

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

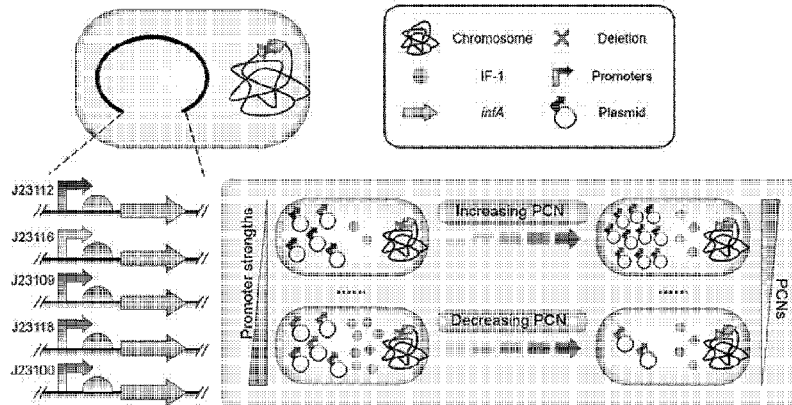
(43) 국제공개일
2018년 10월 11일 (11.10.2018) WIPO | PCT

WO 2018/186704 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/69 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004038
- (22) 국제출원일: 2018년 4월 5일 (05.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0044979 2017년 4월 6일 (06.04.2017) KR
- (71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정규열 (JUNG, Gyoo Yeol); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155 9동 2003호, Gyeongsangbuk-do (KR). 서상우 (SEO, Sang Woo); 08826 서울시 관악구 관악로 1, 122A동 503호, Seoul (KR). 강채원 (KANG, Chae Won); 42706 대구시 달서구 호산로 125, 204동 103호, Daegu (KR). 임현규 (LIM, Hyun Gyu); 27406 충청북도 충주시 탄금대로 21, Chungcheongbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY CONTROLLING PLASMID COPY NUMBER IN ANTIBIOTIC-FREE PLASMID MAINTENANCE SYSTEM

(54) 발명의 명칭: 무항생제 플라스미드 유지 시스템에서 플라스미드 카피 수의 정량적 조절 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a gene expression cassette comprising a synthetic 5' untranslated region (5' UTR), a promoter, and a regulatory gene; a recombinant vector comprising a replication origin and the gene expression cassette; a recombinant microorganism which has the recombinant vector introduced thereinto and shows alleviated segregational instability and ; a method for preparing a recombinant microorganism having alleviated segregational instability by introducing the recombinant vector thereinto; and a method for quantitatively controlling a plasmid copy number in a recombinant microorganism. According to the present invention, removal of *infA* and *efp*, which are genes indispensable for cells, coding respectively for a translation initiation factor and a protein elongation factor (EF-P), from a microbial chromosome and introduction of the gene expression cassette comprising the regulatory gene with *Escherichia coli* serving as a host allow the stable maintenance of plasmids in an antibiotic-free medium without causing intercellular intrinsic variations. In addition, the precise control of expression levels of *infA* and *efp* in the recombinant microorganism by means of a promoter can lead to the quantitative control of PCN at high yield as well. Therefore, the present invention can find a broad spectrum of applications in a variety of industries producing recombinant proteins.

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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 합성 5' UTR(untranslated region), 프로모터 및 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트, 복제원점 및 상기 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물, 상기 재조합 벡터를 도입하여 분리 불안이 개선된 재조합 미생물의 제조 방법 및 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 세포에 필수적인 번역 개시 인자를 코딩하는 유전자인 *infA* 및 단백질 신장 인자(EF-P)를 코딩하는 *efp*를 미생물의 염색체에서 제거시키고 상기 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 *Escherichia coli*를 숙주로 하여 도입하면, 세포 간 고유변이 없이 무항생제 배지에서 플라스미드를 안정적으로 유지할 수 있다. 또한, 상기 재조합 미생물에서 *infA* 및 *efp* 발현량을 프로모터를 통하여 정밀하게 조절할 경우, PCN 역시 높은 효율로 정량적으로 제어할 수 있어, 재조합 단백질을 생산하고자 하는 다양한 산업에서 광범위하게 적용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 무항생제 플라스미드 유지 시스템에서 플라스미드 카피 수의 정량적 조절 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 합성 5' UTR(untranslated region), 프로모터 및 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트, 복제원점 및 상기 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물, 상기 재조합 벡터를 도입하여 분리 불안이 개선된 재조합 미생물의 제조 방법 및 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 플라스미드는 1930년대에 처음 발견되어 제한 효소의 발전으로 오늘날까지 생물 공학 분야에서 유전자를 세포 내로 도입하기 위해 사용되고 있는 대표적인 운반체이다. 이는 세포 내에서 독립적으로 존재하여 유전자 조작이 편리하고 크기가 작아 세포로의 도입 효율이 좋아서 외래 단백질을 생산하기 위해 필요한 길고 복잡한 유전적 대사회로를 구축하는데 응용되고 있다. 크로모솜과 차별되는 가장 큰 장점으로 세포 내에서 적게는 1개, 많게는 1000카피까지 존재하기 때문에 유전자 발현량을 원하는 세기만큼 쉽고 광범위하게 바꿀 수 있기 때문에, 유전자 과발현을 활용한 연구들이 많이 진행되었다.
- [3] 플라스미드는 일반적으로 숙주 세포에게 항생제 저항성과 같이 생존에 필요한 유전자를 제공함으로써 세대가 지나도 계속해서 세포 안에 존재할 수 있다. 그런데 이때, 세포에게 항생제와 같은 화학적 처리를 하지 않으면 플라스미드는 그 숙주 세포에게 어떠한 혜택도 주지 않는 기생물질에 불과하기 때문에 자연스럽게 숙주 세포로부터 배제된다. 세포 분열이 일어날 때 분리 불안(segregational instability) 현상으로 플라스미드를 적게 가지는 부분모집단이 발생하면 그 집단은 플라스미드를 유지하기 위한 신진 대사 부담을 적게 가지므로 배지에서 그 영향력이 증가하고 생산 성능을 감소시킨다. 때문에 세포 내 플라스미드를 계속해서 유지시키기 위해 항생제를 사용하는 것이 필수적이다. 하지만 항생제는 가격이 비싸고 최종 생산물을 오염시키며 다중 약물 내성 생물(multi-drug resistance organism)을 잠재적으로 출현시킬 가능성 등의 문제가 많아 사용이 꺼려진다. 더욱이 장시간 배양 시에는 항생제 저항성 단백질에 의해 항생제가 분해되기 때문에 플라스미드의 안정적 유지에 적합하지 않기에, 항생제를 필요로 하지 않으면서 세포 내에서 플라스미드를 안정하게 유지하는 새로운 전략이 요구된다.
- [4] 항생제를 사용하지 않고 플라스미드의 분리 불안을 해결하는 대안으로, 1980년대부터 항생제 없는 플라스미드 시스템(antibiotic-free plasmid system)이

개발되었다. 이 시스템의 예로는 필수 유전자 보완 시스템 (essential gene complementation system), 독소-항독소 시스템 (toxin-antitoxin system), 조작자-억제제 적정 시스템 (operator-repressor titration system), 그리고 RNA 기반 선택 마커 시스템 (RNA-based selection marker system) 등이 있다. 이 중 필수 유전자 보완 시스템은 크로모솜의 필수 유전자를 제거하는 대신 플라스미드에 그 필수 유전자를 발현시켜서 플라스미드가 유지되도록 하는 시스템인데, 일반적으로 사용될 수 있는 필수 유전자가 많고 오프 타겟 효과와 세포 독성이 없어서 가장 선호된다. 1990년대부터 지난 몇 년간 진행된 선행 연구들에서 주요 대사산물, 환원 보조 인자, 단백질 및 세포벽 합성에 관여하는 필수 유전자를 타겟으로 다양한 숙주 생물에 해당 시스템을 적용시킨 바 있다.

- [5] 플라스미드 카피 수 (plasmid copy number, PCN) 는 유전자의 프로모터나 5'-UTR (5'-untranslated region) 세기와는 별개로 플라스미드에 존재하는 유전자 전체의 발현량을 결정함으로써, 이를 조절할 수 있다는 것은 곧 타겟 유전자와 대사경로의 발현량 조절을 가능하게 하는 것이기 때문에 바이오기반 화합물을 산업적으로 대량 생산하는데 매우 중요한 역할을 한다. 대사공학 분야에서는 다중 유전자 경로의 균형을 맞추는 도구로서 다양한 PCN을 가지는 다른 복제 원점을 사용해 왔다. 하지만 일반적으로 사용되는 플라스미드의 PCN은 매우 넓은 범위를 가지고 세포 간 변이가 커서 배양 조건을 동일하게 하더라도 세포 간 변이가 커서 결과가 일관성 있지 않다. 또한 지금까지 개발된 PCN 조절 시스템은 모두 항생제가 필요한 조건이고, 무작위 돌연변이와 같은 합리적 접근법으로 카피 수를 조절하는 연구는 패턴을 분석하기 어렵고 정교한 조절이 어렵다는 단점이 있다. 또한, 특히 배지에 값 비싼 항생제가 반드시 첨가되어야 한다는 점에서 무항생제 배지에서 안정적으로 플라스미드 카피 수를 조절할 수 있는 시스템에 대한 필요성이 대두되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에, 본 발명자들은 무항생제 배지 내 플라스미드 카피 수를 조절할 수 있는 시스템에 관하여 연구하던 중 조절 유전자로 생존 필수 유전자인 *infA* 및 *efp*를 이용하고 프로모터로 상기 유전자의 발현량을 정교하게 조절하면 이를 통해 정량적으로 PCN이 예측 가능하게 조절됨을 확인하였는바, 본 시스템을 STAPL (Stable and TunAble PLasmid) 이라 명명하고, 본 발명을 완성하였다.
- [7] 따라서 본 발명의 목적은 합성 5' UTR(untranslated region), 프로모터 및 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트, 복제원점 및 상기 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물, 상기 재조합 벡터를 도입하여 분리 불안이 개선된 재조합 미생물의 제조 방법 및 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 합성 5' UTR(untranslated region), 프로모터 및 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제공한다.
- [9] 또한 본 발명은 복제원점 및 상기 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [10] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터가 도입된 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물을 제공한다.
- [11] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터를 도입하는 단계; 를 포함하는, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물의 제조 방법을 제공한다.
- [12] 또한 본 발명은 (a) 목적 플라스미드 카피 수에 따라 목적 전사량을 가지는 프로모터를 선택하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 선택된 프로모터, 합성 5'UTR 및 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fmt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 제조한 유전자 발현 카세트를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명에 따른 세포에 필수적인 번역 개시 인자를 코딩하는 유전자인 *infA* 및 단백질 신장 인자(EF-P)를 코딩하는 *efp* 를 미생물의 염색체에서 제거시키고 상기 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 *Escherichia coli*를 숙주로 하여 도입하면, 세포 간 고유변이 없이 무항생제 배지에서 플라스미드를 안정적으로 유지할 수 있다. 또한, 상기 재조합 미생물에서 *infA* 및 *efp* 발현량을 프로모터를 통하여 정밀하게 조절할 경우, PCN 역시 높은 효율로 정량적으로 제어할 수 있어, 재조합 단백질을 생산하고자 하는 다양한 산업에서 광범위하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 야생형 *Escherichia coli* W3110 균주에 본 발명의 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 STAPL을 적용시킨 STG1 균주에 대한 모식도이다.
- [15] 도 2는 항생제 유무에 따른 종래 플라스미드 분리 불안 현상과 본 발명의 STAPL 적용 균주에서 플라스미드가 안정적으로 유지되는 과정을 나타낸 모식도이다.
- [16] 도 3은 본 발명의 재조합 벡터를 도입한 STG1과 STAPL 적용이 없는 STG0 대장균 균주를 40 세대 간 배양하며 측정한 플라스미드 유지 비율을 나타낸 결과(도 3A), 배양 0, 10, 20, 그리고 40 세대 째의 세포 하나 당 형광 프로파일을 측정한 결과(도 3B)를 나타낸 도이다.
- [17] 도 4는 *infA*와 *efp*를 각각 포함하는 2개의 플라스미드를 도입하여 형질 전환시킨 STAPL 적용시킨 STGC1 균주 및 STAPL 적용이 없는 STGC0 균주가 40 세대 동안 플라스미드를 유지한 비율을 eGFP(도 4A) 또는 mCherry(도 4B)로 형광 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [18] 도 5는 본 발명의 고 복제 수 재조합 플라스미드를 도입한 STG7과 STAPL 적용이 없는 STG6 대장균 균주를 40 세대 간 배양하여 측정한 플라스미드 유지 비율을 나타낸 도이다.
- [19] 도 6은 본 발명의 STAPL 균주에서 *infA*의 발현량 조절의 메커니즘을 통한 PCN 조절의 메커니즘을 모식화한 도이다.
- [20] 도 7은 STG0 균주에 STAPL을 적용시키고 다양한 세기의 *infA*의 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트들을 도입하여 제작된 STG1-5 균주의 무항생제 배지에서의 특정 형광(도 7A)과 실제 PCN 및 *infA*의 상대적인 프로모터 세기(도 7B), 그리고 균주의 특이적 성장률(도 7C)을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 8은 본 발명의 STG2-5 균주의 0, 10, 20, 그리고 40 세대 째의 세포 하나 당 형광 프로파일을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 9는 이타콘산을 생산하기 위한 *cad* 유전자를 목적 유전자로 포함한 STAPL 시스템 및 해당 플라스미드를 모식화하여 나타낸 도이다.
- [23] 도 10은 본 발명의 재조합 균주 STI0-5를 이용한 이타콘산 생산의 30시간 후의

결과(도 10A) 및 그 때의 PCN(도 10B)을 나타낸 도이다.

