(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0130293
(43) 공개일자 2017년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 9/1096 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0059916
(22) 출원일자 2017년05월15일
심사청구일자 2017년05월15일
(30) 우선권주장
1020160060920 2016년05월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
오민규
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호 (정자동, 파크뷰)
이상우
경기도 남양주시 도농로 34, 508동 804호 (도농동, 부영아파트1단지)
(74) 대리인
이처영, 장제환

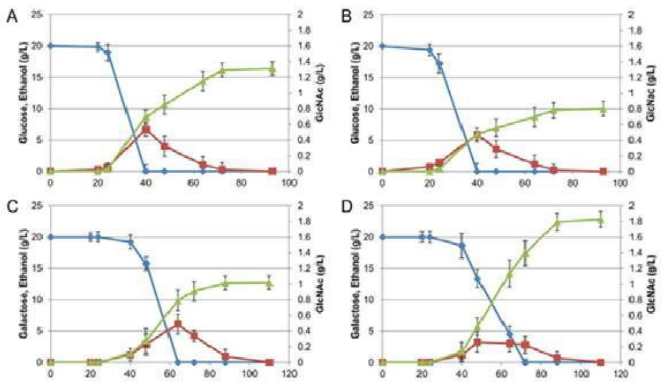
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **해당과정 플럭스 조절에 의해 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물**

(57) 요 약

본 발명은 포스포프룩토키나아제-2를 코딩하는 유전자가 약화 또는 결실되어 해당과정 플럭스가 감소됨으로써 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물 및 상기 변이 미생물을 이용한 N-아세틸글루코사민 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 변이 미생물은 다양한 화학물질에 대한 저항성이 높고 성장 속도가 빠르며 배양이 용이하고 N-아세틸글루코사민의 생성 효율이 뛰어나 N-아세틸글루코사민 대량 생산에 유용한 장점이 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 9/1205 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
C12P 19/26 (2013.01)
C12Y 206/01016 (2013.01)
C12Y 207/01105 (2013.01)
C12Y 301/03001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015024055
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기초.원천기술개발사업
연구과제명 [2단계 1차년도] 대사플럭스 측정기술 기반 바이오화학소재 생산균주 개발 시스템 구축
기 여 율 1/2
주관기관 한국과학기술원
연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015022112
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구
연구과제명 [2차년도]게놈에디팅 기술을 활용한 효율적인 바이오에너지 균주 개발
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

해당과정 및 N-아세틸글루코사민 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서, 포스포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자가 약화 또는 결실되어 있는 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 포스포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자는 pfk26 및/또는 pfk27인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 3

제2항에 있어서, pfk26은 서열번호 1로 표시되고 pfk27은 서열번호 2로 표시되는 것을 특징을 하는 변이 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 3으로 표시되는 GFA1 효소에서 Q96H 및/또는 Q157R로 변이된 변이효소를 코딩하는 유전자가 추가로 도입되어 있는 변이 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 변이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 4 내지 서열번호 6으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열번호 7로 표시되는 HAD phosphatase YqaB를 코딩하는 유전자가 추가로 도입되어 있는 변이 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 미생물은 효모, 곰팡이 및 아스퍼질러스로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 미생물은 포스포프룩토키나아제-1(PFK-1) 및/또는 피루베이트 키나아제 (Pyk1p)를 코딩하는 유전자의 발현이 약화되어 있는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유전자는 CRISPR/Cas9을 이용하여 약화되어 있고, 포스포프룩토키나아제-1(PFK-1)를 코딩하는 유전자의 발현을 약화시키기 위한 gRNA는 서열번호 10으로 표시되고, 피루베이트 키나아제(Pyk1p)를 코딩하는 유전자의 발현을 약화시키기 위한 gRNA는 서열번호 11로 표시되는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

청구항 10

제1항의 변이 미생물을 배양하여 N-아세틸글루코사민을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 N-아세틸글루코사민을 회수하는 단계를 포함하는 N-아세틸글루코사민의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 변이 미생물은 탄소원으로 갈락토오스 존재하에서 배양하는 것을 특징으로 하는

제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해당과정 플럭스 조절에 의해 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물에 관한 것으로, 더 상세하게는 포스포프룩토키나아제-2를 코딩하는 유전자가 약화 또는 결실되어 해당과정 플럭스가 감소됨으로써 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 글루코사민과 그 유도체는 최근 건강 보조식품, 화장품, 의약품 등 그 활용 용도가 다양하여 시장의 수요가 증대되고 있으며, 이러한 수요 증대에 부응하기 위하여 이를 생산하기 위한 대사공학적 연구도 활발해지고 있다. 최근 한 연구에서는 글루코사민과 그 유도체가 관절염을 완화시킬 수 있음을 규명함으로써 관절염 임상 치료 용도로까지 그 적용 영역은 더욱 확대될 전망이다.

[0004] 그러나 현재 생산되고 있는 글루코사민과 그 유도체는 주로 갑각류 껍질의 폐기물로부터 추출한 것으로 이는 인간에게 알레르기 반응과 같은 부작용을 유도할 수 있다. 따라서 이미 안전성이 확보된 균주에서 글루코사민과 그 유도체를 생산하고자 하는 시도가 있으며, 예를 들어 바실러스 서브틸러스를 이용한 글루코사민 생산이 보고된 바 있다(Liu Y, Zhu Y, Li J, Shin HD, Chen RR, Du G, Liu L, Chen J. 2014. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production. Metab Eng 23:42-52).

[0006] 미생물에서 글루코사민 등의 대사물질을 효과적으로 생산하기 위한 하나의 방법으로 대상 대사물질과 관련된 경쟁적 경로에서 플럭스를 대상 대사물질을 향한 경로로 전용하는 방법이 있다. 중심 탄소 대사를 제어함으로써 해당과정(glycolysis)의 플럭스를 감소시키고 대상 대사물질의 수율을 상승시키는 방법이 그 하나의 예가 될 수 있는데, 해당과정의 플럭스를 조절하기 위한 방법으로 박테리아에서 헥소키나아제(hexokinase), 포스포프룩토키나아제(phosphofruktokinase), 피루베이트 키나아제(pyruvate kinase)와 같은 비가역 효소를 변형시켜 해당과정의 플럭스를 조절한 연구가 있다.

[0007] 그러나 진핵세포에서 해당과정을 조절하는 것은 원핵세포에서 해당과정을 조절하는 것과는 상당한 차이가 있는데, 즉 진핵세포에서는 추가적인 다른 자리 입체성 효과가 해당과정의 조절에 중요한 역할을 수행하게 되어 원핵세포에 비해 훨씬 복잡한 기전에 의해 해당과정이 조절되고, 그 결과 진핵세포를 이용한 연구는 아직까지 괄목할 만한 성과를 이루지 못하고 있다. *S.cerevisiae*는 다양한 화학물질에 대한 우수한 저항성을 가지고 있다는 장점에 기인하여 글루코사민과 그 유도체를 생산하는데 상당한 잇점을 가질 수 있으나, 이에 대한 연구로는 최근 *S.cerevisiae*에서 헥소키나아제 활성을 조절함으로써 글루코 생산을 증진시키기 위한 해당과정 플럭스를 조절한 사례가 보고되었을 뿐이다(Tan SZ, Manchester S, Prather KL. 2015. Controlling Central Carbon Metabolism for Improved Pathway Yields in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth Biol). 그러나 헥소키나아제는 *S. cerevisiae*에서 해당 과정의 첫번째 단계에 관여하는 효소로 이의 활성을 조절하는 것은 해당과정에서 그 하부 단계에 있는 글루코사민과 그 유도체와 같은 대사산물을 생산하는데는 적합하지 않다는 문제점이 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 해당과정의 중간 대사산물로 그 활용성이 높은 N-아세틸글루코사민 생산에 적합한 해당과정 플럭스 조절 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자를 약화 또는 결손 시킴으로써 N-아세틸글루코사민의 생산을 효과적으로 증진시킴을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2016-0002509호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast 14(2):115-32.

(비특허문헌 0002) Mumberg D, Muller R, Funk M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156(1):119-22.

(비특허문헌 0003) Fahim Farzadfard, Samuel D Perli, Timothy K Lu. 2013. Tunable and Multifunctional Eukaryotic Transcription Factors Based on CRISPR/Cas. ACS Synthetic Biology Vol.2 No.10 604p~617p.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물 및 상기 변이 미생물을 이용한 N-아세틸글루코사민의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 해당과정 및 N-아세틸글루코사민 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서 포스포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자가 약화 또는 결실되어 있는 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 변이 미생물을 배양하여 N-아세틸글루코사민을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 N-아세틸글루코사민을 회수하는 단계를 포함하는 N-아세틸글루코사민의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 변이 미생물은 다양한 화학물질에 대한 저항성이 높고 성장 속도가 빠르며 배양이 용이하고 N-아세틸글루코사민의 생성 효율이 뛰어나 N-아세틸글루코사민 대량 생산에 유용한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 N-아세틸글루코사민 생합성 경로를 나타낸다.

도 2는 최소 배지에서 배양한 BY4742 YM 균주(A,C)와 pfk26/pfk27 YM 균주(B, D)의 당 소비량, 에탄올 생성량, N-아세틸글루코사민 생성량 프로파일을 나타낸 것이다. (파란색: 글루코오스(A, B) 또는 갈락토오스(C, D), 빨간색: 에탄올, 초록색: N-아세틸글루코사민)

도 3은 N-아세틸글루코사민 생성에 있어서 다양한 탄소원(A)과 GNA 과발현(B)이 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 CRIPR/Cas9을 이용하여 PFK1 및/또는 Pyk1p 의 발현을 약화시킴으로써 해당과정 플럭스를 조절하기 위한 해당과정의 모식도를 나타낸 것이다.

