(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 5 월 27 일 (27.05.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/100980 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/79 (2006.01) *A23K 20/147* (2016.01)
A23K 10/16 (2016.01) *A23K 50/80* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/004280

(22) 국제출원일: 2020 년 3 월 30 일 (30.03.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0149259 2019 년 11 월 20 일 (20.11.2019) KR

(71) 출원인: 부경대학교 산학협력단 (**PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 48547 부산시 남구 신선로 365, Busan (KR).

(72) 발명자: **최태진 (CHOI, Tae-Jin)**; 48516 부산시 남구 분포로 111, 139동 601호, Busan (KR). **김민정 (KIM, Min-Jeong)**; 48033 부산시 해운대구 선수촌로208번길 112, Busan (KR). **문다예 (MOON, Da-Yea)**; 38840 경상북도 영천시 오수5길 78, Gyeongsangbuk-do (KR). **김예린 (KIM, Ye-Lin)**; 50303 경상남도 창녕군 유어면 승계새마길 88, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

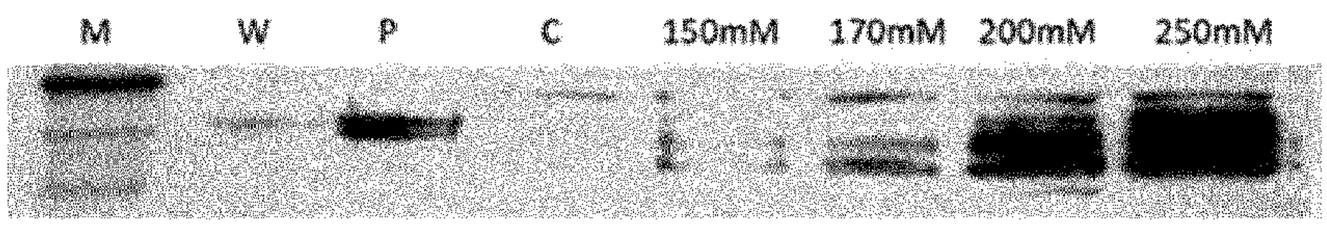
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

WO 2021/100980 A1

(54) **Title:** CHLORELLA VULGARIS-DERIVED SALT-INDUCIBLE PROMOTER AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 클로렐라 불가리스 유래의 염 유도성 프로모터 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a *Chlorella vulgaris*-derived salt-inducible promoter comprising the base sequence represented by SEQ ID NO: 1 and a use thereof. The promoter according to the present invention can be usefully employed such as in recombinant protein production using microalgae.

(57) **요약서:** 본 발명은 서열번호 1 의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) 유래의 염(salt) 유도성 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터는 미세조류를 이용한 재조합 단백질 생산 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 클로렐라 불가리스 유래의 염 유도성 프로모터 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 클로렐라 불가리스 유래의 염 유도성 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 미세조류는 박테리아, 고등 식물 반응기 시스템과 같이 산업과 제약 분야에서 중요한 가치를 갖는 유용 단백질의 생산을 위한 외래 유전자 발현 도구로 사용될 수 있다. 클로렐라는 다양한 배양 조건에 쉽게 적응하고 빠르게 성장하며 지질, 단백질을 포함한 다량의 영양소와 비타민을 함유하는 단세포 녹조류이다. 클로렐라의 장점은 번역 후 변형으로 백신 항원 및 기능성 단백질과 같이 잘 접힌 단백질을 생산하는 플랫폼으로 이용가능하다는 것이다. 그리고 값비싼 포유류 세포 배양과는 달리 복잡한 단백질을 생산하는데 드는 비용이 저렴하고 단백질을 생산하고 축적하는데 시간이 짧다는 장점을 갖고 있다. 영양 부족, 고염, 고온 등과 같은 스트레스 조건 하에서 배양된 미세조류는 여러 이차 대사 산물과 함께 지질 또는 탄수화물, 단백질을 상당량 축적한다. 또한, 스트레스 조건 하에서 배양된 일부 미세조류 종은 지질, 탄수화물과 함께 특정 2차 대사 산물(예컨대, 안료, 비타민 등)이 함께 축적되어 화장품, 식품 또는 제약 부문에 유용하게 이용될 수 있다.

[3] 전사 조절은 세포 과정에서 유전자 발현의 적절한 조절이 필수이다. 프로모터는 유전자의 암호화 서열의 상류에 위치한 DNA 서열의 영역으로, 진핵 생물의 프로모터는 TATA 박스 영역으로 공통염기서열을 포함한다. 식물 형질전환에 주로 사용되는 프로모터는 식물바이러스에서 분리한 꽃양배추모자이크바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터이다. 이 프로모터는 식물 내에서 안정성을 가지고 외래 유전자를 과발현시키는 장점을 가지고 있다. 그러나 식물에서와 달리 미세조류인 클로렐라에서는 35S 프로모터를 이용한 외래 유전자의 발현 효율이 낮다. 따라서, 클로렐라에서 외래 유전자의 발현을 높이기 위한 프로모터를 스크리닝하기 위한 연구가 필요한 상황이다.

[4] 클로렐라 불가리스의 유전자 발현에서 염 스트레스가 미치는 영향에 대한 제한된 연구가 진행되어왔지만 클로렐라 불가리스의 전사체 정보 부족으로, 스트레스 신호 전달 경로 및 하류 유전자에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 본 발명에서는 클로렐라 불가리스를 1% 또는 3%의 염화나트륨 조건에서 2시간과 4시간 동안 배양한 후, RNA-seq 기술을 시용하여 염 스트레스에 따른 유전자 발현 영향을 조사하고, 염 스트레스 조건 하에서 발현이 상향 조절된 유전자의

프로모터를 이용하여 클로렐라의 외래 유전자 발현 시스템에 적용하고자 하였다.

[5] 한편, 한국등록특허 제0788465호에는 '한국에서 분리한 클로렐라 바이러스 에스에스-2 유래 초기발현 유전자 프로모터 및 그 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제2010246호에는 '미세조류 에틀리아 유래의 프로모터 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 클로렐라 불가리스 유래의 염 유도성 프로모터 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 1% 또는 3%의 염을 포함하는 배지에서 배양한 클로렐라 불가리스 균주의 전사체를 분석하여 염 스트레스 조건에서 상향 조절되는 후보 유전자를 선발하였고, 공지된 프로그램을 통해 후보 유전자의 프로모터 서열을 추론하였다. 그 후 상기 도출된 프로모터 서열 및 상기 프로모터 서열 하류에 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 조합한 재조합 벡터를 제작하고 이를 클로렐라에 형질전환한 결과, 염 유도성 프로모터 하류에 연결된 외래 단백질이 염 스트레스 조건 하에서 강하게 발현이 유도되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[7] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) 유래의 염(salt) 유도성 프로모터를 제공한다.

[8] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합된 벡터로 미세조류를 형질전환시키는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 염 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류의 제조방법을 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 염 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류를 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 미세조류의 배양액을 유효성분으로 포함하는 어류용 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[13] 본 발명에 따른 클로렐라 유래의 신규 프로모터는 염 스트레스 조건에서 프로모터 하류에 연결된 외래 단백질 코딩 유전자의 발현을 강하게 유도하는 특성이 있으며, 내인성 프로모터로 미세조류가 자체적으로 가지는 전사 인자 등이 작동가능하여 외인성 프로모터에 비해 더욱 효과적인 전사가 이루어질 수

있는 장점이 있다. 또한, 염 처리에 의한 발현 유도 전에는 외래 단백질의 발현량이 적어 형질전환체의 성장이 억제되지 않기 때문에 형질전환체를 충분히 배양한 후 외래 단백질의 발현을 유도함으로써 외래 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있는 특성이 있어, 미세조류를 이용한 재조합 단백질 생산 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 또한, 외래 단백질로 어류 병원성 미생물 또는 바이러스 유래의 항원 단백질을 선택할 경우, 상기 항원 단백질을 발현하는 미세조류 배양액을 그대로, 혹은 건조 또는 분말화하여 백신 보조제 또는 사료 첨가제로 사용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 1% 또는 3% 염화나트륨을 함유하는 배지에서 2시간 또는 4시간 동안 배양된 클로렐라 불가리스의 전사체에서 상향- 또는 하향-조절된 유전자의 수를 보여준다.

[15] 도 2는 염 스트레스 조건 하에서 DEG(Differentially Expressed Genes)를 분석한 Heat map이다.

[16] 도 3은 염 유도성 프로모터를 찾기 위해 염 스트레스 조건에서 상향 조절된 5개의 후보 유전자의 RT-PCR 결과이다. 레인 1: 100bp size marker, 레인 2~6: Gene 1~5, 레인 7: 양성 대조군(18S rRNA), 레인 8: 음성 대조군.

[17] 도 4는 Gene 2 유전자 프로모터의 cis-acting elements 분석 결과이다.

[18] 도 5는 염 유도성 프로모터를 포함하는 클로렐라 불가리스 형질전환용 벡터의 맵이다.

[19] 도 6은 클로렐라 불가리스 형질전환체에서 VHSV G 유전자(A) 및 SIP(salt-inducing promoter) 서열(B) 존재 유무를 PCR로 검정한 결과이다.

[20] 도 7은 클로렐라 불가리스 형질전환체(S2, S9 및 S12)의 단백질을 추출하여 anti-VHSV G 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다.

