



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0097816
(43) 공개일자 2018년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/00 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01) *C12P 13/12* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/93 (2013.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0024430

(22) 출원일자 2017년02월24일

심사청구일자 2017년12월21일

(71) 출원인

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이상엽

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 212동 702호 (전민동, 엑스포아파트)

장유신

경상남도 사천시 서포면 중촌안길 128 (자혜리)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

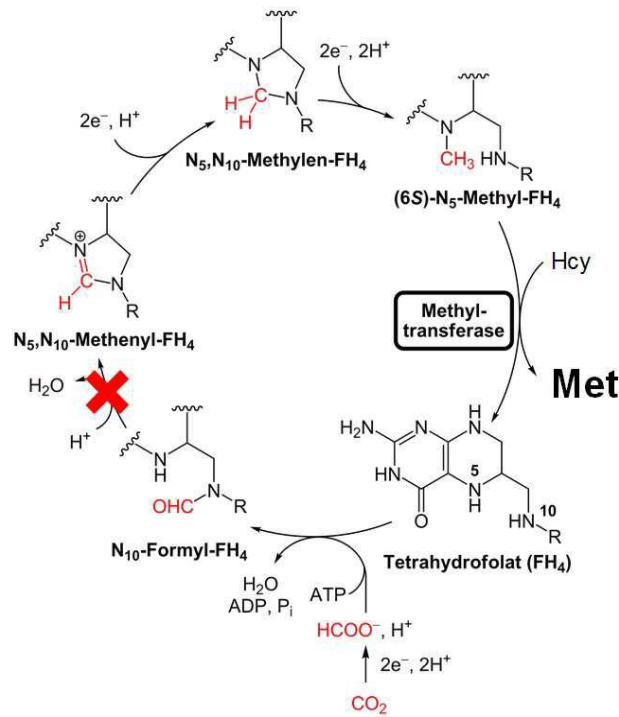
(54) 발명의 명칭 메티오닌 생합성능이 향상된 변이세포

(57) 요약

본 발명은 메티오닌 생합성능이 향상된 변이세포에 관한 것으로, 더 상세하게는 테트라하이드로 폴레이트 C1 대 사회로를 가지고 있는 세포에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



소를 코딩하는 유전자 및/또는 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어, 메티오닌 생합성능이 향상된 변이세포에 관한 것으로, 상기 변이세포를 배양하는 경우 메티오닌을 용이하게 대규모로 생산할 수 있으며, 배양 후 배지로부터 회수하여 동물 사료, 제약, 식품 첨가물, 화장품 및 다이어트 보충제를 포함한 다양한 산업적 용도로 이용할 수 있다. 또한, 상기 반응을 매개로 한 S-아데닐메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM)의 생산을 증가시킬 수 있으므로 이를 메틸 그룹 공여자(donor)로 이용하여 다양한 (생)화합물의 메틸화 반응을 유도함으로써 항암 효과를 향상시키는 장점이 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/1137 (2013.01)

C12P 13/12 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

(72) 발명자

김원준

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

임정애

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

우지은

경상남도 사천시 향촌2길 15-31, 202호 (향촌동, 경상향촌마을)

정금영

부산광역시 부산진구 전포대로 294, 104동 1802호 (전포동, 서면한신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016913250

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 시스템대사공학 기반 개미산으로부터 숙신산 및 말릭산 생산 미생물공정 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M3D3A1A01064918

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-C1 가스 리파이너리 사업

연구과제명 Non-acetogen 기반 CO 가스 활용 바이오부탄올 제조 균주 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.17 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 변이세포.

청구항 2

제1항에 있어서,

포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되고,

메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 5로 표시되고,

글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 9로 표시되는 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변이세포는 메티오닌의 생합성이 증가된 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포는 박테리아, 효모, 곰팡이, 식물세포, 동물세포, 조류 및 미세조류로 구성된 군에서 선택된 어느 하나에서 유래된 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 박테리아는 메탄생성균, 메탄산화균, 아세트전, 대장균, 코리넨박테리움, 크랩시엘라, 효모, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 바이에링키아이(*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리듐 사카로부틸리쿰(*Clostridium saccharobutylicum*), 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세트니쿰(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 부틸리쿰(*Clostridium butyricum*), 클로스트리듐 부틸리쿰(*Clostridium butylicum*), 클로스트리듐 클루이베리(*Clostridium kluyveri*), 클로스트리듐 타이로부틸리쿰(*Clostridium tyrobutylicum*) 및 클로스트리듐 타이로부틸리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현의 감소 또는 억제는 상기 유전자에 대한 안티센스(antisense) 도입에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 7

제6항에 있어서,

포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자에 대한 안티센스는 서열번호 2로 표시되고,

메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자에 대한 안티센스는 서열번호 6으로 표시되고,

글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자에 대한 안티센스는 서열번호 10으로 표시되는 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 안티센스(antisense)는 플라스미드 형태로 도입되는 것을 특징으로 하는 변이세포.

청구항 9

(a) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 변이세포를 배양하여 메티오닌을 생합성 하는 단계; 및

(b) 상기 생합성된 메티오닌을 회수하는 단계를 포함하는, 메티오닌의 제조방법.

청구항 10

포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자의 발현을 억제하는 물질 또는;

포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소로 구성된 군에서 선택되는 효소에 특이적으로 결합하는 저해제를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, shRNA, miRNA 또는 이들 중 하나를 포함하는 벡터인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 저해제는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 메티오닌 생합성능이 향상된 변이세포에 관한 것으로, 더 상세하게는 테트라하이드로 폴레이트 C1 대 사회로를 가지고 있는 세포에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효

[0001]

소를 코딩하는 유전자 및/또는 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어, 메티오닌 생합성능이 향상된 변이세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로 석유 의존도 및 온실가스 저감 요구가 증대됨에 따라 C1 가스를 기반으로 한 수송용 연료 및 기초 화학소재 생산기술에 대한 개발 수요가 급증하고 있다. C1 가스는 합성가스, 바이오가스 및 셰일가스 등 천연가스에서 유래한 탄소(C) 수가 1개인 메탄(CH_4) 가스와, 기타 탄소(C) 수가 1개인 일산화탄소(CO)나 이산화탄소(CO_2) 등과 같은 가스 및 이로부터 유도된 개미산(HCOOH)을 모두 포함하는 개념으로, 최근 미국, 유럽, 중국 등 주요 국가들을 포함한 전 세계 국가들이 셰일 가스 등에서 유래한 C1 가스를 유용 화합물로 전환시키기 위한 생물학적, 화학적 방법을 연구하기 위해 막대한 예산을 투자하고 있다.

