는 단계를 포함하는 비올라세인/디옥시비올라세인 생산 방법을 제공한다.
- [66] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 다중억제 유전자 조합의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [67] (a) 20 ~ 50bp 크기를 가지는 임의의 염기서열을 제조하는 단계;
- [68] (b) 상기 염기서열을 제1 항생제 내성 유전자; 제1 복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1 벡터; 내지 제n 항생제 내성 유전자; 제m 복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;의 표적유전자 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 삽입하여 제1 내지 제r sRNA 라이브러리를 포함하는 제1 내지 제r 벡터 라이브러리를 제조하는 단계; 및

- [69] (c) 상기 제1 내지 제r 벡터 라이브러리를 유용물질을 생산하고자 하는 대상 균주에 도입하여, 유용물질 생산량이 향상되는 경우, 발현이 억제된 유전자 후보군을 동정하여, s개의 발현억제 대상 유전자 조합을 결정하는 단계;
- [70] 여기서, 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하고,
- [71] n은 2 내지 50의 정수이며, m은 2 내지 10의 정수이고, q는 2 내지 500의 정수이며, p는 2 내지 20000의 정수이고, r 및 s는 2 내지 500의 정수임.

[72]

도면의 간단한 설명

- [73] 도 1은 다양한 합성조절 sRNA 발현 플랫폼 제작을 위해 사용된 각 복제 원점 및 항생제 마커들과 이들의 조합을 나타낸다.
- [74] 도 2는 (A) pACYC184-DsRed2 (pLac), (B) pTac15K-DsRed2 (pTrc), (C) pTrc99A-DsRed2 (pTac) 리포터 플라스미드에 대한 합성조절 sRNA 각 플랫폼의 DsRed2 형광단백질 낙다운 효율을 비교한 그래프들이다.
- [75] 도 3은 형광단백질 리포터 플라스미드를 보유하고 있는 대장균 균주에 합성조절 sRNA 발현 플랫폼 플라스미드들을 (a) 1개씩, (b) 2개씩, (c) 3개씩 조합으로 도입시킨 후 측정된 시간별 성장 곡선 그래프들이다. 이 때 리포터 플라스미드들은 pTac표기: pTac15K-dsRed2, pTrc표기: pTrc99A-dsRed2, pACYC로 표기: pACYC184-dsRed2로 표기되었다. 각 그래프는 세 가지 부분으로 나누어져 있는데 (푸른색, 회색, 붉은색 박스), 각각 앞에서부터 1일차, 2일차 (첫 번째 계대배양), 3일차 (두 번째 계대배양)을 나타낸다.
- [76] 도 4는 합성조절 sRNA 발현 플랫폼 플라스미드의 안정성 (stability)을 확인한 결과이다. 도 3의 실험에 사용된 균주들의 (a) 1일 차, (b) 2일 차, (c) 3일 차 계대 배양 후 colony PCR을 수행하여 균주내 sRNA 플랫폼 플라스미드들의 존재 유무를 확인하였다. 여기에서 A는 pACYC184-DsRed2 (pLac), R는 pTrc99A-DsRed2 (pTrc), T는 pTac15K-DsRed2 (pTac) 플라스미드를 나타내며, 1: ColA-Sm, 2: pBBR1-Am, 3: pBBR1-Tc, 4: pBBR1-Sm, 5: CDF-Tc, 6: CDF-Sm을 나타낸다. 대시로 연결된 조합은 해당 플라스미드들이 동시에 형질전환되었다는 것을 뜻한다. 또한, colony PCR은 각 플라스미드 상의 복제 원점을 타겟으로 수행되었으며, PCR 산물의 크기는 다음과 같다: pBBR1, 1 kb; ColA, 0.6 kb; CDF, 0.3 kb.
- [77] 도 5는 합성조절 sRNA 라이브러리 적용에 따른 트레오닌 생산량의 변화를 나타낸 그림이다.
- [78] 도 6은 도 5에서 트레오닌 생산 증가를 보인 합성조절 sRNA들의 이중 조합 적용을 통해 트레오닌 생산량 변화를 나타낸 그림이다.
- [79] 도 7은 합성조절 sRNA 라이브러리 적용에 따른 프롤린 생산량의 변화를 나타낸 그림이다.

- [80] 도 8은 도 7에서 프롤린 생산 증가를 보인 합성조절 sRNA들의 이중 조합 적용을 통해 프롤린 생산량 변화를 나타낸 그림이다.
- [81] 도 9는 프롤린 생산 균주의 유가식 발효 조건 최적화 과정을 통해 얻은 그래프들이다. NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur 균주를 사용하여 (a)는 기존 특허 및 논문에서의 발효 조건에서 (10 g/L glucose, 3 g/L (NH₄)₂SO₄ 첨가 2 L R/2 배지), (b)는 기존 배지에 1.6 g/L yeast extract 첨가하였을 때, (c)는 기존 배지에 3 g/L yeast extract를 첨가 및 기존 feeding 용액에 6 mL trace metal solution 첨가한 발효 조건에서 각각 유가식 발효를 진행하였다. (d)는 컨트롤 실험으로서, 기반 균주인 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA 균주를 (c)의 발효 조건에서 배양하였을 때의 결과를 나타낸다. 각 그래프들에서 붉은 색 원은 세포 성장(OD600)을, 푸른 색 삼각형은 프롤린 농도(g/L)를 나타낸다.
- [82] 도 10는 도 7에서 가장 높은 생산능을 보인 4종의 균주들 (단일 낙다운 적용)을 최적화된 발효 조건하에서 발효한 결과이다. (a)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur 균주, (b)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fadR 균주, (c)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-aspC 균주, (d)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-mazF 균주. 각 그래프들에서 붉은 색 원은 세포 성장을, 푸른 색 삼각형은 프롤린 농도를 나타낸다.
- [83] 도 11은 도 8에서 가장 높은 생산능을 보인 4종의 균주들 (이중 낙다운 조합 적용)을 최적화된 발효 조건하에서 발효를 수행한 결과이다. (a)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-metB 균주, (b)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-murE 균주, (c)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-chpA pColASm-fur 균주, (d)는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-chpA pColASm-fadR 균주. 각 그래프들에서 붉은 색 원은 세포 성장(OD600)을, 푸른 색 삼각형은 프롤린 농도(g/L)를 나타낸다.
- [84] 도 12는 발효를 수행한 모든 프롤린 생산 균주들의 exponential phase (E)와 stationary phase (S) 상태일 때 sRNA 플라스미드들의 보유 상태를 확인하기 위한 colony PCR 결과를 나타낸다. 이 때 균주 1부터 9까지는 표 2의 균주 번호와 동일하다. 이 때 붉은색 삼각형으로 표현된 위쪽 DNA 밴드는 ColA-Sm 플랫폼 기반 sRNA의 존재를, 아랫쪽 DNA 밴드는 CDF-Tc 플랫폼 기반 sRNA의 존재를 나타낸다.
- [85] 도 13은 대장균 유전체 수준의 합성조절 sRNA 라이브러리를 본 발명에서의 신규 sRNA 발현 플랫폼에 이전하고 이를 균주에 적용하여 스크리닝하는 방법을 나타낸 그림이다.
- [86] 도 14는 ColA-Sm 플랫폼 기반의 대장균 유전체 수준의 합성조절 sRNA 라이브러리를 인디고 생산 균주에 도입하고 색깔 스크리닝을 거쳐 균주들을

선별한 후 테스트 튜브에서 배양한 결과이다.

- [87] 도 15는 도 14에서 높은 생산량을 보인 9종의 균주들을 50 mL MR 배지가 담긴 플라스크에서 배양한 결과이다.
- [88] 도 16은 ColA-Sm 플랫폼 기반의 대장균 유전체 수준의 합성조절 sRNA 라이브러리를 비올라세인 생산 균주에 도입하고 색깔 스크리닝을 거쳐 균주들을 선별한 후 테스트 튜브에서 배양한 결과이다.
- [89] 도 17는 도 16에서 높은 생산량을 보인 12종의 균주들을 50 mL MR 배지가 담긴 플라스크에서 배양하고 (a)는 각 균주들의 생산량을 측정한 그래프이다. (b)는 배양 후 각 플라스크를 찍은 사진이다. 비올라세인/디옥시비올라세인을 고농도로 생산하는 균주일수록 더 짙은 색깔을 띠게 된다.
- [90] 도 18은 도 17에서 높은 비올라세인/디옥시비올라세인 생산능을 보이는 균주들을 유가식 발효한 결과이다. (a)는 E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주에 pColA-ytfR 플라스미드가 삽입된 균주, (b)는 E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주에 pColA-minD 플라스미드가 삽입된 균주. 각 그래프들에서 붉은 색 원은 세포 성장을, 푸른 색 삼각형은 비올라세인 농도를, 보라색 삼각형은 디옥시비올라세인 농도를 나타낸다. (a)와 (b)에서 붉은색 화살표는 IPTG에 의해 유도된 시점을 나타낸다. (c)는 발효를 수행한 모든 비올라세인 생산 균주들의 exponential phase (E)와 stationary phase (S) 상태일 때 sRNA 플라스미드들의 보유 상태를 확인하기 위한 colony PCR 결과를 나타낸다. 이 때 균주 1: 대조균 균주, 균주 2: (a)의 균주, 균주 3: (b)의 균주. 이 때 붉은색 삼각형으로 표현된 DNA 밴드는 ColA-Sm 플랫폼 기반 sRNA의 존재를 나타낸다.
- [91] 도 19는 각 균주에서의 합성 조절 sRNA 발현 플라스미드들의 안정성 테스트 결과로서, 두 종류의 리포터 플라스미드들인 pTac15K-DsRed2 ("Tac")과 pTrc99A-DsRed2 ("Trc")를 각각 보유하고 있는 두 대장균 W3110 균주들에 (A)-(F) 단일, (G)-(M) 이중, (N) 삼중 조합의 해당 sRNA 플라스미드들을 형질전환하여 성장곡선을 측정한 그래프이다. 이 때 각 sRNA들은 표적 부차서열을 포함하고 있지 않다. 각 실험은 두 번씩 행해져 그 평균을 나타내었다.
- [92]
- [93] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [94] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [95]
- [96] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [97] 본원에서 "sRNA (small RNA)"란, 단백질로 번역되지 않으며 상보적 결합을 통해 특정 mRNA의 번역을 효과적으로 억제하는, 보통 염기 서열의 길이가

200개 이하의 짧은 길이의 RNA이다.

- [98] 본원에서 "리보솜 결합 부위(ribosome binding site)"란, mRNA의 전사를 위하여 리보솜이 mRNA상에 결합하는 부위를 말한다.
- [99] 본원에서 "유전자"란 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 구조 단백질 또는 조절 단백질을 암호화할 수 있다. 이때, 조절단백질은 전사인자, 열 충격단백질 또는 DNA/RNA 복제, 전사 및/또는 번역에 관여하는 단백질을 포함한다. 본 발명에 있어서, 발현 억제 대상이 되는 표적유전자는 염색체 외 구성요소로서 존재할 수 있다.
- [100]
- [101] 본 발명에서는 다양한 종류의 원핵생물에 적용가능하고, 동시에 다수의 표적유전자 발현을 억제할 수 있는 합성조절 sRNA 기반의 발현 조절 시스템을 개발하고자 하였다.
- [102] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 서로 공존 가능한 세 가지 항생제 마커(아프라마이신, 스트렙토마이신(또는 스펙티도마이신) 및 테트라사이클린)와 서로 공존 가능한 세 가지 복제원점(CDF, pBBR1 및 ColA)을 각각 독립적으로 포함하고, DsRed2 mRNA의 RBS와 상보적으로 결합하도록 하는 sRNA를 깬 어셈블리(Gibson assembly), 골든게이트 어셈블리(golden gate assembly), 라이게이션(ligation), 상동재조합(homologous recombination), SLIC(sequence and ligation-independent cloning), SLiCE(seamless ligation cloning extract), CPEC(circular polymerase extension cloning) 또는 유전자 합성으로 조합하여 총 9가지 종류의 DsRed2 발현 억제용 합성조절 sRNA 발현 벡터를 제작한 다음(도 1), 대장균에 리포터 플라스미드와 함께 도입하여 배양할 경우, 3 종류의 합성조절 sRNA 발현 벡터가 도입되더라도, 대장균의 생장이나, 발현 벡터의 안정성에 아무런 문제가 없다는 것을 확인하였다(도 2 내지 도 4).
- [103] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템으로, 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며, n은 2 내지 50의 정수인 것을 특징으로 하고, m은 2 내지 10의 정수인 것을 특징으로 하며, q는 2 내지 500의 정수인 것을 특징으로 하고, p는 2 내지 20000의 정수인 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템에 관한 것이다.
- [104] 본 발명에서 상기 p는 표적유전자의 개수를 의미하며, 표적유전자는 벡터의 종류와 상관없이 모든 유전자를 표적유전자로 할 수 있기 때문에 2 내지 20000의 정수 범위를 포함할 수 있다.
- [105] 본 발명에 있어서, 상기 항생제는 원핵생물의 사멸을 유도하는 항생제이던

제한없이 이용가능하나, 바람직하게는 앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액티노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라라시클린(oxytetracycline), 팩리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 벤코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[106] 본 발명에 있어서, 상기 복제원점은 원핵생물의 내부로 도입된 플라스미드의 복제를 시작할 수 있는 서열이면 제한없이 이용가능하나, 바람직하게는 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2 으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[107] 본 발명에 있어서, 상기 원핵생물은 sRNA를 발현할 수 있는 원핵생물이면 제한없이 이용가능하나, 바람직하게는 대장균, 리조비움(Rhizobium), 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 로도코커스 (Rhodococcus), 칸디다 (Candida), 에르위니아(Erwinia), 엔테로박터 (Enterobacter), 파스테렐라(Pasteurella), 맨하이미아 (Mannheimia), 액티노바실러스 (Actinobacillus), 아그레가티박터(Aggregatibacter), 잔토모나스(Xanthomonas), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스(Pseudomonas), 아조토박터(Azotobacter), 애시네토박터(Acinetobacter), 랄스토니아(Ralstonia), 아그로박테리움(Agrobacterium), 로도박터(Rhodobacter), 자이모모나스(Zymomonas), 바실러스(Bacillus), 스테필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 클로스트리디움(Clostridium), 코리네박테리움(Corynebacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 사이아노박테리움(cyanobacterium) 및 사이클로박테리움(Cyclobacterium)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[108]

- [109] 본 발명에 있어서, 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [110] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 sRNA의 발현을 유도할 수 있는 모든 종류의 프로모터가 이용가능하며, 바람직하게는 tac, trc, T7, BAD, λPR 및 앤더슨 합성 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [111] 본 발명에 있어서, 상기 Hfq 결합부위는 바람직하게는 MicC 유래인 것을 특징으로 할 수 있고, 가장 바람직하게는 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [112] 본 발명에 있어서, 상기 터미네이터는 sRNA의 전사를 종료할 수 있는 모든 종류의 터미네이터가 이용가능하며, 바람직하게는 T1/TE 터미네이터일 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [113] 본 발명에 있어서, 상기 표적유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역은 표적유전자에 따라 상보적 결합을 형성할 수 있는 최소한의 길이이면 족하며, 예시로서 20 염기 이상 50 염기 이하, 바람직하게는 19 염기 이상 37 염기 이하인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [114] 본 발명에 있어서, 상기 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역은 표적 유전자 mRNA의 리보솜 결합 부위 (Ribosome binding site) 또는 개시 코돈으로 시작하는 단백질 코딩 서열과 전체적으로 또는 부분적으로 상보적 결합을 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [115] 본원에서 "상보적 결합"이란, 핵산서열간 서로 염기 짝짓기(basepairing)하는 것을 의미하며, 표적유전자의 mRNA의 일부 영역과 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역의 서열이 약 70-80% 이상, 바람직하게는 약 80-90% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 95-99% 이상 서로 상보적인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [116]
- [117] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수

개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 원점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단 부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다. 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, et al., EMBO J., 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 sRNA의 발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있다.

- [118] 본 발명에서 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[119]

- [120] 본 발명에 있어서, 상기 표적유전자는 원핵생물 내에 존재하거나, 도입될 수 있으면 제한없이 이용가능하며, 바람직하게는 DsRed2, LuxR, AraC, KanR (kanamycin resistance gene), tyrR(tyrosine regulator), ppc (phosphoenolpyruvate carboxylase), csrA (carbon storage regulator), pgi (glucose-6-phosphate isomerase), glt (citrate synthase), accA (acetyl-CoA carboxyltransferase, alpha-subunit), accB (biotinylated biotin-carboxyl carrier protein), accC (acetyl-CoA carboxylase), accD (acetyl-CoA carboxyltransferase, beta-subunit), aceE (subunit of E1p component of pyruvate dehydrogenase complex), aceF (pyruvate dehydrogenase), ackA (propionate kinase / acetate kinase activity), adiY (AdiY is a positive DNA-binding transcriptional regulator that controls the arginine) decarboxylase (adi) system), argB (acetylglutamate

kinase), argC (N-acetylglutamylphosphate reductase), argG (argininosuccinate synthase), argH (argininosuccinate lyase), asnC (transcriptional regulator that activates the expression of asnA, a gene involved in the synthesis of asparagine), aspA (aspartate ammonia-lyase), crp (CRP transcriptional dual regulator), csiD (predicted protein. CsiD is the product of a gene induced by carbon starvation), csiR (DNA-binding transcriptional repressor), cytR (transcription factor required for transport and utilization of ribonucleosides and deoxyribonucleosides), dcuA (The DcuA transporter is one of three transporters known to be responsible for the uptake of C4-dicarboxylates such as fumarate under anaerobic conditions), deoB (phosphopentomutase), deoC (deoxyribose-phosphate aldolase), deoR (The transcriptional repressor DeoR, for "Deoxyribose Regulator," is involved in the negative expression of genes related to transport and catabolism of deoxyribonucleoside nucleotides), fabH (KASIII, -ketoacyl-ACP synthases), fadD (fatty acyl-CoA synthetase), fadR (FadR Fatty acid degradation Regulon, is a multifunctional dual regulator that exerts negative control over the fatty acid degradative regulon [Simons80, Simons80a] and acetate metabolism), fbp (fructose-1,6-bisphosphatase), fnr (FNR is the primary transcriptional regulator that mediates the transition from aerobic to anaerobic growth), fruR (FruR is a dual transcriptional regulator that plays a pleiotropic role to modulate the direction of carbon flow through the different metabolic pathways of energy metabolism, but independently of the CRP regulator), ftsL (essential cell division protein FtsL), ftsQ (essential cell division protein FtsQ), ftsW (essential cell division protein FtsW), ftsZ (essential cell division protein FtsZ), fur (Fur-Fe²⁺ DNA-binding transcriptional dual regulator), gabD (succinate semialdehyde dehydrogenase, NADP⁺-dependent), gabP (APC transporter), gabT (4-aminobutyrate aminotransferase), gadA (glutamate decarboxylase A subunit), gadB (glutamate decarboxylase B subunit), gadC (GABA APC transporter), glcC (GntR family transcriptional regulator, glc operon transcriptional activator), glpK (glycerol kinase), glpR (sn-Glycerol-3-phosphate repressor), glpX (fructose 1,6-bisphosphatase II), gltA (citrate synthase), hflD (lysogenization regulator), ihfA (IHF, Integration host factor, is a global regulatory protein), ihfB (IHF, Integration host factor, is a global regulatory protein), ilvB (acetohydroxybutanoate synthase/acetolactate synthase), ilvC (acetohydroxy acid isomeroreductase), ilvD (dihydroxy acid dehydratase), ilvG_1 (acetolactate synthase II, large subunit, N-ter fragment (pseudogene)), ilvG_2 (acetolactate synthase II, large subunit, C-ter fragment (pseudogene)), ilvH (acetolactate synthase/acetohydroxybutanoate synthase), ilvL (ilvGEDA operon leader peptide), ilvM (acetohydroxybutanoate synthase/acetolactate synthase), ilvN (acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase), ilvX (Predicted small

protein), *lexA* (*LexA* represses the transcription of several genes involved in the cellular response to DNA damage), *lpxC* (UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase), *marA* (*MarA* participates in controlling several genes involved in resistance to antibiotics, oxidative stress, organic solvents and heavy metals.), *metJ* (*MetJ* transcriptional repressor), *modE* (*ModE* is the principal regulator that controls the transcription of operons involved in the transport of molybdenum and synthesis of molybdoenzymes and molybdate-related functions), *nadB* (L-aspartate oxidase), *narL* (nitrate/nitrite response regulator), *pck* (phosphoenolpyruvate carboxykinase), *PdhR* (*PdhR*, "pyruvate dehydrogenase complex regulator," regulates genes involved in the pyruvate dehydrogenase complex), *phoP* (*PhoP*-Phosphorylated DNA-binding transcriptional dual regulator. Member of the two-component regulatory system *phoQ/phoP* involved in adaptation to low Mg^{2+} environments and the control of acid resistance genes), *pnuC* (*PnuC* NMN transporter), *ppsA* (phosphoenolpyruvate synthetase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *purA* (adenylosuccinate synthetase), *purB* (adenylosuccinate lyase), *purR* (*PurR* Hypoxanthine DNA-binding transcriptional repressor. *PurR* dimer controls several genes involved in purine nucleotide biosynthesis and its own synthesis), *puuE* (4-aminobutyrate aminotransferase), *rbsA* (ribose ABC transporter), *rbsB* (ribose ABC transporter), *rbsD* (ribose pyranase), *rbsK* (ribokinase), *rbsR* (The transcription factor *RbsR*, for "Ribose Repressor," is negatively autoregulated and controls the transcription of the operon involved in ribose catabolism and transport), *rbsB* (*RcsB*-*BglJ* DNA-binding transcriptional activator. *RcsB* protein for "Regulator capsule synthesis B," is a response regulator that belongs to the multicomponent *RcsF/RcsC/RcsD/RcsA-RcsB* phosphorelay system and is involved in the regulation of the synthesis of colanic acid capsule, cell division, periplasmic proteins, motility, and a small RNA), *rutR* (*RutR* regulates genes directly or indirectly involved in the complex pathway of pyrimidine metabolism), *serA* (alpha-ketoglutarate reductase / D-3-phosphoglycerate dehydrogenase), *serC* (phosphohydroxythreonine aminotransferase / 3-phosphoserine aminotransferase), *soxS* (dual transcriptional activator and participates in the removal of superoxide and nitric oxide), *sroD* (*SroD* small RNA), *zwf* (glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase), *asnA* (asparagine synthetase A), *asnB* (asparagine synthetase B), *carA* (carbamoyl phosphate synthetase), *carB* (carbamoyl phosphate synthetase), *ddlB* (D-alanine-D-alanine ligase B), *deoA* (thymidine phosphorylase / uracil phosphorylase), *deoD* (purine nucleoside phosphorylase *deoD*-type), *dpiA* (dual transcriptional regulator involved in anaerobic citrate catabolism), *fis* (*Fis*, "factor for inversion stimulation", is a small DNA-binding and bending protein whose main role appears to be the organization and maintenance of nucleoid structure), *gadE* (*GadE* controls the transcription of genes involved in glutamate dependent system), *gadW*

(GadW controls the transcription of genes involved in glutamate dependent system), gadX (GadX controls the transcription of genes involved in glutamate dependent system), glpF (GlpF glycerol MIP channel), ilvY (IlvY DNA-binding transcriptional dual regulator), ivbL (The ilvB operon leader peptide (IvbL)), lhgO (L-2-hydroxyglutarate oxidase), lpd (Lipoamide dehydrogenase), lrp (Lrp is a dual transcriptional regulator for at least 10% of the genes in Escherichia coli. These genes are involved in amino acid biosynthesis and catabolism, nutrient transport, pili synthesis, and other cellular functions, including 1-carbon metabolism), metB (O-succinylhomoserine lyase / O-succinylhomoserine(thiol)-lyase), metL (aspartate kinase / homoserine dehydrogenase), mraY (phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase), mraZ (Unknown function), murE (UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate 2,6-diaminopimelate ligase), murF (D-alanyl-D-alanine-adding enzyme), murG (N-acetylglucosaminyl transferase), nac (Nac regulates, without a coeffect, genes involved in nitrogen metabolism under nitrogen-limiting conditions), nadA (quinolinate synthase), nsrR (NsrR, the "nitritesensitive repressor" regulates genes involved in cell protection against nitric oxide (NO)), panC (pantothenate synthetase), panD (Aspartate 1-decarboxylase), pgl (6-phosphogluconolactonase), pyrB (aspartate carbamoyltransferase, PyrB subunit), pyrC (dihydroorotase), pyrL (aspartate carbamoyltransferase, PyrI subunit), rob (Rob is a transcriptional dual regulator. Its N-terminal domain shares 49% identity with MarA and SoxS. These proteins activate a common set of about 50 target genes, the marA/soxS/rob regulon, involved in antibiotic resistance, superoxide resistance, and tolerance to organic solvents and heavy metals.) , rpe (ribulose phosphate 3-epimerase), talA (transaldolase A), thrA (aspartate kinase / homoserine dehydrogenase), thrB (homoserine kinase), thrC (threonine synthase), thrL (thr operon leader peptide), tktA (transketolase I), tktB (transketolase II), torR (two-component system, OmpR family, torCAD operon response regulator TorR), aroF (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, tyrosine-repressible), aroA (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase), aroC (Chorismate synthase), pheA (chorismate mutase and prephenate dehydratase, P-protein), trpD (fused glutamine amidotransferase (component II) of anthranilate synthase/anthranilate phosphoribosyl transferase), dapA (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase), ilvE (Branched-chain-amino-acid aminotransferase), lysA (Diaminopimelate decarboxylase), gltA (citrinate synthase), fumA (Fumarate hydratase class I, aerobic), glnA (glutamine synthetase), mdh (malate dehydrogenase), gdhA (NADP-specific glutamate dehydrogenase), argA (amino acid N-acetyltransferase and inactive acetylglutamate kinase), metA (Homoserine O-succinyltransferase), tdh (L-threonine dehydrogenase), livJ (branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic binding

protein), rhtC (Threonine efflux protein), yohJ (UPF0299 membrane protein), chpA (antitoxin of the ChpA-ChpR toxin-antitoxin system), aspC (aspartate aminotransferase), pfkA (ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1), parE (DNA topoisomerase 4 subunit B), ytfR (predicted sugar transporter subunit), ilvA (L-threonine dehydratase, biosynthetic; also known as threonine deaminase), ilvG (Acetolactate synthase), minD (inhibitor of FtsZ ring polymerization; chromosome-membrane tethering protein; membrane ATPase of the MinCDEE system), hisJ (histidine transport system substrate-binding protein), yneH (Glutaminase), napG (Ferredoxin-type protein NapG), kdsA (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase), ygfA (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase), ftsI (cell division protein FtsI (penicillin-binding protein 3)), ostB (trehalose 6-phosphate phosphatase), hybG (hydrogenase expression/formation protein HypC), ampG (MFS transporter, PAT family, beta-lactamase induction signal transducer AmpG), potG (spermidine/putrescine transport system permease protein), caiF (transcriptional activator CaiF), yfbR (5'-deoxynucleotidase YfbR), rfe (UDP-GlcNAc:undecaprenyl-phosphate/decaprenyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase), atpH (F-type H⁺-transporting ATPase subunit delta), tiaE (glyoxylate/hydroxypyruvate/2-ketogluconate reductase) 및 murI (Glutamate racemase)로 구성된 군에서 선택될 수 있으며,

