

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 24일 (24.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/204258 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/04 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005455
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 20일 (20.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0071366 2013년 6월 21일 (21.06.2013) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 오두병 (OH, Doo Byoung); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 서훈 (SEO, Hoon); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 황동현 (HWANG, Dong Hyeon); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권오석 (KWON, Oh Suk); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

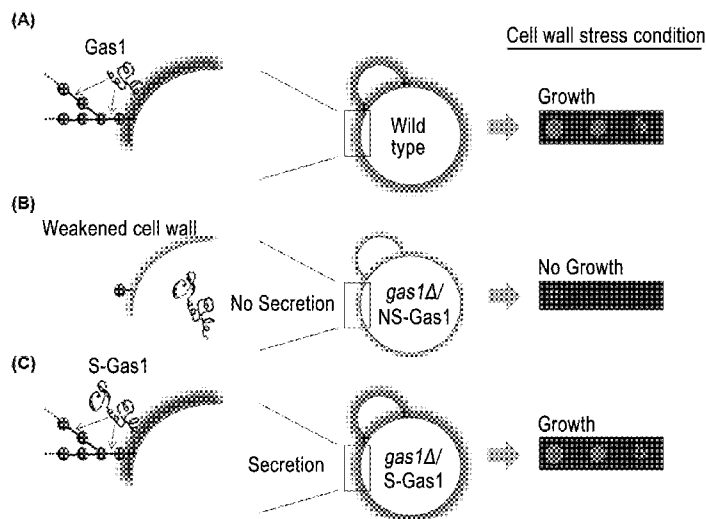
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,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

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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING YEAST STRAIN HAVING IMPROVED RECOMBINANT PROTEIN SECRETION CAPACITY USING CELL WALL DEFICIENT YEAST MUTANT

(54) 발명의 명칭 : 세포벽 결함 효모 변이주를 이용한 재조합 단백질 분비능이 향상된 효모 균주의 스크리닝 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening a yeast strain secreting an introduced target protein, a method for improving the secretion capacity of a target protein, a method for producing a target protein, and a method for producing a yeast mutant having an improved capacity to secreting Gas1 or a fusion protein thereof. With respect to the yeast strain of the present invention, which expresses a fusion protein in which a target protein produced by using a Gas1-deficient strain of which the growth is inhibited under the cell wall stress condition is bound to the N-terminal of the Gas1 protein, the increase in the growth capacity of the yeast strain is verified by forming a cell wall due to the secretion of the fusion protein, thereby effectively verifying the yeast strain having an increased secretion capacity. Thus, the present invention can be useful in selecting strains having an improved secretion capacity from a series of variant libraries, which are prepared by random mutagenesis for mass-producing recombinant proteins.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/204258 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 도입된 목적 단백질을 분비하는 효모 균주를 스크리닝하는 방법, 목적 단백질의 분비능을 향상시키는 방법, 목적 단백질의 제조방법 및 Gas1 또는 이의 융합 단백질의 분비능이 향상된 효모 변이주의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 세포벽 스트레스 조건에서 성장이 저해되는 GAS1 결손 균주를 이용하여 제조한 목적 단백질이 Gas1 단백질의 N-말단에 결합된 융합 단백질을 발현하는 효모 균주는 상기 융합 단백질의 분비에 따른 세포벽 형성에 의한 성장능 증가를 확인함으로써 분비능이 증가된 효모 균주를 효과적으로 확인할 수 있으므로, 재조합 단백질의 대량생산을 위해 무작위 돌연변이에 의해 제조한 일련의 변이주 라이브러리로부터 분비능이 향상된 균주를 선별하는데 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세포벽 결합 효모 변이주를 이용한 재조합 단백질 분비능이 향상된 효모 균주의 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 도입된 목적 단백질을 분비하는 효모 균주를 스크리닝하는 방법, 목적 단백질의 분비능을 향상시키는 방법, 목적 단백질의 제조방법 및 Gas1 또는 이의 융합 단백질의 분비능이 향상된 효모 변이주의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 단백질 의약품 개발은 유전자 재조합 기술이 보편화됨으로써 시작되었다. 특히, 생산량이 제한된 항체, 호르몬, 백신 및 생체기능성 단백질과 같은 유용한 단백질을 미생물 숙주세포에서 대량 생산하여 의약품으로 개발하는 재조합 단백질 의약품 생산기술은 미생물을 세포공장(cell factory)으로 활용하는 대표적인 미생물 이용기술로 부상하고 있다. 난치성 질환의 치료를 위한 고순도의 단백질 의약품에 대한 수요가 기하급수적으로 증가하고 있으므로, 저비용으로 대량생산 가능한 미생물 발현 시스템을 이용한 재조합 의약품 생산기술의 개발은 미래의 의약산업 성장에 크게 기여할 것으로 기대된다. 이를 위해 인체에 무해한 다양한 미생물을 이용하여 저비용으로 대량의 재조합 단백질을 생산할 수 있는 기술개발에 대한 연구가 필요하다. 미생물을 이용한 재조합 단백질 생산 연구는 주로 대장균(*Escherichia coli*; *E.coli*)을 이용하여 수행되고 있으며, 성공적인 생산이 이루어지기도 하였다. 그러나, 생산된 단백질이 활성을 갖기 위하여 당질화부가(glycosylation)와 같은 번역 후 개질(post-translational modification)이 필요한 당단백질이나 크기가 크고 구조가 복잡한 단백질의 생산에는 적용하기 어렵다는 한계가 있다. 따라서, 이러한 단점을 보완하기 위하여 당질화 능력이 있으며, 당단백질 생산에 효율적이고 생장이 빠른 효모를 이용한 연구가 이루어지고 있다. 당질화가 이루어지기 위해서는 재조합 단백질이 소포체(endoplasmic reticulum) 및 골지체(golgi apparatus)와 같은 소기관을 거쳐 세포 밖으로 효과적으로 분비 발현되어야 한다. 그러나, 대다수의 단백질들에 있어서 접힘 등의 문제로 인해 세포 밖으로의 분비가 원활하지 못한 경우가 종종 발생한다. 이를 해결하기 위하여 발현된 목적 단백질을 세포 밖으로 분비하는 성능이 우수한 효모 균주를 선별하는 것이 중요하며, 이에 따라 이들 균주를 효율적으로 선별하고 스크리닝할 수 있는 방법에 대한 요구가 증가하고 있다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 외래 재조합 단백질을 분비 및/또는 발현능이 향상된 효모 균주의 효율적인 선별을 위한 스크리닝 시스템을 개발하고자 노력한 결과, Gas1 단백질의 N-말단 쪽에 외래 재조합 단백질을 융합시킨 시스템을 개발하여, 외래 재조합 단백질과 Gas1 융합단백질이 분비가 잘되면 균주가 성장을 잘하게 되고, 반면에 분비가 잘 되지 못하면 균주가 성장을 못하게 됨으로서 분비 및/또는 발현이 잘되는 균주를 효율적으로 선별할 수 있는 스크리닝 시스템을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[6]

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 하나의 목적은 (a) Gas1을 코딩하는 유전자가 결실된 효모 변이주에 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질 및 Gas1 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; (b) 상기 핵산을 도입한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양하는 단계; 및 (c) 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입한 효모 변이주의 성장 정도를 Gas1을 코딩하는 유전자가 결실된 효모 변이주와 비교하는 단계를 포함하는, 야생형에 비하여 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 Gas1 단백질을 발현하는 효모 또는 이의 변이주에 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하고 목적 단백질과 Gas1 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 분비능을 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝하는 방법에 의해 스크리닝된 효모 균주에 목적 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝하는 방법에 의해 스크리닝된 효모 균주에 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질, 링커 및 Gas1 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 Gas1 또는 이의 융합 단백질의 분비능이 향상된 효모 변이주의 제조방법으로서, (a) Gas1 단백질을 발현하는 효모에 돌연변이를 도입하여 효모 변이주를 준비하는 단계; (b) Gas1 단백질을 발현하는 효모에서 Gas1의 유전자 또는 이의 발현에 관여하는 부위에 돌연변이를 유발시켜 Gas1 단백질의 발현을 저해시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계를 수행하여 획득한 효모 변이주에 Gas1 단백질 또는 이의 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계로부터 획득한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양시 생존하는 효모 변이주를 선별하는 단계를 포함하고, 상기 (a) 및 (b) 단계는 순차적 또는 역순으로 수행될 수 있는 것인 제조방법을 제공하는

것이다.

- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝하는 방법에 의해 스크리닝된 야생형에 비하여 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) Gas1 단백질을 발현하는 효모 또는 이의 변이주에 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하고 목적 단백질과 Gas1 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및 (b) 상기 핵산을 도입한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 발명의 세포벽 스트레스 조건에서 성장이 저해되는 GAS1 결손 균주를 이용하여 제조한 목적 단백질이 Gas1 단백질의 N-말단에 결합된 융합 단백질을 발현하는 효모 균주는 상기 융합 단백질의 분비에 따른 세포벽 형성에 의한 성장능 증가를 확인함으로써 분비능이 증가된 효모 균주를 효과적으로 확인할 수 있으므로, 재조합 단백질의 대량생산을 위해 무작위 돌연변이에 의해 제조한 일련의 변이주 라이브러리로부터 분비능이 향상된 균주를 선별하는데 유용하게 이용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명에 따른 GAS1 결손 균주에 Gas1과 외래 재조합 단백질의 융합단백질을 발현시켜 세포벽 스트레스 조건에서 세포 성장이 회복되는 생존 스크리닝을 통한 고 분비 효모 균주를 선별하는 스크리닝 시스템에 대한 개념도이다. (A) 내지 (C)는 각각 야생형 균주, 저 분비 외래 재조합 단백질(NS)과 Gas1 융합 단백질을 발현하는 GAS1 유전자가 결손된 효모 변이주 및 고 분비 외래 재조합 단백질(S)과 Gas1 융합 단백질을 발현하는 GAS1 유전자가 결손된 효모 변이주에서 Gas1의 작용 및 세포벽 스트레스 조건에서 성장을 나타낸다. (A)에 나타난 바와 같이 Gas1 단백질은 세포 표면에서 β -1,3-글루칸 세포벽 합성에 관여하며, Gas1을 발현하는 야생형 효모 균주는 세포벽 스트레스 조건에서도 성장 가능함을 나타낸 도이다. (B)는 저 분비 외래 재조합 단백질(NS)과 Gas1 융합 단백질을 발현하는 GAS1 유전자가 결손된 효모 변이주는 세포벽 합성이 저해되어 세포벽이 약해지고 이에 따라 세포벽 스트레스 조건에서 성장이 불가능함을 나타낸다. (C)는 고 분비 외래 재조합 단백질과의 융합으로 상기 외래 재조합 단백질과 더불어 Gas1이 세포 밖으로 분비되어 세포 표면에서 정상적으로 기능함으로써 세포벽 스트레스 조건에서도 성장 가능함을 나타낸 도이다.
- [18] 도 2는 본 발명에 따른 (A) 다양한 Gas1 융합 단백질들의 도메인 구조와 (B)이를 발현하는 벡터를 나타낸 도이다. *Saccharomyces cerevisiae* 효모 유래의