[0003] 온실가스나 부생가스 등을 재활용하기 위한 C1 가스 정제(refinery)의 원천기술 개발은 기초 화학소재의 글로벌 가격경쟁력을 확보하고 화학산업의 성장동력을 창출하는데 유리하게 작용할 수 있다. 이와 같이 C1 가스를 재활용하기 위한 유용한 수단으로 생물의 C1 대사회로를 활용할 수 있는데, 대부분의 생명체들은 1 탄소 대사를 위하여 테트라하이드로 폴레이트 (tetrahydrofolate) 회로를 이용하고 있다. 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사는 세린 사이클, 핵산 메틸화, 메티오닌 사이클 등과 연결되어 있고, 상기 대사회로를 통하여 생체 내에 있는 대사산물의 메틸레이션이 유도되는 등, 상기 대사회로는 C1 이동에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, C1 대사회로 및 이 대사회로와 연결된 메티오닌 사이클은 아세틸코에이 및 피루브산과 같은 유용화합물 생합성을 위한 중심 대사로 연결되기 때문에 상기 대사회로를 적절히 활용하는 경우 유용 화합물을 고효율로 합성할 수 있다. 그러나, 아직까지 이러한 대사회로를 이용하여 유용한 화합물을 효율적으로 생산하는 기술이 개발되지 못하고 있어, 당업계에서는 상기 대사회로를 이용한 유용 화합물 합성 기술이 절실히 요구되는 실정이다.

[0004] 한편, 암 발생 원인 중 하나로 S-adenosylmethionine (SAM)으로부터 DNA, RNA, 단백질, 지방 등 수백 가지 대사산물들이 메틸화되는 과정에 문제가 발생하여 methyl sink가 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제들은 테트라하이드로폴레이트 대사회로를 통한 메티오닌의 원활한 합성 및 이들의 SAM으로의 전환을 통하여 해결할 수 있을 것으로 예상된다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 C1 대사회로를 이용하여 (1) 유용 화합물을 고효율로 생산할 수 있는 변이체 또는 (2) S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionin)의 전구체를 원활히 공급하기 위한 기술을 개발하기 위하여 C1 대사회로 조절 연구에 매진한 결과, C1 대사회로에서 메티오닌 생성능을 향상시킬 수 있었으며, 특히 (i) 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 Nickdown 시키거나, (ii) 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 Nickdown 시키거나, (iii) 글리신을 세린으로 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 Nickdown 시키거나, (iv) 이들 세 유전자들을 조합하여 Nickdown 시킨 생물의 C1 대사에서 메티오닌의 생산이 현저히 증가한다는 것을 확인하고 발명을 완성하게 되었다. 이와 더불어, S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionin)의 전구체를 원활히 공급하기 위하여 상기 유전자들의 siRNA를 도입하는 경우 암 치료 효율을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 메티오닌의 생합성이 증가된 변이세포를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이세포를 이용하여 메타오닌을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 향암 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제

또는 감소되어 있는 변이세포를 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 상기 변이세포를 배양하여 메티오닌을 생합성 하는 단계; 및 상기 생합성된 메티오닌을 회수하는 단계를 포함하는, 메티오닌의 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 포밀 테트라하이드로폴레이트로부터 메테닐 테트라하이드로폴레이트로의 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트로부터 메틸렌 테트라하이드로폴레이트 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신으로부터 세린의 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 대한 저해제를 포함하고, 상기 저해제는 siRNA, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, shRNA, miRNA 또는 이들 중 하나를 포함하는 벡터인 것을 특징으로 하는 항암 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자의 발현을 억제하는 물질 또는; 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소로 구성된 군에서 선택되는 효소에 특이적으로 결합하는 저해제를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 C1 대사회로에 관여하는 효소를 암호화하는 특정 유전자의 발현량을 조절하여 메티오닌의 생합성이 증가된 변이세포를 제공하기 위한 것으로, 상기 변이세포를 배양하는 경우 메티오닌을 용이하게 대규모로 생산할 수 있으며, 배양 후 배지로부터 회수하여 동물 사료, 제약, 식품 첨가물, 화장품 및 다이어트 보충제를 포함한 다양한 산업적 용도로 이용될 수 있다. 또한, 상기 반응을 매개로 한 S-아데닐메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM)의 생산을 증가시킬 수 있으므로 이를 메틸 그룹 공여자(donor)로 이용하여 다양한 (생)화합물의 메틸화 반응을 유도함으로써 항암 효과를 향상시키는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트로부터 메테닐 테트라하이드로폴레이트로의 전환에 관여하는 효소의 발현이 억제 또는 감소되어 차단되는 경로를 나타낸 것이다.

도 2는 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로에서, 메테닐 테트라하이드로폴레이트로부터 메틸렌 테트라하이드로폴레이트 전환에 관여하는 효소의 발현이 억제 또는 감소되어 차단되는 경로를 나타낸 것이다.

도 3은 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로에서, 글리신으로부터 세린의 전환에 관여하는 효소의 발현이 억제 또는 감소되어 차단되는 경로를 나타낸 것이다.

도 4는 테트라하이드로 폴레이트 대사회로를 이용한 one-carbon (C1) 전달 경로를 나타낸 것이다.

도 5는 테트라하이드로 폴레이트 대사회로에서 methyl sink를 통한 암 유발 기작을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명에서 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로란, one-carbon(C1) 전달을 위한 순환형 대사회로로, 개미산 한 분자가 테트라하이드로 폴레이트와 만나 포밀-테트라하이드로 폴레이트(Formyl-THF), 메테닐-테트라하이드로폴레이트(Methenyl-THF), 메틸렌-테트라하이드로 폴레이트(Methylen-THF), 메틸-테트라하이드로 폴레이트(Methyl-THF)를 거쳐 테트라하이드로 폴레이트로 대사하는 경로에서, 호모시스테인을 메티오닌으로 전환시키고, 글라이신(Glycine)을 세린(Serine)으로 전환시키는 개미산 동화 대사회로를 일컫는다.

[0017] 본 발명자들은 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포에서 포밀 테트라하이드로폴레이트로부터 메테닐 테트라하이드로폴레이트로의 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 조절하거나, 메테닐 테트라하이드로폴레이트로부터 메틸렌 테트라하이드로폴레이트 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 조절하거나, 글리신으로부터 세린의 전환에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 경우 메티

오닌 생합성 양상이 변화됨을 확인하고, 특히 상기 세 효소 중 어느 하나 이상의 발현을 억제 또는 감소시키는 경우 메티오닌 생합성이 증가됨을 확인할 수 있었다.

