(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0023084
(43) 공개일자 2024년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/78 (2006.01) *C12N 1/38* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/78 (2013.01)
C12N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0019216(분할)
(22) 출원일자 2024년02월07일
심사청구일자 2024년02월07일
(62) 원출원 특허 10-2021-0046799
원출원일자 2021년04월09일
심사청구일자 2021년04월09일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이성국
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
찬드란사테쉬프라부
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

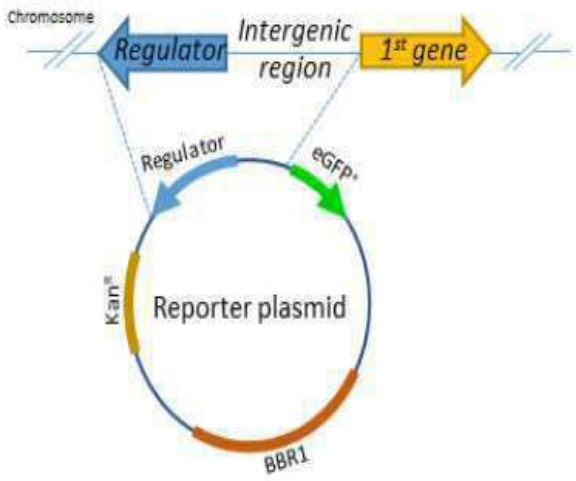
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **슈도모나스 푸티다 균주에서 탄소원 유도 발현이 가능한 발현 카세트 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템**

(57) 요 약

본 발명은 슈도모나스 푸티다 균주에서 탄소원 유도 발현이 가능한 발현 카세트 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 발현 카세트, 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체를 이용함으로써, 저비용의 탄소원 기질을 유도체로 하여 안정적이고 효율적으로 유전자를 발현시킬 수 있으며 상기 형질전환체를 배양하는 데 있어서 탄소원 기질의 농도를 조절함으로써 유전자 발현을 조절할 수 있다. 따라서, 본 발명의 발현 카세트, 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체는 미생물을 이용한 생화학 물질 생산에 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김도윤

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

티와리라메쉬와르

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119420
과제번호	2020R1A4A1018332
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	합성곱 신경망 기반 바이오 에너지 생산 기초 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.07.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주용 발현 카세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 LvaR 전사인자는 서열번호: 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 슈도모나스 균주용 발현 카세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 P_{lvaA} 프로모터는 서열번호: 6으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 슈도모나스 균주용 발현 카세트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 발현 카세트는 LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 것인, 슈도모나스 균주용 발현 카세트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 슈도모나스 균주가 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440인 것인, 슈도모나스 균주용 발현 카세트.

청구항 6

제1항의 발현 카세트를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 7

제6항의 발현 벡터를 포함하는, 형질전환체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 형질전환체는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440인 것인, 형질전환체.

청구항 9

LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 4-하이드록시발레르산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는, 유전자 발현 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 배양 단계에서 탄소원이 4-하이드록시발레르산인 경우 1 mM 내지 20 mM 의 농도로 배지에 포함되는, 유전자 발현 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 슈도모나스 푸티다 균주에서 탄소원 유도 발현이 가능한 발현 카세트 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자연계의 화학 물질 자원 고갈과 화학 물질 생산에 따른 환경 문제가 대두되면서 재생 가능하고 친환경적인 생물자원에서 화학 물질을 대량으로 생산하는 바이오 기반의 산업들이 과학계에서 큰 관심을 받고 있다. 특히, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 균주는 신진대사의 다양성과 폭넓은 적용 가능성을 가지고 있으며 GRAS(Generally Regarded as Safe) 미생물로서 차세대 합성 생물학 숙주 또는 산업 균주로 평가받고 있다(Nikel *et al.*, *Metabolic Engineering*, 50, 142-155, 2018).

[0003] 구체적으로, 슈도모나스 푸티다 균주는 에너지 생성 과정에 의한 산화 스트레스에 강하며, 유기 용매 및 방향족 화합물에 대한 뛰어난 내성을 가지고 있다. 또한, 슈도모나스 푸티다 균주는 신진대사 중 형성하는 부산물이 적으며 ED(Entner-Doudoroff) 경로를 통한 높은 수율의 NADPH를 포함한다는 것이 특징이다(Blank *et al.*, *Antioxid Redox Signal*, 13, 349-394, 2010).

[0004] 한편, 유전자 발현 시스템은 미생물 기반 화학 물질 생산에 있어 중요한 구성 요소이며, IPTG(isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside)와 같은 화학적 유도제를 첨가하여 유전자 발현을 유도하는 방법이 이용되고 있다. 그러나, IPTG와 같은 화학적 유도제를 첨가하기 위해서는 지속적으로 균주의 성장을 모니터링해야 한다는 점과 화학적 유도제의 첨가에 따른 독성 및 비용 증가 등의 문제가 남아있다(Makrides, *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 60(3), 512-38, 1996).

[0005] 따라서, 미생물을 이용한 생화학 물질의 대규모 생산을 위해 화학적 유도제 없이 안정적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 시스템 또는 방법에 대한 개발이 필요한 실정이다. 또한, 미생물을 이용한 생합성 과정에서 이용되는 기질과 이를 통해 생산된 생산물에 대한 안정적인 유전자 발현 시스템은 미생물의 생합성을 이용하는 모든 분야의 산업에서 쓰일 수 있으므로 지속적인 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Nikel et al., Metabolic Engineering, 50, 142-155, 2018

(비특허문헌 0002) Blank et al., Antioxid Redox Signal, 13, 349-394, 2010

(비특허문헌 0003) Makrides, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 60(3), 512-38, 1996

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 슈도모나스 균주에서 안정적으로 유전자를 발현하는 방법에 대해 연구한 결과, 탄소원 기질을 유도제로 하는 유전자 발현 카세트 및 이를 포함한 발현 벡터를 슈도모나스 푸티다 균주에 도입시켜 유전자 발현이 안정적이고, 발현이 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성시켰다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, i) HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자; 또는 ii) HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자; 또는 iii) LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주용 발현 카세트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 측면은, 상기 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은, HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 포도당, 또는 포도당과 자일로스, 4-하이드록시발레르산, 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 혼합물의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면은, HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면은, LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 4-하이드록시발레르산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 발현 카세트, 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체를 이용함으로써, 저비용의 탄소원 기질을 유도제로 하여 안정적이고 효율적으로 유전자를 발현시킬 수 있으며 상기 형질전환체를 배양하는 데 있어서 탄소원 기질의 농도를 조절함으로써 유전자 발현을 조절할 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명의 발현 카세트, 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체는 미생물을 이용한 생화학 물질 생산에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 탄소원 기질 유도성 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터의 모식도이다.

도 2는 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 카세트를 포함하는 유전자 단편을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 3은 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트를 포함하는 유전자 단편을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 4는 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 유전자 단편을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 5는 #384 균주의 다양한 탄소원 기질 존재 하에 유전자 발현량을 비교한 것이다.

도 6은 #384 균주의 포도당 또는 포도당과 다른 탄소원 기질의 혼합물 존재 하에 유전자 발현량을 비교한 것이다.

도 7은 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현 또는 비발현 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 8은 #384 균주의 포도당 농도별 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 확인한 것이다.

도 9는 #414 균주의 다양한 탄소원 기질 존재 하에 유전자 발현량을 비교한 것이다.

도 10은 #414 균주의 3-하이드록시프로피온산 또는 3-하이드록시프로피온산과 다른 탄소원 기질의 혼합물 존재 하에 유전자 발현량을 비교한 것이다.

도 11은 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 12는 #414 균주의 3-하이드록시프로피온산 농도별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 확인한 것이다.

도 13은 #414 균주의 레불린산 농도별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 확인한 것이다.

도 14는 #522 균주의 다양한 탄소원 기질 존재 하에 유전자 발현량을 비교한 것이다.

도 15는 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 16은 #522 균주의 4-하이드록시발레르산 농도별 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 확인한 것이다.

도 17은 LacI/P_{Llac01} 유전자 발현 카세트를 포함하는 유전자 단편을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 18은 슈도모나스 균주의 탄소원 기질 유전자 발현 시스템과 IPTG 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0018] 본 발명의 일 측면은 i) HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자; 또는 ii) HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자; 또는 iii) LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주용 발현 카세트를 제공한다.

[0019] 상기 HexR 전사인자는 전사억제인자로서, *gapA* 유전자, *zwf-pgl-eda* 및 *edd-glk-gltR2* 오페론의 발현을 음성 조절할 수 있으며, HexR 매개 억제는 EDP의 배타적 대사중간체인 KDPG가 HexR에 결합함으로써 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 HexR 전사인자는, 서열번호: 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0020] 상기 HpdR 전사인자는 LysR 타입의 전사활성인자로서, 3-HP 이화 작용을 조절할 수 있으며 3-HP가 HpdR에 결합함으로써, 하위 유전자(downstream gene)의 프로모터 서열과 RNA 중합효소의 결합을 유도시킬 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 HpdR 전사인자는 서열번호: 2로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0021] 상기 LvaR 전사인자는 전사활성인자로서, lvaABCDEFG에 의해 암호화된 lva 오페론에 의해 매개되는 LA 이화 작용을 조절할 수 있으며 LA 및 LA 분해 경로의 중간체인 4-HV와 결합함으로써 유전자 발현을 유도할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 LvaR 전사인자는, 서열번호: 3으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0022] 상기 P_{zwf1} 프로모터는 HexR 전사인자와 결합하는 염기서열이며, 구체적으로 HexR 전사인자를 코딩하는 유전자와 HexR 전사인자가 조절하는 *zwf1* 유전자 사이에 존재할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 P_{zwf1} 프로모터는 서열번호: 4로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0023] 상기 P_{hpdH} 프로모터는 HpdR 전사인자와 결합하는 염기서열이며, 구체적으로 HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자와 HpdR 전사인자가 조절하는 *hpdH* 유전자 사이에 존재할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 P_{hpdH} 프로모터는 서열번호: 5로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0024] 상기 P_{lvaA} 프로모터는 LvaR 전사인자와 결합하는 염기서열이며, 구체적으로 LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자와 LvaR 전사인자가 조절하는 *lvaA* 유전자 사이에 존재할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 P_{hpdH} 프로모터는 서열번호: 6으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어 "전사인자"는 DNA의 특정 부위에 결합하여 유전자의 발현을 촉진하거나 억제하는 단백질을 의미한다. 특히, 전사인자는 DNA-결합 영역(DNA-binding domain, DBD)과 트랜스조절 영역(transregulation domain)을 갖는다.