Gas1 단백질(*Gas1*₁₋₅₅₉)과 신호 펩타이드(signal peptide; SP)를 MF α (mating factor alpha)의 신호 펩타이드로 교체한 단백질(MF α -*Gas1*₂₃₋₅₅₉)을 발현하는 유전자를 주형 벡터(template vector)인 YEp352ScGADHpt에 클로닝하여 YEp352-G1과 YEp352-M-G1 발현 벡터들을 각각 제작하였다. 또한, 외래 재조합 단백질과의 융합 단백질 발현을 위하여 인간의 글루코세레브로시다아제(glucocerebrosidase; Gcase) 유전자와 α -갈락토시다아제(α -galactosidase; GLA) 유전자를 SpeI 제한효소를 이용하여 YEp352-M-G1 벡터에 클로닝하여 YEp352-M-Gcase-G1 및 YEp352-M-GLA-G1 발현 벡터를 각각 제작하였다.

- [19] 도 3은 야생형 *S. cerevisiae* 효모 균주; 상기 효모의 *GAS1* 결손 균주(*ScGAS1* Δ); 및 Gas1 또는 Gas1과 외래 재조합 단백질의 융합 단백질을 발현하는 *GAS1* 결손 균주들의 세포벽 스트레스 조건에 대한 반응을 나타낸 도이다. 상기 일련의 효모 균주를 일반적인 배양조건인 (A) 2% 포도당 복합 배지를 이용하여 30°C에서, 세포벽 스트레스 조건인 (B) 50 μ g/ml 콩고레드(Congo Red; CR)를 포함하는 배지에서, 및 (C) 8 μ g/ml 칼코플루오르 화이트(Calcofluor White; CFW)를 포함하는 배지에서 배양하여 성장률을 비교하였다. 액체배지에서 지수 성장기까지 배양한 효모들을 좌측으로부터 10배씩 희석하면서 점적하여 성장률을 비교하였으며, 각 레인에 점적한 효모 균주는 아래와 같다:
- [20] 1; 사카로마이세스 세레비지에 BY4741 야생형 균주(*S. cerevisiae* BY4741),
- [21] 2; *GAS1* 유전자 결손 변이주(*S. cerevisiae* BY4741 *ScGAS1* Δ),
- [22] 3; Gas1을 발현시킨 *GAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-G1),
- [23] 4; MF α 신호 펩타이드를 가진 Gas1을 발현시킨 *GAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-M-G1),
- [24] 5; MF α 신호 펩타이드, Gcase 및 Gas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *GAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-M-Gcase-G1), 및
- [25] 6; MF α 신호 펩타이드, GLA 및 Gas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *GAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-M-GLA-G1).
- [26] 도 4는 실수유발 PCR(error-prone PCR)을 통해서 돌연변이를 유발한 외래 재조합 단백질을 분비 발현하는 *S. cerevisiae* 균주를 스크리닝하기 위한 생체 내 상동 재조합 클로닝 모식도이다. 실수유발 PCR에는 벡터와 상동성이 있는, 30 bp 이상의 서열을 5'-말단에 추가적으로 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하였다. 이와 같이 증폭시킨 DNA 절편과 SpeI 제한효소로 절단된 YEp352-M-G1 벡터를 함께 효모에 첨가하면, 효모 내에서 상동 재조합 반응에 의해서 환형(circular)으로 완성된 재조합 벡터가 만들어지면서 외래 재조합 단백질 부위에 돌연변이가 도입된 Gas1 융합 단백질이 발현된다.
- [27] 도 5는 SignalP-4.1 프로그램에 의해서 예측된 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)의 Gas1 단백질(HpGas1)의 아미노산 서열의 신호 펩타이드 부분을 나타낸 도이다. 이로부터 N-말단으로부터 21번째 아미노산까지를 신호 펩타이드로 예측하였다.

- [28] 도 6은 *H. polymorpha GAS1* 결손 균주(*HpGAS1Δ*)에 도입하기 위하여 제작한 (A) *H. polymorpha Gas1*(*HpGas1*) 및 이와 결합된 융합 단백질들의 도메인 구조와 (B) 상기 융합 단백질의 발현백터를 나타낸 도이다. *H. polymorpha* 유래의 *Gas1* 단백질(*HpGas1*₁₋₅₅₉)과 신호 펩타이드를 MFα의 것으로 교체한 단백질(MFα-*HpGas1*₂₂₋₅₄₆) 및 아밀라아제(amylase)의 신호 서열(ASS)로 교체한 단백질(ASS-*HpGas1*₂₂₋₅₄₆)의 유전자를 주형 벡터인 pDLMOX에 클로닝하여 pDLMOX-G1, pDLMOX-M-G1 및 pDLMOX-A-G1 벡터들을 각각 제작하였다. 또한, 외래 제조합 단백질과의 융합 단백질 발현을 위하여 Gcase와 GLA 유전자를 EcoRI 제한효소를 이용하여 상기 pDLMOX-M-G1과 pDLMOX-A-G1 벡터에 각각 클로닝하여 pDLMOX-M-Gcase-G1, pDLMOX-M-GLA-G1, pDLMOX-A-Gcase-G1 및 pDLMOX-A-GLA-G1을 제작하였다.
- [29] 도 7은 야생형 *H. polymorpha* 효모 균주; 상기 효모의 *GAS1* 결손 균주(*HpGAS1Δ*); 및 천연형, MFα 또는 ASS의 신호 펩타이드를 포함하며, *HpGas1* 또는 *HpGas1*과 외래 제조합 단백질의 융합 단백질을 발현하는 *GAS1* 결손 균주들의 세포벽 스트레스 조건에 대한 반응을 나타낸 도이다. 상기 일련의 효모 균주를 일반적인 배양 조건인 (A) 37°C에서 1% 메탄올 복합 배지를 이용하여, 또는 세포벽 스트레스 조건인 (B) 100 μg/ml 콩고레드를 포함하는 배지에서 배양하여 성장률을 비교하였다. 액체배지에서 지수 성장기까지 배양한 효모들을 좌측으로부터 10배씩 희석하면서 점적하여 성장률을 비교하였으며, 각 레인에 점적한 효모 균주는 아래와 같다:
- [30] 1; *HpOCH1* 유전자 결손 한세놀라 폴리모르파 DL1-g22 균주(*H. polymorpha* DL1-g22),
- [31] 2; *HpGAS1* 유전자 결손 한세놀라 폴리모르파 DL1-g22 변이주(*H. polymorpha* DL1-g22 *HpGAS1Δ*),
- [32] 3; *HpGas1*을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-G1),
- [33] 4; MFα 신호 펩타이드를 가진 *HpGas1*을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-M-G1),
- [34] 5; ASS 신호 펩타이드를 가진 *HpGas1*을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-A-G1),
- [35] 6; MFα 신호 펩타이드, Gcase 및 *HpGas1*로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-M-Gcase-G1),
- [36] 7; ASS 신호 펩타이드, Gcase 및 *HpGas1*로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-A-Gcase-G1),
- [37] 8; MFα 신호 펩타이드, GLA 및 *HpGas1*로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-M-GLA-G1), 및
- [38] 9; ASS 신호 펩타이드, GLA 및 *HpGas1*로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ*/pDLMOX-A-GLA-G1).
- [39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명은 (a) *Gas1*을 코딩하는 유전자가 결실된 효모 변이주에 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질 및 *Gas1* 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; (b) 상기 핵산을 도입한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양하는 단계; 및 (c) 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입한 효모 변이주의 성장 정도를 *Gas1*을 코딩하는 유전자가 결실된 효모 변이주와 비교하는 단계를 포함하는, 야생형에 비하여 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [41] 본 발명에서 용어, "*Gas1*"은 β -1,3-글루카노실트랜스글라이코실레이즈(β -1,3-glucanotransglycosylase)로서 세포 표면으로 분비되어 β -1,3-글루칸(β -1,3-glucan) 세포벽 합성에 관여한다. 또한 상기 *Gas1*은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커(glycosylphosphatidylinositol anchor; GPI anchor)를 통해 세포 표면에 부착되는 당단백질(glycoprotein)이다. 이는 교차결합 효소로 효모 세포벽의 구조 및 투과성에 중요한 역할을 한다. 상기 *Gas1*을 코딩하는 유전자인 *GAS1*은 N-말단에는 신호 펩타이드(signal peptide; SP)를, C-말단에는 세포 표면에 고정화하기 위한 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 앵커 도메인을 포함하며, 활성 도메인이 그 사이에 위치한다.
- [42] 상기 세포벽 합성에 관여하는 단백질인 *Gas1*의 부재 즉, *GAS1* 유전자가 결손된 균주는 세포벽이 약화되어 세포벽 스트레스 조건에서는 성장하기 어렵다. 이에 본 발명자들은 *Gas1* 단백질을 리포터로 하여 *Gas1* 단백질의 N-말단에 목적 단백질을 융합시킨 융합 단백질 생산 시스템을 개발하였다. 상기 융합 단백질 생산 시스템은 *Gas1* 단백질을 포함하므로, 세포벽 스트레스 조건에서 성장이 저해되는 것을 회복하기 위하여 *Gas1*을 발현 분비하려는 성질을 나타낸다. 따라서, *Gas1*과의 융합 단백질 생산 시스템은 세포벽 스트레스 조건에서 융합 단백질의 발현 및 분비가 향상되며 해당 효모의 분비 여부 및 정도는 세포벽 스트레스 조건에서 상기 융합 단백질 생산 시스템의 성장능을 분석하여 확인할 수 있다. 본 발명의 목적상, 스크리닝을 위해서는 단순히 *Gas1*을 포함하는 융합 단백질을 분비하는 것뿐만 아니라 상기 분비된 융합 단백질이 천연형의 *Gas1* 단백질과 마찬가지로 세포 표면에 결합하여 세포벽을 형성함으로써 성장능을 회복시킬 수 있어야 하므로 세포 표면에 결합하기 위한 *Gas1*의 C-말단에 위치한 GPI 앵커 도메인은 자유롭게 결합가능한 상태로 유지되는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질 및 *Gas1* 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인의 순서로 융합되도록 고안하는 것이 바람직하다.
- [43] 본 발명에서 용어, "분비(secretion)"는 세포 또는 샘(gland)으로부터 물질을

방출하는 과정을 의미하는 것으로, 방출되는 물질이 폐기물(waste product)이 아닌 어떠한 기능을 갖는 물질이라는 점에서 배설(excretion)과는 구별된다. 전형적인 세포의 분비 기전은 포로솜(porosome; 세포미세공)이라는 세포 형질막(plasma membrane)에 있는 분비문(secretory portal)을 통한다. 특히 본 발명에서의 분비는 경로에 제한없이 세포 내에서 생성된 단백질이 세포 밖으로 방출되는 현상을 모두 포함하며, 상기 분비된 융합 단백질은 Gas1 단백질을 통해 세포벽에 고정된 형태일 수 있다. 따라서, 상기 분비된 융합 단백질로부터 목적 단백질을 회수하기 위하여 Gas1 단백질로부터 목적 단백질을 분리시키는 단계를 추가로 수행할 수 있다. 구체적인 사항은 후술할 것이다.