- [0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자가 결실되거나 상기 유전자의 발현이 억제 또는 감소되어 있는 변이세포에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서 상기 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소는 포미도-테트라하이드로폴레이트 사이클로디아미네이스(formimido-THF cyclodeaminase)이고, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소는 포밀-테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤레이스/메틸릴렌-테트라하이드로폴레이트 디하이드로게네이스(formyl-THF cyclohydrolase/methylene-THF dehydrogenase)이고, 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자는 세린 하이드록시메틸트랜스퍼레이스(serine hydroxymethyltransferase)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0020] 본 발명에서 상기 포미도-테트라하이드로폴레이트 사이클로디아미네이스(formimido-THF cyclodeaminase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 *ftcd*이고, 상기 포밀-테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤레이스/메틸릴렌-테트라하이드로폴레이트 디하이드로게네이스(formyl-THF cyclohydrolase/methylene-THF dehydrogenase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 *folD*이고, 상기 세린 하이드록시메틸트랜스퍼레이스(serine hydroxymethyltransferase)를 코딩하는 유전자는 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 *glyA*일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0021] 본 발명에서 상기 변이세포는 메티오닌의 생합성이 증가된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포는 인간세포, 박테리아, 효모, 곰팡이, 식물세포, 동물세포, 조류 및 미세조류로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0023] 상기 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포는, 바람직하게는, 박테리아일 수 있고, 상기 박테리아는 메탄생성균, 메탄산화균, 아세트전, 대장균, 코리넨박테리움, 크랩시엘라, 효모, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 바이에링키아이(*Clostridium beijerinckii*), 클로스트리듐 사카로부틸리쿰(*Clostridium saccharobutylicum*), 클로스트리듐 사카로퍼부틸아세토니쿰(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*), 클로스트리듐 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 부틸리쿰(*Clostridium butyricum*), 클로스트리듐 부틸리쿰(*Clostridium butylicum*), 클로스트리듐 클루이베리(*Clostridium kluyveri*), 클로스트리듐 타이로부틸리쿰(*Clostridium tyrobutylicum*) 및 클로스트리듐 타이로부틸리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 가장 바람직하게는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0024] 본 발명에서 상기 유전자 발현의 감소 또는 억제는 상기 유전자에 대한 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오타이드 도입에 의해 유도될 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 유전자의 발현을 감소 또는 억제시킬 수 있는 당업계에서 주지된 기술은 모두 활용될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자에 대한 안티센스는 서열번호 2로 표시되고, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자에 대한 안티센스는 서열번호 6으로 표시되고, 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자에 대한 안티센스는 서열번호 10으로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 상기 서열번호 2로 표시되는 안티센스는 포미도-테트라하이드로폴레이트 사이클로디아미네이스(formimido-THF cyclodeaminase)를 코딩하는 유전자인 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 *ftcd*의 발현을 억제 또는 감소시키고, 서열번호 6으로 표시되는 안티센스는 포밀-테트라하이드로폴레이트 사이클로하이드롤레이스/메틸릴렌-테트라하이드로폴레이트 디하이드로게네이스(formyl-THF cyclohydrolase/methylene-THF dehydrogenase)를 코딩하는 유전자인 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 *folD*의 발현을 억제 또는 감소시키고, 상기 서열번호 10으로 표시되는 안티센스는 세린 하이드록시메틸트랜스퍼레이스(serine hydroxymethyltransferase)를 코딩하는 유전자인 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 *glyA*의 발현을 억제 또는 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0027] 본 발명에서 상기 안티센스(antisense)는 플라스미드 형태로 도입될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0028] 본 발명에서 유전자의 "조절"은 유전자의 결실(deletion), 발현저해, 발현증진, knockdown, 프로모터 교체, 조절기작의 도입 등의 기법으로 유전자의 발현을 유발한 것까지 모두 포함하며, 생합성 경로에 존재하는 효소들 중 1개 이상을 진화(evolution) 시키거나 변이(mutation) 시키는 것을 포괄하는 개념이다.
- [0029] 본 발명에서 "넉다운"은 유전자의 발현을 완전히 차단시키는 "넉-아웃"과는 달리, 유전자의 발현량을 상당량 줄여 유전자의 기능이 감소되도록 하는 것을 의미한다. 이는 유전자의 전사체 수준에서 조절될 수도 있고, 단백질 수준에서 조절될 수도 있다. 그러나, 본 발명은 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로를 가지고 있는 세포에서, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자의 발현이 억제 또는 감소시키는데 의의가 있으므로, "넉다운" 및 "넉-아웃" 중 어느 것을 사용하여도 소기의 목적을 달성할 수 있을 것이다.
- [0030] 본 발명에서 "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 게놈 삽입물일 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 개시점, (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 발명의 벡터는 넉다운시키고자 하는 유전자의 안티센스(antisense)가 생성될 수 있도록 전사개시 신호와 프로모터가 포함된 것이 특징이다.
- [0031] 상기 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있으며, 본 발명의 효과를 위해 추가적으로 변형될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 싸이올레이즈 프로모터를 이용한다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원(ori)을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 게놈 DNA에 통합될 수 있다. 바람직하게는 벡터 내로 삽입되어 전달된 유전자가 숙주세포의 게놈 내로 비가역적으로 융합되어 세포 내에서 유전자 발현이 장기간 안정적으로 지속되도록 하는 것이 바람직하다.
- [0032] 구체적으로, 본 발명에 사용된 벡터는, pTHL1-Cm 벡터이나, 당업계에서 유전자의 발현을 억제하기 위하여 통상적으로 사용하는 pIMP1, pMTL21E, pIM13 등의 벡터로 대체하여 사용할 수 있다.
- [0033] 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.
- [0034] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및/또는 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및/또는 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을

같이 포함하고 있는 하나의 재조합백터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합백터는 진핵 발현숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