[24] 도 11은 라이코펜을 생산하기 위한 *idi*, *ispA*, 그리고 *crtEBI* 유전자를 목적 유전자로 포함한 STAPL 시스템 및 해당 플라스미드를 모식화하여 나타낸 도이다.

[25] 도 12는 본 발명의 제조합 균주 STL0-5를 이용한 라이코펜 생산의 균주의 OD가 약 0.8일 때의 라이코펜의 특정 생산 양상(도 12A)과 그 때의 PCN(도 12B)을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

[26] 본 발명은 합성 5' UTR(untranslated region), 프로모터 및 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제공한다.

[27] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[28]

[29] 본 발명에서 사용하는 “조절 유전자”는 숙주 세포의 생존력과 직접적으로 연관되어 있는 생존 필수 유전자를 의미하며, 상기 조절 유전자를 숙주세포 염색체가 아닌 플라스미드에 발현시킬 경우, 숙주세포가 생존하기 위해 필수적으로 요구하는 생존 필수 유전자를 플라스미드에서 발현할 수 있고, 플라스미드의 전사 수준을 생존 필수 유전자 발현량 조절의 메커니즘을 통하여 조절 가능하다.

[30] 본 발명의 유전자 발현 카세트는 조절 유전자로 대장균 내에서 필수 유전자로 알려진 유전자를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *mpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*

, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fmt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자일 수 있고, 더욱 바람직하게는 *infA* 및 *efp* 를 조절 유전자일 수 있다.

- [31] 본 발명의 본 발명의 용어 “프로모터”는 DNA의 일부분으로 전사를 개시할 수 있도록 RNA 중합효소의 결합에 관여한다. 일반적으로 표적 유전자와 동일 가닥상에 표적 유전자에 인접하여 이의 상류에 위치하는 서열을 말한다. 본 발명에서는 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmK*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fmt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자를 발현하기 위하여 합성된 프로모터를 도입하는 것을 특징으로 하며, 상기 프로모터는 항시성 프로모터를 이용하는 것이 바람직하다. 항시성 프로모터(constitutive promoter)란 외부의 자극, 생장단계, 조직 등의 특성과 관계없이 언제나 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터를 의미하며, 본 발명의 항시성 프로모터는 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*,

proS, hemB, secD, secF, ribD, ribE, nusB, thiL, dxs, ispA, ffs, dnaX, adk, hemH, lpxH, cysS, folD, argU, mrdB, mrdA, nadD, holA, rlpB, leuS, lnt, leuW, glnS, fldA, infA, ftsK, lolA, serS, rpsA, msbA, lpxK, kdsB, mukF, mukE, mukB, asnS, fabA, serT, mviN, rne, yceQ, fabD, fabG, acpP, tmk, holB, lolC, lolD, lolE, pth, prsA, ispE, lolB, hemA, prfA, prmC, kdsA, topA, ribA, fabI, tyrS, ribC, pheT, pheS, rplT, infC, thrS, nadE, gapA, yeaZ, aspS, argS, leuZ, cystT, pgsA, metG, folE, yejM, gyrA, nrdA, nrdB, folC, accD, fabB, gltX, ligA, zipA, dapE, dapA, hda, der, hisS, ispG, suhB, acpS, era, lepB, pssA, yfiO, rplS, trmD, rpsP, ffh, grpE, yfjB, serV, csrA, alaS, ispF, ispD, ftsB, eno, pyrG, lgt, prfB, fbaA, pgk, metK, yqgF, plsC, parC, parE, ribB, cca, folB, ygjD, dnaG, rpoD, infB, nusA, leuU, glmM, ftsH, obgE, rpmA, rplU, ispB, murA, kdsC, yrbK, yhbN, yhbG, rpsI, rplM, degS, mreD, mreC, mreB, accB, accC, rpoC, rpoB, rplL, rplJ, nusG, secE, glyT, thrU, coaA, birA, murB, murI, priA, ftsN, yihA, polA, hemG, hemC, hemD, proM, hisR, argX, rho, trpT, glmU, glmS, yidC, rnpA, rpmH, dnaA, dnaN, gyrB, spoT, gmk, dut, dfp, rpmB, coaD, kdtA, gpsA, glyQ, glyS, ftsY, ftsE, ftsX, rpoH, asd, yrfF, trpS, rpsL, rpsG, fusA, rpsJ, rplC, rplD, rplW, rplB, rpsS, rplV, rpsC, rplP, rpmC, rpsQ, rplN, rplX, rplE, rpsN, rpsH, rplF, rplR, rpsE, rpmD, rplO, secY, rpsM, rpsK, rpsD, rpoA, rplQ, fmt, def, yrdC, ubiA, plsB, lexA, dnaB, ssb, groS, groL, efp, psd, rsgA, orn, yjeE, rpsR, ppa, valS, yjgP, yjgQ, dnaC 및 dnaT로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자의 발현을 지속적으로 유도하기 위한 목적으로 사용된다. 본 발명의 항시성 프로모터는 서열번호 1 내지 5로 표시된 서열을 포함하는 프로모터인 것이 바람직하며, 상기 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로 실질적으로 동질의 역할을 수행할 수 있는 것이라면 당 분야의 전문가들에 의해 적절하게 부가, 결실, 또는 치환되어 사용될 수 있다. 본 발명의 항시성 프로모터는 예컨대, J23112, J23116, J23109, J23118 및 J23100 프로모터인 것이 바람직하며, 상기 프로모터 들은 구입하거나 합성하여 도입할 수 있다. 본 발명에서는 프로모터에 작동가능하게 연결된 조절 유전자의 발현 정도를 원하는 정도의 발현세기를 갖는 프로모터로 선별하여 조절할 수 있으며, 이를 통해 PCN, 나아가 목적 유전자 생산을 조절할 수 있다.

- [32] 본 발명의 발현 카세트에 포함된 합성 5' UTR은 유전자를 저발현시키기 위한 것이며, UTR Designer (doi:10.1016/j.ymben.2012.10.006, http://sbi.postech.ac.kr/utr_designer)를 통해 계산된 예측 발현량이 100 내지 100,000의 값을 나타내는 낮은 세기의 5'UTR을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 1000 내지 2000의 값을 나타내는 5'UTR을 사용할 수 있다. 본 발명에서는 바람직한 일 예로 서열번호 54, 55, 56 및 59으로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 합성 5'UTR을 사용하였다.
- [33] 본 발명의 유전자 발현 카세트는 목적 유전자를 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 용어 “목적 유전자”는 본 발명의 유전자 발현 카세트를 도입한 제조합

미생물로 목표하는 생산물인 대사물질을 코딩하는 유전자를 의미한다. 본 발명에 있어서 유전자 발현 카세트에 포함된 목적 유전자는 대량 생산에 필요로 하는 물질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있으며, 본 발명에서는 이타콘산 또는 라이코펜을 코딩하는 유전자를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

이타콘산을 코딩하는 유전자는 *Aspergillus terreus*에서 유래된 *cad* 외래 유전자를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이타콘산의 생산을 달성할 수 있는 서열이라면 본 발명의 서열에 모두 제한없이 포함되는 것으로 해석될 수 있다. 또한 라이코펜을 코딩하는 유전자는 *Escherichia coli*에서 유래된 *ispA*와 *idi* 및 *Pantoea agglomerans*에서 유래된 *crtEBI* 유전자를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 라이코펜의 생산을 달성할 수 있는 서열이라면 본 발명의 서열에 모두 제한없이 포함되는 것으로 해석될 수 있다.

- [34] 본 발명의 유전자 발현 카세트는 터미네이터를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 유전자 발현 카세트에 포함된 터미네이터는 유전자 발현 카세트 DNA의 전사를 종결하기 위해 유전자 발현 카세트 DNA 말단에 연결되는 것으로, 프로모터에 맞게 당업자의 적정 선택 수준에서 채택하여 사용할 수 있어 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에서는 바람직한 일 예로, 서열번호 53으로 표시되는 BBa_B1002를 사용하였다.

[35]

- [36] 또한 본 발명은 복제원점 및 상기 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

- [37] 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 재조합 벡터로 바람직하게는 플라스미드를 이용할 수 있다.

- [38] 본 발명에 있어서, 상기 플라스미드의 origin과 관계없이 제한 없는 플라스미드를 사용할 수 있으나, 바람직하게는 세포 당 1 내지 600 카피 수를 가지도록 하는 복제원점을 포함하는 플라스미드를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 세포 당 40 내지 500 카피수를 가지는 것을 사용할 수 있다.

- [39] 본 발명의 재조합 벡터는 복제원점(레플리콘)을 포함하며, 재조합 벡터의 복제를 가능케 할 수 있는 서열이라면 본 발명의 서열에 모두 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명에서는 바람직한 일 예로, 조절 유전자로 *infA*를 사용한 경우에는 복제원점으로 ClōDF-13 또는 PMB1을 사용하였고, 조절 유전자로 *efp*를 사용한 경우에는 ClōE1을 사용하였다.

- [40] 또한 본 발명의 재조합 벡터는 복제수 조절가능한 클로닝 벡터로 사용하기 위하여 조절 유전자의 발현을 조절하기 위한 프로모터 및 목적 유전자를 삽입하기 위한 제한효소 부위를 포함할 수 있으며, 상기 재조합 벡터를 가진

세포의 선별을 위한 선택 마커를 포함할 수 있다.

[41]

[42] 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터가 도입된 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물을 제공한다.

[43]

본 발명에서 사용된 “분리 불안이 개선된”은 재조합 벡터가 도입된 미생물이 일련의 계대 배양에도 일정 수 이상의 재조합 벡터의 수를 균주 내에 안정적으로 유지할 수 있는 것을 의미한다.

[44]

본 발명에서는 재조합 미생물의 바람직한 일례로 야생형 대장균 W3110 균주를 이용하였으나, 이에 제한됨 없이 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 야생형 대장균이란 인공적인 유전자의 재조합, 치환, 돌연변이 등이 가해지지 않은 천연 상태의 대장균을 의미한다.

[45]

본 발명의 재조합 미생물은 분리 불안을 해소하고 도입되는 유전자 카세트에 의하여 재조합 벡터의 수, 보다 바람직하게는 플라스미드 카피 수를 정량적으로 조절하기 위하여, 재조합 미생물 내 염색체 상의 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *fold*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *mpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fmt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자가 제거된 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 *infA* 및 *efp*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자가 제거된 것을 특징으로 한다.

[46]

[47] 또한 본 발명은 재조합 벡터를 도입하는 단계;를 포함하는, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물의 제조 방법을 제공한다.

[48] 본 발명의 재조합 미생물 제조방법을 이용하면, 분리 불안이 개선되고 도입되는 유전자 카세트에 의하여 재조합 벡터의 수, 보다 바람직하게는 플라스미드 카피 수를 정량적으로 조절 가능한 재조합 미생물을 제조할 수 있다.

[49]

[50] 또한 본 발명은 (a) 목적 플라스미드 카피 수에 따라 목적 전사량을 가지는 프로모터를 선택하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 선택된 프로모터, 합성 5'UTR 및 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fmt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 제조한 유전자 발현 카세트를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법을 제공한다.

[51] 본 발명의 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법에 있어서, 목적 플라스미드 카피 수에 따라 목적 전사량을 가지는 프로모터를 선택하여 플라스미드 카피수의 정량 조절이 가능하다. 상기 (a) 단계에서 세기가 강한 프로모터를 선택하는 경우, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수를 낮게 유지할

수 있다. 반면, 세기가 약한 프로모터를 선택하는 경우, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수를 높게 유지할 수 있다. 따라서, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수를 목적하는 양으로 조절하기 위하여, 재조합 벡터 내 목적 전사량을 가지는 프로모터를 선택하여 도입함으로써 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량적인 조절이 가능하다.

- [52] 본 발명의 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법에서 재조합 미생물 내 도입되는 유전자 발현 카세트는 목적 유전자 또는 터미네이터를 더 포함할 수 있다. 또한 상기 유전자 발현 카세트에 포함되는 프로모터는 서열번호 1 내지 5로 표시된 서열을 포함하는 프로모터인 것이 바람직하며, 상기 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로 실질적으로 동질의 역할을 수행할 수 있는 것이라면 당 분야의 전문가들에 의해 적절하게 부가, 결실, 또는 치환되어 사용될 수 있다. 본 발명의 항시성 프로모터는 예컨대, 서열번호 1 내지 5로 표시되는 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 프로모터(J23112, J23116, J23109, J23118 및 J23100) 인 것이 바람직하며, 상기 프로모터 들은 구입하거나 합성하여 도입할 수 있다.

- [53] 본 발명의 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법에서는 재조합 미생물 내 염색체 상의 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fmt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종

이상의 조절 유전자가 제거된 것을 특징으로 한다. 상기 조절 유전자가 미생물 내 염색체에서 제거되고 플라스미드에서 발현되는 경우, 숙주세포가 생존하기 위해 필수적으로 요구하는 생존 필수 유전자를 플라스미드에서 발현하여, 생존 필수 유전자 발현량 조절 메커니즘으로 플라스미드의 전사 수준이 조절되는바, 상기 재조합 미생물 내 플라스미드 카피수의 정량적인 조절이 가능하다.

