

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0043583 (43) 공개일자 2014년04월10일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0106126 (22) 출원일자 2012년09월24일 심사청구일자 2013년03월05일		(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 박진병 서울 영등포구 여의동로3길 10, 101동 2403호 (여의도동, 여의도자이) 양경미 서울시 강남구 삼성동 316-37 청광빌라 301호 최원자 서울 강남구 삼성로 151, 8동 1302호 (대치동, 선경아파트) (74) 대리인 손민

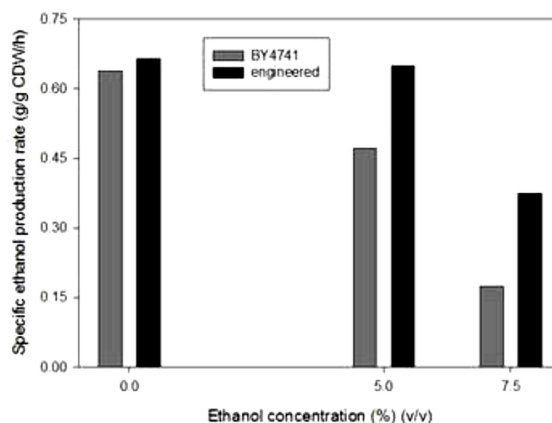
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규한 에탄올-내성 변이주 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 효모의 방출펌프가 과발현되도록 형질전환된 에탄올-내성 효모균주 및 상기 효모균주를 이용하여 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 형질전환된 에탄올-내성 효모균주는 주변 환경의 에탄올 농도가 5%(v/v) 까지 증가하더라도 에탄올 생산성이 감소되지 않는다는 장점이 있으므로, 상기 형질전환된 에탄올-내성 효모균주는 바이오 에탄올 제조분야 및 주류 제조분야를 비롯한 다양한 에탄올의 산업적 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081512

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망파이오니아사업

연구과제명 글로벌탄소대사흐름분석 기법을 이용한 우량 에탄올생산균주 대사특성 분석

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2011.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

세포막에 결합된 방출펌프 단백질이 과발현되도록 형질전환된 에탄올-내성 효모균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방출펌프 단백질은 효모균주 유래의 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방출펌프 단백질은 사카로마이세스 속(*Saccharomyces sp.*) 효모균주 유래의 VMR1, SNQ2, ADP1, PDR15, YBT1, YOR1, PDR10, BPT1, MDL2, PDR8, PXA2 및 NFT1으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 방출펌프 단백질은 사카로마이세스 속 효모균주 유래의 ADP1인 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 ADP1은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 ADP1은 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 에탄올-내성 효모균주는 사카로마이세스 속 효모균주인 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드가 발현벡터에 삽입되어 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) BY4741 균주에 도입됨으로써, ADP1 단백질이 과발현되도록 형질전환된 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 효모균주는 7.5%(v/v) 이하의 에탄올을 포함하는 배양 조건에서, 야생형 효모균주에 비하여 보다 높은 수준의 성장을 및 에탄올 생산성을 나타내는 것인 에탄올-내성 효모균주.

청구항 10

(a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 에탄올-내성 효모균주를 에탄올을 포함하는 배양조건에서 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 수득한 배양물의 배양상등액으로부터 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는, 에탄올 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 에탄올은 7.5%(v/v) 이하의 농도로 배지에 포함되는 것인 에탄올 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 에탄올-내성 변이주 및 그의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 효모의 방출펌프가 과발현되도록 형질전환된 에탄올-내성 효모균주 및 상기 효모균주를 이용하여 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식물 또는 해초(seaweed) 바이오매스로부터 바이오 에탄올을 생산하는 방법은 환경적 측면에서 전세계적인 관심의 대상이 되고 있으나, 초기 투자비 및 생산비용이 과다하여 산업적으로 생산되지는 못하고 있으며, 에탄올을 대량으로 생산하는 공정면에서 다양한 문제점이 발생하기 때문에, 이러한 문제점을 해결하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 상기 다양한 문제점 중에서도, 미생물을 이용하여 바이오 에탄올을 생산할 경우, 초기에는 미생물의 성장을 및 에탄올 생산성이 높은 수준을 나타내지만, 에탄올의 생산량이 증가함에 따라 에탄올에 의한 스트레스가 발생하여 미생물의 성장을 및 에탄올 생산성이 저하되는 문제점에 대하여는 높은 관심이 집중되고 있는데, 이는 바이오 에탄올의 생산공정에 핵심적인 역할을 담당하는 미생물 균주의 선택과 관련되기 때문이다.

[0003] 에탄올을 생산하는 것으로 알려진 균주의 일종인 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)는 바이오매스 자원으로부터 바이오에탄올의 생산을 포함하는 여러 산업 분야에서 다양하게 이용되고 있는 효모균주이다. 상기 효모균주는 오랫동안 사용되어온 에탄올 생산용 미생물이기 때문에 이를 이용한 에탄올 생산공정에 대하여 많은 연구가 이루어져 있으나, 상대적으로 에탄올에 의한 스트레스에 대하여 취약하다는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 에탄올-내성을 갖는 효모 변이주를 개발하려는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 예를 들어, 트리할로로스 또는 프롤린을 효모균주 내에 축적하면 효모의 에탄올 저항성이 증가하고, 에르고스테롤이 *S. cerevisiae*의 에탄올 저항성과 관련된다는 사실이 보고되었다.

[0004] 한편, 친지질성 물질은 소수성 내부를 구획함으로써 세포막과 상호작용하고, 막의 유동성 증가는 극성 또는 비

극성 분자에 대한 투과성을 증가시킨다(Ma and Liu, 2010; Rosa and Sa-Correia, 1996; Salgueiro et al., 1988; Teixeira et al., 2009). 유기 화합물의 존재하에서 막 본래 모습이 상실되면, 막에 박혀 있는 단백질의 매트릭스 및 선택적 장벽인 세포막의 기능이 손상되고, 세포 성장율과 생물량 수율이 감소될 수 있다. 통상적으로, 미생물은 용매의 독성을 견뎌내는 몇가지 작용기작을 갖는다(Isken et al., 1999; Ramos et al., 2002). 그 중 하나는 양성자 동력원을 이용하여 세포 밖으로 독성 분자를 방출시키는 막 수송체의 일종인 방출 펌프를 이용하는 것이다(Murakami, 2009; Nikaido and Takatsuka, 2009). 박테리아의 방출 펌프는 일반적으로 물질을 인지하는 내막 단백질, 주변 세포질 연결기 및 외막 통로의 세 가지 단백질로 구성된다. 박테리아에서 몇몇 용매-내성 방출 펌프는 이미 특성이 밝혀졌다(e.g., ttgABC, ttgDEF, ttgGHI, srpABC from *Pseudomonas putida*(Kieboom et al., 1998; Rojas et al., 2001), acrAB-tolC from *Escherichia coli*(Nikaido and Takatsuka, 2009)). 이러한 펌프 단백질은 용매와 친지질성 화합물을 세포 밖으로 방출시키는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히, 진핵세포에서, 다수의 ABC(ATP-binding cassette) 방출 펌프가 보고되었다. 이들은 P-당 단백질(P-glycoprotein)이라고도 하는 여러 약물 내성 단백질(multiple drug resistance proteins, MRDs), 여러 약물 내성-관련 단백질(multidrug resistance-associated proteins, MRPs) 및 모노카르복실레이트 운반체(monocarboxylate transporter)를 포함한다. 포유류의 ABC 운반체들은 네 개의 도메인으로 구성된 특징적인 구조를 갖는다. 두 개의 막투과 도메인(transmembrane domain, TMDs)은 이중막에 박혀 있고, 두 개의 핵산 결합 도메인(nucleotide binding domain, NBD)은 세포질에 위치한다. 이들 펌프는 영양소의 흡수 뿐만 아니라 지질, 지방산 및 콜레스테롤의 방출에 관여한다. *S. cerevisiae*는 30개의 ABC 단백질을 가지고 있는데, 이들은 핵산 결합 도메인의 서열 유사성에 따라 ABCB, ABCC, ABCD 및 ABCG로 분류된다. 그러나, ABC 단백질의 기능과 기질 친화도에 대하여 연구할 것이 많이 남아 있다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 에탄올-내성을 갖는 효모 변이주를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 효모에 존재하는 방출펌프 단백질을 과발현시키도록 형질전환된 효모균주가 에탄올-내성을 나타낼 뿐만 아니라 상기 형질전환된 효모균주를 이용하면 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 세포막에 결합된 방출펌프 단백질이 과발현되도록 형질전환된 에탄올-내성 효모균주를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 에탄올-내성 효모균주를 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 세포막에 결합된 방출펌프 단백질이 과발현되도록 형질전환된 에탄올-내성 효모균주를 제공한다.

