



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0078124
(43) 공개일자 2013년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0146898

(22) 출원일자 2011년12월30일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

최원자

서울특별시 서대문구 대현동 11-1, 이화여자대학교 자연과학대학 생명과학전공

김완기

경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 의과학연구소 분자생물학실

(74) 대리인

양부현

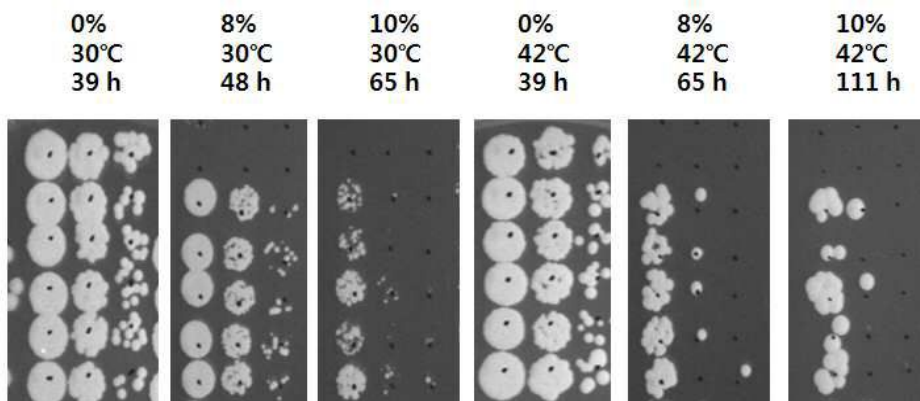
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 에탄올-저항성 효모 스트레인

(57) 요약

본 발명은 돌연변이(mutation)된 KmSPT15 유전자를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 스트레인 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 효모 스트레인은 고농도 에탄올, 바람직하게는 8-10% 에탄올에서 성장할 수 있는 산업적으로 유용한 효모 스트레인이다. 고농도의 에탄올에 내성을 보이는 스트레인을 발명함으로써 보다 효율적인 에탄올 생산에 유용하게 사용될 것이며, 또한 바이오에탄올 생산공정 시 발생하는 여러 스트레스에 저항성을 가진 고효율의 에탄올 생성능의 슈퍼스트레인으로서 실용성을 가질 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345072522

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망파이오니아사업

연구과제명 미생물 오닉스 융합기반 바이오에너지 생산 및 온실가스 저감 기술 개발 연구

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.07.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

돌연변이(mutation)된 KmSPT15 유전자를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 스트레인.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 돌연변이는 야생형 KmSPT15 유전자의 아미노산 서열에서 한 개 또는 두 개의 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 야생형 KmSPT15 유전자의 D147 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F175 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F148 및 G226 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 G226 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 또는 야생형 KmSPT15 유전자의 E122 및 L186 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하는 돌연변이된 KmSPT15 유전자인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 야생형 KmSPT15 유전자의 D147 위치의 아미노산 서열이 D147V로 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F175 위치의 아미노산 서열이 F175L로 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F148 및 G226 위치의 아미노산 서열이 F148S 및 G226V로 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 G226 위치의 아미노산 서열이 G226V로 돌연변이된 아미노산 서열; 또는 야생형 KmSPT15 유전자의 E122 및 L186 위치의 아미노산 서열이 E122D 및 L186H로 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하는 돌연변이된 KmSPT15 유전자인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 플라스미드로 효모 세포에 도입되는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 5-10% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 8-10% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.), 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 또는 산업적인 배수체(polyploid) 효모 스트레인인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 효모 스트레인은 클루이베로미세스 종인 것을 특징으로 하는 효모 스트레인.

청구항 10

제 1 항의 돌연변이된 KmSPT15 유전자가 삽입된 효모 스트레인을 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법.

청구항 11

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

청구항 12

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

청구항 13

서열목록 제1서열로 이루어진 뉴클레오타이드 서열.

청구항 14

제 13 항의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 효모 발현 벡터.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 에탄올-저항성 효모 스트레인에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 고온(항상 45℃ 이상)에서 가수분해 효소에 의해 단당 또는 이당으로 분해되는 전분 및 셀룰로오스 같은 폴리사카라이드로부터 바이오에탄올을 효율적으로 생산하기 위한 고온에서의 에탄올 발효 및 효소적 분해과정, 즉 동시 당화발효공정(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)은 매우 경제적으로 커다란 이점을 창출한다. 비록 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 글루코오스로부터 에탄올 발효를 위해 가장 널리 이용되는 미생물일 지라도, 고온에서 사카로마이세스 세레비지애는 대사 활성을 잃거나 또는 죽기 때문에 SSF를 위한 세포로 바람직하지 않다. 최근 십년 동안, 열 저항성(Winkler et al., 2002; Yamamoto et al., 2008; Auesukaree et al., 2009; Snober et al., 2009)을 책임지는 분자 인자들을 동정하고 증가된 온도에

서 성장하는 스트레인들을 개발 또는 선택(Shimoda et al., 2006; Araque et al., 2008; Shiet al., 2009; Hou, 2009)하기 위한 수많은 노력이 행해졌지만, 37℃ 이상에서 이상적인 수율의 에탄올을 생산할 수 있는 산업 스트레인들을 얻는 것은 아직까지 요원하다.