[0026] 본 발명의 용어 "프로모터"는 유전자의 기본 전사 및/또는 조절 전사에 필요한, 일반적으로 코딩 서열 바로 상류의 DNA 서열을 의미한다. 특히, 프로모터는 전사의 개시를 가능하게 하는 정보를 가지며, 일반적으로 전사 개시 시작 부위 및 중합효소 복합체에 대한 결합 부위를 갖는다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 염기서열은, 서열 목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 여기서, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열로서 70% 이상의 상동성, 구체적으로 80% 이상의 상동성, 보다 더 구체적으로 90% 이상의 상동성을 갖는 서열이며, 이들 상동성 범위에 있는 염기서열도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석된다.

[0028] 본 발명의 용어 "발현 카세트"는 형질전환체에 의해서 발현되는 유전자 및 조절 서열로 구성되는 벡터 DNA로서, 프로모터 서열, 오픈 리딩 프레임, 폴리아데닐화 부위를 포함하는 3' 비번역 영역을 포함할 수 있다.

[0029] 상기 발현 카세트는 HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따르면, 상기 슈도모나스 균주는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 시링가에(*Pseudomonas syringae*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*) 또는 슈도모나스 오리지하비탄스(*Pseudomonas oryzihabitans*)일 수 있다. 구체적으로, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 균주일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440을 이용하였다.

[0031] 본 발명의 다른 측면은, 상기 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0032] 본 발명의 용어 "발현 벡터"는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다.

[0033] 상기 발현 벡터는 종래에 알려진 발현 벡터에 상기 발현 카세트를 도입한 것일 수 있고, 공지의 방법에 의하여 인위적으로 디자인된 재조합 발현 벡터일 수 있다. 상기 발현 카세트를 도입하여 발현 벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.

[0034] 상기 발현 벡터의 제조를 위한 벡터는 상기 발현 카세트를 도입할 수 있는 공지된 다양한 벡터를 사용할 수 있으며, 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등 일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 발현 벡터로 pPROBE-eGFP+를 사용하였다.

[0035] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[0036] 본 발명의 용어 "형질전환체"는 외래의 유전물질을 포함하여 유전형질이 변화된 것을 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환체는 유전자 조작이 용이하며 다양한 발현 시스템에 적용될 수 있으며, 대량 배양에 이용될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따르면, 상기 형질전환체는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 시링가에(*Pseudomonas syringae*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*) 또는 슈도모나스 오리지하비탄스(*Pseudomonas oryzihabitans*)일 수 있다. 구체적으로, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 균주일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440을 이용하였다.

[0038] 상기 발현 벡터는 형질전환 방법을 통해 미생물, 균주 내로 도입시킬 수 있다.

[0039] 상기 형질전환 시키는 방법으로는, Kindle(1990)에 의해 공지된 글라스 비드를 이용한 형질전환법, 칼슘/폴리에틸렌 글리콜법을 이용한 원형질체의 형질전환법, 전기천공법, 미량주사법, 입자 충격 투입법(particle bombardment), 전기충격법(electrophration), 아그로박테리움을 매개로 한 방법, 유전자 총 또는 물리적 도입법 등이 사용될 수 있으며 숙주세포의 종류 및 특성에 맞게 당업자가 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 전기천공법을 사용하였다.

[0040] 본 발명에 따르면, i) HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자; 또는 ii) HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자; 또는 iii) LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 포도당, 자일로스, 3-하이드록시프로피온산, 레불린산 및 4-하이드록시발레르산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 탄소원의 존재 하에 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0041] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계는 균주를 LB 배지에 넣어 전-배양(pre-cultures) 하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 균주를 5 g 효모 추출물, 10 g 펩톤 및 10 g 염화나트륨(NaCl)을 처리한 LB 배지에 넣어 200 rpm, 37℃의 조건에서 전-배양하였다.

[0042] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계는 균주를 포도당, 자일로스, 4-하이드록시발레르산, 3-하이드록시프로피온산 및 레불린산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 탄소원이 포함된 M9Y 배지에 넣어 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 균주를 상기 탄소원이 10 mM 또는 0 mM 내지 20 mM 농도로 상이하게 포함된 M9Y 배지에 넣어 37℃ 온도에서 OD600 값이 0.4에 도달할 때까지 배양하였다.

[0043] 상기 M9Y 배지는 NaH_2PO_4, KH_2PO_4, NaCl, NH_4Cl, $CaCl_2$, $MgSO_4.7H_2O$ 및 효모 추출물을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, M9Y 배지에 1 ℓ 당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 포함되었다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면은, HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 포도당 또는 포도당과 자일로스, 4-하이드록시발레르산, 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 혼합물의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공한다.

[0045] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계는 포도당 또는 포도당과 자일로스, 4-하이드록시발레르산, 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 혼합물이 포함된 M9Y 배지에 넣어 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 포도당, 포도당-자일로스 혼합물, 포도당-레불린산 혼합물, 포도당-4-하이드록시발레르산 혼합물 또는 포도당-3-하이드록시프로피온산 혼합물을 탄소원으로 하여 배양하였다.

[0046] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계에서 탄소원이 포도당인 경우 포도당은 0.1 mM 내지 10 mM, 0.2 mM 내지 8 mM, 0.3 mM 내지 7 mM, 0.4 mM 내지 6 mM 또는 0.5 mM 내지 5 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게, 포도당은 0.5 mM 내지 5 mM의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도 범위일 때, 최소한의 탄소원 기질을 사용하여 유전자를 최대로 발현시키는 것이 가능할 수 있다.

[0047] 본 발명의 또 다른 측면은, HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공한다.

[0048] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계에서 3-하이드록시프로피온산 존재 하에 배양하는 경우 3-하이드록시프로피온산과 포도당, 자일로스, 4-하이드록시발레르산 또는 레불린산의 혼합물의 존재 하에 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 3-하이드록시프로피온산, 3-하이드록시프로피온산-포도당 혼합물, 3-하이드록시프로피온산-자일로스 혼합물, 3-하이드록시프로피온산-레불린산 혼합물 또는 3-하이드록시프로피온산-4-하이드록시발레르산 혼합물을 탄소원으로 하여 배양하였다.

[0049] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계에서 탄소원이 3-하이드록시프로피온산인 경우 3-하이드록시프로피온산은 0.1 mM 내지 50 mM, 0.1 mM 내지 40 mM, 0.1 mM 내지 35 mM, 0.1 mM 내지 30 mM 또는 0.1 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게, 0.1 mM 내지 20 mM 의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도 범위일 때, 최소한의 탄소원 기질을 사용하여 유전자를 최대로 발현시키는 것이 가능할 수 있다.

[0050] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계에서 탄소원이 레불린산인 경우 레불린산은 0.1 mM 내지 50 mM, 0.2 mM 내지 40 mM, 0.4 mM 내지 35 mM, 0.6 mM 내지 30 mM, 0.8 mM 내지 25 mM, 1 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게, 1 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도 범위일 때, 최소한의 탄소원 기질을 사용하여 유전자를 최대로 발현시키는 것이 가능할 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 측면은, LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 슈도모나스 균주를 4-하이드록시발레르산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공한다.

[0052] 상기 슈도모나스 균주를 배양하는 단계에서 탄소원이 4-하이드록시발레르산인 경우 4-하이드록시발레르산은 0.1 mM 내지 50 mM, 0.2 mM 내지 40 mM, 0.4 mM 내지 35 mM, 0.6 mM 내지 30 mM, 0.8 mM 내지 25 mM, 1 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게, 1 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도 범위일 때, 최소한의 탄소원 기질을 사용하여 유전자를 최대로 발현시키는 것이 가능할 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0054] **참고예: 세균 균주 및 탄소원 기질**

[0055] 하기 실시예들에서 사용된 균주를 하기 표 1, 전사인자 및 프로모터의 유전자 서열 정보를 표 2, 사용된 프라이머를 표 3에 나타내었으며 탄소원 기질은 하기 표 4에 나타내었다.

