



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0002509

(43) 공개일자 2016년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/04 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0080955

(22) 출원일자 2014년06월30일

심사청구일자 2014년06월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

오민규

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호 (정자동, 파크뷰)

이상우

경기 남양주시 도농로 34, 102동 1304호 (도농동, 부영그린타운)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 15 항

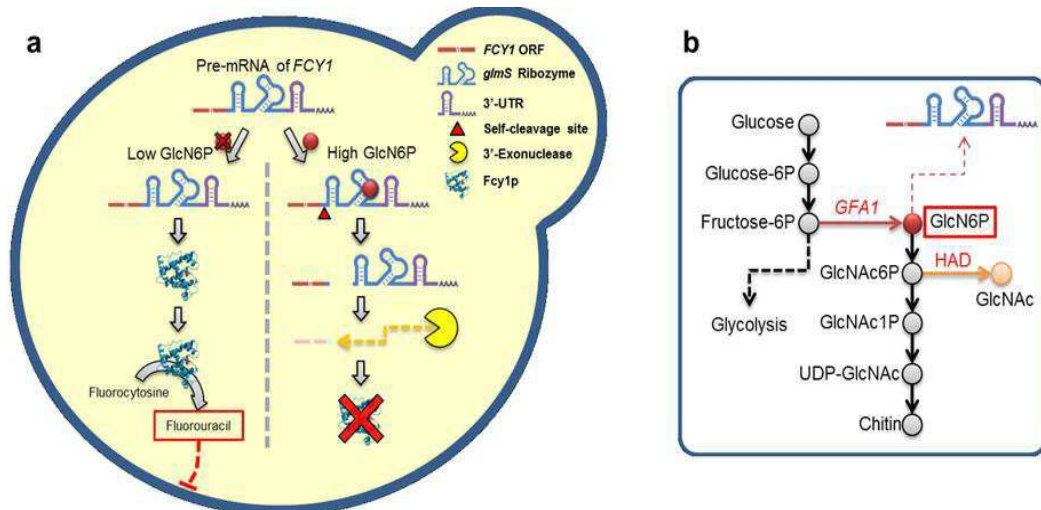
(54) 발명의 명칭 **인공 자살 유전자 회로를 이용한 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 인공 자살 유전자 회로를 이용한 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 자살유전자와 리보스위치를 결합시킨 인공 자살 유전자 회로를 변이균주에 도입하여 대사산물을 생산하지 못하는 변이균주는 사멸시키고, 대사산물을 과생산하는 변이균주만 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주를 스크리닝하는 방법은, 성장 속도가 상대적으로 빠르거나 느린 대사산물 과생산 변이 균주를 육안으로 구별하여 분리할 수 있고, 목적 대사산물에 따라 인공 자살 유전자 회로에 사용되는 리보스위치를 교체함으로써 다양한 균주에 인공 자살 유전자 회로를 공통적으로 적용시킬 수 있어 유용하다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는, 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법:

- (a) 자살유전자 및 리보스위치(riboswitch)를 함유하는 인공 자살 유전자 회로가 도입되어 있고, 목적 대사산물 생성에 관여하는 유전자의 변이체를 함유하는 변이균주 라이브러리를 구축하는 단계;
- (b) 상기 변이균주 라이브러리를 각각 배양시키는 단계; 및
- (c) 상기 배양된 변이균주 라이브러리 중에서 성장속도가 상대적으로 빠른 변이균주를 목적 대사산물 과생산 변이균주로 선택하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주에서는 과생산된 목적 대사산물이 리보스위치(riboswitch)와 결합하여 상기 인공 자살 유전자 회로를 억제시키고, 목적 대사산물의 생산이 없거나 적은 변이균주에서는 상기 인공 자살 유전자 회로가 작동하여 상기 변이균주의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 균주는 효모인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 리보스위치(riboswitch)는 목적 대사산물과 결합한 후 자살 유전자를 효소 작용으로 절단하는 리보자임(ribozyme)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리보스위치(riboswitch)는 자살 유전자의 pre-mRNA의 3'UTR(untranslated region) 부위에 삽입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 리보자임(ribozyme)은 GlcN6P와 결합하는 *glmS* 리보자임; 또는 FMN, ATP, theophylline, tetracyclin, xanthine, TMPyP4, light and caged theophylline, ERK2 phosphorylated/unphosphorylated, HCV helicase/replicase, Tat protein, cAMP, cCMP, cGMP, 3-methylxanthine, caffeine, aspartame, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , 및 Light and (BDHP-COOH or BCPD-COOH)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 작동체 분자(effector molecule)와 결합하는 리보자임인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 자살유전자는 시토신 디아미네이스(cytosine deaminase), 티미딘 카이네이스(thymidine

kinase), 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase), 우라실 포스포리보실 트랜스퍼레이즈(uracil phosphoribosyl transferase), 및 뉴클레오사이드 다이포스포카이네이즈(nucleoside diphosphokinase)를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 배양시 외부 조절인자를 첨가하여 상기 인공 자살 유전자 회로의 작동 범위를 조절하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 자살 유전자가 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)를 코딩하는 유전자인 경우, 상기 외부 조절인자는 플루오로사이토신(fluorocytosine)이고;

자살 유전자가 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase) 또는 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase)를 코딩하는 유전자인 경우, 상기 외부 조절인자는 dideoxythymidine, trifluoromethylthymidine, ethyldeoxyuridine, bromovinyldeoxyuridine, bromovinyl-arabinouracil, 및 ganciclovir로 구성된 군에서 선택되는 피리미딘 뉴클레오사이드 유사체(pyrimidine nucleoside analog) 또는 구아노신 유사체(guanosine analog)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 목적 대사산물의 생성에 관여하는 유전자는 fructose-6P를 GlcN6P로 변환시키는 GFA1을 코딩하는 유전자 또는 리보플라빈(riboflavin)을 FMN으로 변환시키는 FMN을 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

서열번호 1의 아미노산 서열에서, Q96H 및 Q157R의 아미노산 변이를 포함하는 GFA1 변이체.

청구항 12

제11항에 있어서, 서열번호 2~4중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 GFA1 변이체.

청구항 13

제11항 또는 제12항의 GFA1 변이체를 코딩하는 유전자를 함유하는 GlcN6P 과생산 변이균주.

청구항 14

다음 단계를 포함하는, GlcNAc를 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법:

- (a) 제13항의 GlcN6P 과생산 변이균주에, 다양한 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자를 각각 도입하여 변이균주 라이브러리를 구축하는 단계;
- (b) 상기 변이균주 라이브러리를 각각 배양시키는 단계; 및
- (c) 상기 배양된 변이균주 중에서 성장속도가 상대적으로 느린 변이균주를 GlcNAc 과생산 변이균주로 선택하는 단계.