[0003] SSF에 적합한 열-저항성 *S. 세레비지애* 스트레인을 얻는 것이 현재까지 어렵다는 것을 고려해 볼 때, 에탄올을 생산할 수 있는 유전적으로 열-저항성 스트레인들의 에탄올 발효능을 개선하는 것이 또 다른 방법일 수 있다. 상기 열-저항성 스트레인은 낮은 온도에서 *S. 세레비지애*보다 더 낮은 에탄올 수율을 가지는 *클루이베로미세스 막시아누스(Kluyveromyces marxianus)* 및 한세놀라 폴리모파(*Hansenula polymorpha*)를 포함한다. 비록 *K. 막시아누스*의 에탄올 발효 능력이 *H. 폴리모파*의 그것보다 더 나은 것처럼 보여지지만, 상기 종들을 다루는 것은 세포 수준(예를 들어, 게놈 서플링 또는 진화적 적응)에서는 용이하지만 분자 수준에서는 (a) 이전에 개발된 분자 수단들 또는 스트레인들을 얻기 어렵고 ; 및 (b) 상세한 분자 정보의 부재 같은 어려움이 있다. 게놈 레벨에서 *K. 막시아누스*에 대한 정보는 아직까지 10년 이상 전에 공개된 전체 게놈 중 약 20%에 해당하는 게놈 서열에 의존하고 있다.

[0004] 낙농업계에서 이용되고 있는 효모(dairy yeast)인 *K. 막시아누스*는 자가수정(homothallic)이 가능한 자낭균계(hemiascomycetous) 효모로 알려져 있으며, 계통학적으로 *S. 세레비지애*와 관련되어 있고, 보다 잘-알려진 *클루이베로미세스 락티스(Kluyveromyces lactis)*(Lachance, 1998; Llorente et al., 2000)에 대한 자매종(sister species)이다. *K. 락티스* 및 *K. 막시아누스*의 주된 공통 특징은 탄소원으로 락토오스를 이용하는 능력이다. *K. 막시아누스*는 산업적으로 가장 널리 이용되고 있는데, 이는 상기 스트레인이 생물공학적 적용(biotechnology applications)을 위해 바람직한 특성들을 가지고 있기 때문이다: (a) 진행 미생물 중에서 가장 빠른 성장률; (b) 52℃까지 성장할 수 있는 능력을 가지는 열-저항성(thermotolerance); (c) 락토오스 및 인슐린 같은 다양한 종류의 당들을 동화할 수 있는 능력; (d) 용해 효소의 배출; 및 (e) 발효에 의한 에탄올의 생산(Fonseca et al., 2008). 생물공학적 적용을 위한 많은 유용한 특성들을 가졌음에도 불구하고, 바이오에탄올을 생산하는 것을 성공한 예는 낮은 에탄올 발효능으로 인해 제한적이었다.

[0005] 본 연구에서는, SSF에 적합한 고농도 에탄올 발효능을 가지는 스트레인들을 얻기 위한 첫 단계로서, 본 발명자들은 TATA 박스 결합 단백질을 인코딩하는 KmSPT15 유전자의 에러-유발 돌연변이유발법(mutagenesis)을 실시하여 증가된 에탄올 저항성을 가지는 *K. 막시아누스* 스트레인을 구축하고자 노력하였다. 상기 첫 2-글자의 접두어는 기원 종을 지시하는 데 이용되었다(예를 들어, *K. 막시아누스*, Km; *S. 세레비지애*, Sc; 및 *K. 락티스*, Kl).

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 산업적으로 유용한 에탄올-저항성 효모 스트레인을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 *클루이베로미세스* 종(*Kluyveromyces* spp.), 바람직하게는 *클루이베로미세스 막시아누스(Kluyveromyces marxianus)*에서 KmSPT15 유전자를 분리하고 이를 템플레이트로 PCR-매개된 임의적 돌연변이유발법(random mutagenesis)을 이용하여 얻어진 돌연변이된 KmSPT15를 효모에 형질전환시켜 산업적으로 유용한 에탄올-저항성 형질변형 효모 스트레인을 분리하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10% 에탄올)에서 성장할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 에탄올-저항성 형질변형 효모 스트레인을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 에탄올 생산방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 서열목록 제1서열로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 데 있다.

- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 효모 발현 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.
- 과제의 해결 수단**
- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 돌연변이(mutation)된 KmSPT15 유전자를 포함하는 에탄올-저항성 형질 변형 효모 스트레인을 제공한다.
- [0014] 본 발명자들은 산업적으로 유용한 에탄올-저항성 효모 스트레인을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 클루이베로미세스 중, 바람직하게는 클루이베로미세스 막시아누스에서 KmSPT15 유전자를 분리하고 이를 템플레이트로 PCR-매개된 임의적 돌연변이유발법을 이용하여 얻어진 돌연변이된 KmSPT15를 효모에 형질전환시켜 산업적으로 유용한 에탄올-저항성 형질변형 효모 스트레인을 분리하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10% 에탄올)에서 성장할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0015] 발화성, 휘발성 무색 액체인 에탄올은 가장 널리 이용되는 용매이다. 산업적으로, 에탄올은 자동차 연료 및 연료 첨가제로서 이용되며, 향수(scents), 향료(flavorings), 착색제(colorings) 및 의약품(medicines)으로도 이용된다. 또한, 에탄올은 알코올 음료 내 주요 정신활성 구성성분으로 중추신경계에 진정 효능을 가진다. 에탄올은 에틸렌의 수화를 통해 석유화학적으로 생산될 수 있으며, 효모를 이용하여 당을 발효시킴으로써 생물학적으로 생산될 수 있는데, 이러한 생물학적 생산은 석유 및 곡물 사료제의 가격에 의존적인 석유화학적 과정에 의한 생산보다 훨씬 경제적이다. 따라서, 생물학적 에탄올의 생산 과정을 위한 효모 스트레인의 개발은 매우 중요하다.
- [0016] 본 발명에 따르면, 본 발명은 효모에서 PCR에 의해 돌연변이 유발된 KmSPT15 유전자를 형질전환시킨 효모 스트레인들을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이는 야생형 KmSPT15 유전자의 아미노산 서열 내에 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하며, 보다 바람직하게는 한 개 내지 다섯 개의 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하고, 보다 더 바람직하게는 한 개 내지 두 개의 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하며, 가장 바람직하게는 서열목록 제8서열 내지 제12서열로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 야생형 KmSPT15 유전자의 D147 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F175 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F148 및 G226 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 G226 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열; 또는 야생형 KmSPT15 유전자의 E122 및 L186 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하는 돌연변이된 KmSPT15 유전자이다.
- [0019] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 야생형 KmSPT15 유전자의 D147 위치의 아미노산 서열이 D147V로 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F175 위치의 아미노산 서열이 F175L로 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 F148 및 G226 위치의 아미노산 서열이 F148S 및 G226V로 돌연변이된 아미노산 서열; 야생형 KmSPT15 유전자의 G226 위치의 아미노산 서열이 G226V로 돌연변이된 아미노산 서열; 또는 야생형 KmSPT15 유전자의 E122 및 L186 위치의 아미노산 서열이 E122D 및 L186H로 돌연변이된 아미노산 서열을 포함하는 돌연변이된 KmSPT15 유전자이다.
- [0020] 본 발명에 따르면, 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자, 바람직하게는 서열목록 제3서열 내지 제7서열로 이루어진 돌연변이된 KmSPT15 유전자로 형질전환된 효모 스트레인은 고농도 에탄올, 보다 바람직하게는 5-10% 에탄올, 보다 더 바람직하게는 7-10% 에탄올, 그리고 가장 바람직하게는 8-10% 에탄올에서 성장할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 플라스미드로 효모 세포에 도입될 수 있다. 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자는 효모 세포의 지놈(genomic) DNA에 도입될 수 있다.

- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자의 형질전환에 이용될 수 있는 효모 스트레인은 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.), 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 또는 산업적인 배수체(polyploid) 효모 스트레인을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자의 형질전환에 이용될 수 있는 효모 스트레인은 클루이베로미세스 종이며, 보다 더 바람직하게는 글루이베로미세스 막시아누스이고, 가장 바람직하게는 클루이베로미세스 막시아누스 NCYC 587이다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자 카피를 효모 스트레인에 도입하는 단계 및/또는 효모 세포의 지놈 DNA의 내인성 KmSPT15 유전자를 돌연변이시키는 단계를 포함하는 에탄올-저항성 효모 스트레인 제조방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자가 삽입된 효모 스트레인을 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 효모 발현 벡터를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 돌연변이된 KmSPT15 유전자로 형질전환된 효모 스트레인을 유효성분으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하고, 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 C6 당은 글루코오스를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명은 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 그의 전사체에 의해 감염된 세포 및 유전자 도입에 의한 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상술한 돌연변이된 KmSPT15 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 상술한 돌연변이된 KmSPT15 단백질에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 재조합 벡터는 서열목록 제8서열 내지 제12서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 및 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 원핵세포는 박테리아 세포 및 고세균을 포함하며, 진핵세포는 효모세포, 포유동물세포, 식물세포, 곤충세포, 줄기세포 및 곰팡이를 포함하고, 가장 바람직하게는 효모세포이다.
- [0031] 바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터는 (i) 상술한 본 발명의 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터를 포함하며, 보다 바람직하게는 (i) 상술한 본 발명의 서열목록 제8서열 내지 제12서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 동물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 재조합 발현벡터를 포함한다.
- [0032] 바람직하게는, 상술한 발현대상물질은 돌연변이된 KmSPT15 단백질, 보다 바람직하게는 서열목록 제8서열 내지 제12서열로 이루어진 돌연변이된 KmSPT15 단백질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 발현벡터에서 발현대상물질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