- [121] 더욱 바람직하게는 zwf (glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase), tktA (transketolase I), tktB (transketolase II), pgi (glucose-6-phosphate isomerase, fbp (fructose-1,6-bisphosphatase), serC (phosphohydroxythreonine aminotransferase / 3-phosphoserine aminotransferase), murE (UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate 2,6-diaminopimelate ligase), pps (phosphoenolpyruvate synthetase), aceE (subunit of E1p component of pyruvate dehydrogenase complex), pta (Phosphate acetyltransferase), purA (adenylosuccinate synthetase), ackA (propionate kinase / acetate kinase activity), pck (phosphoenolpyruvate carboxykinase), ppc (phosphoenolpyruvate carboxylase), accA (acetyl-CoA carboxyltransferase, alpha-subunit), fadD (fatty acyl-CoA synthetase), fabH (KASIII, -ketoacyl-ACP synthases), aspA (aspartate ammonia-lyase), carB (carbamoyl phosphate synthetase), ilvH (acetolactate synthase/acetohydroxybutanoate synthase), ilvM (acetohydroxybutanoate synthase/acetolactate synthase), ilvN (acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase), ilvC (acetohydroxy acid isomeroeductase), asnA (asparagine synthetase A), asnB (asparagine synthetase B), argH (argininosuccinate lyase), deoA (thymidine phosphorylase / uracil phosphorylase), thrA (aspartate kinase / homoserine dehydrogenase), metB (O-succinylhomoserine lyase / O-succinylhomoserine(thiol)-lyase), metA, tdh, ilvL (ilvGEDA operon leader peptide), crp (CRP transcriptional dual regulator), fadR (FadR Fatty acid degradation Regulon,

is a multifunctional dual regulator that exerts negative control over the fatty acid degradative regulon [Simons80, Simons80a] and acetate metabolism), fur (Fur-Fe+2 DNA-binding transcriptional dual regulator), lrp (Lrp is a dual transcriptional regulator for at least 10% of the genes in *Escherichia coli*. These genes are involved in amino acid biosynthesis and catabolism, nutrient transport, pili synthesis, and other cellular functions, including 1-carbon metabolism), gltA (citrate synthase), pdhR (PdhR, "pyruvate dehydrogenase complex regulator," regulates genes involved in the pyruvate dehydrogenase complex), tyrR (tyrosine regulator), csrA (carbon storage regulator), lexA (LexA represses the transcription of several genes involved in the cellular response to DNA damage), aroF (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, tyrosine-repressible), aroA (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase), aroC (Chorismate synthase), pheA (chorismate mutase and prephenate dehydratase, P-protein), trpD (fused glutamine amidotransferase (component II) of anthranilate synthase/anthranilate phosphoribosyl transferase), dapA (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase), ilvE (Branched-chain-amino-acid aminotransferase), lysA (Diaminopimelate decarboxylase), gltA (citrate synthase), fumA (Fumarate hydratase class I, aerobic), glnA (glutamine synthetase), mdh (malate dehydrogenase), gdhA (NADP-specific glutamate dehydrogenase), argA (amino acid N-acetyltransferase and inactive acetylglutamate kinase), metA (Homoserine O-succinyltransferase), tdh (L-threonine dehydrogenase), livJ (branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic binding protein), rhtC (Threonine efflux protein), yohJ (UPF0299 membrane protein), chpA (antitoxin of the ChpA-ChpR toxin-antitoxin system), aspC (aspartate aminotransferase), pfkA (ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1), parE (DNA topoisomerase 4 subunit B), ytfR (predicted sugar transporter subunit), ilvA (L-threonine dehydratase, biosynthetic; also known as threonine deaminase), ilvG (Acetolactate synthase), minD (inhibitor of FtsZ ring polymerization; chromosome-membrane tethering protein; membrane ATPase of the MinCDEE system), hisJ (histidine transport system substrate-binding protein), yneH (Glutaminase), napG (Ferredoxin-type protein NapG), kdsA (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase), ygfA (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase), ftsI (cell division protein FtsI (penicillin-binding protein 3)), ostB (trehalose 6-phosphate phosphatase), hybG (hydrogenase expression/formation protein HypC), ampG (MFS transporter, PAT family, beta-lactamase induction signal transducer AmpG), potG (spermidine/putrescine transport system permease protein), caiF (transcriptional activator CaiF), yfbR (5'-deoxynucleotidase YfbR), rfe (UDP-GlcNAc:undecaprenyl-phosphate/decaprenyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase), atpH (F-type H⁺-transporting ATPase subunit delta), tiaE (glyoxylate/hydroxypyruvate/2-ketogluconate reductase) 및 murI (Glutamate

racemase)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[122]

[123] 본 발명은 또한, 제1항생제 내성 유전자를 코딩하는 제1핵산 조각; 제1복제원점을 코딩하는 제2핵산 조각; 및 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 코딩하는 제3핵산 조각을 집는 어셈블리(Gibson assembly), 골든게이트 어셈블리(golden gate assembly), 라이게이션(ligation), 상동재조합(homologous recombination), SLIC(sequence and ligation-independent cloning), SLiCE(seamless ligation cloning extract), CPEC(circular polymerase extension cloning) 또는 유전자 합성으로 연결하는 단계를 포함하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제조방법에 관한 것이다.

[124] 본 발명은 또한, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[125] 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

[126] 본 발명은 또한, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템을 원핵생물 내로 도입하거나, 원핵생물 내에서 발현시키는 단계; 및 표적 유전자의 mRNA 발현을 억제하는 단계를 포함하는 표적유전자의 동시다중 발현억제 방법에 관한 것이다.

[127] 본 발명은 또한, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템을 포함하는 표적유전자의 동시다중 발현억제용 조성물에 관한 것이다.

[128]

[129] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 20 염기 내지 50 염기를 가지는 임의의 염기서열을 제조하는 단계; (b) 상기 염기서열을 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제1벡터의 표적유전자 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 삽입하여 제1 sRNA 라이브러리를 포함하는 제1벡터 라이브러리를 제조하는 단계; (c) 상기 제1벡터 라이브러리를 유용물질을 생산하고자 하는 대상 균주에 도입하여, 유용물질 생산량이 향상되는 경우, 발현이 억제된 유전자 후보군을 동정하여, 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자로 결정하는 단계; (d) 상기 결정된 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자를 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제q 벡터에 각각 삽입하는 단계; 및 (e) 상기 발현억제 대상 유전자를 포함하는 q개의 벡터가 도입된 재조합 균주를 제조하는 단계; 여기서, q는 2 내지 500의 정수인 것을 특징으로 하는 유용물질 생산 균주의 개량방법에 관한 것이다.

[130]

[131] 또한, 당업자는 본 발명의 방법을 통해, (a) 20 염기 내지 50 염기를 가지는 임의의 염기서열을 제조하는 단계; (b) 상기 임의의 염기서열을 상기 동시다중

표적유전자 발현억제 시스템의 제1 벡터 내지 제q 벡터의 표적유전자 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 삽입하여 제1 내지 제r sRNA 라이브러리를 포함하는 제1 내지 제r 벡터 라이브러리를 제조하는 단계; (c) 상기 제1 내지 제r 벡터 라이브러리를 유용물질을 생산하고자 하는 대상 균주에 도입하여 유용물질 생산량이 향상되는 경우, 발현이 억제된 유전자 후보군을 동정하여 s개의 발현억제 대상 유전자 조합을 결정하는 단계를 포함하는 유용물질 생산 균주의 개량방법 역시 자명하게 도출할 수 있으며, 이를 기반으로 한 유용물질 생산 균주의 개량방법 역시 자명하게 도출할 수 있다.

[132] 여기서, q, r 및 s는 2 내지 500의 정수인 것을 특징으로 할 수 있다.

[133] 이는 동시에 다수의 라이브러리를 스크리닝하여 가장 효과가 좋은 유전자 조합을 복잡한 단계 없이 한 번의 스크리닝으로 바로 도출할 수 있어 기존의 유전자 회로 개선방법을 획기적으로 개량할 수 있다는 것을 의미한다.

[134]

[135] 한편 본 발명에서는 기존의 대사공학적으로 개량되어 플라스미드가 도입된 개조된 원핵생물에 본 발명에 따른 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템을 추가로 도입하여, 목적 물질의 생산량을 더욱 향상시킬 수 있을지를 확인하고자 하였다.

[136] 즉 본 발명의 다른 실시예에서는 기존 트레오닌 생산 연구에서 트레오닌 생산 경로를 강화시키고, 트레오닌 생산 경로상의 효소들이 생산물에 의한 활성 저해를 받지 않도록 피드백 저항성 효소로 개량을 함과 더불어 트레오닌 트랜스포터를 과발현한 균주(TH28C-pBRThrABCR3, KH Lee et al., Mol. Syst. Biol. 2007, 3(149))에, 본 발명에서 제작한 sRNA 라이브러리를 처리한 결과, 트레오닌 생산량을 추가로 증가시키는 8개의 유전자를 발굴하였으며(도 5), 이들의 조합을 통해 가장 트레오닌 생산능의 향상이 뛰어난 유전자 조합을 발굴하여, 30% 이상의 트레오닌 증산이 가능한 것을 확인하였다(도 6).

[137] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 트레오닌(Threonine) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 tktA, aroF, pta, ilvH, ilvE, glnA, fur 또는 chpA 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, tktA, aroF, pta, ilvH, ilvE, glnA fur 및 chpA로 구성된 균에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 트레오닌 생산능력이 향상된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[138] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 lacI(lactose operon repressor), metA(Homoserine O-succinyltransferase), lysA(Diaminopimelate decarboxylase), tdh(L-threonine dehydrogenase), iclR(AceBAK operon repressor) 및 tdcC(Threonine/serine transporter)로 구성된 균에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가로 결실된 것을 특징으로 할 수 있다.

[139] 또한 상기 재조합 미생물은 thrA(Bifunctional aspartokinase/homoserine

dehydrogenase 1)의 1034번째 염기 서열이 C에서 T로 바뀐 돌연변이, lysC(lysine-sensitive aspartokinase 3)의 1055번째 염기 서열이 C에서 T로 바뀐 돌연변이, ilvA(l-threonine dehydratase, biosynthetic; also known as threonine deaminase)의 290번째 염기 서열이 C에서 T로 바뀐 돌연변이로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 조작된 것을 특징으로 하며, thrABC 오페론, ppc(phosphoenolpyruvate carboxylase), acs(acetyl-CoA synthetase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 프로모터가 trc 프로모터로 치환된 것을 특징으로 하며, 또한 rhtA(threonine and homoserine efflux system), rhtB(homoserine, homoserine lactone and S-methyl-methionine efflux pump), rhtC(threonine efflux pump), thrAC1034T, thrB(homoserine kinase), thrC(L-threonine synthase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 플라스미드 기반 과발현된 것을 특징으로 할 수 있다.

- [140] 본 발명에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(Rhizobium), 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 로도코커스 (Rhodococcus), 칸디다 (Candida), 에르위니아(Erwinia), 엔테로박터 (Enterobacter), 파스테렐라(Pasteurella), 맨하이미아 (Mannheimia), 액티노바실러스 (Actinobacillus), 아그레가티박터(Aggregatibacter), 잔토모나스(Xanthomonas), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스(Pseudomonas), 아조토박터(Azotobacter), 애시네토박터(Acinetobacter), 랄스토니아(Ralstonia), 아그로박테리움(Agrobacterium), 로도박터(Rhodobacter), 자이모모나스(Zymomonas), 바실러스(Bacillus), 스테필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 클로스트리디움(Clostridium), 코리네박테리움(Corynebacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 사이아노박테리움(cyanobacterium) 및 사이클로박테리움(Cyclobacterium)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[141]

- [142] 본 발명의 다른 실시예에서는 기존의 합성조절 sRNA를 도입하여 프롤린 생산량을 증가시킨 대장균 균주(NMH26-p15PP3533, pKKtrcSargF-trcSglnA, M. Noh et al., Cell Systems (2017), 5, 1-9)에 본 발명에 따른 sRNA 라이브러리를 처리하여, 7개의 후보 유전자 군을 도출하였으며(도 8), 이들의 조합을 통해 프롤린 생산을 추가로 향상시키는 유전자 조합을 발굴하여 30%이상의 프롤린 증산이 추가로 가능한 것을 확인하였다(도 8).

- [143] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 프롤린(proline) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제1 내지 제q벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 serC, murE, aspC, metB, fadR, fur 또는 chpA 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을

- 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, *serC*, *murE*, *aspC*, *metB*, *fadR*, *fur* 및 *chpA* 로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 프롤린 생산능력이 향상된 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [144] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 *lacI*, *speE*, *speG*, *argI*, *puuP*, *puuA*, *putA*, *putP*, *proP*, *speC*, *potE*, 및 *speF*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가로 결실된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [145] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 *argECBH* 오페론, *speF-potE*, 및 *argD*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 프로모터가 *trc* 프로모터로 치환된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [146] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 PP3533 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [147] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 *argF* 및 *glnA* 유전자의 발현이 추가로 억제되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 유전자의 발현 억제는 합성조절 sRNA를 통해 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(*Rhizobium*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 로도코커스(*Rhodococcus*), 칸디다(*Candida*), 에르위니아(*Erwinia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 파스테렐라(*Pasteurella*), 맨하이미아(*Mannheimia*), 액티노바실러스(*Actinobacillus*), 아그레가티박터(*Aggregatibacter*), 잔토모나스(*Xanthomonas*), 비브리오(*Vibrio*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아조토박터(*Azotobacter*), 애시네토박터(*Acinetobacter*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 로도박터(*Rhodobacter*), 자이모모나스(*Zymomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스테필로코커스(*Staphylococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 사이아노박테리움(*cyanobacterium*) 및 사이클로박테리움(*Cyclobacterium*)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [148] 본 발명은 또한, 상기 프롤린 생산능이 향상된 재조합 미생물을 트레이스 메탈 용액(trace metal solution)을 포함하는 배지에서 유가식 발효를 통해 배양하는 단계를 포함하는 프롤린 생산 방법에 관한 것이다.
- [149]
- [150] 본 발명의 다른 실시예에서는 기존의 구축된 sRNA 라이브러리를 본 발명에 따른 sRNA 발현 벡터로 집은 어셈블리를 이용하여 빠르고 정확하며 효율적으로 이전한 다음, 인디고 및 비올라세인 생산 균주에 대하여 라이브러리 스크리닝을 통하여 인디고 또는 비올라세인 생산능을 향상시킬 수 있는 유전자 조합을 발굴하여, 인디고 또는 비올라세인의 생산능이 획기적으로 증가하는 것을

확인하였다(도 16 내지 도 18).

- [151] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 인디고(indigo) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 *asnA*, *hisJ*, *yneH*, *napG*, *kdsA*, *ygfA*, *ftsI*, *aceF* 또는 *ostB* 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, *asnA*, *hisJ*, *yneH*, *napG*, *kdsA*, *ygfA*, *ftsI*, *aceF* 및 *ostB* 로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 인디고 생산능력이 향상된 제조합 미생물에 관한 것이다.
- [152] 본 발명에 있어서, 상기 제조합 미생물은 *trpR*, *pykF* 및 *pykA*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가로 결실되고, *tktA*의 프로모터가 *trc* 프로모터로 치환되어 있으며, *tnaA*, *fmo*, *aroGfbr*, *trpEfbr*, 및 *aroL*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 *fbr*은 피드백 저항을 받지 않는다는 것을 뜻한다(feedback resistance).
- [153] 본 발명에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(*Rhizobium*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 로도코커스(*Rhodococcus*), 칸디다(*Candida*), 에르위니아(*Erwinia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 파스테렐라(*Pasteurella*), 맨하이미아(*Mannheimia*), 액티노바실러스(*Actinobacillus*), 아그레가티박터(*Aggregatibacter*), 잔토모나스(*Xanthomonas*), 비브리오(*Vibrio*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아조토박터(*Azotobacter*), 애시네토박터(*Acinetobacter*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 로도박터(*Rhodobacter*), 자이모모나스(*Zymomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스테필로코커스(*Staphylococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 사이아노박테리움(*cyanobacterium*) 및 사이클로박테리움(*Cyclobacterium*)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [154]
- [155] 본 발명은 또 다른 관점에서, 비올라세인(violacein) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서, 상기 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 *ytfR*, *hybG*, *ampG*, *potG*, *caiF*, *minD*, *ilvM*, *yfbR*, *rfe*, *atpH*, *tiaE* 또는 *murI* 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, *ytfR*, *hybG*, *ampG*, *potG*, *caiF*, *minD*, *ilvM*, *yfbR*, *rfe*, *atpH*, *tiaE* 및 *murI*로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있는 것을 특징으로 하는

비올라세인/디옥시비올라세인 생산능력이 향상된 재조합 미생물에 관한 것이다.

- [156] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* 및 *vioE*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [157] 본 발명에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(*Rhizobium*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 로도코커스 (*Rhodococcus*), 칸디다 (*Candida*), 에르위니아(*Erwinia*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 파스테렐라(*Pasteurella*), 맨하이미아 (*Mannheimia*), 액티노바실러스 (*Actinobacillus*), 아그레가티박터(*Aggregatibacter*), 잔토모나스(*Xanthomonas*), 비브리오(*Vibrio*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아조토박터(*Azotobacter*), 애시네토박터(*Acinetobacter*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 로도박터(*Rhodobacter*), 자이모모나스(*Zymomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스테필로코커스(*Staphylococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 사이아노박테리움(*cyanobacterium*) 및 사이클로박테리움(*Cyclobacterium*)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [158] 본 발명은 또한 상기 재조합 미생물을 트레이스 메탈 용액(*trace metal solution*)을 포함하는 배지에서 유가식 발효를 통해 배양하는 단계를 포함하는 비올라세인/디옥시비올라세인 생산 방법에 관한 것이다.
- [159]
- [160] 실시예
- [161] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [162]
- [163] 실시예 1. 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템의 성능 확인
- [164] 1.1. 다양한 합성조절 sRNA 플랫폼 제작
- [165] 본 발명에서는 다양한 합성조절 sRNA 플랫폼들을 구축하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 유용한 화합물의 생산을 위한 여러 종류의 플라스미드들과 동시에 사용될 수 있도록 설계하였는데, 보다 구체적으로 서로 공존 가능한 세 가지 항생제 마커 (*Apramycin*, Am로 표기; *streptomycin* 또는 *spectinomycin*, Sm으로 표기; *tetracycline*, Tc로 표기)를 사용하였고, 서로 공존 가능한 세 가지 복제원점 (*CDF*, *pBBR1*, *ColA*)을 이용하여 총 아홉 가지 벡터

(CDF-Am, CDF-Sm, CDF-Tc, pBBR1-Am, pBBR1-Sm, pBBR1-Tc, ColA-Am, ColA-Sm, ColA-Tc) 를 구축하였다(도 1). 이 때 [서열번호1]은 CDF 복제원점, [서열번호2]는 pBBR1 복제원점, [서열번호3]은 ColA 복제원점, [서열번호4]는 Am 항생제 마커, [서열번호5]는 Sm 항생제 마커, [서열번호6]은 Tc 항생제 마커 DNA 서열들을 의미한다.

- [166] 본 발명에서 사용된 합성조절 sRNA는 PR 프로모터(서열번호7)를 기반으로 micC scaffold(서열번호8)와 T1/TE 터미네이터(서열번호9)를 활용하였다. 상기 아홉 개의 합성조절 sRNA 플랫폼 플라스미드들을 sRNA 조각, 항생제 마커(항생제 내성 유전자) 조각 및 복제원점 조각으로 구성된 세 개의 DNA 조각을 집는 어셈블리(gibson assembly)를 통해 제작하였다(D.G.Gibson et al., Nature Methods (2009), 6(5), 343-345).
- [167] sRNA 조각은 기존 특허(KR 10-1575587 B1)에서의 pWAS 플라스미드를 템플릿으로 삼아 [서열번호10/서열번호11]을 이용하여 PCR을 통해 수득하였다. 항생제 마커 조각들 중 Am 조각은 [서열번호12/서열번호13]를 통해, Sm 조각은 [서열번호14/서열번호15]을 통해, 그리고 Tc 조각은 [서열번호16/서열번호17]를 통해 수득하였다. 복제원점 조각들 중 CDF 조각은 [서열번호18/서열번호19]을 통해, pBBR1 조각은 [서열번호20/서열번호21]을 통해, 그리고 ColA 조각은 [서열번호22/서열번호23]를 통해 수득하였다.

[168]

[서열번호1]

5'-

```

gatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctttgacctgtaaaccgaaaaaccacctggggaggt
ggtttgatcgaagggttaagtcagttggggaactgcttaaccgtggtaactggctttcgagagcacagcaaccaa
tctgtcctccagtgtagccggactttggcgcacactcaagagcaaccgctgttttagctaaacaaatcctctgcga
actcccagttaccaatggctgctgccagtggttttaccgtgctttccgggttgactcaagtgaacagttaccgg
ataaggcgagcagtcgggctgaacggggagttctgcttacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgag
ccgagataccagtggtgagctatgagaaagcgccacactcccgtaggaggagaaaggcggaacagggtatccg
gtaaacggcaggggtcggaacaggagagcgcaagaggagcgacccgccggaacgggtggggatctttaagt
cctgtcgggtttcgccgtactgtcagattcatggtgagcctcacggctcccacagatgcaccggaaaagcgtctg
tttatgtgaactctggcaggagggcgagcctatggaaaaacgccaccggcgcgccctgctgttttgctcacat
gttagtcccctgcttatccacggaatctgtgggtaacttgtatgtgtccgcagcgc-3'

```

[169]

[서열번호2]

5'-

tatgatcatttattctgcctcccagagcctgataaaaacggtgaatccgtagcgaggtgccgccggcttcattcag
gtcgaggtggcccggctccatgcaccgcgacgcaacgcggggaggcagacaaggatataggcgggcgaggcg
gctacagccgatagtctggaacagcgcacttacgggtgtgctgcgaaccaagtgtaccggcgcggcagcgtg
accggtgtcggcggtccaacggctcgccatcgtccagaaaacacggctcatcgggcatcggcaggcgctgctg
cccgcgccgttccattcctccgttccggtcaaggctggcaggtctggtccatgcccggaatgccgggctggctg

[170]

ggcggctcctcgccggggccggctcggtagttgctgctcgcccgatac agggctcgggatgcggcgcaggctcgc
catgccccaacagcgattcgtcctggtcgtcgtgatcaaccaccacggcggcactgaacaccgacaggcgcaact
ggtcgcggggctggtccacgccacgcggctattgaccacgtaggccgacacggtgccggggccgttgagctt
cacgacggagatccagcgctcgccaccaagtcttgactgcgtattggaccgtccgcaagaacgtccgatgag
cttgaaaagtgtcttctggctgaccaccacggcgttctggtggccatctgcgccacgaggtgatgcagcagcatt
gccgccgtgggttctcgcataaagcccgccacgcctcatgcgcttgcgttccgttgacccagtgaccggg
cttgtcttggctgaatgccgatttcttgactgcgtggccatgcttatctccatgcggtagggggtccgcacgggt
gcggcaccatgcgcaatcagctgcaacttttcggcagcgcgac aacaattatgcgttgcgtaaaagtggcagtc aa
ttacagattttcttaacctacgc aatgagctattgcggggggtgccgcaatgagctgttgcgtaccccccttttaa
gttgttgatttttaagctttcgc atttcgccctatatctagttcttggtgcccaaagaaggcg acccctgcgggggtc
ccccacgccttcggcgcggctccccctccggcaaaaagtggccccctcgggggttgttgatcgactgcgcggcctt
cggccttgcccaagggtggcgtgcccccttgaacccccgcactcgccgccgtgaggctcggggggcaggcgg
gcgggcttcgcccttcgactgccccactcgcataggcttgggtcgttccaggcgcgtcaaggccaagccgctgc
gcggtcgtgcgcgagcctgaccgccttcacttgggtgtcaaccggcaagcgaagcgcgagggccgaggc
cggaggctttcccagagaaaattaaaaaattgatggggcaaggccgagggccgcgc agttggagccggtg
ggtatgtggtcgaaggctggtagccggtgggc aatccctgtggtcaagctcgtgggcaggcgcagcctgtcca
tcagcttgccagcagggttgtccacgggccgagcgaagcgaagcagccggtggccgctcgcggccatcgtcca
catatccacgggctggc aaggagcgcagc gaccgcgcagggcgaagcccgagagcaagcccgtagggcg
ccgagccgccgtaggcggtcacgactttgcgaagc aaagtctagt gagtatactcaagcattgagtggccgcc
ggaggcaccgccttgcgtgccccgtcgagccggtggacaccaaaggaggggcaggcatggcggc ata
cgcgatcatgcgatgcaagaagctggcgaaaatgggc aacgtggcgccagctcgaagcacgcctaccgcgag