표 1

[0056]

프로모터 시스템	균주 번호	공급원
HexR/P_{zwf1}	#384	*P. putida* KT2440
HpdR/P_{hpdH}	#414	*P. putida* KT2440
LvaR/P_{lvaA}	#522	*P. putida* KT2440
LacI/P_{L1ac01}	#525	pBbB6c-*gfp*

표 2

[0057]

유전자	유전자 서열(5'- 3')	서열번호
HexR	tcagttgaggtcgtcgtcctcgatcgggtaacggctggcgttgaggctttccttgatcttgcgcaggtgaggctg gaagtccacgccgcggcgcagggtcatgccggtggccagtacatcgagcacggtcagctggatgatccgcgaggt cattggcatgtagatgtcggtatcttccggcagcggaatgtgcaggctcaggctgcaggcattggccagtggcga gcctgcggcggtgaggcccagcaccgaagcgccgttttcacgtgccaggcgcgccacttcgaccagttcgcgggt gcgcccggtgtaggaaatgatcacgaacagatcgccggtgtgggcgaccgaggccagcatgcgctgcatcagcac atcggcgtgggccgacacggccaggttgaagcggaagaacttgtgctgcgcatccagggccaccggggctgaggc gccgaggccgaagaagtggatctgccgggcctggatcatcatgtccacggcgcggctgacctgctgcgggtccag ttgctggcaggcgctgtcaagcgaggcgatggcgctggcgaagatcttctgggtgtaggcggccgggtcatcgtc ggcctctaccgcgcggctgacataggcggcaccactggccaggctctgcgccagttgcagcttgagttcggggta gccgctgacgccgaacgagcggcagaagcggttgacggtcggttcgctgaccttggccgcctgggccagcgcagc gatgctgaaacgggtggcttgttgcgggttgagcaggatgacttcggcgactttgcgttcggccttgttcagctc gtcgaggcggccctggatctgttccaggaggtttcgcacgcggtccat	1
HpdR	ctactcggctagcaactcgctttgttcggccgcgcacaacgccagcaggtagtcccacaccacccgcaggcgcac agacttgtgcagctcgcggcgggtgcagatccagtagctgcgctggatggtttctcccggcagcacgcgcaccag tgtcgggtcgtggcgggccatgtagttgggcagcacggcgatgcccagcccggcgcgggcggcggcttgctgggc gatcacgctggtgcttcgaaacaccacgttgggtactcggcagaaactgttgagaaacagcagttcctggctgaa cagcaaatcgtcaacgtagccgatccagctgtgccgggccaggtcttcgcggtggcgcagtggcggcgcgcggtc caggtaggcctggctggcgtatagcgccaggcggtagtcggtgagtttgcgggtgatcagcagatcggcgttggg ccgctccagatggatgctgatttctgcctcgcggttgaggatgctgacgaagcgcggcaccgctaccaattccac ctccaggccggggtagcgctcgaacaacgcgttcatgcgtggggtgaagaacatgatgccgatgccttcggttac ccccaggcgaatcttgcccagcggggtgatggcctgggtgatttcctcctgtgccagcagggcgacgttctccat ggcttcggcatgcttgagcagggcttgacccgaggggggtcagctcgtacccctgggcatgttgcacgaacagcgc ggtccccaggctctgctcgatgctctcgatatgccgggccacggtgctgtgggtagtgttcaggcgcttggcggc ggtcagcaagcggccgctgcgctgcaactcgaggaaaaaccgcagatcattccagtcgaacat	2
LvaR	tcaattggcagatcgcaagcgccgccacaaggttgtgcggctgatgccgagacggcgggcggcttcgtcgaggtt gccgcggcagctttccaacgtttcctttacatggcgcagttgcgcgaccttgccgatggtgtgcaggtccgtttc gcctgacgacttttttccgggcgggtgaaggggagggccttcgcacagttcaggtagcacgcgtgctaggtactg ctcgttcacgcggtgttcctcaagcagttcgcgtgccgagagcatcgcgcgctcgatcacattctccagttcccg gacattgcccggccaggcatagcgttcaaggtacggcagcagcgcggcggggatgtctgcagctcccggtggttg cccctgaacgagcaggcgctggctgatgccccggcagatcagggcaatgtcctcagggcgctctcgcagcggggt ggtctgcagacgcaggatgttgagccggaaatacaggtcggtacggaaatcgccatcgtccatggcgctgcgcag gtccttgtgggtggcggcaatgatgcgcacgtcgatggcaatcggttcggtgctgcccaggcgcaggacttcgcg ctcttgcagcacgcgcagcaggcgtgtttgcagcgacaccggcatgtcgccgatctcgtcgaggaacagcgtgcc gcggtgtgctgcttcgaacaggcctggcttgccacctttgcgcgagccgctgaaggcgccttcctcgtagccgaa caattcactttccagcaacgactcgggaaacgccgcgcagttgatggcgacgaaggggccttgccggcgcgggct ttcgttatggattccctgggcgagcagttccttgccggtgccgctttcaccggtaatcaggatggtcgaatggct ggtggcaaaacgcttggccaactgcagcatctcgcggttggccttgctgttgccgttgagctggtcgagccggta acgggcagtgaacgcaccagggcggcgggtggatcggatgcgttggtcggcacgttgcacaacagtgatgtcctg gcaggtcaggaccaggccggtacgttcgccgttctccaggataggcagtaaattgctcaccacggcgtgcgagcc gagccgcatcacgcggttttcttcacccgtgccttcctgcagcgcctgctgcaggtccagttccgggcacagctg ctgcagcggccggcccagcgctgcgctaaccggcaggtccagcagctgcgcaagggcagggttgagcgactgcac cacgccttggttgtcgaccgctgctacgccggcggggatatgccgcagcacggcattcagatgccgccgtttggc gatctcgacgcgttgagtgtcgagaatgcccagggcttcctccagcgctttgcgcgcggtgtcttcgctcagcga cagcacgccatgcagccctgcctgctccgccagctccaccaccgtcgacgagccgatgatgctgcgacagcctag ctgggccgcctgttcgacggcctggcgggcctcttccagggaggtgtaggcggcctggtgaacctggacggtgaa gagcgcggccatggcttgcaggtcgtggttgacatggttgtagctgagcacggccacttgggaggagcgttcgcg ggcctgccccaatgcccgtagcaggtcgccactgcccacgcgcatcgccagtaccgggcgtgtcaggtgtttgcg caggtaggcggcggtcgccccggcgcagacgaacacatcgaccttgcctgcctgctccaattctcgggcggtctg tagtgcttcagccaccgaggtgtcgaggacttcgatacgagtatctgggtagtccgtcgtgagcccggccaccac atgggcgagccggctccgttgttgggggcgctgcaagtggctgatcagcacgacgacctgggaggcaagagcatc cat	3

P_{zwf1}	gggtgtgtccttgggtcgggaagacagccggctgtgtgagcagcaggcttttgcacggtcgtctatcgtactgt cggtgcggttgacgtaccacttgtctgtaacacttgtgtgtaatgttgtggtttttactacattatcccttgaaa accgtgtgtgaaagcggtattcctagaccaactttaggaaagaaccaacatc	4
P_{hpdH}	gcttgtccttttatggcagttcgttccggcctcttaacgggcatgcccacaggtgcggtgaacaccctgaaggtaa cgtgatccctgagctgcgggcgagcccgtgaagaggtcggtacaggcttgcccctgtgctaaaacgcacagcggc tgcgcgaaatctcgtgtttcatccacgaaattactcactaagatggatcgggacaagaataaaaaacaggcgcga ggttgcac	5
P_{lvaA}	cacggggcctgttcatgtttgaaatgtttcgataatgaatcaatagcttgcaaatatgcaacaagcagcctgact ttcgctcggcggtgaggcgtcagaacccaggctgtatgcggcctgtggctgacttttgaagagttggcccaggcc ttgctcttgggcttgtgccaacccagaaaccaaaggcagggcctacagaacc	6
LacI	tcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggc ggtttgcgtattgggcgccagggtggttttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgc ctggccctgagagagttgcagcaagcggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggt taacggcgggatataacatgagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatgtccgcaccaacgcgcag cccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgat gccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtcgccttcccgttccgctatcgg ctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacagaacttaatgggcc cgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatggga gaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttc cacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtg caccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggc gcgagatttaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaa cgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccacttt ttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcata ctctgcgacatcgtataacgttactggtttcac	7
P_{L1ac01}	attcaccaccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggt gtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttga gcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccacca tacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatat aggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagaattgtg agcggataacaattgacattgtgagcggataacaagatactgagcacatcagcaggacgcactgacc	8
5'UTR	ggatccgtcgactgcagccgcttaattccctaactaactaaagattaactttataaggaggaaaaacat	9
$eGFP^{+}$	atgagtaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcac aaattttctgtcagtggagagggtgaaggtgatgcaacatacggaaaacttacccttaaatttatttgcactact ggaaaactacctgttccgtggccaacacttgtcactactttgacctatggtgttcaatgcttttcccgttatccg gatcacatgaaacggcatgacttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaacgcactatatctttc aaagatgacgggaactacaagacgcgtgctgaagtcaagtttgaaggtgataccttgttaatcgtatcgagtta aaaggtattgattttaaagaagatggaaacattctcggacacaaactggagtacaactataactcacacaatgta tacatcacggcagacaaacaaaagaatggaatcaaagctaacttcaaaattcgccacaacattgaagatggctcc gttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattac ctgtccacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatggtccttcttgagtttgtaact gctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaaataa	10

표 3

[0058]

프라이머	유전자 서열(5'- 3')	서열번호
HexR-FP	ccggggaattctcagttgaggtcgtcgtcct	11
P_{Zwf1}-RP	ccgggggatccccaaacagggcaaaggtgca	12
HpdR_FP	ttcaggaattcataaaacgaaaggctcagtcg	13
P_{hpdH}-RP	atcggatccgtgcaacctcgcgcctgtttttttattcttgtcc	14
LvaR-FP	ttcaggaattctcaattggcagatcgcaagc	15
P_{lvaA}-RP	atcggatccggttctgtaggccctgcctt	16

표 4

[0059]

프로모터 시스템	탄소원 기질(유도제)
HexR/P_{zwf1}	포도당(Glucose, G), 자일로스(Xylose, X), 레불린산(Levulinic acid, LA), 4-하이드록시발레르산(4-hydroxuvaleric acid, 4HV), 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP), 셀로비오스(Cellobiose, C), 포도당-자일로스 혼합물(GX), 포도당-레불린산 혼합물(GLA), 포도당-4-하이드록시발레르산 혼합물(GHV), 포도당-3-하이드록시프로피온산 혼합물(G3HP), 포도당-셀로비오스 혼합물(GC)
HpdR/P_{hpdH}	포도당(Glucose, G), 자일로스(Xylose, X), 레불린산(Levulinic acid, LA), 4-하이드록시발레르산(4-hydroxuvaleric acid, 4HV), 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP), 3-하이드록시프로피온산-포도당 혼합물(G3HP), 3-하이드록시프로피온산-자일로스 혼합물(3HPX), 3-하이드록시프로피온산-레불린산 혼합물(3HPLA), 3-하이드록시프로피온산-4-하이드록시발레르산 혼합물(3HPHV)
LvaR/P_{lvaA}	포도당(Glucose, G), 자일로스(Xylose, X), 4-하이드록시발레르산(4-hydroxuvaleric acid, 4HV), 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP)
LacI/P_{Llac01}	IPTG(isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside)

[0060] 상기 표 4에서 G: 포도당, X: 자일로스, LA: 레불린산, 4HV: 4-하이드록시발레르산, 3HP: 3-하이드록시프로피온산, C: 셀로비오스, A: 아라비노스, M: 만노스, GX, GLA, GHV, G3HP, GC, 3HPX, 3HPLA, 3HPHV: 상기 유도제의 조합을 나타낸다.**실시예 1. HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 및 형질전환체(#384) 제조**

[0061] 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제작하기 위해서 전사인자를 코딩하는 서열과 각 전사인자에 의해 조절되는 첫 번째 유전자의 번역 시작 부위(translational start site) 사이의 영역(intergenic region)을 모두 포함하는 유전자 인서트를 상기 표 2의 전사인자 및 프로모터의 DNA와 표 3의 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 상기 증폭된 유전자 인서트를 절단한 후, 상기 절단된 유전자 단편을 호스트 벡터에 삽입하여 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다(도 1).