[0009] 본 발명의 용어 "방출펌프(Efflux pump)"란, 세포막에 존재하는 단백질성 능동수송체를 의미하는데, 에너지 소스로서 ATP 가수분해를 사용하는 일차 능동수송체 및 수소 또는 나트륨이온을 세포외부로 방출함에 의해 생성되는 전기화학적 전위차를 이용하는 이차 능동수송체(uniporters, symporters 또는 antiporters)를 포함하고, 아미노산 서열 및 기질의 방출시에 사용되는 에너지 원천에 따라 MFS(major facilitator superfamily), ABC(ATP-binding cassette superfamily), SMR(small multidrug resistance family), RND(resistance-nodulation-cell division superfamily) 및 MATE(The Multi antimicrobial extrusion protein family)의 다섯가지 하위군으로 분류된다. 본 발명의 목적상 상기 방출펌프는 효모균주 유래의 방출펌프일 수 있고, 바람직하게는 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.) 효모균주 유래의 방출펌프일 수 있으며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 속 효모균주 유래의 Vmr1p, Snq2p, Adp1p, Pdr15p, Ybt1p, Yor1p, Pdr10p, Bpt1p, Mdl2p, Pdr8p, Pxa2p, Nft1p 등의 유전자로부터 발현된 방출펌프인 VMR1, SNQ2, ADP1, PDR15, YBT1, YOR1, PDR10, BPT1, MDL2, PDR8, PXA2, NFT1

등이 될 수 있고, 가장 바람직하게는 *S. cerevisiae* BY4741 균주로부터 유래된 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 방출펌프 ADP1일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 다양한 사카로마이세스 속 효모균주 유래의 방출펌프를 코딩하는 유전자의 발현량을 확인한 결과, 에탄올 내성균주인 iETS3에서 야생형 효모균주 보다도 높은 수준의 발현량을 나타냄을 확인하였으므로, 에탄올-내성 증진에 방출펌프가 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었고, 특히 방출펌프 중의 하나인 ADP1에 대한 구체적인 연구를 통하여 상기 방출펌프가 과발현되면, 효모균주에 에탄올-내성을 부여함으로써 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[0011] 본 발명의 용어 "에탄올-내성"이란, 배양배지와 같은 주변 환경에 존재하는 에탄올에 의하여 세포의 성장 또는 세포대사가 영향을 받지 않는 효모균주의 특성을 의미한다. 효모와 같은 단세포성 균주는 특정한 발효조건하에서 균주 내에서 에탄올을 생성하여 균주의부로 분비할 수 있는데, 상기 외부로 분비된 에탄올의 농도가 일정 수준 이상으로 증가하면, 상기 효모균주의 세포막을 기준으로 생성되는 에탄올 농도구배에 의하여 균주의부에 존재하는 에탄올이 균주의 내부로 침투하게 되며, 이처럼 내부로 침투된 에탄올은 미토콘드리아 막의 전위를 저하시키고, 균주 내의 ROS 형성을 증가시켜서 미토콘드리아 막의 구조를 손상시키는 등의 작용을 수행하여, 상기 균주의 성장 및 대사를 억제함으로써, 균주의 성장을 억제하고, 상기 균주가 생산하는 에탄올의 생산성을 저해시키게 된다.

[0012] 본 발명에서는 상기 균주의 내부로 침투하는 에탄올을 균주의 외부로 방출할 수 있는 방출펌프를 과발현시켜서 균주내의 에탄올을 외부로 방출시킬 수 있는 형질전환된 균주를 제작하였다. 상기 제작된 형질전환된 균주는 균주내부의 에탄올을 능동적으로 방출시켜서 에탄올에 의한 균주의 성장저해 및 에탄올 생산성 저해를 방지할 수 있으므로, 결과적으로는 에탄올-내성을 부여받게 된다. 이같은 에탄올-내성은 균주내로 침투되는 에탄올의 양보다 방출펌프에 의하여 균주 외부로 방출되는 에탄올의 양이 동일하거나 또는 많기 때문에 부여되는 것이므로, 상기 균주의 주변 환경에 존재하는 에탄올의 농도가 일정 수준 이상으로 증가하여 균주 내로 침투되는 에탄올의 양이 방출되는 양보다 많아지게 되면 상기 에탄올-내성을 상실하게 된다.

[0013] 실제로, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 방출펌프를 과발현하도록 형질전환된 효모균주라 하더라도 배지에 포함된 에탄올의 함량이 증가할 수록 그의 성장율이 저하되고(도 4), 상기 형질전환된 효모균주로부터 생산되는 에탄올의 생산성이 감소됨을 확인하였다(도 6). 특히, 배지에 포함된 에탄올의 함량이 5%(v/v)가 될 때 까지는 상기 형질전환된 효모균주의 에탄올 생산성이 감소하지 않아 에탄올-내성을 나타내었으나, 배지에 포함된 에탄올의 함량이 7.5%(v/v)에 이르는 경우에는 에탄올 생산성이 급격히 감소함을 확인할 수 있었다(도 6). 그러나, 이처럼 배지에 포함된 에탄올의 함량이 증가할 경우에도 형질전환된 효모균주는 야생형 균주에 대하여 상대적인 에탄올-내성을 나타냄을 알 수 있었다(도 4 및 6). 따라서, 주변 환경 또는 배지에 적어도 7.5%(v/v) 이하의 농도로 에탄올이 존재하는 경우에는 상기 형질전환된 효모균주가 에탄올-내성을 나타낸다고 할 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어 "형질전환된 에탄올-내성 효모균주"란, 상술한 바와 같이 에탄올을 효모균주의 외부로 방출할 수 있는 방출펌프를 과발현시켜서 효모균주 내의 에탄올을 외부로 방출시킬 수 있는 형질전환된 효모균주를 의미한다. 상기 형질전환된 효모균주는 효모균주 유래의 방출펌프의 일종인 사카로마이세스 속 효모균주 유래의 ADP1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사카로마이세스 속 효모균주에 도입하여 제작할 수 있는데, 상기 폴리뉴클레오티드는 발현벡터에 포함되거나 또는 효모의 게놈 DNA에 삽입된 형태로 효모균주에 도입될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드가 발현벡터에 삽입되어 *S. cerevisiae* BY4741 균주에 도입될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환된 에탄올-내성 효모균주는 7.5%(v/v) 이하의 에탄올을 포함하는 배양 조건에서 성장하고, 에탄올을 생산할 수 있다.

[0015] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 (a) 상기 형질전환된 에탄올-내성 효모균주를 에탄올을 포함하는 배양조건에서 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 수득한 배양물의 배양상등액으로부터 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는, 에탄올 생산방법을 제공한다. 이때, 상기 에탄올은 바람직하게는 7.5%(v/v) 이하의 농도, 보다 바람직하게는 0.01 내지 7.5%(v/v)의 농도, 가장 바람직하게는 5%(v/v)의 농도로

배지에 포함될 수 있으나, 에탄올의 농도가 증가하여도 야생형 보다는 상대적인 에탄올-내성을 나타내므로, 배지에 포함되는 에탄올의 함량은 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 용어 "배양"이란, 상기 형질전환된 에탄올-내성 효모균주로부터 에탄올을 생산하기 위하여, 상기 균주를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 일련의 행위를 의미한다. 본 발명에서 상기 균주를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로스의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 배양시의 온도조건은 바람직하게는 27℃ 내지 37℃, 보다 바람직하게는 30℃ 내지 35℃를 유지하고, 배양 기간은 1 내지 36일 동안 배양함이 바람직하며, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제하는 방법을 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 칼세인 방출 분석을 통하여 에탄올에 의한 스트레스 내성 기작에 약물/용매 방출 펌프가 관련됨을 확인하였고(도 1), 대부분의 방출펌프 유전자는 야생형 균주 보다는 에탄올-내성 변이주에서 높은 수준으로 발현되며(도 2), 칼세인 AM의 방출과 관계있는 막 방출 펌프가 기질 막 ATP 결합 카세트 운반체에 속하는 ADP1임을 규명하고(도 3), 상기 ADP1을 과발현할 수 있는 형질전환된 균주가 에탄올에 의한 스트레스에 대해 내성(도 4)을 나타낼 뿐만 아니라, 상기 형질전환된 균주의 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성이 5%(v/v) 에탄올에 의한 독성에 의해 영향을 받지 않아, 에탄올이 존재하는 조건에서도 에탄올 생산성을 효율적으로 유지할 수 있음을 알 수 있었다(도 5 및 도 6). 아울러, 상기 *S. cerevisiae*의 성장율 및 에탄올 생산이 상호 비례함을 확인할 수 있었다(도 7).