- [0035] 상술한 재조합 백터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0036] 물론 모든 백터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 백터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 백터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 백터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 백터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 백터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [0037] 아울러, 본 발명에서 도입된 유전자는 숙주세포의 게놈에 도입되어 염색체 상 인자로서 존재하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 백터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.
- [0038] 본 발명에서 대사회로란 C1 대사회로 또는 해당과정(glycolysis)을 거쳐서 제공된 탄소로부터 목적 화합물이 합성되는 경로만으로 국한하지 않고, 세포내의 특정 대사산물로부터 목적 화합물이 합성되는 경로들을 포괄하는 개념이다.
- [0039] 본 발명은 다른 관점에서 (a) 상기 변이세포를 배양하여 메티오닌을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 메티오닌을 회수하는 단계를 포함하는, 메티오닌의 제조방법에 관한 것이다.
- [0040] 상기 제조방법에 의해 메티오닌은 대규모로 생산될 수 있으며, 배양 후 배지로부터 회수되어 동물 사료, 제약, 식품 첨가물, 화장품 및 다이어트 보충제를 포함하여 다양한 산업적 용도로 이용될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0041] 한편, 포름산 대사회로는 핵산 빌딩 블록의 생성을 통한 DNA 합성과 수선 경로를 지원하는데, 이 대사과정은 효소 티미딜레이트 신테아제(thymidylate synthase)에 의한 메틸기의 첨가를 통해 deoxyuridine monophosphate(dUMP)로부터 deoxythymidine monophosphate (dTMP, 5-CH₂-dUMP)를 de novo 합성하고, 이후 deoxynucleotide 삼인산을 합성하게 된다. Thymidine triphosphate(dTTP)는 DNA 합성과 수선 과정에서 필수적인 4개의 DNA 중 하나로, 세포 내 dTTP의 수치에 의해 DNA 합성은 제한된다.
- [0042] 본 발명의 테트라하이드로 폴레이트 C1 대사회로에서는 5- 메틸 -THF- 호모 시스테인 S- 메틸 전이 효소 (EC 2.1.1.13)의 작용에 의한 호모시스테인이 메티오닌으로 전환된다. 생산된 메티오닌의 일부는 이어서 메티오닌 아데노실 트랜스퍼라제에 의해 ATP와 함께 S- 아데노실 메티오닌 (SAM 또는 SAdoMet), 인산염 및 이인산염을 생성한다. S- 아데노실 메티오닌은 메틸 전이 효소의 핵심 기질이며 지질과 펩타이드와 같은 생물학적 분자의 100 가지가 넘는 메틸화 반응에 참여한다. DNA의 메틸화는 S- 아데노실 메티오닌을 메틸 공여자(donor)로 이용하는 중요한 후성 유전학적 변형으로, 폴레이트 수치와 대사는 DNA의 메틸화 반응 등을 통하여 정상 세포와 악성 세포에 있어서 DNA를 합성하고 수선하는데 매우 중요하다.
- [0043] 본 발명자들은 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자에 대한 발현이 억제 또는 감소되는 경우 암의 발생 및 전이가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0044] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 유전자의 발현을 억제하는 물질 또는; 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소, 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소 및 글리신을 세린으로 전환하는 효소로 구성된 군에서 선택되는 효소에 특이적으로 결합하는 저해제를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명에서, 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, 안티센스-올리고뉴클레오타이드, shRNA, miRNA 또는

이들 중 하나를 포함하는 벡터인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0046] 본 발명에서, 상기 저해제는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0047] 본 발명에 따른 항암 조성물은 약학적 조성물일 수 있고, 유효성분으로서 상기 저해제와 함께 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 경우를 포함한다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 이 분야에 통상적으로 사용되는 모든 담체를 포함하며, 예컨대, 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상 환자는 포유 동물, 바람직하게는 사람, 원숭이, 설치류 (마우스, 래트)일 수 있으며, 특히 메티오닌의 발현과 관련되는 질병이나 증상을 가지거나, 메티오닌 발현 증가를 필요로 하는 모두 포유 동물, 예컨대, 사람일 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 의하여 치료 가능한 암은 폐암, 간암, 대장암, 췌장암, 위암, 유방암, 난소암, 신장암, 갑상선암, 식도암, 전립선암 등의 고형암 및 골육종, 연부조직육종, 신경교종 등으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암의 치료를 위해 in vivo 또는 ex vivo 상에서 세포 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 저해제를 세포 내에 도입하게 되면 표적 단백질인 S- 아데노실 메티오닌 생성이 증가하여 암세포가 사멸하고 암의 치료가 가능하게 된다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 국소, 경구 또는 비경구적 등으로 투여하기 위해서 제제화할 수 있다. 구체적으로는 눈의 점막, 질, 또는 항문 내 투여 포함을 하는 국소 투여, 또는폐, 기관지, 비강, 외피, 내피 투여, 정맥, 동맥, 피하, 복강, 근육, 두개 (뇌경막 또는 뇌실) 등의 비경구 투여, 또는 경구 투여 등의 경로를 통할 수 있다. 국소 투여를 위하여, 약학적 조성물은 패치와 연고, 로션, 크림, 젤, 적제, 좌약, 스프레이, 용액, 파우더 등의 형태로 제제화될 수 있다. 비경구적 투여, 뇌경막 혹은 뇌실 내 투여를 위하여, 약학적 조성물은 버퍼, 희석제, 투과 촉진제, 기타 통상적으로 약제학적으로 사용 가능한 전달체 혹은 부형제와 같은 적절한 첨가제를 함유하는 멸균수용액을 포함할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 주사용 조성물과 혼합하여 종양이 발생한
- [0053] 부위에 주사형태로 투여하거나, 겔 조성물 또는 경피흡수용 점착 조성물과 혼합하여, 직접 환부에 바르거나 붙여서 경피 경로로 투여할 수 있도록 구현함이 바람직하다. 상기 주사용 조성물은 특별한 제한은 없지만 등장성 수용액 또는 현탁액 형태인 것이 바람직하고, 멸균처리, 및/또는 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 및/또는 리포솜 제제)를 함유할 수 있다. 상기 겔조성물은 카르복시메틸 셀룰로오즈, 메틸 셀룰로오즈, 아크릴산 중합체, 카르보폴(carbopol) 등의 통상적인 겔제제와 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 리포솜 제제를 함유하며, 상기 경피흡수용 점착 조성물은 유효성분층이 점착제층, 피지흡수를 위한 흡착층 및 치료약물층을 포함하고, 치료약물층은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 리포솜 제제를 함유하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에 따른 저해제의 유효량은 암세포 성장 저해 및 암 치료 효과를 얻기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 증상의 정도, 투여되는 저해제의 종류, 제형의 종류, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 치료 기간, 동시 사용되는 화학 항암제 등의 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 예컨대, 1일 투여 용량은 0.001 mg/kg ~ 100 mg/kg인 것이 좋고, 상기 용량은 한 번에 모두 투여되거나 수회에 걸쳐서 분량하여 투여될 수 있다.
- [0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0056] 특히, 하기 실시예에서는 본 발명에 따른 유전자 녹다운(knockdown)을 위한 생물로 특정 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 만을 예시하였으나, 다른 생물을 사용하더라도, 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 및/또는 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자를 가지고 있는 숙주 미생물에 동일 유전자를 조절하고 이를 이용하여 메티오닌 생합성이 향상된 C1 대사회로를 가지게 하는 것 역시 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0057] 실시예 1: 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자

넉다운(knockdown)용 플라스미드 제작

[0058] 숙주 미생물인 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에서 포밀 테트라하이드로폴레이트를 메테닐 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자인 CAC2310 유전자(서열번호 1)를 넉다운(knockdown) 시키기 위하여 CAC2310 안티센스(antisense)(서열번호 2)를 발현하는 벡터를 다음과 같이 제작하였다.