[0062] 구체적으로, *P. putida* KT2440 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여, HexR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 이에 결합하는 P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 영역을 상기 표 3의 서열번호: 11, 서열번호: 12의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 이때, P_{zwf1} 프로모터를 코딩하는 유전자는 HexR 전사인자를 코딩하는 유전자와 전사인자에 의해 조절되는 첫 번째 유전자 *zwf1* 사이의 유전자 간 영역에 존재하며 이 영역을 포함하여 증폭시켰다. PCR 반응을 위해 Q5™ DNA 중합효소 및 Gibson assembly cloning kit(New England Biolabs, USA)를 사용하였으며, 사용된 모든 제한 효소 또한 New England Biolabs 사로부터 구입하였다.

표 5

[0063]

PCR 단계	온도	시간
1단계	98℃	3분
2단계	98℃	20초
3단계	63.5 ~ 71℃(Ta)	20초
4단계	72℃	30초

5단계	72℃	3분
Ta(어닐링 온도) HexR/P_{zwf1}: 65.7℃ HpdR/P_{hpdH}: 65.7℃ LacI/P_{LlacO1}: 71℃		
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장		

[0064] 상기 증폭시킨 유전자를 EcoRI/BamHI 제한효소로 절단하여 단편을 얻은 후, 상기 절단된 단편을 프로모터가 없는 광범위 호스트 범위 벡터(pPROBE-eGFP+, BBR1-ori, Km^R)에 삽입하여 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 카세트(도 2)를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다. MicroPulser 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 사용하여 1.8 kV, 0.1 cm 큐벳 간격(cuvette gap)의 조건에서 *P. putida* KT2440 균주를 상기 발현 벡터로 형질전환시켰다. *P. putida* KT2440 균주에 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제조하였으며, 이를 "#384" 균주로 명명하였다.

[0065] 한편, *P. putida* KT2440 균주에 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 도입시키지 않은 형질전환체는 "#530" 균주로 명명하였다.

[0066] **실시예 2. HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 및 형질전환체(#414) 제조**

[0067] *P. putida* KT2440 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여, HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 이에 결합하는 P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 영역을 상기 표 3의 서열번호: 13, 서열번호: 14의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 이때, P_{hpdH} 프로모터를 코딩하는 유전자는 HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자와 전사인자에 의해 조절되는 첫 번째 유전자 *hpdH* 사이의 유전자 간 영역에 존재하며 이 영역을 포함하여 증폭시켰다. PCR 반응을 위해 Q5™ DNA 중합효소 및 Gibson assembly cloning kit(New England Biolabs, USA)를 사용하였으며, 사용된 모든 제한 효소 또한 New England Biolabs 사로부터 구입하였다. PCR은 상기 실시예 1과 동일한 방법 및 조건으로 수행하였다.

[0068] 상기 증폭시킨 유전자 영역을 EcoRI/BamHI 제한효소로 절단하여 단편을 얻은 후, 상기 절단된 단편을 프로모터가 없는 광범위 호스트 범위 벡터(pPROBE-eGFP+, BBR1-ori, KmR)에 삽입하여 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트(도 3)를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

[0069] MicroPulser 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 사용하여 1.8 kV, 0.1 cm 큐벳 간격의 조건에서 *P. putida* KT2440 균주를 상기 발현 벡터로 형질전환시켰다. *P. putida* KT2440 균주에 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환 미생물을 제조하였으며, 이를 "#414" 균주로 명명하였다.

[0070] **실시예 3. LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 및 형질전환체(#522) 제조**

[0071] *P. putida* KT2440 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여, LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 이에 결합하는 P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 영역을 상기 표 3의 서열번호: 15, 서열번호: 16의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 이때, P_{lvaA} 프로모터를 코딩하는 유전자는 LvaR 전사인자를 코딩하는 유전자와 전사인자에 의해 조절되는 첫 번째 유전자 *lvaA* 사이의 유전자 간 영역에 존재하며 이 영역을 포함하여 증폭시켰다. PCR 반응을 위해 Q5™ DNA 중합효소 및 Gibson assembly cloning kit(New England Biolabs, USA)를 사용하였으며, 사용된 모든 제한 효소 또한 New England Biolabs 사로부터 구입하였다. PCR은 상기 실시예 1과 동일한 방법 및 조건으로 수행하였다.

[0072] 상기 증폭시킨 유전자 영역을 EcoRI/BamHI 제한효소로 절단하여 단편을 얻은 후, 상기 절단된 단편을 프로모터가 없는 광범위 호스트 범위 벡터(pPROBE-eGFP+, BBR1-ori, KmR)에 삽입하여 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 카세트(도 4)를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

[0073] MicroPulser 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 사용하여 1.8 kV, 0.1 cm 큐벳 간격의 조건에서 *P. putida* KT2440 균주를 상기 발현 벡터로 형질전환시켰다. *P. putida* KT2440 균주에 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환 미생물을 제조하였으며, 이를 "#522" 균주로 명명하였다.

[0074] **실시예 4. 형질전환체(#384)를 이용한 탄소원 기질별 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0075] 상기 실시예 1에서 제조한 #384 균주를 이용하여 탄소원 기질별 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량

을 비교 분석하였다.

[0076] 상기 실시예 1에서 제조한 #384 균주를 LB 배지(BD Difco, Franklin lakes, NJ)에 넣어 회전식 진탕기에서(rotary shaker) 200 rpm, 37℃의 조건에서 전-배양(pre-cultures) 하였다. 이때, LB 배지에 5 g 효모 추출물, 10 g 펩톤 및 10 g 염화나트륨(NaCl)을 더 처리하였다. 이후, 배지를 상기 표 2의 탄소원 기질 중 포도당(Glucose, G), 자일로스(Xylose, X), 레불린산(Levulinic acid, LA), 4-하이드록시발레르산(4-hydroxuvaleric acid, 4HV), 또는 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP)이 10 mM 농도로 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지(BioShop Canada Inc, Canada)로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 포함되도록 하였다.

[0077] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며, OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0078] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, #384 균주는 다른 탄소원 기질과 비교하여 포도당에서 유의하게 높은 유전자 발현을 보였다. 또한, 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 도입시키지 않은 #530 균주와 비교할 때, 유전자 발현에 있어서 유의미한 차이를 보였다.

[0079] **실시예 5. 형질전환체(#384)를 이용한 포도당 혼합물별 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0080] 상기 실시예 1에서 제조한 #384 균주를 이용하여 실시예 4와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 상기 표 4의 탄소원 기질 중 포도당(Glucose, G), 각 탄소원이 1:1의 비율로 혼합된 포도당-자일로스 혼합물(GX), 포도당-레불린산 혼합물(GLA), 포도당-4-하이드록시발레르산 혼합물(GHV) 및 포도당-3-하이드록시프로피온산 혼합물(G3HP)이 10 mM 농도로 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지(BioShop Canada Inc, Canada)로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 포함되도록 하였다.

[0081] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며, OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0082] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, #384 균주는 포도당에 다른 탄소원 기질을 추가한 혼합물을 사용하였을 때 유전자 발현에 있어 유의미한 차이를 보였으며 이는 포도당만을 기질로 하였을 때와 비슷한 유전자 발현 양상을 보였다.

[0083] 이를 통해, HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 카세트는 포도당만을 기질로 하거나 포도당 및 다른 탄소원 기질의 혼합물로 유도된다는 것을 확인하였다. 구체적으로, 기질로서 첨가된 포도당은 엔트너-듀도르프 경로(Entner-Doudoroff Pathway, EDP)를 통해 분해되어 2-케토-3-디옥시-6-포스포글루코닉산(2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate, KDPG) 분자를 생성하고, 생성된 KDPG 분자가 HexR를 억제함으로써 유전자를 발현시킨다는 것을 확인하였다(도 7).

[0084] **실시예 6. 형질전환체(#384)를 이용한 포도당 농도별 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0085] 상기 실시예 1에서 제조한 #384 균주를 이용하여 실시예 4와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 포도당의 농도가 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM로 상이하게 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 포함되도록 하였다.

[0086] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0087] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, #384 균주는 포도당의 농도가 0.5 mM에서 5 mM로 증가함에 따라, 유전자 발현 강도가 증가하였다. 하지만, #384 균주는 포도당의 농도가 5 mM를 초과하였을 때, 유전자 발현이 더 이상 증가하지 않았다.

[0088] 이를 통해, 포도당 농도의 증가가 유전자 발현의 증가에 관여하며, HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템이 포도당의 농도에 의해 조절될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0089] **실시예 7. 형질전환체(#414)를 이용한 탄소원 기질별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0090] 상기 실시예 2의 #414 균주를 이용하여 탄소원 기질별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 비교 분석하였다.

[0091] 상기 실시예 4에서와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 상기 표 2의 탄소원 기질 중 포도당(Glucose, G), 자일로스(Xylose, X), 레불린산(Levulinic acid, LA), 4-하이드록시발레르산(4-hydroxuvaleric acid, 4HV), 또는 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP)이 10 mM 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 더 포함되도록 하였다.