청구항 15

HAD phosphatase YqaB 또는 YihX를 코딩하는 유전자를 함유하는 GlcNAc 과생산 변이균주.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인공 자살 유전자 회로를 이용한 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 자살유전자와 리보스위치를 결합시킨 인공 자살 유전자 회로를 변이균주에 도입하여 대사산물을 생산하지 못하는 변이균주는 사멸시키고, 대사산물을 과생산하는 변이균주만 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

오래 전부터, 미생물에 의한 발효와 같은 세포 대사작용은 식품을 가공하는 데에 이용되어 왔다. 그러나, 세포 내 메커니즘에 대한 이해도가 높아지면서, 공학적인 수요를 충족시키기 위해, DNA 재조합 기술과 최근 개발된 다양하고 새로운 인공 장치(synthetic device)를 이용하여 세포 대사작용을 조절하는 것이 가능해졌다. 인공 시스템은, 인위적인 조작이 세포 내 조절 시스템과 독립적으로 작동되기 때문에 뛰어난 형질의 교란(perturbation)을 도입하는데 무리 없이 이용될 수 있다는 점에서, 접근 가능한 형질(phenotype)의 범위를 넓혀 줄 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 이러한 경우의 좋은 예로, 인공 리보스위치(riboswitch)는 미생물의 대사작용을 공학적인 수요에 맞추어 리프로그래밍(re-program)하기 위해 인공적으로 설계되어 미생물에 도입되어 왔다.

[0003]

리보스위치는 작은 리간드에 의존(ligand-dependent)하여 유전자를 조절하는 구조물로, 다양한 종의 RNA에서 발견된 바 있다. 자연적인 리보스위치는 세포 내 대사물질의 농도에 반응하여 자신의 구조를 변형시키는데, 리간드인 대사물질이 리보스위치의 활성부위(active site)가 아닌 다른 자리에 결합하여(allosterically-bound) RNA의 입체 구조를 변형시킴으로써 유전자의 발현을 조절한다. 그 결과, 유전자 전사(transcription)의 종결이 정상상태보다 빨리 일어나거나, 단백질로의 번역(translation)이 개시되는 것을 막거나, 또는 mRNA의 분해 속도에 영향을 미치게 된다.

[0004]

리보스위치 자체가 자연적인 대사산물 센서라는 점을 이용하여, 유용한 대사물질을 생산하는 미생물의 높은 스크리닝 효율을 달성하기 위해 인공적인 리보스위치가 포함된 인공 유전자 회로가 진화공학적인 측면에서 개발되고 적용될 수 있다. 무작위적으로 형질을 교란(perturbation)시킨 돌연변이체 중 유용한 대사물질을 과생산하는 변이체들을 효율적으로 스크리닝하려면, 육안으로 돌연변이체의 형질을 관찰할 수 있도록 대사물질의 생산에 따라 색변화를 나타내거나, 성장속도가 달라지는 형질을 나타낼 수 있어야 한다. 그러나 오직 몇 가지의 대사산물만 자연적인 발색 또는 형광을 나타내고, 대부분의 대사산물은 그러한 형질을 나타내지 않는다는 제한이 있어, 복잡한 실험과정을 거치는 비효율적인 스크리닝을 하게 된다는 문제점이 있다.

[0005]

이러한 눈에 띄지 않는 형질을 스크리닝할 때의 제한을 극복하기 위해 인공 대사물질 센서를 이용하려는 몇몇 시도가 있었다. 특히, 형광 단백질 리포터와 결합된 인공 리보스위치가 개발되었고, 이는 fluorescence-activated cell sorting(FACS)을 이용하여 caffeine demethylase라는 효소의 효율적인 유도 진화가 가능함을 증명한 바 있다 (Michener JK et al., *Metab Eng* 14:306-316, 2012).

[0006]

그러나, 성장속도가 빠른 것으로 나타나는 변이체를 스크리닝하는 것이 최대의 효율을 나타낸다는 것이 밝혀졌고 (Dietrich JA et al., *Annu Rev Biochem* 79:563-590, 2010), 본 발명자들은 이를 고려하여 성장속도에 대한 의존성을 나타내는 인공 유전자 회로를 디자인하였다. 세포 내 타겟 대사물질의 농도가 달라짐에 따라 세포의 성장속도가 함께 달라져 대사산물을 과생산하는 변이체를 선택할 수 있도록 설계하였다.

[0007]

또한, 본 발명자들은 추후에 이와 같은 스크리닝 원리를 다양한 대사산물을 생성하는 다양한 균주에 적용시킬 수 있도록 하기 위해 예의 노력한 결과, 두 개의 일반적인고 보편적인 세포 메커니즘을 차용하여 리보스위치를

이용한 인공 자살 유전자 회로를 설계했다.

[0008] 하나는, 스스로를 절단하는 리보자임(self-cleaving ribozyme)이 관여하는 mRNA의 분해 메커니즘으로, 이는 많은 유전자 회로에 이미 적용된 바 있고, 진핵세포 뿐만 아니라 원핵세포 시스템에도 다양하게 적용될 수 있음이 밝혀져 있다.

[0009] 또한, 플루오로시토신(fluorocytosine)이 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)에 의해 플루오로우라실(flourouracil)로 변환되는 것은 세포의 사멸(자살)을 유도한다는 것도 일반적으로 알려져 있는 메커니즘으로, 이는 우라실의 유사체인 플루오로우라실이 진핵세포와 원핵세포에서 독성을 나타내어 RNA의 기능 장애를 가져오기 때문인 것으로 알려져 있다.