[54] 본 발명의 재조합 미생물 내 플라스미드 카피수의 정량 조절 방법을 이용하면 항생제가 포함되지 않은 배지에서 수행하여도 안정적으로 플라스미드 카피수의 정량 조절이 가능하다.

[55] 본 발명의 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법에 있어서, 플라스미드 카피수의 조절은 선택된 프로모터의 세기를 통하여 조절이 가능하다. 세기가 강한 프로모터를 선택하는 경우, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수를 낮게 유지할 수 있다. 반면, 세기가 약한 프로모터를 선택하는 경우, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수를 높게 유지할 수 있다. 따라서, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수를 원하는 양으로 조절하기 위하여, 재조합 벡터 내 원하는 세기의 프로모터를 선택하여 도입함으로써 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량적인 조절이 가능하다.

[56]

[57] 본 발명을 이하 실시예를 통하여 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[58]

[59] 사용한 균주 및 플라스미드

[60] 하기 실시예에서 사용한 균주 및 플라스미드를 하기 표 1에 정리하여 나타내었다.

[61] [표1]

이름	관련 특징	소스
균주		
Mach-T1 ^R	E. coli F ⁻ Φ 80(lacZ) Δ M15 Δ lacX74 hsdR(r _K -mK+) Δ recA1398 endA1 tonA	Invitrogen
W3110	E. coli F λ rph-11N(rrnD, rrnE)1	ATCC27325
STG0	W3110/pCDF-eGFP	본 발명
STG1	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv1	본 발명
STG2	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv2	본 발명
STG3	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv3	본 발명
STG4	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv4	본 발명
STG5	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv5	본 발명
STI0	W3110/pCDF-CAD	본 발명
STI1	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_CADv1	본 발명
STI2	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_CADv2	본 발명
STI3	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_CADv3	본 발명
STI4	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_CADv4	본 발명
STI5	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_CADv5	본 발명
STL0	W3110/pCDF_idi_ispA crtEBI	선행 연구
STL1	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_LYCv1	본 발명
STL2	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_LYCv2	본 발명
STL3	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_LYCv3	본 발명
STL4	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_LYCv4	본 발명
STL5	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_LYCv5	본 발명
STGC0	W3110 pCDF-eGFP/pET-mCherry	본 발명
STGC1	W3110 Δ infA Δ efp::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv1/pSTAPL_mCherry	본 발명
STG6	W3110/pUC19-eGFP	본 발명
STG7	W3110 Δ infA::Kan ^R /pSTAPL_eGFPv7	본 발명

플라스미드		
pKD46	Red recombinase expression vector, Amp ^R	선행 연구
pCDF_Duet	Expression vector, Sm ^R , cloDF13ori	Novagen
pFRT72 _{variant}	T-vector containing kanamycin resistance gene	선행 연구
pCDF-eGFP	pCDF_Duet/P _{J23100} -synUTR _{egfp} -egfp-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_eGFPv1	pCDF_eGFP/P _{J23116} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_eGFPv2	pCDF_eGFP/P _{J23112} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_eGFPv3	pCDF_eGFP/P _{J23109} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_eGFPv4	pCDF_eGFP/P _{J23118} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_eGFPv5	pCDF_eGFP/P _{J23100} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pCDF-CAD	pCDF_Duet-P _{tac} -synUTR _{cad} -cad-T _{T7}	본 발명
pSTAPL_CA Dv1	pCDF-CAD/P _{J23116} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_CA Dv2	pCDF-CAD/P _{J23112} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_CA Dv3	pCDF-CAD/P _{J23109} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_CA Dv4	pCDF-CAD/P _{J23118} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_CA Dv5	pCDF-CAD/P _{J23100} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pCDF_idi_ispA _{crtEBI}	pCDF-Duet/P _{J23100} -idi-T _{BBa_B1005} /P _{J23100} -ispA-T _{BBa_B1005} /P _{J23100} -crtE-crtB-crtI-T _{BBa_B1005}	선행 연구
pSTAPL_LY Cv1	pCDF_idi_ispA _{crtEBI} /P _{J23116} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명

pSTAPL_LY Cv2	pCDF_idi_ispA_crtEBI/P _{J23112} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_LY Cv3	pCDF_idi_ispA_crtEBI/P _{J23109} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_LY Cv4	pCDF_idi_ispA_crtEBI/P _{J23118} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_LY Cv5	pCDF_idi_ispA_crtEBI/P _{J23100} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명
pCP20	Flippase expression vector, Amp ^R , Cm ^R	선행 연구
pETDuet	Expression vector, Amp ^R , pMB1ori	Novagen
pFRT2161	T-vector containing kanamycin resistance gene	본 발명
pZ-mCherry	pZS21 plasmid containing mcherry gene	선행 연구
pET-mCherry	pETDuet/P _{J23100} -synUTR _{mcherry} -mcherry-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_mC herry	pET-mCherry/P _{J23116} -synUTR _{efp} -efp-T _{BBa_B1002}	본 발명
pUC19-eGFP	pUC19/P _{J23118} -synUTR _{egfp} -egfp-T _{BBa_B1002}	본 발명
pSTAPL_eGF Pv7	pUC19_eGFP/P _{J23112} -synUTR _{infA} -infA-T _{BBa_B1002}	본 발명

[62]

[63] 사용한 프로모터 및 프라이머 시퀀스

[64] 하기 실시예에서 사용한 프로모터 및 프라이머 시퀀스를 표 2 및 표 3에 정리하여 나타내었다.

[65] [표2]

프로모터 명	서열 (5'- 3')	라이브러리에서의 서열*	알려져 있는 상대적인 세기†	실제 측정된 상대적인 세기‡,§,	서열 번호
J23112	ctgatagctagctcagtcctagggattatgtagc	1	1	1.27 ± 0.20	1
J23109	tttacagctagctcagtcctagggactgtgtagc	4	106	2.26 ± 0.42	2
J23116	ttgacagctagctcagtcctagggactatgtagc	8	396	1.00 ± 0.30	3
J23118	ttgacggctagctcagtcctaggtattgtgtagc	14	1429	6.41 ± 2.60	4
J23100	ttgacggctagctcagtcctaggtacagtgc	19	2547	7.38 ± 2.64	5

[66] *라이브러리에서의 서열은 19개의 프로모터 세기의 오름차순 순서를 의미한다.

[67] †알려져 있는 상대적인 세기는 형광값을 기반으로 하였다(Registry of Standard Biological Parts, <http://parts.igem.org/>).

[68] ‡실제 측정된 상대적인 세기는 STG1-5 균주의 infA 전사체 양을 각각의 PCN으로 나눈 값으로 결정하였다.

[69] §실제 측정된 상대적인 세기는 가장 작은 값으로 정규화하였으며, 그 결과를 나타내었다.

[70] ||프로모터의 알려져 있는 세기와 실제 측정된 세기의 차이는 유전적 배경에 따라 차이가 난다.

[71]

[72] [표3]

프라이머명	폴리뉴클레오타이드 서열 (5'-3') ^{*,†,‡,§,}	서열번호
C-infA-F	gtggcgagtccatgttcagccg	6
C-infA-B	aaacctcatgggtggcaacggg	7
D-infA-F	tgccgaataatttctgggtaccacgatgcttgtttcaccacaagaatgagcatg accggcgcgatgc	8
D-infA-B	ctcgttctttctcttcgcccacagggcggtaaaacaatcagcgactacgggctca gcggatctcatgcgc	9
O-eGFP-F2	gagagtcaGAGCTCTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGG TACAGTGCTAGC	10
O-eGFP-B	gcatgcggctGAGCTCGCGAAAAAACCCCGCCGAAGCG	11
O-infA-F2	ctgaaaCCTCAGGTTTACAGCTAGCTCAGTCCTAGGG ACTGTGCTAGC	12
O-infA-B	CCTGAGGGCGAAAAAACCCCGCCGAAGCGGGGTTT TTTGCGtcagcgactacggaagacaatgcg	13
O-infA-F1v1	ctgaaaCCTCAGGTTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGG GACTATGCTAGCgtagtactggaaatgagcatcc	14
O-infA-F1v2	ctgaaaCCTCAGGCTGATAGCTAGCTCAGTCCTAGG GATTATGCTAGCgtagtactggaaatgagcatcc	15
O-infA-F1v3	ctgaaaCCTCAGGTTTACAGCTAGCTCAGTCCTAGGG ACTGTGCTAGCgtagtactggaaatgagcatcc	16
O-infA-F1v4	ctgaaaCCTCAGGTTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGT ATTGTGCTAGCgtagtactggaaatgagcatcc	17
O-infA-F1v5	ctgaaaCCTCAGGTTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGT ACAGTGCTAGCgtagtactggaaatgagcatcc	18
O-eGFP-F1	ctcagtcctaggtacagtgctagcatcctgcattaaaggagcatccattatggctag caagggcgagg	19
Q-pCDF-F	catgttagtcatgccccgc	20
Q-pCDF-B	ctcactcattaggcaccggg	21
Q-polA-F	gcgagcgatccagaagatct	22
Q-polA-B	gggtaaaggatgccacagaca	23
Q-infA-F	ggaaatgagcatccagtatggcc	24
Q-infA-B	gtagtttttgcgcattttaccggag	25

O-cad-F1	ggaattgtgagcggataacaatt <u>aaaaaaaaaaaaaggagcatcacccatgacc</u> aaacagagcgcagatagca	26
O-cad-F2	catccaGGTCTCgggTTGACAATTAATCATCGGCTCGT <u>ATAATG</u> gtggaattgtgagcggataacaattaaaaaa	27
O-cad-B1	aaaaaaaaacccccgccgaagcgggggttttttgggtgcgatttaaaccagcggac ttttaaccggaca	28
O-cad-B2	catccaGGTCTCgccccaaaaaaacccccgccgaagcgg	29
O-pCDF-F	catccaGGTCTCgttggaacctcaggcatttgagaagcacac	30
O-pCDF-B	catccaGGTCTCctcgaaccaggagtcgcataagggagagcgtc	31
C-efp-F	ggcacacgcagggcaaaaag	32
C-efp-B	ctggcagcgcgagagatgg	33
D-efp-F	gagggccttatggcaacgtactatagcaacgattttcgtgctggtcttaaacgc atgaccgcgcgatgc	34
D-efp-B	ctctgacctgaataagtgatgggtgcagcctgcaggccgcaccacaaccgccg cgacgacaggcacatgcg	35
O-mCherry-F 1	caggcgcgccGAGCTC <u>TTGACGGCTAGCTCAGTCCTA</u> <u>GGTACAGTGCTAGC</u> ccctggattaaaagg	36
O-mCherry-F 2	<u>TGCTAGCccctggattaaaaggagcatctttaatggtttccaagggcgag</u>	37
O-mCherry-B	attcgaattcGAGCTCGCGAAAAAACCCCGCCGAAGCGG GGTTTTTGGCgtcattattgtacagctcatccatgccac	38
O-efp-F1	<u>CTAGGGACTATGCTAGC</u> tcctgattctcacataaccagaaaattat ggcaacgtactatagcaacg	39
O-efp-F2	cgtcggtaccctcgagTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGG <u>ACTATGCTAGC</u> tcctgattc	40
O-efp-B	ctttaccagactcgagGCGAAAAAACCCCGCCGAAGCGGGG TTTTTTGGCgttacttcacgcgagagacgtattc	41
FRT2161_F	ccgcatgaccgcgcgatgcgaagttcctatactctctggagaataggaacttctca agatccccctcacgtgccgc	42
FRT2161_B	cgcgacgacaggcacatgcggaagttcctattctccagagagtataggaacttca gagcgcttttgaagctgggggtgg	43
O-pUC19-F	tttgcgtgaaaCTCGAGcgccaagcttgcattgcctgc	44
O-pUC19-B	aggagtttacCCTGAGGggccagcaaaaggccaggaac	45

O-eGFP-F1v2	<u>TGCTAGCagggtgtgcgaaaggagcatctttaatggctagcaagggcgag</u> g	46
O-eGFP-F2v2	<u>tttgctgaaaCCTCAGGTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAG</u> <u>GTATTGTGCTAGCagggtgtgcgaaaggag</u>	47
O-eGFP-Bv2	tagaccatttctcgagGCGAAAAAACCCCGCC	48
O-infA-F1v2	<u>GTCCTAGGGATTATGCTAGCgtagtactggattttgcatccagt</u> atggccaaagaagacaatatg	49
O-infA-F2v2	<u>cccgggtacccccgggtaccGAGCTCCTGATAGCTAGCTCA</u> <u>GTCCTAGGGATTATGCTAGCgtag</u>	50
O-infA-B1v2	TCAGTGAGACCTCAGCGACTACGGAAGACAATG	51
O-infA-B2v2	agtgccacctGACGTCGCGAAAAAACCCGCCGAAGCGG GGTTTTTGCgtagtgagacctcagcgactac	52

[73] *이탈릭체의 서열은 리콤비네이션을 위한 상응하는 유전자 서열을 나타낸다.

[74] †밀줄 친 소문자 서열은 5'-UTR 서열을 나타낸다.

[75] ‡밀줄 친 대문자 서열은 프로모터 서열을 나타낸다.

[76] §대문자로 처리된 서열은 제한효소 서열을 나타낸다.

[77] ‖이탈릭체의 대문자로 처리된 서열은 터미네이터 서열을 나타낸다.