[171] cgcgagacgcccacgctgacgccagcaggacgccagagaacgagcactggcggccagcagcaccgatga
agc gatgggccgactgctgcgaggttgctgccagagaagcggcgc aaggacgctgtgttggcggtcgagtacgtc
atgacggccagcccgaatggtggaagtcggccagccaagaacagcaggcgcggttcttcgagaaggcgcac
aagtggctggcggacaagtacggggcggatcgcatcgtgacggccagcatccaccgtgacgaaaccagcccgc
acatgaccgcgttcgtggtgccgtgacgcaggacggcaggctgtcgccaaggagttcatcggaacaaagc
gcagatgacccgcgaccagaccacgtttcgggccgctgtggccgatctagggtgcaacggggcatcgagggc
agcaaggcacgtcacacgcgcattcaggcgttctacgaggccctggagcggccaccagtgggccacgtcaccat
cagcccgaagcggtcgagccacgcgcctatgcaccgcagggttggccgaaaagctgggaatctcaaagcgc
gttgagacgccggaagccgtggccgaccggctgacaaaagcggttcggcaggggtatgagcctgccctacagg
ccgccgcaggagcgcgtgagatgcgcaagaaggccgatcaagccaagagacggcccagaccttcgggag
cgctgaagcccgttctggacgccctggggccgttgatcgggatatgcaggccaaggccgccgcatcatcaa
ggccgtgggcgaaaagctgctgacggaacagcgggaagtccagcgccagaaacaggcccagcggcagcagg
aacgcgggcgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataa
aataggcgtatcacgaggcccttcgtcttcgaataaacctgtgacggaagatcacttcgagaataaataaat
cctgggtgtccctgttgatacc-3'

[172]

[서열번호3]

5'-

aaacgtcctagaagatgccaggaggatacttagcagagagacaataaggccggagcgaagccgttttccatag
 gctccgccccctgacgaacatcacgaaatctgacgctcaaatcagtggtggcgaaacccgacaggactataaag
 ataccaggcggtttccccctgatggctccctcttgcgctcctgttcccgtctgcggtccgtgttggtggagg
 ctttaccctaaatcaccacgtcccgttccgtgtagacagttcgtccaagctgggctgtgtgcaagaacccccgttca
 gcccgtactgtgcgccttatccggtaactatcatcttgagtccaacccggaaaagacacgacaaaacgccactggca
 gcagccattgtaactgagaattagtggttagatcgcagagcttgaagtgtggcctaacagaggctacact
 gaaaggacagtatttggtatctgcgtccactaaagccagttaccagggttaagcagttccccaactgacttaacctc
 gatcaaaccgcctccccaggcggtttttcgttacagagcaggagattacgacgatcgtaaaaggatctcaagaa
 gatcctttacggattcccgcacca-3'

[173]

[서열번호4]

5'-

atgtcatcagcgggtggagtgaatgtcgtgcaatacgaatggcgaaaagccgagctcatcggtcagcttctcaacc
 ttgggggttaccgccggcggtgtgctgctggtccacagctcctccgtagcgtccggccccctcgaagatgggccactt
 ggactgatcagagccctgcgtgctgcgtgggtccggaggagggacgctcgtcatgccctcgtggtcaggtctgga
 cgacgagccgttcgatcctgccacgtcggccgttacaccggaccttgagttgtctctgactcattctggcgccctgcc
 aatgtaaaagcgcagcgccatccatttgcccttgccgagcggggccacaggcagagcagatcatctctgatcc
 attgccccctgccacctcactgcctgcaagccccggtcggccgtgtccatgaactcgatgggcaggtacttctcctcg
 gcgtgggacacgatgccaacacgacgctgcaccttgccgagttgttgcaaaaggttcctatggggtgccgagac
 actgcaccattcttcaggatggcaagttggtacgcgtcgattatctcgagaatgaccactgctgtgagcgctttgcct
 tggcggacaggtggctcaaggagaagagccttcagaaggaagggtccagtcggcatgccttgctcggttgatcc
 gctcccgacattgtggcgacagccctgggtcaactgggccgagatccgttgatcttctgcatccgccagaggc
 gggatgcgaagaatgcgatgccgctcgccagtcgattggctga-3'

[174]

[서열번호5]

5'-

atgaggggaagcggatgatcgccgaagatcgactcaactatcagaggtagttggcgctatcgagcgccatctcgaa
ccgacggtgctggccgtacattgtacggctccgcagtgatggcgccctgaagccacacagtgatattgatttgct
ggttacggtagccgtaaggcttgatgaaacaacgcggcgagcttgatcaacgacctttggaaacttcggcttccc
ctggagagagcgagattctccgcgctgtagaagtcaccattgtgtgcacgacgacatcattccgtggcgttatcca
gctaagcgcgaactgcaatttgagaatggcagcgc aatgacattctgcaggtatcttcgagccagccacgatcg
acattgatctggctatcttgctgacaaaagcaagagaacatagcgttgccttggtaggccagcggcgaggaaact
cttgatccgggttctgaacaggatctatttgaggcgctaaatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactg
ggctggcgatgagcgaaatgtagtgcttacggtgtcccgcttggtagcgcagtaaccggc aaaatcgcgcc
gaaggatgtcgctgccgactgggcaatggagcgccctgccggcccagtatcagcccgtcatacttgaagctagaca
ggcttatcttgacaagaagaagatcgcttggcctcgcgcgagatcagttggaagaattgtccactacgtgaaa
ggcgagatcaccaaggtagtcggcaataa-3'

[175]

[서열번호6]

5'-

atgaaaattattaatattggagtttagctcatgttgatgcaggaaaaactaccttaacagaaagcttattatataaca
gtggagcgtattacagaattaggaagcgtggacaaagggtacaacgaggacggataatacgttttagaacgtcag
agaggaattacaattcagacaggaataaacctctttcagtgaggaaaatacgaaggtgaacatcatagacacgcc
ggacatatggatttcttagcagaagtatacgttcattatcagtttagatggggcaattctactgatttctacaaaaga
tggcgtacaagc aaaaactcgatattattcatgcacttaggaaaatggggattccacaatctttttatcaataaga
ttgaccaaagtgaattgatttatcaacggttatcaggatattaagagaaactttctgccgaaattgtaataaaca
gaaggtagaactgtatcctaattgtgtgtgtgacgaactttaccgaatctgaacaatgggatacggtaataagaggga
aacgatgaccttttagagaaatatgtccggtaaatcattagaaacattggaactcgaacagagggaagcataa

[176] gatttcagaattgttctctgttcctctttatcatggaagtgcataaagtaataaggattgataacattatagaagtt
 attactaataaattttattcatcaacacatc gaggtccgtctgaactttgcggaaatgtttcaaaattgaatatacaaaa
 aaaagacaacgtcttgc atatatacgcctttatagtggagtactacatttac gagattc ggtagagtatcagaaaaa
 gaaaaataaaagttacagaaatgtatacttcaataaatggtgaattatgtaagattgatagagcttattctggagaa
 attgttattttgcaaaatgagttttgaaagttaaatagtgttcttgagatacaaaactattgccacagagaaaaaga
 ttgaaatccgcaccttactacaaacaactgttgaaacggagttaacctgaacagagagaaatgttgcttgatgcc
 cttttgaaatctcagatagt gatccgcttctac gatattacgtggattctacgacacatgaattatactttcttcttag
 ggaaagtacaaatggaagtgattagtgcactgttgcaagaaaagtatcatgtggagatagaactaaaagagccta
 cagtcatttatatggagagaccgttaaaaaatgcagaatataccattcacatcgaagtgccgcaaatcctttctggg
 ctccattggtttatctgtatcacgcgttccgttgggaagtggaatgcagtatgagagctcggtttcttggatactta
 aatcaatcatttcaaaatgcagttatggaaggatagcttatggttgtgaacaaggattgtatggttgaatgtgac
 ggactgtaaaatctgttttaagtatggcttatactatagccctgttagtacctcagcagattttcgatgcttgctctat
 tgtattggaacaagctttaaaaaagctggaacagaattgttagagccatatcttagttttaaatttatgcgccacag
 gaatatctttcacgagc atacaacgatgctcctaaatattgtgcgaacatcgtagacactcaattgaaaataatgag
 gtcattcttagtgagaaaatccctgctcgggtattcaagaatcgtagtgatttaactttctttacaaatggacgtag
 tgtttgttaacagagttaaaagggtaccatgttactaccggtgaacctgtttgccagccccgtcgtccaaatagtcg
 gatagataaagtacgatatatgttcaataaaataact-3'

[177] [서열번호7] 5'- taacaccgtgcgtgttgactattttacctctggcgggtgataatggttgc-3'

[178] [서열번호8]

5'-

tttctgttggccattgcattgccactgattttccaacatataaaaagacaagccccgaacagtcgtccgggctttttt-
 3'

[179]

[서열번호9]

5'-

ccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgttggttgcggtgaacgctc
tctactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcgtttata-3'

[180]

[서열번호10] 5'-GGTAAACCCAGGAGGTATAG-3'

[서열번호11] 5'-GTGCCACCTAAATTGTAAGC-3'

[서열번호12]

5'-GCTTACAATTTAGGTGGCAC

ACGGTAACTGATGCCGTATTTG-3'

[서열번호13]

5'-CATTGTAACCTATGATTATC

GAAGAACTCCAGCATGAGATCC-3'

[서열번호14]

5'-GCTTACAATTTAGGTGGCAC

GACCGAGTGAGCTAGCTATTTG-3'

[서열번호15] 5'-CATTGTAACCTATGATTATC CTGAGCAATAACTAGCATAAC-

3'

[181]

[서열번호16]

5'-GCTTACAATTTAGGTGGCAC

GACAGTGGAGTATATCGACCAG-3'

[서열번호17]

5'-CATTGTAACCTATGATTATC

GCTCACATGTAGTTTATAATAAC-3'

[서열번호18] 5'-CTATACCTCCTGGGTTTACC AAGTTAGCTCACTCATTAGGC-

3'

[서열번호19] 5'-GATAATCATAGGTTACAATG TTTATCAGGGTTATTGTCTC-3'

[서열번호20] 5'-CTATACCTCCTGGGTTTACC GGTATCAACAGGGACACCAGG-

3'

[서열번호21] 5'-GATAATCATAGGTTACAATG TATGATCATTTATTCTGCCTCC-

3'

[서열번호22] 5'-CTATACCTCCTGGGTTTACC TATCAGGGTTATTGTCTCATG-3'

[서열번호23] 5'-GATAATCATAGGTTACAATG CGCAACGCAATTAATGTAAG-

3'

- [182] 1.2. 다양한 합성조절 sRNA 효율 테스트를 위한 리포터 플라스미드 제작
- [183] 다양한 플랫폼 sRNA들의 유전자 발현 억제능을 확인하기 위해서 우선 DsRed2 유전자를 포함하고 있는 리포터 플라스미드들을 제작하였다. 리포터 플라스미드들 중 pACYC184-DsRed2는 기존 문헌에서 제작된 바와 동일한 플라스미드를 활용하였다(M. Noh et al., Cell Systems (2017), 5, 1-9).
- [184] pTac15K-DsRed2 (p15A 복제원점, kanamycin -Km으로 표기- 항생제 마커), pTrc99A-DsRed2 (ColE1 복제원점, ampicilin -Ap로 표기- 항생제 마커) 리포터 플라스미드 구축은 먼저 pTac15K와 pTrc99A를 템플릿으로 하여 [서열번호24/서열번호25]를 통하여 PCR을 통해 깃슨 어셈블리(gibson assembly)를 위한 플라스미드 조각을 제조한 다음, DsRed2 유전자를 [서열번호26/서열번호27]을 통하여 PCR 반응으로 수득한 다음, 상기 두 조각을 깃슨 어셈블리를 통해 조립함으로써 pTac15K-DsRed2, pTrc99A-DsRed2 리포터 플라스미드를 구축하였다.

[185]

[서열번호24] 5'-GGATGAGAGAAGATTTTCAG-3'

[서열번호25] 5'-TTTTTTTTTTTGTGTGAAATTGTTATCCGC-3'

[서열번호26]

5'-

ATTAACCTTTATTAATTAAAGGAGGACAAATATATGGCGAGCAGTGAGAACGTC-3'

[서열번호27]

5'-CTGAAAATCTTCTCTCATCC ATTACGCCACCAGGGCATAGTTTTTC-3'

[186] 1.3. 다양한 합성조절 sRNA의 DsRed2 형광 단백질에 대한 낙다운 효율 테스트 및 성능 조사

[187] 실시예 1-1에서 구축한 다양한 합성조절 sRNA 플랫폼 플라스미드와 DsRed2 형광단백질 발현 리포터 플라스미드를 이용하여 합성조절 sRNA의 DsRed2 형광 단백질에 대한 낙다운 테스트 및 각 플랫폼의 성능 조사를 아래와 같이 진행하였다.

[188] 기반 균주는 *Escherichia coli* W3110을 사용하였다. 우선 DsRed2 형광단백질의 발현을 낙다운 하기 위한 합성조절 sRNA를 구축함에 있어, 다양한 합성조절 sRNA 플랫폼 플라스미드들을 템플릿으로 삼아 [서열번호28/서열번호29]를 이용한 inverse PCR 반응을 이용하였다. PCR을 통해 생성된 DNA 중 DpnI 제한효소 (엔지노믹스, 대한민국)로 템플릿을 제거하였으며, 뒤따른 T4 polynucleotide kinase (엔지노믹스, 대한민국)와 T4 ligase (엘피스 바이오텍, 대한민국)에 의한 반응을 통해 완성된 anti-DsRed2-sRNA 플라스미드를 제작하였다.

[189] 모든 클로닝 상의 DNA 서열 확인 작업은 Cosmogenetech사 (대한민국)를 통하여 진행하였다. 상기에서 명시한 바와 같이 구축된 9개의 anti-DsRed2-sRNA 플라스미드들과 세 가지 DsRed2- 리포터 플라스미드들을 이용하여 대사공학에서 자주 사용되는 세 가지 리포터 플라스미드들 - 각각 세 가지 다른 항생제 마커를 지니고 있는 - 에 대한 다양한 합성조절 sRNA의 낙다운 성능을 판단하고자 하였다.

[190] 구축한 9개의 anti-DsRed2-sRNA - 각각 CDF-Am, CDF-Sm, CDF-Tc, pBBR1-Am, pBBR1-Sm, pBBR1-Tc, ColA-Am, ColA-Sm, ColA-Tc 플랫폼 플라스미드에 삽입 - 를 pACYC184-DsRed2 리포터 플라스미드와 함께 *E. coli* W3110 균주에 형질전환하였으며, 5 mL의 LB (Luria-Bertani) 배지가 담긴 테스트 튜브에 접종된 채로 24시간 동안 섭씨 37도씨에서 200 RPM으로 배양한 다음, OD600이 보정된 채로 (OD600=2) 96 well standard opaque 마이크로플레이트에 옮긴 후, microplate

reader을 통해 형광 세기를 측정하였다. DsRed2 형광 단백질의 excitation 파장은 562 nm, emission 파장은 603 nm, 그리고 cutoff 값은 590 nm로 설정하고 측정하였다.

[191] 또한, 상기 9개의 anti-DsRed2-sRNA를 pTac15K-DsRed2 리포터 플라스미드와 함께 E. coli W3110 균주에 형질전환 한 뒤 배양하여, 상기와 동일하게 형광 세기를 측정한 하였다

[192] 또한, 상기 9개의 anti-DsRed2-sRNA를 pTrc15K-DsRed2 리포터 플라스미드와 함께 E. coli W3110 균주에 형질전환 한 뒤 배양하여, 상기와 동일하게 형광세기를 측정하였다.

[193] 그 결과, 총 6가지의 플랫폼 (CDF-Sm, CDF-Tc, pBBR1-Am, pBBR1-Sm, pBBR1-Tc, ColA-Sm) 들을 실제 대사공학에서 사용될 수 있는 플랫폼 후보로 선정하였다. 선정된 플랫폼들은 다양한 환경의 DsRed2 발현 균주들에서 모두 효과적인 목표 유전자 발현 억제능을 보여주었다 (도2). ColA-Tc, ColA-Am 플랫폼은 클로닝과정에서 리포터 플라스미드와 함께 형질전환하였을 경우 안정성이 떨어졌고, CDF-Am 플랫폼은 액체 배지에서 성장 저해 문제를 나타내고 pTrc99A-DsRed2 리포터에 대한 낙다운 성능이 떨어졌기에 플랫폼 후보에서 제외하였다.

[194] 본 발명은 균주내의 3가지 유전자를 동시에 낙다운 하기 위해 ColA-Sm, CDF-Tc, pBBR1-Am 3가지 플랫폼을 선정하여 추후 대사공학적 실시예에서 사용하였다. 이들 중 하나의 플랫폼을 일차 라이브러리 제작 대상으로 선정하였다. 이 때 일차 스크리닝 플랫폼이라 함은 일반적으로 사용에 편리하도록 본 발명자들이 지정한 것이지, 본 발명의 용법에 한정을 주는 것이 아님은 자명할 것이다.

[195]

[서열번호28] 5'-GAGAACGTCATC GCAACCATTATCACCGCCAG-3'

[서열번호29] 5'-ACTGCTCGCCAT TTTCTGTTGGGCCATTG CATTG-3'

[196] 1.4. 다양한 조합의 합성조절 sRNA 플랫폼이 숙주 대장균의 성장에 미치는 영향

[197] 1) 단일 sRNA 플랫폼

[198] 실시예 1-3에서 제조한 합성조절 sRNA 플랫폼 플라스미드가 여러 조합으로 대장균 균주에 도입되었을 때, 숙주 세포의 성장에 미치는 영향을 알아보고자하였다. 먼저 단일 sRNA 플랫폼 도입 후 균주 생장 테스트를 하였는데, 대사공학적으로 사용되는 실제 환경과 최대한 유사한 환경에서 테스트하고자 리포터 플라스미드 각각 한 종이 이미 도입된 대장균 균주에 각 sRNA 플랫폼을 도입하였다. 따라서 상기 실시예에서 언급된 pTac15K-dsRed2, pTrc99A-dsRed2, pACYC184-dsRed2 리포터 플라스미드를 각각 보유하고 있는 E.

coli W3110 균주 세 종에 실시예 1.3에서 선정한 6가지 sRNA 플랫폼을 각각 도입하여 다음과 같은 18종의 균주를 제작하였다: Tac-pBBR1Am, Tac-pBBR1Tc, Tac-pBBR1Sm, Tac-ColASm, Tac-CDFTc, Tac-CDFSm, Trc-pBBR1Am, Trc-pBBR1Tc, Trc-pBBR1Sm, Trc-ColASm, Trc-CDFTc, Trc-CDFSm,ACYC-pBBR1Am, ACYC-pBBR1Tc, ACYC-pBBR1Sm, ACYC-ColASm, ACYC-CDFTc, ACYC-CDFSm.

[199] 제작한 균주들과 각 대조군 균주들 (Ctrl로 표기; sRNA 플랫폼이 도입되지 않고 각각의 리포터 플라스미드만 도입된 균주)을 각기 5 mL의 LB 배지가 들어있는 테스트 튜브에 접종하여 16시간동안 37°C, 200 RPM에서 배양하였으며, 모든 균주들은 세 종씩 접종하여 테스트하였다. 그 후, 각 well에 200 µL의 LB 배지가 유입된 microplate에 모든 균주들을 24 시간동안 계대 배양을 진행하였는데 (1일 차), 이 때 Bioscreen C를 이용하여 교반이 이루어짐과 동시에 모든 균주들의 OD600을 1시간마다 측정하도록 하였다. 이렇게 24 시간동안의 배양이 종료된 후, 다시 동일한 조건의 microplate 상에 모든 균주들을 24 시간동안 계대 배양을 진행하였다 (2일 차). 이 때 역시 Bioscreen C를 이용하여 균주 생장을 측정하였다. 3일 차 계대 배양 또한 동일하게 수행하였다.

[200] 그 결과, 도 3의 상단 세 개의 그래프 (a) 에 개시된 바와 같이 단일 sRNA 플랫폼의 도입은 숙주 대장균의 성장에 영향을 끼치지 않는 것을 확인하였다.

[201]

[202] 2) 이중 sRNA 플랫폼

[203] 본 연구진은 나아가 대장균 균주가 두 종의 sRNA 플랫폼을 동시에 보유하고 있을 때의 성장 곡선 또한 분석하고자 하였다. 따라서 상기에서 언급된 바와 같이 세 종의 리포터 플라스미드가 도입된 E. coli W3110 균주에 다음과 같은 조합으로 sRNA 플랫폼을 형질전환한 균주들 21종을 제작하였다:

Tac-ColASm-pBBR1Am, Tac-ColASm-pBBR1Tc, Tac-ColASm-CDFTc, Tac-CDFSm-pBBR1Am, Tac-CDFSm-pBBR1Tc, Tac-CDFTc-pBBR1Am, Tac-CDFTc-pBBR1Sm, Trc-ColASm-pBBR1Am, Trc-ColASm-pBBR1Tc, Trc-ColASm-CDFTc, Trc-CDFSm-pBBR1Am, Trc-CDFSm-pBBR1Tc, Trc-CDFTc-pBBR1Am, Trc-CDFTc-pBBR1Sm, ACYC-ColASm-pBBR1Am, ACYC-ColASm-pBBR1Tc, ACYC-ColASm-CDFTc, ACYC-CDFSm-pBBR1Am, ACYC-CDFSm-pBBR1Tc, ACYC-CDFTc-pBBR1Am, ACYC-CDFTc-pBBR1Sm.

[204] 제작한 균주들에 대한 성장 테스트는 상기 단일 sRNA 플랫폼에 대한 테스트와 동일한 방식으로 수행하였다.

[205] 그 결과, 도 3의 중앙 세 개의 그래프 (b)에 개시된 바와 같이 두 종의 sRNA 플랫폼들의 도입은 숙주 대장균 균주의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[206]

[207] 3) 삼중 sRNA 플랫폼

- [208] 본 연구진은 마지막으로 세 종의 sRNA 플랫폼의 동시 도입이 숙주 대장균 균주의 생장에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 따라서 상기에서 언급된 바와 같이 세 종의 리포터 플라스미드가 도입된 E. coli W3110 균주에 다음과 같은 조합으로 sRNA 플랫폼을 형질전환한 균주들 3종을 제작하였다:
 Tac-ColASm-pBBR1Am-CDFTc, Trc-ColASm-pBBR1Am-CDFTc, ACYC-ColASm-pBBR1Am-CDFTc.
- [209] 제작한 균주들에 대한 성장 테스트는 상기 단일 sRNA 플랫폼에 대한 테스트와 동일한 방식으로 수행하였다.
- [210] 그 결과, 도 3의 하단 세 개의 그래프 (c)에 개시된 바와 같이 세 종의 sRNA 플랫폼들의 도입은 숙주 대장균 균주의 생장에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.
- [211]
- [212] 1.5. 다양한 조합의 합성조절 sRNA 플랫폼들의 대장균 숙주 내에서의 안정성
- [213] 실시예 1.4를 진행함에 있어서, 1일 차, 2일 차, 3일 차 배양이 종료될 때마다 각 세포를 일정량 수득하여 colony PCR을 진행하여 해당 균주에 sRNA 플랫폼들이 안정하게 존재하는지를 테스트하였다. 이 때, 보다 쉽게 각 플랫폼들을 구분하고자 서로 다른 복제 원점은 서로 다른 길이의 PCR 산물을 제작하도록 하는 아래의 프라이머들 6종을 사용하였다. 이 때 [서열번호30], [서열번호31]은 CDF 복제원점에 특이적인 것으로 0.34 kb의 PCR 산물을 생성하고, [서열번호32], [서열번호33]은 pBBR1 복제원점에 특이적인 것으로 1.08 kb의 PCR 산물을 생성하며, [서열번호34], [서열번호35]는 ColA 복제원점에 특이적인 것으로 0.65 kb의 PCR 산물을 생성하도록 설계하였다.
- [214]
- [서열번호30] 5'-CAACCATGAATCTGACAGTAC-3'
- [서열번호31] 5'-CTCTGCGAACTCCCAGTTAC-3'
- [서열번호32] 5'-CGTTGCGTAAAAGTGGCAGTC-3'
- [서열번호33] 5'-GCTTCTTGCATCGCATGATC-3'
- [서열번호34] 5'-TCCGTAAAGGATCTTCTTGAG-3'
- [서열번호35] 5'-GTCCTAGAAGATGCCAGGAG-3'
- [215] PCR 산물을 전기영동으로 확인한 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 3일 차 계대 전까지는 모두 sRNA를 보유하고 있었지만 3일 차에는 몇몇 균주에서 sRNA가 소실된다는 것을 알 수 있다. 하지만 대부분의 균주들은 sRNA 플랫폼들을 안정하게 지니고 있다는 것을 확인하였다.

- [216] 상기와 같이 숙주세포 내에서의 본 발명의 합성조절 sRNA 플랫폼들의 안정성을 테스트 하였지만, 여러 개의 합성 조절 sRNA 발현 벡터들의 동시 적용이 하나의 벡터를 활용하는 것과 비교하여 더욱 안정하거나 최소 비슷하게 안정하다는 것을 증명하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [217] 본 특허 명세서 상에서 예시로 보여준 바와 같이 최대 세 개의 합성 조절 sRNA 플랫폼 벡터들이 (이미 숙주세포가 포함하고 있는 벡터 제외) 동시에 형질전환된 경우를 살펴보았다. pTac15K-dsRed2와 pTrc99A-dsRed2 두 가지 리포터 플라스미드를 각각 지니고 있는 두 종류의 대장균 W3110 균주에 합성 조절 sRNA 발현 플라스미드들을 단일, 이중, 삼중의 조합으로 형질전환하여 28종의 균주들을 제작하였다. 이렇게 제작된 균주들은 >80 세대 동안 계대 배양되었고, 약 20 세대 당 한 번씩 계대 및 플라스미드 보유 비율을 측정하였다.
- [218] 플라스미드 보유 비율 측정을 위해서는 다음과 같이 실험을 진행하였다. 먼저 해당 균주를 5 mL LB 배지가 함유된 25 mL test tube에 섭씨 37도에서 12시간 이상 배양하였고, 약 1000개의 세포를 새로 준비한 LB 배지에 계대 접종하여 섭씨 37도에서 약 20 세대 동안 배양을 진행하였다. 이 때 적절한 농도의 항생제가 필요에 따라 이용되었다. 그 후, 배양액은 항생제가 포함되지 않은 LB 아가 플레이트 위에 묻혀서 배양되었고, 각 플레이트 당 50 개의 콜로니씩을 무작위로 선별하여 각각의 항생제(Tc, Sm, 또는 Am)가 함유된 LB 아가 플레이트 위에 찍어 배양하였다.
- [219] 각 항생제가 함유된 LB 아가 플레이트 상에서의 각 균주들의 콜로니 생존율을 이용하여 플라스미드 보유 비율을 측정하였다. 그 결과는 도 19와 같다. 도 19에서 확인할 수 있는 바와 같이 대부분의 균주들(28 균주 중 25 균주)은 80세대 이상에서 90% 이상의 플라스미드 보유율을 보였다. 나머지 세 균주들 (다음의 플라스미드 조합을 보유하고 있는 균주들: pColA-SmR-pBBR1-AmR, pCDF-SmR-pBBR1-TcR, 그리고 pCDF-TcR-pBBR1-SmR) 또한 80% 이상의 플라스미드 보유율을 보여주었다.
- [220] 이로써 본 발명에서 개발된 동시다중 합성 조절 sRNA 발현 플라스미드들은 굉장히 높은 안정성을 보여준다는 점이 증명되었다. 본 실시예에서는 약 80 세대까지 세포를 배양하였는데, 이는 보통 산업계에서 배양되는 세대 수(유가식 배양이 세포 OD600 0.05에서 시작하여 1,000에서 종료된다고 가정하였을 때)인 약 15보다 훨씬 큰 숫자로써 대부분의 바이오 프로세스에서도 해당 sRNA 발현 플라스미드들이 안정할 수 있다는 점을 보여준다.
- [221]
- [222] 실시예 2. 주요 대사 회로 상의 유전자들에 대한 ColA-Sm 및 CDF-Tc 플랫폼을 이용한 sRNA 라이브러리 구축
- [223] 실시예 1-3에서 선별한 합성조절 sRNA 발현 플랫폼의 실제 유용물질 생산 균주에의 활용 가능성을 확인하고자 대장균 내의 주요 대사회로상의 유전자들을 선별하고 이 유전자의 발현을 억제시키는 합성조절 sRNA

라이브러리를 구축하였다.