[0020] 한편, 본 발명에서 제공하는 에탄올-내성 효모균주는 BVM0(Baeyer-Villiger monooxygenase) 유전자가 도입된 형질전환체를 이용하여, 배지로부터 공급받은 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 알코올을 생산하는 방법에 응용될 수도 있다.

[0021] 본 발명자들은 올레산 수화효소 유전자, 알코올 탈수소화효소 유전자 및 BVM0 유전자가 도입되어, 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 알코올을 생산할 수 있는 형질전환체를 제작하고, 상기 형질전환체를 이용하여 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 알코올을 분비생산하는 방법을 개발하였다(대한민국 특허출원 제10-2012-0036372호). 그러나, 상기 형질전환체를 이용하여 중쇄 디카르복실산 및 알코올을 생산할 경우에는 알코올의 분비생산량이 증가할 수록 피드백 저해가 발생하여 목적하는 중쇄 디카르복실산의 생산수율이 제한된다는 문제점이 있었다.

[0022] 이러한 문제점은 본 발명에서 제공하는 에탄올-내성 효모균주를 이용하여 해결할 수 있다. 즉, 본 발명에서 제공하는 에탄올-내성 효모균주는 균주의 내부로 침투하는 에탄올을 균주의 외부로 방출할 수 있는 방출펌프를 과발현시켜서 에탄올에 의한 균주의 성장저해 및 에탄올 생산성 저하를 방지할 수 있으므로, 상기 에탄올-내성 효

모균주에 올레산 수화효소 유전자, 알코올 탈수소화효소 유전자 및 BVMO 유전자를 도입하여 제조된 형질전환 균주는 배지로부터 공급받은 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 알코올을 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 알코올-내성을 나타내어, 일정수준의 알코올이 생산될 때까지는 알코올에 의하여 발생하는 피드백 저해를 방어할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 에탄올-내성 효모균주에 올레산 수화효소 유전자, 알코올 탈수소화효소 유전자 및 BVMO 유전자를 도입하여 제조된 형질전환 균주를 이용하면, 장쇄 지방산으로부터 중쇄 디카르복실산 및 알코올을 보다 효율적으로 생산할 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에서 제공하는 형질전환된 에탄올-내성 효모균주는 주변 환경의 에탄올 농도가 5%(v/v) 까지 증가하더라도 에탄올 생산성이 감소되지 않는다는 장점이 있으므로, 상기 형질전환된 에탄올-내성 효모균주는 바이오 에탄올 제조분야 및 주류 제조분야를 비롯한 다양한 에탄올의 산업적 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 *S. cerevisiae* BY4741 및 그의 에탄올 내성변이주 iETS3의 칼세인 방출 분석결과를 나타낸다. 상기 각 세포를 20 g/L 글루코스를 포함하는 YNB 배지(좌측) 및 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 동일 배지(우측)에서 배양하였다. 회색 및 녹색선은 각각 BY4741 균주와 iETS3 균주의 형광세기를 나타낸다.

도 2는 BY4741 및 에탄올-내성 변이주 iETS3로부터 발현된 다양한 방출펌프 유전자의 mRNA 분석결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 *S. cerevisiae*의 ADP1의 RT-PCR 결과 및 칼세인 방출 분석결과를 나타낸다. (A) 5%(v/v) 에탄올의 부재 또는 존재하에서 20 g/L 글루코스를 포함하는 YNB 배지에서 배양된 *S. cerevisiae* BY4741 균주 및 iETS3 균주의 ADP1의 RT-PCR 결과를 나타낸다. GAPDH는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자이다. (B) 20 g/L 글루코스를 포함하는 YNB 배지에서 기초배양한 후에 20 g/L 갈락토스를 포함하는 YNB 배지에서 배양된 *S. cerevisiae* pYES2/ADP1 균주의 ADP1의 RT-PCR 결과를 나타낸다. (C) *S. cerevisiae* pYES2/ADP1 및 그의 모균주인 BY4741 균주의 칼세인 방출 분석결과를 나타낸다. 상기 세포는 20 g/L 갈락토스를 포함하는 YNB 배지에서 배양하였다. 회색 및 녹색선은 각각 BY4741 균주와 그의 형질전환 균주를 나타낸다.

도 4는 *S. cerevisiae* BY4741 균주 및 BY4741 pYES2/ADP1 균주의 성장율에 미치는 에탄올 농도의 효과를 나타낸다. 상기 성장율은 20 g/L 갈락토스와 0-7.5%(v/v) 에탄올을 포함하는 YNB 배지에서 배양하면서 세포농도에 기초하여 산출하였다. 상기 세포는 30℃에서 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

도 5는 *S. cerevisiae* BY4741 균주(흰색) 및 BY4741 pYES2/ADP1 균주(검은색)의 배양프로필을 나타내는 그래프이다. 상기 세포를 20 g/L 갈락토스를 포함하는 YNB 배지(A), 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 동일배지(B) 및 7.5%(v/v) 에탄올을 포함하는 동일배지(C)에서 배양하였다. 상기 배양물을 30℃ 및 200 rpm의 조건으로 배양하였다.

도 6은 *S. cerevisiae*의 에탄올 생산성에 대한 배지내 에탄올 농도의 영향을 나타내는 그래프이다. 에탄올 생산성은 도 5의 방법으로 배양을 진행하는 중의 에탄올 생산량에 기초하여 산출하였다.

도 7은 *S. cerevisiae*의 성장을 및 에탄올 생산성의 상관관계를 나타내는 그래프이다. 상기 성장율과 에탄올 생산성은 도 5의 방법으로 배양을 진행하는 중의 세포밀도 및 에탄올 생산량에 기초하여 산출하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 실시예 1: 재료 및 방법

[0027] 실시예 1-1: 효모균주 및 배양 배지

[0028] *S. cerevisiae* BY4741 및 그의 에탄올 내성변이주 iETS3를 YPD 배지 및 30℃ 조건에서 사전배양하였다. 그런 다음, 주 배양을 위해, 아미노산 없는 6.7 g/L YNB(yeast nitrogen base), 우라실이 없는 0.77 g/L complete supplement mixture 및 0.02 g/L 우라실로 구성되고, 20 g/L 갈락토스를 포함하는 YNB 배지를 사용하였다.

[0029] 실시예 1-2: 시약

[0030] 에탄올과 사이클로스포린 A는 Calbiochem(La Jolla, CA)에서 입수하였다.

[0031] 칼세인 방출분석키트(Calcein efflux assay kits)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 입수하였다.

[0032] 그외 기타 시약들은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)에서 입수하였다.

[0033] 실시예 1-3: 칼세인 방출 분석(Calcein efflux assay)

[0034] 칼세인 방출분석키트(Calcein efflux assay kits)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라, 칼세인 방출 분석(Calcein efflux assay)을 수행하였다. 즉,

[0035] 배양된 세포에 2 μM calcein AM을 가하여 30℃에서 30분간 염색하고, 488nm에서 여기되는 형광을 측정하여 칼세인 방출 분석을 수행하였다. 이때, 염색되지 않은 세포에서는 형광이 검출되지 않았다.

[0036] 실시예 1-4: RT-PCR

[0037] 배양된 세포에 Trizol 시약을 처리하고 공지된 방법에 따라 총 RNA를 수득하였다. 상기 수득한 총 RNA를 역전사 PCR 키트(Super-Script First Strand Synthesis System, Promega)에 적용하여 역전사를 수행하여 cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA를 주형으로 하고 하기의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다(94℃, 2분; 30 사이클(94℃, 1분; 50℃, 2분; 및 72℃, 1분) 및 72℃, 5분).