[0092] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 조건에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0093] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, #414 균주는 다른 탄소원 기질과 비교하여 3-HP(3-하이드록시프로피온산)에서 유의하게 높은 유전자 발현을 보였으며 LA(레불린산)에서 두 번째로 높은 유전자 발현을 보였다. 또한, 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 도입시키지 않은 #530 균주와 비교하여 유전자 발현에 있어 유의미한 차이를 보였다.

[0094] **실시예 8. 형질전환체(#414)를 이용한 3-HP 혼합물별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0095] 상기 실시예 2에서 제조한 #414 균주를 이용하여 실시예 4에서와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 상기 표 4의 탄소원 기질 중 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP), 각 탄소원이 1:1의 비율로 혼합된 3-하이드록시프로피온산-포도당 혼합물(G3HP), 3-하이드록시프로피온산-자일로스 혼합물(3HPX), 3-하이드록시프로피온산-레불린산 혼합물(3HPLA), 3-하이드록시프로피온산-4-하이드록시발레르산 혼합물(3HPHV)이 10 mM 농도로 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지(BioShop Canada Inc, Canada)로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 포함되도록 하였다.

[0096] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며, OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0097] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, #414 균주는 3-HP만을 탄소원으로 하였을 때 뿐만 아니라 3-HP에 다른 탄소원 기질을 추가한 혼합물을 사용하였을 때에도 유전자 발현에 있어 유의미한 차이를 보였으며 특히, LA를 추가하였을 때 가장 높은 유전자 발현을 보였다.

[0098] 이를 통해 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트는 3-HP 또는 LA만을 기질로 하거나 3-HP 및 다른 탄소원 기질의 혼합물로 유도된다는 것을 확인하였다(도 11).

[0099] **실시예 8. 형질전환체(#414)를 이용한 3-하이드록시프로피온산(3-HP) 농도별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0100] 상기 실시예 2에서 제조한 #414 균주를 이용하여 실시예 4에서와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 사전 배양액을 3-HP의 농도가 0 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM로 상이하게 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 더 포함되도록 하였다.

[0101] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 조건에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0102] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, #414 균주는 3-HP의 농도가 0.1 mM에서 20 mM로 증가함에 따라, 유전자 발현 강도가 증가하였다. 특히, 3-HP의 농도가 0.1 mM에서 0.5 mM로 증감함에 따라, 유전자 발현에 있어 확연한 차이를 보였으며 민감하게 반응하였다.

[0103] 이를 통해, 3-HP 농도의 증가가 유전자 발현의 증가에 관여하며, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템이 3-HP의 농도에 의해 조절될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0104] **실시예 10. 형질전환체(#414)를 이용한 레불린산(LA) 농도별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0105] 상기 실시예 2에서 제조한 #414 균주를 이용하여 실시예 4에서와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 LA의 농도가 0 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM로 상이하게 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ 당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 더 포함되도록 하였다.

[0106] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0107] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, #414 균주는 LA의 농도가 증가함에 따라, 유전자 발현 강도가 증가하는 것으로 나타났다. 그러나, LA의 농도가 1 mM 이하로 낮을 때, 유전자 발현에 있어 유의미한 차이를 보이지 않았으며 민감하게 반응하지 않았다.

[0108] 이를 통해, LA 농도의 증가가 유전자 발현의 증가에 관여하며, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템이 LA의 농도에 의해 조절될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0109] **실시예 11. 형질전환체(#522)를 이용한 탄소원 기질별 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0110] 상기 실시예 3의 #522 균주를 이용하여 탄소원 기질별 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 비교 분석하였다.

[0111] 상기 실시예 4에서와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 상기 표 2의 탄소원 기질 중 포도당(Glucose, G), 자일로스(Xylose, X), 4-하이드록시발레르산(4-hydroxuvaleric acid, 4HV), 또는 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3HP)이 10 mM 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ 당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 더 포함되도록 하였다.

[0112] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 조건에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0113] 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, #522 균주는 다른 탄소원 기질과 비교하여 4-HV(4-하이드록시발레르산)에서 유의하게 높은 유전자 발현을 보였다. 또한, 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 도입시키지 않은 #530 균주와 비교하여 유전자 발현에 있어 유의미한 차이를 보였다.

[0114] 이를 통해 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 카세트는 4-HV를 기질로 하여 유도된다는 것을 확인하였다(도 15).

[0115] **실시예 12. 형질전환체(#522)를 이용한 4-하이드록시발레르산(4HV) 농도별 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0116] 상기 실시예 3에서 제조한 #522 균주를 이용하여 실시예 4에서와 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 4-HV의 농도가 0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM로 상이하게 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ 당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 더 포함되도록 하였다.

[0117] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 각 웰당 180 ㎕

씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0118] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, #522 균주는 4HV의 농도가 증가함에 따라 민감하게 반응하지 않고, 비슷한 유전자 발현 강도를 나타내었다.

[0119] 이를 통해, 4HV 농도 증가에 크게 상관없이, LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 시스템은 4HV의 농도에 비의존적으로 유전자 발현 할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0120] **실시예 13. LacI/P_{Llac01} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 및 형질전환체(#525) 제조**

[0121] pBbB6c-*gfp* 플라스미드를 주형으로 하여, LacI 전사인자를 코딩하는 유전자 및 이에 결합하는 P_{Llac01} 프로모터를 코딩하는 유전자를 포함하는 영역을 상기 표 3의 서열번호: 17, 서열번호: 18의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 이때, P_{Llac01} 프로모터를 코딩하는 유전자는 LacI 전사인자를 코딩하는 유전자와 전사인자에 의해 조절되는 첫 번째 유전자 *Llac01* 사이의 유전자 간 영역에 존재하며 이 영역을 포함하여 증폭시켰다. PCR은 상기 실시예 1과 동일한 방법 및 조건으로 수행하였다.

[0122] 상기 증폭시킨 유전자를 EcoRI/BamHI 제한효소로 절단하여 단편을 얻은 후, 상기 절단된 단편을 프로모터가 없는 광범위 호스트 범위 벡터(pPROBE-eGFP+, BBR1-ori, Km^R)에 삽입하여 LacI/P_{Llac01} 유전자 발현 카세트(도 17)를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

[0123] MicroPulser 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 사용하여 1.8 kV, 0.1 cm 큐벳 간격(cuvette gap)의 조건에서 *P. putida* KT2440 균주를 상기 발현 벡터로 형질전환시켰다. *P. putida* KT2440 균주에 LacI/P_{Llac01} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현벡터를 도입시킨 형질전환체는 "#525" 균주로 명명하였다.

[0124] **실시예 14. 탄소원 기질 유도성 유전자 발현 시스템 및 ITPG 유도성 유전자 발현 시스템 비교**

[0125] 상기 실시예 1에서 제조한 #384 균주, 실시예 2에서 제조한 #414 균주 및 실시예 3에서 제조한 #522 균주를 이용하여 실시예 4과 동일한 방법으로 전-배양하였다. 이후, 배지를 각각의 유전자 발현 시스템을 유도하는 탄소원인 포도당, 3-하이드록시프로피온산, 레불린산 또는 4-하이드록시발레르산이 10 mM 포함된 20 mℓ의 M9Y 배지로 교체하였다. 이때, M9Y 배지에 1 ℓ 당 6.78 g NaH_2PO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0.011 g $CaCl_2$, 0.49 g $MgSO_4.7H_2O$ 및 5 g 효모 추출물이 더 포함되도록 하였다.

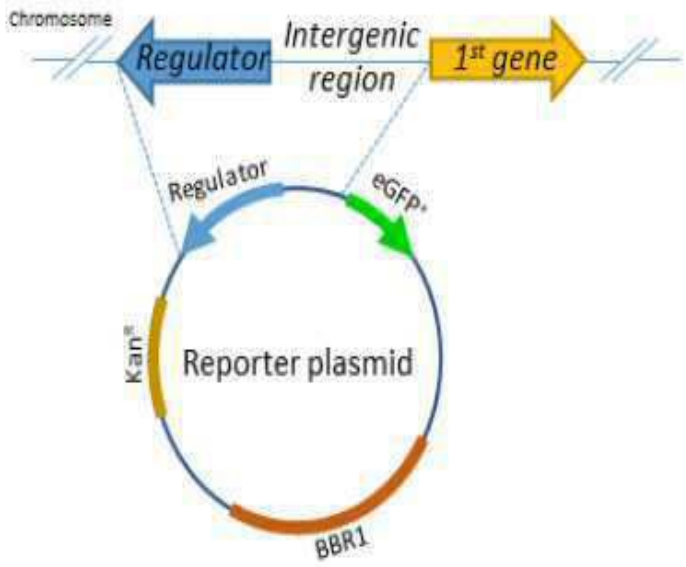
[0126] 그 후, 상기 배양액을 37℃ 온도에서 배양하였으며 OD600 값이 0.4에 도달할 때, 상기 배양액을 웰당 180 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하고 Tecan microplate reader(Infinite F200 PRO, Tecan)에서 30℃ 온도에서 배양한 후, FACS를 이용하여 상기 실시예 10에서 제조한 균주 #525의 ITPG 유도성 유전자 발현 시스템과 비교 분석하였다.

[0127] 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 포도당 기질 유도성 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 시스템이 도입된 균주 #384와, 3HP 또는 LA 기질 유도성 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템이 도입된 균주 #414와, 4HV 기질 유도성 LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 시스템이 도입된 균주 #522는 IPTG 유도성 유전자 발현 시스템이 도입된 균주 #525에 비해 높은 수준의 유전자 발현을 나타내었다.