[21] 도 8은 염 유도성 프로모터(SIP) 하류에 VHSV G 단백질 코딩 서열이 연결된 재조합 벡터로 형질전환되어 VHSV G 단백질을 발현하는 형질전환 클로렐라에서 단시간 동안 염화나트륨을 처리하고 VHSV G 단백질 발현량을 보여주는 웨스턴 블랏 결과로, 위쪽 밴드는 VHSV G 단백질의 당화(glycosylation)된 형태, 아래쪽 밴드는 당화지되 않은 형태를 나타낸다. M: Protein marker, P: 양성 대조군(순수분리된 VHSV G 단백질), C: 염화나트륨을 처리하지 않은 형질전환 클로렐라, W: 야생형 클로렐라, 150mM-500mM: 염화나트륨을 처리한 형질전환 클로렐라.

[22] 도 9는 염 유도성 프로모터(SIP) 하류에 VHSV G 단백질 코딩 서열이 연결된 재조합 벡터로 형질전환되어 VHSV G 단백질을 발현하는 형질전환 클로렐라에서 장시간 동안 염화나트륨을 처리하고 VHSV G 단백질 발현량을 보여주는 웨스턴 블랏 결과이다. M: Protein marker, P: 양성 대조군(순수분리된 VHSV G 단백질), C: 염화나트륨을 처리하지 않은 형질전환 클로렐라, W: 야생형

클로렐라, 150mM-250mM: 염화나트륨을 처리한 형질전환 클로렐라.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) 유래의 염(salt) 유도성 프로모터를 제공한다.

[24] 본 발명에 따른 염 유도성 프로모터는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)에서 분리된 것으로, 염 스트레스 조건에서 발현이 상향 조절되는 hypothetical protein 코딩 유전자로의 상류(upstream) 지역에서 유래한 것으로, 상기 hypothetical protein 코딩 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[25] 또한, 본 발명은 상기 염 유도성 프로모터 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열이다. 구체적으로, 상기 프로모터는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[26] 프로모터(promoter)는 구조유전자(gene)의 상부 쪽에 연결되어 있는 유전체(genome) 부위로서, 이에 연결된 구조유전자가 mRNA로 전사(transcription)되도록 조절하는 역할을 한다. 프로모터에는 여러 일반전사인자(general transcription factor)들이 결합함으로써 활성화(activation)되는데, 보편적으로 유전자 발현을 조절하는 TATA box, CAT box 등의 염기서열을 가지고 있다. 생체의 기본대사에 필요한 단백질들은 세포 내에서 일정 농도를 유지하여야 하므로 이들의 유전자에 연결된 프로모터는 일반전사인자의 작용만으로도 항시 활성화되어 있다. 이에 반하여 평시에는 역할이 없고 특수한 상황 하에서만 기능이 요구되는 단백질들은 해당 구조유전자의 발현을 유도하는 유도성 프로모터(inducible promoter)가 연결되어 있다. 즉 유도성 프로모터에는 생물체의 발달과정에서, 또는 주변으로부터의 환경적 요인에서 오는 외부 자극에 의해 활성화된 특이 전사인자(specific transcription factor)가 결합함으로써 활성화된다. 일반적으로 프로모터는 RNA 중합효소가 결합하여 전사개시를 유도하는 부분을 포함하며 프로모터의 염기서열에 따라 RNA 합성 정도가 결정되기 때문에 프로모터에 따라 유전자의 발현 강도가 다를 수 있다.

[27] 본 발명은 또한, 상기 염 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[28] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 미세조류용 발현 벡터일 수 있으나,

이에 제한되지 않는다. 발현벡터는 통상적으로 전사를 가능하게 하는 프로모터, 목적 단백질을 발현하는 유전자, 미생물 내에서 자기 복제하여 증폭할 수 있는 유전자 및 목적하는 벡터를 선별하기 위한 항생물질의 선택마커 유전자가 최소한 필요하며, 목적 유전자를 제외한 상기 유전자들은 벡터의 백본(backbone) 및 선택된 숙주에 따라 달라질 수 있다. 벡터 제작에 있어서 상기 최소한으로 필요한 유전자들은 당업자에게는 널리 알려져 있으며, 유전자 발현 조건 및 목적에 따라 용이하게 선택할 수 있다.

[29] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터는 본 발명에 따른 염 유도성 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있다. 본 발명에서, "작동가능하게 연결된"은 이종 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트의 성분을 말한다. 예를 들면, 단백질을 코딩하는 이종 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이종 DNA에 해당하는 기능적 mRNA의 생산을 촉진한다.

[30] 상기 '목적 단백질' 또는 '외래 단백질'은 상기 단백질을 발현하는 형질전환된 숙주세포에서는 정상적으로는 존재할 수 없는 단백질을 의미한다. 상기 목적 단백질은 모든 종류의 단백질일 수 있으며, 예컨대 효소, 호르몬, 항체, 사이토카인 등의 의학적 활용성이 있거나, 어류를 포함한 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 영양성분을 다량 축적할 수 있는 단백질 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[31] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합된 벡터로 미세조류를 형질전환시키는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 염 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류의 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 목적 단백질이 염 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류를 제공한다.

[32] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 재조합 벡터를 미세조류에 형질전환한 다음, 당업계에 알려진 통상의 기술을 사용하여 형질전환체만을 선별할 수 있는 항생물질을 포함하는 미세조류의 생장에 적합한 선택배지를 사용하여 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현할 수 있는 재조합 벡터를 함유하는 형질전환체를 선별할 수 있다. 재조합 벡터를 미세조류에 형질전환시키는 방법은 당업계에 공지된 기술을 이용할 수 있다.

[33] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 미세조류는 클로렐라(*Chlorella*), 세네데스무스(*Scenedesmus*), 두날리엘라(*Dunaliella*), 스피룰리나(*Spirulina*) 및 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 클로렐라(Chlorella)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 클로렐라는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 엘립소이데아(*C. ellipsoidea*), 클로렐라 피레노이도사(*C. pyrenoidosa*) 또는 클로렐라 레귤라리스(*C. regularis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 본 발명에 따른 형질전환 미세조류는 염 처리 조건에서 목적 단백질의 발현이

증가되는 것을 특징으로 한다.

[35] 본 발명은 또한, 상기 형질전환 미세조류의 배양액을 유효성분으로 포함하는 어류용 사료 첨가제를 제공한다. 본 발명의 형질전환용 미세조류는 그 자체가 어류의 사료 보조제 소재로 활용될 수 있으며, 목적 단백질로 어류 병원체의 단백질을 발현시킬 경우 면역증강용 사료 첨가제로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[36] 본 발명의 사료첨가제에는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들면 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병 예방제와 같은 첨가제가 추가로 포함될 수 있다.

[37] 본 발명의 사료첨가제는 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[38] 본 발명의 사료첨가제는 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 리파제와 같은 지방 분해효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코겐 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α-1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.

[39] 본 발명의 사료첨가제는 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

[40] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 염 유도성 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[41] 본 발명의 단백질을 생산하는 방법은 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포(형질전환체)를 공지된 기술을 이용하여 재조합 단백질의 생산에 적합한 배지에서 배양하는 것일 수 있다. 예를 들어, 세포들은 적합한 배지와 단백질이 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 쉐이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지기술을 사용하여 탄소, 질소원 및 무기염을

포함하는 적합한 배지에서 일어난다. 적합한 배지는 상업적으로 입수하거나 예를 들면, ATCC(American Type Culture Collection)의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있다.

[42] 본 발명의 일 구현 예에 따른 목적 단백질 생산 방법에 있어서, 상기 배양은 염 유도성 프로모터 하류에 연결된 목적 단백질의 발현 유도를 위해 배양 배지에 염(salt)을 처리하는 것을 특징으로 한다.

[43] 또한, 상기 생산방법에서는 발현된 단백질을 당업계에 공지된 단백질 분리방법을 이용하여 회수할 수 있다. 예를 들어 단백질은 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 영양배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[44]

[45] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] **재료 및 방법**

[48] **1. 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) PKVL7422 배양 조건 및 RNA 분리**

[49] 본 발명자는 *C. vulgaris* Pukyong Virus Laboratory 7422로 명명되는 클로렐라 불가리스를 획득하였다. 이 조류는 빠른 성장과 쉬운 배양 및 암(dark) 조건에서 잘 자라는 특성을 가지고 있다. 클로렐라 불가리스 PKVL7422는 52 μmol photons/m ^{2}/s의 광원 및 BG-11 배지에서 20℃로 배양하였다. 세포를 다양한 농도의 염화나트륨으로 다양한 기간 배양시켰다. 구체적으로, 염화나트륨을 포함하지 않는 대조군, 1% 염화나트륨을 함유하는 BG-11 배지, 또는 3% 염화나트륨을 함유하는 BG-11 배지에서 2시간 또는 4시간 동안 배양시켰다.