- [44] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 모균주로서 *GAS1* 유전자가 결손된 균주, 상기 균주에 Gas1을 발현하도록 제조된 변이주, 및 세포 밖으로의 분비능이 열악한 Gcase 및 GLA 단백질과의 융합 단백질을 생성하는 효모 변이주를 제작하고, 이들 균주의 세포벽 스트레스 조건에서의 성장능을 확인하였다. 그 결과, *GAS1* 유전자가 결손된 균주는 세포벽 스트레스 조건에서 성장하지 못하였으나, 이로부터 Gas1을 발현하도록 제조된 변이주는 성장능을 회복한 것을 확인할 수 있었다. 한편, 상기 Gas1과 Gcase 또는 GLA와의 융합 단백질을 생산하는 효모 변이주는 Gas1을 단독으로 발현하는 변이주보다는 성장능이 감소되었으나, *GAS1* 유전자가 결손된 균주에 비해서는 향상된 성장능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 3 및 도 7).
- [45] 본 발명에 따른 스크리닝 방법은 분비능이 높은 균주의 선별을 위하여 효모 변이주 라이브러리에 적용할 수 있다. 상기 효모 변이주 라이브러리는 돌연변이의 도입에 의해 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 라이브러리 제조방법을 사용하여 수행될 수 있다. 바람직하게 상기 돌연변이는 효모의 단백질 분비능을 향상시키기 위하여 수행되는 것일 수 있다.
- [46] 한편, 분비능을 향상시키기 위한 상기 돌연변이는 효모 변이주 자체에 도입되거나, 목적 단백질에 도입될 수 있다. 이때, 상기 돌연변이는 무작위 돌연변이일 수 있다.
- [47] 상기 효모 변이주 자체에 무작위 돌연변이를 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 예컨대, EMS(ethyl methanesulfonate) 또는 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 등과 같은 돌연변이 유발물질(mutagen)을 사용하는 화학적인 방법; 또는 DNA 복제시 복구(repair)와 관련된 유전자가 결손된 숙주를 사용하거나 교정기능이 손상된 POL3 유전자를 도입하는 유전학적인 방법 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [48] 또한 목적 단백질에 돌연변이를 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게는 돌연변이가 도입된 목적 단백질을 코딩하는 유전자 절편과 절단된 벡터를 함께 효모 변이주에 첨가하여 효모 내에서의 상동 재조합에 의해 효모 변이주 내의 염색체로 도입될 수 있다.
- [49] 상기 효모 변이주의 모균주는 당업계에 공지된 Gas1을 발현하는 효모 균주를

제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게 Gas1을 코딩하는 유전자를 포함하는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [50] 본 발명에서, 용어 "신호 펩타이드(signal peptide; SP)"는 신호 서열, 리더 서열 또는 리더 펩타이드라고도 불리는 5 내지 30 아미노산 길이의 짧은 펩타이드로 분비경로(secretory pathway)를 향해 예정된 새롭게 합성된 단백질의 대부분의 N-말단에 존재한다. 상기 신호 펩타이드는 단백질의 특수한 아미노산 배열로 형성된 영역으로 핵 이행 신호, 미토콘드리아 이행 신호 등이 있으며, 이는 이를 포함하는 단백질의 경로를 결정한다. 상기 단백질은 세포로부터 분비되거나 대부분의 세포막에 삽입되어 특정 기관(예컨대, 세포질세망(endoplasmic reticulum), 골지(golgi) 또는 엔도솜(endosome)) 내에 존재하는 단백질에 포함된다. 대부분의 제1형 막-결합 단백질이 신호 펩타이드를 포함함에도 불구하고 제2형 및 멀티-스패닝 막-결합 단백질의 대부분은 절단되지 않는 것을 제외하고는 신호 서열과 생화학적으로 유사한 첫번째 통과막 도메인(transmembrane domain)에 의해 분비경로로 표적화된다. 상기 신호 펩타이드를 포함하는 제1형 막-결합 단백질은 정지-이동 고정 서열(stop-transfer anchor sequence)를 갖는 지질막에 결합하며, 합성과정 동안 세포질세망 내강(성숙형이 원형질막(plasmalemma)에 위치하는 경우, 세포외 공간)을 표적하는 N-말단을 포함한다. 전술한 바와 같이 신호 펩타이드는 이를 포함하는 단백질의 세포 내 경로를 결정하므로 해당 단백질의 분비 효율을 결정하는 중요한 요소이다. 상기 신호 펩타이드는 극도로 비균질(heterogeneous)하며, 많은 원핵성 및 진핵성 신호 펩타이드는 심지어는 다른 종에서도 기능적으로 상호교환가능하다.
- [51] 따라서, 본 발명의 융합 단백질을 발현하는 효모 변이주는 신호 펩타이드로서 상기 융합 단백질에 사용되는 Gas1 유래 또는 상기 Gas1 이외의 단백질 유래의 신호 펩타이드를 제한없이 포함할 수 있다. 이때, 상기 Gas1 이외의 단백질은 다른 효모 균주의 Gas1 또는 Gas1이 아닌 다른 단백질, 바람직하게는 제1형 막-결합 단백질일 수 있다. 바람직하게는 종이나 단백질의 종류에 무관하게 단백질의 분비 효율을 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드를 이용할 수 있다.
- [52] 본 발명에 따른 GAS1 결손 효모 변이주를 이용하는 단백질 분비 효모 균주의 스크리닝 방법의 상기 (b) 단계에서 세포벽 스트레스 조건은 바람직하게 세포벽 합성 저해제를 포함하는 배지에 배양하거나, 정상적인 배양 온도보다 높은 온도에서 배양함으로써 제공될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 세포벽에 스트레스를 부여할 수 있는 배양조건을 적용할 수 있다.
- [53] 상기 세포벽 합성 저해제의 비제한적인 예는 콩고레드(Congo red; CR), 칼코플루오로 화이트(Calcofluor white), 카페인(cafeine), 캐스포펙진(caspofungin), 하이그로마이신(hygromycin), 소듐 도데실

설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS) 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

- [54] 한편, 사카로마이세스 세레비지에의 경우 정상적인 배양 온도보다 높은 37°C에서 배양함으로써 세포벽 스트레스 조건을 달성할 수 있다.

[55]

- [56] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 효모 균주에 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하고 목적 단백질과 Gas1 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 분비능을 향상시키는 방법을 제공한다.

- [57] 상기 신호 펩타이드는 전술한 바와 같이 이에 결합된 단백질의 분비 효율을 결정하며, 이는 이를 발현하는 종이나 단백질의 종류에 무관하게 상호 교환 가능하므로, Gas1 단백질의 신호 펩타이드 서열에 제한되지 않고, 종이나 단백질의 종류에 무관하게 단백질의 분비능을 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드를 선택하여 사용할 수 있다.

[58]

- [59] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 스크리닝하는 방법에 의해 스크리닝된 효모 균주에 목적 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법을 제공한다.

- [60] 바람직하게 상기 목적 단백질은 돌연변이에 의해 분비능이 향상될 수 있으며, 상기 돌연변이는 무작위 돌연변위일 수 있다.

- [61] 또한 바람직하게 상기 목적 단백질은 추가로 신호펩타이드를 포함할 수 있으며, 상기 신호펩타이드는 전술한 바와 같이, 종이나 단백질의 종류에 무관하게 단백질의 분비능을 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드를 선택하여 사용할 수 있다.

- [62] 또한 바람직하게 상기 제조방법은 스크리닝된 효모 균주가 결실된 Gas1을 코딩하는 유전자를 회복한 것일 수 있다.

[63]

- [64] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 스크리닝하는 방법에 의해 스크리닝된 효모 균주에 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질, 링커 및 Gas1 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법을 제공한다.

- [65] 바람직하게 상기 목적 단백질은 전술한 바와 같이, 돌연변이에 의해 분비능이 향상될 수 있으며, 상기 돌연변이는 무작위 돌연변위일 수 있고, 추가로 신호펩타이드를 포함할 수 있으며, 상기 신호펩타이드는 종이나 단백질의 종류에 무관하게 단백질의 분비능을 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드를 선택하여 사용할 수 있다.

- [66] 바람직하게 상기 제조방법은 분비된 융합 단백질로부터 목적 단백질을 회수하기 위하여 Gas1 단백질로부터 목적 단백질을 분리시키는 단계를 추가로 수행할 수 있다. 상기 목적 단백질을 분리시키는 단계는 당업계에 공지된 방법을

제한없이 이용하여 수행될 수 있다. 또한 상기 목적 단백질의 분리를 용이하게 하기 위하여 상기 Gas1 단백질과 목적 단백질이 용이하게 절단될 수 있는 링커를 통하여 연결된 융합 단백질의 형태로 발현하도록 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 고안할 수 있다. 상기 링커는 이에 제한되지 않으나, 제한효소에 의해 절단될 수 있도록 특이적인 결합자리를 갖는 서열로 구성되는 펩타이드 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[67]

[68] 또 다른 양태로서, 본 발명은 Gas1 또는 이의 융합 단백질의 분비능이 향상된 효모 변이주의 제조방법으로서, (a) Gas1 단백질을 발현하는 효모에 돌연변이를 도입하여 효모 변이주를 준비하는 단계; (b) Gas1 단백질을 발현하는 효모에서 Gas1의 유전자 또는 이의 발현에 관여하는 부위에 돌연변이를 유발시켜 Gas1 단백질의 발현을 저해시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계를 수행하여 획득한 효모 변이주에 Gas1 단백질 또는 이의 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계로부터 획득한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양시 생존하는 효모 변이주를 선별하는 단계를 포함하고, 상기 (a) 및 (b) 단계는 순차적 또는 역순으로 수행될 수 있는 것인 제조방법을 제공한다.