[224] 먼저, 라이브러리를 구축할 플랫폼 벡터는 ColA-Sm과 CDF-Tc 로 선정하였고, 이렇게 선정한 각각의 플랫폼에 총 61가지의 주요 유전자들의 발현을 억제시킬 합성조절 sRNA 를 구축하였다. 합성조절 sRNA 의 목표 유전자들은 1) 주요 대사 경로 (해당 경로 및 TCA 회로 상에서 파생되는 주요 경로), 2) 대사 물질 transporter, 3) 세포 사멸, 4) 대사 회로 조절에 관여되는 유전자들을 선별하였다 (표 1). sRNA 라이브러리 구축시에는 상기 실시예 1.3에서 anti-DsRed2 sRNA를 구축하였을 때와 동일한 방법을 사용하였다. 즉, 우선 inverse PCR을 통하여 promoter와 micC 사이에 target binding sequence 24mer를 삽입하고, 뒤따른 DpnI 제한 효소 및 T4 PNK와 T4 ligase에 의하여 ligation 된 후 시퀀싱을 통하여 올바른 클론을 선택할 수 있었다.

[225] 이렇게 구축한 61 종류의 sRNA에 해당하는 타겟 유전자와 그에 해당하는 target binding sequence는 하기 표 1에 개시하였다.

[226]

[227] [표1]

합성조절 sRNA 의 목표 유전자들 및 서열

서열번호	목표 유전자	타겟 유전자 상 결합 염기서열 (5'-3')
42	<i>zwf</i>	ATGGCGGTAACGCAAACAGCCCAG
43	<i>tktA</i>	ATGTCCTCACGTAAAGAGCTTGCC
44	<i>pgi</i>	ATGAAAAACATCAATCCAACGCAG
45	<i>pfkA</i>	ATGATTAAGAAAATCGGTGTGTTG
46	<i>fbp</i>	ATGAAAACGTTAGGTGAATTTATT
47	<i>serC</i>	ATGGCTCAAATCTTCAATTTTAGT
48	<i>aroF</i>	ATGCAAAAAGACGCGCTGAATAAC
49	<i>aroA</i>	ATGGAATCCCTGACGTTACAACCC
50	<i>aroC</i>	ATGGCTGGAAACACAATTGGACAA
51	<i>pheA</i>	ATGACATCGGAAAACCCGTTACTG
52	<i>trpD</i>	ATGGCTGACATTCTGCTGCTCGAT
53	<i>dapA</i>	ATGTTACGCGGAAGTATTGTCGCG
54	<i>murE</i>	GTGGCAGATCGTAATTTGCGCGAC
55	<i>lysA</i>	ATGCCACATTCAGTTCAGCACC
56	<i>pps</i>	ATGTCCAACAATGGCTCGTCACCG
57	<i>aceE</i>	ATGTCAGAACGTTTCCCAAATGAC
58	<i>pta</i>	GTGTCCCGTATTATTATGCTGATC
59	<i>ackA</i>	ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTT
60	<i>pck</i>	ATGCGCGTTAACAATGGTTTGACC

[228]

61	<i>ppc</i>	ATGAACGAACAATATTCCGCATTG
62	<i>gltA</i>	ATGGCTGATACAAAAGCAAACTC
63	<i>fumA</i>	ATGTCAAACAAACCCTTTCATTAT
64	<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCT
65	<i>accA</i>	ATGAGTCTGAATTCCTTGATTTT
66	<i>fadD</i>	TTGAAGAAGGTTTGGCTTAACCGT
67	<i>fabH</i>	ATGTATACGAAGATTATTGGTACT
68	<i>aspC</i>	ATGTTTGAGAACATTACCGCCGCT
69	<i>aspA</i>	ATGTCAAACAACATTCGTATCGAA
70	<i>carB</i>	ATGCCAAAACGTACAGATATAAAA
71	<i>ilvH</i>	ATGCGCCGGATATTATCAGTCTTA
72	<i>ilvG</i>	ATGAATGGCGCACAGTGGGTGG
73	<i>ilvM</i>	ATGATGCAACATCAGGTCAATGTA
74	<i>ilvN</i>	ATGCAAAACACAACCTCATGACAAC
75	<i>ilvA</i>	ATGGCTGACTCGCAACCCCTGTCC
76	<i>ilvC</i>	ATGGCTAACTACTTCAATACACTG
77	<i>ilvE</i>	ATGACCACGAAGAAAGCTGATTAC
78	<i>asnA</i>	ATGAAAACCGCTTACATTGCCAAA
79	<i>asnB</i>	ATGTGTTCAATTTTTGGCGTATTC
80	<i>argH</i>	ATGGCACTTTGGGGCGGGCGTTTT
81	<i>deoA</i>	TTGTTTCTCGCACAAGAAATTATT
82	<i>glnA</i>	ATGTCCGCTGAACACGTACTGACG
83	<i>gdhA</i>	ATGGATCAGACATATTCTCTGGAG
84	<i>argA</i>	GTGGTAAAGGAACGTAAAACCGAG
85	<i>thrA</i>	ATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGGT
86	<i>metB</i>	ATGACGCGTAAACAGGCCACCATC

[229]

87	<i>metA</i>	ATGCCGATTCGTGTGCCGGACGAG
88	<i>tdh</i>	ATGAAAGCGTTATCCAACTGAAA
89	<i>ilvL</i>	ATGACAGCCCTTCTACGAGTGATT
서열번호	Transporters	타겟 유전자 상 결합 염기서열 (5'-3')
90	<i>livJ</i>	ATGAACATAAAGGGTAAAGCGTTA
91	<i>rhtC</i>	ATGTTGATGTTATTTCTCACCGTC
서열번호	Cell regulation	타겟 유전자 상 결합 염기서열 (5'-3')
92	<i>crp</i>	ATGGTGCTTGGCAAACCGCAAACA
93	<i>fadR</i>	ATGGTCATTAAGGCGCAAAGCCCG
94	<i>fur</i>	ATGACTGATAACAATACCGCCCTA
95	<i>lrp</i>	ATGGTAGATAGCAAGAAGCGCCCT
96	<i>pdhR</i>	ATGGCCTACAGCAAATCCGCCAA
97	<i>tyrR</i>	ATGCGTCTGGAAGTCTTTTGTA
98	<i>csrA</i>	ATGCTGATTCTGACTCGTCGAGTT
서열번호	Cell death	타겟 유전자 상 결합 염기서열 (5'-3')
99	<i>lexA</i>	ATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAA
100	<i>yohJ</i>	ATGAGTAAGACACTGAACATTATC
101	<i>chpA</i>	ATGGTAAGCCGATACGTACCCGAT
102	<i>parE</i>	ATGACGCAAACCTATAACGCTGAT

[230] 실시예 3. 구축한 sRNA 라이브러리를 이용한 유용물질 생산 미생물 공장 생산능 향상

[231] 실시예 2에서 제조한 sRNA 라이브러리를 이용하여 기존의 pWAS 기반 sRNA 라이브러리를 이용하여 쉽게 엔지니어링하지 못하였던 생산 균주를 개발하였다. 기존의 sRNA 시스템을 적용하기 어렵다고 함은 배경기술에 개시된 바와 같이 1) 생산 균주가 포함하고 있는 플라스미드의 항생제 저항성 마커 또는 복제 원점이 중복되거나, 2) 여러 개의 낙다운 유전자 타겟을 여러 조합으로 쉽게 적용하고자 할 때를 뜻한다. 본 연구진은 새로운 sRNA 플랫폼을 이용하여 위와 같은 한계들을 해결하였다.

[232] 3.1. 다양한 합성조절 sRNA 플랫폼을 이용한 트레오닌 (L-threonine) 증산

[233] 1) 단일 sRNA 플랫폼

- [234] 기존에 개발되었던 균주들 중 트레오닌 (L-threonine) 생산 균주는 100% rational하게 대사공학적으로 개량된 균주임에도 불구하고 유가식 발효를 통해 82.4 g/L의 매우 높은 트레오닌 생산능을 보이는 균주이다. 100% rational한 방법으로 이미 트레오닌을 매우 고농도로 생산하는 균주에 random-rational한 방법의 합성조절 sRNA를 적용하였을 때의 생산능은 개선될 수 있을 것이라 예상하였다.
- [235] 기존 트레오닌 생산 연구에서 트레오닌 생산 경로를 강화시키고, 트레오닌 생산 경로상의 효소들이 생산물에 의한 활성 저해를 받지 않도록 피드백 저항성 효소로 개량을 함과 더불어 트레오닌 트랜스포터 과발현등의 전략을 통하여 유가식 발효를 통하여 82.4 g/L의 고농도와 0.393 g/g (트레오닌/포도당)의 높은 수득률로 트레오닌 생산(TH28C - pBRThrABCR3 균주)에 성공한 바 있다 (K.H. Lee et al., Mol. Syst. Biol. (2007), 3(149)).
- [236] 상기 트레오닌 생산 균주에 실시예 2에서 구축한 CDF-Tc 기반의 sRNA 라이브러리 중 트레오닌 과생산에 적용 가능한 55개의 합성조절 sRNA 라이브러리를 적용하여 플라스크 배양을 진행하였다. 트레오닌 플라스크 배양을 위하여 글리세롤 세포 스타크를 5 mL LB가 포함된 테스트 튜브에 접종하였고, 16시간 배양 후 플라스크로 계대 배양하였다. 플라스크 배양은 30 mL의 50 g/L glucose가 첨가된 TPM1 배지를 포함하고 있는 배플 플라스크에서 31°C, 250 rpm, 48 시간 동안 진행되었으며, TPM1 배지는 1L 당 다음의 성분들을 포함하고 있다: 2 g yeast extract, 4 g KH₂PO₄, 14 g (NH₄)₂SO₄, 30 g CaCO₃, 2 g MgSO₄, 1 g betaine, 5 mL trace metal solution, 2 mM L-methionine, 2 mM L-lysine.
- [237] 플라스크 배양 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 기존에 보고된 생산 균주(TH28C - pBRThrABCR3 균주)에 대하여 플라스크 배양을 수행함으로써 약 16.68 g/L의 트레오닌을 수득한 반면, 55개의 합성조절 sRNA 라이브러리를 적용할 경우, 트레오닌 생산량이 21.68 g/L 까지 증가할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [238] 가장 트레오닌을 증산시킬 수 있었던 낙다운 유전자 타겟은 aroF 이고 pheA 또한 상당한 증산을 이루어냈다는 것을 감안하였을 때, 방향족 생산물로의 대사 흐름을 억제함으로써 트레오닌으로의 대사 흐름을 상당히 증가시킬 수 있었다고 판단된다(도 5). 뿐만 아니라, 트레오닌으로부터 이소루신을 생산하는 대사 경로 상의 ilvH, 아세트산의 축적에 관여하는 pta 등의 발현을 억제하였을 때에도 팔목할 만한 트레오닌 증산을 관찰할 수 있었다.
- [239]
- [240] 2) 다중 sRNA 플랫폼
- [241] 이렇게 단일 유전자 발현 억제를 통하여서도 상당한 증산을 관찰할 수 있었음에도, 본 연구진은 개발된 합성조절 sRNA 플랫폼을 최대한 활용하기 위하여 호환 가능한 두 가지 합성조절 sRNA 플라스미드를 이용하여 동시 이중 낙다운을 통한 트레오닌 증산을 관찰하고자 하였다.
- [242] 단일 유전자 발현 억제 실험을 통하여 총 55개의 유전자 타겟 중 트레오닌을

20% 이상 증산시키도록 하는 8개의 유전자 타겟을 선별할 수 있었다. 이 8개의 낙다운 타겟은 다음과 같다: *tktA*, *aroF*, *pta*, *ilvH*, *ilvE*, *glnA*, *fur*, *chpA*. 본 연구진이 구축한 합성조절 sRNA 플랫폼을 활용하면 언급된 8개의 낙다운 유전자 타겟들을 2개씩 조합하여 동시 이중 낙다운을 손쉽게 테스트할 수 있으며, 이를 통하여 트레오닌을 더욱 높은 수율로 생산해내는 균주를 선별할 수 있을 것으로 예상하였다.

[243] 기존의 합성조절 sRNA 플랫폼에서는 동시 다발적 낙다운을 위해서는 단일 벡터에 sRNA를 하나씩 새로이 재조합을 해야 하므로 시간이 오래 걸리며 여러 균주를 한 번에 제작하기 어려운 단점이 있었지만, 본 플랫폼을 활용하면 단순 형질전환을 통하여 유전자 재조합 없이 여러 균주를 한 번에 제작이 가능하다는 장점이 부각된다.

[244] 따라서 총 28개의 이중 유전자 낙다운 조합에 해당하는 균주들을 매우 손쉽게 제작하였으며, 이렇게 구축한 균주들에 대한 flask 배양 결과를 도 6에 개시하였다. 흥미롭게도, 동시 이중 유전자 발현 억제 실험을 통해서 총 28개의 균주들 중 3개의 균주에서 기존 모균주 대비 30% 이상 증산된 결과를 관찰할 수 있었다. 특히, *glnA-tktA*를 동시 낙다운한 균주에서는 약 37%의 증산된 트레오닌을 얻을 수 있었으며, 최대 22.94 g/L의 트레오닌을 수득하였다. 언급된 세 가지 유전자 낙다운 조합은 다음과 같다: *ilvE-tktA*, *glnA-tktA*, *chpA-pta*.

[245] 상기 실시예를 통해 서술한 바와 같이, CDF-Tc와 ColA-Sm 플랫폼 상에 미리 구축해둔 합성 조절 sRNA 라이브러리를 활용하여 이미 대사공학적으로 개량된 균주에 대한 다중 낙다운 테스트를 손쉽게 빠르며 효과적으로 진행할 수 있었다. 또한, 이미 rational하게, 산업 균주와 견줄 정도로 높은 농도의 트레오닌을 이미 생산하는 균주에 새로 구축한 sRNA를 적용하여 37% 가량 생산능을 끌어올린 것은 산업계에서도 가히 주목할 만하다고 할 수 있다.

[246]

[247] 3.2. 다양한 합성조절 sRNA 플랫폼을 이용한 프롤린 (L-proline) 증산

[248] 1) 단일 sRNA 플랫폼

[249] 본 발명에서는 합성조절 sRNA 플랫폼을 이용하여 프롤린 증산 균주를 개발하는데 활용하고자 하였다. 최근 가축 사료, 식품 첨가제, 의약 및 화합물 시장 등에서 매우 유용하게 사용되고 있는 프롤린 (L-proline)을 대량으로 생산할 수 있는 대장균 균주(NMH26 - p15PP3533, pKKtrcSargF-trcSglnA 균주)를 합성조절 sRNA를 이용하여 개발된 보고가 있다(KR 10-1750855 B1, M. Noh et al., Cell Systems (2017), 5, 1-9).

[250] 이 균주는 2개의 플라스미드를 가지고 있는데 하나는 프롤린의 생산을 위한 pTac15K 기반의 벡터이고, 또 하나는 ColE1 복제원점과 Ap 항생제를 갖는 합성조절 sRNA 플랫폼 벡터이다. 따라서 본 연구진은 위의 균주에 새로 구축된 합성조절 sRNA 플랫폼을 도입하여 이미 합성조절 sRNA를 통하여 증산이 된 균주임에도 불구하고 더욱 생산능을 끌어올리고자 하였다. 기존에 보고된

균주(NMH26 - p15PP3533, pKKtrcSargF-trcSglnA 균주)는 플라스크 상에서 1.95 g/L, 유가식 발효를 통하여 32.7 g/L의 프롤린을 생산하였다(KR 10-1750855 B1, M. Noh et al., Cell Systems (2017), 5, 1-9).

- [251] 이미 구축한 CDF-Tc 기반의 sRNA 라이브러리 중 프롤린 과생산에 적용 가능한 60개의 sRNA 라이브러리를 적용하여 플라스크 배양을 진행하였다. 플라스크 배양을 위하여 우선적으로 글리세롤 세포 스타크를 5 mL LB가 함유된 테스트 튜브에 접종하였고, 16시간 걸쳐 후, 플라스크에 계대배양 하였다. 플라스크 배양은 10 g/L glucose, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 첨가된 50 mL의 R/2 배지(pH 6.8)를 함유하는 배플 플라스크에서 37°C, 200 rpm에서 24 시간동안 진행하였으며, R/2 배지는 1L당 다음의 성분들을 포함하고 있다: 6.75 g KH_2PO_4 , 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.85 g citric acid, and 5 mL trace metal solution.
- [252] 플라스크 배양 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 20% 이상 증산된 균주는 총 7종이었으며, 이 균주들에 해당하는 유전자 낙다운 타겟은 다음과 같다: serC, murE, aspC, metB, fadR, fur, chpA. 특히 fur이 낙다운된 균주는 기존 균주 대비 약 38.4% 정도 증가된 프롤린 생산능을 보여주었는데, 플라스크 상에서 최대 2.72 g/L까지 생산 가능한 것을 확인하였다(도 7).

[253]

[254] 2) 다중 sRNA 플랫폼

[255] 합성조절 sRNA 플랫폼을 활용하여 프롤린을 더욱 증산시키고자, 호환 가능한 두 가지 합성조절 sRNA 플라스미드를 이용하여 동시 이중 낙다운을 통한 프롤린 증산을 관찰하였다. 프롤린이 20% 이상 증산된 결과를 보인 7개의 유전자 타겟들을 2개씩 조합하여 동시 이중 낙다운을 테스트하였고, 이들 균주들에 대한 플라스크 배양 결과는 도 8에 개시되어 있다.

[256] 그 결과, fur-metB가 동시 낙다운된 균주가 플라스크 배양시 40.8% (2.90 g/L)의 프롤린 증산을 나타내는 것을 확인하였다(도 8).

[257] 종합적으로 보면, 총 21개의 균주들 중 5개의 균주에서 기존 모균주 대비 30% 이상 증산된 결과를 관찰할 수 있었다. 언급된 다섯 가지 유전자 낙다운 조합은 다음과 같다: fur-murE, fur-metB, fur-fadR, chpA-fadR, fur-chpA. 이는 본래 모균주에 포함되어 있는 sRNA 플라스미드를 포함하여 총 세 개의 sRNA 플라스미드가 도입된 것으로써, 동시 다중 sRNA 낙다운 시스템을 통해 빠르고 쉽게 고효율 생산 균주를 제작할 수 있다는 점을 나타낸다

[258]

[259] 3.3. 합성조절 sRNA 플랫폼을 이용하여 증산된 프롤린 (L-proline) 생산 균주의 유가식 발효 공정 개발

[260] 1) 단일 sRNA 플랫폼

[261] 프롤린 생성능이 크게 향상된 균주들을 대상으로 유가식 발효를 진행하였다. 먼저 발효 공정을 최적화하기 위해 단일 유전자 발현 억제를 통해 가장 높은 증산을 이루어낸 fur 낙다운 균주를 사용하였다. 먼저 기존에 보고된 프롤린 균주

발효 조건을 활용하여 유가식 발효를 진행하였다(KR 10-1750855 B1).

- [262] NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA 균주(기존 특허 KR 10-1750855 B1에서의 프롤린 생산 균주)에 pCDFTc-fur 플라스미드(fur 낙다운을 위한 sRNA 벡터)가 삽입된 균주를 해당 항생제 (Km, Ap, Tc)가 함유된 5 mL LB가 들어있는 테스트 튜브에 접종한 후 37°C에서 16시간동안 배양하였다. 그 후, 10 g/L glucose, 3 g/L (NH₄)₂SO₄가 첨가된 R/2 배지 (pH 6.8) 50 mL이 들어있는 배플 플라스크 2개에 OD600이 2에 도달할 때까지 계대 배양을 수행하였다. 이렇게 키운 균주 100 mL은 10 g/L glucose, 3 g/L (NH₄)₂SO₄가 첨가된 1.9 L의 R/2 (pH 6.8) 배지가 들어있는 발효기에 접종하였다.
- [263] 발효 시 28% (v/v) 암모니아 용액을 통하여 pH는 6.8로 고정하였고, DO (dissolved oxygen concentration)는 공기로 인한 포화도의 40%로 설정하였는데, 이 때 교반기의 속도와 발효기로 들어가는 공기 대 산소의 비율로써 DO를 일정하게 조절하였다. 또한, 유가식 발효에서의 feeding 용액은 pH-stat 전략에 따라 들어갔는데, 발효기 시스템 상 pH가 6.83 이상으로 올라갔을 시 일정량의 feeding 용액이 자동으로 유입되도록 설정하였다. 이 때 발효용 feeding 용액은 1 L당 다음의 성분들을 포함하고 있다: 650 g glucose, 85 g (NH₄)₂SO₄, 8 g/L MgSO₄·7H₂O. 그 결과, 도 9-a에 개시된 바와 같이 발효기에 접종한 균주는 거의 자라지 못하고 성장을 멈추었다. 이번에는 flask와 발효 배지에 각각 1.6 g/L의 yeast extract를 첨가해주었는데, 균주의 성장이 다소 회복이 되긴 했지만 아직은 상대적으로 낮은 수준인 것을 확인하였다(도 9-b). 추가적으로 발효 배지에 3 g/L yeast extract를 추가하였고 fur이 낙다운 될 시 세포 내 금속 이온 관련 대사 회로가 제대로 작동하지 않을 수 있으므로 feeding 용액에 6 mL trace metal solution을 첨가하였다.
- [264] 그 결과, 도 9-c에 개시된 바와 같이 획기적으로 향상된 세포 성장을 관찰할 수 있었고, 프롤린의 농도 또한 51.6 g/L로 크게 증산되었다. 이는 기존에 보고된 프롤린 생산량 (33.8 g/L) 에 비교하여 52.7% 증산된 결과이다 (Noh et al., Cell Systems, 2017, KR 10-1750855 B1).
- [265] 이렇게 최적화된 유가식 발효 조건에서 기존의 보고된 균주를 배양하였을 때도 기존에 보고된 농도와 비슷한 프롤린이 생산되는 것을 확인하였다(도 9-d).
- [266] 본 연구진은 최적화된 유가식 발효 조건에서 상기 실시예 3.2를 통하여 제작 프롤린 고생산능 균주들을 배양하고 프롤린 생산량을 측정하였다. 단일 낙다운 균주들 4종에 대하여 유가식 발효를 진행하였는데, 그 결과는 도 10-a의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur 균주 (51.6 g/L), 도 10-b의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fadR 균주 (33.8 g/L), 도 10-c의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-aspC 균주 (41.4 g/L), 도 10-d의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-mazF 균주 (25.2 g/L) 와 같다.
- [267]
- [268] 2) 이중 sRNA 플랫폼

- [269] 이 중 낙다운 균주들에 대한 유가식 발효를 진행하였고, 그 결과는 도 11-a의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-metB 균주 (55.3 g/L), 도 11-b의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-murE 균주 (41.3 g/L), 도 11-c의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-chpA pColASm-fur 균주 (47.1 g/L), 도 11-d의 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-chpA pColASm-fadR 균주 (38.6 g/L) 와 같다.
- [270] 이 때 가장 프롤린 생산능이 좋은 균주는 NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-metB 균주 (fur과 metB가 이중으로 낙다운 되어 있는 균주), 55.3 g/L의 높은 생산 농도, 1.053 g/L/h의 높은 생산능, 그리고 0.200 g proline/g glucose의 수율을 나타내었다. 생산 농도 면에서, 이는 기존에 보고된 프롤린 생산량 (33.8 g/L) 에 비교하여 63.6% 증산된 결과이다 (Noh et al., Cell Systems, 2017, KR 10-1750855 B1). 언급한 모든 균주들에 대한 유가식 발효들에 대한 결과를 하기 표 2에 정리하였다.
- [271] 또한, 상기 프롤린 생산 균주들의 유가식 발효 과정 동안 exponential phase와 stationary phase 상태에 있는 세포들에 sRNA가 안정히 남아있는지 확인하기 위하여 colony PCR을 진행한 결과, 도 12에 개시된 바와 같이 모든 sRNA 벡터들이 안정적으로 유지된 것을 확인하였다.
- [272] 상기 실시예를 통해 서술한 바와 같이, CDF-Tc와 ColA-Sm 플랫폼 상에 미리 구축해둔 합성 조절 sRNA 라이브러리를 활용하여 이미 대사공학적으로 개량된 균주에 대한 다중 낙다운 테스트를 손쉽고 빠르게 효과적으로 진행할 수 있었으며, 이렇게 구축된 균주는 유가식 발효에서도 매우 뛰어난 성능을 보임으로써 산업 균주로의 개발에 매우 큰 가능성을 보여주었다. 더욱이 기존 대사공학적 전략을 통하여 도입된 두 개의 합성 조절 sRNA와 새로이 도입된 두 개의 합성 조절 sRNA까지 총 네 개의 합성 조절 sRNA를 포함한 균주가 유가식 배양에서 매우 양호한 성장을 보이며 매우 높은 프롤린 생산능을 보여주었다는 점은 당업계에서도 매우 주목할 만 하며, 향후 산업 균주로의 활용성을 보여주는 단적인 예시라 할 수 있다.
- [273]

[274] [표2]

sRNA 플랫폼들을 통하여 개량된 프롤린 생산 균주들에 대한 유가식 발효 결과.