[50]

[표1]

BG-11 배지 조성

BG-11			
#	Component	Stock solution (g/L)	Addition per 1Litre culture medium
Stock 1	Na_2MG EDTA	1g	1ml
	Ferric ammonium citrate	6g	
	Citric acid • $1H_2O$	6g	
	$CaCl2 • 2H_2O$	36g	
Stock 2	$Mg SO_4 • 7H_2O$	75g	1ml
Stock 3	$K_2HPO_4 • 3H_2O$	40g	1ml
Stock 4	Na_2CO_3	19.07g	1ml
Stock 5	H_3BO_3	2.86g	1ml
	$MnCl_2 • 4H_2O$	1.81g	
	$ZnSo_4 • 7H_2O$	0.222g	
	$CuSO_4 • 5H_2O$	0.079g	
	$COCl_2 • 6H_2O$	0.05g	
	$NaMoO_4 • 2H_2O$	0.391g	
Nitrogen Source	$NaNO_3$	-	1.5g
Carbone Source	Glucose	-	5g
Chlorate Source	-	-	-

[51] 이어, 이들 배양액을 4℃에서 30분 동안 3,500 rpm으로 원심분리하여 세포만을 수득하였다. 그 후 제조업체의 지침에 따라 TRIzol 시약을 사용하여 회수한 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 TURBO™ DNase 키트 (Invitrogen)를 사용하여 게놈 DNA를 제거하였다. RNA 농도 및 완전성은 Nano Drop Fluorometer 및 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

[52]

[53] **2. 라이브러리 구축 및 시퀀싱**

[54] cDNA 라이브러리의 구축을 위해 제조사의 지침에 따라 TruSeq 가닥 mRNA 샘플 준비 키트 (Illumina)를 사용하여 1,000 ng의 RNA를 cDNA로 전환시켰다. 마그네틱 비드를 사용하여 폴리(A) tail에 기초하여 폴리아데닐화 된 RNA의 선택 및 정제를 수행하였다. 이어서, 랜덤 헥사머(hexamer) 프라이머와 역전사효소를 사용하여 mRNA의 단편화 및 역전사를 진행하였다. Actinomycin

D를 사용하여 DNA-의존적 합성을 억제하였다. 이중 가닥 cDNA의 합성은 RNA 주형을 제거하고, 두 번째 가닥을 합성하고, dTTP 대신에 dUTP를 도입하여 cDNA를 블런트 말단으로 제작하였다. cDNA는 여러 어댑터에 의해 연결되었다. 마지막으로, 전사체 서열 분석을 Illumina HiSeq 4000 플랫폼을 사용하여 수행하여 길이가 100bp인 paired-end 서열을 생성하였다.

[55]

[56] **3. 전처리, 조립 및 분석**

[57] 먼저 원시 데이터를 FastQC를 사용하여 품질을 확인한 다음, Trimmomatic을 사용하여 저품질 데이터와 어댑터 서열을 제거하기위해 원시 데이터를 전처리하였다. QC 점수가 ≥ 30인 데이터를 분석하고 HISAT v2.0.5를 사용하여 클로렐라 불가리스 UTEX 395 게놈에 정렬하였다(Kim D. et al., 2015, Nat methods, 12(4): 357-360). 클로렐라 불가리스 UTEX 395의 참조 게놈은 NCBI 데이터베이스에서 다운로드하였다. 스크립트는 클로렐라 불가리스 UTEX 395의 게놈에 정렬되었고, 매핑된 판독만이 추가 분석에 제출되었다. 전사체는 기본 매개 변수를 Trinity를 사용하여 조립한 다음, 컷오프 E 값이 $\leq 10^{-5}$인 BLASTX 도구를 사용하여 NCBI 비중복 (nr) 데이터베이스에 대해 쿼리하였다. 최고 데이터가 매핑되고 주석이 달리면 관련된 기능은 Blast2GO를 사용하여 분석하였다. KEGG pathway를 이용하여 유전자 서열을 분석하였다.

[58]

[59] **4. 유전자 발현의 차이 비교**

[60] 처리된 그룹에서의 다양한 전사체의 발현 수준을 FPKM 값(Fragments per kilobase per millions mapped reads)에 기초하여 RSEM 1.2.15 툴을 사용하여 대조군과 비교하였다. FPKM이 0인 전사체를 제거하고, 양자 이외의 정규화 방법을 사용하여 0 이외의 FPKM 값을 로그 변환하고 정규화 하였다. 전사체 발현은 대조군과 처리군 사이의 배수 변화에 기초하여 계산되었고, 디폴트 컷오프는 ±2로 하였다.

[61]

[62] **5. RNA 추출 및 cDNA 합성**

[63] 염 유도성 프로모터를 찾기 위해 염 스트레스 조건에서 상향 조절된 5개의 후보 유전자를 선택하였고, 염화나트륨을 포함하지 않는 대조군, 1% 또는 3% 염화나트륨을 함유하는 BG-11 배지에 2시간 또는 4시간 동안 반응시킨 뒤 RT-PCR을 통해 발현 수준을 확인하였다. TRIzol을 사용하여 조류 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 조류 세포를 막자와 막자 사발을 이용하여 파쇄한 후, 1.5㎖ 튜브에 옮기고 샘플에 1㎖의 TRIzol을 첨가하였다. 샘플을 10분 동안 4℃, 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액을 새로운 1.5㎖ 튜브에 옮기고, 200㎕의 클로로포름을 첨가하고 15초 동안 잘 섞어준 다음 실온에서 2분간 둔 다음 15분 동안 4℃, 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액을 새로운 1.5㎖ 튜브에 옮겨 담고, 실온에서 10분간 둔 다음 4℃에서 10분동안 13,000rpm으로

원심분리하였다. 그 후 이소프로판올을 1:1 비율로 분주하고 잘 섞어 RNA를 침전시켰다. 게놈 DNA를 제조사의 지시에 따라 TURBO DNA-free™ 키트 (Invitrogen)를 사용하여 제거하였다. 첫 가닥 cDNA는 SuperScript ™ VILO ™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)와 1㎕의 RNA를 주형으로 사용하여 제작하였다. PCR 반응시간은 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 85℃에서 5분이었다. 합성한 cDNA는 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. cDNA를 이용하여 mRNA로 전사하였는지 확인하기 위해 PCR을 진행하였다. PCR은 95℃, 3분 진행 뒤, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 과정을 30번 반복수행하고, 마지막 단계로 72℃에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔에 전기영동 한 뒤 UV trans illuminator를 이용하여 확인하였다. PCR 증폭에 사용된 프라이머는 표 2에 나열하였다.

[64] [표2]

본 발명에 사용된 프라이머 정보

표적 유전자		염기서열 (5'→3')	증폭산물
Gene 1	Forward	AGATTTAGTGGCTTGGGTAGC (서열번호 3)	123 bp
	Reverse	ATATGTGCCGGAGTTGACATAG (서열번호 4)	
Gene 2	Forward	CGCGCACTCTGCCATATAA (서열번호 5)	107 bp
	Reverse	GTTGAGCAAATCGTCACCAATC (서열번호 6)	
Gene 3	Forward	CAGTCGGTAGCAGCTTTCTT (서열번호 7)	90 bp
	Reverse	GGGTGCCATCGTAATCATAGT (서열번호 8)	
Gene 4	Forward	CGCGCACTCTGCCATATAA (서열번호 9)	145 bp
	Reverse	GTTGAGCAAATCGTCACCAATC (서열번호 10)	
Gene 5	Forward	CTTCGACTTCCGACGACTTT (서열번호 11)	121 bp
	Reverse	GAGCCAGCATAGTCAGCATAG (서열번호 12)	

[65]

[66] **6. Blast N 확인 및 프로모터 분리**

[67] 염 유도성 프로모터는 ≤10^{-5}의 E값을 컷 오프하고 NCBI 데이터베이스에 보관된 클로렐라 불가리스와 예상된 유전자를 Blast하여 추론하였다. 염 유도성

유전자의 5' flanking 서열을 찾고, 프로모터의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 유전자 서열과 5' flanking 서열 위치에서 제작하였다. 제작한 각각의 프라이머를 이용하여 클로렐라 불가리스 PKVL7422의 게놈 DNA로부터 증폭시켜 1.3Kbp 부근에서 단편을 회수하였다. PCR은 95℃ 3분 진행 뒤, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분 과정을 30번 반복하고, 마지막 단계로 72℃에서 5분간 진행하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 확인하였다. 그 후 겔에서 밴드(band)만 잘라낸 뒤 Geneall Gel Extraction Kit (Geneall, 대한민국)를 사용하여 정제하였다. 추출된 단편을 TAKARA 제조사의 지시에 따라 pMD19 벡터로 클로닝하고 시퀀싱을 통해 확인하였다. 그 후, Plantecare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)를 사용하여 프로모터 서열을 분석하였다.

[68]

[69] **7. 제한효소 서열 추가 및 벡터 삽입**

[70] 프로모터 서열을 분석한 뒤 프라이머를 제작하고 site directed mutagenesis를 이용하여 염 유도성 프로모터의 5' flanking 지역에는 *EcoR*I제한효소 자리를, 3' flanking 지역에는 *BamH*I제한효소 자리를 추가하였다. 시퀀싱을 통해 삽입여부를 확인하였다. 그리고 *BamH*I, *EcoR*I제한효소 및 K buffer (TAKARA)를 이용하여 염 유도성 프로모터와 상기 프로모터 서열이 삽입될 벡터를 잘라주었다. 5X DNA loading buffer와 섞어준 뒤 1% 아가로스 겔에 전기영동한 후 전술한 것과 동일하게 Geneall Gel Extraction Kit를 사용하여 효소처리에 의해 잘린 단편들을 정제하였다. 두 단편을 라이게이션(ligation) 한 뒤, *E. coli* DH5α에 형질전환한 다음 콜로니 PCR로 형질전환된 *E. coli*를 확인하였다. 사용한 프라이머는 하기 표 3에 기재하였다.