도 5는 CRIPR/Cas9을 이용하여 PFK1 및/또는 Pyk1p 의 발현을 약화시킴으로써 N-아세틸글루코사민 생성이 증가됨을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 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 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서

사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0020] 본 발명에서는, 해당과정(glycolysis) 및 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서, 해당과정 플럭스를 감소시킴으로써 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물를 제작하기 위한 실험을 수행하였다.

[0021] 프룩토오스-2,6-비스포스페이트(F26BP)에 의한 프룩토오스-1,6-비스포스파타아제(F16BPase)의 저해 및 PFK-1의 다른자리 입체성 활성은 *S.cerevisiae*를 포함한 다양한 진핵생물 시스템에서 해당과정(glycolysis)과 포도당신생과정(gluconeogenesis)을 조절하는 주요 조절 기전으로 알려져 있다. 이는 PFK-1과 F16BPase가 다양한 전사인자에 의해 전사적으로 조절되는 박테리아와 상이한 방식이다.

[0023] 프룩토오스-6-포스페이트(F6P)로부터 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 생성하기 위해서는 GFA1, GNA1, HAD 포스파타아제와 같은 유전자들을 필요로 하며, 본 발명자들은 선행 연구를 통하여 GlcN6P의 생성능이 뛰어난 GFA1 변이체와 할로산 디할로게나아제 유사(haloacid dehalogenase-like, HAD) 인산효소인 YqaB를 동정하였고, 상기 GFA1 변이체와 YqaB를 *S.cerevisiae*에서 과발현함으로써 N-아세틸글루코사민의 과생산을 유도하였다.

[0024] 상기 GFA1 변이체는 서열번호 3의 아미노산 서열에서, Q96H 및 Q157R의 아미노산 변이를 포함하는 GFA1 돌연변이에 관한 것이고, 바람직하게는, 서열번호 4~6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0025] 본 발명자들은 GFA1 변이체가 도입된 균주에 HAD phophatase를 코딩하는 유전자를 각각 도입하여 변이 균주 라이브러리를 구축하였고, N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 과생산하는 변이균주를 스크리닝할 수 있었으며, 가장 효율적으로 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 과생산하는 변이균주에 도입된 HAD phosphatase의 서열을 분석한 결과, 서열번호 7의 YqaB임을 알 수 있었다.

[0026] 선행 연구에서는 효과적인 효소를 스크리닝하기 위한 것으로 단일 복제 플라스미드를 이용하여 GFA1 돌연변이와 HAD 인산효소를 클로닝하였으나, 본 발명에서는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성을 극대화하기 위하여 다중 복제 플라스미드를 이용하여 재조합 벡터를 제작하였다. 그 결과, GFA1 돌연변이를 과발현하였을 때 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성은 0.2g/L를 나타내었고, YqaB를 함께 과발현시킨 결과 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성능은 1.2g/L까지 증가함을 알 수 있었다(도 2A). N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성은 글루코오스 소비와 함께 시작하여 에탄올이 완전히 소비될 때까지 지속되었다(도 2A).

[0028] *S.cerevisiae*에서 PFK-2 동질효소(isozyme)를 인코딩하는 PFK26과 PFK27를 결손시킨 실험에서 F26BP의 형성은 완전히 차단되었고, F16BP의 형성도 감소시킨 것으로 나타나, 생체 내에서 F26BP의 활성이 사라지는 경우 PFK-1의 활성도 함께 감소됨을 알 수 있다. N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생합성 경로에 있어서 최초의 율속 단계(rate-limiting)는 글루타민-프룩토오스-6-포스페이트 트랜스아미나아제(Gfa1p)에 의해 조절되고 이는 기질로 프룩토오스-6-포스페이트(F6P)를 함께 사용함으로써 PFK-1과 경쟁한다(도 1). 이러한 특성으로부터 본 발명자들은 *S. cerevisiae*에서 해당과정 플럭스를 감소시킴으로써 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성을 증가시킬 수 있음을 착안하였다.

[0029] 진핵생물의 PFK-1은 F26BP에 의해 활성화되고, F26BP가 존재할 때 훨씬 낮은 K_M값을 갖는다(K_M = 0.11 mM for F6P with 20 μM F26BP and K_M = 1.65 mM without F26BP). *S. cerevisiae*에서 F26BP 농도는 글루코오스 6-포스페이트(G6P)와 상관관계를 보이며, 발효성 당류는 G6P 수치를 신속하게 증가시킴으로써 F26BP를 증가시킨다. 따라서, 본 발명자들은 F6P에 대해 활성화된 PFK-1이 Gfa1p 보다 낮은 K_M값을 갖기 때문에 (K_M(PFK-1)= 0.11 mM with 20 μM F26BP vs K_M(Gfa1p)= 0.39 mM with 20 μM F26BP) 글루코오스가 소비되었을 때 F26BP에 의한 PFK-1의 활성은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성을 방해할 수 있다고 판단하였다. 이에 PFK-1 활성을 감소시키고 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성을 증가시키기 위하여 F26BP의 생성을 제거하도록 PFK26과 PFK27 유전자를 모두 결손시키기로 하였다.

[0030] 이를 위하여 본 발명자는 두 개의 N-아세틸 글루코사민(GlcNAc) 합성 유전자인 GFA1 변이체와 YqaB를 과발현하고 PFK-2의 활성을 나타내지 않는 pfk26/pfk27 YM 균주를 제작하고(표 1) PFK-2의 파괴(disruption) 및 이에

따른 PFK-1의 비활성화가 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성에 미치는 영향을 확인해 보았다. 그 결과, 글루코오스 소비율(BY4742 YM: 1.28 g/L/h; pfk26/pfk27 YM: 1.16 g/L/h)과 에탄올 생성양은 BY4742 YM 대조군 균주에 비해 크게 달라지지 않았고, N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성은 오히려 다소 감소하는 경향을 나타내었다(도 2A, 도2B). 이에, 본 발명자들은 글루코오스가 단독 탄소원으로 작용할 때 pfk26/pfk27 균주에서 해당과정 플럭스가 여전히 강하게 작용하고 있어, N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성능을 개선하기 위해서는 해당과정 플럭스의 추가적인 감소가 필요함을 알 수 있었다.

[0031] 갈락토오스를 단독 탄소원으로 하여 *S. cerevisiae*를 배양하는 경우, 글루코오스를 이용하는 것에 비해 당질 이용(sugar utilization)이 감소되고 에탄올 생산이 감소되기 때문에, 본 발명자는 에탄올 플럭스를 감소시키고 N-아세틸글루코사민 플럭스를 증가시키기 위하여 단독 탄소원으로 갈락토오스를 사용하여 보았다. 그러나 갈락토오스를 사용하는 경우 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성이 글루코오스를 사용하는 것에 비해 다소 감소하는 것으로 나타났다(도 2A, 도 2C). 또한, 갈락토오스에 의한 감소된 해당과정이 에탄올 생산에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 갈락토오스를 사용하였을 때, PFK-1의 활성이 다소 감소하였으나, 갈락토오스의 사용으로 F26BP의 수치가 감소함으로써 F16BPase의 활성이 증가하여 F6P와 F16B 사이의 무익 회로(futile cycle)를 유도한 결과인 것으로 판단되었다. 이러한 갈락토오스를 단독 탄소원으로 사용하였을 때의 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성능 감소는 PFK-2의 파괴의 효과와 유사한 경향을 나타내었다(도 2B).

[0032] 한편 글루코오스를 단독 탄소원으로 하여 배양한 pfk26/pfk27 균주에서 PFK-1의 활성은 감소하였지만 여전히 강하게 나타나고 F26BP의 다른자리 입체성 조절에 의해 저해된 F16BPase 활성은 PFK-2의 제거에 의해 활성화되어 이 또한 무익 회로가 된 것으로 판단되었다.

[0033] 그러나 PFK-2 제거와 탄소원으로 갈락토오스의 효과가 결합되자 N-아세틸글루코사민 생성능은 현저히 증가하였고, 갈락토오스 소비 속도는 감소되었으며(BY4742 YM: 0.985 g/L/h; pfk26/pfk27 YM: 0.553 g/L/h), 에탄올 생산도 감소되었다(도 2D). PFK-2가 제거된 균주에서 갈락토오스를 단독 탄소원으로 사용하는 경우의 효과는 해당과정 경로가 충분히 차단되고 포도당신생과정이 충분히 활성화된 결과로 보여지며, 이러한 상황에서 F6P는 비활성화된 PFK-1에 비해 F6P에 대해 더 높은 친화력을 나타내는 Gfa1p에 의해 사용이 증가하고 이는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성을 위한 플럭스로의 이동을 촉진한 결과로 보인다. 이는 PFK-2가 결손된 균주에서 다른 방법에 의해 해당과정 플럭스를 추가적으로 감소시킴으로써 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성을 추가적으로 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0034] 한편, 갈락토오스 이외의 다양한 탄소원을 이용하여 동일한 실험을 진행해 본 결과, 글루코오스, 프룩토오스, 만노오스는 유사한 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성능을 나타내었다(도 3A). 글루코오스나 프룩토오스와 같은 탄소원을 사용하였을 때 PFK27이 상향조절되었으나, 갈락토오스를 사용하였을 때에는 PFK27이 상향조절되지 않는다는 연구 결과에 비추어 볼 때, 갈락토오스를 사용하는 동시에 해당과정에 관여하는 유전자 활성을 억제하는 경우 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성이 증가시킬 수 있다고 판단된다.