[0010] 이에 착안하여, 본 발명자들은 glucosamine-6-phosphate(GlcN6P)라는 효모 대사산물의 세포 내 농도에 반응하는 리보자임인 *glmS*가, 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)를 코딩하는 유전자인 *FCY1*에 삽입된 자살 유전자 회로를 이용하면, GlcN6P를 과생산하는 효모의 변이체만 효율적으로 스크리닝할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 자살 유전자 회로를 변이균주에 도입하여 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주를 용이하게 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 자살유전자 및 리보스위치(riboswitch)를 함유하는 인공 자살 유전자 회로가 도입되어 있고, 목적 대사산물 생성에 관여하는 유전자의 변이체를 함유하는 변이균주 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 변이균주 라이브러리를 각각 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 배양된 변이균주 라이브러리 중에서 성장속도가 상대적으로 빠른 변이균주를 목적 대사산물 과생산 변이균주로 선택하는 단계를 포함하는, 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열에서, Q96H 및 Q157R의 아미노산 변이를 포함하는 GFA1 변이체를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 GFA1 변이체를 코딩하는 유전자를 함유하는 GlcN6P 과생산 변이균주를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, (a) 상기 GlcN6P 과생산 변이균주에, 다양한 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자를 도입하여 변이균주 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 변이균주 라이브러리를 각각 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 배양된 변이균주 중에서 성장속도가 상대적으로 느린 변이균주를 GlcNAc 과생산 변이균주로 선택하는 단계를 포함하는, GlcNAc를 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, HAD phosphatase YqaB 또는 YihX를 코딩하는 유전자를 함유하는 GlcNAc 과생산 변이균주를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주를 스크리닝하는 방법은, 성장 속도가 상대적으로 빠르거나 느린 대사산물 과생산 변이 균주를 육안으로 구별하여 분리할 수 있고, 목적 대사산물에 따라 인공 자살 유전자 회로에 사용되는 리보스위치를 교체함으로써 다양한 균주에 인공 자살 유전자 회로를 공통적으로 적용시킬 수 있어 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 *glmS* 리보자임을 함유하는 인공 자살 유전자 회로의 작용 방식(a)과, 이를 검증하기 위해 사용한 GlcNAc 과생산 생합성 경로(b)를 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 *glmS* 리보자임을 함유하는 인공 자살 유전자 회로의 작동을 검증하기 위해, 다양한 농도의 GlcN를 넣어 주어 효모의 성장 속도를 비교한 결과를 나타낸 그래프(a,b)와, 다양한 농도의 플루오로시토신(fluorocytosine)을 넣어줌에 따라 자살 회로의 작동범위를 조절할 수 있음을 나타낸 그래프(c)이다.
- 도 3은 GFA1 변이체 라이브러리가 도입된 다양한 균주들의 대사물질 생산에 따른 흡광도를 나타낸 그래프(a)와, 가장 성장 효율이 좋았던 GFA1-m1, GFA1-m9, GFA1-m12에 대하여, 어느 위치에서 변이가 나타났는지 분석한 결과(b)이다.
- 도 4는 가장 성장 효율이 좋았던 GFA1-m12 균주에 HAD phosphatase 라이브러리를 도입했을 때 대사물질 생산에 따른 흡광도를 나타낸 그래프(a)와, HAD phosphatase 라이브러리 도입에 따라 원래 GlcNAc를 생산하지 못하는 효모에서 GlcNAc를 생산할 수 있었음을 보여주는 그래프(b)이다.
- 도 5는 FMN 리보자임을 함유하는 인공 자살 유전자 회로의 작동을 검증하기 위해, 다양한 농도의 FMN를 넣어 주어 효모의 성장 속도를 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 FMN 과생산 생합성 경로를 나타낸 모식도(a)와, FMN 리보자임을 함유하는 인공 자살 유전자 회로의 작동을 검증하기 위해, 세포 내 FMN 생성에 따른 효모의 성장 속도를 비교한 결과를 나타낸 그래프(b,c)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0020] 본 발명에서는, 효모 내에서 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)를 코딩하는 유전자로 알려져 있는 *FCY1* 유전자와, 효모 내 대사산물인 glucosamine-6-phosphate(GlcN6P)에 반응하는 *glmS* 리보자임(ribozyme)을 결합시킨 인공 자살 유전자 회로를 설계하고, 이를 GlcN6P 생성에 관여하는 유전자(*GFA1*)의 변이체를 함유하는 변이 균주 라이브러리에 도입한 후 성장속도가 빠른 균주를 스크리닝하는 실험을 수행하였다.
- [0021] 그 결과, 대사산물(GlcN6P)을 적게 생산하여 *glmS* 리보자임이 활성화되지 않는 변이균주의 경우, *FCY1* 유전자로부터 시토신 디아미네이즈가 발현되어 외부에서 넣어준 플루오로사이토신(fluorocytosine)을 독성물질인 플루오로우라실(flourouracil)로 전환시켜 세포가 사멸하고, 대사산물을 과생산하여 *glmS* 리보자임이 활성화되는 경우 효소작용으로 *FCY1* 유전자를 절단하여, 시토신 디아미네이즈(Fcy1p)가 발현되지 않아 세포가 정상적으로 성장하므로, 대사산물을 과생산하는 변이균주를 쉽게 스크리닝할 수 있음을 확인하였다 (도 1).
- [0022] 또한, *glmS* 리보자임 대신 FMN 리보자임을 *FCY1* 유전자와 결합시킨 인공 자살 유전자를, FMN 생성에 관여하는 유전자(*FMN1*)를 함유하는 균주에 도입하였을 때에도 인공 자살 유전자 회로가 정상적으로 작동하여, 대사산물(FMN; flavin mononucleotide) 과생산 변이균주를 쉽게 스크리닝할 수 있음을 확인하였다 (도 6a).
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 자살유전자 및 리보스위치(riboswitch)를 함유하는 인공 자살 유전자 회로가 도입되어 있고, 목적 대사산물 생성에 관여하는 유전자의 변이체를 함유하는 변이균주 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 변이균주 라이브러리를 각각 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 배양된 변이균주 라이브러리 중에서 성장속도가 상대적으로 빠른 변이균주를 목적 대사산물 과생산 변이균주로 선택하는 단계를 포함하는, 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 목적 대사산물을 과생산하는 변이균주에서는 과생산된 목적 대사산물이 리보스위치(riboswitch)와 결합하여 상기 인공 자살 유전자 회로를 억제시키고, 목적 대사산물의 생산이 없거나 적은 변이균주에서는 상기 인공 자살 유전자 회로가 작동하여 상기 변이균주의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서, 자살 유전자 회로의 제작을 위해, *glmS* 리보자임을 코딩하는 유전자가 삽입된 벡터를 증폭시키고, 이를 효모에 도입하여 효모가 가지고 있는 *FCY1* locus에 삽입시켜 형질전환 하였다. 그 결과, *FCY1*의 pre-mRNA의 3'UTR(untranslated region)부위에 *glmS* 리보자임이 삽입된 자살 유전자 회로가 구성되었다.
- [0026] 리보스위치(riboswitch)는 mRNA의 일부로 구성되고, 작은 리간드에 의존(ligand-dependent)하여 mRNA의 번역을

조절하는 구조물로, 리간드로 작용하는 세포 내 대사물질과 결합하여 mRNA의 입체 구조를 변형시킴으로써, 유전자의 발현을 조절한다. 예를 들어, rho-비의존적인 전사 종결과 같이 유전자 전사(transcription)의 종결이 정상상태보다 빨리 일어나거나, mRNA상에서 리보솜이 결합하는 부위를 접어 리보솜이 결합하지 못하게 하여 단백질로의 번역(translation)이 개시되는 것을 막는다. 또한, RNA 구조의 변형으로 인해 pre-mRNA의 이어맞추기(splicing)에 영향을 줄 수도 있고, mRNA의 분해 속도에 영향을 미치는 등 다양한 방법으로 유전자의 발현을 조절하게 된다.

[0027] 리보자임(ribozyme)은 RNA(ribonucleic acid)의 'ribo'와 효소(enzyme)의 'zyme'의 합성어이다. 효소의 활성을 갖는 리보자임은, 다른 생체분자의 반응을 진행시키는 촉매의 역할을 하거나(trans-acting), 자기접합 또는 자기절단 반응과 같이 분자내 촉매(cis-acting)로 작용하게 된다.

[0028] *glmS* 리보자임은 리보스위치(riboswitch)이면서 동시에 효소처럼 작용하는 RNA 분자이다. 리간드인 대사물질(GlcN6P)이 리보스위치의 활성부위(active site)가 아닌 다른 자리에 작동체분자(effector molecule)로서 결합하면(allosterically-bound) 효소로서 활성화되어, 자기절단(self-cleavage)반응을 한다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에서, 자살유전자 회로의 구성요소로 이용된 *glmS* 리보자임은, 이에 특이적으로 결합하는 리간드인 glucosamine-6-phosphate(GlcN6P)의 농도가 높아져 *glmS* 리보자임과 결합하면 자기 자신의 RNA phosphodiester backbone을 절단(self-cleavage)하여 단백질로의 번역을 막는다. 이와 같은 *glmS* 리보자임의 성질을 이용하여, 본 발명에서는 *FCYI*의 pre-mRNA상에 *glmS* 리보자임이 존재하도록 균주를 형질전환시키고, *glmS* 리보자임이 GlcN6P와 결합하면 *FCYI*의 ORF(open reading frame)을 절단하여 핵산말단 가수분해효소인 3'-exonuclease에 노출되어 분해되게 함으로써 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)가 더 이상 발현되지 않도록 하였다 (도 1a).