[69] 상기 Gas1 단백질을 발현하는 효모 자체에 돌연변이를 도입하는 (a) 단계와 Gas1 단백질을 발현하는 효모에서 Gas1의 유전자 또는 이의 발현에 관여하는 부위에 돌연변이를 유발시켜 Gas1 단백질의 발현을 저해시키는 (b) 단계는 서로 독립적인 단계이므로, 상기 두 단계의 수행 순서는 본 발명의 제조방법에 영향을 미치지 않는다. 따라서, 순차적으로 또는 역순으로 수행될 수 있다.

[70] 전술한 바와 같이, 상기 신호 펩타이드는 종이나 단백질의 종류에 무관하게 단백질의 분비능을 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드를 선택하여 사용할 수 있다.

[71]

[72] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 스크리닝하는 방법에 의해 스크리닝된 야생형에 비하여 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주를 제공한다.

[73] 바람직하게 상기 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주는 상기 스크리닝된 효모 균주의 결실된 Gas1을 코딩하는 유전자를 회복시킨 것일 수 있다.

[74]

[75] 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) Gas1 단백질을 발현하는 효모 또는 이의 변이주에 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하고 목적 단백질과 Gas1 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및 (b) 상기 핵산을 도입한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법을 제공한다.

[76] 바람직하게 상기 변이주는 Gas1 단백질을 발현하는 효모에서 Gas1의 유전자 또는 이의 발현에 관여하는 부위에 돌연변이가 유발되어 Gas1 단백질의 발현이 저해된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 Gas1 단백질을 코딩하는 유전자인 *GAS1*을 제거한 *GAS1* 결손 변이주일 수 있다.

- [77] 전술한 바와 같이, 상기 신호 펩타이드는 종이나 단백질의 종류에 무관하게 단백질의 분비능을 향상시킬 수 있는 신호 펩타이드를 선택하여 사용할 수 있다.
- [78] 상기 분비된 융합 단백질로부터 목적 단백질을 회수하기 위하여 Gas1 단백질로부터 목적 단백질을 분리시키는 단계를 추가로 수행할 수 있다. 상기 목적 단백질을 분리시키는 단계는 당업계에서 공지된 방법을 제한없이 이용하여 수행될 수 있다. 또한 상기 목적 단백질의 분리를 용이하게 하기 위하여 상기 Gas1 단백질과 목적 단백질이 용이하게 절단될 수 있는 링커를 통하여 연결된 융합 단백질의 형태로 발현하도록 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 고안할 수 있다. 상기 링커는 이에 제한되지 않으나, 제한효소에 의해 절단될 수 있도록 특이적인 결합자리를 갖는 서열로 구성되는 펩타이드 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[79]

발명의 실시를 위한 형태

- [80] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[81]

[82] 실시예 1: *S. cerevisiae* 효모의 GAS1 스크리닝 시스템용 벡터 제작

[83]

[84] 실시예 1.1: ScGAS1 유전자 발현벡터의 제작

[85]

- [86] 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information; NCBI) 웹사이트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 검색을 통하여 *S. cerevisiae* 효모의 GAS1(ScGAS1) 유전자 서열을 확보하였다. 선행문헌으로부터 559개 아미노산 서열 중 N-말단 1 내지 22번의 신호 펩타이드를 포함하며, 23 내지 559번에 활성도메인 및 세포 표면에 대한 고정(localization) 정보가 존재함을 확인하였다(Carotti *et al.*, Eur. J. Biochem., 2004, 271(18): 3635-3645). 상기 세포 표면에 단백질을 고정시키는 역할을 하는 글리코실포스파티딜이노시톨-앵커(glycosylphosphatidylinositol-anchor; GPI-anchor) 도메인은 C-말단에 위치한다. 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) BY4741 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하고 ScGas1-F(서열번호 1) 및 ScGas1-R(서열번호 2)를 프라이머로 이용하여 PCR을 수행하여 ScGAS1 유전자를 획득하였다. 상기 획득한 DNA 절편을 BamHI 제한효소를 이용하여 YEp352ScGAPDHpt 벡터에 클로닝하여 YEp352-G1을 제작하였다(도 2B 좌측). 또한, ScGAS1의 신호 펩타이드(N-말단으로부터 1 내지 22번)를 MF α (mating factor α)의 신호 펩타이드로 교체하기 위한 클로닝을 수행하였다. 구체적으로 Invitrogen 사의

pPICZ α A 벡터를 주형으로 사용하고, MFa-F(YEp352)(서열번호 3) 및 MFa-R(YEp352)(서열번호 4) 프라이머쌍을 이용하여 MF α 의 N-말단 신호 펩타이드를 포함하는 prepro 서열을 PCR로 증폭시켰다. 이후 BY4741 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하고 ScGas1_w/o_SP-F(서열번호 5) 및 ScGas1-R(서열번호 2)를 프라이머로 이용하여 신호 펩타이드의 후방의 ScGAS1 유전자 서열을 증폭시켰으며, 융합 PCR(fusion PCR)을 수행하여 이를 앞서 수득한 MF α 의 prepro 부분 DNA와 결합시켰다. 최종 융합 PCR에는 MFa-F(서열번호 3)와 ScGas1-R(서열번호 2) 프라이머쌍을 사용하였다. 증폭된 DNA는 BamHI 제한효소를 이용하여 YEp352ScGAPDHpt 벡터에 클로닝하여 YEp352-M-G1을 제작하였다(도 2B 좌측).

[87]

[88] 실시예 1.2: ScGas1과 외래 재조합 단백질의 융합 단백질 발현을 위한 발현벡터의 제작

[89]

[90] 본 발명에서는 외래 재조합 단백질로서 인간 글루코세레브로시다아제(glucocerebrosidase; Gcase) 및 α -갈락토시다아제(α -galactosidase; GLA) 효소 단백질을 선택하였다. 상기 단백질은 각각 고셔병(Gaucher disease)과 파브리병(Fabry disease) 환자에 투여되는 고가의 효소 치료제로서 현재로서는 동물세포인 CHO(chinese hamster ovary) 세포를 이용하여 생산되고 있으나, 분비 발현이 어려운 단백질이다. 본 발명자들은 인간의 cDNA로부터 Gcase-F(서열번호 6) 및 Gcase-R(서열번호 7)의 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 통해 Gcase 유전자를 증폭하여 수득하였다. 이후, SpeI 제한효소를 사용하여 상기 실시예 1.1.에서 구축한 YEp352-M-G1 벡터에 이를 클로닝하여 YEp352-M-Gcase-G1 벡터를 제작하였다(도 2B 우측). 마찬가지로 GLA-F(서열번호 8) 및 GLA-R(서열번호 9)를 프라이머쌍으로 이용하여 전술한 방법으로 GLA 유전자를 증폭시켜 수득하고 이를 YEp352-M-G1 벡터에 클로닝하여 YEp352-M-GLA-G1 벡터를 제작하였다(도 2B 우측).

[91]

[92] 실시예 2: ScGAS1 결손 균주에서 ScGas1과 외래 재조합 단백질의 융합 단백질 발현을 통한 세포벽 스트레스 저항성 회복

[93]

[94] Gas1 융합 단백질의 세포벽 스트레스 저항성 회복기능을 이용한 고 분비 균주 스크리닝 시스템의 개념을 증명하기 위하여 *S. cerevisiae* 효모의 GAS1 결손 균주를 이용하였다. 상기 ScGAS1 결손 균주(*S. cerevisiae* BY4741 ScGAS1 Δ , YSC1021-551615)는 오픈 바이오시스템즈 사로부터 구입하여 사용하였다. 상기 ScGAS1 Δ 균주에 실시예 1에서 제작한 YEp352-G1, YEp352-M-G1, YEp352-M-Gcase-G1 및 YEp352-M-GLA-G1 벡터를 형질전환으로 도입하였다.

이후 이들 형질전환 균주들을 세포벽 스트레스 조건에서 배양하여 성장 정도를 확인하였다. 대조군으로는 야생형 균주 및 *GAS1* 결손 균주를 사용하였다. 세포벽 스트레스 조건을 제공하기 위하여 세포벽 합성 저해제인 콩고레드 또는 칼코플루오르 화이트를 각각 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 8 $\mu\text{g/ml}$ 로 포함하는 2% 포도당 복합배지를 사용하였다.

- [95] 구체적으로, *S. cerevisiae* BY4741 야생형 균주, *ScGAS1* 유전자 결손 변이주(*S. cerevisiae* BY4741 *ScGAS1* Δ), Gas1을 발현시킨 *ScGAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-G1), MF α 신호 펩타이드를 가진 Gas1을 발현시킨 *ScGAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-M-G1), MF α 신호 펩타이드, Gcase 및 Gas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *ScGAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-M-Gcase-G1), 및 MF α 신호 펩타이드, GLA 및 Gas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *ScGAS1* 결손 변이주(*ScGAS1* Δ /YEp352-M-GLA-G1)를 각각 3 ml 씩 2% 포도당 복합배지에 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 상기 배양한 균주들을 지수 성장기(exponential growth phase)에 수득하여 멸균수 1 ml에 초기 OD₆₀₀ 값을 1로 조절하고 1/10씩 연속적으로 희석하였다. OD를 1로 조절한 균주 및 일련의 희석한 균주를 2% 포도당 복합배지, 50 $\mu\text{g/ml}$ 콩고레드를 포함하는 배지 및 8 $\mu\text{g/ml}$ 칼코플루오르 화이트를 포함하는 배지에 1 μl 씩 집적하여 30°C에서 2일 또는 3일간 배양하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

- [96] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 야생형 균주는 세포벽 스트레스 조건인 50 $\mu\text{g/ml}$ 콩고레드 또는 8 $\mu\text{g/ml}$ 칼코플루오르 화이트를 포함하는 배지에서도 뛰어난 성장능을 나타낸 반면, *ScGAS1* 결손 변이주는 성장이 저해되었다. 그러나, *ScGas1* 또는 MF α 의 신호 펩타이드를 포함하는 *ScGas1*을 발현하는 *ScGAS1* 결손 변이주에서는 세포벽 스트레스 조건에서 성장능이 회복되는 것을 확인하였다. 한편, 세포 밖으로 분비가 잘 되지 않는 Gcase 또는 GLA 단백질과 연결된 융합 단백질을 발현하는 경우에는 전방의 Gcase 또는 GLA 단백질로 인해 *ScGas1* 단백질이 분비되더라도 세포 밖으로 분비되어 세포 표면에 정상적으로 위치하지 못하여 세포벽 스트레스 조건에서 성장이 크게 저해되는 것을 관찰할 수 있었다. 다만, 상대적으로 분비능이 다소 높은 GLA와의 융합 단백질을 발현하는 변이주의 경우 Gcase와의 융합 단백질을 발현하는 변이주보다 다소 높은 성장능을 나타내나 여전히 *ScGas1* 단백질을 발현하는 변이주보다는 성장이 현저히 저해되었다.