No.	Strains	Titer (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (g/g)
1	NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA (Noh et al., Cell Systems, 2017)	33.8		
2	NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA (with optimized condition)	34.3	1.16	0.172
3	NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur	51.6	0.860	0.258
4	NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fadR	33.7	0.748	0.257
5	NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-mazF	25.2	0.525	0.294
6	NMH26 p15PP3533 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-aspC	41.4	0.796	0.217
7	NMH26 p15PP3534 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-metB	55.3	1.053	0.200
8	NMH26 p15PP3535 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-fur pColASm-murE	41.3	0.898	0.187
9	NMH26 p15PP3536 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-chpA pColASm-fur	47.1	0.818	0.166
10	NMH26 p15PP3537 pKKtrcSargF-trcSglnA pCDFTc-chpA pColASm-fadR	38.6	0.988	0.172

[275] 실시예 4. 유전체 수준 sRNA 라이브러리의 플랫폼 이전 기술 및 이를 이용한 고속 스크리닝 기법

[276] 합성조절 sRNA를 다양한 환경 및 다양한 생산균주에 적용하기 위해서 유전체 수준의 sRNA 발현 플랫폼을 다른 플랫폼으로 손쉽게 이전할 수 있는 방법을 개발하였다(도 13). 본 실시예에서는 ColE1 복제원점과 Ap 항생제 마커를 가지고 있는 플랫폼 플라스미드 (pWAS)로부터 본 발명에서 새로이 만든 ColA-Sm 플랫폼 플라스미드로 합성조절 sRNA 를 이전하는 것으로 예시로 사용하였다. 본 연구진은 기존 연구를 통하여 대장균 유전체 수준 합성 조절 sRNA

라이브러리 (1,858개의 타겟 유전자에 대한)를 구축한 바 있다 (D. Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA (2018), 115(40): 9835-9844).

[277] 본 전략은 김슨 어셈블리를 이용한 것으로 ColA-Sm 플랫폼 플라스미드를 [서열번호36]와 [서열번호37] 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다. sRNA 라이브러리의 각 개체끼리 비교하였을 때, 서로 다른 sRNA 벡터들 사이에는 mRNA target binding sequence 24 bp를 제외한 모든 다른 DNA 서열이 동일하므로, pWAS sRNA library를 템플릿으로 하여 [서열번호38] / [서열번호39] 프라이머를 이용하여 1,858개의 서로 다른 mRNA target binding sequence를 포함하고 있는 sRNA 조각들을 PCR 증폭시켰다. 그 후, sRNA 라이브러리 조각들과 ColA-Sm 조각이 gibson assembly를 통하여 원형 벡터로 합친 후, E. coli DH5α 균주에 형질 전환하였다.

[278] 이 때 1,858개의 모든 sRNA를 새로운 플랫폼에 수용하기 위하여 약 25,000개 (library 사이즈의 약 13.5배)의 콜로니를 얻을 때까지 반복 수행하였고, 얻어진 모든 콜로니를 섞은 후 maxiprep을 통하여 새로운 ColA-Sm 플랫폼 기반의 sRNA 라이브러리를 얻는데 성공하였다 (도 13). 이 때 유전체 수준 합성 조절 sRNA 라이브러리를 새로운 플랫폼으로 이전하는데 걸린 시간은 2일로, 이는 한정된 인력으로 새로이 유전체 수준 합성 조절 sRNA 라이브러리를 구축하게 된다면 걸리는 시간인 수 주 ~ 수 개월과 비교한다면 획기적으로 시간, 인력 및 자원을 절약할 수 있다는 점에서 주목할 만하다.

[279]

[서열번호36] 5'-AGTCAACACGCACGGTGTTAG-3'

[서열번호37] 5'-CAATTCGCCCTATACCTCCTG-3'

[서열번호38] 5'-TAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTAC-3'

[서열번호39] 5'-CAGGAGGTATAGGGCGAATTG-3'

[280] 실시예 5. 플랫폼 이전된 sRNA 라이브러리와 고속 스크리닝을 활용한 인디고 (indigo) 증산

[281] 실시예 4에서 구축한 sRNA 라이브러리를 인디고 생산 균주에 도입하여 증가된 생성능을 갖는 인디고 생산 균주를 선별하고자 하였다. 인디고는 Indigofera 계통의 식물에서 생산되는 천연 염료로써 청바지 등의 염색에 주로 사용되는 방향족 아미노산 계통의 화합물이다. 기존에는 자연 추출법을 통해 생산되며, 현재는 화학적 합성법에 의해 거의 모든 수요가 충당된다.

[282] 기존에 보고된 인디고 생산 균주(IND5 - pTrc-TF1, pTac-GEL 균주)는 유가식 발효에서는 0.640 g/L의 농도 및 플라스크 수준에서는 0.108 g/L의 농도로 인디고를 생산하였다(J. Du et al., J Biotechnol., 2018, 267, 19-28). 기존에 보고된 인디고 생산 균주(IND5 - pTrc-TF1, pTac-GEL 균주)는 pWAS와 항생제 저항성

마커와 복제 원점이 동일한 벡터를 지니고 있어 바로 적용이 불가능하다. 또한, 콜로니가 푸른색을 띠므로써 손쉽게 생산능의 증감을 눈으로 확인할 수 있다는 장점을 지니고 있었다. 따라서 새로이 구축된 sRNA 라이브러리를 인디고 생산 균주에 도입하여 콜로니 스크리닝을 통하여 인디고 생산능이 향상된 개량 균주를 선별하였다.

- [283] 먼저 실시예 4에서 구축한 플랫폼의 (ColA-Sm) sRNA 라이브러리를 인디고 생산 균주에 형질전환시켰고, 약 20,000개 이상의 콜로니를 얻을 수 있었다. 이들 중 더욱 진한 색을 띠는 84종의 콜로니를 선별할 수 있었고, 선별된 균주들을 3 mL LB 배지에서 37°C 200rpm에서 16시간동안 pre-cultivation, 그리고 잇따른 3 mL의 10 g/L glucose가 첨가된 MR 배지 small scale cultivation을 통하여 30°C에서 48시간동안 250 RPM에서 배양하였다. 세포들의 OD600이 약 0.6-0.8이 되었을 때 1 mM IPTG로 외래 유전자 발현을 유도시켰다. 이 때, MR 배지는 기존 논문 (J. Du et al., J Biotechnol., 2018, 267, 19-28) 에서 보고된 바와 같은 조성의 MR 배지를 사용하였으며, MR 배지는 1L당 다음의 성분들을 포함하고 있다: 6.67 g of KH₂PO₄, 4 g of (NH₄)₂HPO₄, 0.8 g of MgSO₄·7H₂O, 0.8 g of citric acid, 5 mL of trace metal solution.
- [284] 배양 결과는 도 14에 개시된 바와 같으며, 이러한 초기 스크리닝을 통하여 최대 246% 증산된 균주를 선별할 수 있었다 (기존 균주 생산량인 33.3 mg/L 대비 81.9 mg/L까지 증산). 이 때, 가장 높은 인디고 생산능을 지닌 상위 9개의 균주들을 선정하여 10 g/L glucose가 첨가된 50 mL MR 배지에서 30°C, 200 rpm에서 72시간동안 배양을 수행한 다음, 세포들의 OD600이 약 0.6-0.8이 되었을 때 1 mM IPTG로 외래 유전자 발현을 유도시켰다.
- [285] 그 결과, 도 15에 개시된 바와 같이 asnA 낙다운 균주에서 134.84 mg/L까지 인디고 생산량이 증가하는 것을 확인하였다.
- [286]
- [287] 실시예 6. 플랫폼 이전된 sRNA 라이브러리와 고속 스크리닝을 활용한 비올라세인 (violacein) 증산
- [288] 실시예 4에서 제작한 ColA-Sm 플랫폼으로 이전된 대장균 유전체 수준 sRNA 라이브러리를 다른 이차 대사 산물인 비올라세인에 적용하였다. 비올라세인(violacein)과 그 이성질체인 디옥시비올라세인(deoxyviolacein)은 항암 효과 등 많은 의학적 효능을 지니고 있으나, 그 동안 너무 낮은 생산량으로 인하여 연구의 동력이 부족한 실정이었다. 따라서 비올라세인과 디옥시비올라세인의 과량 생산을 통하여 위 문제를 해결하고자 하였다.
- [289]
- [290] 6.1. 플랫폼 이전된 sRNA 라이브러리와 고속 스크리닝을 활용한 비올라세인 (violacein) 증산
- [291] 비올라세인의 생산을 위해서는 vioABCDE의 다섯가지 유전자가 필요한데, 우선적으로 vioABDE를 포함하고 있는 iGEM fragment를 활용하기로 하였다

(Part BBa_K598019; MIT Registry of Standard Biological Parts). 본 플라스미드는 pSB1C3 (chloramphenicol 저항 항생제 마커, pUC 기반 복제원점)를 기반 벡터로 삼고 있다. 따라서 나머지 필요한 vioC 유전자를 pTac15K 벡터에 클로닝하고자 다음과 같은 방법을 사용하였다. 우선 *Janthonobacterium lividum*의 genomic DNA를 추출 후, 이를 템플릿으로 활용하여 [서열번호 40], [서열번호 41]를 프라이머로 사용하여 vioC DNA 조각을 증폭하였다. 그 후 EcoRI, KpnI site를 통해 vioC 조각을 Gibson assembly를 활용하여 삽입하였다.

[292]

[서열번호 40] 5'-caatttcacacaggaaacaga ATGCATAAAATCATTATCGTCG-3'

[서열번호

41]

5'-CTCTAGAGGATCCCCGGGTACC

TCATTAATTTACCCTTCCAAG-3'

[293]

E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주를 기반 균주로 활용하기로 하였고, 해당 균주에 실시예 4에서 제작한 ColA-Sm 기반 대장균 유전체 수준 sRNA 라이브러리를 형질전환한 후, 20,000개 이상의 콜로니를 얻었다. 이 후 향상된 비올라세인 생산능을 지닌 균주 선별 과정은 실시예 5와 동일하게 수행하였다. 보다 자세히는 이들 중 더욱 진한 보라색을 띠는 32종의 콜로니를 선별할 수 있었고, 선별된 균주들을 3 mL LB 배지에서 37°C 200rpm에서 16시간동안 pre-cultivation, 그리고 잇따른 3 mL의 10 g/L glucose가 첨가된 MR 배지 small scale cultivation을 통하여 30°C에서 48시간동안 250 RPM에서 배양하였다.

[294]

배양 결과는 도 16에 개시된 바와 같으며, 이러한 초기 스크리닝을 통하여 비올라세인이 최대 545%, 디옥시비올라세인이 최대 784% 증산된 균주를 선별할 수 있었다. 이 때, 가장 높은 비올라세인/디옥시비올라세인 생산능을 지닌 상위 12개의 균주들을 선정하여 10 g/L glucose가 첨가된 50 mL MR 배지에서 30°C, 200 rpm에서 48시간동안 배양한 다음, 세포들의 OD600이 약 0.6-0.8이 되었을 때 1 mM IPTG로 외래 유전자 발현을 유도하였다.

[295]

그 결과, 도 17에 개시된 바와 같이 비올라세인 생산량이 가장 많이 증가한 균주는 ytfR 낙다운 균주였으며 0.656 g/L까지 증산된 비올라세인 생산능을 나타내었다(기반 균주 0.116 g/L 생산). 또한, 가장 높은 디옥시비올라세인 생산능을 보인 균주는 minD 낙다운 균주였으며 52.1 mg/L까지 증산된 디옥시비올라세인 생산능을 나타내었다(기반 균주 21.7 mg/L 생산).

[296]

[297]

6.2. 합성조절 sRNA 플랫폼을 이용하여 증산된 비올라세인 (violacein) 생산 균주의 유가식 발효 공정 개발

[298]

비올라세인 생성능이 크게 향상된 균주들을 대상으로 유가식 발효를 진행하였다. 이 때 실시예 6.1에서 플라스크 배양 결과 비올라세인 생산능이

제일 좋았던 ytfR 낙다운 균주와 디옥시비올라세인 생산능이 제일 좋았던 minD 낙다운 균주에 대하여 각각 유가식 발효를 진행하고자 하였다. E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주에 pColA-ytfR 플라스미드(ytfR 낙다운을 위한 sRNA 벡터)가 삽입된 균주와 E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주에 pColA-minD 플라스미드(minD 낙다운을 위한 sRNA 벡터)가 삽입된 균주를 해당 항생제 (Cm, Km, Spc)가 함유된 5 mL LB가 들어있는 테스트 튜브에 접종한 후 30°C에서 16시간동안 배양하였다. 그 후, 20 g/L glucose, 3 g/L (NH₄)₂SO₄가 첨가된 MR 배지 (pH 7.0) 50 mL이 들어있는 배플 플라스크 2개에 OD600이 4에 도달할 때까지 계대 배양을 수행하였다. 이렇게 키운 균주 100 mL은 20 g/L glucose, 3 g/L (NH₄)₂SO₄가 첨가된 1.9 L의 MR (pH 7.0) 배지가 들어있는 발효기에 접종하였다.

- [299] 발효 시 28% (v/v) 암모니아 용액을 통하여 pH는 7.0로 고정하였고, DO (dissolved oxygen concentration)는 공기로 인한 포화도의 40%로 설정하였는데, 이때 교반기의 속도와 발효기로 들어가는 공기 대 산소의 비율로써 DO를 일정하게 조절하였다. 또한, 유가식 발효에서의 feeding 용액은 pH-stat 전략에 따라 들어갔는데, 발효기 시스템 상 pH가 7.05 이상으로 올라갔을 시 일정량의 feeding 용액이 자동으로 유입되도록 설정하였다. 이 때 발효용 feeding 용액은 1 L당 다음의 성분들을 포함하고 있다: 650 g glucose, 85 g (NH₄)₂SO₄, 8 g/L MgSO₄·7H₂O, 6 mL trace metal solution.
- [300] E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주에 pColA-ytfR 플라스미드가 삽입된 균주의 유가식 발효 결과, 도 18-a에 개시된 바와 같이 1.80 g/L의 비올라세인과 0.55 g/L의 디옥시비올라세인이 생산되었다. 또한, E. coli BL21 pSB1C3-vioABDE pTac15K-Jli-vioC 균주에 pColA-minD 플라스미드가 삽입된 균주의 유가식 발효 결과, 도 18-b에 개시된 바와 같이 1.10 g/L의 비올라세인과 0.78 g/L의 디옥시비올라세인이 생산되었다.
- [301] 또한, 상기 비올라세인 생산 균주들의 유가식 발효 과정 동안 exponential phase와 stationary phase 상태에 있는 세포들에 sRNA가 안정히 남아있는지 확인하기 위하여 colony PCR을 진행한 결과, 도 18-c에 개시된 바와 같이 모든 sRNA 벡터들이 안정적으로 유지된 것을 확인하였다.
- [302] 상기 실시예에서 서술한 바와 같이, 매우 빠른 시일 내에 유전체 수준 합성 조절 sRNA 라이브러리를 새로운 플랫폼으로 이전할 수 있었으며, 이는 인디고와 비올라세인의 증산에 매우 효과적임이 증명되었다. 더욱이, 비올라세인 생산 균주의 경우, 스크리닝된 합성 조절 sRNA를 포함하고 있는 균주의 유가식 발효를 통하여 본 스크리닝 방법이 매우 효과적이라는 점이 증명되었으며, 기존 대사공학적 균주 개발법을 통하여 수 개월 ~ 수 년동안 실험을 수행하여 얻을 수 있는 비올라세인/디옥시비올라세인 생산 농도를 수 일만에 얻을 수 있었다는 점은 당업계에서는 가히 주목할 만하다.

[303]

[304] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[305]

산업상 이용가능성

[306] 본 발명의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템은 기존의 유전자 결실방법과는 달리 타겟 유전자의 서열을 변형하지 않으면서 특정 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 합성조절 sRNA 기반 유전자 발현조절 시스템으로서, 다양한 벡터를 포함하여 원핵생물에서 활용 가능한 다른 플라스미드들과 호환성 있게 사용될 수 있고 동시다중 도입이 가능하도록 설계하여 빠르고 효율적인 재조합 미생물 제조에 유용하다.

[307] 본 발명에 따른 미생물 대사 흐름 조절을 통해 개발된 프롤린 또는 트레오닌 고효율 생산용 재조합 미생물은 축산용 사료 및 산업용제 미생물로 유용하다. 또한, 본 발명에서 개발한 대장균 유전체 수준의 합성조절 sRNA 라이브러리 이전 기술을 고속 스크리닝 기법과 접목함으로써 기존 기술에서는 불가능했던 획기적인 생산능 증가를 이룩하였다. 본 발명에 따른 인디고 또는 비올라세인 고효율 생산 균주 역시 의약품 및 산업용제 미생물로 매우 유용하다. 따라서, 본 발명은 산업적, 의학적으로 유용한 다양한 대사 산물의 효율적 생산을 위한 재조합 균주의 제작 및 효율적 생산 방법 확립에 사용할 수 있어 유용하다.

[308]

서열목록 Free Text

[309] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1백터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q백터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포 도입되어 있는 재조합 미생물로, 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적 유전자와 제p표적 유전자는 서로 각각 상이하며, n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며, 상기 항생제는 앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라라시클린(oxytetracycline), 팩리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고, 상기복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며, 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적 유전자 발현 억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 2] 다음의 단계를 포함하는 유용물질 생산균주의 개량방법:

- (a) 20~50bp 크기를 가지는 임의의 염기서열을 제조하는 단계;
 (b) 상기 염기서열을 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1 벡터의 표적유전자 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 삽입하여 제1 sRNA 라이브러리를 포함하는 제1 벡터 라이브러리를 제조하는 단계;
 (c) 상기 제1 벡터 라이브러리를 유용물질을 생산하고자 하는 대상 균주에 도입하여, 유용물질 생산량이 향상되는 경우, 발현이 억제된 유전자 후보군을 동정하여, 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자로 결정하는 단계;
 (d) 상기 결정된 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자를 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 상기 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터에 각각 삽입하는 단계; 및
 (e) 상기 발현억제 대상 유전자를 포함하는 q개의 벡터가 도입된 제조합 균주를 제조하는 단계,

여기서,

상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 2 내지 500개의 발현억제 대상 유전자는 서로 각각 상이하며,

n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, q는 2 내지 500의 정수인 것을 특징으로 함.

[청구항 3]

제1항에 있어서, 상기 원핵생물은 대장균, 리조비움(Rhizobium), 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 로도코커스 (Rhodococcus), 칸디다 (Candida), 에르위니아(Erwinia), 엔테로박터 (Enterobacter), 파스테렐라(Pasteurella), 맨하이미아 (Mannheimia), 액티노바실러스 (Actinobacillus), 아그레가티박터(Aggregatibacter), 잔토모나스(Xanthomonas), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스(Pseudomonas), 아조토박터(Azotobacter), 애시네토박터(Acinetobacter), 랄스토니아(Ralstonia), 아그로박테리움(Agrobacterium), 로도박터(Rhodobacter), 자이모모나스(Zymomonas), 바실러스(Bacillus), 스테필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 클로스트리디움(Clostridium), 코리네박테리움(Corynebacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 사이아노박테리움(cyanobacterium) 및 사이클로박테리움(Cyclobacterium)로 구성되는 균에서 선택되는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 제조합 미생물.

- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 프로모터는 *tac*, *trc*, T7, BAD, λ PR 및 앤더슨 합성 프로모터로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 Hfq 결합부위는 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 터미네이터는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 표적유전자는 DsRed2, LuxR, AraC, KanR (kanamycin resistance gene), *tyrR*(tyrosine regulator), *ppc* (phosphoenolpyruvate carboxylase), *csrA* (carbon storage regulator), *pgi* (glucose-6-phosphate isomerase), *glt* (citrate synthase), *accA* (acetyl-CoA carboxyltransferase, alpha-subunit), *accB* (biotinylated biotin-carboxyl carrier protein), *accC* (acetyl-CoA carboxylase), *accD* (acetyl-CoA carboxyltransferase, beta-subunit), *aceE* (subunit of E1p component of pyruvate dehydrogenase complex), *aceF* (pyruvate dehydrogenase), *ackA* (propionate kinase / acetate kinase activity), *adiY* (AdiY is a positive DNA-binding transcriptional regulator that controls the arginine decarboxylase (*adi*) system), *argB* (acetylglutamate kinase), *argC* (N-acetylglutamylphosphate reductase), *argG* (argininosuccinate synthase), *argH* (argininosuccinate lyase), *asnC* (transcriptional regulator that activates the expression of *asnA*, a gene involved in the synthesis of asparagine), *aspA* (aspartate ammonia-lyase), *crp* (CRP transcriptional dual regulator), *csiD* (predicted protein. CsiD is the product of a gene induced by carbon starvation), *csiR* (DNA-binding transcriptional repressor), *cytR* (transcription factor required for transport and utilization of ribonucleosides and deoxyribonucleosides), *dcuA* (The DcuA transporter is one of three transporters known to be responsible for the uptake of C4-dicarboxylates such as fumarate under anaerobic conditions), *deoB* (phosphopentomutase), *deoC* (deoxyribose-phosphate aldolase), *deoR* (The transcriptional repressor DeoR, for "Deoxyribose Regulator," is involved in the negative expression of genes related to transport and catabolism of deoxyribonucleoside nucleotides), *fabH* (KASIII, -ketoacyl-ACP synthases), *fadD* (fatty acyl-CoA synthetase), *fadR*

(FadR Fatty acid degradation Regulon, is a multifunctional dual regulator that exerts negative control over the fatty acid degradative regulon [Simons80, Simons80a] and acetate metabolism), fbp (fructose-1,6-bisphosphatase), fnr (FNR is the primary transcriptional regulator that mediates the transition from aerobic to anaerobic growth), fruR (FruR is a dual transcriptional regulator that plays a pleiotropic role to modulate the direction of carbon flow through the different metabolic pathways of energy metabolism, but independently of the CRP regulator), ftsL (essential cell division protein FtsL), ftsQ (essential cell division protein FtsQ), ftsW (essential cell division protein FtsW), ftsZ (essential cell division protein FtsZ), fur (Fur-Fe²⁺ DNA-binding transcriptional dual regulator), gabD (succinate semialdehyde dehydrogenase, NADP⁺-dependent), gabP (APC transporter), gabT (4-aminobutyrate aminotransferase), gadA (glutamate decarboxylase A subunit), gadB (glutamate decarboxylase B subunit), gadC (GABA APC transporter), glcC (GntR family transcriptional regulator, glc operon transcriptional activator), glpK (glycerol kinase), glpR (sn-Glycerol-3-phosphate repressor), glpX (fructose 1,6-bisphosphatase II), gltA (citrate synthase), hflD (lysogenization regulator), ihfA (IHF, Integration host factor, is a global regulatory protein), ihfB (IHF, Integration host factor, is a global regulatory protein), ilvB (acetohydroxybutanoate synthase/acetolactate synthase), ilvC (acetohydroxy acid isomeroreductase), ilvD (dihydroxy acid dehydratase), ilvG_1 (acetolactate synthase II, large subunit, N-ter fragment (pseudogene)), ilvG_2 (acetolactate synthase II, large subunit, C-ter fragment (pseudogene)), ilvH (acetolactate synthase/acetohydroxybutanoate synthase), ilvL (ilvGEDA operon leader peptide), ilvM (acetohydroxybutanoate synthase/acetolactate synthase), ilvN (acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase), ilvX (Predicted small protein), lexA (LexA represses the transcription of several genes involved in the cellular response to DNA damage), lpxC (UDP-3-O-acetyl-N-acetylglucosamine deacetylase), marA (MarA participates in controlling several genes involved in resistance to antibiotics, oxidative stress, organic solvents and heavy metals.), metJ (MetJ transcriptional repressor), modE (ModE is the principal regulator that controls the transcription of operons involved in the transport of molybdenum and synthesis of molybdoenzymes and molybdate-related functions), nadB (L-aspartate oxidase), narL (nitrate/nitrite response regulator), pck (phosphoenolpyruvate carboxykinase), PdhR (PdhR, "pyruvate dehydrogenase complex regulator," regulates genes involved in the pyruvate dehydrogenase complex), phoP (PhoP-Phosphorylated DNA-binding transcriptional dual regulator. Member of

the two-component regulatory system phoQ/phoP involved in adaptation to low Mg²⁺ environments and the control of acid resistance genes), *pnuC* (PnuC NMN transporter), *ppsA* (phosphoenolpyruvate synthetase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *purA* (adenylosuccinate synthetase), *purB* (adenylosuccinate lyase), *purR* (PurR Hypoxanthine DNA-binding transcriptional repressor. PurR dimer controls several genes involved in purine nucleotide biosynthesis and its own synthesis), *puuE* (4-aminobutyrate aminotransferase), *rbsA* (ribose ABC transporter), *rbsB* (ribose ABC transporter), *rbsD* (ribose pyranase), *rbsK* (ribokinase), *rbsR* (The transcription factor RbsR, for "Ribose Repressor," is negatively autoregulated and controls the transcription of the operon involved in ribose catabolism and transport), *rbsB* (RcsB-BglJ DNA-binding transcriptional activator. RcsB protein for "Regulator capsule synthesis B," is a response regulator that belongs to the multicomponent RcsF/RcsC/RcsD/RcsA-RcsB phosphorelay system and is involved in the regulation of the synthesis of colanic acid capsule, cell division, periplasmic proteins, motility, and a small RNA), *rutR* (RutR regulates genes directly or indirectly involved in the complex pathway of pyrimidine metabolism), *serA* (alpha-ketoglutarate reductase / D-3-phosphoglycerate dehydrogenase), *serC* (phosphohydroxythreonine aminotransferase / 3-phosphoserine aminotransferase), *soxS* (dual transcriptional activator and participates in the removal of superoxide and nitric oxide), *sroD* (SroD small RNA), *zwf* (glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase), *asnA* (asparagine synthetase A), *asnB* (asparagine synthetase B), *carA* (carbamoyl phosphate synthetase), *carB* (carbamoyl phosphate synthetase), *ddlB* (D-alanine-D-alanine ligase B), *deoA* (thymidine phosphorylase / uracil phosphorylase), *deoD* (purine nucleoside phosphorylase deoD-type), *dpiA* (dual transcriptional regulator involved in anaerobic citrate catabolism), *fis* (Fis, "factor for inversion stimulation", is a small DNA-binding and bending protein whose main role appears to be the organization and maintenance of nucleoid structure), *gadE* (GadE controls the transcription of genes involved in glutamate dependent system), *gadW* (GadW controls the transcription of genes involved in glutamate dependent system), *gadX* (GadX controls the transcription of genes involved in glutamate dependent system), *glpF* (GlpF glycerol MIP channel), *ilvY* (IlvY DNA-binding transcriptional dual regulator), *ivbL* (The *ilvB* operon leader peptide (IvbL)), *lhgO* (L-2-hydroxyglutarate oxidase), *lpd* (Lipoamide dehydrogenase), *lrp* (Lrp is a dual transcriptional regulator for at least 10% of the genes in *Escherichia coli*. These genes are involved in amino acid biosynthesis and catabolism, nutrient) transport, pili synthesis, and other