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 바람직하게는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)인 것을 특징으로 할 수 있다. 그러나, 인공 자살 유전자 회로가 도입될 수 있는 균주는 효모에 한정되지 않으며, 유용한 대사물질을 생성능을 갖는 다양한 원핵세포 및 진핵세포에 도입될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 리보스위치(riboswitch)는 목적 대사산물과 결합한 후 자살 유전자를 효소 작용으로 절단하는 리보자임(ribozyme)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서는 자살유전자에 삽입(integrate)되는 리보스위치로 *glmS* 리보자임을 사용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 목적 대사산물에 따라 이와 특이적으로 결합하는 여러 종류의 리보스위치로 대체될 수 있다. 코발아민(cobalamine), cyclic d-GMP, FMN(flavin mononucleotide), 글루타민(glutamine), 글라이신(glycine), 라이신(lysine), PreQ1, 퓨린(purine), SAH(S-adenosylhomocysteine), SAM(S-adenosyl methionine), SAM-SAH, 테트라하이드로엽산(tetrahydrofolate), TPP(thiamine pyrophosphate) 등으로 구성된 군에서 선택되는 리간드와 결합하는 다양한 리보스위치로 대체될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 보다 바람직하게는, 자기절단(self-cleavage)이 가능한 FMN ribozyme, hairpin ribozyme, hammerhead ribozyme, hepatitis delta virus(HDV) ribozyme, Varkud satellite(VS) ribozyme, Beta-globin co-transcriptional cleavage(CotC) ribozyme, twister ribozyme, leadzyme 등으로 구성된 군에서 선택되는 리보자임으로 대체될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명에 있어서, 더욱 바람직하게는 상기 리보자임(ribozyme)은 GlcN6P와 결합하는 *glmS* 리보자임이거나, *glmS* 리보자임과 같이 대사물질과 결합하여 자기절단 효소작용을 나타내는 hammerhead allosteric ribozyme인 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, FMN, ATP, theophylline, tetracyclin, xanthine, TMPyP4, light and caged theophylline, ERK2 phosphorylated/unphosphorylated, HCV helicase/replicase, Tat protein, cAMP, cCMP, cGMP, 3-methylxanthine, caffeine, aspartame, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , 및 Light and (BDHP-COOH or BCPD-COOH) 등으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 작동체분자(effector molecule)와 결합하는 hammerhead allosteric ribozyme으로 대체될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 리보스위치는 자살 유전자의 pre-mRNA의 3'UTR(untranslated region) 부위에 삽입되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 상기 리보스위치는 자살 유전자의 pre-mRNA의 3'UTR(untranslated region) 부위에 삽입되는 것이 바람직하다. 진핵세포의 번역(translation)은 원핵세포와는 다르게 5'끝에서부터 스캔이 시작되므로 가장 처음으로 나타나는 시작 코돈(start codon) AUG에서부터 번역이 시작되어, 5'UTR 부위에 리보스위치가 삽입될 경우 잘못된 위치에

서 번역이 시작되어 목표로 하는 자살 유전자가 제대로 발현되지 않게 된다. 따라서 리보스위치를 3'UTR 부위에 삽입하는 것이 pre-mRNA의 효율적인 불안정화에 유리하다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 자살유전자는 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase), 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase), 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase), 우라실 포스포리보실 트랜스퍼레이즈(uracil phosphoribosyl transferase), 및 뉴클레오사이드 다이포스포카이네이즈(nucleoside diphosphokinase)를 코딩하는 유전자로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 사용될 수 있는 자살유전자의 종류는 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase)를 코딩하는 *tdk* 및 HSV-tk, 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase)를 코딩하는 *tmk*, 우라실 포스포리보실 트랜스퍼레이즈(uracil phosphoribosyl transferase)를 코딩하는 *upp* 또는 *fur1*, 뉴클레오사이드 다이포스포카이네이즈(nucleoside diphosphokinase)를 코딩하는 *ndk* 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 시토신 디아미네이즈를 코딩하는 유전자인 *FCYI*이 이용될 수 있다. 효모에서 시토신 디아미네이즈를 코딩하는 유전자의 이름은 *FCYI*이고, 이와 상동성(homology)을 갖는 시토신 디아미네이즈를 코딩하는 유전자는 다른 미생물에도 흔히 존재한다. 예를 들어, 대장균(*E. coli*)에서는 *codA*이고, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에서는 *FCAI*이다.

[0039] 본 발명에 있어서, 배양시 외부 조절인자를 첨가하여 상기 인공 자살 유전자 회로의 작동 범위를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 자살 유전자가 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)를 코딩하는 유전자인 경우, 상기 외부 조절인자는 플루오로사이토신(fluorocytosine)이고;

[0040] 자살 유전자가 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase) 또는 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase)를 코딩하는 유전자인 경우, 상기 외부 조절인자는 dideoxythymidine, trifluoromethylthymidine, ethyldeoxyuridine, bromovinyldeoxyuridine, bromovinyl-arabinouracil, 및 ganciclovir로 구성된 군에서 선택되는 피리미딘 뉴클레오사이드 유사체(pyrimidine nucleoside analog) 또는 구아노신 유사체(guanosine analog)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서 사용된 자살유전자인 *FCYI* 유전자가 코딩하는 시토신 디아미네이즈는, 시토신(cytosine)에서 아민기를 가수분해로 제거하여 우라실(uracil)로 만드는 효소로, 세포 외부에서 cytosine analog인 플루오로시토신(fluorocytosine)을 첨가해주면, 아민기를 제거하여 플루오로우라실(fluorouracil)로 변환시킨다. 플루오로우라실은 세포 내에서 독성을 나타내어 RNA의 기능 장애를 가져와 세포의 자살(사멸)을 유도하게 된다. 따라서, 플루오로시토신은 자살 유전자 회로의 작동을 조절하는 조절인자로서의 역할을 하고, 첨가해주는 플루오로시토신의 농도에 따라 자살 유전자 회로의 작동범위를 조절하는 것이 가능하다.

[0042] 자살유전자가 시토신 디아미네이즈를 코딩하는 유전자가 아닌 다른 유전자인 경우에는, 플루오로시토신이 아닌 다른 외부 조절인자를 첨가해 주어야 한다. 예를 들어, 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase) 또는 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase)를 코딩하는 유전자인 *tmk* 또는 *tkd*를 사용하는 경우, dideoxythymidine, trifluoromethylthymidine, ethyldeoxyuridine, bromovinyldeoxyuridine, 또는 bromovinyl-arabinouracil 포함하는 피리미딘 뉴클레오사이드 유사체(pyrimidine nucleoside analog)중 하나를 첨가하여, 이들의 thymidine 부분을 인산화시킴으로써 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 또 다른 예로, HSV-tk 유전자를 사용하는 경우 구아노신 유사체(guanosine analog)인 ganciclovir를 첨가해 주면 인산화된 화합물로 변환되어 DNA 합성의 연쇄 중절을 일으켜 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에서, 대사산물 과생산 변이균주의 경우 *glmS* 리보자임이 GlcN6P와 결합하면 *FCYI*의 ORF(open reading frame)을 절단하여 시토신 디아미네이즈가 더이상 발현되지 않아, 플루오로시토신을 첨가해 주어도 플루오로우라실로 변환되지 않아 세포가 사멸하지 않고, 이에 따라 콜로니의 성장속도가 상대적으로 빠르게 나타나므로 쉽게 스크리닝할 수 있었다. 반면, 대사산물을 거의 생산하지 못하는 변이균주의 경우 *glmS* 리보자임의 효소 작용이 없어 시토신 디아미네이즈가 그대로 발현되므로, 플루오로시토신을 첨가해주면 플루오로우라실로 변환되어 그 독성에 의해 세포가 사멸하게 되는 것을 확인하였다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 목적 대사산물의 생성에 관여하는 유전자는 fructose-6P를 GlcN6P로 변환시키는 GFA1을 코딩하는 유전자 또는 리보플라빈(riboflavin)을 FMN으로 변환시키는 FMN1를 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0045] 대사공학에서 유용한 대사물질을 생산하고자 할 때에는 합리적 설계방식 또는 무작위 스크리닝 방법의 두 가지 방법으로 균주를 조작하게 된다. 무작위 스크리닝 방법은 대상 균주의 정확한 대사물질의 합성 경로나 세포 생장에 핵심이 되는 해당과정에 대한 정보가 부족하여도 적용할 수 있다는 장점이 있어, 산업적으로 유용한 대사