[71] [표3]

염 유도성 프로모터 삽입 여부 확인을 위한 PCR 프라이머 정보

표적 유전자		염기서열 (5'→3')	증폭산물
Salt2 promoterGopti	Salt2(+268)	GTAAGGCTGTCGTTTGTCGC (서열번호 13)	873 bp
	GR(+605)	TTGTGCAAACGCCCTCAATG (서열번호 14)	

[72]

[73] **8. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 형질전환**

[74] $3x10^7$ cells/㎖ 정도 자란 클로렐라 불가리스 PKVL7422 균주 1㎖을 6,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. 배지를 제거한 다음 세포 펠릿에 삼투버퍼 (0.2M sorbitol, 0.2M mannitol) 1㎖을 처리하였다. 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 6,000rpm에서 10분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 펠릿을

전기천공용 버퍼 (500mM NaCl, 5mM KCl, 5mM $CaCl_2$, 20mM Herpes, 200mM mannitol, 200mM sorbitol; pH 7.2)에 재부유시켰다. 그리고 5㎍ PCR 산물을 첨가하고 얼음 위에 10분간 두었다. 그 후, 이 부유액을 0.2cm 전기천공용 큐벳(cuvette)에 분주한 뒤 Electroporator인 PULSE CONTROL PLUS를 이용하여 1KV, 25μF, 400 ohm으로 전기충격을 처리하였다. 그런 다음 얼음 위에 10분간 둔 뒤 0.5% 글루코스가 첨가된 5㎖ BG-11 배지로 옮겨담은 뒤 20℃ 배양실에서 24시간 동안 암 배양하였다. 그런 다음 선택 배지인 BGNK (1% agar, BG-11, 0.5% glucose, 150mM $KClO_3$, 17mM NH_4Cl)에 200㎕ 분주하고 도말한 뒤, 20℃에서 2주간 암 배양하였다.

[75] [표4]

BGNK 배지 조성

BGNK			
#	**Component**	**Stock solution (g/L)**	**Addition per 1Litre culture medium**
Stock 1	Na_2MG EDTA	1g	1ml
	Ferric ammonium citrate	6g	
	Citric acid • $1H_2O$	6g	
	$CaCl2 • 2H_2O$	36g	
Stock 2	$Mg\ SO_4 • 7H_2O$	75g	1ml
Stock 3	$K_2HPO_4 • 3H_2O$	40g	1ml
Stock 4	Na_2CO_3	19.07g	1ml
Stock 5	H_3BO_3	2.86g	1ml
	$MnCl_2 • 4H_2O$	1.81g	
	$ZnSo_4 • 7H_2O$	0.222g	
	$CuSO_4 • 5H_2O$	0.079g	
	$COCl_2 • 6H_2O$	0.05g	
	$NaMoO_4 • 2H_2O$	0.391g	
Nitrogen Source	NH_4Cl	-	0.91g
Carbone Source	Glucose	-	5g
Chlorate Source	$KClO_3$	-	24.5g

[76]

[77] **9. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 형질전환체의 DNA 추출 및 PCR**

[78] BGNK 배지에 자라난 콜로니를 선택 배지인 BGPK (BG-11, 0.5% Glucose,

150mM $KClO_3$, 20mM $(NH_4)_2HPO_4$) 액체배지 5㎖에 20℃에서 일주일간 광 배양하였다(표 5).

[79] [표5]

BGPK 배지 조성

BGPK			
#	Component	Stock solution (g/L)	Addition per 1Litre culture medium
Stock 1	Na_2MG EDTA	1g	1ml
	Ferric ammonium citrate	6g	
	Citric acid • $1H_2O$	6g	
	CaCl2 • $2H_2O$	36g	
Stock 2	Mg SO_4 • $7H_2O$	75g	1ml
Stock 3	K_2HPO_4 • $3H_2O$	40g	1ml
Stock 4	Na_2CO_3	19.07g	1ml
Stock 5	H_3BO_3	2.86g	1ml
	$MnCl_2$ • $4H_2O$	1.81g	
	$ZnSo_4$ • $7H_2O$	0.222g	
	$CuSO_4$ • $5H_2O$	0.079g	
	$COCl_2$ • $6H_2O$	0.05g	
	$NaMoO_4$ • $2H_2O$	0.391g	
Nitrogen Source	$(NH_4)_2HPO_4$	-	2.64g
Carbone Source	Glucose	-	5g
Chlorate Source	$KClO_3$	-	24.51g

[80] 세포가 일주일 뒤 $4x10^7$ cells/㎖으로 성장하였을 때 2㎖을 15㎖ 튜브에 분주한 뒤 3,500 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 그리고 상층액 1㎖을 제외한 나머지는 제거한 뒤 펠릿을 BGPK 배지에 재부유한 다음 1.5㎖ 튜브에 옮겨 담고, 6,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 튜브 내 상층액을 제거한 뒤 BIONEER 사의 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit를 이용하여 DNA를 추출하였다. PCR을 이용하여 게놈 DNA 내로 원하는 외래 유전자가 삽입되었는지 확인하였다. 사용한 프라이머는 삽입된 유전자인 VHSV G 유전자에 결합하는 프라이머를 사용하였다. PCR 반응액은 PCR premix 4㎕, 정방향 프라이머(GF) 0.5㎕, 역방향 프라이머(GR) 0.5㎕, DNA 주형 1㎕, 증류수 14㎕로 조성하였으며, 유전자 증폭기를 이용하여 94℃ 15초, 60℃ 15초, 72℃ 10초의 과정을 35회 진행하였다. PCR 산물을 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 확인하였다.

[81] [표6]

클로렐라 불가리스 PKVL7422의 형질전환 확인을 위한 프라이머 정보

표적 유전자		염기서열 (5'→3')	증폭산물
G opti	GF (681)	GAGCATCGACCTCTACAGCC (서열번호 15)	681 bp
	GR (681)	CCGAAGATCATGCCGTCGTA (서열번호 16)	

[82]

[83] **실시예 1. 발현된 전사체들의 비교 및 분석**

[84] 상이한 염 스트레스 조건에서 다르게 발현된 유전자를 조사하기 위해, FPKM값을 계산하였다. 그 후 Quantile 방법을 기반으로 2배 이상의 임계값으로 계산하였다. 2시간 동안 1%와 3% 염화나트륨을 함유하는 배지에서 배양된 클로렐라 불가리스는 각각 5,232개와 3,968개의 유전자 발현을 변화시켰다. 또한, 1% 및 3% 염화나트륨을 함유하는 배지에서 4시간 동안 배양된 클로렐라 불가리스는 각각 9,196개 및 9,035개의 유전자가 차별적인 발현 패턴을 보여, 염 스트레스에 더 오랜 시간 노출될수록 발현 수준이 변하는 유전자의 수가 증가함을 알 수 있었다. 2시간의 염 스트레스 후, 상향 조절된 전사체의 수는 1%와 3% 염화나트륨 두 조건에서 하향 조절된 전사체의 수와 유사하였다(도 1). 그러나, 4시간의 염 스트레스 후에는 하향 조절된 유전자의 수가 상향 조절된 유전자의 수보다 많은 것으로 확인되었다.

[85] 발현된 유전자 중에서 50개의 유전자가 염 스트레스 하에서 강하게 조절되지 않는 것으로 확인되었다(도 2). 반면, 사이클린 집단 유전자는 1% 또는 3% 염화나트륨을 함유하는 배지에서 2시간 동안 배양될 때 각각 41.1 및 31.1배로 고도로 상향조절 되었다. 또한 putative *GTP diphosphokinase chloroplastic* 유전자는 높은 염 스트레스에서 고도로 상향 조절되었다(도 2). 대조적으로 하향 조절된 유전자는 hypothetical CHLNCDRAFT_28884가 있었고, 또한 하향 조절된 단일 유전자 중에는 전사 개시 인자 TFIID 서브유닛 6 동형 X1 및 유비퀴틴 카르복실 말단 가수분해효소 5 동형 X2도 있었다.

[86]

[87] **실시예 2. 염 스트레스에 의해 상향 조절된 유전자 확인**

[88] 염 유도성 프로모터를 찾기 위해 염 스트레스 조건에서 상향 조절된 5개의 후보 유전자를 선택한 뒤 클로렐라 불가리스로부터 총 RNA를 추출하고 cDNA로 합성한 다음 cDNA를 Nano drop으로 정량한 뒤 RT-PCR을 통해 확인하였다. 예상 밴드 사이즈는 Gene 1은 123bp, Gene 2는 107bp, Gene 3는 90bp, Gene4는 145bp, Gene 5는 121bp이다. 도 3에 개시된 것과 같이 5개의 유전자 중에 Gene 1에서 Gene 4 cDNA는 예상 밴드 사이즈에서 밴드를 확인할 수 있었으며, Gene 5는

밴드를 확인할 수 없었다. 이 4개의 유전자 중 Gene2에서 밴드가 진하게 나타났고, 1% 및 3% 염화나트륨 조건에서 2시간 및 4시간 반응 조건 모두에서 상향 조절되는 것으로 확인된 Gene 2를 최종 후보 유전자로 선택하였다. Gene 2의 프로모터를 찾기 위해 NCBI 데이타베이스에 보관된 클로렐라 불가리스와 Blast하여 프로모터 부위를 추론하였다.

[89]

[90] **실시예 3. 프로모터 cis-acting elements 분석**

[91] 염 유도성 유전자의 5' flanking 서열을 찾았고, 프로모터의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용하여 클로렐라 불가리스 PKVL7422 게노믹 DNA를 증폭시킨 뒤 아가로스 겔을 이용하여 밴드를 확인한 뒤 pMD19 벡터에 TA 클로닝하였다. 그 후, 시퀀싱을 통해 클로닝된 서열을 확인하였다. Gene 2의 프로모터 시퀀스 결과를 Plant cis-acting regulatory DNA elements 데이터베이스를 활용한 Plantcare 툴을 이용하여 전사 인자의 결합 부위를 확인하였다. 그 결과, Gene 2의 프로모터는 총 1,174bp 크기(서열번호 1)로, CCAAT box, TATA box, CAAT box 포함하여 전사 인자 결합 부위가 존재하는 것을 알 수 있었다(도 4).