[0038] 정방향 프라이머: 5'-GAGCTCATGGGAAGTCATCGACG-3'(서열번호 1)

[0039] 역방향 프라이머: 5'-CTCGAGCTACTTTTGTCCACAAC-3'(서열번호 2)

[0040] 실시예 1-5: 복제 및 발현

[0041] YNB 배지에서 배양된 *S. cerevisiae* BY4741를 QIAGEN Genomic DNA Purification kit에 적용하여 게놈 DNA를 수득하였다.

[0042] 효모의 ADP1 유전자를 지노믹 DNA로부터 PCR 방법으로 증폭하여 수득하고, 이의 발현을 유도하기 위하여 pYES2 벡터(Invitrogen)의 SacI-XhoI 위치에 삽입하여 재조합 발현벡터 pYES2/ADP1을 제조하였다. 이때, 증폭된 ADP1 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열은 extensive sequencing(Bionics, Korea)으로 확인하였다.

[0043] 상기 제조된 재조합 발현벡터 pYES2/ADP1를 원래의 균주인 *S. cerevisiae* BY4741에 리튬 아세테이트 방법으로

도입하여 형질전환체를 제작하고, 형질전환체는 2% 포도당이 포함된 ura 결핍 YNB 아가 배지를 사용하여 선별하였다.

[0044] 형질전환체에서 ADP1 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여, 상기 형질전환체를 포도당을 포함하는 YNB 배지에 접종하고 하룻밤동안 배양하였다. 상기 배양물을 원심분리하여 균체를 수득하고, 상기 균체를 2% 갈락토스를 탄 소원으로 포함하는 YNB/ura 유도 배지에 접종하였다.

[0045] **실시예 1-6: 세포 배양 및 에탄올 발효**

[0046] 야생형 및 조작된 효모균주를 2% 갈락토스를 포함하는 YNB/ura+ 배지에 접종하고, 30℃에서 하룻밤동안 배양하였다.

[0047] 상기 배양물을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 수득하고, 이를 신선한 배지에 재현탁하였으며, 이를 30℃에서 200rpm으로 교반하며 배양하였다. 이때, 배양물의 부피는 약 50mℓ이고, 알루미늄 포일로 감싸서 차광시켰다.

[0048] 아울러, 상기 세포의 성장에 에탄올이 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 배양물에 최종농도가 5 내지 7.5%(v/v)가 되도록 에탄올을 가하였다.

[0049] **실시예 1-7: 포도당, 글리세롤, 에탄올 및 유기산의 정량분석**

[0050] 포도당, 글리세롤, 에탄올 및 유기산(예를 들어, 초산, 젖산 등)을 HPX-87H 컬럼(Bio-Rad Aminex, Hercules, CA, USA)을 이용한 HPLC 방법에 적용하여 정량분석하였다. 용출액으로는 5 mM H₂SO₄ 용액을 사용하고, 용출속도는 0.6mℓ/분이며, 용출온도는 50℃로 설정하였다. 상기 성분을 검출하기 위한 검출기로는 Refractive index detector와 UV dual absorbance detector를 사용하였고, 이때, UV 파장으로는 210nm를 사용하였다.

[0051] **실시예 2: 결과 및 분석**

[0052] **실시예 2-1: *S. cerevisiae*의 칼세인 방출 분석**

[0053] *S. cerevisiae*의 에탄올 스트레스에 대한 내성은 막에 결합된 약물/용매 방출 펌프를 포함한 다양한 인자에 의해 영향을 받을 수 있다고 알려져 있다(Ma and Liu, 2010; Teixeira et al., 2009). *S. cerevisiae*의 에탄올 내성에 대한 약물/용매 방출 펌프의 효과를 평가하기 위하여, 우선, *S. cerevisiae* BY4741의 칼세인 방출 분석을 수행하였다.

[0054] 칼세인 AM(Calcein AM, M.W 995)은 진핵세포의 생체막을 빠르게 관통하는 비형광물질이고, 이는 세포내에서 에스터가수분해효소에 의해 가수분해되어 친수성의 형광물질인 칼세인으로 전환된다.

[0055] 만일, 막에 결합된 방출펌프가 존재한다면, 세포내로 유입된 칼세인 AM이 가수분해되기 전에 세포밖으로 방출될 것이고, 이로 인하여 세포내부에서 형광을 나타내지 않게 될 것으로 예측할 수 있다.

[0056] 에탄올이 없는 조건에서 배양된 *S. cerevisiae* BY741 균주 및 에탄올 내성균주인 iETS3 균주를 대상으로 칼세인 방출 분석을 수행한 결과, 각 균주에서 측정된 형광값에 다소 차이가 있었다(도 1). 그러나, 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 배지에서 배양된 상기 두가지 균주를 대상으로 칼세인 방출 분석을 수행한 경우에는 *S. cerevisiae* BY741 균주에서 측정된 형광값이 iETS3 균주에서 측정된 값보다 월등히 높은 수준을 나타내었다. 상기 결과는 에탄올에 의한 스트레스 내성 기작에 약물/용매 방출 펌프가 관련됨을 시사하였다.

[0057] 실시예 2-2: 방출펌프의 mRNA 분석

[0058] 상기 실시예 2-1의 결과로부터, 에탄올에 의한 스트레스 내성 기작에 약물/용매 방출펌프가 관련됨을 확인하였으므로, 효모에서 발현되는 약물/용매 방출펌프 중에서 야생형 균주보다도 에탄올 내성균주에서 발현량이 우수한 것을 확인하고자 mRNA 분석을 수행하였다.

[0059] 구체적으로, 야생형 BY4741 균주와 에탄올-내성 변이주 iETS3를 5L bioreactor의 1.5L YPD 20(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glc 200 g/L)배양액에 접종 후 30° C에서 500rpm으로 배양하였다. Exponential phase 시점에서 발효액 중 일부를 회수하여 RNA-seq differential gene expression analysis 방법에 따라 각각의 효모에서 발현되는 전사체(transcriptome)들을 분석하였다(도 2). 도 2는 BY4741 및 에탄올-내성 변이주 iETS3로부터 발현된 다양한 방출펌프 유전자의 mRNA 분석결과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 대부분의 방출펌프 유전자는 야생형 균주 보다는 에탄올-내성 변이주에서 높은 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

[0060] 실시예 2-3: *S. cerevisiae* BY4741에서 ADP1의 복제 및 발현

[0061] 상기 실시예 2-2의 결과로부터, 대부분의 방출펌프 유전자는 야생형 균주 보다는 에탄올-내성 변이주에서 높은 수준으로 발현됨을 확인하였으므로, 상기 각 방출펌프 중에서 칼세인 AM의 방출과 관계있는 막 방출 펌프를 규명하기 위하여, 다양한 약물/용매 방출 펌프의 발현 유형을 RT-PCR 방법으로 조사하였다(도 3A). 그 결과, iETS3 균주에서 높은 수준으로 발현되는 기질 막 ATP 결합 카세트 운반체에 속하는 ADP1(M.W 110 kDa)이 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 배양물에서 높은 수준으로 발현되는 반면, *S. cerevisiae* BY4741 균주에서는 매우 낮은 수준으로 발현됨을 확인하였다. 이러한 결과는 높은 에탄올 농도환경에서도 상기 ADP1의 발현이 유도될 수 있다는 점을 시사하였다.

[0062] 에탄올 내성기작에 대한 ADP1의 역할을 조사하고자, *S. cerevisiae* BY4741의 게놈 DNA로부터 ADP1 유전자를 증폭하고, 이를 GAL1 프로모터를 포함하는 pYES2 벡터(Invitrogen)에 복제하여 재조합 발현벡터 pYES2/ADP1을 제작하였다. 상기 제작된 pYES2/ADP1을 *S. cerevisiae* BY4741에 도입하여 형질전환체를 수득하고, 상기 형질전환체에서 발현된 ADP1의 수준을 비교한 결과, 갈락토스를 탄소원으로 포함하는 배지에서 과발현됨을 확인하였다(도 3B). 아울러, 상기 형질전환체를 대상으로 칼세인 방출 분석을 수행하고 이를 모균주(*S. cerevisiae* BY4741)의 것과 비교한 결과, 형광값이 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 3C).

[0063] 상기 결과는, ADP1이 *S. cerevisiae* BY4741에서 과발현될 수 있고, 칼세인 AM을 방출시킨다는 점을 시사하였다.