cellular functions, including 1-carbon metabolism), metB (O-succinylhomoserine lyase / O-succinylhomoserine(thiol)-lyase), metL (aspartate kinase / homoserine dehydrogenase), mraY (phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase), mraZ (Unknown function), murE (UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate 2,6-diaminopimelate ligase), murF (D-alanyl-D-alanine-adding enzyme), murG (N-acetylglucosaminyl transferase), nac (Nacregulates, without a coeffectector, genes involved in nitrogen metabolism under nitrogen-limiting conditions), nadA (quinolinate synthase), nsrR (NsrR, the "nitritesensitive repressor" regulates genes involved in cell protection against nitric oxide (NO)), panC (pantothenate synthetase), panD (Aspartate 1-decarboxylase), pgl (6-phosphogluconolactonase), pyrB (aspartate carbamoyltransferase, PyrB subunit), pyrC (dihydroorotase), pyrL (aspartate carbamoyltransferase, PyrL subunit), rob (Rob is a transcriptional dual regulator. Its N-terminal domain shares 49% identity with MarA and SoxS. These proteins activate a common set of about 50 target genes, the marA/soxS/rob regulon, involved in antibiotic resistance, superoxide resistance, and tolerance to organic solvents and heavy metals.) , rpe (ribulose phosphate 3-epimerase), talA (transaldolase A), thrA (aspartate kinase / homoserine dehydrogenase), thrB (homoserine kinase), thrC (threonine synthase), thrL (thr operon leader peptide), tktA (transketolase I), tktB (transketolase II), torR (two-component system, OmpR family, torCAD operon response regulator TorR), aroF (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, tyrosine-repressible), aroA (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase), aroC (Chorismate synthase), pheA (chorismate mutase and prephenate dehydratase, P-protein), trpD (fused glutamine amidotransferase (component II) of anthranilate synthase/anthranilate phosphoribosyl transferase), dapA (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase), ilvE (Branched-chain-amino-acid aminotransferase), lysA (Diaminopimelate decarboxylase), gltA (citrinate synthase), fumA (Fumarate hydratase class I, aerobic), glnA (glutamine synthetase), mdh (malate dehydrogenase), gdhA (NADP-specific glutamate dehydrogenase), argA (amino acid N-acetyltransferase and inactive acetylglutamate kinase), metA (Homoserine O-succinyltransferase), tdh (L-threonine dehydrogenase), livJ (branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic binding protein), rhtC (Threonine efflux protein), yohJ (UPF0299 membrane protein), chpA (antitoxin of the ChpA-ChpR toxin-antitoxin system), aspC (aspartate aminotransferase), pfkA (ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1), parE (DNA topoisomerase 4 subunit B),

ytfR (predicted sugar transporter subunit), ilvA (L-threonine dehydratase, biosynthetic; also known as threonine deaminase), ilvG (Acetolactate synthase), minD (inhibitor of FtsZ ring polymerization; chromosome-membrane tethering protein; membrane ATPase of the MinCDEE system), hisJ (histidine transport system substrate-binding protein), yneH (Glutaminase), napG (Ferredoxin-type protein NapG), kdsA (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase), ygfA (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase), ftsI (cell division protein FtsI (penicillin-binding protein 3)), ostB (trehalose 6-phosphate phosphatase), hybG (hydrogenase expression/formation protein HypC), ampG (MFS transporter, PAT family, beta-lactamase induction signal transducer AmpG), potG (spermidine/putrescine transport system permease protein), caiF (transcriptional activator CaiF), yfbR (5'-deoxynucleotidase YfbR), rfe (UDP-GlcNAc:undecaprenyl-phosphate/decaprenyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase), atpH (F-type H⁺-transporting ATPase subunit delta), tiaE (glyoxylate/hydroxypyruvate/2-ketogluconate reductase) 및 murI (Glutamate racemase)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 제조합 미생물.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 표적유전자는 zwf (glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase), tktA (transketolase I), tktB (transketolase II), pgi (glucose-6-phosphate isomerase), fbp (fructose-1,6-bisphosphatase), serC (phosphohydroxythreonine aminotransferase / 3-phosphoserine aminotransferase), murE (UDP-N-acetylmuramoylalanyl-Dglutamate 2,6-diaminopimelate ligase), pps (phosphoenolpyruvate synthetase), aceE (subunit of E1p component of pyruvate dehydrogenase complex), pta (Phosphate acetyltransferase), purA (adenylosuccinate synthetase), ackA (propionate kinase / acetate kinase activity), pck (phosphoenolpyruvate carboxykinase), ppc (phosphoenolpyruvate carboxylase), accA (acetyl-CoA carboxyltransferase, alpha-subunit), fadD (fatty acyl-CoA synthetase), fabH (KASIII, -ketoacyl-ACP synthases), aspA (aspartate ammonia-lyase), carB (carbamoyl phosphate synthetase), ilvH (acetolactate synthase/acetohydroxybutanoate synthase), ilvM (acetohydroxybutanoate synthase/acetolactate synthase), ilvN (acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase), ilvC (acetohydroxy acid isomeroreductase), asnA (asparagine synthetase A), asnB (asparagine synthetase B), argH (argininosuccinate lyase), deoA (thymidine phosphorylase / uracil phosphorylase), thrA (aspartate kinase / homoserine dehydrogenase), metB (O-succinylhomoserine lyase / O-succinylhomoserine(thiol)-lyase), metA, tdh,

ilvL (ilvGEDA operon leader peptide), crp (CRP transcriptional dual regulator), fadR (FadR Fatty acid degradation Regulon, is a multifunctional dual regulator that exerts negative control over the fatty acid degradative regulon [Simons80, Simons80a] and acetate metabolism), fur (Fur-Fe+2 DNA-binding transcriptional dual regulator), lrp (Lrp is a dual transcriptional regulator for at least 10% of the genes in Escherichia coli. These genes are involved in amino acid biosynthesis and catabolism, nutrient transport, pili synthesis, and other cellular functions, including 1-carbon metabolism), gltA (citrate synthase), pdhR (PdhR, "pyruvate dehydrogenase complex regulator," regulates genes involved in the pyruvate dehydrogenase complex), tyrR (tyrosine regulator), csrA (carbon storage regulator), lexA (LexA represses the transcription of several genes involved in the cellular response to DNA damage), aroF (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, tyrosine-repressible), aroA (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase), aroC (Chorismate synthase), pheA (chorismate mutase and prephenate dehydratase, P-protein), trpD (fused glutamine amidotransferase (component II) of anthranilate synthase/anthranilate phosphoribosyl transferase), dapA (4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase), ilvE (Branched-chain-amino-acid aminotransferase), lysA (Diaminopimelate decarboxylase), gltA (citrate synthase), fumA (Fumarate hydratase class I, aerobic), glnA (glutamine synthetase), mdh (malate dehydrogenase), gdhA (NADP-specific glutamate dehydrogenase), argA (amino acid N-acetyltransferase and inactive acetylglutamate kinase), metA (Homoserine O-succinyltransferase), tdh (L-threonine dehydrogenase), livJ (branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic binding protein), rhtC (Threonine efflux protein), yohJ (UPF0299 membrane protein), chpA (antitoxin of the ChpA-ChpR toxin-antitoxin system), aspC (aspartate aminotransferase), pfkA (ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1), parE (DNA topoisomerase 4 subunit B), ytfR (predicted sugar transporter subunit), ilvA (L-threonine dehydratase, biosynthetic; also known as threonine deaminase), ilvG (Acetolactate synthase), minD (inhibitor of FtsZ ring polymerization; chromosome-membrane tethering protein; membrane ATPase of the MinCDEE system), hisJ (histidine transport system substrate-binding protein), yneH (Glutaminase), napG (Ferredoxin-type protein NapG), kdsA (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase), ygfA (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase), ftsI (cell division protein FtsI (penicillin-binding protein 3)), ostB (trehalose 6-phosphate phosphatase), hybG (hydrogenase expression/formation protein HypC), ampG (MFS transporter, PAT family, beta-lactamase induction signal transducer AmpG),

potG(spermidine/putrescine transport system permease protein),
 caiF(transcriptional activator CaiF), yfbR(5'-deoxynucleotidase YfbR),
 rfe(UDP-GlcNAc:undecaprenyl-phosphate/decaprenyl-phosphate
 GlcNAc-1-phosphate transferase), atpH(F-type H⁺-transporting ATPase
 subunit delta), tiaE(glyoxylate/hydroxypyruvate/2-ketogluconate reductase) 및
 murI(Glutamate racemase)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는
 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는
 재조합 미생물.

[청구항 10] 제1항 및 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 동시다중 표적유전자
 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하는
 단계; 및 제1 및 제p 표적유전자의 mRNA 발현을 억제하는 단계를
 포함하는 표적유전자의 동시다중 발현억제 방법.

[청구항 11] 트레오닌(Threonine) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에,
 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는
 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자;
 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을
 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자
 발현억제 시스템이 도입되어 있는 재조합 미생물로,
 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과
 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며,
 n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의
 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,
 상기 항생제는앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin),
 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin),
 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin),
 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin),
 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin),
 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin),
 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 푸로마이신(puromycin),
 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin),
 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin),
 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin),
 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid),
 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin),
 옥시테트라라시클린(oxytetracycline), 팍리택셀(paclitaxel),
 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin),
 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin),
 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서

선택되고,

상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,

상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느

하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자

mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하고,

상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는

영역에 tktA, aroF, pta, ilvH, ilvE, glnA, fur 또는 chpA 유전자의 mRNA와

상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어,

tktA, aroF, pta, ilvH, ilvE, glnA fur 및 chpA로 구성된 군에서 선택되는 2개

이상의 유전자의 발현이 억제되어 있어 트레오닌 생산능력이 향상된

것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

[청구항 12] 제11항에 있어서, lacI(Lactose-inducible lac operon transcriptional repressor), metA(Homoserine O-succinyltransferase/O-acetyltransferase),

lysA(Diaminopimelate decarboxylase), tdh(L-threonine dehydrogenase),

iclR(AceBAK operon repressor) 및 tdcC(Threonine/serine transporter)로

구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가로 결실된 것을

특징으로 하는 재조합 미생물.

[청구항 13] 제12항에 있어서, thrA(Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1)의 1034번째 염기 서열이 C에서 T로 바뀐 돌연변이, lysC(lysine-sensitive aspartokinase 3)의 1055번째 염기 서열이 C에서 T로 바뀐 돌연변이,

ilvA(l-threonine dehydratase, biosynthetic; also known as threonine

deaminase)의 290번째 염기 서열이 C에서 T로 바뀐 돌연변이로 구성된

군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 조작된 것을 특징으로 하고,

thrABC 오페론, ppc(phosphoenolpyruvate carboxylase), acs(acetyl-CoA

synthetase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 프로모터가

trc 프로모터로 치환된 것을 특징으로 하며, rhtA(threonine and homoserine

efflux system), rhtB(homoserine, homoserine lactone and S-methyl-methionine

efflux pump), rhtC(threonine efflux pump), thrAC1034T, thrB(homoserine

kinase), thrC(L-threonine synthase)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의

유전자가 플라스미드 기반 과발현된 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

[청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(Rhizobium),

비피도박테리움 (Bifidobacterium), 로도코커스 (Rhodococcus), 칸디다

(Candida), 에르위니아(Erwinia), 엔테로박터 (Enterobacter),

파스테렐라(Pasteurella), 맨하이미아 (Mannheimia), 액티노바실러스

(Actinobacillus), 아그레가티박터(Aggregatibacter),

잔토모나스(Xanthomonas), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스(Pseudomonas),

아조토박터(Azotobacter), 애시네토박터(Acinetobacter),

랄스토니아(Ralstonia), 아그로박테리움(Agrobacterium), 로도박터(Rhodobacter), 자이모모나스(Zymomonas), 바실러스(Bacillus), 스테필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 클로스트리디움(Clostridium), 코리네박테리움(Corynebacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 사이아노박테리움(cyanobacterium) 및 사이클로박테리움(Cyclobacterium)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.

- [청구항 15] 프롤린(proline) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에, 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 제조합 미생물로, 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며, n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며, 상기 항생제는엠포실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin), 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin), 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin), 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin), 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin), 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid), 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin), 옥시테트라시클린(oxytetracycline), 팩리택셀(paclitaxel), 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin), 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서 선택되고, 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322, SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,

상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하고, 상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 serC, murE, aspC, metB, fadR, fur 또는 chpA 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 벡터가 도입되어 있어, serC, murE, aspC, metB, fadR, fur 및 chpA 로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있어 프롤린 생산능력이 향상된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.

- [청구항 16] 제15항에 있어서, lacI, speE, speG, argI, puuP, puuA, putA, putP, proP, speC, potE, 및 speF로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가로 결실된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, PP3533 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, argF 및 glnA 유전자의 발현이 추가로 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 19] 제15항에 있어서, argECBH 오페론, speF-potE, 및 argD로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 프로모터가 trc 프로모터로 치환된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.
- [청구항 20] 제15항의 제조합 미생물을 트레이스 메탈 용액(trace metal solution)을 포함하는 배지에서 유가식 발효를 통해 배양하는 단계를 포함하는 프롤린 생산 방법.
- [청구항 21] 제15항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(Rhizobium), 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 로도코커스 (Rhodococcus), 칸디다 (Candida), 에르위니아(Erwinia), 엔테로박터 (Enterobacter), 파스테렐라(Pasteurella), 맨하이미아 (Mannheimia), 액티노바실러스 (Actinobacillus), 아그레가티박터(Aggregatibacter), 잔토모나스(Xanthomonas), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스(Pseudomonas), 아조토박터(Azotobacter), 애시네토박터(Acinetobacter), 랄스토니아(Ralstonia), 아그로박테리움(Agrobacterium), 로도박터(Rhodobacter), 자이모모나스(Zymomonas), 바실러스(Bacillus), 스테필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus), 스트렙토코커스(Streptococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 클로스트리디움(Clostridium), 코리네박테리움(Corynebacterium), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 사이아노박테리움(cyanobacterium) 및 사이클로박테리움(Cyclobacterium)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.

[청구항 22] 인디고(indigo) 생합성 경로를 가지는 숙주세포에,
 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는
 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1백터; 및 제n항생제 내성 유전자;
 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을
 포함하는 제q백터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자
 발현억제 시스템이 도입되어 있는 제조합 미생물로,
 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과
 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며,
 n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의
 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며,
 상기 항생제는앰피실린(ampicillin), 카나마이신(Kanamycin),
 클로로암페니콜(chloramphenicol), 아프라마이신(apramycin),
 스트렙토마이신(streptomycin), 스펙티도마이신(spectinomycin),
 테트라사이클린(tetracyclin), 에리트로마이신(erythromycin),
 네오마이신(neomycin), 페니실린(penicillin), 액시노마이신(actinomycin),
 가베니실린(garbenicillin), 겐타미신(gentamicin), 블라스티시딘(blasticidin),
 마이코페놀릭산(mycophenolic acid), 퓨로마이신(puromycin),
 제오신(zeocin), 보렐리딘(borrelidin), 이오노마이신(ionomycin),
 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin),
 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin),
 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid),
 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin),
 옥시테트라라시클린(oxytetracycline), 팩리택셀(paclitaxel),
 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin),
 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin),
 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서
 선택되고,
 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322,
 SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,
 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느
 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자
 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하고,
 상기 제1 내지 제q백터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는
 영역에 asnA, hisJ, yneH, napG, kdsA, ygfA, ftsI, aceF 또는 ostB 유전자의
 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된 백터가 도입되어
 있어, asnA, hisJ, yneH, napG, kdsA, ygfA, ftsI, aceF 및 ostB 로 구성된
 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이 억제되어 있어 인디고
 생산능력이 향상된 것을 특징으로 하는 제조합 미생물.

- [청구항 23] 제22항에 있어서, *trpR*, *pykF* 및 *pykA*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 추가로 결실되고, *tktA*의 프로모터가 *trc* 프로모터로 치환되어 있으며, *tnaA*, *fmo*, *aroGfbr*, *trpEfbr*, 및 *aroL*로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 24] 제22항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(*Rhizobium*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 로도코커스(*Rhodococcus*), 칸디다(*Candida*), 에르위니아(*Erwinia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 파스테렐라(*Pasteurella*), 맨하이미아(*Mannheimia*), 액티노바실러스(*Actinobacillus*), 아그레가티박터(*Aggregatibacter*), 잔토모나스(*Xanthomonas*), 비브리오(*Vibrio*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아조토박터(*Azotobacter*), 애시네토박터(*Acinetobacter*), 랄스토니아(*Ralstonia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 로도박터(*Rhodobacter*), 자이모모나스(*Zymomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스테필로코커스(*Staphylococcus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 사이아노박테리움(*cyanobacterium*) 및 사이클로박테리움(*Cyclobacterium*)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 25] 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 및 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q벡터;를 포함하는 원핵생물의 동시다중 표적유전자 발현억제 시스템이 도입되어 있는 재조합 미생물로, 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하며, n은 2 내지 50의 정수이고, m은 2 내지 10의 정수이며, q는 2 내지 500의 정수이고, p는 2 내지 20000의 정수이며, 상기 항생제는앰피실린(*ampicillin*), 카나마이신(*Kanamycin*), 클로로암페니콜(*chloramphenicol*), 아프라마이신(*apramycin*), 스트렙토마이신(*streptomycin*), 스펙티도마이신(*spectinomycin*), 테트라사이클린(*tetracyclin*), 에리트로마이신(*erythromycin*), 네오마이신(*neomycin*), 페니실린(*penicillin*), 액티노마이신(*actinomycin*), 가베니실린(*garbenicillin*), 겐타미신(*gentamicin*), 블라스티시딘(*blasticidin*), 마이코페놀릭산(*mycophenolic acid*), 퓨로마이신(*puromycin*), 제오신(*zeocin*), 보렐리딘(*borrelidin*), 이오노마이신(*ionomycin*),

다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin),
 이버멕틴(ivermectin), 에버멕틴(avermectin), 미트라마이신(mithramycin),
 미토마이신(mitomycin), 나리딕식산(nalidixic acid),
 노보비오신(novobiocin), 니스타틴(nystatin),
 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 팍리택셀(paclitaxel),
 폴리마이신(polymyxin), 리팜피신(rifampicin), 살리노마이신(salinomycin),
 타일로신(tylosin), 발리노마이신(valinomycin), 밴코마이신(vancomycin),
 빈블라스틴(vinblastine), 및 빈크리스틴(vincristine) 으로 구성된 군에서
 선택되고,
 상기 복제원점은 CloDF13(CDF), pBBR1, ColA, ColE1, pUC, pBR322,
 SC101, RSF1030(RSF), 및 RK2로 구성된 군에서 선택되며,
 상기 합성 sRNA 암호화 영역은 프로모터; MicC, SgrS 및 MicF 중 어느
 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site); 표적 유전자
 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역; 및 터미네이터를 포함하는 것을
 특징으로 하는
 동시다중 표적 유전자 발현억제 시스템이 숙주세포에 도입되어 있는
 재조합 미생물에서,
 상기 숙주세포는 비올라세인(violacein) 생합성 경로를 가지고,
 상기 제1 내지 제q 벡터의 표적유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는
 영역에 ytfR, hybG, ampG, potG, caiF, minD, ilvM, yfbR, rfe, atpH, tiaE 또는
 murI 유전자의 mRNA와 상보적으로 결합하는 서열을 삽입하여 제조된
 벡터가 도입되어 있어, ytfR, hybG, ampG, potG, caiF, minD, ilvM, yfbR, rfe,
 atpH, tiaE 및 murI로 구성된 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자의 발현이
 억제되어 있는 것을 특징으로 하는 비올라세인/디옥시비올라세인
 생산능력이 향상된 재조합 미생물.

[청구항 26] 제25항에 있어서, vioA, vioB, vioC, vioD 및 vioE로 구성된 군에서
 선택되는 하나 이상의 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로
 하는 재조합 미생물.

[청구항 27] 제25항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균, 리조비움(Rhizobium),
 비피도박테리움 (Bifidobacterium), 로도코커스 (Rhodococcus), 칸디다
 (Candida), 에르위니아(Erwinia), 엔테로박터 (Enterobacter),
 파스테렐라(Pasteurella), 맨하이미아 (Mannheimia), 액티노바실러스
 (Actinobacillus), 아그레가티박터(Aggregatibacter),
 잔토모나스(Xanthomonas), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스(Pseudomonas),
 아조토박터(Azotobacter), 애시네토박터(Acinetobacter),
 랄스토니아(Ralstonia), 아그로박테리움(Agrobacterium),
 로도박터(Rhodobacter), 자이모모나스(Zymomonas), 바실러스(Bacillus),
 스테필로코커스(Staphylococcus), 락토코커스(Lactococcus),

스트렙토코커스(*Streptococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 사이아노박테리움(*cyanobacterium*) 및 사이클로박테리움(*Cyclobacterium*)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

[청구항 28] 제25항의 재조합 미생물을 트레이스 메탈 용액(trace metal solution)을 포함하는 배지에서 유가식 발효를 통해 배양하는 단계를 포함하는 비올라세인/디옥시비올라세인 생산 방법.

[청구항 29] 다음의 단계를 포함하는 다중억제 유전자 조합의 스크리닝 방법:

(a) 20 ~ 50bp 크기를 가지는 임의의 염기서열을 제조하는 단계;

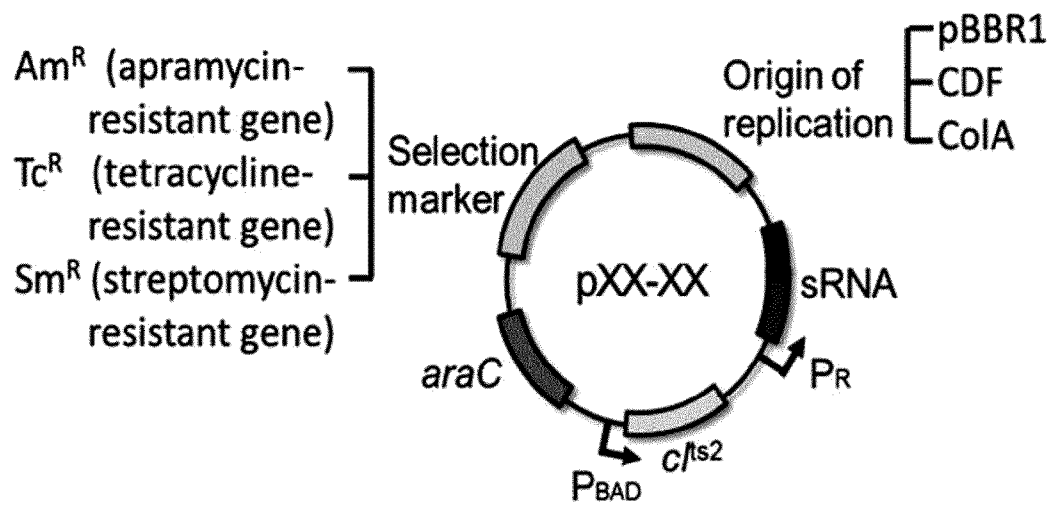
(b) 상기 염기서열을 제1항생제 내성 유전자; 제1복제원점; 제1 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화 영역을 포함하는 제1벡터; 내지 제n항생제 내성 유전자; 제m복제원점; 제p 표적유전자 발현을 억제하는 합성 sRNA 암호화영역을 포함하는 제q 벡터;의 표적유전자 mRNA와 상보적으로 결합하는 영역에 삽입하여 제1 내지 제r sRNA 라이브러리를 포함하는 제1 내지 제r 벡터 라이브러리를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 제1 내지 제r 벡터 라이브러리를 유용물질을 생산하고자 하는 대상 균주에 도입하여, 유용물질 생산량이 향상되는 경우, 발현이 억제된 유전자 후보군을 동정하여, s개의 발현억제 대상 유전자 조합을 결정하는 단계;

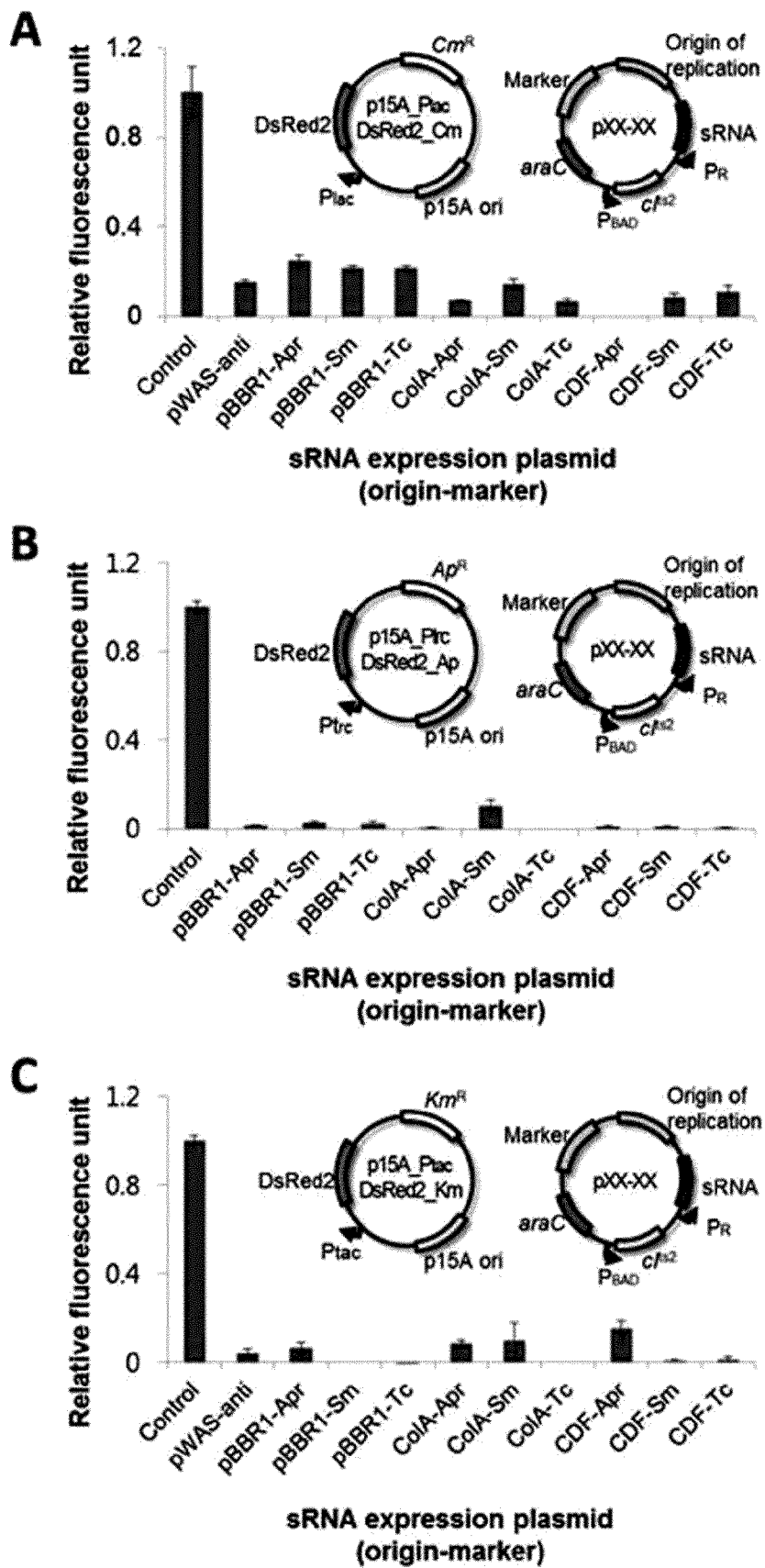
여기서, 상기 제1항생제 내성 유전자와 제n항생제 내성 유전자, 제1복제원점과 제m복제원점 및 제1표적유전자와 제p표적유전자는 서로 각각 상이하고,

n은 2 내지 50의 정수이며, m은 2 내지 10의 정수이고, q는 2 내지 500의 정수이며, p는 2 내지 20000의 정수이고, r 및 s 는 2 내지 500의 정수임.