[0035] *S.cerevisiae*에서 유래한 GNA1를 박테리아에서 과발현 시킨 결과 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성이 증가되었다는 연구 결과에 기초하여 글루코사민-6-포스페이트 아세틸트랜스퍼라아제인 GNA1의 추가적인 과발현을 BY4742 YMG 균주와 pfk26/pfk27 YMG 균주에서 유도하여 보았으나, GNA1의 과발현은 GNA1을 과발현시키지 않은 균주에 비해 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성을 다소 감소시키는 것으로 나타났다(도 3B). 이로써 본 발명자들은 GNA1이 이미 S.cerevisiae에서 충분히 발현되고 있으며 GFA1 돌연변이 및 YqaB의 과발현이 N-아세틸글루코사민 생산에 충분히 기여하고 있음을 알 수 있었다.

[0037] 본 발명에서는 S. cerevisiae에서 PFK-1의 가장 강력한 활성인자로 작용하는 F26BP를 생산하는 PFK-2를 결손시키고 단독 탄소원으로 갈락토오스를 사용함으로써 해당과정 플러스를 감소시켰을 때, 에탄올 생성이 감소되고 N-아세틸글루코사민 생성(GlcNAc)이 2g/L까지 증가함을 확인하였다. 이는 진핵생물에서 N-아세틸글루코사민 생성에 있어서 가장 높은 역가에 해당하는 것이다.

[0039] 따라서 본 발명은 일 관점에서 해당과정 및 N-아세틸글루코사민 생합성 경로 과정을 갖는 미생물에서, 포스포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자가 약화 또는 결실되어 있는 N-아세틸글루코사민 생성능이 향상된 변이 미생물에 관한 것이다.

[0040] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 포스포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자는 pfk26 및/또는 pfk27

일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 있어서, pfk26은 서열번호 1로 표시되고 pfk27은 서열번호 2로 표시되는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 변이 미생물은 서열번호 3으로 표시되는 GFA1 효소에서 Q96H 및/또는 Q157R로 변이된 변이효소를 코딩하는 유전자가 추가로 도입될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 변이효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 4 내지 서열번호 6으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 변이 미생물은 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자가 추가로 도입될 수 있으며, 상기 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자는 YqaB 또는 YihX 일 수 있다. 한편, 상기 HAD phosphatase YqaB는 서열번호 7로 표시될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미생물은 해당과정 및 N-아세틸글루코사민 생합성 경로 과정을 갖는 미생물은 제한없이 사용할 수 있으나, 효모, 곰팡이 및 아스퍼질러스로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 미생물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0047] 본 발명은 다른 관점에서 상기 변이 미생물을 배양하여 N-아세틸글루코사민을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 N-아세틸글루코사민을 회수하는 단계를 포함하는 N-아세틸글루코사민의 제조방법에 관한 것이다.

[0048] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 변이 미생물은 탄소원으로 갈락토오스 존재하에서 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0050] 한편, 본 발명에 있어서 포스포프룩토키나아제-2(PFK-2)를 코딩하는 유전자를 약화 또는 결실시키는 외에 다른 포스포프룩토키나아제 또는 피루베이트 키나아제 같은 해당과정 조절 유전자를 추가적으로 변형시킴으로써 해당과정의 속도를 늦추고 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 생성량을 더욱 증가시킬 수 있을 것이다.

[0052] 이를 위하여, 본 발명에서는 PFK-2, 즉, pfk26/pfk27이 제거된 돌연변이 균주에, CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 추가적으로 포스포프룩토키나아제-1(PFK-1)을 코딩하는 유전자인 PFK1 및/또는 피루베이트 키나아제(Pyk1p)를 코딩하는 유전자인 *PYK1*의 발현을 억제하여 N-아세틸글루코사민 생산이 증가되는지 확인하고자 하였고, 본 발명의 일실시예에 있어서, pfk26/pfk27이 제거된 돌연변이 균주(pfk26/pfk27 YM)에 각각 *PFK1* 및/또는 *PYK1*의 유전자 발현이 추가로 억제(약화)된 균주에서 이들 유전자 발현이 억제(약화)되지 않은 대조군 균주(pfk26/pfk27 YM)에 비해 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성이 현저히 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 5).

[0053] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 변이 미생물은 포스포프룩토키나아제-1(*PFK-1*) 및/또는 피루베이트 키나아제(Pyruvate kinase(Pyk1p))를 코딩하는 유전자의 발현이 추가적으로 약화되어 있을 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 유전자는 CRISPR/Cas9을 이용하여 약화되어 있고, 포스포프룩토키나아제-1(*PFK-1*)를 코딩하는 유전자(즉, PFK1)의 발현을 약화시키기 위한 gRNA는 서열번호 10으로 표시되고, 피루베이트 키나아제(Pyruvate kinase(Pyk1p))를 코딩하는 유전자(즉, PYK1)의 발현을 약화시키기 위한 gRNA는 서열번호 11로 표시될 수 있다.

[0056] 일반적으로 CRISPR/Cas 시스템은 핵산절단효소인 Cas 단백질 및 가이드 RNA(guide RNA)로 복합체를 형성하여 작용한다. 이중 CRISPR/Cas9 시스템에서는 가이드 RNA에 해당하는 crRNA와 tracrRNA를 하나로 연결한 단일사슬 가이드 RNA(sgRNA) 역시 Cas9 단백질과 복합체를 형성할 수 있다.

[0057] 가이드 RNA(guide RNA)의 안내 서열(guide sequence)이 타겟 유전자에 상보적인 서열을 가지고 있기 때문에, 타겟 유전자에 결합하고, 핵산절단효소인 Cas9에 의하여 PAM 모티프(protospacer adjacent motif)의 인접 부위를 절단하여 DSB(double strand break)를 생성하게 되며, 상기 절단부위를 복구시키려는 숙주 세포에 내재된 DNA 수복 과정을 통해 타겟 유전자가 결실되는 특징이 있다.

[0058] 본 발명에서의 Cas 단백질, 예시적으로 Cas9(CRISPR associated protein 9)은 가이드 RNA(guide RNA)의 RNA 스

캐폴드 부분과 결합하며 복합체를 형성하고, 타겟 유전자의 서열에 존재하는 PAM 서열을 인지하여 타겟 유전자로 CRISPR/Cas 시스템을 인도하며, 가이드 RNA의 안내 서열과 타겟 유전자 사이의 상보적 결합을 통해 타겟 유전자를 식별하며, 최종적으로 활성 부위인 HNH 도메인과 RuvC 도메인에 의하여 핵산 절단활성을 나타낸다.

[0059] 이러한 Cas9의 여러 도메인 중 염기 절단에 관여하는 두 개의 도메인에 특정 아미노산에 하나의 변이가 도입되면 핵산절단능력을 상실하는 것이 알려져 있다. 그 예로 스트렙토코커스 피오제네스(Streptococcus pyogenes)의 Cas9의 경우 아미노산 10번과 840번을 각각 알라닌으로 변이시키면(D10A 및 H840A 변이), DNA 절단 능력을 상실하게 되고 이를 보통 dCas9이라고 한다. 또한, 10번, 840번 중 어느 하나의 아미노산을 알라닌으로 변이(D10A 또는 H840A 변이)시킨 Cas9 효소는 이중 가닥 염기 중 한 가닥만을 절단하는 닉카아제(nickase) 활성을 가지는 것으로 알려져 있다.

[0060] 본 발명에서는 Cas 단백질과 가이드 RNA(guide RNA)를 균주에 동시에 도입할 경우에는 단일 벡터 또는 서로 다른 벡터에 의하여 발현되도록 구성할 수 있으며, 발현된 Cas 단백질과 가이드 RNA(guide RNA)는 균주 내에서 발현된 다음, 자발적으로 복합체를 형성할 수 있다. 상기 복합체는 'CRISPR/Cas 시스템', 'CRISPR complex", Cas9-gRNA complex', 'CRISPR/Cas 복합체', 'Cas 단백질 복합체' 등의 용어와 혼용될 수 있다.

[0062] 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 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0064] **실시예 1: PFK26/ PFK27 이중 결손 플라스미드 및 균주 제작**

[0065] 공개특허 제10-2016-0002509호에 개시된 방법을 응용하여 GFA1 변이체와 HAD 포스프타아제인 YqaB가 과발현되는 변이 균주를 제작하였고, PFK26과 PFK27 유전자가 결손되어 PFK-2가 파괴된 pfk26/pfk27 균주도 제작하였다. 즉, N-아세틸글루코사민 생합성 경로를 강화하기 위한 하이-카피 플라스미드를 제작하기 위하여 타겟 유전자를 PCR 반응을 통해 증폭시키고 제한 효소로 절단한 후 p423GPD 또는 p425GPD 플라스미드에 접합시켰다. YqaB 유전자는 HIS3 선별 마커를 가지고 있는 p423GPD에 클로닝하여 p423GPD-YqaB를 제작하였고, 변이된 GFA1과 GNA1은 LEU2 선별 마커를 가지고 있는 p425GPD에 클로닝하여 p425GPD-MG를 제작하였다. YqaB, 변이된 GFA1, GNA1의 과발현은 각각 GPD, GPD, TEF 프로모터에 의해 유도되었다. *S. cerevisiae* BY4742에서 PFK26의 ORF(open reading frame)는 상동 재조합을 통하여 45bp 상동성 팔과 loxP 서열이 연결되어 있는 KanMX6 선별 마커를 포함하는 절편으로 대체시켰다. KanMX6 선별 마커는 Cre/loxP 시스템을 통하여 PFK27을 결손시키는데 재사용하였다. 염색체상의 PFK26 또는 PFK27의 위치에 선별 마커가 대체되었음은 염기서열 분석법에 의해 확인하였다. 이와 같은 방법에 의해 제작된 균주와 플라스미드는 하기 표 1과 표 2와 같다.