[97]

[98] 실시예 3: 돌연변이에 의해 분비능이 향상된 효모 균주의 선별

[99]

[100] 실시예 3.1: 실수유발(error-prone) PCR에 의한 외래 재조합 단백질 내 돌연변이의 도입

[101]

[102] 실수유발 PCR을 이용하여 외래 재조합 단백질에 무작위적인 돌연변이를

도입하고 이를 생체 내 상동 재조합 클로닝 방법을 이용하여 ScGas1과 융합 단백질로 ScGAS1 결손 균주에서 발현되도록 하여 세포벽 스트레스 조건에서 성장능이 향상된 균주를 선별하고자 하였다.

- [103] 구체적으로, 인간 Gcase 유전자를 효모에서 고 발현 되도록 코돈이 최적화된 Gcase 유전자(cGcase)를 합성하여 사용하였다(DNA2.0). 상기 합성된 cGcase 유전자를 주형으로 하고 error-cGcase-F(서열번호 10)와 error-cGcase-R(서열번호 11) 프라이머를 사용하였으며, 클론테크 사의 Diversify PCR Random Mutagenesis Kit를 이용하여 실수유발 PCR을 수행하였다. 상기 프라이머들은 YEp352-M-G1 벡터의 MF α 신호 펩타이드 및 GAS1 유전자와 각각 30 bp 이상 중첩되도록 제작하였다(도 4). 이와 같이 증폭된 DNA 절편을 SpeI 제한효소로 절단한 YEp352-M-G1 벡터와 함께 형질전환에 의해 ScGAS1 결손 균주(*S. cerevisiae* BY4741 ScGAS1 Δ)에 도입시켰다. 이로부터, 효모 내에서 상동 재조합 반응에 의해서 환형(circular)으로 완성된 재조합 벡터 YEp352-M-errorGcase-G1을 형성하여 외래 재조합 단백질 부위에 돌연변이가 도입된 Gas1 융합단백질을 발현시켰다. 상기 제조한 일련의 돌연변이 Gcase가 연결된 ScGas1 융합 단백질을 분비하는 균주를 100 μ g/ml 콩고레드 SC-URA 최소 배지에서 배양하여 성장능을 확인하고 분비 발현 능력이 향상된 변이주를 선별하여 확보하였다.

[104]

[105] 실시예 3.2: 효모 균주에 돌연변이의 도입

[106]

- [107] 상기 실시예 3.1.에서는 외래 재조합 단백질에 돌연변이를 도입하여 분비 발현능력이 향상된 효모 균주를 선별하는 전략을 제시하였다. 또 다른 방법으로서 외래 재조합 단백질보다는 효모 균주 자체에 무작위 돌연변이를 도입하고, 본 발명에 따른 Gas1 스크리닝 시스템을 이용하여 분비 발현능이 향상된 돌연변이 변이주를 선별할 수 있다. 효모 균주에 무작위 돌연변이를 도입하는 방법으로는 EMS 또는 NTG 등과 같은 돌연변이 유발물질(mutagen)을 사용하는 화학적인 방법 또는 DNA 복제시 복구(repair)와 관련된 유전자가 결손된 숙주를 사용하거나 교정 기능이 손상된 POL3 유전자를 도입하는 등의 유전학적인 방법 등을 사용할 수 있다.

[108]

[109] 실시예 4: 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 효모 균주에서 Gas1 기반 분비 발현 균주의 선별

[110]

- [111] 본 발명자들은 GAS1 결손 균주에 Gas1 단백질과 외래 재조합 단백질을 융합 발현시켜서 성장이 회복되는 생존 스크리닝 방법이 *S. cerevisiae* 효모에만 국한되지 않고, 다른 효모들에도 적용이 되는지 확인하고자 하였다. 이를 위해서 메탄올자화 효모 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)와 더불어 재조합 단백질 분비 발현용으로 널리 사용되고 있는 *H. polymorpha* 효모에 상기 본 발명에 따른

Gas1 기반 스크리닝 시스템이 적용될 수 있는지를 테스트하였다.

[112]

[113] **4.1: HpGAS1 유전자 발현벡터의 제작**

[114]

[115] 본 발명자들은 대한민국 특허공개번호 제2013-0142900호에서 규명하였던 *H. polymorpha*의 *GAS1* 유전자(*HpGAS1*)가 발현하는 아미노산 서열과 SignalP 프로그램(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)을 이용하여 신호 펩타이드 부위를 예측하였다. 그 결과, 전체 546개의 아미노산 중 1 내지 21번의 아미노산이 신호 펩타이드인 것으로 예측되었다. 따라서, 22 내지 546번까지의 아미노산에 활성 도메인과 세포 표면에 고정을 위한 GPI-앵커 도메인이 존재할 것으로 유추할 수 있었다. 본 발명자들은 *H. polymorpha* DL1 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하고, HpGas1-F(서열번호 12) 및 HpGas1-R(서열번호 13) 프라이머들을 이용하여 PCR을 통해 *HpGAS1* 유전자를 수득하였다. 이렇게 수득한 DNA 절편을 HindIII 제한효소를 이용해서 pDLMOX 벡터에 클로닝하여 pDLMOX-G1을 제작하였다(도 6B의 좌측). 또한, HpGas1의 신호 펩타이드를 MF α 또는 ASS의 신호 펩타이드로 바꾸어 주기 위한 클로닝도 수행하였다. 이를 위하여 Invitrogen 사의 pPICZ α A 벡터를 주형으로 하고, MF α -F(pDLMOX)(서열번호 14) 및 MF α -R(pDLMOX)(서열번호 15) 프라이머들을 이용하여 MF α N-말단의 신호 펩타이드를 포함한 prepro 서열을 PCR로 증폭시켰다. 또한, DL1 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하고, HpGas1_w/o_SP-F(서열번호 17) 및 HpGas1-R(서열번호 13) 프라이머들을 이용하여 신호 펩타이드 후방의 *HpGAS1* 유전자 서열을 증폭시켰으며, 이를 앞에서 수득한 MF α 의 prepro 부분 DNA와 융합 PCR(fusion PCR)을 통해서 연결하였다. 최종 융합 PCR에는 MF α -F(pDLMOX)(서열번호 14)와 HpGas1-R(서열번호 13) 프라이머를 사용하였다. 증폭된 DNA는 HindIII 제한효소를 이용해서 pDLMOX 벡터에 클로닝하여 pDLMOX-M-G1을 제작하였다(도 6B의 좌측). 아밀라아제의 신호 펩타이드, ASS는 단일 프라이머 AmylasesSS_HpGas1-F(서열번호 16)를 이용하여 HpGas1 단백질에 연결하였다. 구체적으로, DL1 균주로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하고, AmylasesSS_HpGas1-F(서열번호 16)와 HpGas1-R(서열번호 13) 프라이머들을 이용하여 증폭하였으며, 이를 HindIII 제한효소를 이용하여 pDLMOX 벡터에 도입하여 pDLMOX-A-G1을 제작하였다(도 6B의 좌측).

[116]

[117] **실시예 4.2: 외래 재조합 단백질과 융합한 *HpGAS1* 유전자 발현벡터의 제작**

[118]

[119] 본 발명자들은 외래 재조합 단백질들로서 상기 *S. cerevisiae* 균주에서와 동일하게 인간 글루코세레브로시다아제(Gcase)와 α -갈락토시다아제(GLA) 효소 단백질을 선택하였다. 본 발명자들은 인간의 cDNA로부터

Gcase-F(MFa-tag)(서열번호 18)와 Gcase-R(preHpGas-tag)(서열번호 20) 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 Gcase 유전자를 증폭시켜 수득하였다. 나아가, 상기 수득한 유전자를 EcoRI 제한효소를 이용하여 실시예 4.1.에서 구축한 pDLMOX-M-G1 벡터에 클로닝하여 pDLMOX-M-Gcase-G1 벡터를 제작하였다. 또한, Gcase-F(Amyl-tag)(서열번호 19)와 Gcase-R(preHpGas-tag)(서열번호 20) 프라이머를 이용하여 Gcase 유전자를 증폭하고 EcoRI 제한효소를 이용하여 실시예 4.1.에서 구축한 pDLMOX-A-G1 벡터에 클로닝하여 pDLMOX-A-Gcase-G1 벡터를 구축하였다. 마찬가지로 GLA-F(MFa-tag)(서열번호 21)와 GLA-R(preHpGas-tag)(서열번호 23) 프라이머를 이용하여 GLA 유전자를 PCR로 증폭하여 수득하였고, 이를 EcoRI 제한 효소를 이용하여 pDLMOX-M-G1 벡터에 클로닝하여 pDLMOX-M-GLA-G1 벡터를 제작하였다. 또한, GLA-F(Amyl-tag)(서열번호 22)와 GLA-R(preHpGas-tag)(서열번호 23) 프라이머를 이용하여 GLA 유전자를 증폭하고 EcoRI 제한효소를 이용하여 실시예 4.1.에서 구축한 pDLMOX-A-G1 벡터에 클로닝하여 pDLMOX-A-GLA-G1 벡터를 구축하였다.