- [0034] 본 발명의 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lac* UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L 프로모터, p_R 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터, T7 프로모터, 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 숙주 세포는 *E. coli*이며, 가장 바람직하게는 *E. coli* DH5이다. 또한, 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024(1984)) 그리고 파아지 의 좌향 프로모터(p_L 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pRS316, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pH79, pUC19, pET 등), 파지(예: gt4B, -Charon, z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 재조합 벡터가 진핵세포, 바람직하게는 효모 세포에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 발현대상물질의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 효모 세포에서 유래된 프로모터, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, 효모(*S. cerevisiae*) GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터, 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 또는 AOX2 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아테노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림프톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 효모 GAPDH 프로모터이다.
- [0036] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).
- [0037] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법(Cohen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 발현대상물질-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 "프로모터-발현대상물질 인코딩 뉴클레오타이드 서열-폴리 아데닐화 서열"의 구조를 갖는다.
- [0039] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0040] 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 형질전환된 효모 세포의 제조는 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 리튬 아세테이트/DMSO 방법(Hill, J., et al., (1991), DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19, 5791.), 리포솜-매개 전이방법(Wong et al., 1980), 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, et al., (1990), *J. Reprod. Fert.* 41:173-182; Kopchick, et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In *Transgenic Animals*, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.* 16, 107-110) 등을 이용하여 실시한다.
- [0041] 한편, 본 발명의 발현대상물질 단백질을 유효성분으로써 유전자 도입에 이용하기 위해 발현대상물질 단백질이 효과적으로 세포 내로 침투할 수 있어야 한다. 예를 들어, 상술한 돌연변이된 KmSPT15 단백질을 유효성분으로 이용하는 경우, 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 돌연변이된 SPT15 단백질에 부착시키는 것이 바람직하다. 즉, 유효성분으로서 본 발명의 돌연변이된 KmSPT15 단백질을 세포 내로 도입(permeable peptide transduction)하기 위하여 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 상기

단백질과 융합하여 융합 단백질을 만든다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 라이신/아르기닌 등 기본 아미노산 잔기들을 주로 포함하고 있어서 이와 융합된 단백질들을 세포막을 투과하여 세포내로 침투시키는 역할을 한다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 바람직하게는 HIV-1 Tat 단백질, 드로소필라 안테나페디아의 homeodomain, HSV VP22 전사조절단백질, vFGF에서 유도된 MTS 펩타이드, 페넨트라틴, 트랜스포탄 또는 Pep-1 펩타이드에서 유래된 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 한편, 본 발명의 효모 스트레인은 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자의 대규모 동정에 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 동정은 (i) 본 발명의 형질전환된 효모 스트레인 및 형질전환되지 않은 정상 효모로부터 전사체 프로파일(transcriptome profiling)을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 전사체 프로파일을 비교/분석하는 단계를 실시함으로써, 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자를 대량으로 동정할 수 있다.

[0043] 상기 전사체 프로파일의 비교/분석에 있어서, 상기 정상 효모보다 상기 형질전환된 효모 스트레인에 혼성화 시그널이 1.5배 이상의 증가 배수(fold increase)로 검출되면 에탄올 저항성을 상향-조절하는 유전자로 판단되고, 상기 시그널이 1.5배 이상의 감소 배수(fold decrease)로 검출되면 에탄올 저항성을 하향-조절하는 유전자로 판단된다.

[0044] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 돌연변이된 KmSPT15 유전자로 형질전환된 효모 스트레인을 유효성분으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 전사체 프로파일은 마이크로어레이로 실시할 수 있다.

[0046] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로브"는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일체이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프로브는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(Egholm, *et al.*, *Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)되어 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 시료 DNA는 아미노알릴-dUTP가 삽입되어 합성되며, NHS-에스테르 Cy 다이로 표지되어 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 생시료는, 바람직하게는 효모 세포, 가장 바람직하게는 상술한 본 발명의 형질전환된 효모 세포이다. 프로브

대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수 있다.