[92]

[93] **실시예 4. 클로렐라 불가리스 형질전환 벡터 제작**

[94] 제한 효소 자리를 추가한 염 유도성 프로모터(salt-inducible promoter, 이하 SIP)를 *EcoR*I과 *BamH*I으로 자른 다음 벡터에 포함되어 있던 35S CaMV 35S 프로모터를 잘라낸 뒤 SIP를 삽입하였다. 이 벡터는 VHSV G 유전자를 가지고 있는 벡터이다. SIP 삽입 후 시퀀싱을 통해 벡터 내로 SIP가 삽입한 것을 확인하였다. 도 5는 완성된 클로렐라 형질전환 벡터를 모식화한 것이다.

[95]

[96] **실시예 5. 클로렐라 불가리스 PKVL7422 형질전환체의 확인**

[97] 실시예 4의 형질전환 벡터로 클로렐라 불가리스를 형질전환한 후, 형질전환된 클로렐라 불가리스를 BGPK (BG-11, 0.5% Glucose, 150mM $KClO_3$, 20mM $(NH_4)_2HPO_4$) 배지에서 일주일 동안 20℃에서 광 배양한 뒤, DNA를 추출하고 VHSV G 유전자와 SIP가 존재하는지 PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 6(A)에 개시된 것과 같이 VHSV G 유전자는 형질전환체 S1부터 S13에서 예상된 크기 위치인 681bp에서 밴드를 확인할 수 있었고, SIP 서열은 도 6(B)에 개시된 것과 같이 S2, S9 및 S12 형질전환체에서만 예상된 크기 위치인 873bp에서 밴드가 확인되었다.

[98] 또한, 상기 S2, S9 및 S12 형질전환체의 단백질을 추출하여 anti-VHSV G 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, S2, S9 및 S12 형질전환체 모두에서 75 kDa의 VHSV G 단백질이 확인됨을 알 수 있었다(도 7).

[99]

[100] **실시예 6. 염화나트륨 처리에 따른 재조합 단백질의 발현량 분석**

[101] 재조합 단백질의 발현이 확인된 형질전환 클로렐라에 다양한 농도의 염을 처리하여 단백질의 발현량을 비교·분석하였다. $3x10^7$ cells/㎖ 정도로 성장한

클로렐라 불가리스에 염화나트륨을 150mM, 170mM, 200mM, 250mM, 300mM, 350mM, 400mM, 450mM 또는 500mM의 농도로 첨가한 뒤 30분 후 발현량을 웨스턴 블랏을 이용하여 분석하였다. 야생형 및 염 처리를 하지 않은 형질전환 클로렐라와 염 처리한 형질전환 클로렐라의 전체 단백질을 추출하고 전기영동 후 웨스턴 블랏을 실시한 결과 도 8에 나타낸 바와 같이 단백질 밴드가 관찰되었다. 150mM부터 450mM까지는 재조합 단백질의 발현량이 점차 증가되다가 500mM의 염화나트륨 처리 구간에서는 발현량이 감소하는 현상을 보였다.

[102] 또한, $3x10^7$ cells/㎖로 성장한 형질전환 클로렐라에 염화나트륨을 150mM, 170mM, 200mM 및 250mM의 농도로 첨가한 후 5일간 배양하여 $4x10^8$ cells/㎖까지 성장시킨 후 단백질 발현량을 웨스턴 블랏을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 염화나트륨 처리 농도에 비례하여 재조합 단백질의 발현량이 증가되는 것으로 확인되었으며, 250mM 처리 농도에서는 염화나트륨을 처리하지 않은 군과 비교하여 재조합 단백질의 발현량이 약 9.6배 증가하는 것으로 확인되었다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) 유래의 염(salt) 유도성 프로모터.

[청구항 2] 제1항의 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 프로모터의 하류(downstrem)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 재조합 벡터.

[청구항 4] 제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류.

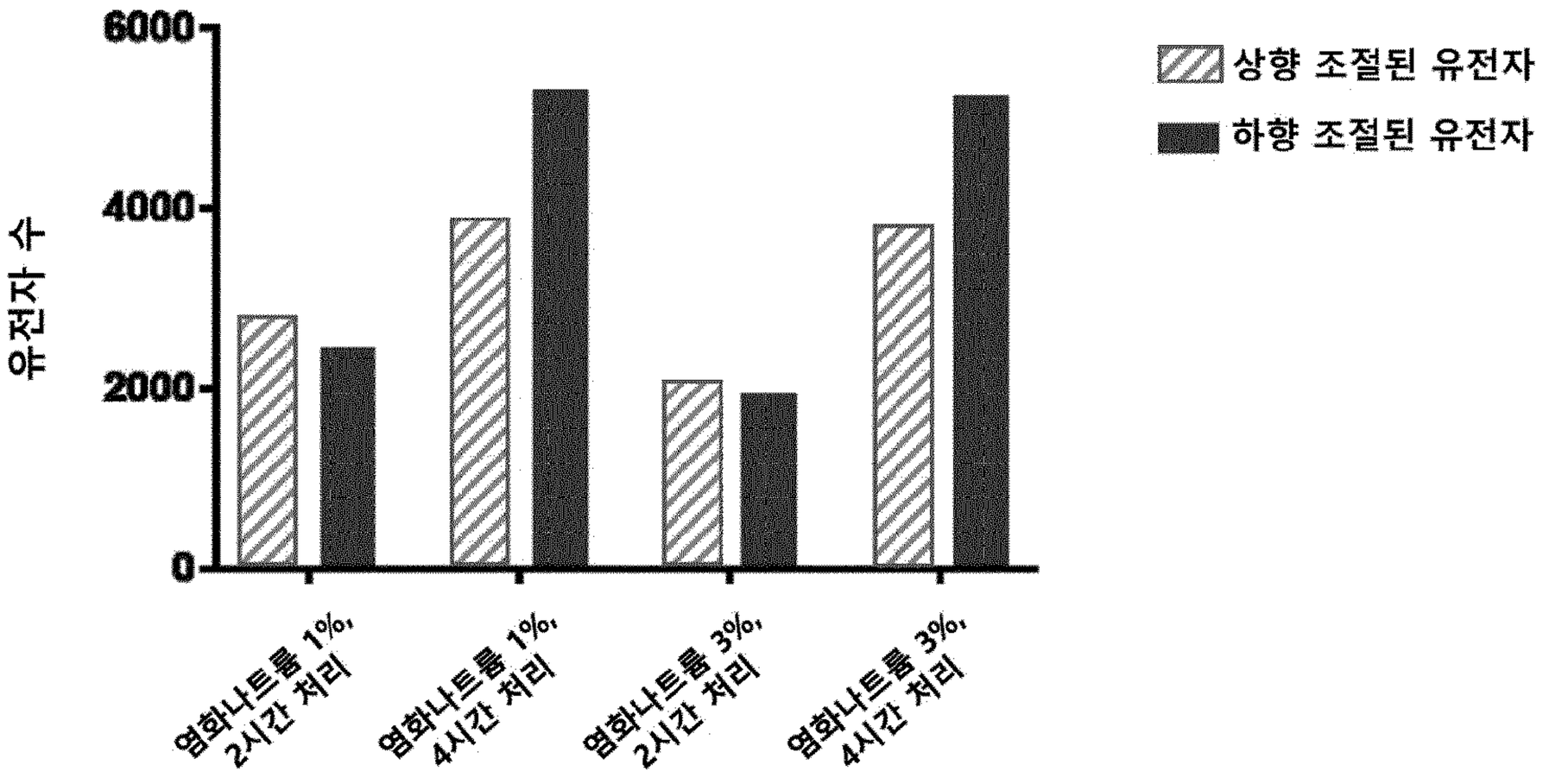
[청구항 5] 제4항의 형질전환된 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법.

[청구항 6] 제2항의 재조합 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및
상기 재조합된 벡터로 미세조류를 형질전환시키는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 염 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류의 제조방법.