[120]

[121] 실시예 4.3: *HpGAS1* 결손 균주에서 HpGas1과 외래 제조합 단백질의 융합 단백질 발현을 통한 세포벽 스트레스 저항성 회복

[122]

[123] 상기 실시예 2를 통해 *S. cerevisiae* 효모에서 검증된 Gas1 융합 단백질의 세포벽 스트레스 저항성 회복 기능을 이용한 스크리닝 시스템이 *H. polymorpha* 효모에서도 작동하는지를 알아보기 위하여 추가적인 실험을 수행하였다. 산업적 활용 가능성을 고려하여 효모 특이적인 당사슬을 부가하는 *HpOCH1* 유전자가 결손된 DL1-g22 균주를 모균주로 사용하였다(Cheon *et al*, J. Micorbiol., 2012, 50: 341-348). 본 발명자들은 대한민국 특허공개번호 제2013-0142900호에서 사용하였던 Ura 카세트를 이용한 *HpGAS1* 유전자 결손과 동일한 방법을 사용하여 *H. polymorpha* DL1-g22 균주에서 *HpGAS1* 유전자를 결손시켜 *g22-HpGas1Δ* 균주를 제작하였다. 그리고, *g22-HpGas1Δ* 균주에 실시예 4.1. 및 4.2.에서 제작한 pDLMOX-G1, pDLMOX-M-G1, pDLMOX-A-G1, pDLMOX-M-Gcase-G1, pDLMOX-A-Gcase-G1, pDLMOX-M-GLA-G1 및 pDLMOX-A-GLA-G1 벡터들을 형질전환으로 도입하였다. 상기 형질전환 균주들과 대조균으로써 DL1-g22 균주를 세포벽 스트레스 조건에서 배양하여 성장을 비교하였다. 세포벽 스트레스 조건을 위해서는 세포벽 합성 저해제로서 100 $\mu\text{g/ml}$ 쿡고레드와 탄소원으로 1% 메탄올(MeOH)을 포함하는 복합 배지를 사용하였다.

[124]

구체적으로, *HpOCH1* 유전자 결손 한세놀라 폴리모르파 DL1-g22 균주(DL1-g22), *HpGAS1* 결손 변이주(*g22-HpGAS1Δ*), HpGas1을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1Δ/pDLMOX-G1*), MFα 신호 펩타이드를 가진

HpGas1을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1*Δ/pDLMOX-M-G1), ASS 신호 펩타이드를 가진 HpGas1을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1*Δ/pDLMOX-A-G1), MFα 신호 펩타이드, Gcase 및 HpGas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1*Δ/pDLMOX-M-Gcase-G1), ASS 신호 펩타이드, Gcase 및 HpGas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1*Δ/pDLMOX-A-Gcase-G1), MFα 신호 펩타이드, GLA 및 HpGas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1*Δ/pDLMOX-M-GLA-G1), 및 ASS 신호 펩타이드, GLA 및 HpGas1로 연결된 융합 단백질을 발현시킨 *HpGAS1* 결손 변이주(*HpGAS1*Δ/pDLMOX-A-GLA-G1)를 각각 3 ml씩 37°C에서 1% 포도당 복합 배지에 200 rpm으로 진탕배양하였다. 상기 배양한 균주들을 지수 성장기에 수득하여 멸균수 1 ml에 초기 OD₆₀₀ 값을 1로 조절하고 1/10씩 연속적으로 희석하였다. 상기 OD를 1로 조절한 균주 및 일련의 희석한 균주를 1% 메탄올 복합 배지(도 7A) 및 100 μg/ml 콩고레드를 포함하는 배지(도 7B)에 1 μl씩 집적하여 37°C에서 2일 또는 3일간 배양하였다.

[125] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 야생형은 세포벽 스트레스 조건인 100 μg/ml 콩고레드를 포함하는 배지에서도 우수한 성장능을 나타내는데 반해, *HpGAS1* 결손 균주는 성장이 현저히 저해되는 것을 확인하였다. 한편, *HPGAS1* 결손 균주에 HpGas1 또는 다른 신호 펩타이드를 포함하는 HpGas1 단백질을 발현하게 되면, 신호 펩타이드의 종류와 무관하게, 세포벽 스트레스 조건에서도 성장능이 회복됨을 확인하여였다. 또한, Gcase 또는 GLA와 HpGas1을 융합한 단백질들의 경우에서도 HpGas1 단백질만 발현시킨 경우보다는 미약하지만 *HpGAS1* 결손 균주에 비해서는 성장이 다소 회복되는 것을 관찰할 수 있었다.

[126] 이와 같은 결과는, 본 발명의 Gas1 기반 스크리닝 시스템이 다양한 효모 종류에서 분비능이 우수한 효모를 스크리닝할 수 있음을 시사하는 것이며, 이와 같이 스크리닝된 효모 균주를 이용해 다양한 목적 단백질을 대량 생산할 수 있음을 시사하는 것이다.

[127]

[128] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

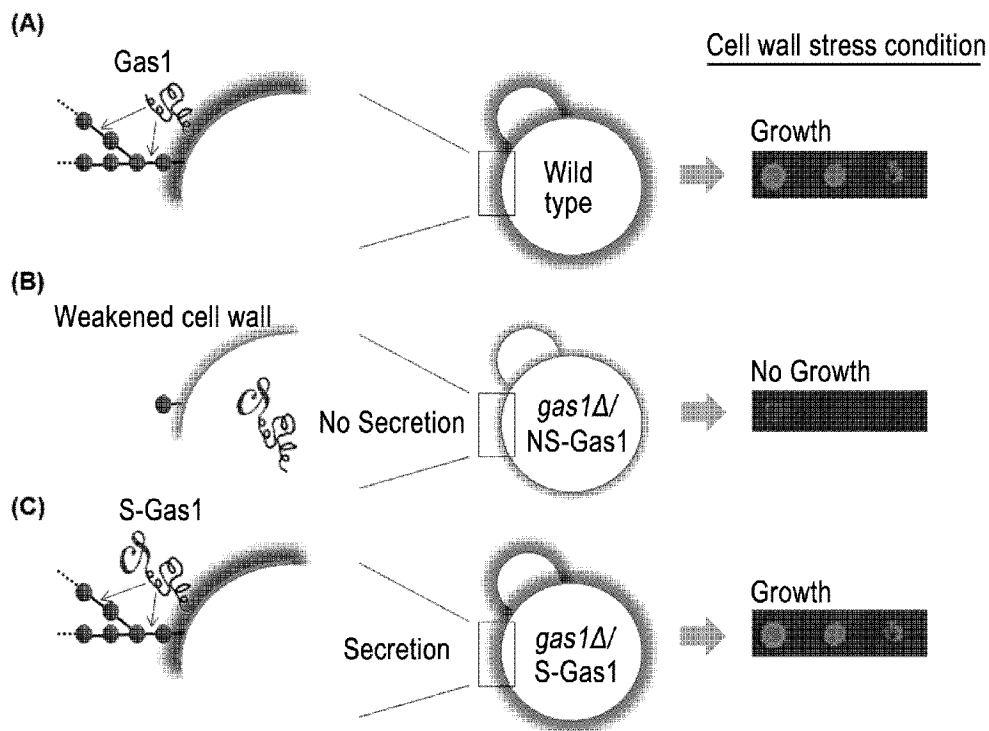
청구범위

- [청구항 1] (a) Gas1을 코딩하는 유전자가 결실된 효모 변이주에 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질 및 Gas1 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계;
(b) 상기 핵산을 도입한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양하는 단계; 및
(c) 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입한 효모 변이주의 성장 정도를 Gas1을 코딩하는 유전자가 결실된 효모 변이주와 비교하는 단계를 포함하는, 야생형에 비하여 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주를 스크리닝하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 효모 변이주는 효모 변이주 라이브러리인 것인 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 효모 변이주의 모균주는 Gas1을 코딩하는 유전자를 포함하는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 균주인 것인 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 신호 펩타이드는 융합 단백질에 사용되는 Gas1 유래 또는 상기 Gas1 이외의 단백질 유래인 것인 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 Gas1 이외의 단백질은 상기 (a) 단계의 효모 변이주 이외의 다른 효모 균주의 Gas1; 또는 Gas1이 아닌 다른 단백질인 것인 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 (b) 단계에서 세포벽 스트레스 조건은 세포벽 합성 저해제를 포함하는 배지에 배양하거나, 정상적인 배양 온도보다 높은 온도에서 배양함으로써 제공되는 것인 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 세포벽 합성 저해제는 킵고레드, 칼코플루오로 화이트, 카페인, 캐스포핀진, 하이그로마이신 및 소듐 도데실 설페이트로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포벽 합성 저해제인 것인 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 효모 변이주는 무작위 돌연변이에 의해 분비능이 향상된