[0064] 실시예 2-4: *S. cerevisiae*의 성장에 대한 ADP1 과발현의 효과

[0065] 에탄올 내성에 ADP1의 과발현이 미치는 영향을 조사하기 위해, 모균주(야생형 균주) 및 형질전환된 균주를 20 g/L의 갈락토스와 서로 다른 농도의 에탄올을 포함하는 YNB 배지에서 배양하였다(도 4). 에탄올을 포함하지 않는 배지에서, 형질전환된 균주의 성장율은 0.20/h이고, 이는 야생형 균주에 비해 20% 정도 낮은 수준이었다. 이에 반하여, 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 배지에서는, 형질전환된 균주가 야생형 균주와 동등한 수준의 성장율을 나타내었다. 상기 결과는 형질전환된 균주는 에탄올이 존재하는 조건에서도 동일한 성장율을 나타낸다는 것이며, 이는 형질전환된 균주가 에탄올에 의한 스트레스에 대해 내성을 나타낸다는 점을 시사하는 것이다.

[0066] 실시예 2-5: *S. cerevisiae*의 에탄올 생산에 대한 ADP1 과발현의 효과

[0067] *S. cerevisiae*의 에탄올 생산성에 대한 ADP1 과발현의 효과를 확인하기 위해서, 야생형 균주 및 형질전환된 균주를 20 g/L 갈락토스 및 0 내지 7.5%(v/v) 에탄올을 포함하는 YNB 배지에서 배양하였다(도 5). 에탄올이 없는 조건에서 배양된 상기 두 가지 균주는 동일하게 10.5 g/L의 최종 에탄올 농도 및 0.41 g/L/h의 에탄올 생산성을

나타내었고, 균주에 따른 유의한 차이는 확인되지 않았다(도 5a). 이에 반하여, 에탄올이 존재하는 조건에서는 야생형 균주에 비하여 형질전환된 균주의 에탄올 생산성이 증가하였고, 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 조건에서 현저히 증가하였다. 구체적으로, 5%(v/v) 에탄올을 포함하는 조건에서, 형질전환된 균주는 9.1 g/L의 최종 에탄올 농도 및 0.38 g/L/h의 에탄올 생산성을 나타내었는데, 이는 동일조건의 야생형 균주의 것보다 최종 에탄올 농도는 47% 증가된 것이고, 에탄올 생산성은 60% 증가된 것이다(도 5b).

[0068] 상기 결과를 에탄올이 없는 조건에서 형질전환된 균주의 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성과 비교하여도 유사한 결과를 나타내었다(도 6).

[0069] 상기 결과는, 형질전환된 균주의 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성이 5%(v/v) 에탄올에 의한 독성에 의해 영향을 받지 않는다는 점을 나타낸다.

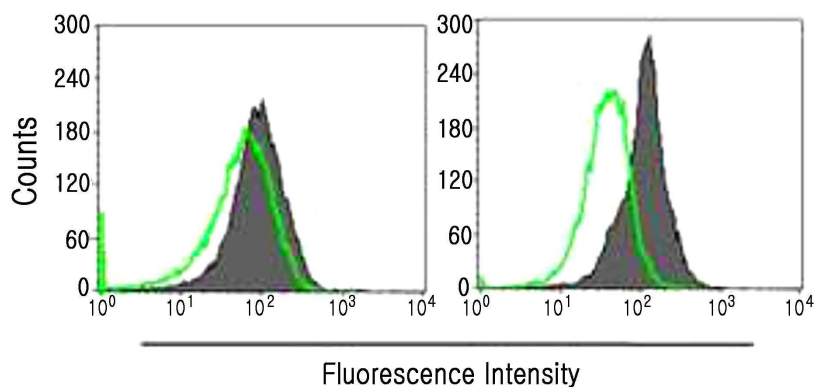
[0070] 한편, 7.5%(v/v) 에탄올이 존재하는 조건에서는, 상기 형질전환된 균주의 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성이 급격히 저하되었으나(도 5c), 이같은 최종 에탄올 농도 및 에탄올 생산성은 야생형 균주의 것보다는 월등히 높은 수준임을 알 수 있었다(도 6).

[0071] 아울러, 상기 *S. cerevisiae*의 성장을 및 에탄올 생산성의 상관관계를 분석한 결과, *S. cerevisiae*의 성장을 및 에탄올 생산이 상호 비례함을 알 수 있었다(도 7).

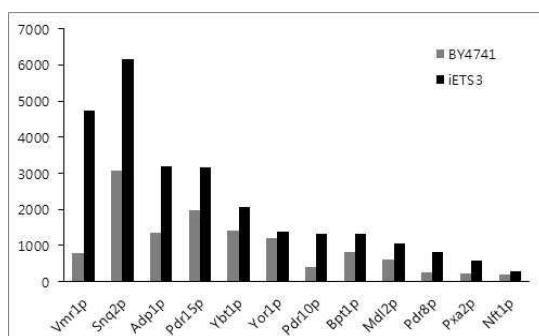
[0072] 상술한 바를 종합하면, 형질전환된 균주에서 과발현되는 ADP1은 일정 수준의 에탄올에 의해 유도되는 스트레스에 대하여 내성을 부여하고, 이같이 부여된 내성에 의하여 에탄올이 존재하는 조건에서도 상기 형질전환체는 에탄올 생산성을 효율적으로 유지할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