[78]

[79] STAPL 시스템에서의 플라스미드 카피 수

[80] 하기 실시예로 측정한 STAPL 시스템에서의 플라스미드 카피 수를 표 4에 정리하여 나타내었다.

[81] [표4]

		eGFP		Itaconic acid		Lycopene	
Promoter	Sm	Strain	PCN*	Strain	PCN*	Strain	PCN*
-	-	STG0	1 ± 0	STI0	613 ± 74	STL0	21 ± 3
-	+	STG0	176 ± 12	STI0	1365 ± 28	STL0	65 ± 12
J23116	-	STG1	261 ± 21	STI1	3390 ± 105	STL1	684 ± 155
J23112	-	STG2	208 ± 12	STI2	1174 ± 305	STL2	265 ± 43
J23109	-	STG3	251 ± 31	STI3	1373 ± 73	STL3	70 ± 11
J23118	-	STG4	200 ± 10	STI4	663 ± 160	STL4	38 ± 1
J23100	-	STG5	46 ± 6	STI5	726 ± 46	STL5	93 ± 9

[82] *PCN은 염색체의 카피 수를 플라스미드의 카피 수로 나누어 계산한 값을

나타내었다.

[83]

[84] 사용한 터미네이터 및 5'-UTR 서열 및 유전자 서열

[85] 본 발명에서 사용한 터미네이터 및 5'-UTR 서열 및 유전자 서열을 하기 표 5에 정리하여 나타내었다.

[86] [표5]

		염기서열(5' - 3')	서열 번호
터미네이터	BBa_1002	cgcaaaaaaccccgcttcggcgggggttttcgc	53
5'-UTR	infA(STG1-5)	gtagtactggaaatgagcatccagt	54
	infA(STG7)	gtagtactggattttgcatccagt	55
	efp(STGC1)	tcctgattctcacataaccagaaaatt	56
	eGFP(STG0)	atcctgcattaaaggagcatccatt	57
	eGFP(STG6)	agggtgtgcgaaaggagcatcttta	58
	mCherry(STGC0)	ccctggattaaaaggagcatcttta	59
유전자		염기서열	
<i>infA</i>		atggccaaagaagacaatattgaaatgcaaggaaccgttcttgaaacgttgc ctaataaccatgttcgcgtagagttagaaaacggtcacgtggttactgcacac atctccggtaaaatgcgcaaaaactacatccgcacctgacgggcgacaaa gtgactgttgaactgaccccgtagacactgagcaaaggccgcatgtcttcc gtagtcgctga	60
<i>efp</i>		atggcaacgtactatagcaacgattttcgtgctggtcttaaaatcatgtagac ggcgaaccttacgcggttgaagcgagtgaaatcgtaaaaccgggtaaaggc caggcatgttgcgcgttaaaactgcgtcgtctgctgaccggtactgcgtaga aaaaaccttcaaactactgattccgctgaaggcgtgatgttgcgatatgaa cctgacttacctgtacaacgacggtgagttctggcacttcatgaacaacgaaa ctttcgagcagctgtctgctgatgcaaaagcaattggtgacaacgctaaatgg ctgctggatcaggcagagtgatcgtaactctgtggaatggcagccgatctc cgttactccgccgaacttcgtgaactggaaatcgttgataccgatccgggcc tgaaaggatgataccgcaggtactggtggcaaacgggctaccctgtctactgg cgctgtggttaaagtccgctgtttgtacaaatcggcgaagtcataaagtgg atacccgctctggtgaatacgtctctcgcgtgaagtaa	61

eGFP		atggctagcaagggcgaggagctgttaccgggggtggtgcccatcctggtc gagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagg gcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcacca ccggcaagctgcccgtgccctggccccaccctcgtgaccacctgacctacg gcgtgcagtgttcagccgtaccccgaccacatgaagcagcagcacttctt caagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaa ggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgac acctggtgaaccgcacgagctgaagggcacgacttaaggaggacgg caacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtcta tatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttaagatccg ccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcag aacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacct gagcaccagtcggcctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcac atggctcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcgcatggac gagctgtacaagtga	62
mCherry		atggtttccaagggcgaggaggataacatggctatcattaaagagttcatgc gcttcaaagttcacatggagggttctgttaacggtcacgagttcgagatcga ggcgaaggtgagggccgtccgtatgaaggcacccagaccgcccactga aagtgactaaaggcgcccgctgccttttgcgtgggacatcctgagccgc aatttatgtacggttctaaagcttatgttaaacaccagcggatccccggact atctgaagctgtctttccggaagggttcaagtgggaacgcgtaatgaatttg aagatggtggtgctgtgaccgtcactcaggactcctccctgcaggatggcg agttcatctataaagttaaactgcgtggtactaatttccatctgatggcccggt gatgcagaagaagacgatgggttgggagggcgtctagcgaacgcgatgtacc cggaagatggtgctgaaaggcgaaattaaacagcgcctgaaactgaaa gatggcgccattatgacgctgaagtgaaaaccacgtacaaagccaagaa acctgtgcagctgcctggcgcgtacaatgtgaatattaaactggacatcacct ctcataatgaagattatagatcgtagagcaatatgagcgcgggaggggtcg tcattctaccggtggcatggatgagctgtacaaataa	63
codon optimized <i>cad</i>		CGGAAGAACGTCCGATTAGCAGCATTGCAGGT CAGATGAGCGTTGCATATATTCTGGCCGTTCA GCTGGTTGATCAGCAGTGTCTGCTGAGCCAGT TTAGCGAATTTGATGATAACCTGGAACGTCCG GAAGTTTGGGATCTGGCACGTAAAGTTACCAG CAGCCAGAGCGAAGAATTTGATCAGGATGGTA ATTGTCTGAGCGCAGGTCGTGTTTCGTATTGAA TTTAATGATGGTTCCAGCATTACCGAAAGCGT	64

		TGAAAAACCGCTGGGTGTTAAAGAACCGATGC CGAATGAACGTATCCTGCATAAATATCGTACC CTGGCAGGTAGCGTTACCGATGAAAGCCGTGT GAAAGAAATTGAAGATCTGGTTCTGGGTCTGG ATCGTCTGACCGATATTAGTCCGCTGCTGGAA CTGCTGAACTGTCCGGTTAAAAGTCCGCTGGT TTAA	
<i>idi</i>		ATGCAGACCGAACATGTGATTCTGCTGAACGC GCAGGGCGTGCCGACCGGCACCCTGGAAAAA TATGCGGCGCATACCGCGGATACCCGCCTGCA TCTGGCGTTTAGCAGCTGGCTGTTTAACGCGA AAGGCCAGCTGCTGGTGACCCGCCGCGCGCTG AGCAAAAAAGCGTGGCCGGGCGTGTGGACCA ACAGCGTGTGCGGCCATCCGCAGCTGGGCGAA AGCAACGAAGATGCGGTGATTCGCCGCTGCCG CTATGAACTGGGCGTGGAAATTACCCCGCCGG AAAGCATTATCCGGATTTTCGCTATCGCGCG ACCGATCCGAGCGGCATTGTGGAAAACGAAGT GTGCCCCGGTGTTTGCGGCGCGCACCACCAGCG CGCTGCAGATTAACGATGATGAAGTGATGGAT TATCAGTGGTGCGATCTGGCGGATGTGCTGCA TGGCATTGATGCGACCCCGTGGGCGTTTAGCC CGTGGATGGTGATGCAGGCGACCAACCGCGA AGCGCGCAAACGCCTGAGCGCGTTTACCCAGC TGAAATAA	65
<i>ispA</i>		ATGGATTTCCCGCAGCAGCTGGAAGCGTGTGT GAAACAGGCGAACCAGGCGCTGAGCCGCTTTA TTGCGCCGCTGCCGTTTCAGAACACCCCGGTG GTGGAAACCATGCAGTATGGCGCGCTGCTGGG CGGCAAACGCCTGCGCCCGTTTCTGGTGTATG CGACCGGCCACATGTTTGGCGTGAGCACCAAC ACCCTGGATGCGCCGGCGGGCGGCGGTGGAATG CATTCATGCGTATAGCCTGATTCATGATGATCT GCCGGCGATGGATGATGATGATCTGCGCCGCG GCCTGCCGACCTGCCATGTGAAATTTGGCGAA GCGAACGCGATTCTGGCGGGCGATGCGCTGCA GACCCTGGCGTTTAGCATTCTGAGCGATGCGG	66

		ATATGCCGGAAGTGAGCGATCGCGATCGCATT AGCATGATTAGCGAACTGGCGAGCGCGAGCG GCATTGCGGGCATGTGCGGGCGGCCAGGCGCTG GATCTGGATGCGGAAGGCAAACATGTGCCGCT GGATGCGCTGGAACGCATTCATCGCCATAAAA CCGGCGCGCTGATTCGCGCGGGCGGTGCGCCTG GGCGCGCTGAGCGCGGGCGATAAAGGCCGCC GCGCGCTGCCGGTGCTGGATAAATATGCGGAA AGCATTGGCCTGGCGTTTCAGGTGCAGGATGA TATTCTGGATGTGGTGGGCGATACCGCGACCC TGGGCAAACGCCAGGGCGCGGATCAGCAGCT GGGCAAAGCACCTATCCGGCGCTGCTGGGCC TGGAACAGGCGCGCAAAAAAGCGCGCGATCT GATTGATGATGCGCGCCAGAGCCTGAAACAGC TGGCGGAACAGAGCCTGGATAACCAGCGCGCTG GAAGCGCTGGCGGATTATATTATTCAGCGCAA CAAATAA	
<i>crtE</i>		ATGGTATCTGGCTCAAAGGCTGGCGTCTCGCC ACATCGCGAAATTGAAGTGATGCGCCAGAGCA TTGATGATCATCTGGCGGGCCTGCTGCCGGAA ACCGATAGCCAGGATATTGTGAGCCTGGCGAT GCGCGAAGGCGTGATGGCGCCGGGCAAACGC ATTCGCCCCTGCTGATGCTGCTGGCGGGCGCG CGATCTGCGCTATCAGGGCAGTATGCCGACCC TGCTGGATCTGGCGTGCGCGGTGGAACCTGACC CATAACCGCGAGCCTGATGCTGGATGATATGCC GTGCATGGATAACGCGGAACTGCGCCGCGGCC AGCCGACCACCCATAAAAAATTTGGCGAAAGC GTGGCGATTCTGGCGAGCGTGGGCCTGCTGAG CAAAGCGTTTGGCCTGATTGCGGCGACCGGCG ATCTGCCGGGCGAACGCCGCGCGCAGGCGGTG AACGAACTGAGCACCGCGGTGGGCGTGCAAG GCCTGGTGCTGGGCCAGTTTCGCGATCTGAAC GATGCGGCGCTGGATCGCACCCCGGATGCGAT TCTGAGCACCAACCATCTGAAAACCGGCATTC TGTTTAGCGCGATGCTGCAGATTGTGGCGATT GCGAGCGCGAGCAGCCCGAGCACCCGCGAAA	67

		CCCTGCACGCGTTTGGCGCTGGATTTTGGCCAG GCGTTTCAGCTGCTGGATGATCTGCGCGATGA TCATCCGGAAACCGGCAAAGATCGCAACAAA GATGCGGGCAAAGCACCCTGGTGAACCGCCT GGGCGCGGATGCGGCGCGCCAGAACTGCGC GAACATATTGATAGCGCGGATAAACATCTGAC CTTTGCGTGCCCGCAGGGCGGCGCGATTTCGCC AGTTTATGCATCTGTGGTTTGGCCATCATCTGG CGGATTGGAGCCCCGGTGATGAAAATTGCGTAA	
<i>crtB</i>		ATGTCCCAACCCCCCTTGCTAGACCACGCAAC CCAGACGATGGCGAACGGCAGCAAGAGCTTT GCGACCGCGGGCGAAACTGTTTGATCCGGCGAC CCGCCGCAGCGTGCTGATGCTGTATACCTGGT GCCGCCATTGCGATGATGTGATTGATGATCAG ACGCATGGCTTTGCGAGCGAAGCGGCGGCGG AAGAAGAAGCGACCCAGCGCCTGGCGCGCCT GCGCACCTGACCCTGGCGGCGTTTGAAGGCG CGGAAATGCAGGACCCGGCGTTTGCGGCGTTT CAGGAAGTGGCGCTGACCCACGGCATTACCCC GCGCATGGCGCTGGATCATCTGGATGGCTTTG CGATGGATGTGGCGCAGACCCGCTATGTGACC TTTGAAGATACCCTGCGCTATTGCTATCATGTG GCGGGCGTGGTGGGCCTGATGATGGCGCGCGT GATGGGCGTGCGCGATGAACGCGTGCTGGATC GCGCGTGCGATCTGGGCCTGGCGTTTCAGCTG ACCAACATTGCGCGCGATATTATTGATGATGC GGCGATTGATCGCTGCTATCTGCCGGCGGAAT GGCTGCAGGATGCGGGCCTGACCCCGGAAAA CTATGCGGCGCGCGAAAACCGCGCGGCGCTGG CGCGCGTGGCGGAACGCCTGATTGATGCGGCG GAACCGTATTATATTAGCAGCCAGGCGGGCCT GCATGATCTGCCGCCGCGCTGCGCGTGGGCGA TTGCGACCGCGCGCAGCGTGTATCGCGAAATT GGCATTAAAGTGAAAGCGGCGGGCGGCAGCG CGTGGGATCGCCGCCAGCATAACCAGCAAAGGC GAAAAAATTGCGATGCTGATGGCGGCGCCGG	68