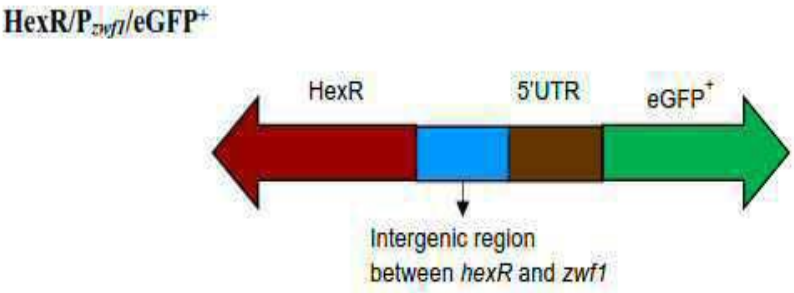
[0128] 이를 통해, 포도당, 3HP, LA 및 4HV와 같은 저가 탄소원 기질의 유도성 유전자 발현 시스템이 IPTG 유도성 유전자 발현 시스템과 유사한 구조를 갖추고 있으며, IPTG 유도성 유전자 발현 시스템에 비해 안정적이며 효율적으로 유전자를 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

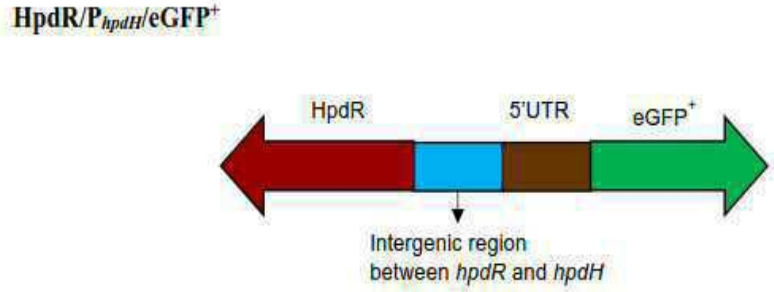
도면1



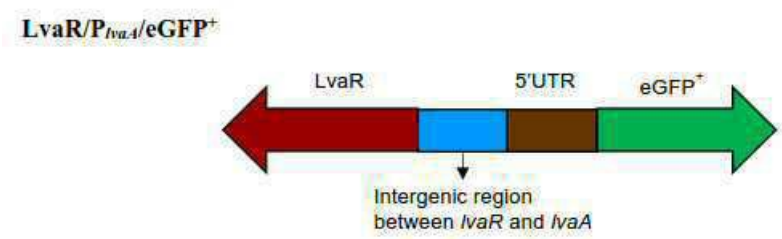
도면2



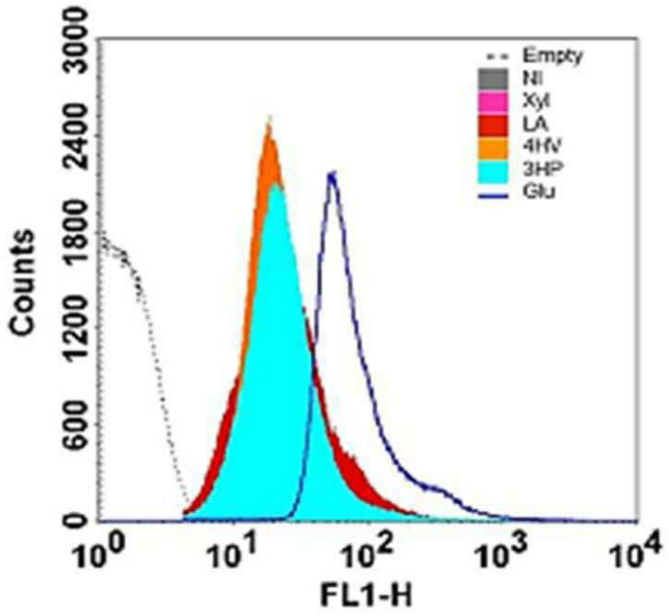
도면3



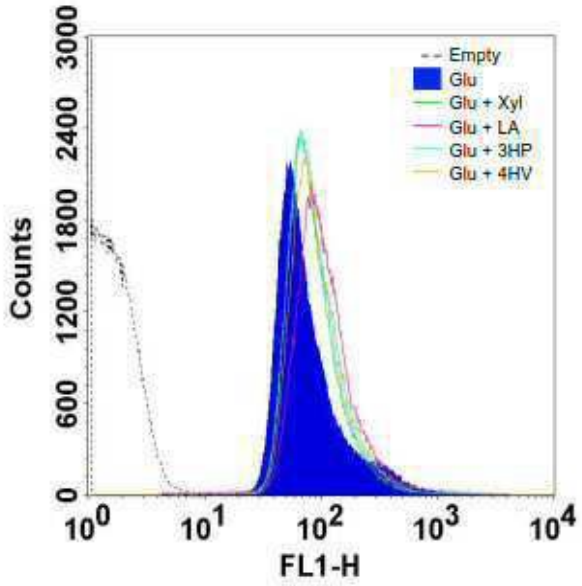
도면4


LvaR/P$_{lvaA}$/eGFP$^+$
LvaR
5'UTR
eGFP$^+$
Intergenic region
between *lvaR* and *lvaA*

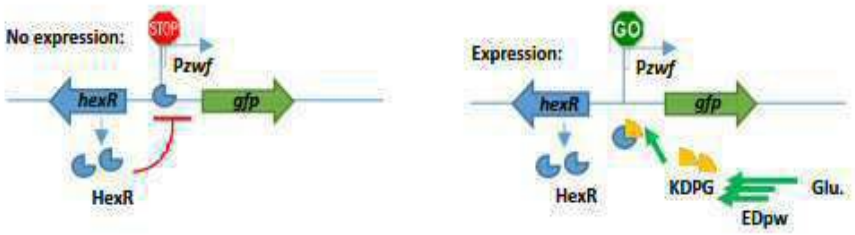
도면5


Empty
Nl
Xyl
LA
4HV
3HP
Glu
Counts
0
600
1200
1800
2400
3000
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

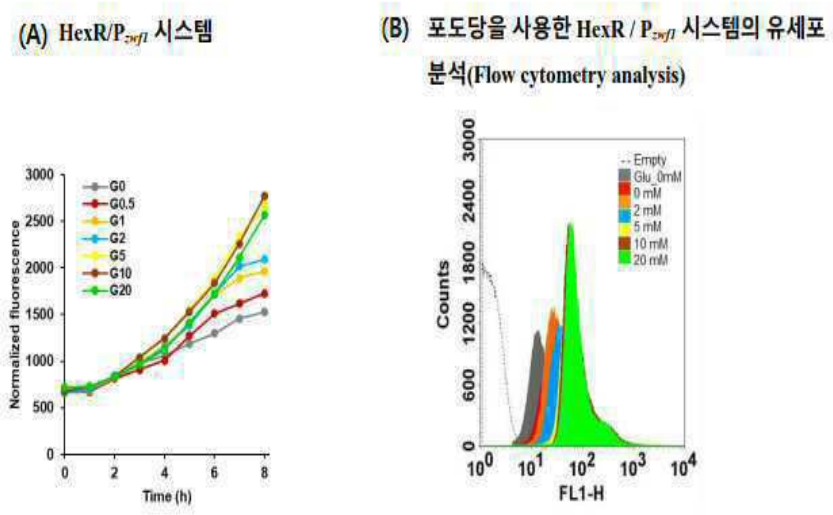
도면6


Empty
Glu
Glu + Xyl
Glu + LA
Glu + 3HP
Glu + 4HV
Counts
0
600
1200
1800
2400
3000
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

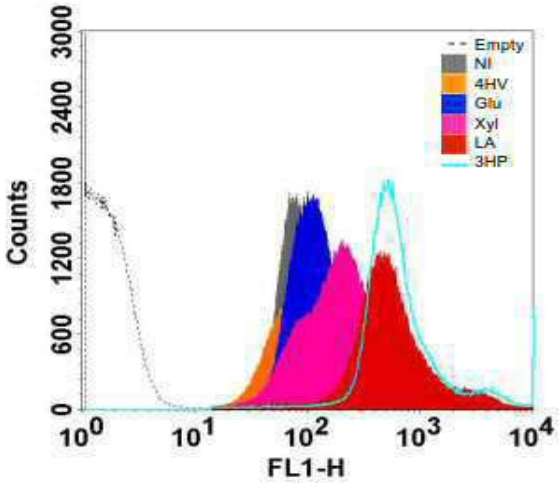
도면7


No expression:
STOP
Pzwf
hexR
gfp
HexR
Expression:
GO
Pzwf
hexR
gfp
HexR
KDPG
Glu.
EDpw

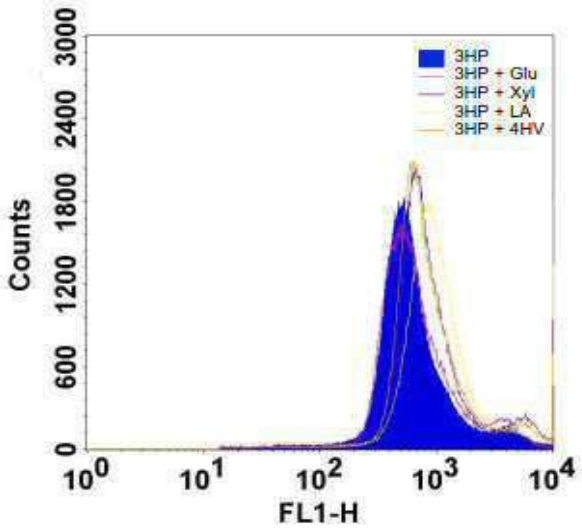
도면8


(A) HexR/P$_{zwf}$ 시스템
(B) 포도당을 사용한 HexR / P$_{zwf}$ 시스템의 유세포 분석(Flow cytometry analysis)
Normalized fluorescence
Time (h)
G0
G0.5
G1
G2
G5
G10
G20
Counts
FL1-H
Empty
Glu_0mM
0 mM
2 mM
5 mM
10 mM
20 mM