[0050] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0051] 핵산 시료 또는 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P³² 및 S³⁵), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 증금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0052] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 핵산 시료 또는 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate) 등이다. 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명의 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자의 대규모 동정을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 상술한 본 발명의 효모 스트레인 및 정상 효모로부터 유래한 핵산 시료를 마이크로어레이 기판에 고정된 프로브와 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자 여부를 판단할 수 있다. 즉, 시료에서의 혼성화 시그널이 정상 시료(정상 세포)보다 1.5배 이상의 증가 배수로 검출되면 에탄올 저항성을 상향-조절하는 유전자로 판단되고, 상기 시그널이 1.5배 이상의 감소 배수로 검출되면 에탄올 저항성을 하향-조절하는 유전자로 판단된다.

[0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 마이크로어레이를 통해 검출된 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자의 발현량을 추가적으로 측정함으로써 재확인할 수 있다. 발현량의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Kaufma *et al.*, *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press) 또는 인 시투(*in situ*) 혼성화 반응(Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

[0054] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 본 발명의 형질전환된 효모 스트레인 및 형질전환되지 않은 정상 효모로부터 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 상술한 마이크로어레이 데이터와 비교함으로써 에탄올 저항성 및/또는 민감성 효모 유전자의 발현량 변화를 재검증한다.

발명의 효과

- [0055] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0056] (a) 본 발명은 돌연변이(mutation)된 KmSPT15 유전자를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 효모 스트레인 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [0057] (b) 본 발명의 효모 스트레인은 고농도 에탄올, 바람직하게는 8-10% 에탄올에서 성장할 수 있는 산업적으로 유용한 효모 스트레인이다.
- [0058] (c) 고농도의 에탄올에 내성을 보이는 스트레인을 발명함으로써 보다 효율적인 에탄올 생산에 유용하게 사용될 것이며, 또한 바이오에탄올 생산공정 시 발생하는 여러 스트레스에 저항성을 가진 고효율의 에탄올 생성능의 슈퍼스트레인으로서 실용성을 가질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 K. 막시아누스 SPT15 ORF의 뉴클레오타이드 서열(a) 및 아미노산 서열(b)을 보여주는 결과이다. K. 막시아누스 NCYC 587의 10-kb HindIII 게놈 DNA 단편의 시퀀싱 결과, KmSPT15의 전체 ORF를 포함하였으며, ScSPT15와 높은 상동성을 나타냈다.

도 2는 KmETS-1 내지 KmETS-5의 증가된 에탄올 저항성을 보여주는 결과이다. 세포들이 YPD+G418 또는 YPD 액체 배지에서 2.0의 OD600까지 배양하여 10배씩 연속적으로 희석시켰다. 지시된 농도의 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 분취액(5 μ l)을 스팟팅하여 적정 시간 동안 30°C 및 42°C에서 배양하였다. 테스트된 스트레인들은 순서적으로 위쪽부터 아래까지 NCYC 587(대조군) 및 KmETS-1 내지 KmETS-5였다.

도 3은 돌연변이된 KmSPT15 대립형질의 도식적으로 나타난 도면이다. 플라스미드들(pKmSPT15-M1 내지 pKmSPT15-M5)은 KmETS-1 내지 KmETS-5로부터 회수되어 시퀀싱하였다. 상기 pKmSPT15-M1 내지 pKmSPT15-M5의 유도된 아미노산 서열과 KmSPT15wt의 서열과의 비교를 통해, 점 돌연변이(화살표)의 위치를 나타냈다. 구조적 도메인의 맵핑은 이전에 공개된 문헌에 기초한다(Alper et al., 2006). 50개의 아미노산으로 이루어진 N-말단은 KmSPT15와 ScSPT15 간의 비-보존적 부위를 나타낸다.

도 4는 증가된 에탄올 저항성을 확인하는 스팟 어세이 결과이다. 상기 회수된 플라스미드들(pKmSPT15-M1 내지 pKmSPT15-M5)이 NCYC 587 스트레인에 재-형질전환되어 각각 r-KmETS-1 내지 r-KmETS-5를 생산하였다. 스팟 어세이는 도 1에서 실시된 바와 동일하게 실시하였다. 테스트된 스트레인들은 순서적으로 위쪽부터 아래까지 NCYC 587(대조군) 및 r-KmETS-1 내지 r-KmETS-5였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0061] 실시예