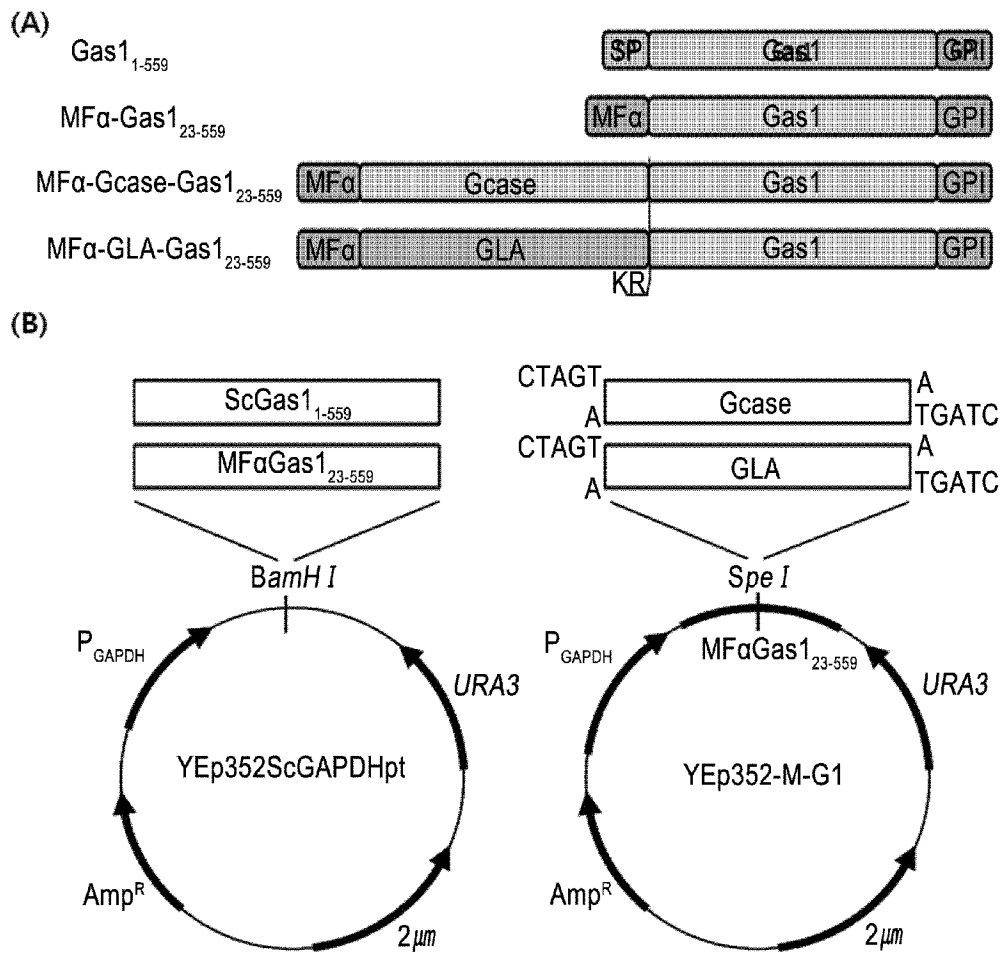
- 것인 방법.
- [청구항 9] Gas1 단백질을 발현하는 효모 또는 이의 변이주에 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하고 목적 단백질과 Gas1 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 분비능을 향상시키는 방법.
- [청구항 10] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 스크리닝된 효모 균주에 목적 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 목적 단백질은 무작위 돌연변이에 의해 분비능이 향상된 것인 제조방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 목적 단백질은 추가로 신호펩타이드를 포함하는 것인 제조방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 스크리닝된 효모 균주는 결실된 Gas1을 코딩하는 유전자가 회복된 것인 제조방법.
- [청구항 14] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 스크리닝된 효모 균주에 N-말단으로부터 차례로 신호 펩타이드, 목적 단백질, 링커 및 Gas1 단백질의 신호 펩타이드를 제외한 도메인이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 융합 단백질의 링커를 제한효소로 절단하여 목적 단백질을 분리시키는 것인 제조방법.
- [청구항 16] Gas1 또는 이의 융합 단백질의 분비능이 향상된 효모 변이주의 제조방법으로서,
(a) Gas1 단백질을 발현하는 효모에 돌연변이를 도입하여 효모 변이주를 준비하는 단계;
(b) Gas1 단백질을 발현하는 효모에서 Gas1의 유전자 또는 이의 발현에 관여하는 부위에 돌연변이를 유발시켜 Gas1 단백질의 발현을 저해시키는 단계; 및
(c) 상기 (a) 및 (b) 단계를 수행하여 획득한 효모 변이주에 Gas1 단백질 또는 이의 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및
(d) 상기 (c) 단계로부터 획득한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양시 생존하는 효모 변이주를 선별하는 단계를 포함하고, 상기 (a) 및 (b) 단계는 순차적 또는 역순으로 수행될 수

- 있는 것인 제조방법.
- [청구항 17] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 스크리닝된 야생형에 비하여 목적 단백질의 분비능이 향상된 효모 균주.
- [청구항 18] (a) Gas1 단백질을 발현하는 효모 또는 이의 변이주에 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하고 목적 단백질과 Gas1 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; 및
(b) 상기 핵산을 도입한 효모 변이주를 세포벽 스트레스 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 제조방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 변이주는 Gas1 단백질을 발현하는 효모에서 Gas1의 유전자 또는 이의 발현에 관여하는 부위에 돌연변이가 유발되어 Gas1 단백질의 발현이 저해된 것인 제조방법.

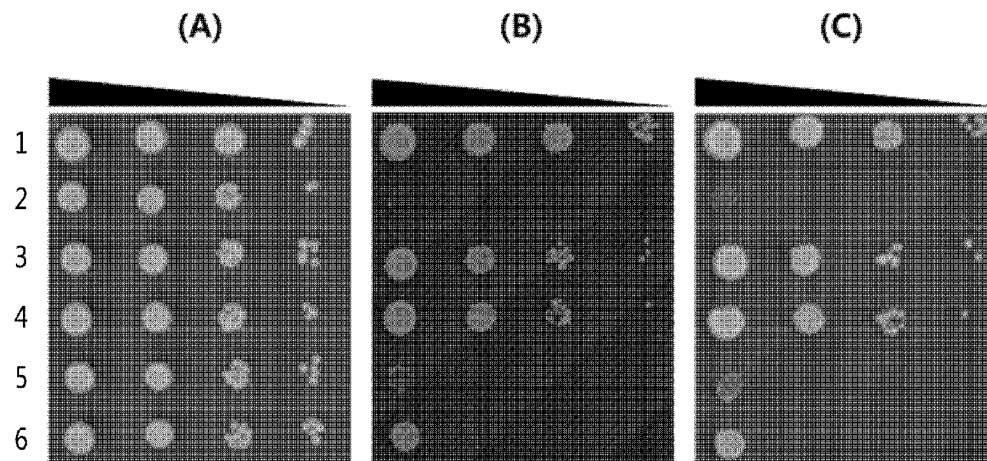
[Fig. 1]



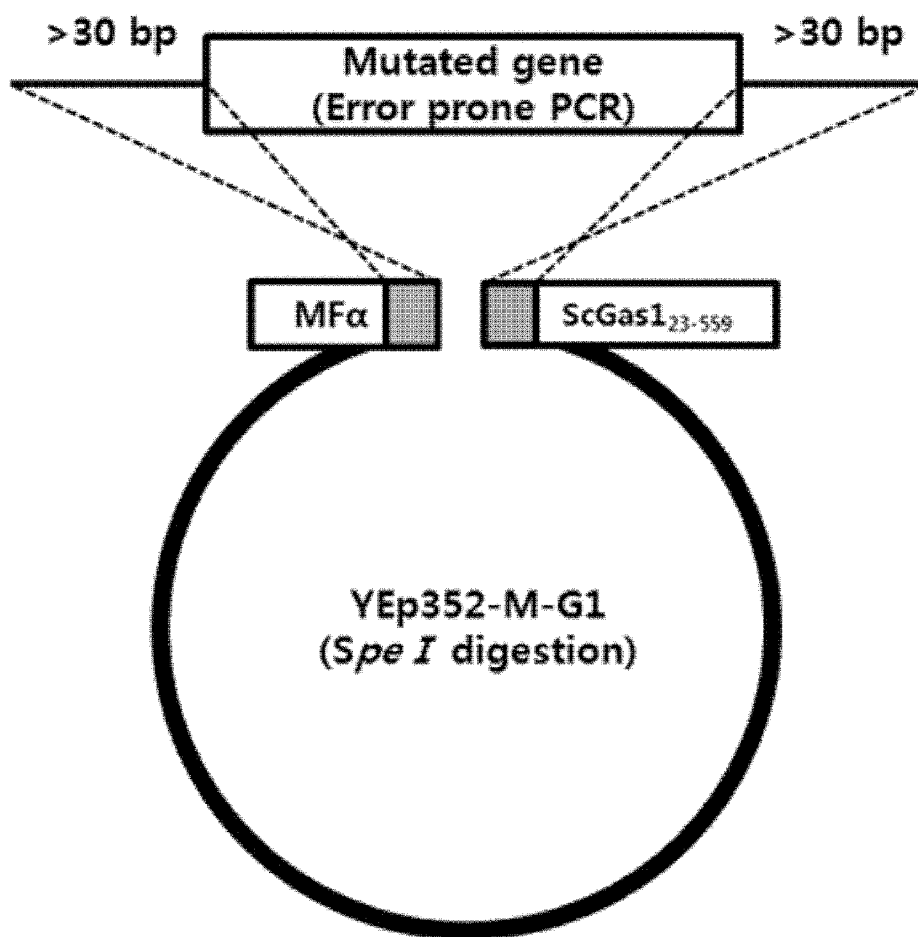
[Fig. 2]



[Fig. 3]

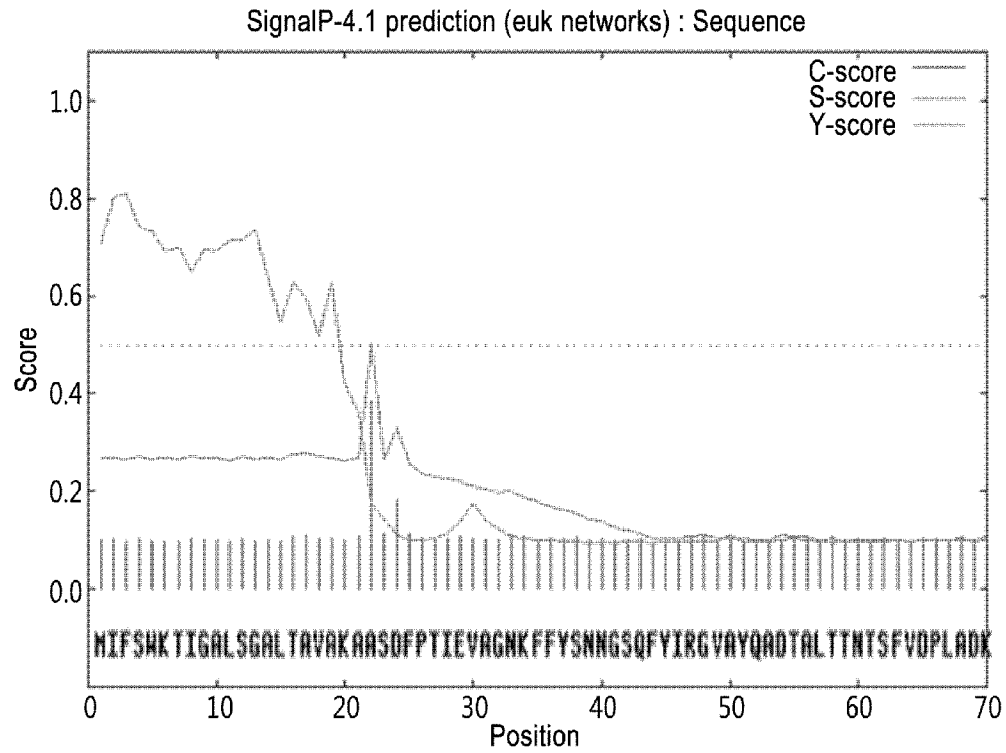


[Fig. 4]