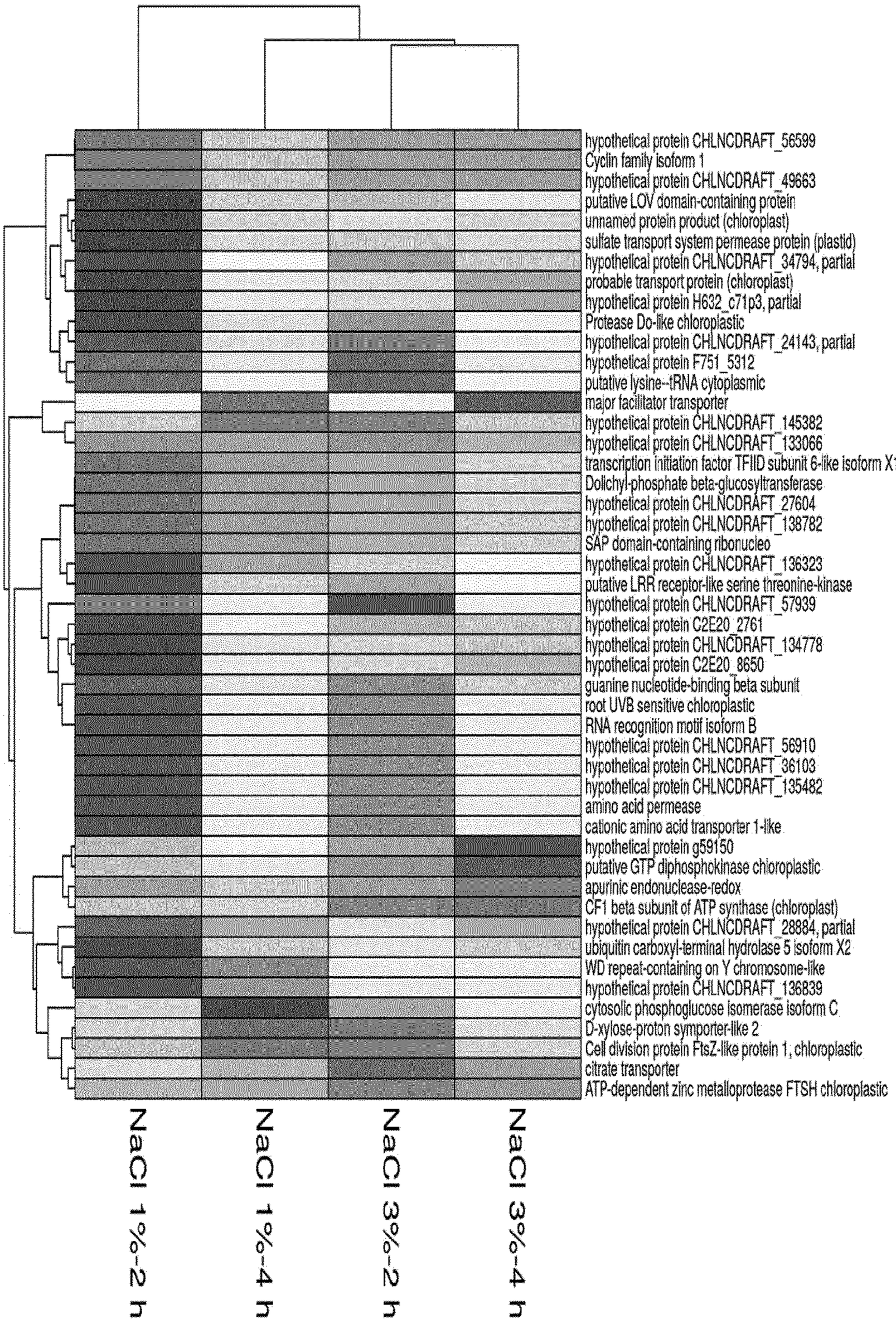
[청구항 7] 제6항의 제조방법으로 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 염 스트레스 조건에서 발현되는 형질전환 미세조류.

[청구항 8] 제7항에 따른 형질전환 미세조류의 배양액을 유효성분으로 포함하는 어류용 사료 첨가제.

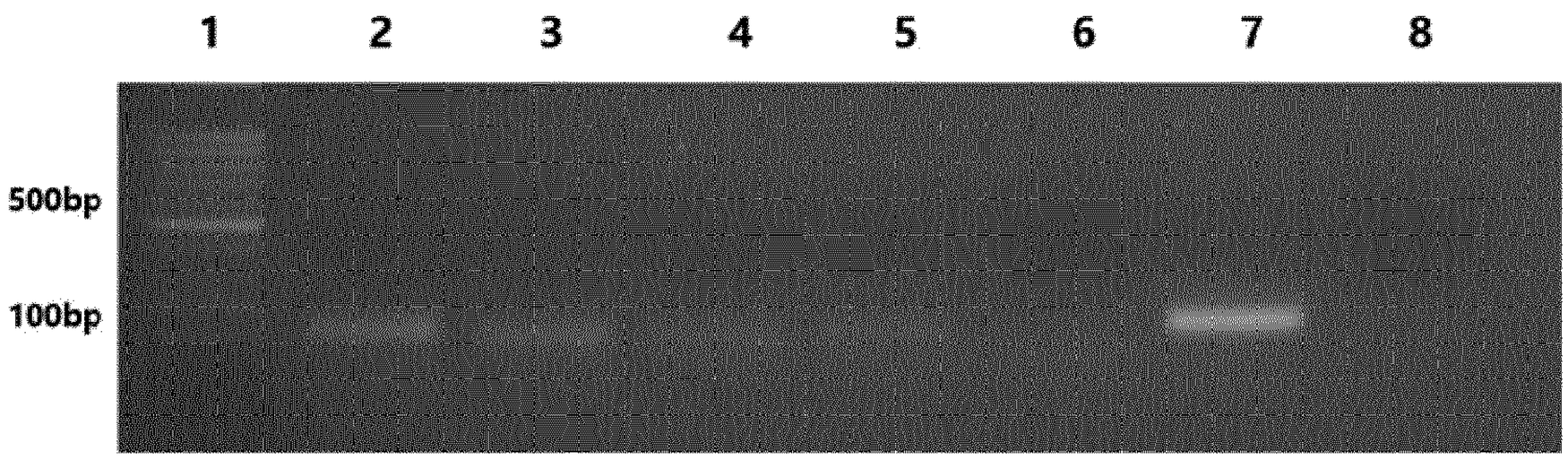
[도1]


6000
4000
2000
0
유전자 수
상향 조절된 유전자
하향 조절된 유전자
염화나트륨 1%, 2시간 처리
염화나트륨 1%, 4시간 처리
염화나트륨 3%, 2시간 처리
염화나트륨 3%, 4시간 처리

[도2]


hypothetical protein CHLNCDRAFT_56599
Cyclin family isoform 1
hypothetical protein CHLNCDRAFT_49663
putative LOV domain-containing protein
unnamed protein product (chloroplast)
sulfate transport system permease protein (plastid)
hypothetical protein CHLNCDRAFT_34794, partial
probable transport protein (chloroplast)
hypothetical protein H632_c71p3, partial
Protease Do-like chloroplastic
hypothetical protein CHLNCDRAFT_24143, partial
hypothetical protein F751_5312
putative lysine--tRNA cytoplasmic
major facilitator transporter
hypothetical protein CHLNCDRAFT_145382
hypothetical protein CHLNCDRAFT_133066
transcription initiation factor TFIID subunit 6-like isoform X1
Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase
hypothetical protein CHLNCDRAFT_27604
hypothetical protein CHLNCDRAFT_138782
SAP domain-containing ribonucleo
hypothetical protein CHLNCDRAFT_136323
putative LRR receptor-like serine threonine-kinase
hypothetical protein CHLNCDRAFT_57939
hypothetical protein C2E20_2761
hypothetical protein CHLNCDRAFT_134778
hypothetical protein C2E20_8650
guanine nucleotide-binding beta subunit
root UVB sensitive chloroplastic
RNA recognition motif isoform B
hypothetical protein CHLNCDRAFT_56910
hypothetical protein CHLNCDRAFT_36103
hypothetical protein CHLNCDRAFT_135482
amino acid permease
cationic amino acid transporter 1-like
hypothetical protein g59150
putative GTP diphosphokinase chloroplastic
apurinic endonuclease-redox
CF1 beta subunit of ATP synthase (chloroplast)
hypothetical protein CHLNCDRAFT_28884, partial
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform X2
WD repeat-containing on Y chromosome-like
hypothetical protein CHLNCDRAFT_136839
cytosolic phosphoglucose isomerase isoform C
D-xylose-proton symporter-like 2
Cell division protein FtsZ-like protein 1, chloroplastic
citrate transporter
ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH chloroplastic
1
0.5
0
-0.5
-1
NaCl 1%-2 h
NaCl 1%-4 h
NaCl 3%-2 h
NaCl 3%-4 h

[도3]


1
2
3
4
5
6
7
8
500bp
100bp

[도4]