		GCCAGGTGATTCGCGCGAAAACCCGCGTG ACCCCGCGCCCGGCGGGCCTGTGGCAGCGCCC GGTGTA	
--	--	---	--

- [87] 실시예 1. STAPL 시스템 대장균 제조 및 STAPL 시스템에서의 플라스미드 수
유지의 확인
- [88] STAPL을 기본으로 하는 영양 요구성 보완(auxotrophic complementation) 시스템을 구축하기 위해 염색체(chromosome) 상의 필수 유전자를 제거하고 플라스미드에 해당 필수 유전자를 발현시키는 실험을 수행하였다. IF-1 단백질이 세포의 생존력과 직접적으로 연관되어 있어 교차 먹이 효과(cross-feeding effect)를 최소화 시킬 수 있으므로, 조절 유전자로 번역 개시 인자-1(IF-1)을 암호화 하는 *infA*를 선택하여 상기 조절 유전자를 발현하는 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를 설계하였다. 균주에 *infA*를 도입하기 위한 플라스미드는 중간 카피 (세포 당 40 카피)로 알려져 있는 pCDFduet을 사용하고, 복제원점(레플리콘)으로 CloDF13 을 이용하여 제조하였다.
- [89] 먼저, *infA* 발현 카세트를 중간 세기의 항시성 프로모터(J23116)와 UTR designer에 의해 계산적으로 디자인된 1115.3의 값을 나타내는 낮은 세기의 5'-UTR, 그리고 합성 터미네이터 (BBa_B1002)를 포함하여 구축하였다. 플라스미드 기반 발현 시스템은 여러 카피 수로 존재하기 때문에 염색체 상의 발현량과 같은 양으로 클로닝 하면 세포에게 부담을 주고 성장을 방해할 수 있어 *infA* 발현이 낮게 되도록 상기 발현 카세트를 디자인하였다. 플라스미드 카피 수(PCN)를 간접적으로 관찰하기 위해 같은 플라스미드에서 강한 항시성 프로모터 (J23100)와 5'-UTR 하에서 eGFP를 리포터 단백질로써 발현시켰다.
- [90] 이를 위해 *Escherichia coli*의 W3110 균주의 염색체를 주형으로 하고 표 3의 O-*infA*-F1v1/O-*infA*-F2/O-*infA*-B 프라이머 세트를 이용해 *infA* 유전자를 증폭하였고, *Bsu*36I 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 상기 플라스미드에 삽입하였다. 계속해서 eGFP는 O-eGFP-F1/O-eGFP-F2/O-eGFP-B 프라이머 세트를 이용해 증폭하였고, *Sac*I 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 상기 플라스미드에 삽입함으로써 최종적으로 pSTAPL_eGFPv1 플라스미드를 제작하였다.
- [91] 완성된 플라스미드는 *Escherichia coli*의 W3110 균주에 삽입하였다. 그 다음으로 영양 요구성 유지를 위해 균주의 염색체 상 *infA*를 제거하기 위하여 기존에 알려진 Lambda-Red 리콤비네이션 시스템을 이용하였고, pKD46 플라스미드를 이용하였다. *infA* 제거를 위한 DNA 단편은 FRT-Kan^R-FRT를 주형으로 하고, D-*infA*-F/D-*infA*-B 프라이머 세트로 증폭하여 *infA*가 제거된 재조합 대장균 STG1을 제조하였다. 상기의 과정을 통해 제작된 재조합 플라스미드와 균주를 도 1에 나타내었다.
- [92] 상기 제조한 STAPL이 적용된 재조합 대장균에서의 플라스미드가 장시간

안정성을 가질 수 있는지 평가하기 위하여, 종래의 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템을 가진 대장균(STG0)과 함께 세포 배양을 진행하였다.

- [93] 재조합 대장균 pSTAPL_eGFPv1을 포함한 모든 재조합 균주를 플라스미드 안정성 테스트를 위한 배지 조건인 변형된 3 ml의 글루코오스 M9 배지 (100 mM 인산버퍼, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L NH_4Cl , 2 g/L NaCl , 1 g/L casamino acid를 포함하며, 20 g/L의 글루코오스를 유일 탄소원으로 사용)에 넣은 후, 37°C에서 250 rpm로 하여 배양하였고, 40 세대 동안 5 세대에 한 번씩 일련의 계대 배양을 진행하였다. 초기 세포 농도는 사전에 같은 배지에서 배양을 통해 준비된 세포와 동일하도록 OD_{600} 농도 0.05로 희석하였다. 플라스미드 유지를 위한 항생제로는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 스트렙토마이신을 사용하였다.
- [94] 배양 중의 세포 성장은 UV-1700 spectrophotometer를 이용하여 600 nm 파장의 흡광도를 측정하는 방법으로 정량하였다. 세포 형광을 VICTOR 1420 multilabel plate reader를 이용하고 486 nm 파장의 여가 필터와 535 nm 파장의 방출 필터를 사용하여 측정하였다. 세포를 인산염 완충 식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)로 씻은 다음 S3e cell sorter를 이용하여 세포 하나 당 형광을 측정하였다. 항생제 유무에 따른 종래 플라스미드 분리 불안 현상과 STAPL 적용 균주에서 플라스미드가 안정적으로 유지되는 과정을 모식도로 하여 도 2에 나타내었고, STG1 및 STG0 대장균 균주를 40 세대 간 배양하며 측정한 플라스미드 유지 비율(도 3A) 및 배양 0, 10, 20, 40세대 켜의 세포 하나 당 형광 프로파일을 측정한 결과(도 3B)를 도 3에 나타내었다.
- [95] 도 2 및 도 3A, 3B에 나타난 바와 같이, 항생제가 첨가되지 않은 STG0 균주는 10세대 켜에서 플라스미드가 없는 세포 56.2% 정도 발생하였고, 40세대 켜에는 형광 비율이 13.7% 으로 나타나 균주 내 플라스미드를 유지한 비율이 급격하게 감소하는 것을 확인하였다. 항생제가 첨가된 STG0 균주의 경우는 플라스미드가 없는 세포가 발생하지는 않았지만, 플라스미드를 적게 가지는 세포 집단이 12.3% 정도로 발생하였고, 배양 후 0 세대에 비해 40 세대 켜에는 형광 비율이 65%로 나타남을 확인하였다. 반면 STAPL이 적용된 STG1 균주는 항생제의 첨가 없이도 40 세대 동안 형광 비율이 100%와 가깝게 높게 유지되었고 0 세대에 비해 40 세대에는 형광비율이 97.2%로 나타나, 균주 내 플라스미드를 나타내는 세포 집단이 균일하게 나타나 고유 변이가 적은 것을 확인할 수 있었다. 종합적으로, 종래의 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템과 STAPL 시스템을 대비한 결과, STAPL 시스템이 적용된 재조합 대장균을 이용하면 플라스미드가 장시간 안정적으로 유지될 수 있음을 확인하였다.

[96]

[97] **실시예 2. 다중 플라스미드 시스템에서의 STAPL 시스템 적용**

- [98] STAPL을 기본으로 하는 영양 요구성 보완 시스템을 두 개의 플라스미드에 대해 구축하기 위해 염색체 상의 두 개의 필수 유전자를 제거하고 플라스미드에 필수 유전자를 각각 발현시켰다. 발현 카세트 내 조절 유전자로 세포의 생존력과

직접적으로 연관되어 있어 교차 먹이 효과가 최소화시킬 수 있는 번역 개시 인자-1(IF-1)를 암호화 하는 *infA*와 단백질 신장 인자(EF-P)를 암호화 하는 *efp*를 선택하여 STAPL 시스템을 구축하였다. *infA*을 사용한 STAPL 시스템을 도입한 균주에 추가적으로 균주에 *efp*를 도입하기 위한 플라스미드는 중간 카피 (세포 당 40 카피)로 알려져 있는 pETduet을 사용하고, 복제원점(레플리콘)으로 CloE1을 이용하여 제조하였다.

- [99] *efp*를 도입하기 위한 플라스미드에 포함되는 *efp* 발현 카세트를 중간 세기의 항시성 프로모터(J23116)와 UTR designer에 의해 디자인 된 1169.4의 낮은 세기의 5'-UTR, 그리고 합성 터미네이터 (BBa_B1002)를 포함하여 구축하였다. 염색체 상의 발현량과 같은 양으로 클로닝 하면 세포에게 부담을 주고 성장을 방해할 수 있어 *efp* 발현이 낮게 되도록 상기 발현 카세트를 디자인하였다. PCN을 간접적으로 관찰하기 위해 같은 플라스미드에서 강한 항시성 프로모터 (J23100)와 5'-UTR 하에서 mCherry를 리포터 단백질로써 발현시켰다.
- [100] 컨트롤 플라스미드로, mCherry를 주형으로 하고 표 2의 O-mCherry-F1/O-mCherry-F2/ O-mCherry-B 프라이머 세트를 이용해 증폭하였고, *SacI* 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 pET 플라스미드에 삽입함으로써 pET-mCherry 플라스미드를 제작하였다. pET 플라스미드를 STAPL 시스템으로 적용하기 위하여, *Escherichia coli*의 W3110 균주의 염색체를 주형으로 하고 표 3의 O-efp-F1/O-efp-F2/O-efp-B 프라이머 세트를 이용해 *efp* 유전자를 증폭하였다. 이후 *XhoI* 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 앞서 제작한 pET-mCherry 플라스미드에 삽입하였다. *infA*를 조절 유전자로 사용하여 STAPL 시스템을 도입한 실시예 1의 STG1 균주의 발현 카세트의 프로모터와 같은 세기의 항시성 프로모터인 J23116을 사용한 *infA* 발현 카세트가 도입된 STG1 균주에 상기 제조된 플라스미드를 삽입하였다.
- [101] 이후, 영양 요구성 유지를 위해 STG1 균주의 염색체 상의 *efp*를 제거하기 전, 염색체 상의 카나마이신 저항성 유전자를 제거하기 위하여, pCP20 플라스미드를 사용하여 리콤비네이션을 진행하였다. 염색체 상의 *efp*를 제거하기 위해 기존에 알려진 Lambda-Red 리콤비네이션 시스템을 이용하고 pKD46 플라스미드를 사용하였다. 영양 요구성 유지를 위해 염색체 상의 *efp*를 제거하기 위한 DNA 단편을 pFRT2161을 주형으로 하고, 표 3의 D-efp-F/D-efp-B 프라이머 세트로 증폭하여 상기 염색체 상의 *efp*가 제거된 재조합 대장균 STGC1을 제조하였다. 상기 제조한 다중 플라스미드 STAPL이 적용된 재조합 대장균에서 플라스미드의 장시간 안정성을 평가하기 위하여, 종래의 항생제의존성 플라스미드 유지 시스템(STGC0)과 함께 세포 배양을 진행하였다.
- [102] STGC0와 STGC1 균주를 플라스미드 안정성 테스트를 위한 배지 조건인 변형된 3 ml의 글루코오스 M9 배지 (100 mM 인산버퍼, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 2 g/L NH₄Cl, 2 g/L NaCl, 1 g/L casamino acid를 포함하며, 4 g/L의 글루코오스를 유일 탄소원으로 사용)에 넣은 후, 37°C에서 250 rpm로 하여 배양하였고, 40세대

동안 5 세대에 한 번씩 일련의 계대 배양을 진행하였다. 초기 세포 농도는 사전에 같은 배지에서 배양을 통해 준비된 세포와 동일하도록 OD₆₀₀ 농도 0.05로 희석하였다. 양성 제어로 사용된 전통적인 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템(STGC0)의 경우에 플라스미드 유지를 위한 항생제로 50 µg/ml의 스트렙토마이신과 암피실린을 배지에 더 포함하여 배양을 실시하였다.

[103] 배양 중의 세포 성장을 UV-1700 spectrophotometer를 이용하여 600 nm 파장의 흡광도를 측정하는 방법으로 측정하였고, eGFP 형광을 VICTOR 1420 multilabel plate reader를 이용하고 486 nm 파장의 여과 필터와 535 nm 파장의 방출 필터를 사용하여 측정하였다. mCherry 형광을 Hidex Sense microplate reader, 575 nm 파장의 여과 필터와 610 nm 파장의 방출 필터를 사용하여 측정하였고, 상기 측정한 형광의 결과를 도 4A 및 4B에 나타내었다.

[104] 도 4A에서 나타난 바와 같이, 항생제가 첨가되지 않은 STGC0 균주에서 pCDF 플라스미드는 0 세대에 비해 40 세대의 균주에서 그 값이 감소하여 형광비율이 6.6%의 값을 나타내는 것을 확인하였다. 항생제가 첨가된 STGC0 균주의 pCDF 플라스미드는 40세대의 균주에서 형광비율 값이 62.4%로 나타나 항생제가 첨가된 STGC0 균주보다는 그 값이 증가하였으나, 거듭된 계대 배양을 통하여 플라스미드의 수가 감소한 것을 확인하였다. 반면, 다중 플라스미드에 대해 STAPL이 적용된 STGC1 균주는 항생제의 첨가 없이 40 세대 동안 형광이 높게 유지되었고, 거듭된 계대 배양에도 플라스미드 수가 점차 증가하여 40 세대에서의 균주에서는 형광비율이 169.6%로 그 발현이 증가한 것을 확인하였다. 도 4B에서 확인한 바와 같이, pET 플라스미드에 대해서도 마찬가지로, STGC0 균주는 항생제 첨가 유무와는 상관없이 플라스미드의 수가 낮게 유지됨을 확인하였다. 구체적으로 항생제가 첨가되지 않은 균주는 40세대 후에 11.6%의 형광비율 값을 보였고, 항생제가 첨가된 경우 40세대 후의 균주는 형광비율이 78.5%로 나타남을 확인하였다. STAPL 시스템이 적용된 STGC1 균주는 항생제를 첨가하지 않더라도 40 세대 동안 플라스미드가 안정하게 유지되고 세대가 높아질수록 그 형광비율이 증가하여, 40 세대의 균주에서는 형광비율이 247%로 나타나 매우 안정적으로 플라스미드 수가 유지됨을 확인하였다. 종합적으로, 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템과 STAPL 시스템을 대비한 결과, STAPL 시스템에서 조절 유전자로 infA 뿐 아니라 efp 유전자를 사용한 경우에도 플라스미드가 장시간 안정적 유지가 가능함을 확인하였고, 아울러 다중 플라스미드에 대해서도 STAPL 시스템을 적용하면 재조합 균주 내 플라스미드의 수가 장시간 안정적으로 유지가 가능함을 확인하였다.