[0062] 실험재료 및 실험방법

[0063] 효모 스트레인 및 배지

- [0064] K. 막시아누스 NCYC587은 형질전환 수용체(transformation recipients)로 이용되었다. 효모 세포는 비-선택적 증식(propagation)을 위해 YPD(1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 글루코오스; 및 고형 플레이트를 이용하는 경우, 1.5% 아가 첨가)에서 30℃에서 배양하거나 또는 선택적 증식을 위해 G418(50 /ml)을 포함하는 YPD에서 배양하였다.
- [0065] **분자생물학적 방법**
- [0066] 플라스미드 제조, 클로닝, 서던 블랏팅 및 시퀀싱은 이전에 기술된 것과 동일하게 실시하였다(Sambrook J and Russell D, 2001). 대장균(*Escherichia coli*) 스트레인인 DH5는 플라스미드 제조를 위한 숙주로 이용하였다.
- [0067] **PCR(Polymerase chain reaction)**
- [0068] K. 막시아누스 계놈에서 KMSPT15 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다: 전-변성 단계, 95℃에서 5분; 한 사이클이 95℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 1분으로 이루어진 30 사이클; 및 추가 연장 단계, 72℃에서 5분. 필요하다면, PCR 산물들은 젤 용출로 정제하고 pGEM-T easy 벡터(Promega)로 클로닝한 후, 시퀀싱하였다.
- [0069] **KmSPT15 클로닝**
- [0070] NCYC 587로부터 얻어진 계놈 DNA를 HindIII로 절단한 후, 0.7% 아가로오스 젤에 전기영동하였다. 이후, 니트로셀룰로오스 막으로 옮기고 ³²P-표지된 ScSPT15로 프로빙되었다. 약 10 kb의 양성 단편이 TOPO-pCRII 벡터(Invitrogen)에 서브클로닝되어 pKmSPT15g 벡터를 제조하였다. 전체 삽입체의 서열이 분석되었으며, ScSPT15 유전자와 높은 상동성을 가지고 단백질을 인코딩하는 ORF(open reading frame)이 상기 계놈 단편에 존재하였다.
- [0071] **SPT15 돌연변이 라이브러리의 제조**
- [0072] KmSPT15의 ORF는 pKmSPT15g를 템플레이트로 Pfu DNA 폴리머라제로 증폭되었으며, 이때 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머(KmSPT15ORF-S; BamHI 위치 포함), 5'-GGATCCATGTCTGAAGATGATAGAATG-3'; 및 안티 센스 프라이머(KmSPT15ORF-AS; SalI 위치 포함), 5'-GTCGACTTATAATTTCTGAATTCCTCACTC-3'. 상기 PCR-증폭된 단편을 젤-정제하여 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하여 pT-KmSPT15를 제조하였다.
- [0073] KmSPT15 돌연변이 라이브러리는 템플레이트로 상기 pT-KmSPT15를 이용하고 상기 프라이머를 이용한 GeneMorph II 임의적 돌연변이유발 키트(Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제작하였다. PCR 산물들이 BamHI 및 SalI으로 절단하여 K. 막시아누스 발현벡터인 pKMEX14 벡터(대한민국 특허출원번호 제2011-0146746호)에 클로닝하였다. 상기 얻어진 플라스미드들을 *E. coli* DH5에 형질전환시켜 30℃에서 배양하였는데, 이는 성장이 빠른 세포들의 과다성장을 억제하기 위한 조건이었다. 그 결과, 1×10^6 의 총 콜로니 수를 가지는 KmSPT15 돌연변이체들에 대한 1차 라이브러리를 제조하였다. 임의적으로 20개의 콜로니를 선택하여 시퀀싱한 결과, 분자-기반된 돌연변이율이 약 85%에 이른다는 것을 확인하였다. 20개 중 17개의 콜로니에서 발견된 돌연변이는 하나 이상의 염기 위치, 대부분 3-5개의 염기 위치(나머지는 야생형과 동일)에서 발견되었다. 상기 야생형 플라스미드들 중 하나는 이후 대조군 벡터(pKMEX14-SPT15wt)로 이용하였다.
- [0074] 증폭 및 대규모 정제를 통해, 라이브러리 플라스미드(500 μ g)는 K. 막시아누스 NCYC 587에 형질전환되어 고형 YPD+G418 플레이트에서 25℃(성장이 빠른 세포들의 과다성장을 억제하기 위한 조건)로 배양하였다. 총 효모 콜로니의 수는 약 4×10^3 CFU(colony forming units)/ μ g DNA의 형질전환 효율에 따라 약 2×10^6 였다. 모든 콜로니들이 15 ml YPD-G418로 상기 플레이트 표면을 긁어서 수거하여, KmSPT15 돌연변이체들에 대한 효모 라이브러리를 제조하였다.
- [0075] **효모 형질전환**