산물들을 생산하고자 하는 연구 등에서 많이 이용되어 왔다. 무작위 스크리닝 방법은 균주의 특정 유전자에 무작위적으로 다른 형질을 나타내는 변이체를 만들 수 있는 방법들을 적용하는 단계와, 발현된 변이체들 중 원하는 형질을 나타내는 균주만 선택하는 단계 두 과정을 거치게 된다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에서, 효모 내 중간 대사물질인 fructose-6P를 GlcN6P로 변환시키는 glutamine-fructose-6-phosphate transaminase를 코딩하는 *GFA1* 유전자 (도 1b)를 무작위적으로 변이시켜 GlcN6P를 과생산할 수 있는 변이체를 생성하기 위해, 무작위적인 점 변이(point mutation)를 일으키는 실수유발 PCR(error-prone PCR)을 이용하여 변이체들을 생성한 후, 자살 유전자 회로가 도입된 균주(효모)에 도입하여 변이균주 라이브러리를 구축하였다. 그 결과, 어떤 변이균주는 GlcN6P를 과생산하여 자살 유전자 회로가 억제되고, 어떤 변이균주는 GlcN6P를 거의 생산하지 못하여 자살 유전자 회로가 작동하여, 변이균주마다 성장속도에 차이를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0047] 마찬가지로, 본 발명의 일 실시예에서, *glmS* 리보자임 대신 FMN 리보자임을 자살유전자에 삽입하여 균주에 도입하였을 때에도 인공 자살 유전자 회로가 작동할 수 있음을 확인하였는바, 효모 내 중간 대사물질인 리보플라빈(riboflavin)을 FMN(flavin mononucleotide)로 변환시키는 FMN1을 코딩하는 *FMN1* 유전자에 대해서도 실수유발 PCR을 통해 변이체들을 생성한 후, 자살 유전자 회로가 도입된 균주(효모)에 도입하여 변이균주 라이브러리를 구축하면, 성장속도가 빠른 변이균주를 스크리닝할 수 있음은 당업자에게 자명하다고 할 것이다.

[0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 인공 자살 유전자 회로 및 GFA1 변이체들이 도입된 변이균주 라이브러리를 배양한 결과, 서열번호 2의 GFA1 변이체를 가지는 GFA1-m1 균주, 서열번호 3의 GFA1 변이체를 가지는 GFA-m9 균주, 서열번호 4의 GFA1 변이체를 가지는 GFA1-m12 균주가 가장 높은 성장효율을 보여, 이들의 변이된 GFA1 서열을 시퀀싱하였다. 그 결과, 서열번호 1의 wildtype 아미노산 서열과 비교하였을 때, 두 개의 보존된 변이(conserved mutation)인 Q96H와 Q157R이 관찰되었다.

[0049] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에서, Q96H 및 Q157R의 아미노산 변이를 포함하는 GFA1 변이체에 관한 것이고, 바람직하게는, 서열번호 2~4중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 GFA1 변이체를 코딩하는 유전자를 함유하는 GlcN6P 과생산 변이균주에 관한 것이다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서, GFA1 변이체가 도입된 균주 중 가장 성장효율이 좋았던 GFA1-m12 균주에 다양한 종류의 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자를 각각 도입하여 변이균주 라이브러리를 구축하였다. HAD phosphatase는 GlcNAc6P(N-acetylglucosamine-6-phosphate)를 GlcNAc(N-acetylglucosamine)로 변환시키는 효소인데 (도 1b), wildtype의 효모에는 HAD phosphatase가 존재하지 않아 GlcNAc를 생산할 수 없다. 그러나 본 발명에서, HAD phosphatase를 코딩하는 유전자를 효모에 도입하면 HAD phosphatase에 의해 GlcNAc6P가 GlcNAc로 변환되는 과정에서 효모 내 GlcN6P 농도는 줄어들어 결국 자살 유전자 회로가 작동하게 되고, 이에 따라 성장속도가 느린 콜로니를 선택함으로써 GlcNAc를 과생산하는 변이균주를 스크리닝할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 효과를 가장 잘 나타내는 변이균주가 생성하는 HAD phosphatase의 서열을 분석한 결과, 서열번호 5의 YqaB 또는 서열번호 6의 YihX임을 알 수 있었다.

[0052] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 GlcN6P 과생산 변이균주에, 다양한 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자를 도입하여 변이균주 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 변이균주 라이브러리를 각각 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 배양된 변이균주 중에서 성장속도가 상대적으로 느린 변이균주를 GlcNAc 과생산 변이균주로 선택하는 단계를 포함하는, GlcNAc를 과생산하는 변이균주의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, HAD phosphatase YqaB 또는 YihX를 코딩하는 유전자를 함유하는 GlcNAc 과생산 변이균주에 관한 것이다.

[0053] [실시예]

[0054] 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.

[0055] 한편, 하기 실시예에서는 자살유전자로 시토신 디아미네이즈(cytosine deaminase)를 코딩하는 유전자인 *FCY1* 만

을 예시하였으나, 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase), 티미딜레이트 카이네이즈(thymidylate kinase), 우라실 포스포리보실 트랜스퍼레이즈(uracil phosphoribosyl transferase), 또는 뉴클레오사이드 다이포스포카이네이즈(nucleoside diphosphokinase)를 코딩하는 유전자로 대체 가능하다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[0056]

또한, 하기 실시예에서는 자살유전자에 삽입되는 리보자임으로 *glmS* 또는 FMN 리보자임을 예시하였으나, 이들과 같이 대사물질과 결합하여 자기절단 효소작용을 수행할 수 있는 다른 리보자임, 예를 들어 FMN, ATP, theophylline, tetracyclin, xanthine, TMPyP4, light and caged theophylline, ERK2 phosphorylated/unphosphorylated, HCV helicase/replicase, Tat protein, cAMP, cCMP, cGMP, 3-methylxanthine, caffeine, aspartame, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Light and (BDHP-COOH or BCPD-COOH) 등으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 작동체분자(effector molecule)과 결합하는 리보자임으로 대체 가능하다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[0057]

실시예 1: 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4742 균주에 도입하기 위한 자살 리보스위치의 제작

[0058]

1-1. *glmS* 리보자임을 이용한 자살 리보스위치의 제작

[0059]

먼저, Klenow fragment (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여, *glmS* 리보자임을 클로닝하기 위해, 20개의 염기쌍이 겹치는 두 개의 DNA 프라이머를 첨가하고 상온에서 결합(anneal)시켰다. 결합된 프라이머는 3'말단을 채워넣기 위한 Klenow fragment와 함께 향온시켰다. 1시간동안 반응시킨 후, *glmS* 리보자임 서열이 함유된 3'말단이 채워진 프라이머 콤플렉스(complex)를 제한효소를 이용하여 절단하고 플라스미드에 접합(ligate)시켰다. *glmS* 리보자임 서열 뒤에 *URA3* cassette가 있는 플라스미드를, 중합효소연쇄반응(PCR)의 주형으로 사용하여 증폭시켰다. 증폭된 *glmS* 리보자임 유전자 조각을 효모에 도입하여 효모의 유전자 상에 삽입하기 위해, 상동재조합을 위한 45개의 염기쌍의 homology arm을 포함하는 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 증폭하였다.