[105]

[106] 실시예 3. 고복제 수 플라스미드에서의 STAPL 시스템 적용

[107] 고복제 수 플라스미드 (high copy plasmid)의 경우 플라스미드의 확률적 변동이 크기 때문에 카피 수가 급격히 줄어드는 것이 일반적이다. 다만, 본 발명의

STAPL시스템을 이용하면 고복제 수 플라스미드를 이용한 경우에도 안정적으로 PCN을 유지하는지를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. STAPL 시스템을 high copy plasmid 시스템에 도입하기 위해 플라스미드에 필수 유전자를 발현시키고 염색체 상의 동일 필수 유전자를 제거하였다. 발현 카세트 내 조절 유전자로 세포의 생존력과 직접적으로 연관되어 있어 교차 먹이 효과가 최소화시킬 수 있는 번역 개시 인자-1(IF-1)을 암호화 하는 *infA*를 선택하여 STAPL 시스템을 구축하였다. *infA*을 도입하기 위한 플라스미드는 높은 카피 (세포 당 500 카피)로 알려져 있는 pUC19을 사용하고, 복제원점(레플리콘)으로 pMB1을 이용하여 제조하였다.

- [108] *infA*를 도입하기 위한 플라스미드에 포함되는 *infA* 발현 카세트를 낮은 세기의 항시성 프로모터(J23112)와 UTR designer에 의해 디자인 된 263.75의 낮은 세기의 5'-UTR, 그리고 합성 터미네이터 (BBa_B1002)를 포함하여 구축하였다. 염색체 상의 발현량과 같은 양으로 클로닝 하면 세포에게 부담을 주고 성장을 방해할 수 있어 *infA* 발현이 낮게 되도록 상기 발현 카세트를 디자인하였다. PCN을 간접적으로 관찰하기 위해 같은 플라스미드에서 강한 항시성 프로모터 (J23118)와 5'-UTR 하에서 eGFP를 리포터 단백질로써 발현시켰다.
- [109] 컨트롤 플라스미드로, pUC19를 주형으로 하여 표 3의 O-pUC19-F/O-pUC19-B 프라이머 세트를 이용해 증폭하였고, eGFP는 eGFP를 주형으로 하고 표 3의 O-eGFP-F1v2/ O-eGFP-F2v2/O-eGFP-Bv2 프라이머 세트를 이용해 증폭하였으며, Bsu36I과 XhoI 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 pUC19 플라스미드에 삽입함으로써 pUC19-eGFP 플라스미드를 제작하였다. pUC19 플라스미드를 STAPL 시스템으로 적용하기 위하여, *Escherichia coli*의 W3110 균주의 염색체를 주형으로 하고 표 3의 O-*infA*-F1v2/O-*infA*-F2v2/O-*infA*-B1v2/O-*infA*-B2v2 프라이머 세트를 이용해 *infA* 유전자를 증폭하였다. 이 후 *SacI*과 *AatII* 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 앞서 제작한 pUC19-eGFP 플라스미드에 삽입하였고, pSTAPL_eGFPv7을 제작하였다.
- [110] 이후, 영양 요구성 유지를 위해 STG6 균주의 염색체 상의 *infA*를 제거하기 위해 기존에 알려진 Lambda-Red 리콤비네이션 시스템을 이용하고 pKD46 플라스미드를 사용하였다. 영양 요구성 유지를 위해 염색체 상의 *infA*를 제거하기 위한 DNA 단편을 pFRT72를 주형으로 하고, 표 3의 D-*infA*-F/D-*infA*-B 프라이머 세트로 증폭하여 상기 염색체 상의 *infA*가 제거된 재조합 대장균 STG7을 제조하였다. 상기 제조한 다중 플라스미드 STAPL이 적용된 재조합 대장균에서 플라스미드의 장시간 안정성을 평가하기 위하여, 종래의 항생제의존성 플라스미드 유지 시스템(STG6)과 함께 세포 배양을 진행하였다.
- [111] STG6와 STG7 균주를 플라스미드 안정성 테스트를 위한 배지 조건인 변형된 3 ml의 글루코오스 M9 배지 (100 mM 인산버퍼, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 2 g/L NH₄Cl, 2 g/L NaCl, 1 g/L casamino acid를 포함하며, 4 g/L의 글루코오스를 유일 탄소원으로 사용)에 넣은 후, 37°C에서 250 rpm로 하여 배양하였고, 40세대 동안

5 세대에 한 번씩 일련의 계대 배양을 진행하였다. 초기 세포 농도는 사전에 같은 배지에서 배양을 통해 준비된 세포와 동일하도록 OD₆₀₀ 농도 0.05로 희석하였다. 양성 제어로 사용된 종래의 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템(STG6)의 경우에 플라스미드 유지를 위한 항생제로 50 µg/ml의 암피실린을 배지에 더 포함하여 배양을 실시하였다.

- [112] 배양 중의 세포 성장을 UV-1700 spectrophotometer를 이용하여 600 nm 파장의 흡광도를 측정하는 방법으로 측정하였고, eGFP 형광을 VICTOR 1420 multilabel plate reader를 이용하고 486 nm 파장의 여과 필터와 535 nm 파장의 방출 필터를 사용하여 측정하였다. 상기 측정한 형광의 결과를 도 5에 나타내었다.
- [113] 도 5에서 나타난 바와 같이, 항생제가 첨가되지 않은 STG6 균주에서 pUC19 플라스미드는 0 세대에 비해 40 세대의 균주에서 그 값이 감소하여 형광비율이 37.7%의 값을 나타내는 것을 확인하였다. 항생제가 첨가된 STG6 균주의 pUC19 플라스미드는 40세대의 균주에서 형광비율 값이 54.6%로 나타나 항생제가 첨가된 STG6 균주보다는 그 값이 증가하였으나, 거듭된 계대 배양을 통하여 플라스미드의 수가 감소한 것을 확인하였다. 반면, 높은 복제수를 가지는 플라스미드에 대해 STAPL이 적용된 STG7 균주는 항생제의 첨가 없이 40 세대 동안 형광이 높게 유지되었고, 거듭된 계대 배양에도 플라스미드 수가 안정하게 유지되어 40 세대에서의 균주에서는 형광비율이 79.5%로 그 발현이 증가한 것을 확인하였다. 종합적으로, 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템과 STAPL 시스템을 대비한 결과, STAPL 시스템에서 높은 복제 수를 가지는 플라스미드에 대해서도 플라스미드가 장시간 안정적 유지가 가능함을 확인하였다.

[114]

[115] **실시예 4. STAPL에서의 PCN 조절**

- [116] 세포가 생존하기 위해 필수적으로 요구하는 *infA*의 발현량은 정해져 있는바, 세포의 *infA* 발현량 조절의 메커니즘을 이용하여 전사 수준을 조절하면 PCN을 조절할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 실시예 1에서 사용한 대장균 STG1의 *infA* 발현량을 기준으로 추가적인 4개의 다른 *infA* 발현량을 가지는 STG2-5 균주를 제조하였다.

- [117] 서로 다른 세기의 프로모터를 가지는 *infA* 카세트는 O-*infA*-F1v2-5/O-*infA*-B 프라이머 세트에 증폭되었고, *Bsu*36I 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 플라스미드에 삽입함으로써 최종적으로 pSTAPL_eGFPv2-5 플라스미드를 제작하였다. 완성된 플라스미드는 *Escherichia coli*의 W3110 균주에 삽입되었고, 그 다음으로 영양 요구성 유지를 위해 염색체 상의 *infA*를 제거하였다. *infA*를 제거하기 위하여 종래에 알려진 Lambda-Red 리콤비네이션 시스템이 이용되었으며 pKD46 플라스미드가 이용되었다. *infA* 제거를 위한 DNA 단편을 FRT-Kan^R-FRT 주형을 D-*infA*-F/D-*infA*-B 프라이머 세트를 이용하여 증폭시켰다. 상기 과정을 통하여 실시예 1에서 제조된 STG1외에 추가적으로 염색체 상의 *infA*가 제거된 재조합 대장균 STG2-5를 제조하였다.

- [118] 실제 사용된 시스템에서 프로모터 세기를 StepOnePlus Real-time PCR system로 RT-qPCR을 수행하여 실제 전사된 *infA* 전사물의 양을 측정하였다. *infA* 전사물을 증폭시키기 위해 Q-*infA*-F/Q-*infA*-B 프라이머 세트를 사용하였고, 염색체 상에 있는 하우스키핑 유전자인 *hcaT*와 *cysG*를 레퍼런스로 하고, 상기 *hcaT*와 *cysG* 전사물을 증폭시키기 위해 Q-*hcaT*-F/Q-*hcaT*-B와 Q-*cysG*-F/Q-*cysG*-B 프라이머 세트를 사용하였다. 상대적인 *infA* 전사체의 양은 C_T 비교 방법을 통해 정량화 하였고 상기 표 2에 그 상대적인 세기를 나타내었다. 이용한 프로모터들의 예측 세기와 실제 발현 정도는 조금 차이를 보였으나, 대체적인 경향은 일치함이 확인되었다.
- [119] PCN은 염색체 당 플라스미드 개수로 정의하였고, StepOnePlus Real-time PCR system을 사용하고 quantitative polymerase chain reaction(qPCR)을 수행하여 PCN을 측정하였다. 플라스미드와 염색체의 특정 부분을 증폭하기 위해 각각 Q-pCDF-F/Q-pCDF-B 그리고 Q-polA-F/Q-polA-B 프라이머 세트를 사용하였다. 최종적으로, 5개의 각기 다른 발현량을 가지는 *infA*가 삽입된 STAPL 균주를 20 ml의 실시예 1에서 사용한 배지와 같은 배지에서 배양을 진행하였다. *infA*의 발현량 조절의 메커니즘을 통한 PCN 조절의 메커니즘을 도 6에 나타내었고, STG1-5 균주의 무항생제 배지에서의 특정 형광을 도 7A에, 실제 PCN, *infA*의 상대적인 프로모터 세기를 도 7B에, 그리고 균주의 특이적 성장률을 도 7C에 나타내었으며, 상기 STG2-5 균주의 0, 10, 20, 그리고 40 세대 켜의 세포 하나 당 형광 프로파일을 도 8에 나타내었다.
- [120] 도 7A에서 확인한 바와 같이, *infA*의 전사 레벨에 따라 특정형광의 상대적인 값이 감소함을 확인하였다. 또한 도 7B에서는 *infA*의 전사 레벨에 따라 세포의 PCN 값이 변화하는 것을 확인하였다. 상기와 같은 실험 결과를 통하여, 프로모터 세기로 필수 유전자의 전사의 조절을 통하여 *infA* 발현량을 조절하면 PCN이 성공적으로 조절될 수 있음을 확인하였다. 이는 도 6에 모식화하여 나타낸 바와 같이, *infA* 발현량이 낮으면 세포는 생존을 위해 *infA*를 더 요구하므로 플라스미드가 많은 세포들이 선택되어 살아남는 반면, *infA* 발현량이 낮으면 세포에게 대사 부담을 주는 플라스미드가 많이 유지될 필요가 없기 때문에 플라스미드가 적은 세포가 많은 비중을 차지하게 되기 때문에 발생하는 결과이다. 즉, 도 7A 및 7B에서 확인한 바와 같이, *infA* 발현량을 조절하면 PCN이 조절되며, PCN 값은 정량적으로 최대 5.6배까지 조절될 수 있음을 확인하였으며, 이를 표 4에 상기 PCN 값을 정리하여 나타내었다.
- [121] 도 7C에서 확인한 바와 같이, STG1 내지 5 균주들의 특이 성장률은 0.47 h^{-1} 로 모두 비슷한 값을 나타낸다는 것으로부터 본 발명의 STAPL 시스템이 세포에게 대사 부담을 주지 않는다는 것을 확인하였다. 또한, 도 8에서 확인한 바와 같이, STG2-5 균주들은 앞선 실시예 1에서의 STG1 균주와 마찬가지로 계속된 세대 배양으로 그 세대수가 높아져도 세포 하나 당 형광이 안정적으로 유지됨을 확인하였다.

[122] 따라서, 본 발명의 STAPL 시스템은 *infA*의 발현량을 정밀하게 조절함으로써 상기 시스템을 발현하는 세포에서 추가적인 대사 부담을 주지 않으면서 PCN을 정량적으로 5.6배까지 조절할 수 있음을 확인하였다.