- [0076] 효모 형질전환을 위한 모든 플라스미드들은 RNA 절단 없이 수작업으로 제조되었다. DNA 농도는 알려진 농도의 대조군 DNA의 밴드 강도와 비교함으로써 대략적으로 측정하였다. DNAs 및 RNAs의 혼합물이 이전에 기재된 바와 같이 효모 형질전환에 이용하였다(Gietz et al., 2002).
- [0077] 에탄올 민감성을 위한 스팟 어세이
- [0078] 스팟 어세이를 위해, 2.0의 광학밀도(OD₆₀₀)까지 성장한 세포의 분취액(aliquots; 5 μ l)이 10배씩 연속적으로 희석되어 8% 또는 10% 에탄올을 포함하는 고형 YPD 플레이트에 스팟팅되었다. 상기 플레이트들이 적정 시간 동안 30°C 또는 42°C에서 배양되었다.
- [0079] 실험결과
- [0080] KmSPT5의 동정
- [0081] ScSPT15와 혼성화된 K. 막시아누스 NCYC 587의 10 kb-길이 HindIII 게놈 DNA 단편에 대한 시퀀싱을 통해, KmSPT15의 전체 ORF가 동정되었다(도 1). KmSPT15는 233개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하고, K1SPT15(*Kluyveromyces lactis* SPT15)와 9개의 아미노산(대부분의 아미노산이 비-보존적인 N-말단에 위치)이 다르다(결과를 보이지 않음).
- [0082] 에탄올-저항성 스트레인의 개발
- [0083] KmSPT15 돌연변이 라이브러리를 이용하여 에탄올-저항성 스트레인을 동정하기 위해, 1×10^6 CFU의 효모가 에탄올을 포함하지 않거나 또는 8% 또는 10% 에탄올을 포함하는 고형 YPD 플레이트에 각각 플레이트되었다. NCYC 587 스트레인은 상기 8% 또는 10% 에탄올을 포함하는 고형 YPD 플레이트에서 지속적인 배양에서조차 성장할 수 없다(도 2). 42°C에서 3일 동안 배양한 후, 31개의 콜로니들이 성장하였다. 상기 콜로니들의 에탄올-저항성이 8% 또는 10% 에탄올-포함 고형 YPD 플레이트에서 스팟 어세이를 통해 조사되었다. 그 결과, 5개의 에탄올-저항성 스트레인들(KmETS-1 내지 KmETS-5)이 분리되었다. 상기 5개의 스트레인들은 8% 및 10% 에탄올에 저항성을 나타낸 반면에, 대조군은 저항성을 보이지 않았다(도 2).
- [0084] 상기 증가된 에탄올 저항성이 돌연변이된 SPT15의 존재에 의해 부여되는 지 여부를 확인하기 위해, KmETS-1 내지 KmETS-5로부터 플라스미드를 회수하였다(각각, pKmSPT15-M1, -M2, -M3, -M4 및 M5). 각 SPT15 대립형질의 시퀀싱을 통해, 돌연변이 위치는 다음과 같다: (a) KmSPT15-M1의 경우, KmSPT15 ORF:D147V; (b) KmSPT15-M2의 경우, KmSPT15 ORF:F170L; (c) KmSPT15-M3의 경우, KmSPT15 ORF:F148S 및 G226V; (d) KmSPT15-M4의 경우, KmSPT15 ORF:G226V; 및 (e) KmSPT15-M5의 경우, KmSPT15 ORF:E122D 및 L186H(도 3). 각 플라스미드를 NCYC 587 스트레인에 재-도입하여 r-KmETS-1 내지 rKmETS-5를 제조하였다. 이후, 8% 또는 10% 에탄올-포함 고형 YPD 플레이트에서 스팟 어세이를 실시한 결과, 모든 재-도입된 스트레인들은 상기 KmETS-1 내지 KmETS-5 스트레인에서처럼 유사한 정도의 에탄올 저항성을 나타냈다(도 4).
- [0085] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0086] 참고문헌
- [0087] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. 2006.Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. Science 314:1565-1568.
- [0088] AuesukareeC, DamnernsawadA, KruatrachueM, PokethitiyookP, BoonchirdC, KanekoY,HarashimaS. 2009. Genome-wide identification of genes involved in toleranceto various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Genet 50, 301310.

- [0089] Araque E, Parra C, Rodriguez M, Freer J, Baeza J. 2008. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb Technol* 43, 120123.
- [0090] Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 339354.
- [0091] Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- [0092] Hou L. 2009. Novel methods of genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 31, 671677.
- [0093] Lachance MA. 1998. *Kluyveromyces van der Walt* emend. *vanderWalt*. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 227247.
- [0094] Llorente B, Malpertuy A, Blandin G, Artiguenave F, Wincker P, Dujon B. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Lett* 487, 7175.
- [0095] Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- [0096] Shi D, Wang C, Wang K. 2009. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 139147.
- [0097] Shimoda C, Itadani A, Sugino A, Furusawa M. 2006. Isolation of thermotolerant mutants by using proofreading deficient DNA polymerase as an effective mutator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* 81, 391397.
- [0098] Winkler A, Arkind C, Mattison C P, Burkholder A, Knoche K, Ota I. 2002. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* 1, 163173.
- [0099] Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, Sakurai H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 17, 783790.
- [0100] Snober SM, Fiedler D, Cashikar AG. 2009. Ssd1 is required for thermotolerance and Hsp104-mediated protein disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 29, 187200.