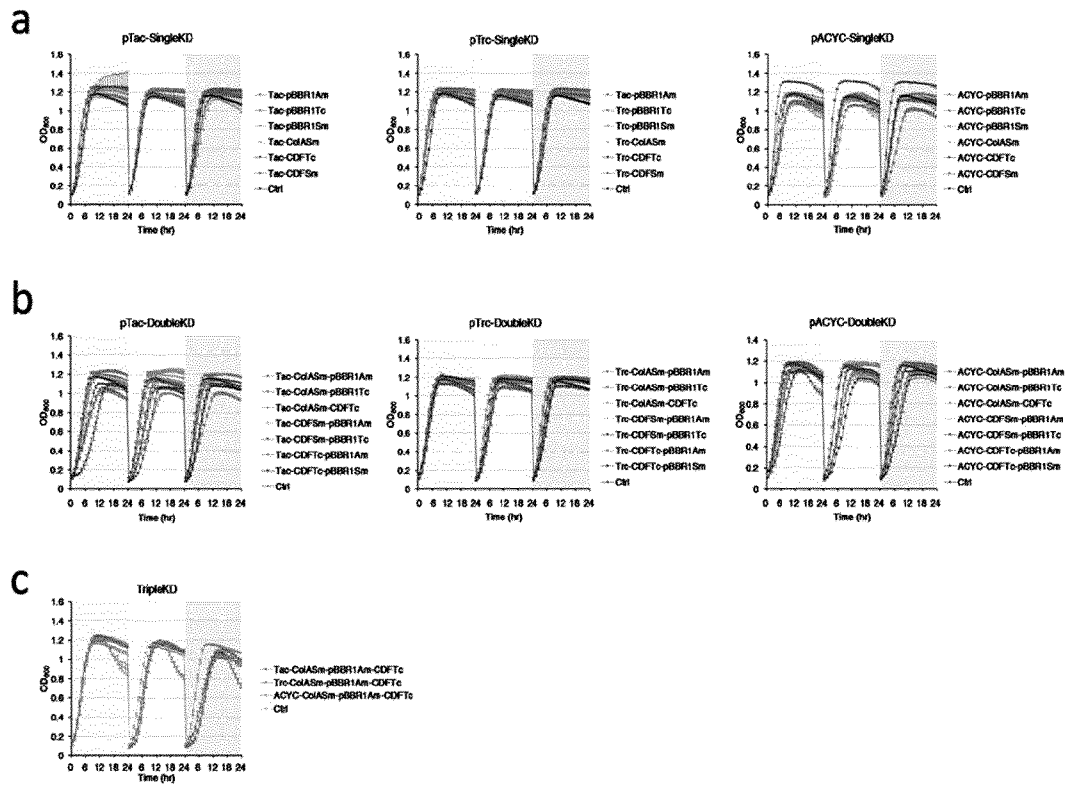
[도 1]



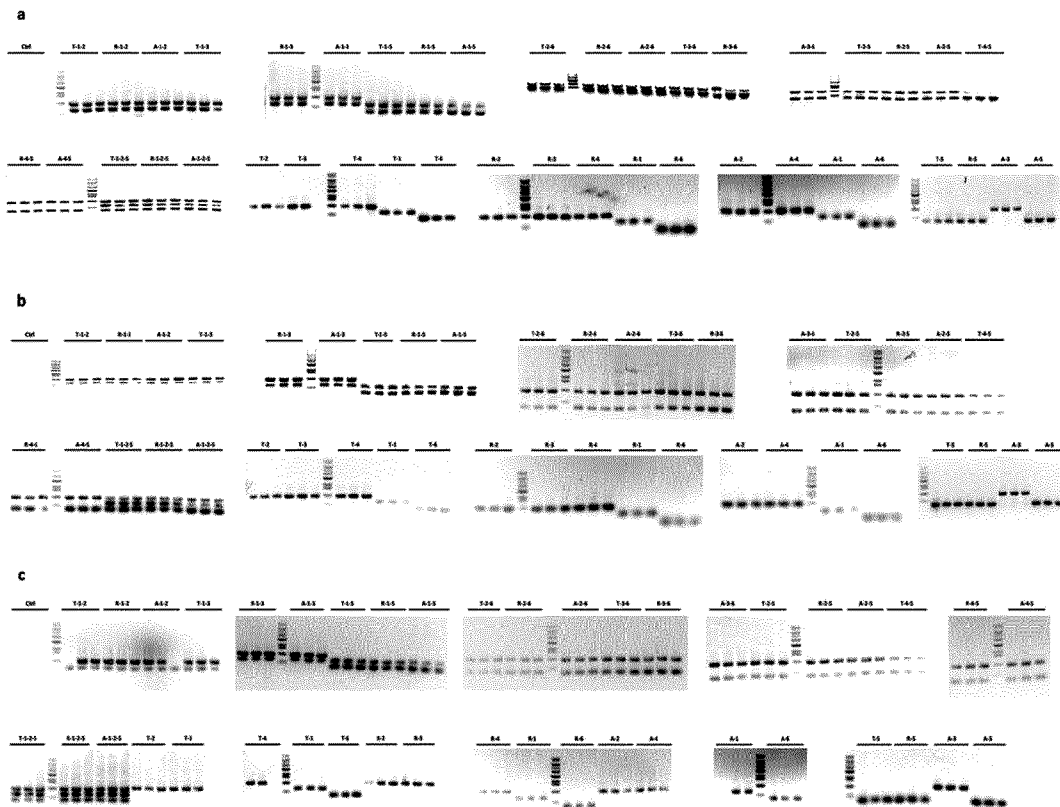
[도2]



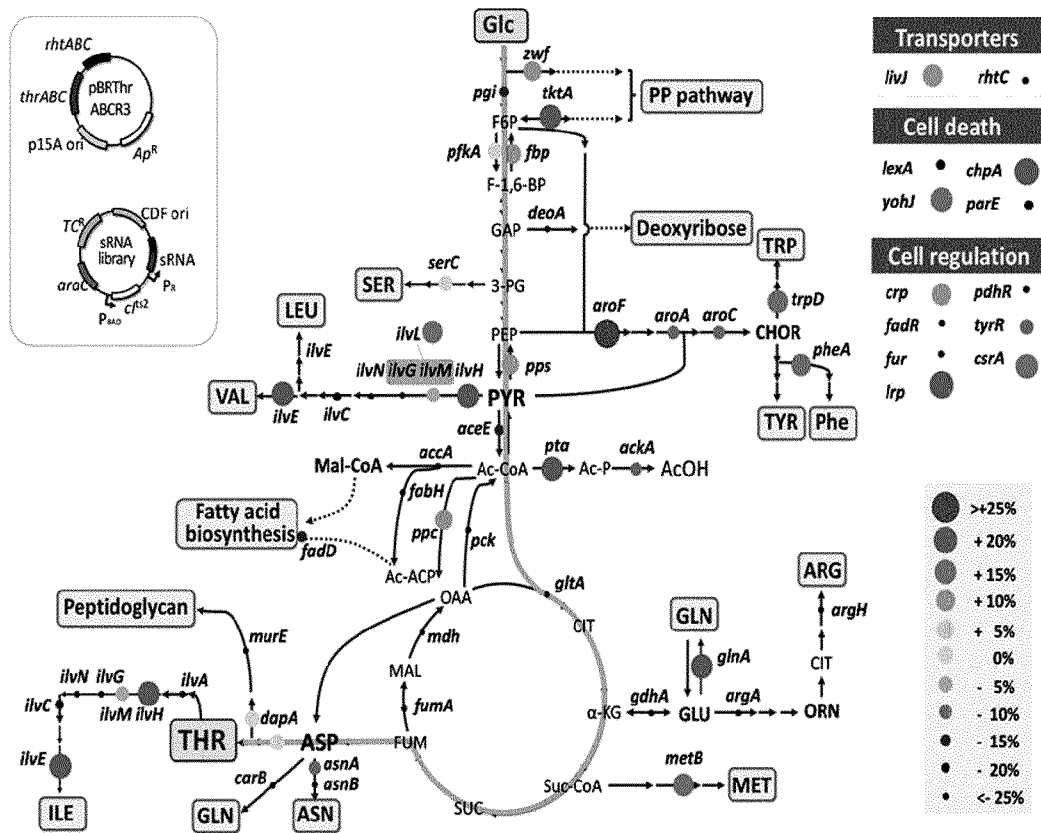
[도3]



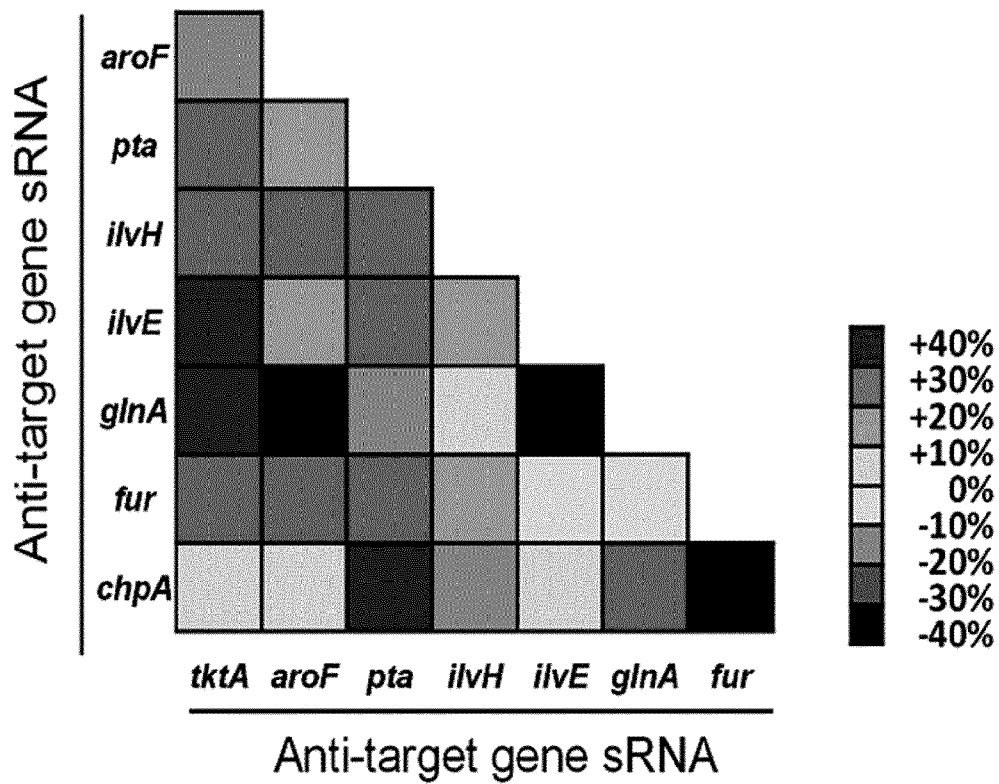
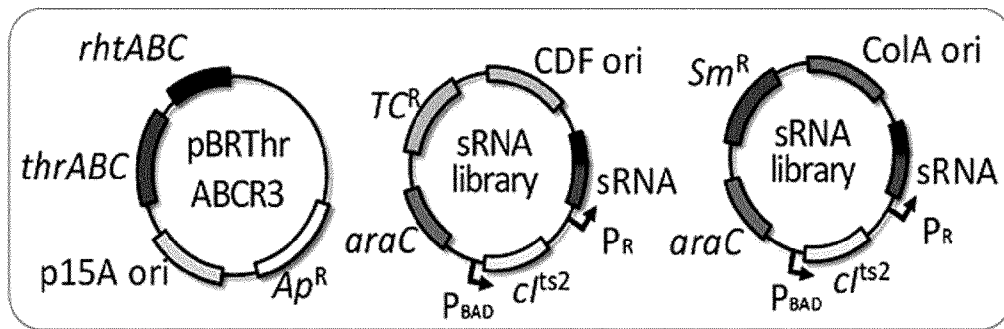
[도4]

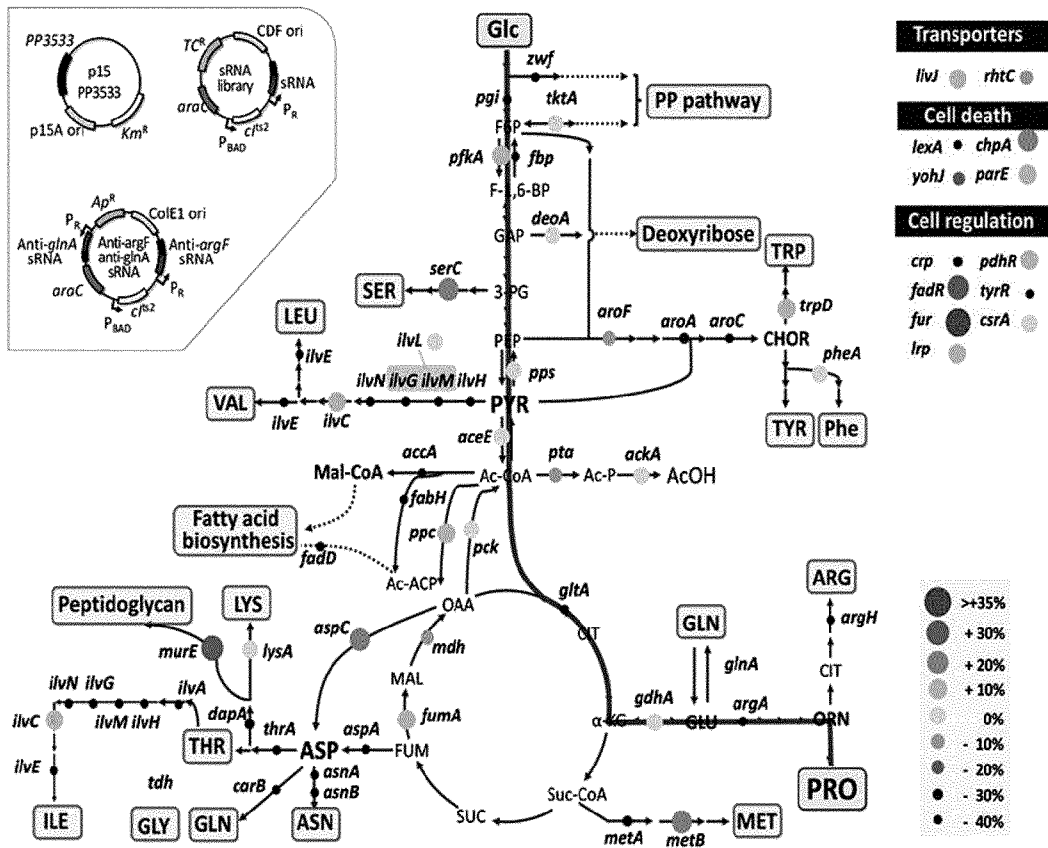


[도5]

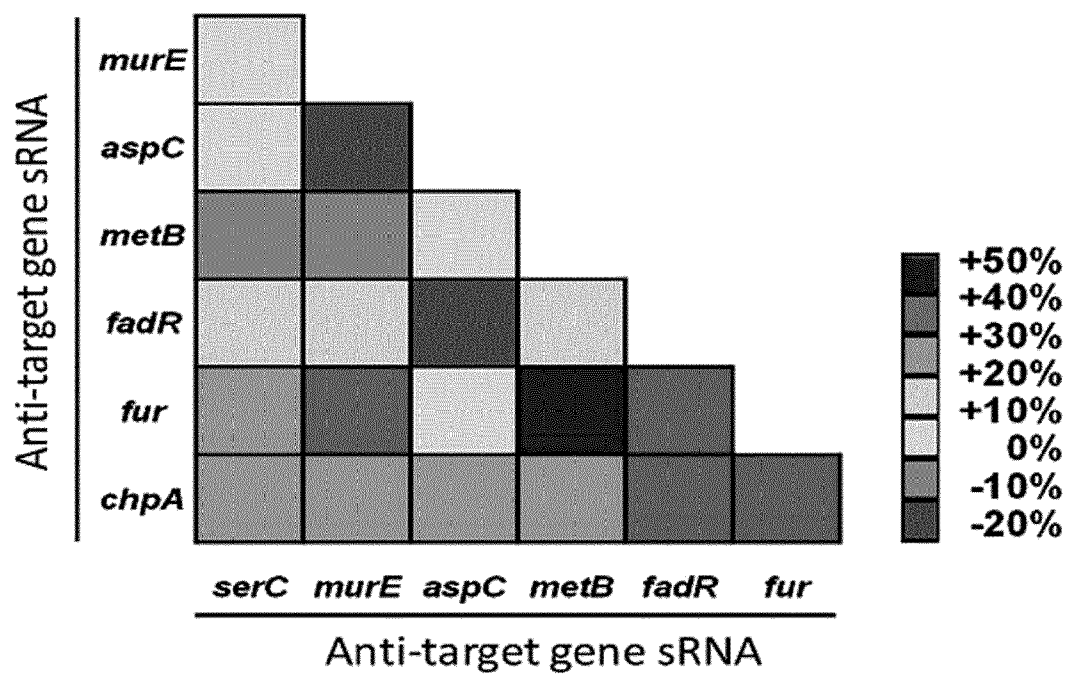
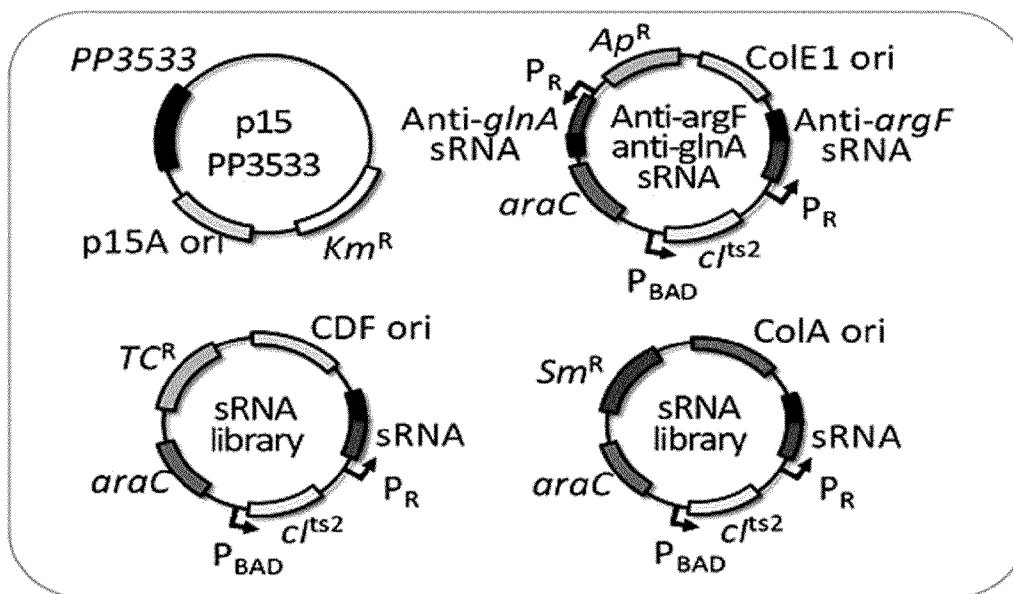


[56]



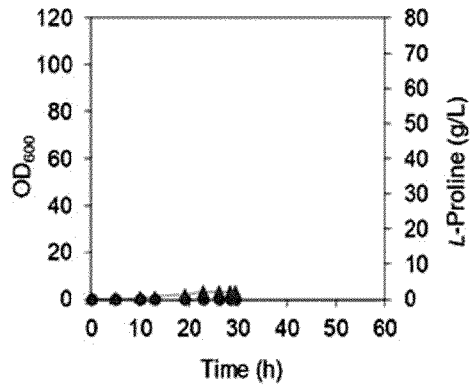


[도8]

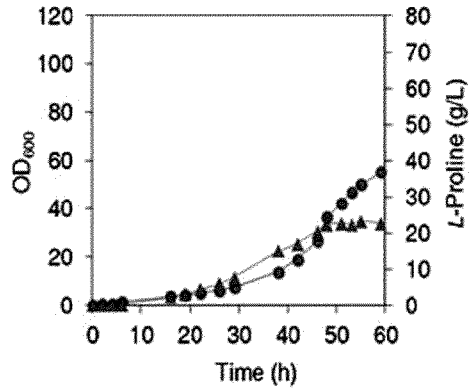


[도9]

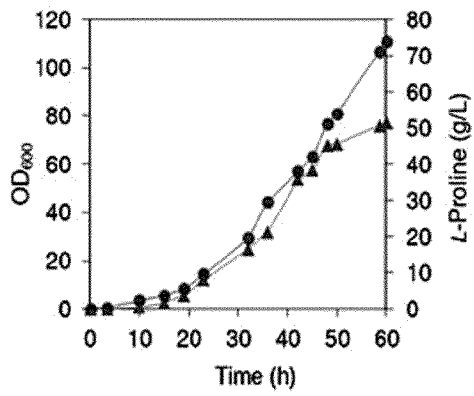
a



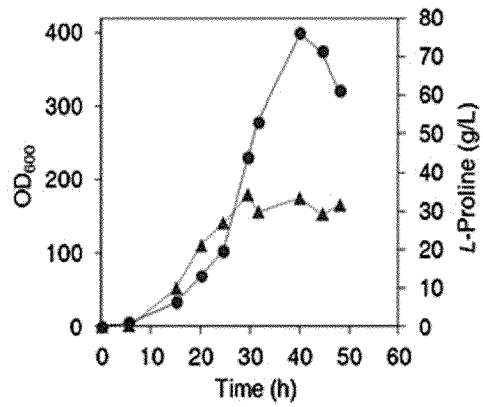
b



c

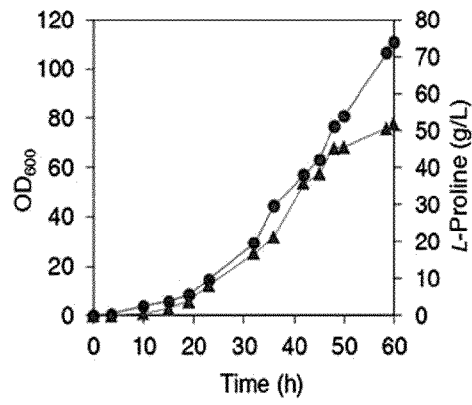


d

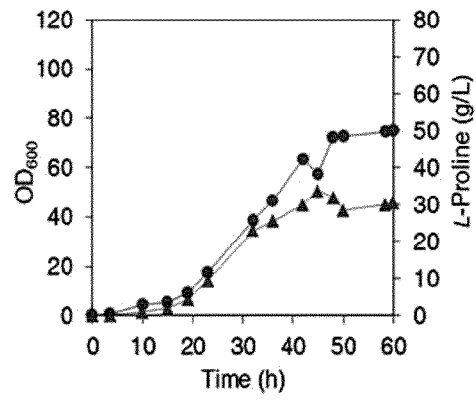


[도10]