표 1

[0067]

Strain	Description	Source
BY4742	MATα *his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*	(Brachmann et al. 1998)
pfk26/pfk27	BY4742 *pfk26Δ0 pfk27::URA3*	-
BY4742 YM	BY4742 p423GPD-YqaB p425GPD-GFA1m	-
BY4742 YMG	BY4742 p423GPD-YqaB p425GPD-MG	-
pfk26/pfk27 YM	pfk26/pfk27 p423GPD-YqaB p425GPD-GFA1m	-
pfk26/pfk27 YMG	pfk26/pfk27 p423GPD-YqaB p425GPD-MG	-

표 2

[0069]

Plasmid	Description	Source
p423GPD	Plasmid with 2μ origin, *GPD* promoter, *CYC1* terminator, and *HIS3* selectable marker	(Mumberg et al. 1995)

p425GPD	Plasmid with 2μorigin, *GPD* promoter, *CYC1* terminator, and *LEU2* selectable marker	(Mumberg et al. 1995)
p423GPD-YqaB	p423GPD harboring YqaB	-
p425GPD-GFA1m	p423GPD harboring *GFA1* mutant	-
p425GPD-MG	p423GPD harboring *GFA1* mutant under *GPD* promoter and *GNA1* under *TEF* promoter	-

[0071] **실시예 2: N-아세틸글루코사민 생산을 위한 균주 배양**

[0073] 상기 실시예 1에서 제작된 균주를 20g/L의 탄소원(글루코오스, 프룩토오스, 만노오스, 또는 갈락토오스), 6.7g/L의 yeast nitrogen base(w/o amino acid), CSM-HIS-LEU dropout mixture가 포함된 합성 최소배지를 이용하여 배양하였다. 균주는 20mL의 배지가 담긴 250ml 플라스크에서 30℃, 미호기성(microaerobic), 250rpm의 조건으로 진탕배양기에서 배양하였으며, 660nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 성장 정도를 확인하였다.

[0075] **실시예 3: 대사물질 농도의 측정**

[0077] 세포외 N-아세틸글루코사민 생성, 탄소원 소비, 에탄올 생산은 고성능액체크로마토그래피(HPLC; high performance liquid chromatography)을 이용하여 측정하였다. 균주를 배양한 배지를 원심분리하고 상층액을 HPLC(YL instrument, Anyang, Korea))로 분석하였고, 글루코오스, 갈락토오스, 에탄올, N-아세틸글루코사민은 10mM H_2SO_4용액을 용리액으로 이용하는 RI detector와 Shodex SUGAR SH1011 컬럼(8.0×300mm)를 이용하여 분석하였다.

[0079] 그 결과, pfk26/pfk27 YM 균주는 대조군인 BY4742 YM 균주와 비교하여 갈락토오스를 단독 탄소원으로 사용하였을 때 2배에 가까운 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성량을 나타내었다(도 2). 한편, 글루코오스, 프룩토오스, 만노오스는 변이 균주를 접종한 후 6일 경과 후 유사한 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성량을 나타내었으며(도 3A), GFA1 변이체와 YqaB를 과발현시킨 변이 균주에 GNA1을 추가적으로 과발현시킨 균주는 글루코오스 및 갈락토오스 최소 배지에서 모두 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성량이 감소하는 것으로 나타났다(도 3B).

[0081] 상기와 같은 결과로부터 YqaB 유전자와 GFA1 변이체가 도입된 미생물에 포스포프룩토키나아제-2를 추가적으로 제거한 변이 미생물을 갈락토오스를 단독 탄소원으로 하여 배양하였을 때 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성에 가장 높은 효율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0083] **실시예 4: CRISPR/Cas 시스템을 이용한 PFK1 및/또는 PYK1 유전자 발현이 억제된 돌연변이 균주의 제작 및 대사물질 농도의 측정**

[0085] 상기 실시예 1에서 제작된 pfk26/pfk27이 제거된 돌연변이 균주(pfk26/pfk27 YM)에 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 추가적으로 *PFK1* 및/또는 *PYK1* 유전자의 발현을 억제 또는 감소(약화)시켜 N-아세틸글루코사민 생산이 증가되는지 확인하고자 하였다(도 4).

[0086] CRISPR/Cas9를 이용하여 *PFK1* 및/또는 *PYK1* 유전자의 발현을 억제 또는 감소(약화)시키기 위해 Tunable and Multifunctional Eukaryotic Transcription Factors Based on CRISPR/Cas(ACS Synthetic Biology Vol. 2 No. 10 604p~617p, Fahim Farzadfard et al.)에 개시된 방법을 이용하였다.

[0087] 해당과정에 관여하는 유전자인 *PFK1*(서열번호 8) 및/또는 *PYK1*(서열번호 9) 를 불활성화시킬 수 없으므로, 발현을 일정 수준으로 억제시킴으로써 N-아세틸글루코사민 생산을 증가시킬 수 있는 가이드 RNA 서열을 스크리닝 하

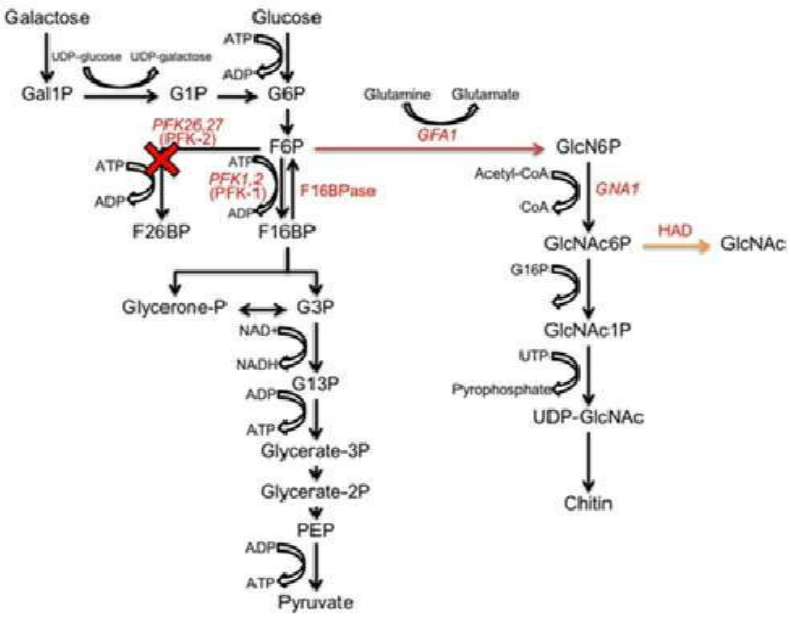
였으며, 그 결과 *PFK1*의 ORF에 결합하는 gRNA 서열로 CAATCTCAAGATTCATGCTA(서열번호 10)가 선정되었고, *PYK1*의 업스트림에 결합하는 gRNA 서열로 CAGTAGAAAACACTTTGTGA(서열번호 11)가 선정되었다. 상기 논문에서 사용된 pRPR1_gRNA_handle_RPR1t plasmid (Addgene, 미국)과 pTPGI_dCas9_VP64 (Addgene, 미국)를 구입하여, 사용자 매뉴얼에 따라 gRNA 서열을 클로닝 하고, dCas9을 함께 클로닝하여 발현시킴으로써, PFK1 및/또는 PYK1 유전자의 발현이 억제되도록 하였다.

[0088] 그 결과, 각각 *PFK1* 또는 *PYK1*의 유전자 발현이 추가로 억제된 균주(각각 PFK1-4, PYK1-4)에서 이들 유전자 발현이 억제되지 않은 대조군 균주(pfk26/pfk27 YM)에 비해 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 생성이 현저히 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 5).

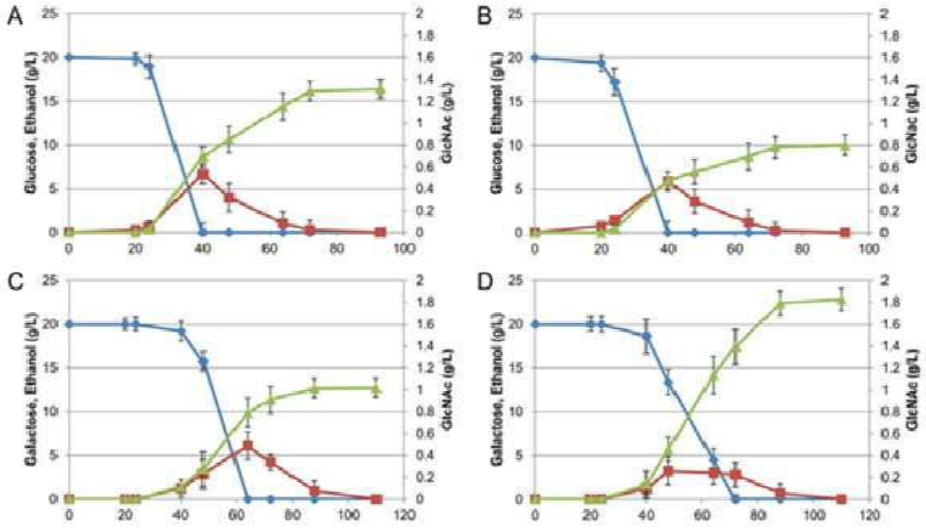
[0090] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