[0059] [서열번호 1] CAC2310 유전자

[0060] 5'-

atgttacaggatatatctatagaggaatttataaaaagaacttgcacggaacaaactcctggcggcggtggagcggcagcactttcagcagcactttcagcagcgttaattgtatggtgtttaactttaccgtaggaaaaaaagtttatgaaaattatgataaagaaactaaaaattaatcaatagcagctctagaaaaatcagacaagcttaaggattatttcttatgtggtatagataaagatgcggaggtttctcaaaaataataaatagttacaaacttccccaaagtagagaagaa gaaaaagcatataggcataaatgtatacaagaagcttcaaaatttgcagcaaaagtagccaataatgcacgtgaactttttgaattgatttggatttcagcaaagtaggaaataaaaatcttataacagatgctggggcagctgcaataatggctgaagcagctattgaaacatcaatattgaatataaag ataaacataggatctatagaggataaggagttaaaagcaagacttgaaaaacttgcagagatttacttttagatagtaagaatggaaagataaaaattta agtgaagtatatcgaatatatag-3'

[0061] [서열번호 2] CAC2310 안티센스

[0062] 5'-

tatctataccacataaagaataatccttaagcttgctgattttctagactgctattgattaatTTTTtagtttctttatcataattttcataaacttttt ttcctacggtaaagttaaacaccatacaattaaagcgtgctgaaagtgtgctgaaagtgtgccgtccaccgccgaggaggttggtttttccgatgcaa gtctctttataaaattcctctatagatatcctgtaacataaatccctccaatagtttatagcatttctataattctttgcacttatagaaaactataat ttttattttaacttatattttatcatgttttctaataataaaaagcataaattatgtatgagagcaagaatttaacctaaagttcttgcctcatattaat tttcataacaagatgcttttttcagagtatggcatactccagtaatttctgtatatatgattttcaatatcctttgggtcataatgtgcttttagattctcc tacttgcctacaggtgttatgcaacaactgaatatttatctggtattctaagctcatctttcatacgttttctcat-3'

[0063] 먼저 CAC2310 안티센스(antisense) 발현을 위한 벡터로는 기존에 잘 알려진 pTHL1-Cm 벡터(Jang et al., Biotech. Prog. 29:10831088, 2013)를 이용하였다. 상기 벡터에는 싸이올레이즈 프로모터가 도입되어 있는데, 싸이올레이즈는 세포 성장주기에 크게 영향받지 않고 계속적이고 안정적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Tummala et al., Appl. Environ. Microbiol., 65:3793~3799, 1999). CAC2310 안티센스 (antisense) 발현을 위하여 pTHL1-Cm 벡터의 PstI 및 AvaI 제한효소 자리에 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 아래 서열번호 3과 서열번호 4를 이용하여 증폭한 DNA 단편을 클로닝 하 였다.

[0064] [서열번호 3]: 5'-CTGCAGTGAGAAAGCCTCCGCATCTT-3'

[0065] [서열번호 4]: 5'-CCCGGGCCTGCTGGATTGCTTCCTTTG-3'

[0066] 실시예 2: 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 넉다운(knockdown)용 플라스미드 제작

[0067] 숙주 미생물인 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에서 메테닐 테트라하이드로폴레이트를 메틸렌 테트라하이드로폴레이 트로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자인 CAC2083 유전자(서열번호 5)를 넉다운(knockdown) 시키기 위하여 CAC2083 안티센스(antisense)(서열번호 6)를 발현하는 벡터를 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제작하였다.

[0068] [서열번호 5] CAC2083 유전자

[0069] 5'-

atgggagatataaattaatggaaaagcggaatctcaaaagtataaagataaaaataattgaattttattaatgaaagaaagaaacagggggttagatatccatgc atagccagtagtaacagttggagatgatgggggtcattatactatgttaacaatcaaaaaaagtagcagaaagcttggaaattgagtttaagagtatat ttagatgaaagtatacgagaggaagaactaataaagttaattgaaggtctaacgtagataataaaattcatggaattatgcttcaattaccgctgcctaat cacattgatgcaaaactagtcacatctaaaatagatgctataaagatatagatagctttacagatataaatacaggaaaaatttacaagggtgaaaaatca tttataccatgcacgccaagaagtattataaatcttataaagagtttaaatgtggatatttggggaaaaatgcagttgtaatagggagaagtaacattgta ggtaaacctacagcgagcttttactaaatgaaaatgcaacggttacaatatgccactctagaacacaaaacttaaaagatatatgtaaaaaagctgatatt attgttaagtgtatttggaaagaccaggttttataacagatgaatttgttaaatgaaaaatctattgttaattgatgttggaaactacagtagtagatggtaaactt cgtggagatgtggtttttgatgaggttataaaaaaggcagcttacgttaactccagttcctgggggagtaggggcgatgacaaccacaatgttaattataat

gtttgtgaggcattgaaataa-3'

[서열번호 6] CAC2083 안티센스

5'-

t t c c t c t c g t a t a c t t t c a t c t a a a a t a t a c t c t t a a a c t c a a t t c c a a g a c t t t t c t g a t a c t t t t t t t g a t t g t t a a c a t a g t a t a a t g a g c c c c c a t c
a t c t c c a a c t g t t a t a c t g g c t a t g c a t g g a a t a t c t a a c c c c t g t t t c t t t c a t t a a t a a a t t c a a t t a t t t t a t c t t t a t a c t t t t g a g a t t c c g c
t t t t c c a t t a a t t a t a t c t c c c a t a c a c a a c t a c t c t c t t t a a a t t a t c a t t t t t c c t c a g a a c t a t t t a t t a a a t t t c c a a t a a c t c c a t t a a c a a t g a
g a a a g a g t t t c t c t t c a g c a t a a c t t t t t g c a a g t t c a a c a g c c t c a t t t g c a g a a c c t t a c a a g g t a t a t c c t t t t c g a a g a a t a t t t c a t a t g c t g c c a t
c c t a a g t a t g g t g a t a t t t a t c t t g g a t a t t c t g c t t a t c t t c c a c t t c t t g g -3'

즉, 싸이올레이즈 프로모터를 가지고 있는 pTHL1-Cm 벡터의 PstI 및 AvaI 제한효소 자리에 클로스트리듐 아세토 부틸리쿰 ATCC 824 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 아래 서열번호 7과 서열번호 8을 이용하여 증폭한 DNA 단편을 클로닝 하였다.

[서열번호 7]: 5'-CTGCAGCTTCAATTAACCTTTATTAGTTC-3'

[서열번호 8]: 5'-CCCGGGTTCTAAAATTGAAGAAAGCT-3'

실시예 3: 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자 녹다운(knockdown)용 플라스미드 제작

숙주 미생물인 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에서 글리신을 세린으로 전환하는 효소를 코딩하는 유전자인 CAC2264 유전자(서열번호 9)를 녹다운(knockdown) 시키기 위하여 CAC2264 안티센스(antisense)(서열번호 10)를 발현하는 벡터를 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제작하였다.