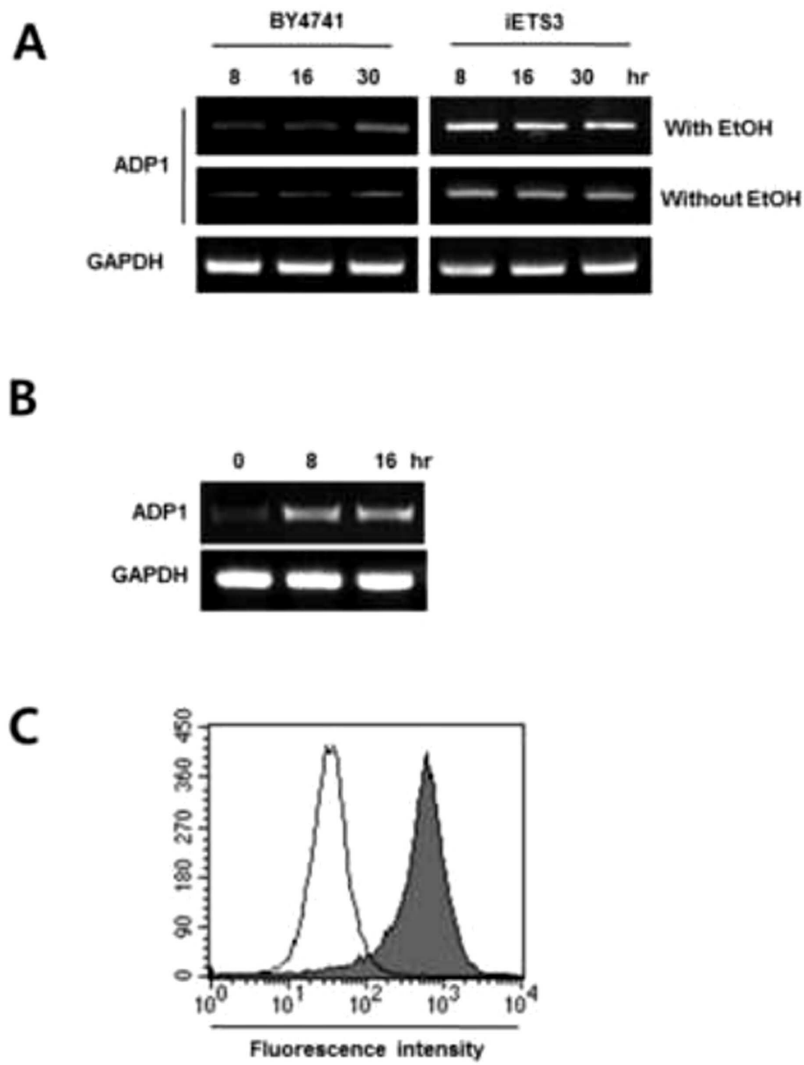
도면1



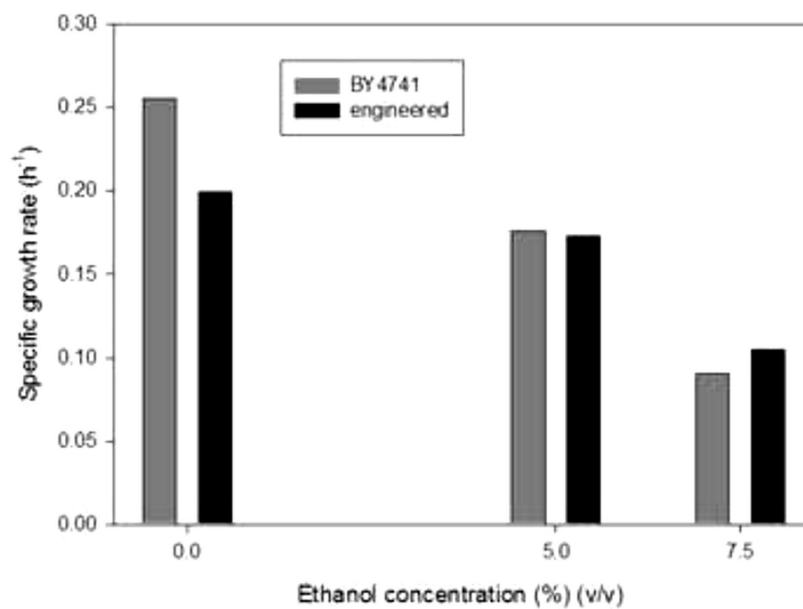
도면2



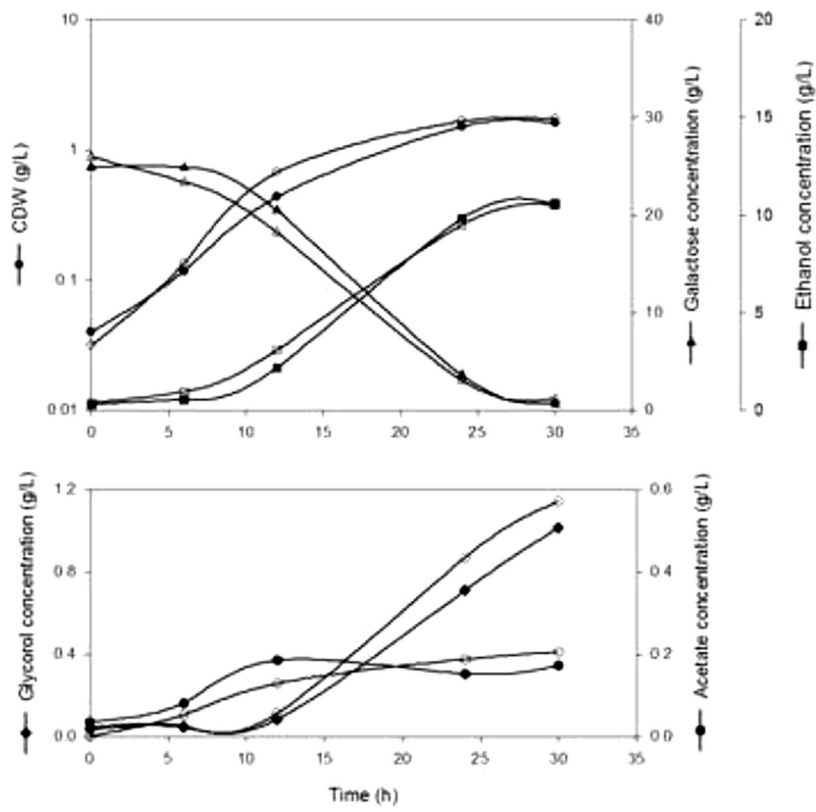
도면3



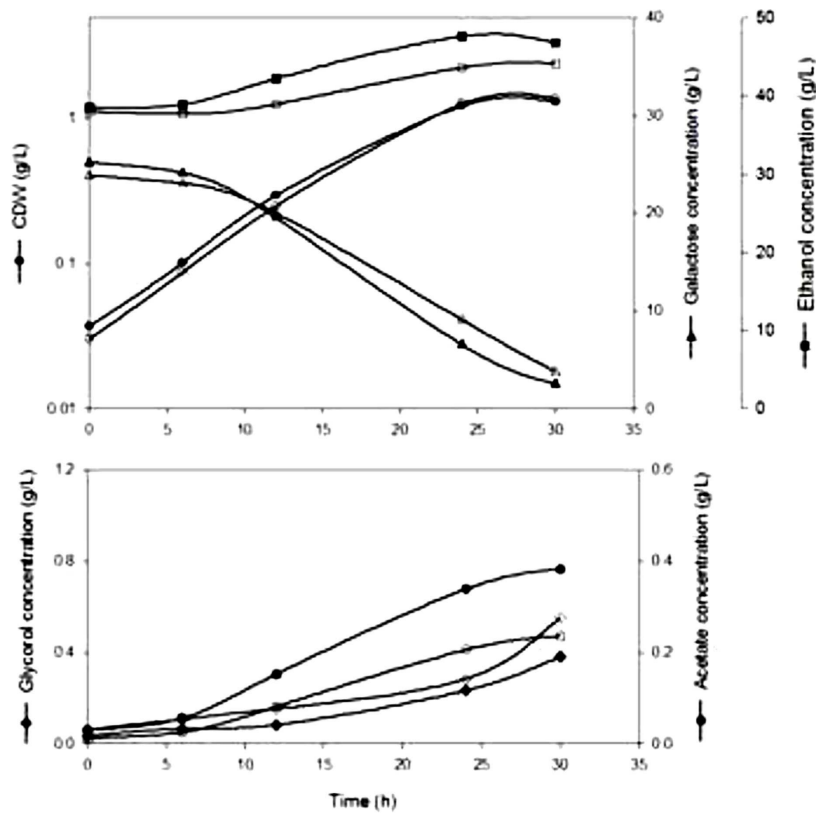
도면4



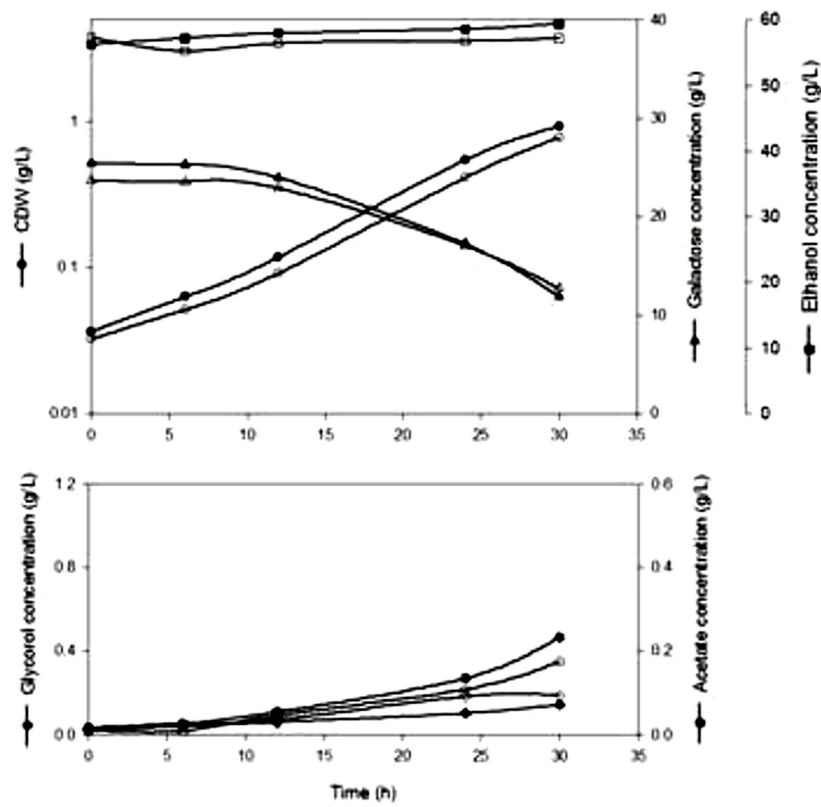
도면5a



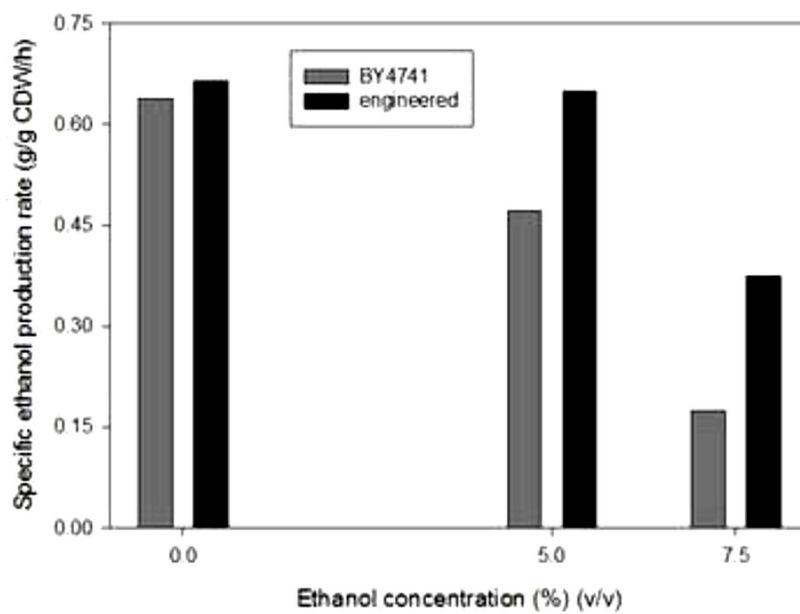
도면5b



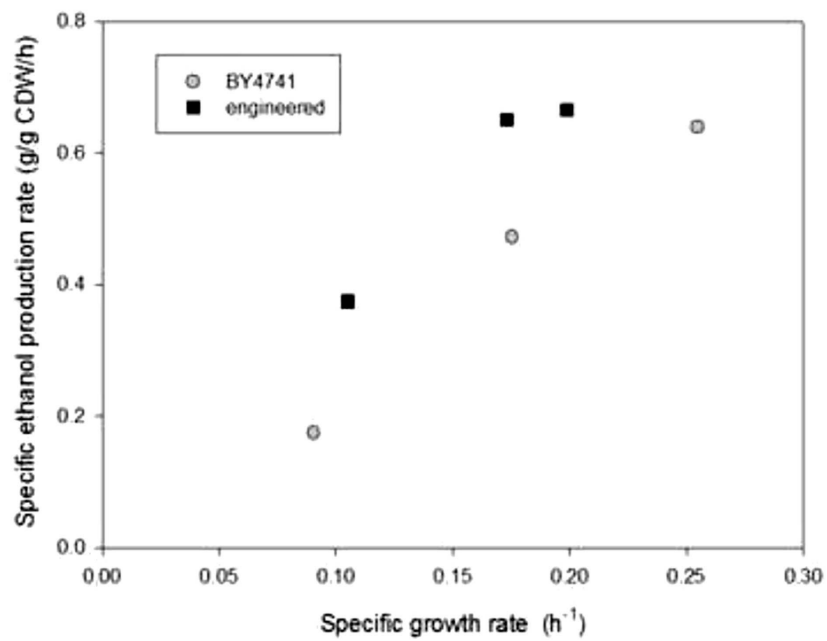
도면5c



도면6



도면7



서열 목록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

<120> Novel ethanol-resistance mutant strain and uses thereof

<130> PA120694/KR

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer F

<400> 1

gagctcatgg gaagtcacg acg

23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer R

<400> 2

ctcgagctac tttgttcca caac

24

<210> 3
 <211> 1049
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae* ADP1
 <400> 3
 Met Gly Ser His Arg Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ser Ile Leu Ser Phe Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Cys Ser Val Val Leu Ala Lys Gln Asp Lys Thr Pro Phe
 20 25 30
 Phe Glu Gly Thr Ser Ser Lys Asn Ser Arg Leu Thr Ala Gln Asp Lys
 35 40 45
 Gly Asn Asp Thr Cys Pro Pro Cys Phe Asn Cys Met Leu Pro Ile Phe
 50 55 60
 Glu Cys Lys Gln Phe Ser Glu Cys Asn Ser Tyr Thr Gly Arg Cys Glu
 65 70 75 80
 Cys Ile Glu Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Ser Leu Pro Leu Cys Gly
 85 90 95
 Gly Leu Ser Pro Asp Glu Ser Gly Asn Lys Asp Arg Pro Ile Arg Ala
 100 105 110
 Gln Asn Asp Thr Cys His Cys Asp Asn Gly Trp Gly Gly Ile Asn Cys
 115 120 125
 Asp Val Cys Gln Glu Asp Phe Val Cys Asp Ala Phe Met Pro Asp Pro
 130 135 140
 Ser Ile Lys Gly Thr Cys Tyr Lys Asn Gly Met Ile Val Asp Lys Val
 145 150 155 160
 Phe Ser Gly Cys Asn Val Thr Asn Glu Lys Ile Leu Gln Ile Leu Asn
 165 170 175
 Gly Lys Ile Pro Gln Ile Thr Phe Ala Cys Asp Lys Pro Asn Gln Glu
 180 185 190
 Cys Asn Phe Gln Phe Trp Ile Asp Gln Leu Glu Ser Phe Tyr Cys Gly
 195 200 205
 Leu Ser Asp Cys Ala Phe Glu Tyr Asp Leu Glu Gln Asn Thr Ser His