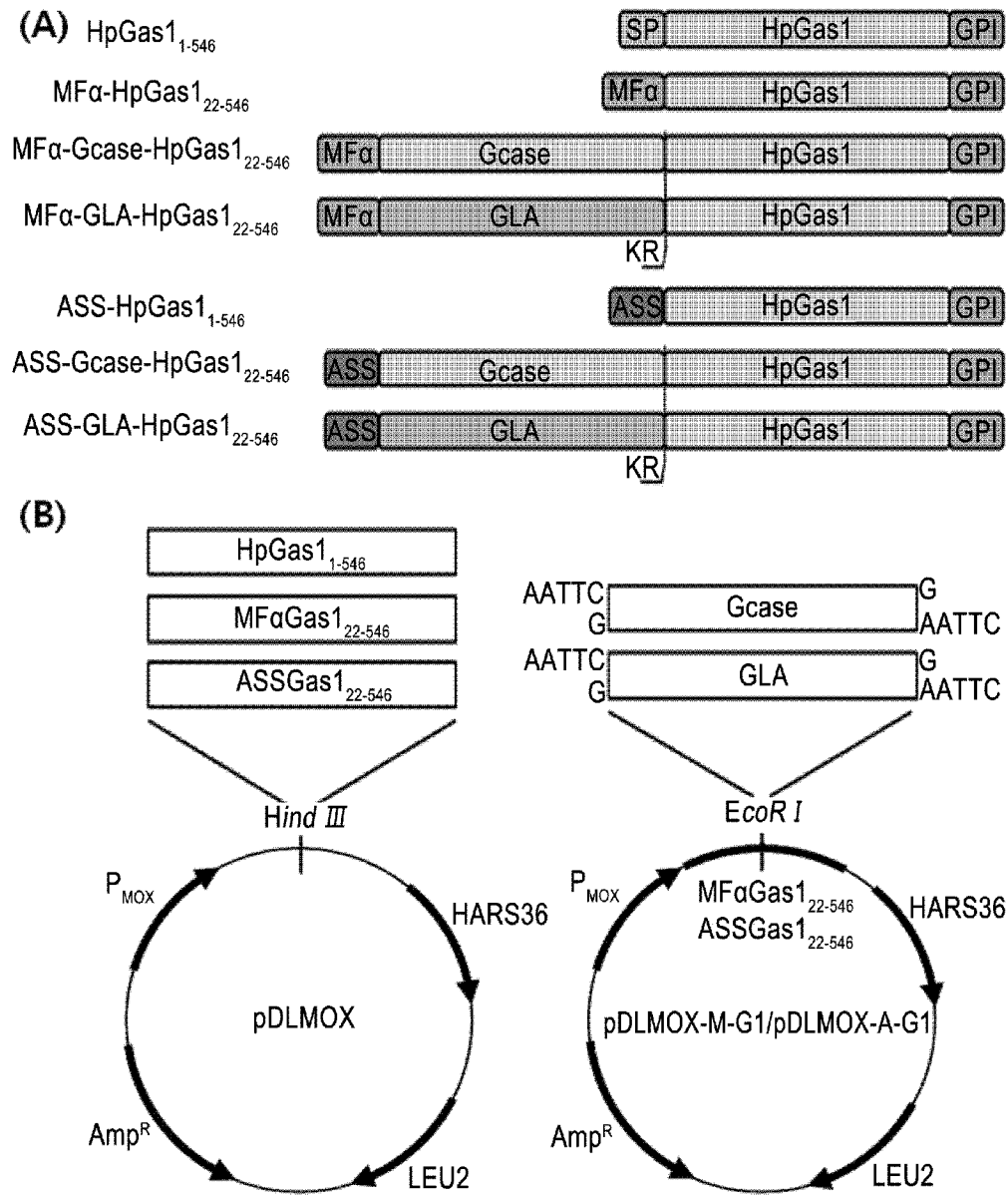


In vivo homologous recombination cloning
(in *S. cerevisiae*)

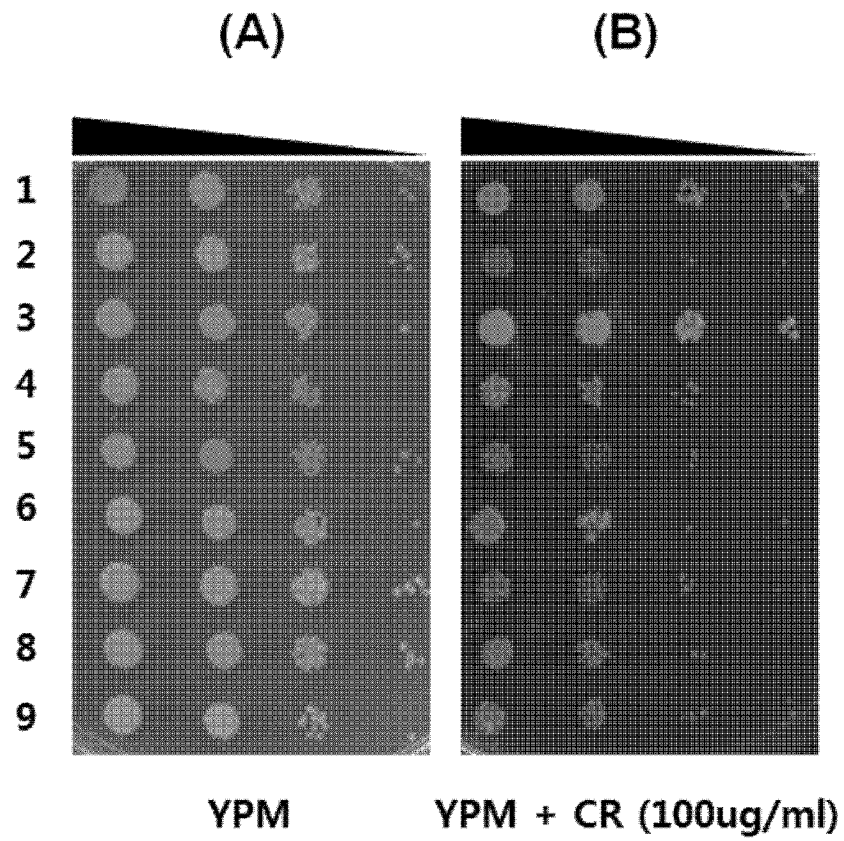
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/04(2006.01)i, C12N 1/19(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/04; C12Q 1/68; C12N 1/19; C12Q 1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Gas1, deletion, protein secretion, yeast, cell wall, cell wall stress

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARX et al., "Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of <i>Pichia pastoris</i> " FEMS Microbiology Letters, vol. 264, no. 1, pp. 40-47 (2006) See abstract; pages 40-43, 45-46; and figures 1-3.	1-19
Y	KR 10-2004-0024074 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 20 March 2004 See abstract; claims 1-33; pages 1-6; and figure 1.	1-19
A	PASSOLUNGHI et al., "Cloning of the <i>Zygosaccharomyces bailii</i> GAS1 homologue and effect of cell wall engineering on protein secretory phenotype" Microbial Cell Factories, vol. 9, article no. 7 (internal pages 1-11) (2010) See the entire document.	1-19
A	WO 2010-135678 A1 (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC. et al.) 25 November 2010 See abstract; claims 1-24; and paragraphs [0004]-[0020].	1-19
A	KR 10-2005-0064456 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 29 June 2005 See abstract; claims 1-4; and figures 1-10.	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 OCTOBER 2014 (01.10.2014)

Date of mailing of the international search report

01 OCTOBER 2014 (01.10.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005455

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	SEO, Hun, "Screening for Yeast with Enhanced Protein Secretion Employing Functional Complementation of Cell-wall Defective Phenotype" Master's degree thesis, Soonchunhyang University, Red-Biotechnology Engineering (February 2014) See abstract; pages 7-38; figures 1-9; and table 1.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0024074 A	20/03/2004	EP 1546405 A1	29/06/2005
		EP 1546405 B1	29/02/2012
		JP 2005-538711 A	22/12/2005
		JP 4927332 B2	09/05/2012
		KR 10-0475133 B1	10/03/2005
		US 2006-0275760 A1	07/12/2006
		US 7736643 B2	15/06/2010
		WO 2004-024954 A1	25/03/2004
WO 2010-135678 A1	25/11/2010	US 2011-0021378 A1	27/01/2011
		US 8440456 B2	14/05/2013
KR 10-2005-0064456 A	29/06/2005	KR 10-0545563 B1	24/01/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/04(2006.01)i, C12N 1/19(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/04; C12Q 1/68; C12N 1/19; C12Q 1/02 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Gas1, 결실, 단백질 분비, 효모, 세포벽, 세포벽 스트레스		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MARX 외, `Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of Pichia pastoris` FEMS Microbiology Letters, Vol.264, No.1, pp.40-47 (2006) 요약; 페이지 40-43, 45-46; 및 도면 1-3 참조.	1-19
Y	KR 10-2004-0024074 A (한국생명공학연구원) 2004.03.20. 요약; 청구항 1-33; 페이지 1-6; 및 도면 1 참조.	1-19
A	PASSOLUNGI 외, `Cloning of the Zygosaccharomyces bailii GAS1 homologue and effect of cell wall engineering on protein secretory phenotype` Microbial Cell Factories, Vol.9, Article No.7 (internal pages 1-11) (2010) 전체 문헌 참조.	1-19
A	WO 2010-135678 A1 (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC. 외) 2010.11.25. 요약; 청구항 1-24; 및 문단 [0004]-[0020] 참조.	1-19
A	KR 10-2005-0064456 A (충남대학교산학협력단) 2005.06.29. 요약; 청구항 1-4; 및 도면 1-10 참조.	1-19
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 10월 01일 (01.10.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 10월 01일 (01.10.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	서훈, ‘효모의 세포벽 결합 표현형의 기능적 상보성을 이용한 우수한 단백질 분비 발현 균주 스크리닝 시스템 개발’ 석사학위논문, 순천향대학교 의약바이오학과 (2014.02.) 요약; 페이지 7-38; 도면 1-9; 및 테이블 1 참조.	1-19

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2014/005455

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2004-0024074 A	2004/03/20	EP 1546405 A1 EP 1546405 B1 JP 2005-538711 A JP 4927332 B2 KR 10-0475133 B1 US 2006-0275760 A1 US 7736643 B2 WO 2004-024954 A1	2005/06/29 2012/02/29 2005/12/22 2012/05/09 2005/03/10 2006/12/07 2010/06/15 2004/03/25
WO 2010-135678 A1	2010/11/25	US 2011-0021378 A1 US 8440456 B2	2011/01/27 2013/05/14
KR 10-2005-0064456 A	2005/06/29	KR 10-0545563 B1	2006/01/24