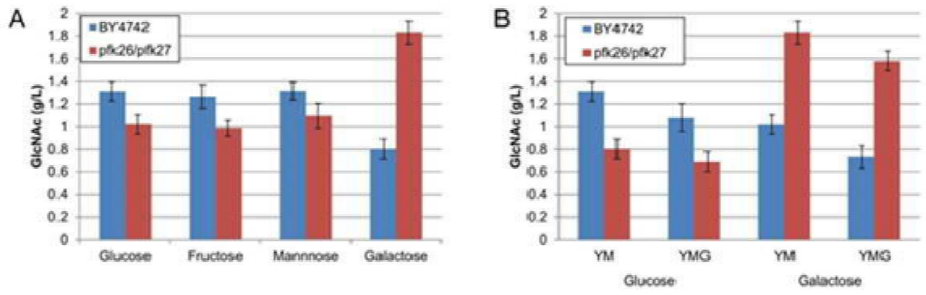
도면1



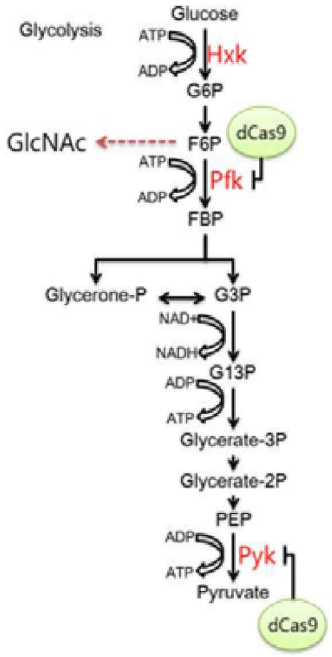
도면2


A
B
C
D
Glucose, Ethanol (g/L)
Galactose, Ethanol (g/L)
GlcNAc (g/L)

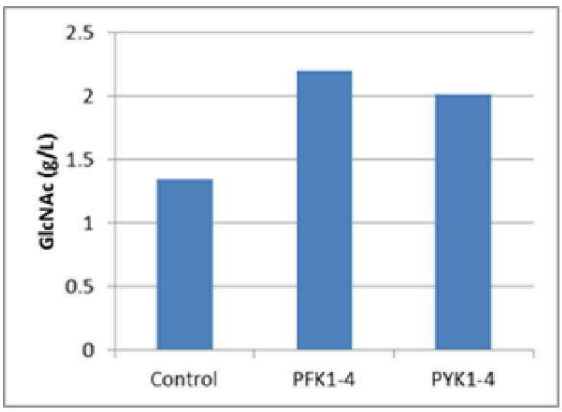
도면3


A
B
BY4742
pfk26/pfk27
GlcNAc (g/L)
Glucose
Fructose
Mannnose
Galactose
YM
YMG
Glucose
Galactose

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Microorganism Having Improved N-acetylglucosamine Producing Capability by Modulating Glycolytic Flux

<130> P17-087

<150> KR 10-2016-0060920

<151> 2016-05-18

<160> 11

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2484

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

atgttcaaac cagtagactt ctctgaaaca tctcctgtgc cgcctgatat tgatcttgct 60

cctacacaat ctccacacca tgtggcacct agtcaagact ccagttatga tcttttatcc 120

cggagttccg atgataaaat tgatgctgaa aagggtccgc atgatgaatt atctaagcac 180

ttaccacttt ttcagaaaag acctttgagc gatactccta tatcgagcaa ttggaactct 240

cctggaatca ctgaagaaaa tacaccttct gactctcctg aaaatagcgc tactaatttg 300

aaatcgctac atcgattgca tattaacgac gaaacgcaac taaaaaatgc taaaattccc 360

acaaacgata ctactgacta catgcctcct tcagatggag caaatgaggt aactcggatt 420

gatttgaaag acattaaatc acctacgaga caccataaaa gaagacctac caccatcgat 480

gttcctggtt taacaaagtc taaaacatct ccagatggtc tcatatcaaa ggaagatagt 540

ggatcaaagt tagtgattgt catggtcgga ctgccagcta cgggaaagtc atttattaca 600

aataaattat ccagattttt aaattattct ttatactatt gtaaagtgtt taatgtcggt 660

aacactagaa ggaagtttgc taaggagcat ggcctaaagg accaggattc aaagtttttc 720

gagccgaaaa acgccgactc tactaggttg agagacaaat gggccatgga tactctggat 780

gaattgctag attatttatt agaaggttca ggatctgtgg gaatttttga tgctacaaat 840

acctctcgtg aaagaagaaa aaacgttctg gctagaatca gaaagagaag tcctcatttg 900

aaggttttat ttttagaatc tgtttgttcg gatcatgcac tggtacagaa aaatattaga 960

ctcaaattat ttggtccaga ttacaaaggt aaagatcctg aaagctcttt aaaagatttt 1020

aaaagtcgcc tggcaaacta cttgaaagcc tatgaaccaa ttgaggatga cgaaaatttg 1080

cagtacatca aaatgataga tgtgggaaag aaagtcatcg catacaatat tcaagggttt 1140

ttagcttcgc agacggtata ttatttgtta aatttcaatt tggctgacag acaaatttgg 1200

ataacgagaa gtggcgagag cgaagataat gttagtggcc gtataggcgg aaattcccat 1260

ttgactcctc gtggtctaag atttgctaaa agtctaccaa aattcattgc cagacagaga 1320

gaaatatttt atcaaaatct catgcaacaa aaaaagaata atgaaaatac agatgggaac 1380

atttataatg acttttтcgt ttggaccagc atgcgtgcta ggactatagg gactgctcaa 1440

tatttcaacg aagatgatta tcctatcaaa caaatgaaaa tgttagatga gttaagtgca 1500

ggtgattatg atggtatgac atatccagaa attaaaaaca actttcctga agaattcgaa 1560

aaaagacaga aagataagtt gagatacaga taccctggta ttggcggtga atcgtatatg 1620

gacgttatta atagactcag acctgttatc acagaactag aaagaatcga ggataacgtt 1680

cttattatta cacaccgggt ggtggcaaga gccttattgg gttattttat gaacttgagt 1740

atgggtatta ttgccaattt ggatgtccca ttacattgtg tatattgcct agaaccaaaa 1800

ccatatggaa tcacttggtc attatgggag tatgatgaag catcggattc attttctaag 1860
gtcccacaaa cggacttgaa taccaccaga gtaaaggagg ttggccttgt ttataatgaa 1920
agaagatatt ctgttatacc aacagctccg ccaagtgcaa gaagcagctt tgcaagtgac 1980
tttttgtcaa gaaaaagatc taatcctact tctgcatctt catcccagag tgaattatca 2040
gaacaaccca agaatagcgt tagtgctcaa actggcagca ataataccac tctcattggg 2100
agcaacttta acatcaagaa tgaaaatggt gattcgagaa taccattatc tgcaccactt 2160
atggccacta atacttctaa taacatctta gatggtggag gtacctcaat ttcgatacat 2220

cgtcccaggg ttgttccaaa tcaaaacaac gtgaatcctc ttttggctaa caacaataaa 2280
gcggcttcta atgtacctaa tgtaaagaag tcagcggcta caccaaggca aatttttgaa 2340
atagataaag tggacgaaaa gttatccatg ttgaaaaata aaagttttct attacatgga 2400
aaggattatc ctaataatgc tgataataat gacaacgaag atataagggc aaaaaccatg 2460
aatcgcagcc aaagtcacgt ttaa 2484

<210> 2
<211> 1194
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 2

atgggtggtt cttccgattc agactctcac gatggatatt tgacttccga atataattcc 60

tcgaattctc ttttttcact taacaccggt aacagctatt caagcgcatc tctcgacaga 120
gccactttag attgtcaaga ttctgttttt ttcgataatc acaaaagttc actgctgtct 180
acagaggtcc caaggtttat ttctaacgac ccgttacact tacccattac actgaattac 240
aaaagagaca atgcagaccc tacgtataca aatggaaaag ttaacaagtt tatgattgtt 300
ttgattgggc taccagctac tgggaagtct accatttctt ctcatttaat tcaatgtttg 360
aagaacaatc cgctaactaa ttcattacgc tgtaaagttt ttaatgctgg taagataaga 420
aggcaaatca gttgtgctac catttcaaag cctttgcttt tgtcgaatac atcttcggaa 480

gacttattta atccgaaaaa taacgataaa aaggaaacgt atgccaggat cactttgcaa 540
aagttgtttc acgaaatcaa caacgatgaa tgtgacgtgg gaatcttcga cgccacaaat 600
tcgaccatcg aaagaagaag atttatattt gaggaggttt gttcgttcaa tacagatgag 660
ctttctagtt tcaatttggt gcccataatc ttacaggtgt catgttttaa cagaagcttt 720
atcaaataca atatccacaa taaatcgttt aatgaagact acttagacaa accttatgaa 780

cttgccatca aagattttgc aaagagatta aaacattact attcgcagtt tacacctttc 840

tcccttgatg agttcaatca aatccatcga tatatcagcc aacatgaaga aatcgatacg 900

agcttatttt tcttcaatgt tattaatgcg ggcgtcgttg agccacattc tttaaatcaa 960

agtcattacc cttcaacctg cggcaagcaa attagggaca ccattatggt tattgaaaat 1020

ttcatcaatc actattctca gatgtttggt tttgaataca tcgaagctgt taaattgttt 1080

tttgaaagtt ttggaaatag ctcagaggaa actttaacta cactagactc tgttgttaat 1140

gataaatttt ttgatgattt gcagagccta attgaaagca acggatttgc ttga 1194

<210> 3

<211> 717

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 3

Met Cys Gly Ile Phe Gly Tyr Cys Asn Tyr Leu Val Glu Arg Ser Arg

1 5 10 15

Gly Glu Ile Ile Asp Thr Leu Val Asp Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr

20 25 30

Arg Gly Tyr Asp Ser Thr Gly Ile Ala Ile Asp Gly Asp Glu Ala Asp

35 40 45

Ser Thr Phe Ile Tyr Lys Gln Ile Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu

50 55 60

Glu Ile Thr Lys Gln Asn Pro Asn Arg Asp Val Thr Phe Val Ser His

65 70 75 80

Cys Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Arg Pro Glu Gln

85 90 95

Val Asn Cys His Pro Gln Arg Ser Asp Pro Glu Asp Gln Phe Val Val

100 105 110

Val His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Phe Arg Glu Leu Lys Thr Leu Leu

115 120 125

Ile Asn Lys Gly Tyr Lys Phe Glu Ser Asp Thr Asp Thr Glu Cys Ile

130 135 140

Ala Lys Leu Tyr Leu His Leu Tyr Asn Thr Asn Leu Gln Asn Gly His

145 150 155 160

Asp Leu Asp Phe His Glu Leu Thr Lys Leu Val Leu Leu Glu Leu Glu

165 170 175

Gly Ser Tyr Gly Leu Leu Cys Lys Ser Cys His Tyr Pro Asn Glu Val

180 185 190

Ile Ala Thr Arg Lys Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val Lys Ser Glu

195 200 205

Lys Lys Leu Lys Val Asp Phe Val Asp Val Glu Phe Pro Glu Glu Asn

210 215 220

Ala Gly Gln Pro Glu Ile Pro Leu Lys Ser Asn Asn Lys Ser Phe Gly

225 230 235 240

Leu Gly Pro Lys Lys Ala Arg Glu Phe Glu Ala Gly Ser Gln Asn Ala

245 250 255

Asn Leu Leu Pro Ile Ala Ala Asn Glu Phe Asn Leu Arg His Ser Gln

260 265 270

Ser Arg Ala Phe Leu Ser Glu Asp Gly Ser Pro Thr Pro Val Glu Phe

275 280 285

Phe Val Ser Ser Asp Ala Ala Ser Val Val Lys His Thr Lys Lys Val

290 295 300

Leu Phe Leu Glu Asp Asp Asp Leu Ala His Ile Tyr Asp Gly Glu Leu

305 310 315 320

His Ile His Arg Ser Arg Arg Glu Val Gly Ala Ser Met Thr Arg Ser

325 330 335

Ile Gln Thr Leu Glu Met Glu Leu Ala Gln Ile Met Lys Gly Pro Tyr

340 345 350

Asp His Phe Met Gln Lys Glu Ile Tyr Glu Gln Pro Glu Ser Thr Phe

355 360 365

Asn Thr Met Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Glu Asn Asn Lys Val Ile Leu

370 375 380

Gly Gly Leu Lys Ala Trp Leu Pro Val Val Arg Arg Ala Arg Arg Leu

385 390 395 400

Ile Met Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ser Cys Leu Ala Thr Arg

405 410 415

Ala Ile Phe Glu Glu Leu Ser Asp Ile Pro Val Ser Val Glu Leu Ala

420 425 430

Ser Asp Phe Leu Asp Arg Lys Cys Pro Val Phe Arg Asp Asp Val Cys

435 440 445

Val Phe Val Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Met Leu Ala Leu

450 455 460

Asn Tyr Cys Leu Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Val Asn Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr Ser Gln

500 505 510

Tyr Ile Ala Leu Val Met Phe Ala Leu Ser Leu Ser Asp Asp Arg Val

515 520 525

Ser Lys Ile Asp Arg Arg Ile Glu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Ile

530 535 540

Pro Gly Gln Ile Lys Gln Val Leu Lys Leu Glu Pro Arg Ile Lys Lys

545 550 555 560

Leu Cys Ala Thr Glu Leu Lys Asp Gln Lys Ser Leu Leu Leu Leu Gly

565 570 575

Arg Gly Tyr Gln Phe Ala Ala Ala Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile Lys

580 585 590

Glu Ile Ser Tyr Met His Ser Glu Gly Val Leu Ala Gly Glu Leu Lys

595 600 605

His Gly Val Leu Ala Leu Val Asp Glu Asn Leu Pro Ile Ile Ala Phe

610 615 620

Gly Thr Arg Asp Ser Leu Phe Pro Lys Val Val Ser Ser Ile Glu Gln

625 630 635 640

Val Thr Ala Arg Lys Gly His Pro Ile Ile Ile Cys Asn Glu Asn Asp

645 650 655

Glu Val Trp Ala Gln Lys Ser Lys Ser Ile Asp Leu Gln Thr Leu Glu
660 665 670

Val Pro Gln Thr Val Asp Cys Leu Gln Gly Leu Ile Asn Ile Ile Pro
675 680 685

Leu Gln Leu Met Ser Tyr Trp Leu Ala Val Asn Lys Gly Ile Asp Val
690 695 700

Asp Phe Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu
705 710 715

<210> 4

<211> 717

<212> PRT

<213
> Artificial Sequence

<220><223> GFA1 mutant 1

<400> 4

Met Cys Gly Ile Phe Gly Tyr Cys Asn Tyr Leu Val Glu Arg Ser Arg
1 5 10 15

Gly Glu Ile Ile Asp Thr Leu Val Asp Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr
20 25 30

Lys Gly Tyr Asp Ser Thr Gly Ile Ala Ile Asp Gly Asp Glu Ala Asp
35 40 45

Ser Thr Phe Ile Tyr Lys Gln Ile Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
50 55 60

Glu Ile Thr Lys Gln Asn Pro Asn Arg Asp Val Thr Phe Val Ser His
65 70 75 80

Cys Ser Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Arg Pro Glu His
85 90 95

Val Asn Cys His Pro Gln Arg Ser Asp Pro Glu Gly Gln Phe Val Val
100 105 110

Val His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Phe Arg Glu Leu Lys Thr Leu Leu
115 120 125

Ile Asn Lys Gly Tyr Lys Phe Glu Ser Asp Thr Asp Thr Glu Cys Ile

130 135 140

Ala Lys Leu Tyr Leu His Leu Tyr Asn Thr Asn Leu Arg Asn Gly His
145 150 155 160
Asp Leu Asp Phe His Glu Leu Thr Lys Leu Val Leu Leu Glu Leu Glu
165 170 175
Gly Ser Tyr Gly Leu Leu Cys Lys Ser Cys His Tyr Pro Asn Glu Val
180 185 190
Ile Ala Thr Arg Lys Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val Lys Ser Glu
195 200 205

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

275 280 285
Phe Val Ser Ser Asp Ala Ala Ser Val Val Lys His Thr Lys Lys Val
290 295 300
Leu Phe Leu Glu Asp Asp Asp Leu Ala His Ile Tyr Asp Gly Glu Leu
305 310 315 320
His Ile His Arg Ser Arg Arg Glu Val Gly Ala Ser Met Thr Arg Ser
325 330 335
Ile His Thr Leu Glu Met Glu Leu Ala Gln Ile Met Lys Gly Pro Tyr
340 345 350

Asp His Phe Met Gln Lys Glu Ile Tyr Glu Gln Pro Glu Ser Thr Phe
355 360 365
Asn Thr Met Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Glu Asn Asn Lys Val Ile Leu
370 375 380
Gly Ser Leu Lys Ala Trp Leu Pro Val Val Arg Arg Ala Arg Arg Leu
385 390 395 400

Ile Met Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ser Cys Leu Ala Thr Arg
405 410 415
Ala Ile Phe Glu Glu Leu Ser Asp Ile Pro Val Ser Val Glu Leu Ala

420 425 430
Ser Asp Phe Leu Asp Arg Lys Cys Pro Val Phe Arg Asp Asp Val Cys
435 440 445
Val Phe Val Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Met Leu Ala Leu
450 455 460
Asn Tyr Cys Leu Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Val Asn Ser
465 470 475 480
Val Gly Ser Ser Ile Ser Arg Val Thr His Cys Gly Val His Ile Asn
485 490 495

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

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

Val Thr Ala Arg Lys Gly His Pro Ile Ile Ile Cys Asn Glu Asn Asp

645 650 655

Glu Val Trp Ala Arg Lys Ser Lys Ser Ile Asp Leu Gln Thr Leu Glu

660 665 670

Val Pro Gln Thr Val Asp Cys Leu Gln Gly Leu Ile Asn Ile Ile Pro

675 680 685

Leu Gln Leu Met Ser Tyr Trp Leu Ala Val Asn Lys Gly Ile Asp Val

690 695 700

Asp Phe Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu

705 710 715

<210> 5

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFA1 mutant 2

<400> 5

Met Cys Gly Ile Phe Gly Tyr Cys Asn Tyr Leu Val Glu Arg Ser Arg

1 5 10 15

Gly Glu Ile Ile Asp Thr Leu Val Asp Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr

20 25 30

Arg Gly Tyr Asp Ser Thr Gly Ile Ala Ile Asp Gly Asp Glu Ala Asp

35 40 45

Ser Thr Phe Ile Tyr Lys Gln Ile Gly Lys Val Ser Ala Leu Glu Glu

50 55 60

Glu Ile Thr Lys Gln Asn Pro Asn Arg Asp Ala Thr Phe Val Ser His

65 70 75 80

Cys Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Arg Pro Glu His

85 90 95

Val Asn Cys His Pro Gln Arg Ser Asp Pro Glu Asp Gln Phe Val Val

100 105 110

Val His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Phe Arg Glu Leu Lys Thr Leu Leu