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

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

 340 345 350
 Asn Gly Leu Gly Ser Ser Lys Ser Pro Ile Arg Leu Pro Asp Glu Asp
 355 360 365
 Ala Val Asn Asn Phe Leu Gln Asn Glu Asp Asp Thr Leu Ala Thr Leu
 370 375 380
 Ser Phe Glu Asn Ile Thr Tyr Ser Val Pro Ser Ile Asn Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Val Glu Glu Thr Val Leu Asn Glu Ile Ser Gly Ile Val Lys Pro Gly
 405 410 415

 Gln Ile Leu Ala Ile Met Gly Gly Ser Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu
 420 425 430
 Leu Asp Ile Leu Ala Met Lys Arg Lys Thr Gly His Val Ser Gly Ser
 435 440 445
 Ile Lys Val Asn Gly Ile Ser Met Asp Arg Lys Ser Phe Ser Lys Ile
 450 455 460
 Ile Gly Phe Val Asp Gln Asp Asp Phe Leu Leu Pro Thr Leu Thr Val

465 470 475 480
 Phe Glu Thr Val Leu Asn Ser Ala Leu Leu Arg Leu Pro Lys Ala Leu

 485 490 495
 Ser Phe Glu Ala Lys Lys Ala Arg Val Tyr Lys Val Leu Glu Glu Leu
 500 505 510
 Arg Ile Ile Asp Ile Lys Asp Arg Ile Ile Gly Asn Glu Phe Asp Arg
 515 520 525
 Gly Ile Ser Gly Gly Glu Lys Arg Arg Val Ser Ile Ala Cys Glu Leu
 530 535 540
 Val Thr Ser Pro Leu Val Leu Phe Leu Asp Glu Pro Thr Ser Gly Leu
 545 550 555 560

 Asp Ala Ser Asn Ala Asn Asn Val Ile Glu Cys Leu Val Arg Leu Ser
 565 570 575
 Ser Asp Tyr Asn Arg Thr Leu Val Leu Ser Ile His Gln Pro Arg Ser
 580 585 590
 Asn Ile Phe Tyr Leu Phe Asp Lys Leu Val Leu Leu Ser Lys Gly Glu
 595 600 605
 Met Val Tyr Ser Gly Asn Ala Lys Lys Val Ser Glu Phe Leu Arg Asn
 610 615 620
 Glu Gly Tyr Ile Cys Pro Asp Asn Tyr Asn Ile Ala Asp Tyr Leu Ile

 625 630 635 640
 Asp Ile Thr Phe Glu Ala Gly Pro Gln Gly Lys Arg Arg Arg Ile Arg
 645 650 655
 Asn Ile Ser Asp Leu Glu Ala Gly Thr Asp Thr Asn Asp Ile Asp Asn
 660 665 670
 Thr Ile His Gln Thr Thr Phe Thr Ser Ser Asp Gly Thr Thr Gln Arg
 675 680 685
 Glu Trp Ala His Leu Ala Ala His Arg Asp Glu Ile Arg Ser Leu Leu
 690 695 700