CGGCTGACAAAGATGAGCGAGAAGCCGATGTCAGGTTGGTTGCTGCTCTC

AGCCTCTGGGCAGGCTGGGCTATGCAGTGTGTGGTCGTGTGCGCTGCTGG

GGCGGTCCAGCCCACTTAGCTTGCTTTAGCTTGTACCCAGGTGGCCTAGGC

ACTCCA**CAAT**GCTGTCGTTCACTTGTCTCATCCCCTT**CTGTGCTCTGCCCGCC**

CAAT-box --------- Motif-sequence --------

CGGCGCTTGCAGCTGCCAAGCTGGACGAGGTGAGCCGCAAGATCAGCGT

———

GCTTTCTTCCTTCCTCGAGACCCCTGAGGAGGCTGCGGCGCTGGCAGAGG

CTGAGGATGCCGAGCCCATTGCTGCTGAGGTGGCGGGGGGCGACAACGA

GGAGGAGGGTGAGG**ACGTG**TACGCTGATGGGTTTGATGATAATG**AGGGG**

--- ABRE -- -- STRE ----

GCAGGTGGGTGGTTCGGCGCATCCGCT**GCAGCGTGTCT**GCTGCTGCGGCG

------- ABRE ---------

— MBS —

GTGTA**TTGACCAACTG**CACTACAGTTGGCCAGCCTGAGCTGGGGATTGGG

- W-box -

CCGCTGCG**CTGTGCTGGGC**CTGCTGGCAGCAGGTGGTGGTGGGCAGCAA

---- Motif-sequence ----

— MBS —

GTGTGT**CAGCGTGAGGC**TGCGGTGTGT**TGCCAACTG**ACAGCTTTTTGCCT

—— GTGGC-motif —— — CAAT-box --

CAGGCACTGT**CGTCA**AGCTG**ACGCC**CTCCACGGCT**CACGTG**CTGCAGAGC

CGTCA-box TGACG-motif — ABRE --

TGGAGGGTGAGGATGAGGAGGCGGGAGGCGAGGAGGAGGAGTTTGGA

GAGGAGGAGGAGGA**TGTGGAGGTGCA**GGCAGCTGATGATGATGAT**GACC**

———— Y-box ———— -- ACE --

CGTATGAGGACGAATCAGAGCTCTGATACGCCTCTCAGCAGAAATTATCAC

————

TTGGGTGCTGCACCGCTTGTTCTGTTTCGTTTG**TCTGTTG**CACTGAGTGCC

CARE-motif

GCCGCTCTCATGCCGTGACGTCCCAACGGTGTGTATGCTGCTGCTACTGCC

GTCGCTTGTAAGGCTGTCGTTTGTCGCAGTGCCGCTGTAGTTTGATGGCAA

GTGCAGGTAGGAAAGCTGTGGGGTGTGTGTCAGAGCGTAGTTGTGCCGT

GGAGAGCCCCGGTTACGTCATGCGGTATGC**CCTTTTG**CCAGCGGTCACACA

—— P-box ——

ACGCATGCGGCGGCGGCGGTCATCA**AAACCA**TAGCGGTGACATGCGGGC

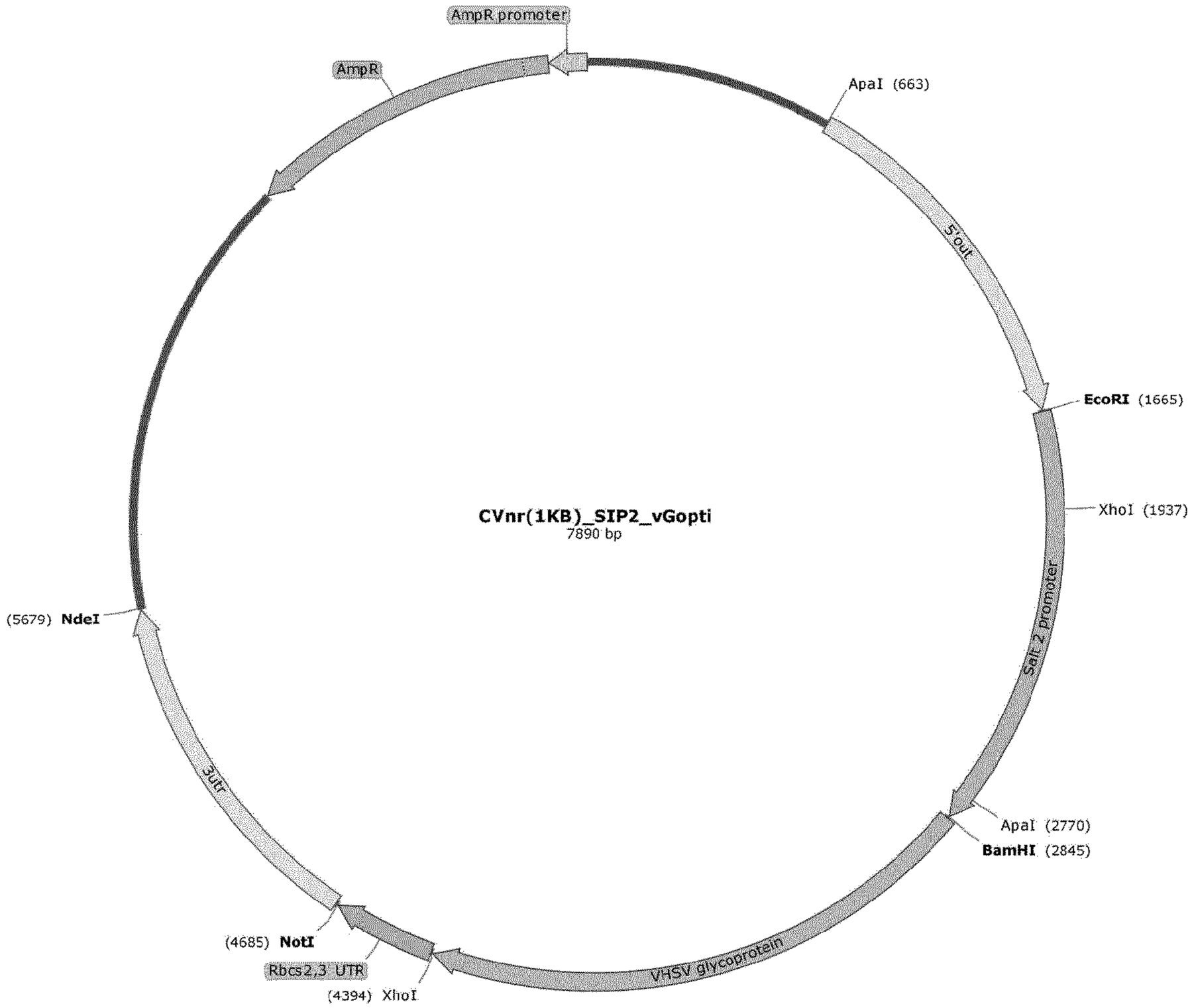
---- ARE ----

CC**TATA**AATTGTGGATTGTGTGCATTCTTAAGCCGTATTGAGTATTATTTTGT

TATA-box

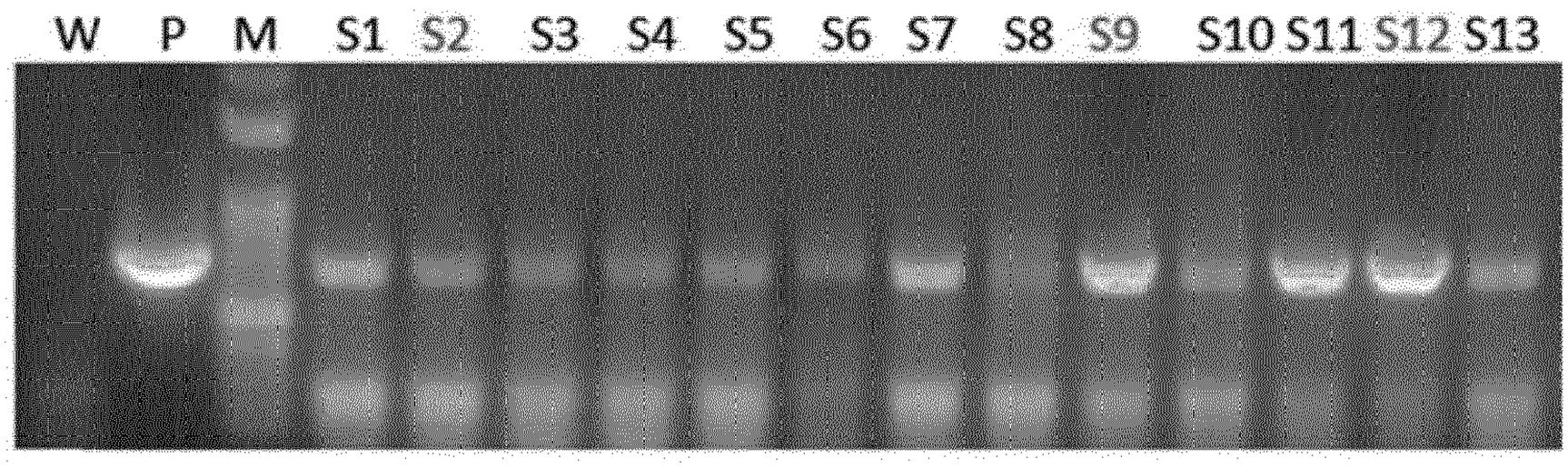
GTGGGCTGTGGTCGCAGTCGCC

[도5]

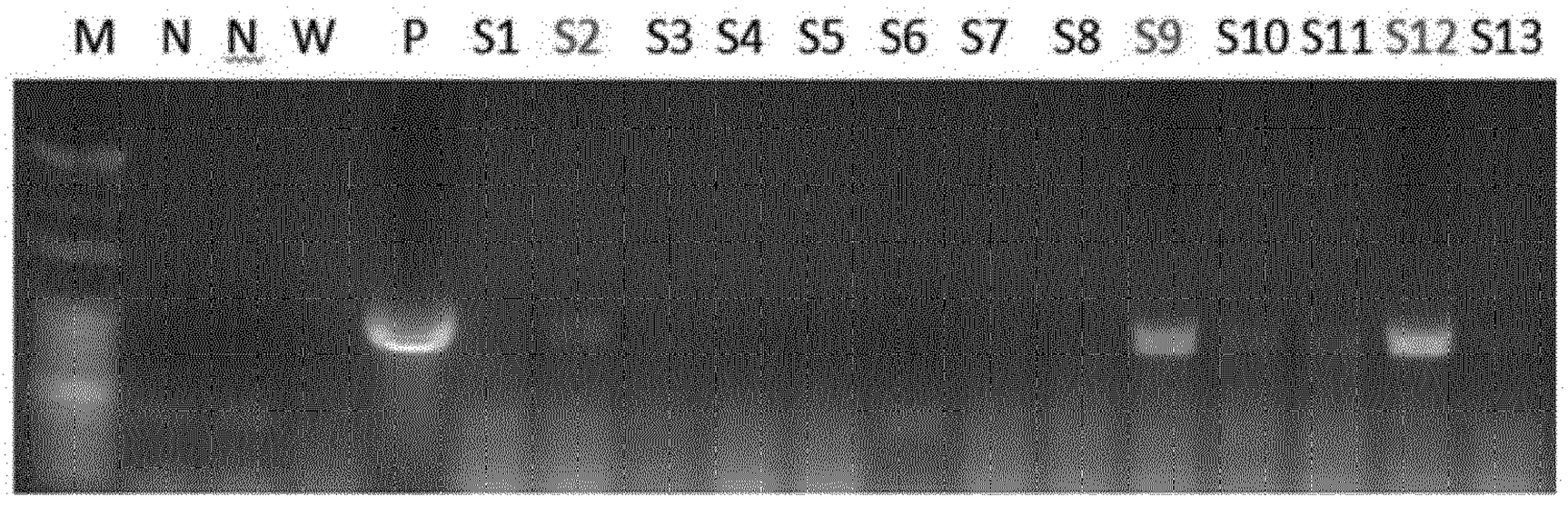

AmpR promoter
AmpR
ApaI (663)
5'out
EcoRI (1665)
XhoI (1937)
Salt 2 promoter
ApaI (2770)
BamHI (2845)
VHSV glycoprotein
(4394) XhoI
Rbcs2,3 UTR
(4685) NotI
3utr
(5679) NdeI
CVnr(1KB)_SIP2_vGopti
7890 bp