[0060]

삽입될 유전자 조각을 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742에 도입하여 균주를 형질전환(transformation)하였고, 자살 리보스위치가 효모의 유전자에 삽입되었는지 확인하기 위해 SD-URA medium (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.77 g/L CSM-URA dropout mixture) plate에서 배양된 콜로니를 선택하였다. 그 결과, BY4742 균주에서 *glmS* 리보자임이 *FCY1* locus의 3'UTR(untranslated region)위치에 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

[0061]

또한, 자살 리보스위치가 제대로 작동하는지 알아보기 위해, 세포 내 GlcN6P의 농도에 따라 자살 리보스위치가 도입된 세포의 성장률이 달라지는지 확인하는 실험을 하였다. 플루오로사이토신(fluorocytosine) 존재 하에, 글루코사민(GlcN)을 외부에서 배양배지에 첨가해 주어, 세포 내 hexokinase에 의해 GlcN6P로 전환되도록 하였다. 그 결과, GlcN6P 농도가 높을수록, *glmS* 리보자임이 자기절단 작용을 하여 시토신 디아미네이즈가 생성되지 않아 성장률이 높은 것을 확인할 수 있었다 (도 2a). 또한, 660nm에서의 흡광도도 GlcN 농도에 따라 달라짐을 확인할 수 있었다 (도 2b).

[0062]

1-2. FMN 리보자임을 이용한 자살 리보스위치의 제작

[0063]

실시예 1-1에서와 동일한 방법을 이용하여, *FCY1* 유전자의 3'UTR 위치에 FMN 리보자임이 삽입되게 하였고, 자살 리보스위치가 제대로 작동하는지 알아보기 위해, 세포 내 FMN 농도에 따라 자살 리보스위치가 도입된 세포의 성장률이 달라지는지 확인하는 실험을 하였다.

[0064]

먼저, FMN을 외부에서 배양배지에 첨가해 주었다. 그 결과, 첨가해준 FMN 농도가 높을수록, FMN 리보자임이 자기절단 작용을 하여 시토신 디아미네이즈가 생성되지 않아 효모의 성장률이 높아지고, 흡광도도 높아지는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0065]

또한, FMN1 유전자를 p413GPD 플라스미드에 클로닝한 후, FMN 자살 리보스위치가 도입된 균주에 형질전환하여, FMN이 세포 내에서 생성되게 하였고, 플루오로사이토신을 처리해 주었다. 그 결과, FMN이 존재하는 경우, FMN 리보자임이 자기절단 작용을 하여 시토신 디아미네이즈가 생성되지 않아 성장률이 높은 것을 확인할 수 있었다 (도 6b). 또한, FMN의 생성에 따라 660nm에서의 흡광도도 높아짐을 확인할 수 있었다 (도 6c).

[0066] **실시예 2: *GFA1* 변이체 라이브러리와 HAD phosphatase 라이브러리의 제작**

[0067] 점돌연변이를 무작위로 발생시키는 실수유발 PCR(error-prone PCR)를 이용하여, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 *GFA1* 변이체 라이브러리를 생성하였다. 먼저, 효모의 *GFA1*를 p415TEF 플라스미드에 클로닝하고, 이것을 Genomorph II Random Mutagenesis kit (Agilent, CA, USA)를 이용한 실수유발 PCR의 주형으로 사용하였다. PCR 증폭산물을 Mighty Mix (Takara)를 이용하여 p415TEF 플라스미드에 접합(ligate)하였고, 이 플라스미드를 수용성이 뛰어난(highly competent) *E. coli* DH5α HIT Competent Cells (RBC, Banqiao City, Taipei County, Taiwan)에 형질전환하여 플라스미드를 최대로 회복시켰다.

[0068] *E. coli*로부터 유래하는, HAD11을 제외한 23가지의 HAD phosphatase는 p413GPD 플라스미드에 클로닝하였고, HAD phosphatase의 라이브러리 생성을 위해 각 HAD phosphatase를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드들을 분리한 후 함께 혼합하였다.

[0069] **실시예 3: *GFA1* 변이체 라이브러리와 HAD phosphatase 라이브러리의 구축 및 스크리닝 과정**

[0070] *GFA1* 변이체 또는 HAD phosphatase를 코딩하는 플라스미드를 BY4742 FGU (*glmS* 자살 리보스위치를 함유하는 BY4742) 균주에 도입하였다. 먼저, BY4742 FGU 균주를 30℃의 YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)에서 배양시키고, 형질전환을 위해 기하급수적으로 성장하는 세포들을 250rpm에서 원심분리하여 수집했다. *GFA1* 변이체 라이브러리를 BY4742 FGU 균주에 형질전환시키고, 형질전환체들은 SD-LEU-URA medium (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.67 g/L CSM-LEU-URA dropout mixture) plate에서 스크리닝하였다.

[0071] HAD phosphatase 라이브러리는 가장 효율이 좋은 GFA1-m12 균주에 형질전환하였고, SD-HIS-LEU-URA medium (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.60 g/L CSM-HIS-LEU-URA dropout mixture) plate에서 스크리닝하였다.

[0072] **실시예 4: 자살 리보스위치가 도입된 변이균주의 성장 관찰**

[0073] 자살 리보스위치가 도입된 BY4742 FGU 균주 및 다른 균주들을 최소 배지(minimal media)에서 배양하였다. BY4742 FGU를 배양하기 위해, 5mg/L의 플루오로시토신(flucytosine)이 첨가된 SD-URA 배지를 사용했고, 접종 2일 후에 흡광도를 측정하였다. *GFA1* 변이체 라이브러리를 스크리닝하기 위해 10mg/L의 플루오로시토신이 첨가된 배지를 사용하였고, HAD phosphatase 라이브러리를 스크리닝하기 위해 20mg/L의 플루오로시토신이 첨가된 배지를 사용하였다 (도 2c).

[0074] *GFA1* 변이체 라이브러리가 도입된 균주를 배양한 결과, 14개의 콜로니가 크기 순으로 분리되었고, 이들의 성장 상태를 비교하였다. 흡광도를 측정한 결과, GFA1-m1(서열번호 2), GFA1-m9(서열번호 3), GFA1-m12(서열번호 4) 균주가 GlcN6P를 가장 많이 생산하여 가장 높은 성장률을 나타냈고 (도 3a), 이들의 변이된 *GFA1* 서열을 시퀀싱하였다 (도 3b). 그 결과, 두 개의 보존된 변이(conserved mutation)인 Q96H와 Q157R이 세 가지 균주에서 공통적으로 관찰되었다. 이와는 독립적으로 배양된 GFA1-m15와 GFA1-m16 균주에서도 마찬가지로 Q96H와 Q157R 두 개의 보존된 변이가 관찰되었다 (도 3b).