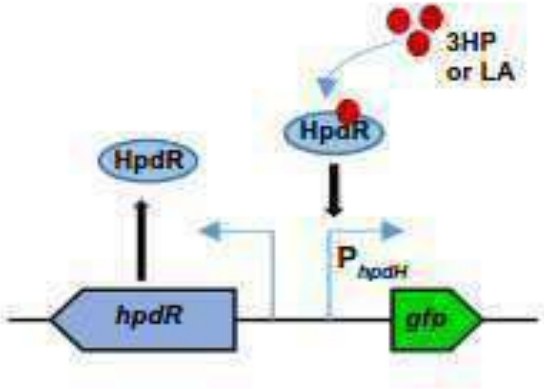
도면9


Counts
FL1-H
Empty
NI
4HV
Glu
Xyl
LA
3HP

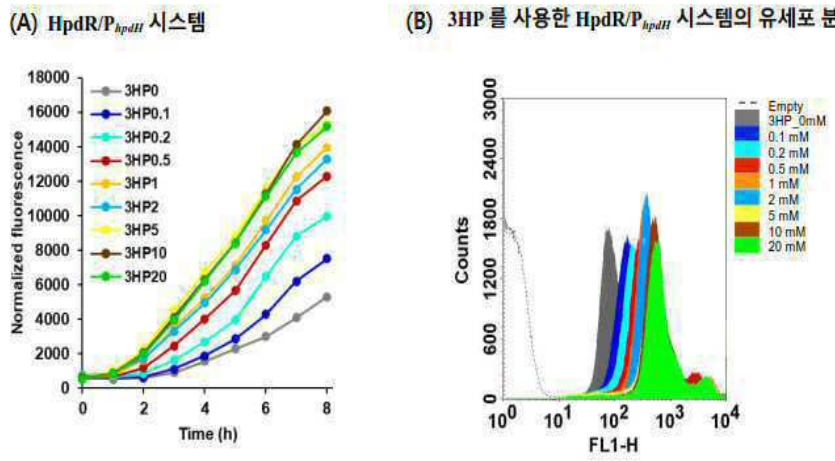
도면10



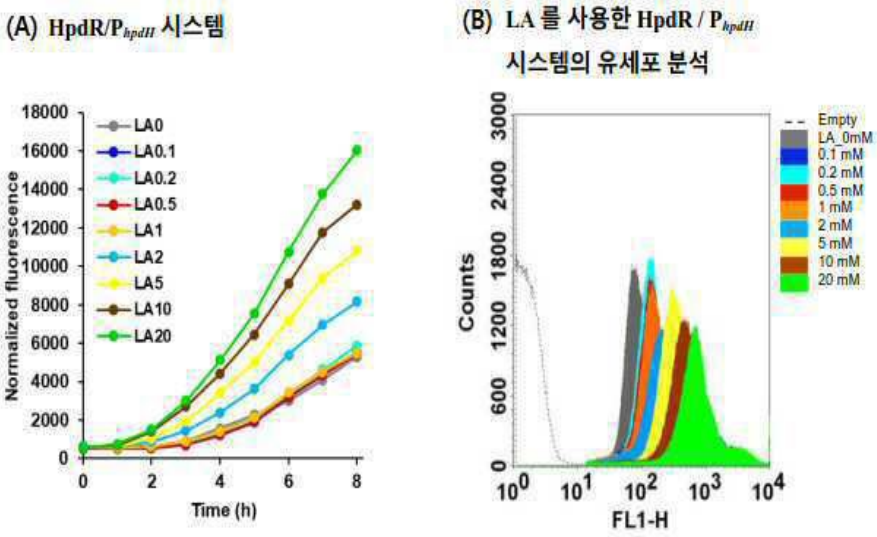
도면11



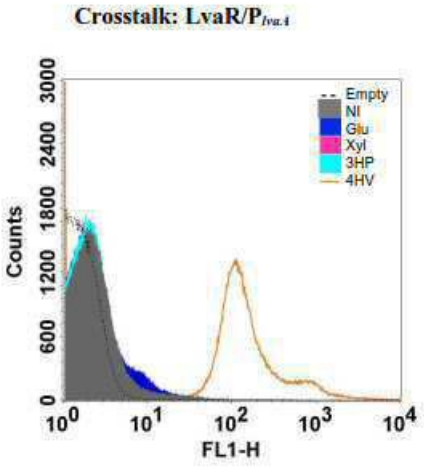
도면12



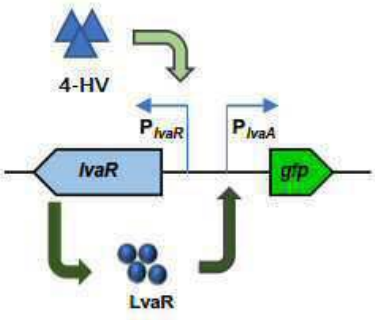
도면13



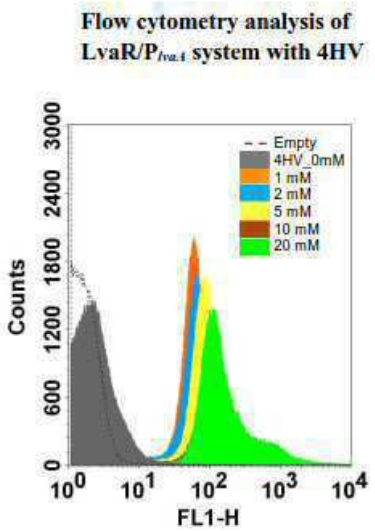
도면14



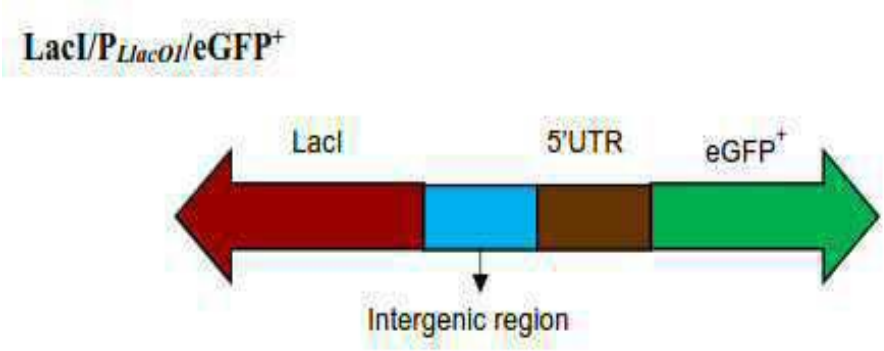
도면15



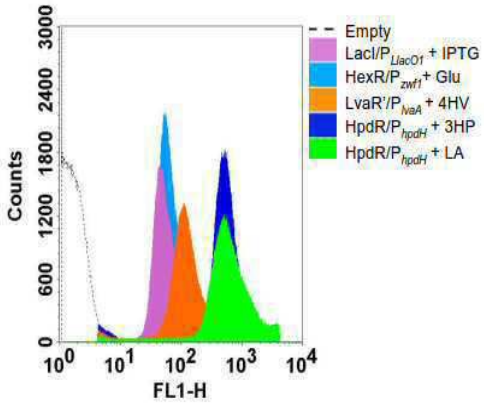
도면16



도면17



도면18



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> EXPRESSION CASSETTE EXPRESSABLE IN PSEUDOMONAS PUTIDA STRAIN AND

GENE EXPRESSION SYSTEM USING SAME

<130> FPD/202402-0033/C

<160> 18

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 873

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for HexR

<400> 1

tcagttgagg tcgtcgtcct cgatcgggta acggctggcg ttgaggcttt ccttgatctt 60

gcgcaggtga ggctggaagt ccacgccgcg gcgcagggtc atgccggtgg ccagtacatc 120

gagcacggtc agctggatga tccgcgaggt cattggcatg tagatgtcgg tatcttccgg 180

cagcggaatg tgcaggctca ggctgcaggc attggccagt ggcgagcctg cggcggtgag 240

gcccagcacc gaagcgccgt tttcacgtgc caggcgcgcc acttcgacca gttcgcgggt 300

gcgcccggtg taggaaatga tcacgaacag atcgccggtg tgggcgaccg aggccagcat 360

gcgctgcatc agcacatcgg cgtgggccga cacggccagg ttgaagcgga agaacttgtg 420

ctgcgcatcc agggccaccg gggctgaggc gccgaggccg aagaagtgga tctgccgggc 480

ctggatcatc atgtccacgg cgcggctgac ctgctgcggg tccagttgct ggcaggcgct 540

gtcaagcgag gcgatggcgc tggcgaagat cttctgggtg taggcggccg ggtcatcgtc 600

ggcctctacc gcgcggctga cataggcggc accactggcc aggctctgcg ccagttgcag 660

cttgagttcg gggtagccgc tgacgccgaa cgagcggcag aagcggttga cggtcggttc 720

gctgaccttg gccgcctggg ccagcgcagc gatgctgaaa cgggtggctt gttgcgggtt 780

gagcaggatg acttcggcga ctttgcgttc ggccttgttc agctcgtcga ggcggccctg 840

gatctgttcc aggaggtttc gcacgcggtc cat 873

<210> 2

<211> 888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for HpdR

<400> 2

ctactcggct agcaactcgc tttgttcggc cgcgcacaac gccagcaggt agtcccacac 60

cacccgcagg cgcacagact tgtgcagctc gcggcgggtg cagatccagt agctgcgctg 120

gatggtttct cccggcagca cgcgcaccag tgtcgggtcg tggcgggcca tgtagttggg 180

cagcacggcg atgcccagcc cggcgcgggc ggcggcttgc tgggcgatca cgctggtgct 240

tcgaaacacc acgttgggta ctcggcagaa actgttgaga aacagcagtt cctggctgaa 300

cagcaaatcg tcaacgtagc cgatccagct gtgccgggcc aggtcttcgc ggtggcgcag 360

tggcggcgcg cggtccaggt aggcctggct ggcgtatagc gccaggcggt agtcggtgag 420

tttgcgggtg atcagcagat cggcgttggg ccgctccaga tggatgctga tttctgcctc 480

gcggttgagg atgctgacga agcgcggcac cgctaccaat tccacctcca ggccggggta 540

gcgctcgaac aacgcgttca tgcgtggggt gaagaacatg atgccgatgc cttcggttac 600

ccccaggcga atcttgccca gcggggtgat ggcctgggtg atttcctcct gtgccagcag 660

ggcgacgttc tccatggctt cggcatgctt gagcagggct tgacccgagg gggtcagctc 720

gtaccctgg gcatgttgca cgaacagcgc ggtccccagg ctctgctcga tgctctcgat 780

atgccgggcc acggtgctgt gggtagtgtt caggcgcttg gcggcggtca gcaagcggcc 840

gctgcgctgc aactcgagga aaaaccgcag atcattccag tcgaacat 888

<210> 3

<211> 1953

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for LvaR

<400> 3

tcaattggca gatcgcaagc gccgccacaa ggttgtgcgg ctgatgccga gacggcgggc 60

ggcttcgtcg aggttgccgc ggcagctttc caacgtttcc tttacatggc gcagttgcgc 120

gaccttgccg atggtgtgca ggtccgtttc gcctgacgac tttttccggg cgggtgaagg 180

gggagggcct tcgcacagtt caggtagcac gcgtgctagg tactgctcgt tcacgcggtg 240

ttcctcaagc agttcgcgtg ccgagagcat cgcgcgctcg atcacattct ccagttcccg 300

gacattgccc ggccaggcat agcgttcaag gtacggcagc agcgcggcgg ggatgtctgc 360

agctcccggt ggttgcccct gaacgagcag gcgctggctg atgccccggc agatcagggc 420

aatgtcctca gggcgctctc gcagcggggt ggtctgcaga cgcaggatgt tgagccggaa 480

atacaggtcg gtacggaaat cgccatcgtc catggcgctg cgcaggtcct tgtgggtggc 540

ggcaatgatg cgcacgtcga tggcaatcgg ttcggtgctg cccaggcgca ggacttcgcg 600

ctcttgcagc acgcgcagca ggcgtgtttg cagcgacacc ggcatgtcgc cgatctcgtc 660

gaggaacagc gtgccgcggt gtgctgcttc gaacaggcct ggcttgccac ctttgcgcga 720

gccgctgaag gcgccttcct cgtagccgaa caattcactt tccagcaacg actcgggaaa 780

cgccgcgcag ttgatggcga cgaaggggcc ttgccggcgc gggctttcgt tatggattcc 840

ctgggcgagc agttccttgc cggtgccgct ttcaccggta atcaggatgg tcgaatggct 900

ggtggcaaaa cgcttggcca actgcagcat ctcgcggttg gccttgctgt tgccgttgag 960

ctggtcgagc cggtaacggg cagtgaacgc accagggcgg cgggtggatc ggatgcgttg 1020

gtcggcacgt tgcacaacag tgatgtcctg gcaggtcagg accaggccgg tacgttcgcc 1080

gttctccagg ataggcagta aattgctcac cacggcgtgc gagccgagcc gcatcacgcg 1140

gttttcttca cccgtgcctt cctgcagcgc ctgctgcagg tccagttccg ggcacagctg 1200

ctgcagcggc cggcccagcg ctgcgctaac cggcaggtcc agcagctgcg caagggcagg 1260

gttgagcgac tgcaccacgc cttggttgtc gaccgctgct acgccggcgg ggatatgccg 1320

cagcacggca ttcagatgcc gccgtttggc gatctcgacg cgttgagtgt cgagaatgcc 1380

cagggcttcc tccagcgctt tgcgcgcggt gtcttcgctc agcgacagca cgccatgcag 1440

ccctgcctgc tccgccagct ccaccaccgt cgacgagccg atgatgctgc gacagcctag 1500

ctgggccgcc tgttcgacgg cctggcgggc ctcttccagg gaggtgtagg cggcctggtg 1560

aacctggacg gtgaagagcg cggccatggc ttgcaggtcg tggttgacat ggttgtagct 1620

gagcacggcc acttgggagg agcgttcgcg ggcctgcccc aatgcccgta gcaggtcgcc 1680

actgcccacg cgcatcgcca gtaccgggcg tgtcaggtgt ttgcgcaggt aggcggcggt 1740

cgccccggcg cagacgaaca catcgacctt gcctgcctgc tccaattctc gggcggtctg 1800

tagtgcttca gccaccgagg tgtcgaggac ttcgatacga gtatctgggt agtccgtcgt 1860

gagcccggcc accacatggg cgagccggct ccgttgttgg gggcgctgca agtggctgat 1920

cagcacgacg acctgggagg caagagcatc cat 1953