[서열번호 9] CAC2264 유전자

c a a a a a t a c t a t a c c a t t t g a g a a a a g a g t c c t t t t a t a c a a g t g g a a t a a g a a t g g g t a c a c c t t c a g t t a c a a c t a g a g g a t t a a g g a a g a g g a a t
g a a a a a g t a g c g t a t t t c a t a a a c t a t g t t a t a g a c a t a g a g a t g a a g a t t a a g t g a a a t a a g g a a c a a g t t t c a g a a t t a t g t a g t g g a t t t c c t a t
a t a t a a g t a a -3'

[서열번호 10] CAC2264 안티센스

5'-

t t t a a a a a g t t t t t t t g c c c t t t c a c g t g c a a g c t c t t c a a c t t t a t c a a c t a c g t a a c a t c c a c c a t a a t a t c t t t t c c t g g a t a t c c t t c t g c a t a c t t
a t t a g t t a a a t a t g a a c c c a t a g c t t c c a t t a c a g c t t t g c t t g t g a a g t t t t c a g a t g c a a t a a g t t c t a t a t t a t t t t c t g t c t c g c a t t t t c t t c t t c
t a t g a t a g a a t a g a c t t c a g a a t c a c t t a c t t t t a t a t t t t c a a a t c c a t a t a t a a c a c t c c c t c a t a c a t t a a t t t g c t a a g t t a a a a a t t a t c a a t
t t t a t g t a t g a t t a t a c c a a a t a g c g t a g a a t t c a a a t a a a g t t t g t g t t a t a a t a a t t t c t g g t c a g t a t a t a t g a c a a t t t t a a t t a a c t a t a c
t a t a t c t t t t g a a a g g t t t t g t t a c c c a t g t c t a c a g a a a a a t t a t a a a t t a g c t g c t t a t g c a g g a a a g a t t t a c t t c a a a g t g g a g c t g a a a t a t a
c a g a g t a g a a g a a c t a t g a a t a a a a t t t g t a c a g c c t t t a a t g t t a a -3'

즉, 싸이올레이즈 프로모터를 가지고 있는 pTHL1-Cm 벡터의 PstI 및 AvaI 제한효소 자리에 클로스트리듐 아세토 부틸리쿰 ATCC 824 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 아래 서열번호 11과 서열번호 12를 이용하여 증폭한 DNA 단편을 클로닝 하였다.

[서열번호 11]: 5'-CTGCAGGGCTGTACATTAGCATGCTCTGC-3'

[서열번호 12]: 5'-CCCGGGGGTAACAAAGCTTTCTGCCTCC-3'

실시예 4: 상기 플라스미드의 클로스트리듐 아세토부틸리쿰으로의 형질전환

클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 상기 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3에서 제작된 재조합 벡터들을 도입하고자 하였다. 이에 앞서, 클로스트리듐으로의 형질전환에 적합하도록 벡터들의 메틸레이션을 유도하였는데, 즉, 바실 러스 서브틸리스 파지 (*Bacillus subtilis* Phage) 3T I 메틸트랜스퍼라제(methyltransferase) 발현 벡터, pAN1 (Mermelstein *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1077, 1993)을 함유하는 대장균 TOP 10(Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif, USA)에 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3에서 제작된 재조합 벡터들을 도입하여 메틸레이션을 유도하였다. 메틸레이션 된 2 종류의 벡터를 대장균으로부터 분리 및 정제하고, 기준 균주(type strain)로 잘 알려진 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824 균주에 도입하여 재조합 변이 미생물을 제조하였다.

형질전환을 위한 컴피턴트 세포(competent cell)는 다음과 같이 준비하였다. 먼저 10 ml CGM 배지(표 1)에 클로

스트리덤 아세토부틸리쿰 ATCC 824 균주를 접종한 후 OD 값이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양된 균주를 2X YTG배지 (Bacto Tryptone 16 g, Yeast extract 10 g, NaCl 4 g, Glucose 5 g, 1 리터 당) 60 ml에 10% 농도로 접종하여 4-5 시간 동안 배양하였다. 형질전환버퍼 (EPB, 270 mM sucrose 15ml, 686 mM NaH₂PO₄ 110 μ l, pH 7.4로 2번 세척한 후, 2.4ml의 동일 버퍼로 미생물 세포를 현탁 시켰다. 상기 방법으로 제조된 컴피턴트 세포 (competent cell) 600 μ l와 재조합 플라스미드 DNA 25 μ l를 섞어서 4 mm 전극을 가진 큐벳(cuvette)에 충전 후 2.5 kV, 25 μ F의 조건으로 전기 충격을 가하였다. 즉시, 1 ml의 2X YTG배지로 현탁하여 3시간 동안 37℃에서 배양한 후, 40 μ g/ml의 에리스로마이신이 포함된 2X YTG 고체배지에 도말하여 형질전환체 ATCC824CAC2310kd, ATCC824CAC2083kd 및 ATCC824CAC2264kd를 선발하였다.

[0087]

표 1

[0088]

CGM 배지의 조성

성분	함량 (g/l)
Glucose	8
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.982
KH ₂ PO ₄	0.75
MgSO ₄	0.348
MnSO ₄ H ₂ O	0.01
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
NaCl	1
Asparagine	2
p-Aminobenzoic acid	0.004
Yeast extract	5

[0089]

실시예 5: 변이 균주의 C1 대사회로 분석을 위한 배양

[0090]

야생형 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 균주인 ATCC 824 균주 및 상기 재조합 변이 균주 ATCC824CAC2310kd, ATCC824CAC2083kd 및 ATCC824CAC2264kd를 배양하여 C1 대사회로를 분석하고자 하였다. 이를 위하여 ¹³C-Formate를 함유한 CGM 배지 10ml이 들어 있는 30ml 시험관을 멸균시키고, 80℃ 이상에서 꺼내어 질소가스를 채운 후, 혐기 챔버에서 실온까지 냉각하였다. 이후, 에리트로마이신(erythromycin) 40 μ g/ml를 첨가하고, 상기 재조합 변이 미생물들을 접종하여 37℃에서 혐기조건으로 16 시간 동안 배양하였다.

[0091]

실시예 6: 변이 균주의 C1 대사회로를 통한 메티오닌 생합성 분석

[0092]

배양이 종료된 후, 야생형 균주와 재조합 변이 균주 ATCC824CAC2310kd, ATCC824CAC2083kd 및 ATCC824CAC2264kd를 회수하여 세포를 구성하는 아미노산을 분석하였다 (Agilent 6890N, 5875 XL MS system, Agilent 7683 automatic injector, column (HP-5MS, 30 m, ID 0.25, film thickness 0.25 m, Agilent Technologies).