[0075] 또한, HAD phosphatase 라이브러리가 도입된 GFA1-m12 균주에 대해서도, 총 12개의 콜로니가 분리되었고 흡광도를 측정하였다. 그 결과, HAD #4, HAD #6, HAD #7, HAD #8의 흡광도가 감소하여, GlcN6P의 생산이 줄어들었음을 확인할 수 있었다 (도 4a). 또한, 이들이 GlcNAc를 생산하는지 분석하였다. 그 결과, HAD phosphatase가 도입되지 않은 BY4742 FGU가 GlcNAc를 전혀 생산하지 못하는 반면, HAD #7, HAD #8에서는 GlcNAc의 생산이 증가했음을 알 수 있었고, HAD #7, HAD #8에서 생산된 HAD phosphatase의 서열분석 결과 HAD phosphatase중 각각 YqaB(서열번호 5)와 YihX(서열번호 6)가 도입되었다는 것을 확인할 수 있었다 (도 4d).

[0076] **실시예 5: HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용한 GlcNAc 농도 측정**

[0077] 실시예 4에서 GlcNAc의 생성은 고성능액체크로마토그래피(HPLC; high performance liquid chromatography)를 이용하여 측정하였다. 세포 내 GlcNAc는 끓는 에탄올을 이용하는 방법으로 추출하였고, speed vacuum concentrator (Hanil, Incheon, Korea)를 이용하여 농축하였다. 농축된 세포 내 대사산물을 물에 용해시키고

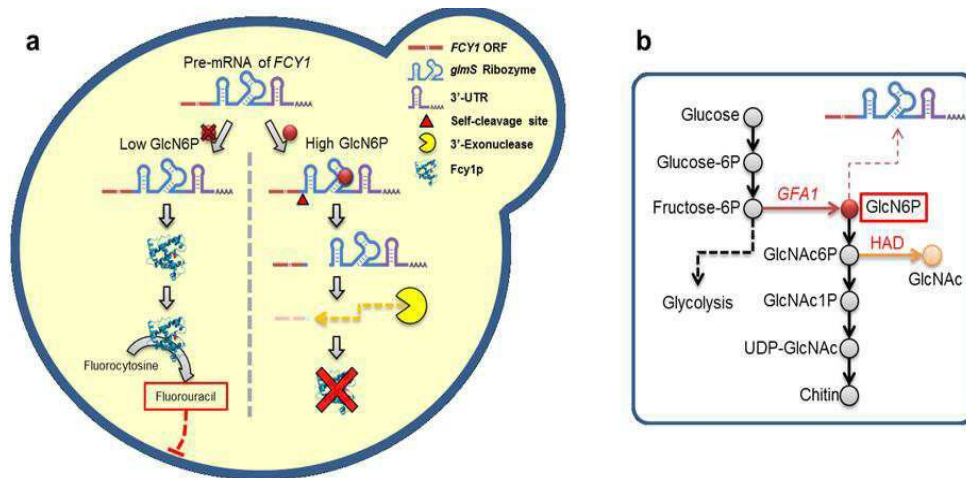
HPLC (YL instrument, Anyang, Korea)에 의해 분석하였다. GlcNAc 농도는 10mM H₂SO₄ 용액을 용리액으로 이용하는 RI detector와 hodex SUGAR SH1011 column (8.0mm x 300mm)을 사용하여 분석하였다.

[0078]

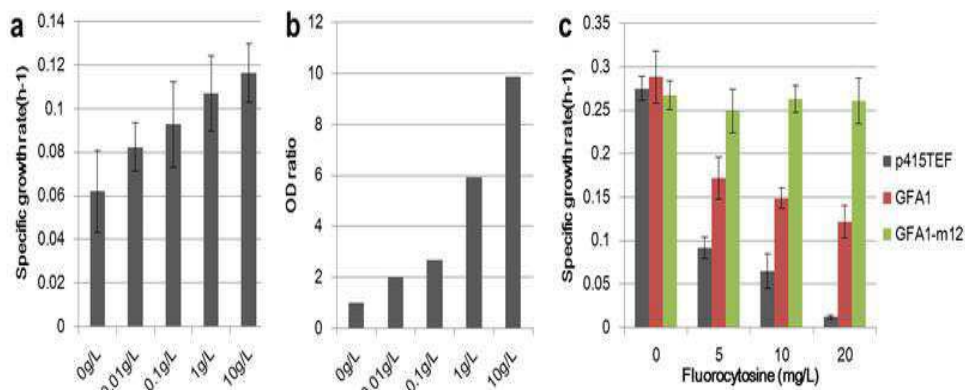
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