<210> 4

<211> 202

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for Pzwf1

<400> 4

gggtgtgtcc ttgggtcggg aagacagccg gctgtgtgag cagcaggctt tttgcacggt 60

cgtctatcgt actgtcggtg cggttgacgt accacttgtc tgtaacactt gtgtgtaatg 120

ttgtggtttt tactacatta tcccttgaaa accgtgtgtg aaagcggtat tcctagacca 180

actttaggaa agaaccaaca tc 202

<210> 5

<211> 233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for PhpdH

<400> 5

gcttgtcctt tatggcagtt cgttccggcc tcttaacggg catgcccaca ggtgcggtga 60

acaccctgaa ggtaacgtga tccctgagct gcgggcgagc ccgtgaagag gtcggtacag 120

gcttgcccct gtgctaaaac gcacagcggc tgcgcgaaat ctcgtgtttc atccacgaaa 180

ttactcacta agatggatcg ggacaagaat aaaaaacagg cgcgaggttg cac 233

<210> 6

<211> 202

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for PlvaA

<400> 6

cacggggcct gttcatgttt gaaatgtttc gataatgaat caatagcttg caaatatgca 60

acaagcagcc tgactttcgc tcggcggtga ggcgtcagaa cccaggctgt atgcggcctg 120

tggctgactt ttgaagagtt ggcccaggcc ttgctcttgg gcttgtgcca acccagaaac 180

caaaggcagg gcctacagaa cc 202

<210> 7

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for LacI

<400> 7

tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 60

cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgccagggtg gtttttcttt tcaccagtga 120

gacgggcaac agctgattgc ccttcaccgc ctggccctga gagagttgca gcaagcggtc 180

cacgctggtt tgccccagca ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggttaacg gcgggatata 240

acatgagctg tcttcggtat cgtcgtatcc cactaccgag atgtccgcac caacgcgcag 300

cccggactcg gtaatggcgc gcattgcgcc cagcgccatc tgatcgttgg caaccagcat 360

cgcagtggga acgatgccct cattcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac cggacatggc 420

actccagtcg ccttcccgtt ccgctatcgg ctgaatttga ttgcgagtga gatatttatg 480

ccagccagcc agacgcagac gcgccgagac agaacttaat gggcccgcta acagcgcgat 540

ttgctggtga cccaatgcga ccagatgctc cacgcccagt cgcgtaccgt cttcatggga 600

gaaaataata ctgttgatgg gtgtctggtc agagacatca agaaataacg ccggaacatt 660

agtgcaggca gcttccacag caatggcatc ctggtcatcc agcggatagt taatgatcag 720

cccactgacg cgttgcgcga gaagattgtg caccgccgct ttacaggctt cgacgccgct 780

tcgttctacc atcgacacca ccacgctggc acccagttga tcggcgcgag atttaatcgc 840

cgcgacaatt tgcgacggcg cgtgcagggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa 900

cgactgtttg cccgccagtt gttgtgccac gcggttggga atgtaattca gctccgccat 960

cgccgcttcc acttttccc gcgttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt tcaccacgcg 1020

ggaaacggtc tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt 1080

cac 1083

<210> 8

<211> 442

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for PLlac01

<400> 8

attcaccacc ctgaattgac tctcttccgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt 60

gcgccattcg atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga 120

agcagcccag tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca 180

aggagatggc gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac 240

aagcgctcat gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggtgatg tcggcgatat 300

aggcgccagc aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga 360

ggatcgagaa ttgtgagcgg ataacaattg acattgtgag cggataacaa gatactgagc 420

acatcagcag gacgcactga cc 442

<210> 9

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for 5 prime UTR

<400> 9

ggatccgtcg actgcagccg cttaattccc taactaacta aagattaact ttataaggag 60

gaaaaacat 69

<210> 10

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for eGFP+

<400> 10

atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60

gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga 120

aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccgtg gccaacactt 180

gtcactactt tgacctatgg tgttcaatgc ttttcccgtt atccggatca catgaaacgg 240

catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa ggttatgtac aggaacgcac tatatctttc 300

aaagatgacg ggaactacaa gacgcgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttgtt 360

aatcgtatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct cggacacaaa 420

ctggagtaca actataactc acacaatgta tacatcacgg cagacaaaca aaagaatgga 480

atcaaagcta acttcaaaat tcgccacaac attgaagatg gctccgttca actagcagac 540

cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600

ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agcgtgacca catggtcctt 660

cttgagtttg taactgctgc tgggattaca catggcatgg atgagctcta caaataa 717

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_HexR-FP

<400> 11

ccggggaatt ctcagttgag gtcgtcgtcc t 31

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PZwf1-RP

<400> 12

ccgggggatc cccaaacagg gcaaaggtgc a 31

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_HpdR_FP

<400> 13

ttcaggaatt cataaaacga aaggctcagt cg 32

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PhpdH-RP

<400> 14

atcggatccg tgcaacctcg cgcctgtttt ttattcttgt cc 42

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_LvaR-FP

<400> 15

ttcaggaatt ctcaattggc agatcgcaag c 31

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PlvaA-RP

<400> 16

atcggatccg gttctgtagg ccctgcctt 29

<210> 17

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_LacI-FP

<400> 17

gaattgggga tcggaagctg acgtcataaa acgaaaggct cagtcgaaag actgggcctt 60

tcgttttatg agctctcact gcccgctttc cagtc 95

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_PLlac01-RP

<400> 18

ttaagcggct gcagtcgacg gatccggtca gtgcgtcctg ctgat 45