115 120 125

Ile Asn Lys Gly Tyr Lys Phe Glu Ser Asp Thr Asp Thr Glu Cys Ile

130 135 140

Ala Lys Leu Tyr Leu His Leu Tyr Asn Thr Asn Leu Arg Asn Gly His

145 150 155 160

Asp Leu Asp Phe His Glu Leu Thr Lys Leu Val Leu Leu Glu Leu Glu

165 170 175

Gly Ser Tyr Gly Leu Leu Cys Lys Ser Cys His Tyr Pro Asn Glu Val

180 185 190

Ile Ala Thr Arg Lys Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val Lys Ser Glu

195 200 205

Lys Lys Leu Lys Val Asp Phe Val Asp Val Glu Phe Pro Glu Glu Asn

210 215 220

Ala Gly Gln Pro Glu Ile Pro Leu Lys Ser Asn Asn Lys Ser Phe Gly

225 230 235 240

Leu Gly Pro Lys Lys Ala Arg Glu Phe Glu Ala Gly Ser Gln Asn Ala

245 250 255

Asn Leu Leu Pro Asn Ala Ala Asn Glu Phe Asn Leu Arg His Ser Gln

260 265 270

Ser Arg Ala Phe Leu Ser Glu Asp Gly Ser Pro Thr Pro Val Glu Phe

275 280 285

Phe Val Ser Ser Asp Ala Ala Ser Val Val Lys His Thr Lys Lys Val

290 295 300

Leu Phe Leu Glu Asp Asp Asp Leu Ala His Ile Tyr Asp Gly Glu Leu

305 310 315 320

His Ile His Arg Ser Arg Arg Glu Val Gly Ala Ser Met Thr Arg Ser

325 330 335

Ile Gln Thr Leu Glu Met Glu Ser Ala Gln Ile Met Lys Gly Pro Tyr

340 345 350

Asp His Phe Met Gln Lys Glu Ile Tyr Glu Gln Pro Glu Ser Thr Phe

355 360 365

Asn Thr Met Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Glu Asn Asn Lys Val Ile Leu

370 375 380

Gly Gly Leu Lys Ala Trp Leu Pro Val Val Arg Arg Ala Arg Arg Leu

385 390 395 400

Ile Met Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ser Cys Leu Ala Thr Arg

405 410 415

Ala Ile Phe Glu Glu Leu Ser Asp Ile Pro Val Ser Val Glu Leu Ala

420 425 430

Ser Asp Phe Leu Asp Arg Lys Cys Pro Val Phe Arg Asp Asp Val Cys

435 440 445

Val Phe Val Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Met Leu Ala Leu

450 455 460

Asn Tyr Cys Leu Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Val Asn Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr Ser Gln

500 505 510

Tyr Ile Ala Leu Val Met Phe Ala Leu Ser Leu Ser Asp Asp Arg Val

515 520 525

Ser Lys Ile Asp Arg Arg Ile Glu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Ile

530 535 540

Pro Gly Gln Ile Lys Gln Val Leu Lys Leu Glu Pro Arg Ile Lys Lys

545 550 555 560

Leu Cys Ala Thr Glu Leu Lys Asp Gln Lys Ser Leu Leu Leu Leu Gly

565 570 575

Arg Gly Tyr Gln Phe Ala Ala Ala Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile Lys

580 585 590

Glu Ile Ser Tyr Met His Ser Glu Gly Val Leu Ala Gly Glu Leu Lys

595 600 605

His Gly Val Leu Ala Leu Val Asp Glu Asn Leu Pro Ile Ile Ala Phe

610 615 620

Gly Thr Arg Asp Ser Leu Phe Pro Lys Val Val Ser Ser Ile Glu Gln

625 630 635 640

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

690 695 700
Asp Phe Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu
705 710 715

<210> 6
<211> 717
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> GFA1 mutant 3
<400> 6
Met Cys Gly Ile Phe Gly Tyr Cys Asn Tyr Leu Val Glu Arg Ser Arg
1 5 10 15
Gly Glu Ile Ile Asp Thr Leu Val Asp Gly Leu Gln Arg Leu Glu Tyr
20 25 30

Arg Gly Tyr Asp Ser Thr Gly Ile Ala Ile Asp Gly Asp Glu Ala Asp
35 40 45
Ser Thr Phe Ile Tyr Lys Gln Ile Gly Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu
50 55 60
Glu Ile Thr Lys Gln Asn Pro Asn Arg Asp Val Thr Phe Val Ser His
65 70 75 80
Cys Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Arg Pro Glu His
85 90 95
Val Asn Cys His Pro Gln Arg Ser Asp Pro Glu Asp Gln Phe Val Val

100 105 110
Val His Asn Gly Ile Ile Thr Asn Phe Arg Glu Leu Lys Thr Leu Leu
115 120 125

Ile Asn Lys Gly Tyr Lys Phe Glu Ser Asp Thr Asp Thr Glu Cys Ile
130 135 140
Ala Lys Leu Tyr Leu His Leu Tyr Asn Thr Asn Leu Arg Asn Gly His
145 150 155 160
Asp Leu Asp Phe His Glu Leu Thr Lys Leu Val Leu Leu Glu Leu Glu
165 170 175

Gly Ser Tyr Gly Leu Leu Cys Lys Ser Cys His Tyr Pro Asn Glu Val
180 185 190
Ile Ala Thr Arg Lys Gly Ser Pro Leu Leu Ile Gly Val Lys Ser Glu
195 200 205
Lys Lys Leu Lys Val Asp Phe Val Asp Val Glu Phe Pro Glu Glu Asn
210 215 220
Ala Gly Gln Pro Glu Ile Pro Leu Lys Ser Asn Asn Lys Ser Phe Gly
225 230 235 240
Leu Gly Pro Lys Lys Ala Arg Glu Phe Glu Ala Gly Ser Gln Asn Ala

245 250 255
Asn Leu Leu Pro Ile Ala Ala Asn Glu Phe Asn Leu Arg His Ser Gln
260 265 270
Ser Arg Ala Phe Leu Ser Glu Asp Gly Ser Pro Thr Pro Val Glu Phe
275 280 285
Phe Val Ser Ser Asp Ala Ala Ser Val Val Lys His Thr Lys Lys Val
290 295 300
Leu Phe Leu Glu Asp Asp Asp Leu Ala His Ile Tyr Asp Gly Glu Leu
305 310 315 320

His Ile His Arg Ser Arg Arg Glu Val Gly Ala Ser Met Thr Arg Ser
325 330 335
Ile Gln Thr Leu Glu Met Val Leu Ala Gln Ile Met Lys Gly Pro Tyr
340 345 350
Asp His Phe Met Gln Lys Glu Ile Tyr Glu Gln Pro Glu Ser Thr Phe
355 360 365
Asn Thr Met Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Glu Asn Asn Lys Val Ile Leu
370 375 380

Gly Gly Leu Lys Ala Trp Leu Pro Val Val Arg Arg Ala Arg Arg Leu

385 390 395 400

Ile Met Ile Ala Cys Gly Thr Ser Tyr His Ser Cys Leu Ala Thr Arg

405 410 415

Ala Ile Phe Glu Glu Leu Ser Asp Ile Pro Val Ser Val Glu Leu Ala

420 425 430

Ser Asp Phe Leu Asp Arg Lys Cys Pro Val Phe Arg Asp Asp Val Cys

435 440 445

Val Phe Val Ser Gln Ser Gly Glu Thr Ala Asp Thr Met Leu Ala Leu

450 455 460

Asn Tyr Cys Leu Glu Arg Gly Ala Leu Thr Val Gly Ile Val Asn Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Gly Pro Glu Ile Gly Val Ala Ser Thr Lys Ala Tyr Thr Ser Gln

500 505 510

Tyr Ile Ala Leu Val Met Phe Ala Leu Ser Leu Ser Asp Asp Arg Val

515 520 525

Ser Lys Ile Asp Arg Arg Ile Glu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Ile