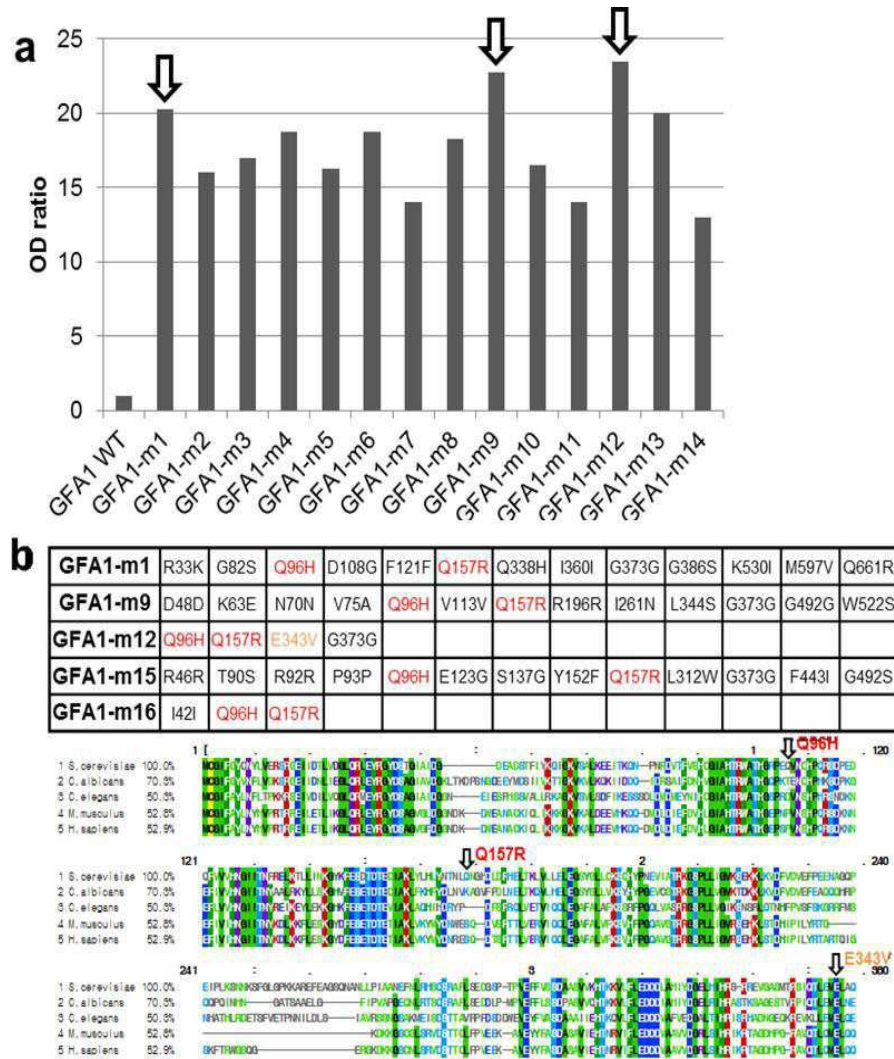
도면1



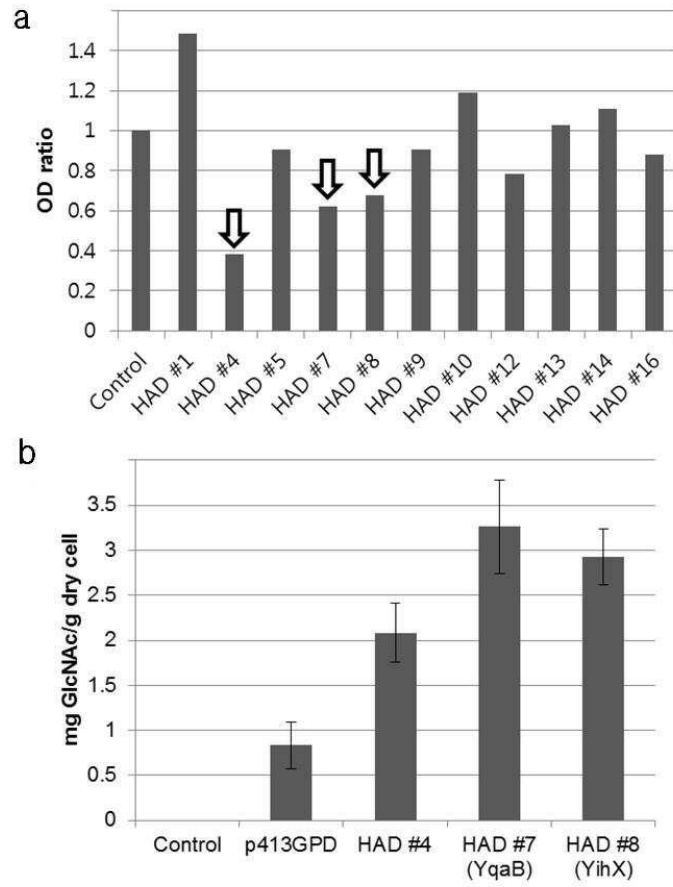
도면2



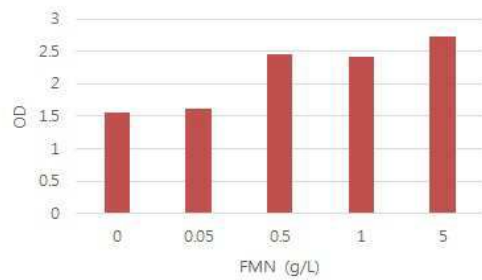
도면3



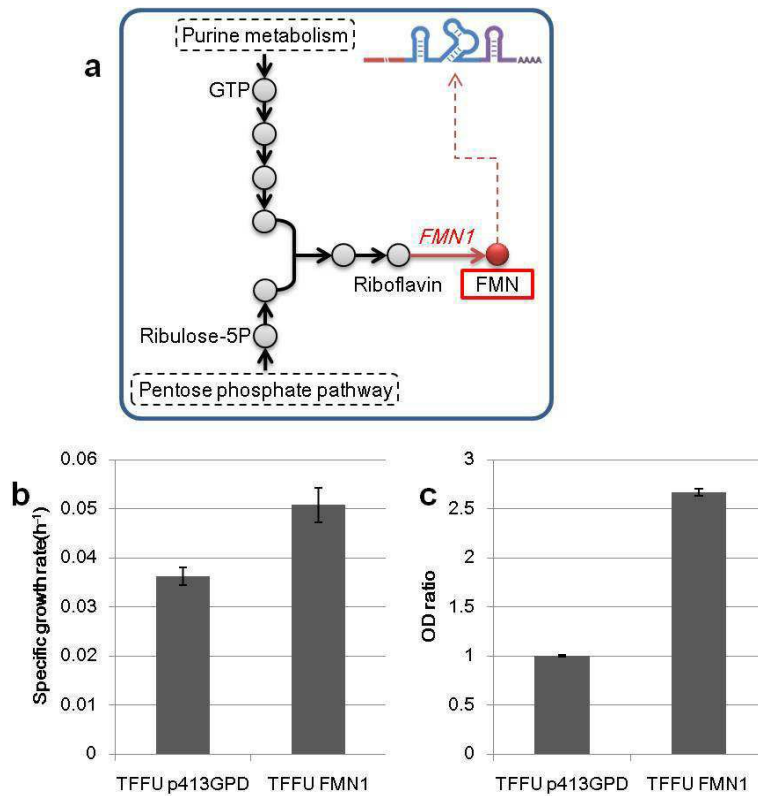
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Screening Mutant Microorganism Overproducing Target Metabolite Using Synthetic Suicide Genetic Circuit
- <130> P14-B168
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 717
- <212> PRT
- <213> GFA1 from *Saccharomyces cerevisiae*
- <400> 1

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> 2

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFA1-m1

<400> 2

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> 3

<211> 717

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> GFA1-m9

<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 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> 4

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFA1-m12

<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										
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										
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										
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										
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
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
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> 5
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> HAD phosphatase YqaB
 <400> 5

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> 6

<211> 199

<212> PRT

<213> HAD phosphatase YihX

<400> 6

Met Leu Tyr Ile Phe Asp Leu Gly Asn Val Ile Val Asp Ile Asp Phe
1 5 10 15
Asn Arg Val Leu Gly Ala Trp Ser Asp Leu Thr Arg Ile Pro Leu Ala

20	25	30	
Ser Leu Lys Lys Ser Phe His Met Gly Glu Ala Phe His Gln His Glu			
35	40	45	
Arg Gly Glu Ile Ser Asp Glu Ala Phe Ala Glu Ala Leu Cys His Glu			
50	55	60	
Met Ala Leu Pro Leu Ser Tyr Glu Gln Phe Ser His Gly Trp Gln Ala			
65	70	75	80
Val Phe Val Ala Leu Arg Pro Glu Val Ile Ala Ile Met His Lys Leu			
85	90	95	
Arg Glu Gln Gly His Arg Val Val Val Leu Ser Asn Thr Asn Arg Leu			
100	105	110	
His Thr Thr Phe Trp Pro Glu Glu Tyr Pro Glu Ile Arg Asp Ala Ala			
115	120	125	
Asp His Ile Tyr Leu Ser Gln Asp Leu Gly Met Arg Lys Pro Glu Ala			
130	135	140	
Arg Ile Tyr Gln His Val Leu Gln Ala Glu Gly Phe Ser Pro Ser Asp			
145	150	155	160
Thr Val Phe Phe Asp Asp Asn Ala Asp Asn Ile Glu Gly Ala Asn Gln			
165	170	175	
Leu Gly Ile Thr Ser Ile Leu Val Lys Asp Lys Thr Thr Ile Pro Asp			
180	185	190	
Tyr Phe Ala Lys Val Leu Cys			

195