[123]

[124] 실시예 5. STAPL을 통한 목표 생산물의 생산

[125] 5.1 STAPL 시스템을 이용한 이타콘산의 생산

[126] 본 발명의 STAPL 시스템을 이용하면 상기 시스템을 적용시킨 균주가 종래의 항생제 의존 플라스미드 유지 시스템에 비해 플라스미드를 장시간 안정적으로 세포 간 변이를 최소화하여 유지할 수 있고, 또한 *infA* 발현량을 조절하여 PCN을 정교하게 조절할 수 있는 바, 이를 이용하여 목표 생산물인 이타콘산(itaconic acid)을 효율적으로 생산할 수 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 대장균의 목표 생산물인 이타콘산을 생산하기 위하여 *Aspergillus terreus*에서 유래된 *cad* 외래 유전자를 Thermo Fisher 사에서 코돈 최적화된 형태로 이용하였다. 유전자 발현량을 최대화하기 위하여, 발현 카세트에 *tac* 프로모터와 합성 5' UTR을 활용한 발현 카세트에 교체하여 사용하였다. 합성 5' UTR의 경우 유전자의 발현량을 최대화할 수 있게 설계한 것으로 UTR Designer를 통하여 예측 발현량이 100만 이상이 되게 설계한 합성 5' UTR을 이용하였다. pCDF-CAD 플라스미드를 제작하기 위해 중간 복제 수를 가지는 pCDFDuet 플라스미드를 주형으로 하여, 표 3에 나타낸 O-pCDF-F/O-pCDF-B 프라이머 세트를 이용해 증폭하였다. *cad*를 O-cad-F1/O-cad-B1 그리고 O-cad-F2/O-cad-B2 프라이머 세트로 차례로 증폭시킨 뒤, *BsaI* 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 상기 플라스미드에 삽입함으로써 최종적으로 pCDF-CAD 플라스미드를 제작하였다. 상기 플라스미드로 STAPL을 적용시킨 pSTAPL_CAD_v1-5를 제작하기 위해서 *Escherichia coli*의 W3110 균주의 염색체를 주형으로 하여 표 3의 O-*infA*-F1v1-5/O-*infA*-F2/O-*infA*-B 프라이머 세트를 이용해 *infA* 유전자를 증폭하였고, *Bsu36I* 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 상기 플라스미드에 삽입하였다. 완성된 플라스미드는 *Escherichia coli*의 W3110 균주에 삽입하였다. 그 다음으로 영양 요구성 유지를 위해 균주의 염색체 상 *infA*를 제거하기 위하여 기존에 알려진 Lambda-Red 리콤비네이션 시스템을 이용하였고, pKD46 플라스미드를 사용하였다. *infA* 제거를 위한 DNA 단편은 FRT-Kan^R-FRT 주형으로 하고, D-*infA*-F/D-*infA*-B 프라이머 세트로 증폭하여 *infA*를 제거된 재조합 대장균 STI1-5를 제조하였다.

[127] 상기 제조한 재조합 대장균에서 생산된 이타콘산 생산량을 비교하기 위하여, 음성, 양성 대조군(STI0)과 함께 세포 배양을 진행하였다. 재조합 대장균 균주 STI0-5를 변형된 25 ml의 글루코오스 M9 배지 (100 mM 인산버퍼, 0.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 2 g/L NH₄Cl, 2 g/L NaCl, 2 g/L yeast extract, 10 mL/L의 ATCC trace mineral solution을 포함하며, 20 g/L의 글루코오스를 유일 탄소원으로 사용)에 넣은 후, 30°C에서 200 rpm의 조건으로 48시간 동안 배양하였고, 초기 세포 농도는 사전에

같은 배지에서 배양을 통해 준비된 세포와 동일하게 OD₆₀₀ 농도 0.05로 희석하였다. 양성 제어로 사용한 종래의 항생제 의존성 플라스미드 유지 시스템(STI0)의 경우에만 플라스미드 유지를 위한 항생제로 50 µg/ml의 스트렙토마이신을 배지에 포함하여 사용하였다. 배양 후, 이타콘산과 배지 내 다른 유기물들은 Aminex HPX-87H 칼럼과 분당 0.6 ml의 5 mM H₂SO₄를 이동상으로 이용하여 측정하였고, 검출에는 Shodex RI-101 기기를 사용하였다. 이타콘산 생산을 위한 STAPL 시스템 및 해당 플라스미드를 모식화하여 도 9에 나타내었고, STI0-5를 이용한 이타콘산 생산의 30시간 후의 결과를 도 10A에, 그때의 PCN을 10B에 나타내었다.

- [128] 도 10A에 나타난 바와 같이, 30시간 후의 결과에서 항생제를 포함하지 않은 STI0 균주에서는 다른 사용된 균주에 비해 무시할 수 있을 만큼의 0.28 g/L의 이타콘산의 생산이 확인되었으나, 항생제를 포함한 STI0 균주에서는 대략 그 2배 정도의 0.42 g/L의 생산이 확인되었다. 한편, 항생제가 포함되지 않은 STAPL 적용 생산 시스템은 *infA* 발현이 가장 낮아서 PCN이 가장 높게 유지되는 STI1 균주에서 항생제를 포함한 STI0 균주에 비해 170% 증가한 0.69 g/L의 이타콘산을 확인하였으며, 이외 다른 균주들이 0.6 g/L의 양 정도의 값을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 배양 초기에는 세포 성장이 빨라서 PCN이 많은 것이 생산에 유리하지만, 이후에는 성장을 거의 하지 않으므로 PCN이 적은 것이 오히려 생산에 유리해진다는 사실을 의미하는 것이다. 또한, 도 10B에 나타난 바와 같이, 균주의 배양 30시간 후에 PCN은 *infA* 발현이 증가할수록 감소하는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로, STI4에서 663 카피수로 최저값이 나타났고, STI1에서 3390 카피수로 최고값이 나타남을 확인하였고, 그 상세한 값은 표 4에 해당 PCN 값으로 나타내었다. 종합적으로, STAPL이 이타콘산 생산 시스템에서도 성공적으로 플라스미드를 유지할 수 있음을 확인하였고, 이는 생산을 최대화하기 위해 표적 유전자의 최적 발현을 찾는 데에 적용할 수 있음을 확인하였다.

[129]

[130] 실시예 5.2 STAPL 시스템을 이용한 라이코펜의 생산

- [131] 상기 실시예 1 내지 3에서 STAPL 적용 균주를 분석한 것을 기반으로 상기 시스템을 이용하여 목표 생산물인 라이코펜(Lycopene)을 효율적으로 생산할 수 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 목표 생산물을 라이코펜으로 하고 STAPL 시스템을 이용을 통한 라이코펜의 생산 양상을 비교 분석하였다. 라이코펜 생산을 위하여 *Escherichia coli*에서 유래된 *ispA*와 *idi* 및 *Pantoea agglomerans*에서 유래된 *crtEBI*를 Thermo Fisher 사에서 코돈 최적화된 형태로 이용하였다. 표 1에 나타난 pCDF-*idi_ispA_crtEBI* 플라스미드를 사용하여 STAPL을 적용시킨 pSTAPL_LYCv1-5를 제작하기 위해서 *Escherichia coli*의 W3110 균주의 염색체를 주형으로 하여 표 3의 O-*infA*-F1v1-5/O-*infA*-F2/O-*infA*-B 프라이머 세트를 이용해 *infA*를 증폭하였고, *Bsu*36I 제한 효소 서열을 이용한 클로닝을 통해 상기

플라스미드에 삽입하였다. 상기 완성된 플라스미드를 *Escherichia coli*의 W3110 균주에 삽입하였다. 그 다음으로 영양 요구성 유지를 위해 균주의 염색체 상 *infA*를 제거하기 위하여 기존에 알려진 Lambda-Red 리조합 시스템을 이용하였고, pKD46 플라스미드를 사용하였다. *infA* 제거를 위한 DNA 단편은 FRT-Kan^R-FRT를 주형으로 하고, D-*infA*-F/D-*infA*-B 프라이머 세트로 증폭하여 *infA*가 제거된 재조합 대장균 STL1-5를 제조하였다.

- [132] 상기 제조한 재조합 대장균에서 라이코펜 생산량을 비교하기 위하여, 음성, 양성 대조군(STL0)과 함께 세포 배양을 진행하였다. 재조합 대장균 균주 STL0-5를 변형된 20 ml의 글루코오스 2X M9 배지 (200 mM 인산버퍼, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 4 g/L NH₄Cl, 4 g/L NaCl을 포함하며, 4 g/L의 글루코오스를 유일 탄소원으로 사용)에 넣은 후, 37°C에서 250 rpm의 조건으로 24시간 동안 배양하였고, 초기 세포 농도는 사전에 같은 배지에서 배양을 통해 준비된 세포와 동일하게 OD₆₀₀ 농도 0.05로 희석하였다. 양성 제어로 사용한 종래의 항생제의존성 플라스미드 유지 시스템(STL0)의 경우에만 플라스미드 유지를 위한 항생제로 50 µg/ml의 스트렙토마이신을 배지에 포함하여 사용하였다. 배양 후, 라이코펜 생산량은 기존에 알려진 변형된 비색적 방법(colorimetric assay)을 통해 측정하였고, VICTOR 1420 Multilabel Plate Reader를 이용해 475 nm의 흡광도 측정을 통해 정량하였다. 라이코펜 생산을 위한 STAPL 시스템 및 사용된 플라스미드를 모식화하여 도 11에 나타내었고, STL0-5 균주의 배양 24시간 후 라이코펜의 특정 생산 양상을 도 12A에, OD가 0.8일 때의 PCN을 도 12B에 나타내었다.

- [133] 도 12A에 나타난 바와 같이, 라이코펜의 특이 생산 경향은 *infA*의 프로모터 세기와 반비례 관계로, 양자는 매우 밀접한 관련이 있음을 확인하였다. *infA* 발현이 높을수록 PCN이 적게 유지되므로 라이코펜 생산 유전자들의 유전자 레벨 양이 상대적으로 감소하고, 라이코펜 합성에 대한 탄소 플럭스가 감소되어 결과적으로 라이코펜의 특이 생산량도 감소하는 결과를 확인하였다. 특히, *infA* 발현이 가장 낮아서 PCN이 가장 높게 유지되는 STL1 균주는 항생제를 포함하는 STL0 균주에 비해 200% 증가된 27.1 mg/g DCW로 높은 라이코펜 생산량을 나타나는 것을 확인하였다. 도 12B에 나타난 바와 같이, 균주의 배양 30시간 후에 PCN은 *infA* 발현이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로, STI4에서 38 카피 수로 최저값이 나타났고, STI1에서 684 카피 수로 최고값이 나타남을 확인하였고, 그 상세한 값은 표 4에 해당 PCN 값을 나타내었다. 종합적으로, STAPL이 라이코펜 생산 시스템에서도 성공적으로 플라스미드를 유지할 수 있음을 확인하였고, 이는 생산을 최대화하기 위해 표적 유전자의 최적 발현을 찾는 데에 적용할 수 있음을 또한 재확인하였다.

[134]

- [135] 본 실시예에 따라, *Escherichia coli*를 숙주세포로 하여 *infA*를 사용하는 STAPL 시스템을 적용시키면 *infA* 발현량에 따라 PCN을 정교하게 정량적으로 조절할 수

있으므로, 배지에 값 비싼 항생제가 반드시 첨가되어야 한다는 기존의 문제점을 해결하여 효과적으로 PCN의 조절이 가능함을 확인하였다.

[136]

[137] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

청구범위

- [청구항 1] 합성 5' UTR(untranslated region), 프로모터, 조절 유전자를 포함하는, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조절 유전자는 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *Int*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*, *fusA*, *rpsJ*, *rplC*, *rplD*, *rplW*, *rplB*, *rpsS*, *rplV*, *rpsC*, *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *secY*, *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, *rplQ*, *fnt*, *def*, *yrdC*, *ubiA*, *plsB*, *lexA*, *dnaB*, *ssb*, *groS*, *groL*, *efp*, *psd*, *rsgA*, *orn*, *yjeE*, *rpsR*, *ppa*, *valS*, *yjgP*, *yjgQ*, *dnaC* 및 *dnaT*로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 1 내지 5로 표시되는 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 프로모터인, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 합성 5' UTR은 유전자를 저발현시키기 위한 것인, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 합성 5' UTR은 서열번호 54, 55, 56 및 59으로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 5' UTR인 것을 특징으로 하는, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 유전자 발현 카세트는 목적 유전자를 더 포함하는

- 것을 특징으로 하는, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 목적 유전자는 이타콘산 또는 라이코펜 생산 유전자인 것을 특징으로 하는, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 유전자 발현 카세트는 터미네이터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 터미네이터는 서열번호 53으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 10] 복제원점 및 제1항의 유전자 발현 카세트를 포함하는, 재조합 벡터.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 플라스미드는 세포당 1 내지 600 카피 수를 가지도록 하는 복제원점을 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 복제원점으로 CloDF-13 또는 PMB1을 포함하고, 조절 유전자로 *infA* 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 14] 제10항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 복제원점으로 CloE1을 포함하고, 조절 유전자로 *efp* 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 15] 제10항의 재조합 벡터가 도입된, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 제13항의 재조합 벡터 및 제14항의 재조합 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 재조합 벡터가 도입된 것을 특징으로 하는, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 재조합 벡터의 수를 안정적으로 유지할 수 있는 것을 특징으로 하는, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 염색체 상의 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*

, rplS, trmD, rpsP, ffh, grpE, yfjB, serV, csrA, alaS, ispF, ispD, ftsB, eno, pyrG, lgt, prfB, fbaA, pgk, metK, yqgF, plsC, parC, parE, ribB, cca, folB, ygjD, dnaG, rpoD, infB, nusA, leuU, glmM, ftsH, obgE, rpmA, rplU, ispB, murA, kdsC, yrbK, yhbN, yhbG, rpsI, rplM, degS, mreD, mreC, mreB, accB, accC, rpoC, rpoB, rplL, rplJ, nusG, secE, glyT, thrU, coaA, birA, murB, murI, priA, ftsN, yihA, polA, hemG, hemC, hemD, proM, hisR, argX, rho, trpT, glmU, glmS, yidC, rnpA, rpmH, dnaA, dnaN, gyrB, spoT, gmk, dut, dfp, rpmB, coaD, kdtA, gpsA, glyQ, glyS, ftsY, ftsE, ftsX, rpoH, asd, yrfF, trpS, rpsL, rpsG, fusA, rpsJ, rplC, rplD, rplW, rplB, rpsS, rplV, rpsC, rplP, rpmC, rpsQ, rplN, rplX, rplE, rpsN, rpsH, rplF, rplR, rpsE, rpmD, rplO, secY, rpsM, rpsK, rpsD, rpoA, rplQ, fmt, def, yrdC, ubiA, plsB, lexA, dnaB, ssb, groS, groL, efp, psd, rsgA, orn, yjeE, rpsR, ppa, valS, yjgP, yjgQ, dnaC 및 dnaT로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자가 제거된 것을 특징으로 하는, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물.