[0093]

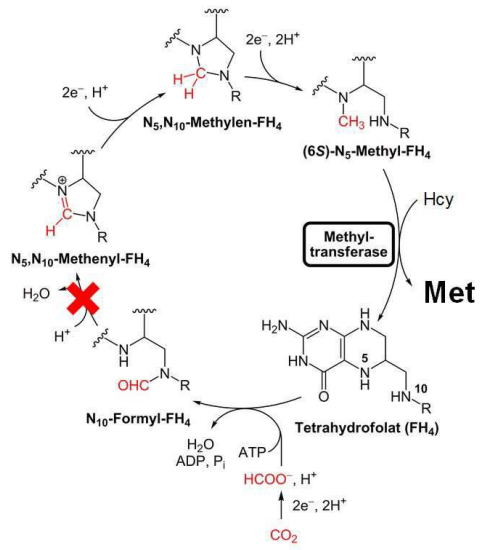
그 결과, 대조군인 야생형 균주는 메티오닌에 대한 summed fractional labeling (SFL)이 10을 나타내는 반면, 실험군인 재조합 균주 ATCC824CAC2310kd, ATCC824CAC2083kd 및 ATCC824CAC2264kd에서는 각각 11, 12, 15의 값을 나타내었다. 이와 같은 결과를 통하여 야생형 균주 대비 이들 세 변이 균주에서 C1 대사회로의 메티오닌 합성이 향상됨을 알 수 있었다.

[0094]

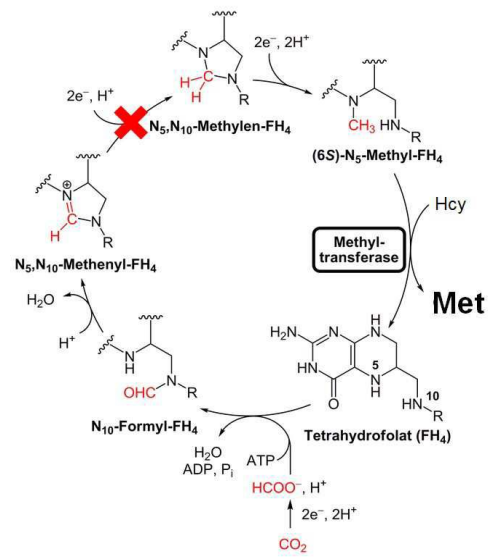
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

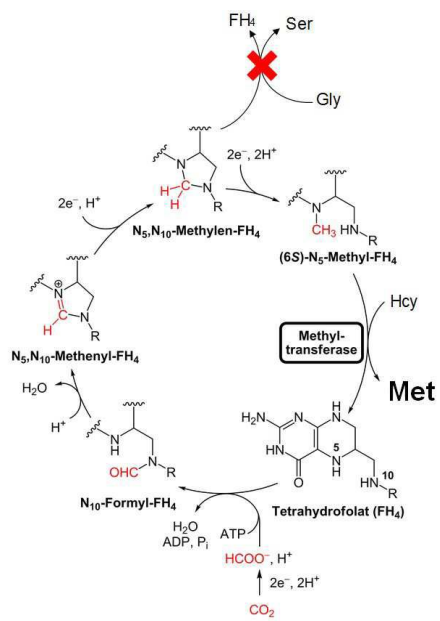
도면1



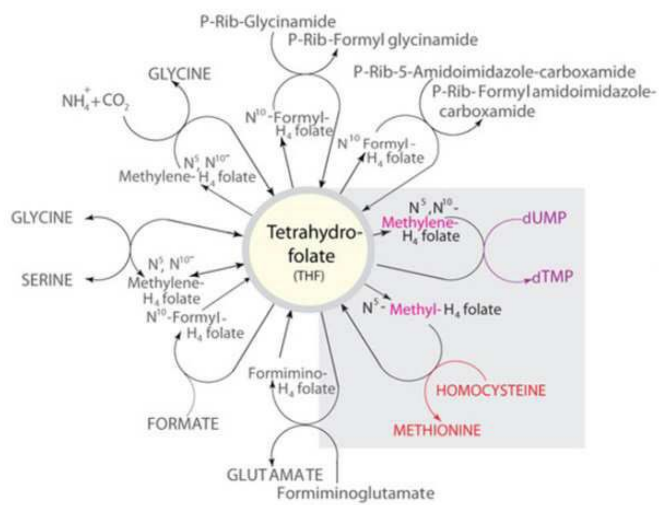
도면2



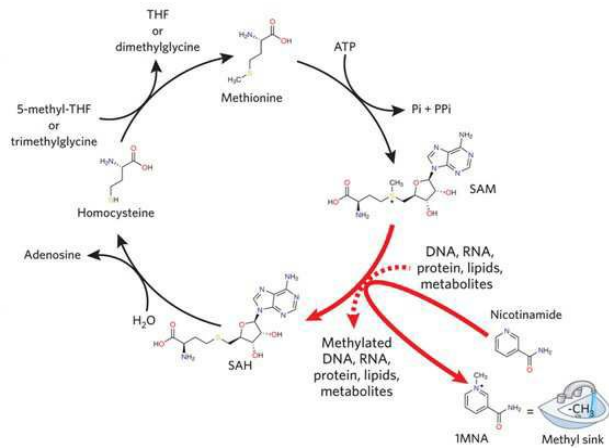
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> An engineered cell having improved methionine biosynthetic ability
- <130> P17-B020
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 636
- <212> DNA
- <213> Clostridium acetobutylicum
- <400> 1

atgttacagg atatatctat agaggaattt ataaaagaac ttgcatcgga aaaaccaact 60

cctggcggcg gtggagcggc agcactttca gcagcacttt cagcagcgct taattgtatg 120

gtgtttaact ttaccgtagg aaaaaaagtt tatgaaaatt atgataaaga aactaaaaaa 180

ttaatcaata gcagtctaga aaaatcagac aagcttaagg attatttctt atgtggtata 240

gataaagatg cggaggcttt ctcaaaaata ataatagtt acaaacttcc ccaaagtaca 300

gaagaagaaa aagcatatag gcataaatgt atacaagaag cttcaaaatt tgcagcaaaa 360

gtaccagaag atgtagccaa taatgcacgt gaactttttg aattgatttg gatttcagca 420

aagttaggaa ataaaaatct tataacagat gctggggcag ctgcaataat ggctgaagca 480

gctattgaaa catcaatatt gaatataaag ataaacatag gatctataga ggataaggag 540

ttaaaagcaa gacttgaaaa aacttgcaga gatttacttt tagatagtaa agaattggaaa	600
gataaaatat taagtgaagt atattcgaat atatag	636
<210> 2	
<211> 587	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Antisense Sequence of CAC2310 gene	
<400> 2	
tatctatacc acataagaaa taatccttaa gcttgtctga tttttctaga ctgctattga	60
ttaatttttt agtttcttta tcataatttt cataaacttt ttttcctacg gtaaagttaa	120
acaccataca attaagcgct gctgaaagtg ctgctgaaag tgctgccgct ccaccgccgc	180
caggagttagg tttttccgat gcaagttctt ttataaatc ctctatagat atatcctgta	240
acataaatc cctccaatag tttatagcat ttctataatt ctttgcactt attagaaaac	300
tataattttt attttaactt atattttatc atgttttcta aataataaaa gcataaatta	360
tgtatgagag caagaattta acctaagttc ttgctctcat attaattatt tcataacaag	420
atgctttttt tcagagtatg gcatactcca gtaatttctg tataatgat tttcaatac	480
ctttggttca taatgtgctt tagattctcc tacttcgcct acaggtgtta ttgcaacaac	540
tgaatattta tctggatttc taagctcatc tttcatacgt ttctcat	587
<210> 3	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward Primer for CAC2310 antisense cloning	
<400> 3	
ctgcagttag aaagcctccg catctt	26
<210> 4	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse Primer for CAC2310 antisense cloning	
<400> 4	
cccgggcctg ctggattgct tccttttg	27
<210> 5	