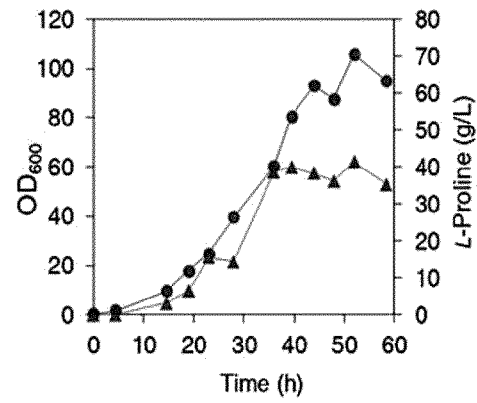
a



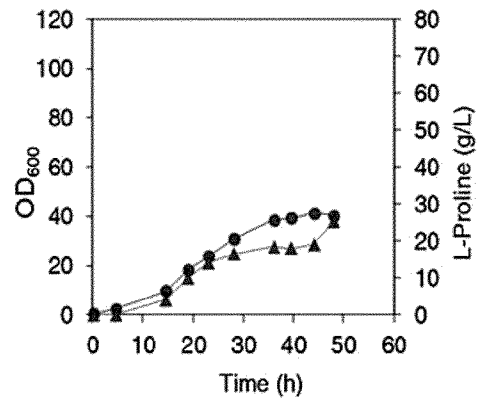
b



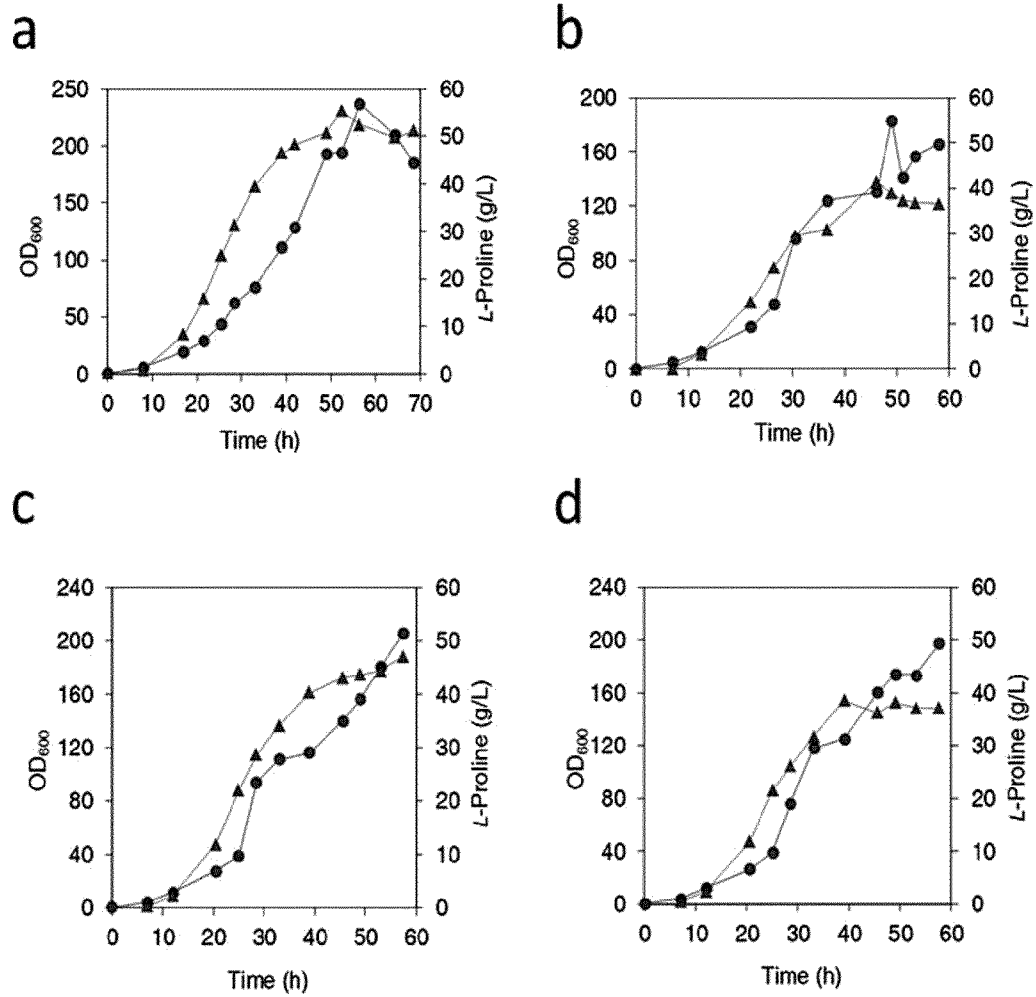
c



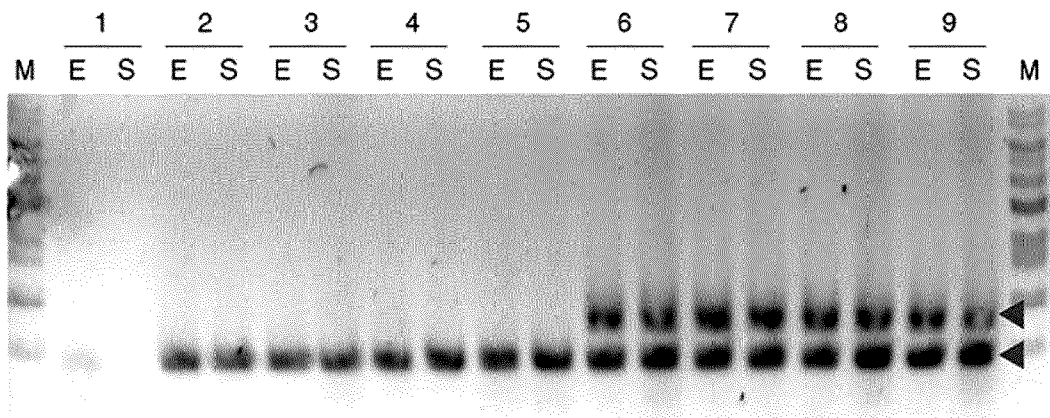
d



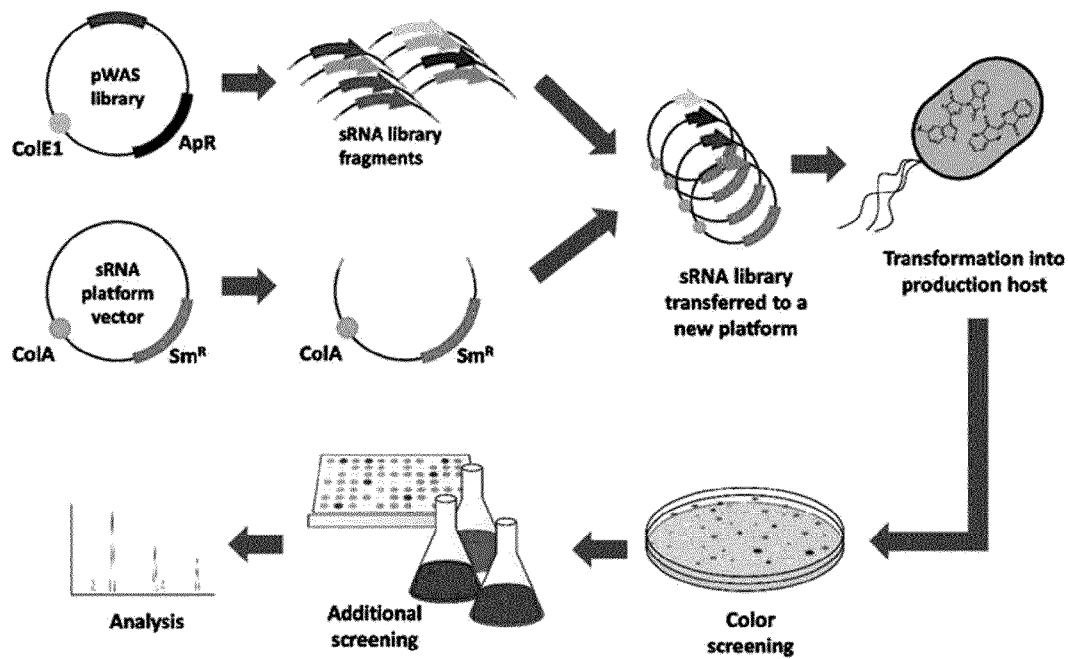
[도11]



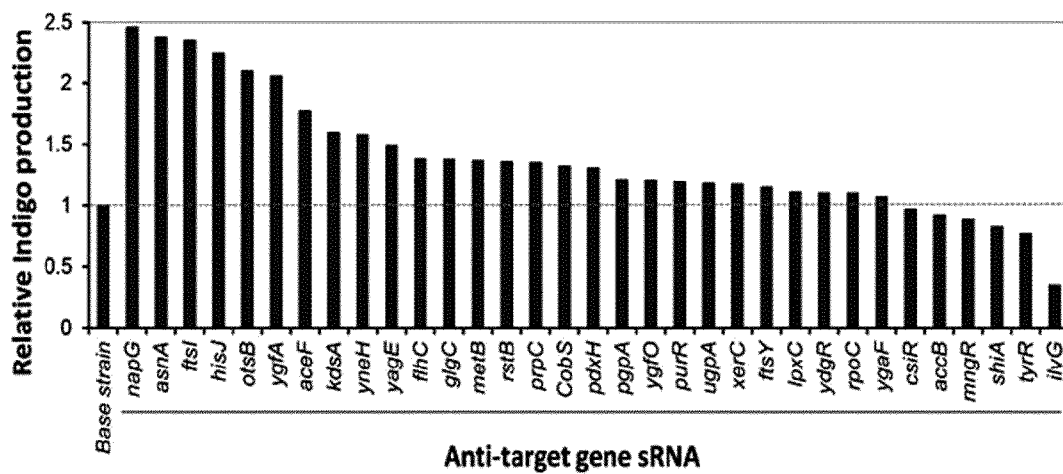
[도12]



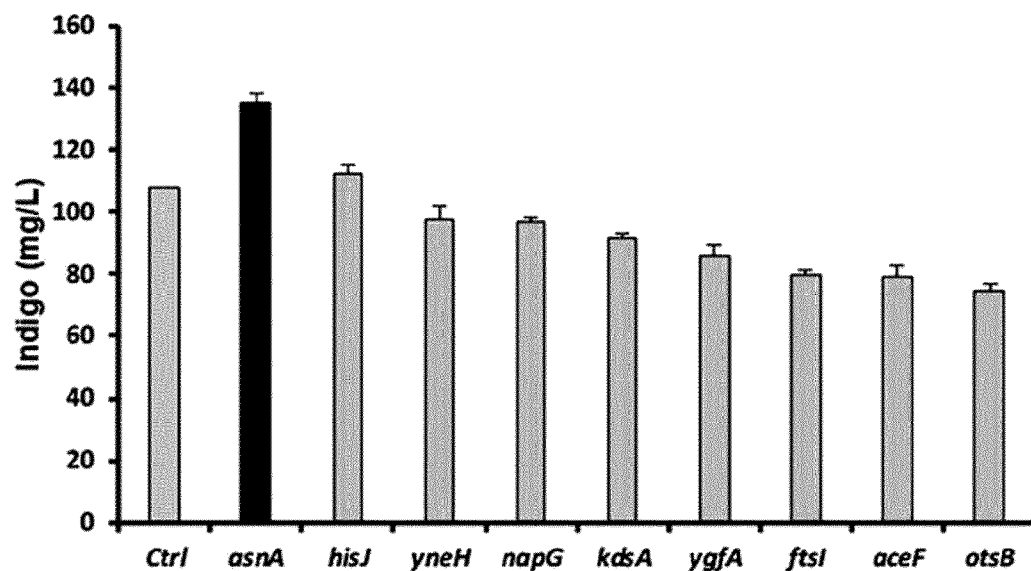
[도13]



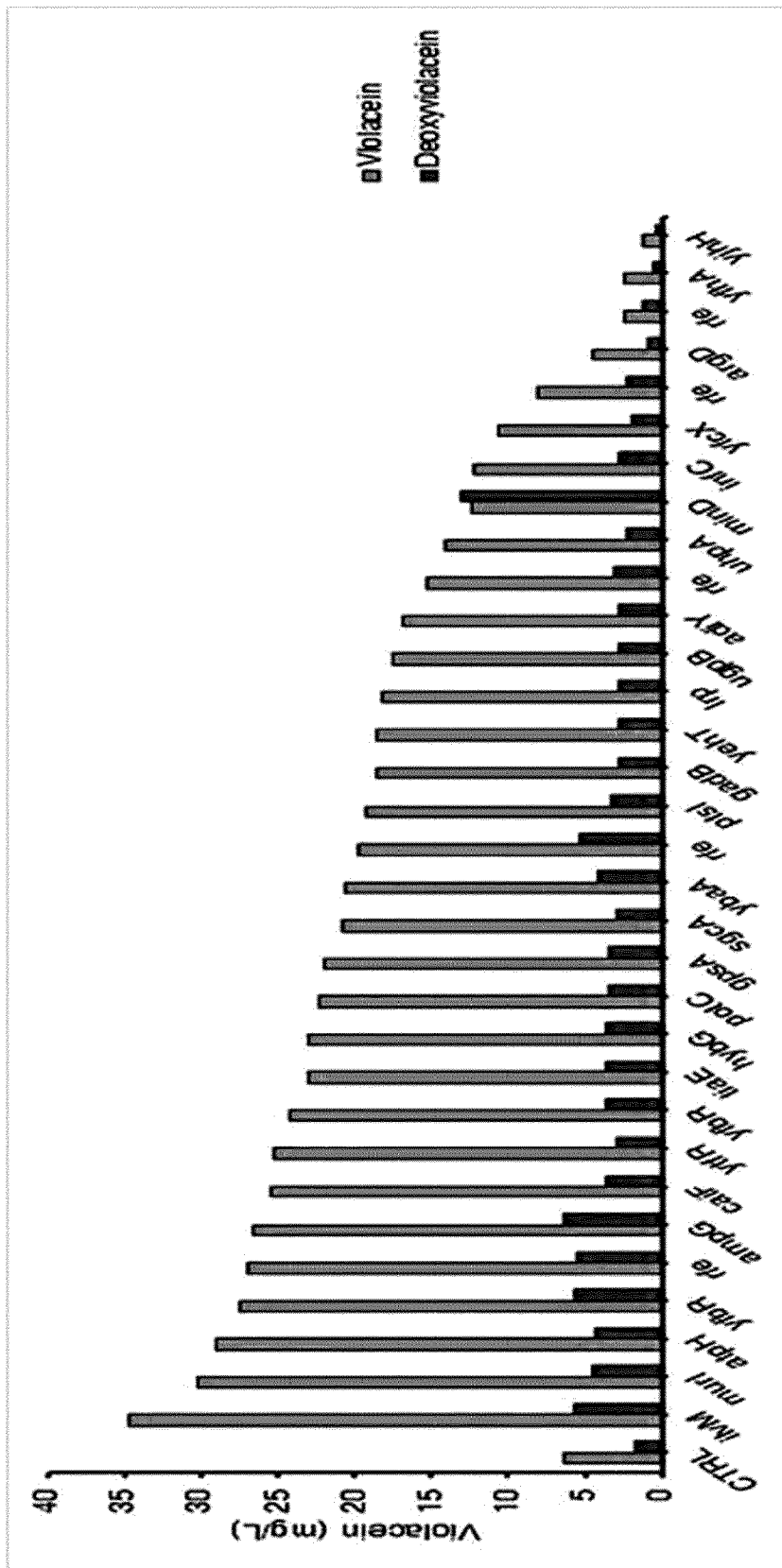
[도14]



[도15]

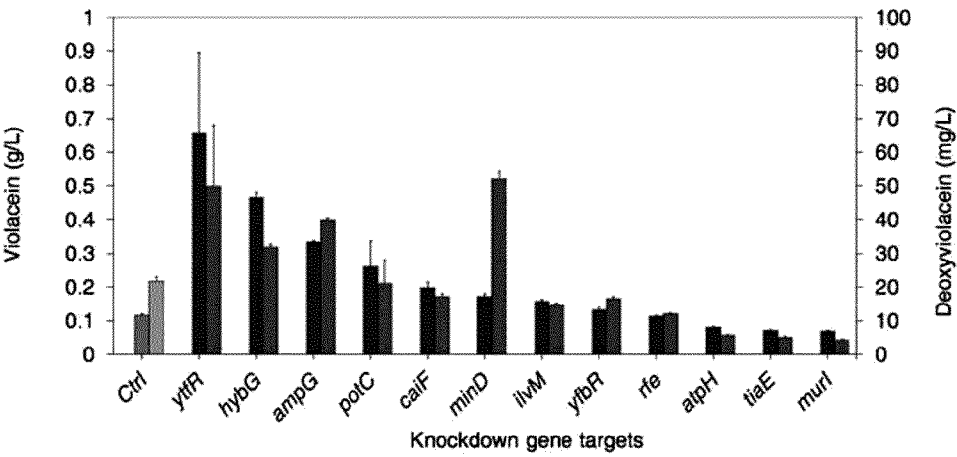


[도16]

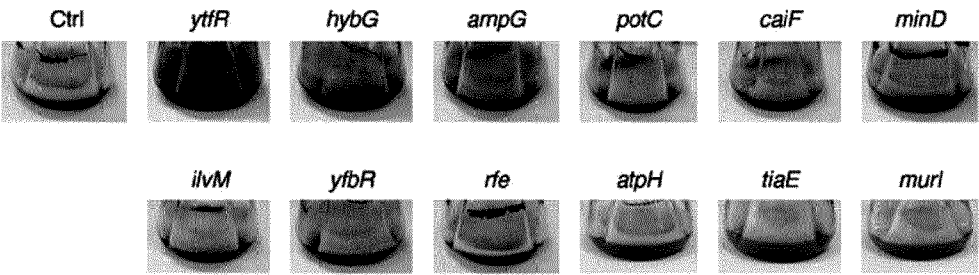


[도17]

a

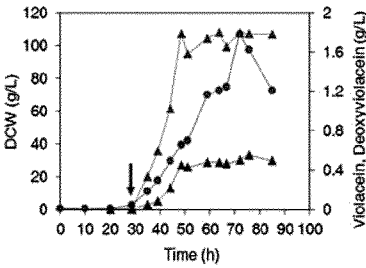


b

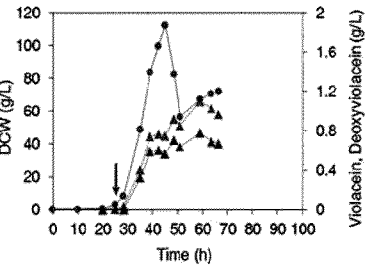


[도18]

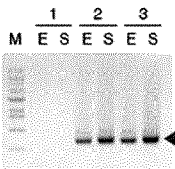
a



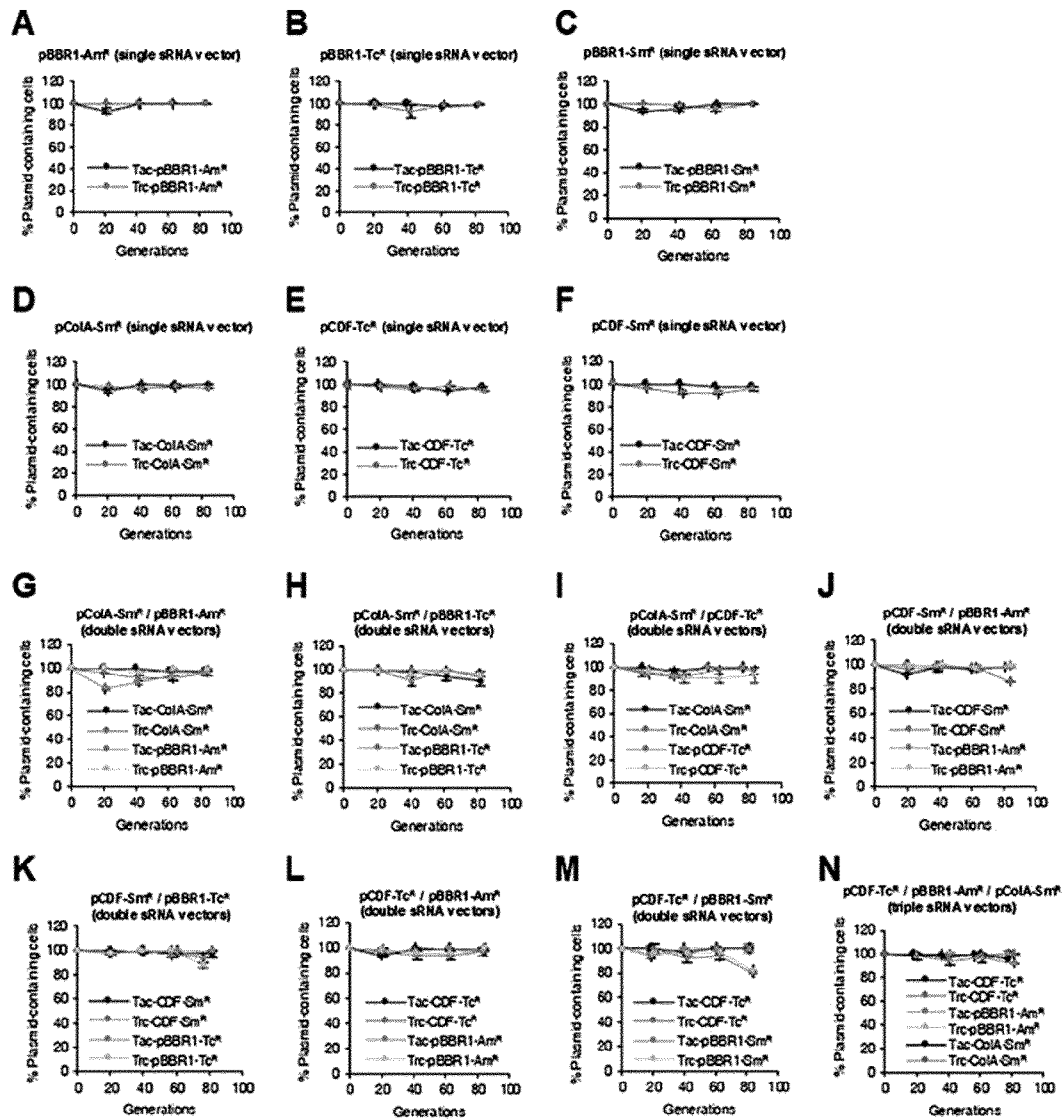
b



c



[도19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i, C12N 15/65(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 17/10(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113; C12N 1/20; C12N 15/09; C12N 15/11; C12N 15/64; C12N 15/70; C12P 7/16; C12N 15/65; C12P 17/10

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: synthetic regulatory sRNA(synthetic regulatory small RNA), target gene, expression inhibition, biosynthetic pathway, threonine, proline, indigo

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHO, C. et al. Efficient gene knockdown in <i>Clostridium acetobutylicum</i> by synthetic small regulatory RNAs. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> . February 2017, vol. 114, no. 2, pages 374-383. See abstract, pages 376, 382; and figure 1.	1-29
A	KR 10-1750855 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 27 June 2017 See the entire document.	1-29
A	KR 10-1575587 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 December 2015 See the entire document.	1-29
A	KR 10-1690780 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 29 December 2016 See the entire document.	1-29
A	WO 2015-190627 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 17 December 2015 See the entire document.	1-29
A	NA, D. et al. Metabolic engineering of <i>Escherichia coli</i> using synthetic small regulatory RNAs. <i>Nature Biotechnology</i> . February 2013, vol. 31, no. 2, pages 170-174 See the entire document.	1-29



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 OCTOBER 2019 (02.10.2019)	Date of mailing of the international search report 02 OCTOBER 2019 (02.10.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007729

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOH, M. et al. Gene expression knockdown by modulating synthetic small RNA expression in Escherichia coli. Cell Systems. 25 October 2017, vol. 5, pages 418-426 See the entire document.	1-29
PX	이상엽. 화확물질 대량 생산용 미생물 개발을 위한 범용 합성 조절 sRNA 기술. 2018 KAIST CORE TECH TRANSFER DAY. 10 September 2018, 삼성 코엑스 317, 318호. 서울, 대한민국. pages 1-13, non-official translation (LEE, Sang Yeob. Universal Synthetic Regulatory sRNA Technology for Development of Microbe for Chemicals Mass Production. Samsung Coex Units 317, 318. Seoul, Republic of Korea.) See page 8.	1,10,11,15,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007729

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1750855 B1	27/06/2017	KR 10-2015-0142304 A	22/12/2015
KR 10-1575587 B1	09/12/2015	CN 104254606 A	31/12/2014
		CN 104254606 B	18/01/2019
		DK 2803727 T3	14/01/2019
		EP 2803727 A2	19/11/2014
		EP 2803727 B1	07/11/2018
		ES 2709105 T3	15/04/2019
		KR 10-2013-0082474 A	19/07/2013
		US 2014-0377752 A1	25/12/2014
		US 9388417 B2	12/07/2016
		WO 2013-105807 A2	18/07/2013
		WO 2013-105807 A3	10/10/2013
KR 10-1690780 B1	29/12/2016	KR 10-2015-0142305 A	22/12/2015
WO 2015-190627 A1	17/12/2015	CN 107109396 A	29/08/2017
		US 10196644 B2	05/02/2019
		US 2017-0130235 A1	11/05/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i, C12N 15/65(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 17/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/113; C12N 1/20; C12N 15/09; C12N 15/11; C12N 15/64; C12N 15/70; C12P 7/16; C12N 15/65; C12P 17/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 합성조절 sRNA(synthetic regulatory small RNA), 표적유전자(target gene), 발현 억제(expression inhibition), 생합성 경로(biosynthetic pathway), 트레오닌(threonine), 프롤린(proline), 인디고(indigo)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CHO, C. 등, 'Efficient gene knockdown in Clostridium acetobutylicum by synthetic small regulatory RNAs', Biotechnology and Bioengineering, 2017.02., 114권, 2호, 페이지 374-383. 초록; 페이지 376, 382; 및 도면 1 참조.	1-29
A	KR 10-1750855 B1 (한국과학기술원) 2017.06.27 전체 문헌 참조.	1-29
A	KR 10-1575587 B1 (한국과학기술원) 2015.12.09 전체 문헌 참조.	1-29
A	KR 10-1690780 B1 (한국과학기술원) 2016.12.29 전체 문헌 참조.	1-29
A	WO 2015-190627 A1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2015.12.17 전체 문헌 참조.	1-29
A	NA, D. 등, 'Metabolic engineering of Escherichia coli using synthetic small regulatory RNAs', Nature Biotechnology, 2013.02., 31권, 2호, 페이지 170-174 전체 문헌 참조.	1-29

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 02일 (02.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 02일 (02.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



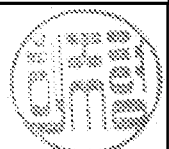
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NOH, M. 등, 'Gene expression knockdown by modulating synthetic small RNA expression in Escherichia coli', Cell Systems, 2017.10.25, 5권, 페이지 418-426 전체 문헌 참조.	1-29
PX	이상엽, '화학물질 대량 생산용 미생물 개발을 위한 범용 합성 조절 sRNA 기술', 2018 KAIST CORE TECH TRANSFER DAY, 2018.09.10, 삼성 코엑스 317, 318호, 서울, 대한민국, 페이지 1-13 페이지 8 참조.	1,10,11,15,22

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1750855 B1	2017/06/27	KR 10-2015-0142304 A	2015/12/22
KR 10-1575587 B1	2015/12/09	CN 104254606 A	2014/12/31
		CN 104254606 B	2019/01/18
		DK 2803727 T3	2019/01/14
		EP 2803727 A2	2014/11/19
		EP 2803727 B1	2018/11/07
		ES 2709105 T3	2019/04/15
		KR 10-2013-0082474 A	2013/07/19
		US 2014-0377752 A1	2014/12/25
		US 9388417 B2	2016/07/12
		WO 2013-105807 A2	2013/07/18
		WO 2013-105807 A3	2013/10/10
KR 10-1690780 B1	2016/12/29	KR 10-2015-0142305 A	2015/12/22
WO 2015-190627 A1	2015/12/17	CN 107109396 A	2017/08/29
		US 10196644 B2	2019/02/05
		US 2017-0130235 A1	2017/05/11