도면

도면1

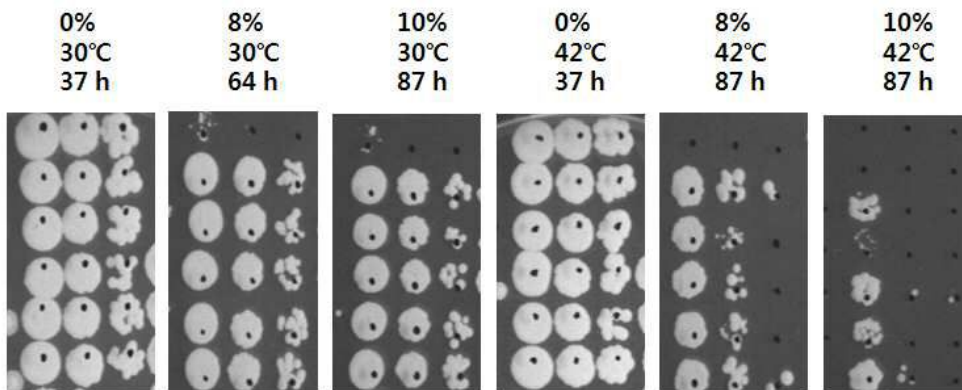
a

ATGTCTGAAGATGATAGAATGAAGCAGTTCCAACAGGAAAACAAGATAGT
GTTTGATCCTAGCACGCGGTCTGTTTGGGAAAGTCAGGAGAAGAGAGAGC
ATGAGTCTTTACCAGGGACCGATGCCAATGCAGACGAAGGAGAGAAGGGA
TCAGCTACATCGGGAATCATACCTACTCTACAGAATATTGTTGCGACAGT
AAACTTGGACTGTAGGTTAGACTTAAAGACTGTAGCGCTACACGCACGTA
ACGCTGAATACAATCCTAAACGTTTTGCAGCTGTTATCATGCGTATTAGA
GAACCAAAAACAACCTGCCCTAATCTTCGCATCTGGTAAGATGGTTGTTAC
GGGTGCTAAAAGTGAAGATGACTCGAAGTTGGCTAGTAGAAAAGTATGCGA
GAATTATTCAAAAGATTGGGTTTCAGTGCCAAATTCACAGATTTCAAGATT
CAGAATATCGTCGGGTCTGTGATGTGAAGTTCCTATTTCGTTTAGAAGG
TTTGGCATTTAGTCACGGTACTTTCTCGTCATATGAACCAGAACTTTTCC
CAGGTCTTATCTATAGAATGGTGAAGCCCAAGATCGTGTTACTAATTTTC
GTCTCGGGAAAAATTGTGTTGACAGGTGCCAAACAAAGAGAAGAAAATCTA
TCAAGCGTTTCGAGGCTATCTATCCTGGGTTGAGTGAATTCAGAAAATTAT
AA

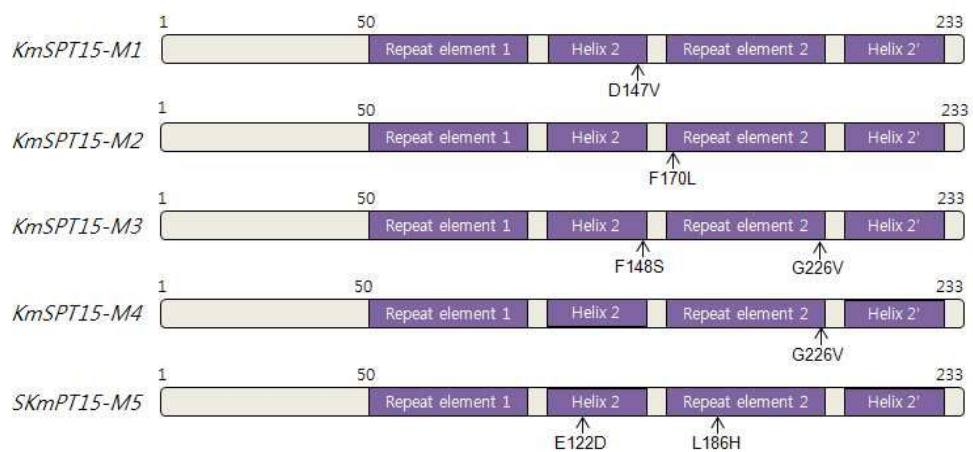
b

M S E D D R M K Q F Q Q E N K I V F D P S T R S V
W E S Q E K R E H E S L P G T D A N A D E G E K G
S A T S G I I P T L Q N I V A T V N L D C R L D L
K T V A L H A R N A E Y N P K R F A A V I M R I R
E P K T T A L I F A S G K M V V T G A K S E D D S
K L A S R K Y A R I I Q K I G F S A K F T D F K I
Q N I V G S C D V K F P I R L E G L A F S H G T F
S S Y E P E L F P G L I Y R M V K P K I V L L I F
V S G K I V L T G A K Q R E E I Y Q A F E A I Y P
V L S E F R K L

도면2



도면3



도면4