[도6]

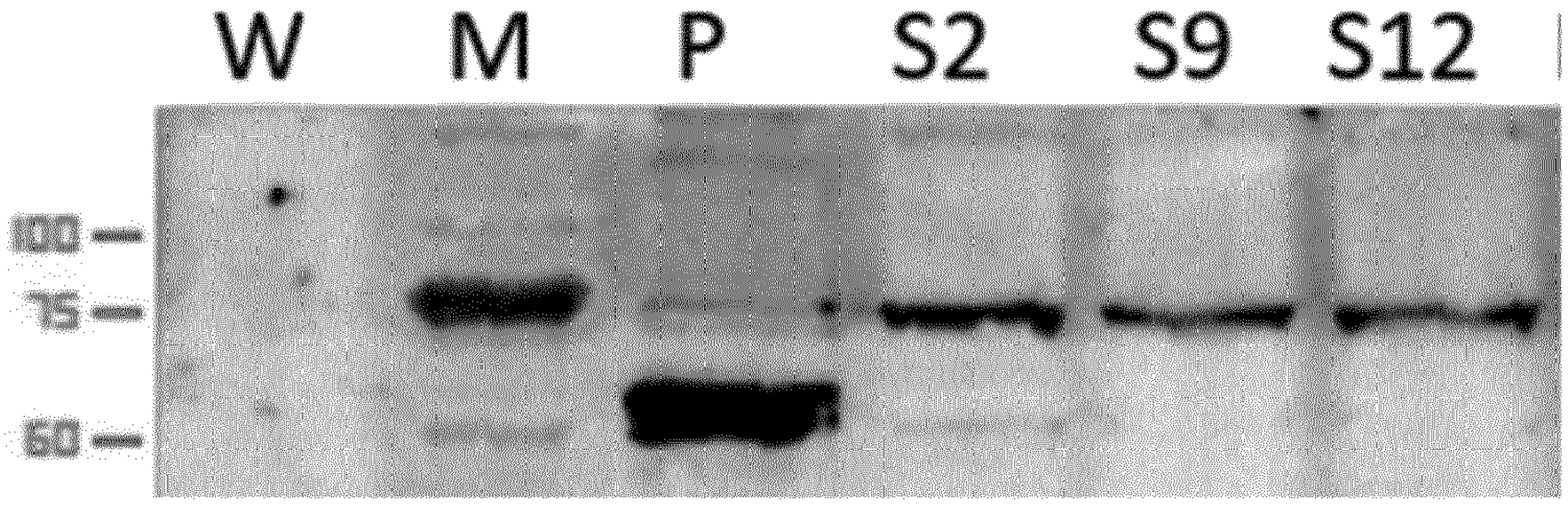
(A)


W P M S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 S11 S12 S13

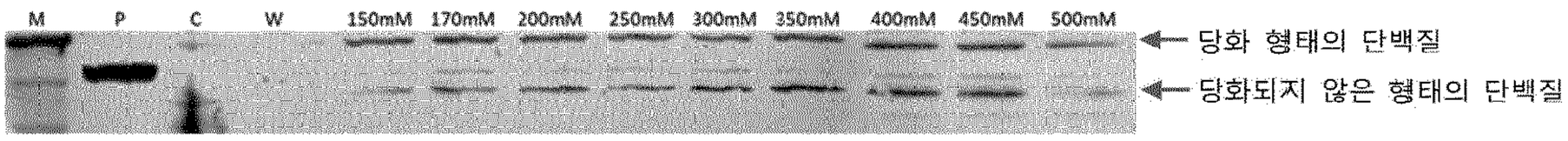
(B)


M N N W P S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 S11 S12 S13

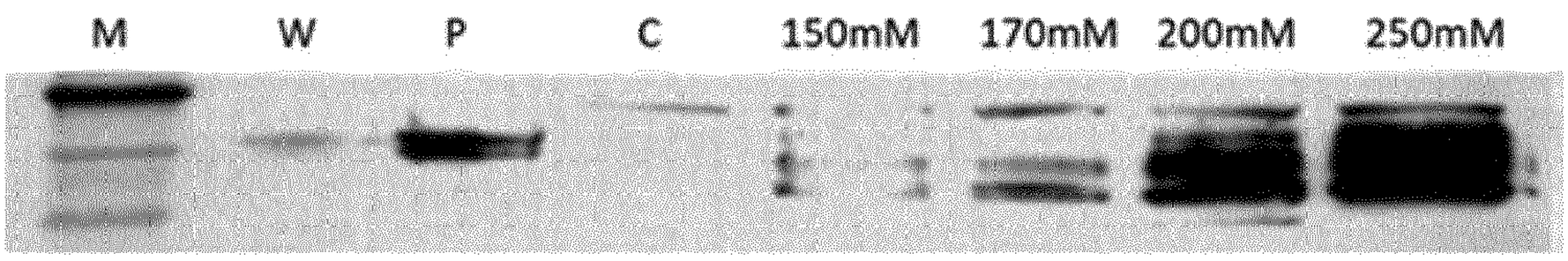
[도7]


W
M
P
S2
S9
S12
100
75
50

[도8]


M
P
C
W
150mM
170mM
200mM
250mM
300mM
350mM
400mM
450mM
500mM
당화 형태의 단백질
당화되지 않은 형태의 단백질

[도9]


M
W
P
C
150mM
170mM
200mM
250mM

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/004280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/79(2006.01)i, A23K 10/16(2016.01)i, A23K 20/147(2016.01)i, A23K 50/80(2016.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/79; A23K 10/30; A23K 20/147; A23L 27/10; A23L 33/00; C12N 1/12; C12P 5/02; A23K 10/16; A23K 50/80

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Chlorella vulgaris, microalgae, mutant, promoter, feed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2017-0116375 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 19 October 2017 See claims 1-13.	1-8
A	KR 10-2016-0046337 A (PAICHAI UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 29 April 2016 See entire document.	1-8
A	KR 10-2014-0130906 A (EWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 12 November 2014 See entire document.	1-8
A	KR 10-1178860 B1 (GANGNEUNG-WONJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION GROUP) 31 August 2012 See entire document.	1-8
A	KR 10-2019-0021131 A (KIM, Jeong Gon et al.) 05 March 2019 See entire document.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 AUGUST 2020 (20.08.2020)	**20 AUGUST 2020 (20.08.2020)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/004280

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0116375 A	19/10/2017	KR 10-1849271 B1	16/04/2018
KR 10-2016-0046337 A	29/04/2016	None	
KR 10-2014-0130906 A	12/11/2014	KR 10-1524652 B1	04/06/2015
KR 10-1178860 B1	31/08/2012	None	
KR 10-2019-0021131 A	05/03/2019	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/004280

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/79(2006.01)i, A23K 10/16(2016.01)i, A23K 20/147(2016.01)i, A23K 50/80(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/79; A23K 10/30; A23K 20/147; A23L 27/10; A23L 33/00; C12N 1/12; C12P 5/02; A23K 10/16; A23K 50/80

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 클로렐라 불가리스(Chlorella vulgaris), 미세조류(microalgae), 변이주(mutant), 프로모터(promoter), 사료(feed, aquaculture)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0116375 A (경북대학교 산학협력단) 2017.10.19 청구항 1-13	1-8
A	KR 10-2016-0046337 A (배재대학교 산학협력단) 2016.04.29 전문	1-8
A	KR 10-2014-0130906 A (이화여자대학교 산학협력단) 2014.11.12 전문	1-8
A	KR 10-1178860 B1 (강릉원주대학교산학협력단) 2012.08.31 전문	1-8
A	KR 10-2019-0021131 A (김정곤 등) 2019.03.05 전문	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 08월 20일 (20.08.2020)	2020년 08월 20일 (20.08.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/004280

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0116375 A	2017/10/19	KR 10-1849271 B1	2018/04/16
KR 10-2016-0046337 A	2016/04/29	없음	
KR 10-2014-0130906 A	2014/11/12	KR 10-1524652 B1	2015/06/04
KR 10-1178860 B1	2012/08/31	없음	
KR 10-2019-0021131 A	2019/03/05	없음	