<211> 837
 <212> DNA
 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 5
 atgggagata taattaatgg aaaagcggaa tctcaaaagt ataaagataa aataattgaa 60
 tttattaatg aaagaaagaa acaggggtta gatattccat gcatagccag tataacagtt 120
 ggagatgatg ggggctcatt atactatgtt aacaatcaaa aaaaagtatc agaaagtctt 180
 ggaattgagt ttaagagtat attttttagat gaaagtatac gagaggaaga actaataaag 240
 ttaattgaag gtctaaacgt agataataaa attcatggaa ttatgcttca attaccgctg 300
 cctaatacaca ttgatgcaaa actagtcaca tctaaaatag atgctaataa agatatagat 360
 agtcttacag atataaatac aggaaaattt tacaagggtg aaaaatcatt tataccatgc 420

 acgccaagaa gtattataaa tcttataaag agtttaaatg tggatatttg tgggaaaaat 480
 gcagttgtaa tagggagaag taacattgta ggtaaaccta cagcgcagct ttactaaat 540
 gaaaatgcaa cggttacaat atgccactct agaacacaaa acttaaaaga tatatgtaaa 600
 aaagctgata ttattgtaag tgctattgga agaccagggt ttataacaga tgaatttggt 660
 aatgaaaaat ctattgtaat tgatgttgga actacagtag tagatggtaa acttcgtgga 720
 gatgtgggtt ttgatgaggt tataaaaaag gcagcttacg taactccagt tcctggggga 780
 gtaggggcga tgacaaccac aatgttaata ttaaatgttt gtgaggcatt gaaataa 837

<210> 6
 <211> 461
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense Sequence of CAC2083 gene

<400> 6
 ttctctcgt atactttcat ctaaaaatat actcttaaac tcaattccaa gactttctga 60
 tacttttttt tgattgttaa catagtataa tgagcccca tcactccaa ctgttatact 120
 ggctatgcat ggaatatcta acccctgttt cttcttttca ttaataaatt caattatfff 180
 atctttatac ttttgagatt ccgcttttcc attaattata tctcccatc acaactactc 240
 tcctttaaat tatcatffff ctcagaact atttattaaa tttccaataa ctccattaac 300

 aaatgagaaa gatttctctt cagcataact ttttgcaagt tcaacagcct catitgcaga 360
 aaccttaca ggtatatacct tttcgaagaa tatttcatat gctgccatcc taagtatggt 420

gatatttattc ttggatatc tgcttatctt ccacttcttg g	461
<210> 7	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward Primer for CAC2083 antisense cloning	
<400> 7	
ctgcagcttc aattaacttt attagtgc	28
<210> 8	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse Primer for CAC2083 antisense cloning	
<400> 8	
cccgggttct aaaattgaag aaagct	26
<210> 9	
<211> 1236	
<212> DNA	
<213> Clostridium acetobutylicum	
<400> 9	
atggattttg aaaatatata agtaagtgat tctgaagtct attctatcat agaagaagaa	60
aatgcgagac aagaaaataa tatagaactt attgcatctg aaaacttcac aagcaaagct	120
gtaatggaag ctatgggttc atatttaact aataagtatg cagaaggata tccaggaaaa	180
agatattatg gtggatgta cgtagttagt aaagttgaag agcttgcacg tgaaagggca	240
aaaaaacttt ttaaagcaga gcatgctaatt gtacagccac attcaggttc acaagctaatt	300
atggctgttt actttgcagt attgaagccg ggagacacta taatgggaat gaaccttaaca	360
gatggaggtc atttaactca tggaagtcca gtttaatttt caggaaaact ctttaataata	420
attgcctatg gtgtaagtga tgaaacagaa caaatagatt atgaagcgtt tagaaaaaaa	480
gccttggagt gtaagccaaa gatgatagta tctggtgcta gtgcatattc aagaattatt	540
gattttaaga aaataagaga aatatgcgat gaagtaggag catatatgat ggtagatatg	600
gtcatatag caggacttgt agcagcagga cttcatccgt caccaattcc atatgctgat	660
tttgtaacaa caactactca taagacttta aggggaccaa gaggcggagc aattttctgc	720

aaggaaaagt atgcaaagga cattgataaa tctgtattcc ctggaatgca ggggggacct	780
ttaatgcaca taattgcagg aaaagcagta tgctttggag aagcttttaa ggatgatttt	840
aaagattatg cacagcaaat agtaaataat gcaaaagtgt ttgcagatga acttacaaaa	900
tacggtttta gaatagtttc aggtggaact gataatcacc ttttattagt tgatttaacg	960
aacaaaaata taacaggaaa agatgcagaa catcttcttg attcagttgg aataactgca	1020
aacaaaaata ctataccatt tgagaaaaag agtcctttta taacaagtgg aataagaatg	1080
ggtacacctt cagttacaac tagaggattt aaggaagagg aaatgaaaa agtagcgtat	1140
ttcataaact atgttataga gcatagagat gaagatttaa gtgaaataag gaaacaagtt	1200
tcagaattat gtagtggatt tcctatatat aagtaa	1236
<210> 10	
<211> 558	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Antisense Sequence of CAC2264 gene	
<400> 10	
tttaaaaagt tttttgccc ttccacgtgc aagctcttca actttatcaa ctacgtaaca	60
tccaccataa tatctttttc ctggatatcc ttctgcatac ttattagtta aatatgaacc	120
catagcttcc attacagctt tgcttgtgaa gttttcagat gcaataagtt ctatattatt	180
ttcttgtctc gcattttctt cttctatgat agaatagact tcagaatcac ttacttttat	240
attttcaaaa tccatatata atacactccc tcatacatTA atttgctaag ttaaaaaatt	300
atcaatttta tgtatgatta tataccaaaa tagcgtagaa ttcaataaa agtttgtgtt	360
ataataattt ctggtcagta tatatgacga attttaatta aactatacta tatcttttga	420
aaggttttgt taccctatgt ctacagaaaa aattataaat ttagctgctt atgcaggaaa	480
gattttactt caaagtggag ctgaaatata cagagtagaa gaaactatga ataaaatttg	540
tacagccttt aatgttaa	558
<210> 11	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward Primer for CAC2264 antisense cloning	
<400> 11	
ctgcagggct gtacattagc atgctctgc	29

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse Primer for CAC2264 antisense cloning
<400> 12
cccgggggt aacaaagctt tctgcctcc

29