 Arg Asp Glu Glu Asp Val Glu Gly Thr Asp Gly Arg Arg Gly Ala Thr
 705 710 715 720

Glu Ile Asp Leu Asn Thr Lys Leu Leu His Asp Lys Tyr Lys Asp Ser
 725 730 735
 Val Tyr Tyr Ala Glu Leu Ser Gln Glu Ile Glu Glu Val Leu Ser Glu
 740 745 750
 Gly Asp Glu Glu Ser Asn Val Leu Asn Gly Asp Leu Pro Thr Gly Gln
 755 760 765
 Gln Ser Ala Gly Phe Leu Gln Gln Leu Ser Ile Leu Asn Ser Arg Ser
 770 775 780
 Phe Lys Asn Met Tyr Arg Asn Pro Lys Leu Leu Leu Gly Asn Tyr Leu
 785 790 795 800
 Leu Thr Ile Leu Leu Ser Leu Phe Leu Gly Thr Leu Tyr Tyr Asn Val
 805 810 815
 Ser Asn Asp Ile Ser Gly Phe Gln Asn Arg Met Gly Leu Phe Phe Phe
 820 825 830
 Ile Leu Thr Tyr Phe Gly Phe Val Thr Phe Thr Gly Leu Ser Ser Phe
 835 840 845
 Ala Leu Glu Arg Ile Ile Phe Ile Lys Glu Arg Ser Asn Asn Tyr Tyr
 850 855 860
 Ser Pro Leu Ala Tyr Tyr Ile Ser Lys Ile Met Ser Glu Val Val Pro
 865 870 875 880
 Leu Arg Val Val Pro Pro Ile Leu Leu Ser Leu Ile Val Tyr Pro Met
 885 890 895
 Thr Gly Leu Asn Met Lys Asp Asn Ala Phe Phe Lys Cys Ile Gly Ile
 900 905 910
 Leu Ile Leu Phe Asn Leu Gly Ile Ser Leu Glu Ile Leu Thr Ile Gly
 915 920 925
 Ile Ile Phe Glu Asp Leu Asn Asn Ser Ile Ile Leu Ser Val Leu Val
 930 935 940
 Leu Leu Gly Ser Leu Leu Phe Ser Gly Leu Phe Ile Asn Thr Lys Asn
 945 950 955 960
 Ile Thr Asn Val Ala Phe Lys Tyr Leu Lys Asn Phe Ser Val Phe Tyr
 965 970 975

Tyr Ala Tyr Glu Ser Leu Leu Ile Asn Glu Val Lys Thr Leu Met Leu
980 985 990

Lys Glu Arg Lys Tyr Gly Leu Asn Ile Glu Val Pro Gly Ala Thr Ile
995 1000 1005

Leu Ser Thr Phe Gly Phe Val Val Gln Asn Leu Val Phe Asp Ile Lys
1010 1015 1020

Ile Leu Ala Leu Phe Asn Val Val Phe Leu Ile Met Gly Tyr Leu Ala
1025 1030 1035 1040

Leu Lys Trp Ile Val Val Glu Gln Lys
1045

<210> 4

<211> 3150

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae ADP1

<400> 4

atgggaagtc atcgacgtta tctctactat agtatattat catttctatt attatcctgc 60
tcagtggtag ttgcaaaaca agataagacc ccattctttg aaggtacttc ttcgaaaaat 120
tcgcgtctaa ctgcacaaga taagggaat gatacatgcc cgccatgttt taattgtatg 180
ctacctat ttgaatgcaa acagttttct gaatgcaatt cgtacactgg tagatgtgag 240
tgtatagaag gggttgagg tgatgattgc tctctgcccc tctgtggcgg tctatcacgc 300
gatgaaagcg gtaataagga tcgtccata agagcacaaa atgacacctg tcattgtgat 360
aacggatggg gagggatcaa ttgtgacgtt tgcagaag atttgtctg tgatgcgttc 420

atgcctgac ctagtattaa ggggacatgt tataagaatg gtatgattgt agataaagta 480
ttttcagggt gtaatgtgac caatgagaaa attctacaga ttttgaacgg caaaatacca 540
caaattacat ttgcctgtga taaacctaat caagaatgta attttcagtt ttggatagat 600
cagttagaaa gcttctattg tggcttaagt gattgtgcct ttgaatacga cttggaacag 660
aatacctccc attataagt taatgacgtt caatgcaaat gcgttcccga cactgtgttg 720
tgtggtgcta aggggtctat agatatctcg gatttctga cagagacaat aaaaggcca 780
ggagatttca gctgtgattt agaaacaagg caatgtaaat tcagtggacc ttctatgaat 840

gatttgatat tgaccgtgtt tggtagacct tatattactt tgaagtgtga atccggtgaa 900
tgtgttcatt atagttagat tccaggttac aaatctcctt caaagatcc aacagtgtca 960

tggcaaggga aattggtgtt ggcatgtgact gctgtgatgg tcctggcact ttttacattt	1020
gctacctttt acattttctaa atctccgtta ttcagaaatg gattgggttc ctcaaagtct	1080
cccattcggtt tgccagatga agatgcggtg aataatttct taaaaatga agatgacaca	1140
ctggcgacat taagttttga aaatactact tatagtgtcc cctcgataaa ttcagatggt	1200
gttgaagaaa ctgtgctgaa tgaaataagt ggtatcgtga agcccgcca aatattagct	1260
atcatgggtg gatctgggtc gggtaaaact actttattag atatcctagc aatgaaacgg	1320
aaaacaggtc acgtttcggg ttccataaaa gttaacggta ttagtatgga ccgtaaatct	1380
ttctcgaaaa taatcgggtt cgtcgatcaa gatgactttt tgctgccac ttgactgtt	1440
tttgaaccg tattaaatag tgcgctgtta agattgccaa aagcattgtc attcgaggcc	1500
aagaaggcaa gagtttataa ggtgttgga gaactaagaa ttattgatat caaagatcgt	1560
attattggta atgaattga tcgtggtatt agtggagggtg aaaaacgccc agtttcatt	1620
gcatgtgaat tagtgacatc tccattggtt ttatttttgg atgaacctac atctggttta	1680
gatgctagta atgccaataa tgttattgaa tgtttgtaa gggtatccag cgactataac	1740
aggacattgg tgctatctat tcatcagcca agatcaaata tattttattt attcgataaa	1800
ttggtcctgt taagtaaagg tgagatggtc tattccggaa atgccaataa agtgtcagaa	1860
tttttgagaa atgagggata tatctgtccg gacaactata atattgctga ttatttgatt	1920
gatattactt ttgaagccgg tcctcagggg aaaaggagaa gaatcagaaa catttccgat	1980
ttagaagctg gtacggatac taacgatatt gataatacga tacaccaaac aacatttact	2040
agcagtgatg gtacaacaca gagagagtgg gctcatcttg cagctcatag agatgagatc	2100
agatctttac tcagagatga agaagatgta gagggaacag atggaaggcg aggtgctact	2160
gagattgact taaataccaa actactacac gataaatata aagatagcgt ctattatgca	2220
gagctttcac aggagatcga ggaagtttta agcgaagggtg atgaggaaag taacgttttg	2280
aatggagatt taccacagg tcaacaatct gctggttttc tgcaacagtt atcgatattg	2340
aattcaagaa gttttaaaaa catgtacaga aacctaaac tattattggg taattattta	2400
ctgacgatcc tattgagttt attcttggga aactatatt acaacgtctc caatgatatc	2460
agcggttttc agaacagaat ggggctgttc ttctttatc taacgtactt cggttttgtt	2520
acattcacag gtctcagctc gttcgtctcg gaaaggatca ttttcataaa agaaagatcc	2580
aataactatt actcgccact tgcatactac attagtaaga taatgagcga agtggccccg	2640
ctacgtgttg taccacctat actcttgtca ttgattgttt acccaatgac tggtttaaac	2700
atgaaagaca atgtttttt taaatgtatt ggaatcctta tactgtttta ccttgggata	2760
tcgttggaaa tcctaaccat cggcataatt ttgaagact tgaataactc cataatatta	2820

agcgtgctgg tgcttttggg ctactactg tttagcggac tatttatcaa tactaagaat	2880
attacaaacg tggccttcaa gtacctgaaa aacttctctg tgttttacta cgcctacgaa	2940
tctttattga tcaatgaggt caaaacattg atgctgaaag agagaaagta cggcttaa	3000
attgaagttc caggcgctac tatcttgagc acatttggat ttgttgtcca aaacctgta	3060
tttgacatca agatcctggc tctgtttaat gtggtgtttt taataatggg gtatctagcc	3120
cttaagtgga tagttgtgga acaaaagtag	3150