530 535 540

Pro Gly Gln Ile Lys Gln Val Leu Lys Leu Glu Pro Arg Ile Lys Lys

545 550 555 560

Leu Cys Ala Thr Glu Leu Lys Asp Gln Lys Ser Leu Leu Leu Leu Gly

565 570 575

Arg Gly Tyr Gln Phe Ala Ala Ala Leu Glu Gly Ala Leu Lys Ile Lys

580 585 590

Glu Ile Ser Tyr Met His Ser Glu Gly Val Leu Ala Gly Glu Leu Lys

595 600 605

His Gly Val Leu Ala Leu Val Asp Glu Asn Leu Pro Ile Ile Ala Phe

610 615 620

Gly Thr Arg Asp Ser Leu Phe Pro Lys Val Val Ser Ser Ile Glu Gln

625 630 635 640

Val Thr Ala Arg Lys Gly His Pro Ile Ile Ile Cys Asn Glu Asn Asp

645 650 655

Glu Val Trp Ala Gln Lys Ser Lys Ser Ile Asp Leu Gln Thr Leu Glu

660 665 670

Val Pro Gln Thr Val Asp Cys Leu Gln Gly Leu Ile Asn Ile Ile Pro

675 680 685

Leu Gln Leu Met Ser Tyr Trp Leu Ala Val Asn Lys Gly Ile Asp Val

690 695 700

Asp Phe Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val Glu

705 710 715

<210> 7

<211> 188

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 7

Met Tyr Glu Arg Tyr Ala Gly Leu Ile Phe Asp Met Asp Gly Thr Ile

1 5 10 15

Leu Asp Thr Glu Pro Thr His Arg Lys Ala Trp Arg Glu Val Leu Gly

20 25 30

His Tyr Gly Leu Gln Tyr Asp Ile Gln Ala Met Ile Ala Leu Asn Gly

35 40 45

Ser Pro Thr Trp Arg Ile Ala Gln Ala Ile Ile Glu Leu Asn Gln Ala

50 55 60

Asp Leu Asp Pro His Ala Leu Ala Arg Glu Lys Thr Glu Ala Val Arg

65 70 75 80

Ser Met Leu Leu Asp Ser Val Glu Pro Leu Pro Leu Val Asp Val Val

85 90 95

Lys Ser Trp His Gly Arg Arg Pro Met Ala Val Gly Thr Gly Ser Glu

100 105 110

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

115 120 125

Phe Asp Ala Val Val Ala Ala Asp His Val Lys His His Lys Pro Ala

130 135 140

Pro Asp Thr Phe Leu Leu Cys Ala Gln Arg Met Gly Val Gln Pro Thr

145 150 155 160

Gln Cys Val Val Phe Glu Asp Ala Asp Phe Gly Ile Gln Ala Ala Arg

165 170 175

Ala Ala Gly Met Asp Ala Val Asp Val Arg Leu Leu

180 185

<210> 8

<211> 2964

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 8

atgcaatctc aagattcatg ctacggtgtt gcattcagat ctatcatcac aaatgatgaa 60

gctttattca agaagaccat tcacttttat cacactctag gatttgcaac tgtgaaagat 120

ttcaacaaat tcaaacatgg tgaaaatagc ttactatctt cagggacttc ccaagattcc 180

ttgagagaag tttggttaga atctttcaag ttgagtgagg ttgatgcttc tgggttccgt 240

ataccacaac aagaagctac taacaaggct caaagtcaag gtgctctatt aaagattcgt 300

ttagtgatgt ctgctccaat cgatgaaact ttcgacacca acgaaaccgc cacaatcact 360

tatttctcta ctgatttgaa caagattgtc gagaaattcc caaaacaagc cgaaaaattg 420

tccgatacct tagtgttttt gaaagatcca atgggcaaca acatcacctt ctcaggctta 480

gctaatgcaa ccgattccgc tccaacttcc aaagatgctt tcttagaagc tacctccgaa 540

gacgaaatca tctctagagc ttcttccgat gcttctgact tactaagaca aacattgggc 600

tcttctcaaa agaagaagaa gattgctgtc atgacttctg gtggtgattc tccaggtatg 660

aatgccgctg ttcgtgccgt tgttcgtaca ggtatacatt tcggctgtga tgtttttgct 720

gtttacgaag gttacgaagg tttactaaga ggcggtaaat atttaaagaa aatggcttgg 780

gaagatgtca gaggttggtt aagtgaaggt ggtactttga ttggtactgc tcgttctatg 840

gaattcagaa agcgtgaggg tcgtagacaa gctgcaggca atttaatttc gcaaggtatt 900

gacgctttgg ttgtttgtgg tggtgatggt tctttaaccg gtgctgatct tttcagacac 960

gaatggccat ctttggttga tgaattggtt gcagaaggta gattcactaa agaagaagtc 1020

gccccataca agaatttgtc cattgttggt cttgtcggtt ccatcgataa tgatatgtct 1080

ggtactgact ctaccattgg tgcttattct gctttggaaa gaatctgtga aatggttgac 1140

tacattgatg ccaccgctaa atcccactcc cgtgcctttg ttgttgaagt tatgggtaga 1200

cattgtggtt ggttggcctt gatggctggt attgctaccg gtgccgatta cattttatt 1260

ccagaaagag ctgttcctca cggaaaatgg caggacgaat tgaaggaagt gtgccaaaga 1320

cacagaagta agggtagaag aaataacaca attattgtcg ctgaaggtgc tttagatgat 1380

caattaaacc ctgttactgc caatgacgtc aaagatgctt tgattgaatt gggtctagac 1440

accaaggtaa ccattctagg tcacgttcaa agaggtggta cagctgttgc tcatgacaga 1500

tggttagcta ctctacaagg tgtcgatgct gttaaggccg ttctggaatt tacccctgaa 1560

actccttctc cattaattgg tattttagaa aacaagataa ttagaatgcc attggttgaa 1620

tctgtgaagt tgactaaatc tgttgccact gccattgaaa acaaagattt cgataaggca 1680

atttctttaa gagacacaga atttattgaa ctttacgaaa acttcttatc cactaccgtt 1740

aaagatgatg gttccgaatt attgccagta tctgacagac taaacattgg tattgtccat 1800

gttggtgccc catctgctgc tttgaacgct gccacccgtg ccgcaactct atactgtttg 1860

tctcacggcc ataaaccata cgctatcatg aatggtttca gtggattgat tcaaaccggt 1920

gaagtgaagg aactatcatg gattgatgtc gaaaactggc ataacttggg tggttccgaa 1980

atcggtacga acagatctgt tgcttcagaa gatttgggta ccattgctta ctacttccaa 2040

aagaacaagc tagacggttt gattattctt ggtggttttg aaggtttcag gtccttgaag 2100

caattgcgtg acggtagaac ccaacaccca atctttaaca ttccaatgtg tttgattcca 2160

gccactgttt ctaacaacgt tccaggtact gaatactcac ttggtgttga tacctgtttg 2220

aacgcattag tcaattacac tgatgacatc aaacagagtg cttctgcgac aagaagaaga 2280

gtcttcgtct gtgaagtcca aggtggtcac tctggttaca tcgcttcttt cactggttta 2340

atcactggtg ctgtttcagt gtacactcca gaaaagaaga tcgacttagc ttctatcaga 2400

gaagatataa ctctattaaa agagaacttt cgtcacgaca aaggtgaaaa cagaaacggt 2460

aagctattgg ttagaaacga acaagcttct agcgtatata gcactcaatt gttggctgac 2520

atcatctctg aagcaagcaa gggtaagttt ggtgttagaa ctgctatccc aggccatgtt 2580

caacaaggtg gtgttccatc ttctaaagac cgtgtcaccg cttccagatt tgctgtcaaa 2640

tgtatcaagt ttatcgaaca atggaacaag aaaaatgaag cttctccaaa cactgacgct 2700

aaggttttga gattcaagtt cgatactcac ggtgaaaagg taccaactgt tgagcacgaa 2760

gatgactctg ctgctgttat ctgtgttaat ggttctcacg tttccttcaa gccaattgct 2820

aacctttggg aaaacgaaac caacgttgaa ttaagaaagg gttttgaagt tcactgggct 2880

gaatacaaca agattggtga catcctgtcc ggtagattaa agttgagagc tgaggtagcc 2940

gctttagccg ctgaaaacaa atga 2964

<210> 9

<211> 1503

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 9

atgtctagat tagaaagatt gacctcatta aacgttgttg ctggttctga cttgagaaga 60

acctccatca ttggtaccat cggtccaaag accaacaacc cagaaacctt ggttgctttg 120

agaaaggctg gtttgaacat tgtccgtatg aacttctctc acggttctta cgaataccac 180

aagtctgtca ttgacaacgc cagaaagtcc gaagaattgt acccaggtag accattggcc 240

attgctttgg acaccaaggg tccagaaatc agaactggta ccaccaccaa cgatgttgac 300

tacccaatcc caccaaacca cgaaatgatc ttcaccaccg atgacaagta cgctaaggct 360

tgtgacgaca agatcatgta cgttgactac aagaacatca ccaaggtcat ctccgctggt 420

agaatcatct acgttgatga tggtgttttg tctttccaag ttttggaagt cgttgacgac 480

aagactttga aggtcaaggc tttgaacgcc ggtaagatct gttcccacaa gggtgtcaac 540

ttaccaggta ccgatgtcga tttgccagct ttgtctgaaa aggacaagga agatttgaga 600

ttcggtgtca agaacggtgt ccacatggtc ttcgcttctt tcatcagaac cgccaacgat 660

gttttgacca tcagagaagt cttgggtgaa caaggtaagg acgtcaagat cattgtcaag 720

attgaaaacc aacaaggtgt taacaacttc gacgaaatct tgaaggtcac tgacggtgtt 780

atggttgcca gaggtgactt gggtattgaa atcccagccc cagaagtctt ggctgtccaa 840

aagaaattga ttgctaagtc taacttggct ggtaagccag ttatctgtgc tacccaaatg 900

ttggaatcca tgacttacaa cccaagacca accagagctg aagtttccga tgtcggtaac 960

gctatcttgg atggtgctga ctgtgttatg ttgtctggtg aaaccgccaa gggtaactac 1020

ccaatcaacg ccgttaccac tatggctgaa accgctgtca ttgctgaaca agctatcgct 1080

tacttgccaa actacgatga catgagaaac tgtactccaa agccaacctc caccaccgaa 1140

accgtcgctg cctccgctgt cgctgctgtt ttcgaacaaa aggccaaggc tatcattgtc 1200

ttgtccactt ccggtaccac cccaagattg gtttccaagt acagaccaaa ctgtccaatc 1260

atcttggtta ccagatgccc aagagctgct agattctctc acttgtacag aggtgtcttc 1320

ccattcgttt tcgaaaagga acctgtctct gactggactg atgatgttga agcccgtatc 1380

aacttcggta ttgaaaaggc taaggaattc ggtatcttga agaagggtga cacttacgtt 1440

tccatccaag gtttcaaggc cggtgctggt cactccaaca ctttgcaagt ctctaccgtt 1500

taa 1503

<210> 10

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA for binding ORF sequence of PFK1

<400> 10

caatctcaag attcatgcta 20

<210> 11

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA for binding upstream of PYK1

<400> 11

cagtagaaaa cactttgtga 20