[청구항 19] 제10항의 재조합 벡터를 도입하는 단계; 를 포함하는, 분리 불안(segregational instability)이 개선된 재조합 미생물의 제조 방법.

[청구항 20] (a) 목적 플라스미드 카피 수에 따라 목적 전사량을 가지는 프로모터를 선택하는 단계;
 (b) 상기 (a) 단계에서 선택된 프로모터, 합성 5'UTR 및 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdB*, *mrdA*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmk*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*,

rpsG, fusA, rpsJ, rplC, rplD, rplW, rplB, rpsS, rplV, rpsC, rplP, rpmC, rpsQ, rplN, rplX, rplE, rpsN, rpsH, rplF, rplR, rpsE, rpmD, rplO, secY, rpsM, rpsK, rpsD, rpoA, rplQ, fmt, def, yrdC, ubiA, plsB, lexA, dnaB, ssb, groS, groL, efp, psd, rsgA, orn, yjeE, rpsR, ppa, valS, yjgP, yjgQ, dnaC 및 dnaT로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 제조하는 단계; 및

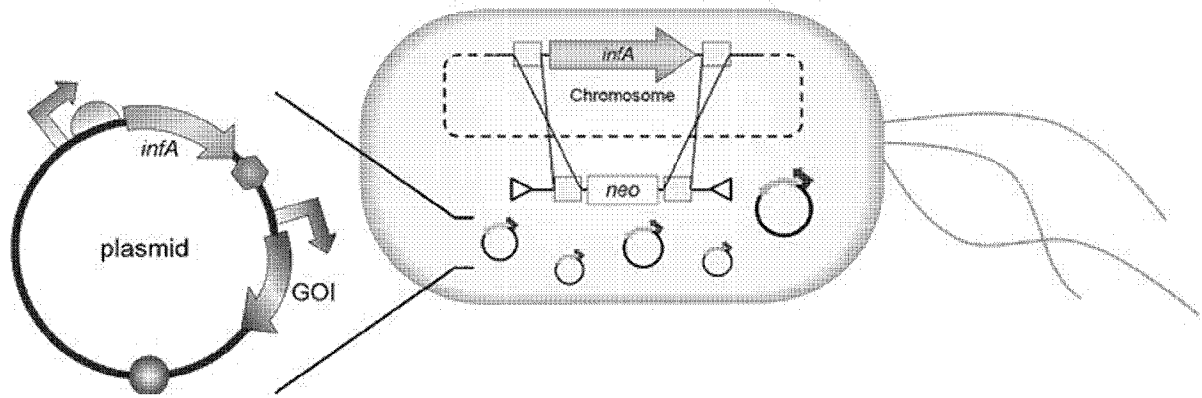
(c) 상기 (b) 단계에서 제조한 유전자 발현 카세트를 미생물에 도입하는 단계;를 포함하는 제조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법.

- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 유전자 발현 카세트는 목적 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법.
- [청구항 22] 제20항에 있어서, 상기 유전자 발현 카세트는 터미네이터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법.
- [청구항 23] 제20항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 1 내지 5로 표시되는 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 프로모터인, 제조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법.
- [청구항 24] 제20항에 있어서, 상기 제조합 미생물은 염색체 상의 *iiribF*, *ileS*, *lspA*, *ispH*, *dapB*, *folA*, *imp*, *ftsL*, *ftsI*, *murE*, *murF*, *mraY*, *murD*, *ftsW*, *murG*, *murC*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *lpxC*, *secM*, *secA*, *coaE*, *can*, *folK*, *hemL*, *yadR*, *dapD*, *map*, *rpsB*, *tsf*, *pyrH*, *frr*, *dxr*, *ispU*, *cdsA*, *yaeL*, *yaeT*, *lpxD*, *fabZ*, *lpxA*, *lpxB*, *dnaE*, *accA*, *tilS*, *proS*, *hemB*, *secD*, *secF*, *ribD*, *ribE*, *nusB*, *thiL*, *dxs*, *ispA*, *ffs*, *dnaX*, *adk*, *hemH*, *lpxH*, *cysS*, *folD*, *argU*, *mrdb*, *mrda*, *nadD*, *holA*, *rlpB*, *leuS*, *lnt*, *leuW*, *glnS*, *fldA*, *infA*, *ftsK*, *lolA*, *serS*, *rpsA*, *msbA*, *lpxK*, *kdsB*, *mukF*, *mukE*, *mukB*, *asnS*, *fabA*, *serT*, *mviN*, *rne*, *yceQ*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *tmk*, *holB*, *lolC*, *lolD*, *lolE*, *pth*, *prsA*, *ispE*, *lolB*, *hemA*, *prfA*, *prmC*, *kdsA*, *topA*, *ribA*, *fabI*, *tyrS*, *ribC*, *pheT*, *pheS*, *rplT*, *infC*, *thrS*, *nadE*, *gapA*, *yeaZ*, *aspS*, *argS*, *leuZ*, *cysT*, *pgsA*, *metG*, *folE*, *yejM*, *gyrA*, *nrdA*, *nrdB*, *folC*, *accD*, *fabB*, *gltX*, *ligA*, *zipA*, *dapE*, *dapA*, *hda*, *der*, *hisS*, *ispG*, *suhB*, *acpS*, *era*, *lepB*, *pssA*, *yfiO*, *rplS*, *trmD*, *rpsP*, *ffh*, *grpE*, *yfjB*, *serV*, *csrA*, *alaS*, *ispF*, *ispD*, *ftsB*, *eno*, *pyrG*, *lgt*, *prfB*, *fbaA*, *pgk*, *metK*, *yqgF*, *plsC*, *parC*, *parE*, *ribB*, *cca*, *folB*, *ygjD*, *dnaG*, *rpoD*, *infB*, *nusA*, *leuU*, *glmM*, *ftsH*, *obgE*, *rpmA*, *rplU*, *ispB*, *murA*, *kdsC*, *yrbK*, *yhbN*, *yhbG*, *rpsI*, *rplM*, *degS*, *mreD*, *mreC*, *mreB*, *accB*, *accC*, *rpoC*, *rpoB*, *rplL*, *rplJ*, *nusG*, *secE*, *glyT*, *thrU*, *coaA*, *birA*, *murB*, *murI*, *priA*, *ftsN*, *yihA*, *polA*, *hemG*, *hemC*, *hemD*, *proM*, *hisR*, *argX*, *rho*, *trpT*, *glmU*, *glmS*, *yidC*, *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *gyrB*, *spoT*, *gmK*, *dut*, *dfp*, *rpmB*, *coaD*, *kdtA*, *gpsA*, *glyQ*, *glyS*, *ftsY*, *ftsE*, *ftsX*, *rpoH*, *asd*, *yrfF*, *trpS*, *rpsL*, *rpsG*,

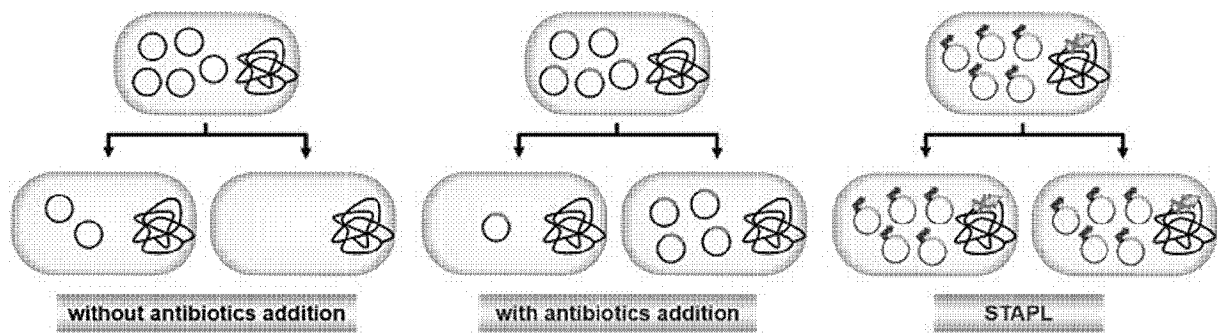
fusA, rpsJ, rplC, rplD, rplW, rplB, rpsS, rplV, rpsC, rplP, rpmC, rpsQ, rplN, rplX, rplE, rpsN, rpsH, rplF, rplR, rpsE, rpmD, rplO, secY, rpsM, rpsK, rpsD, rpoA, rplQ, fmt, def, yrdC, ubiA, plsB, lexA, dnaB, ssb, groS, groL, efp, psd, rsgA, orn, yjeE, rpsR, ppa, valS, yjgP, yjgQ, dnaC 및 dnaT로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 조절 유전자가 제거된 것을 특징으로 하는, 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법.

[청구항 25] 제20항에 있어서, 상기 재조합 미생물을 항생제 미포함 배지에서 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물 내 플라스미드 카피 수의 정량 조절 방법.

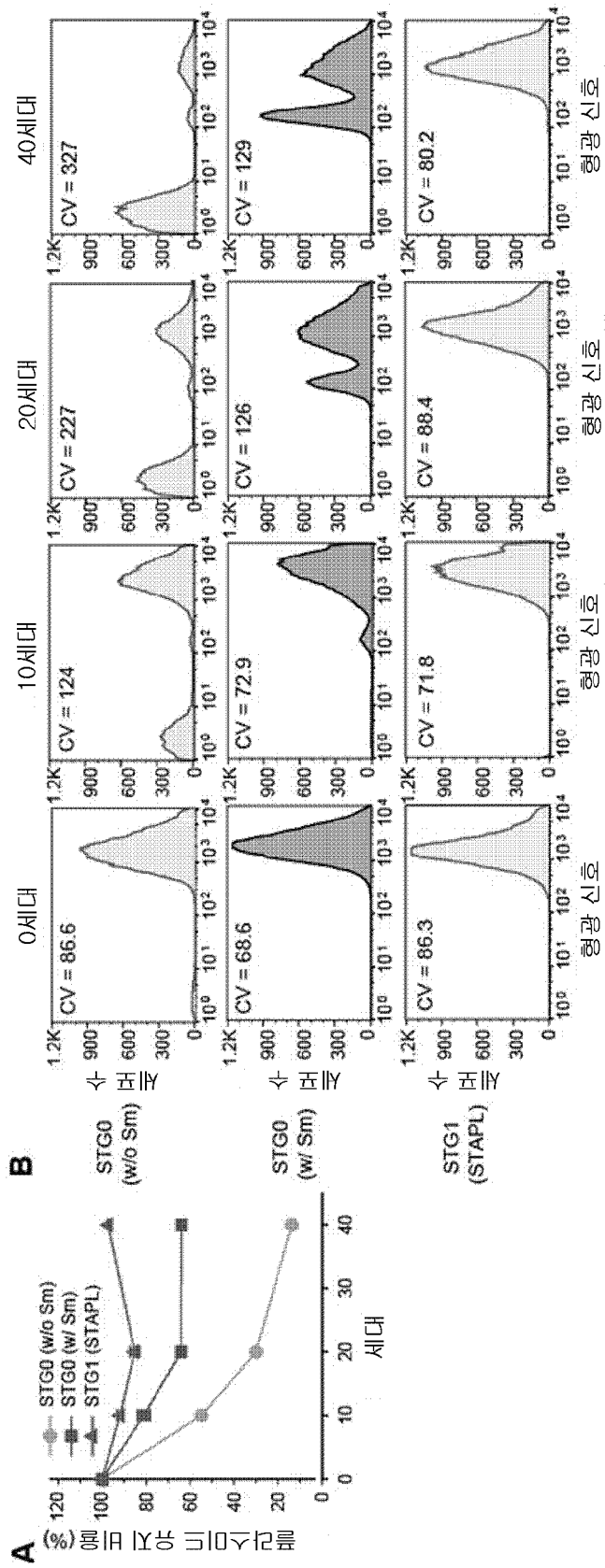
[도1]



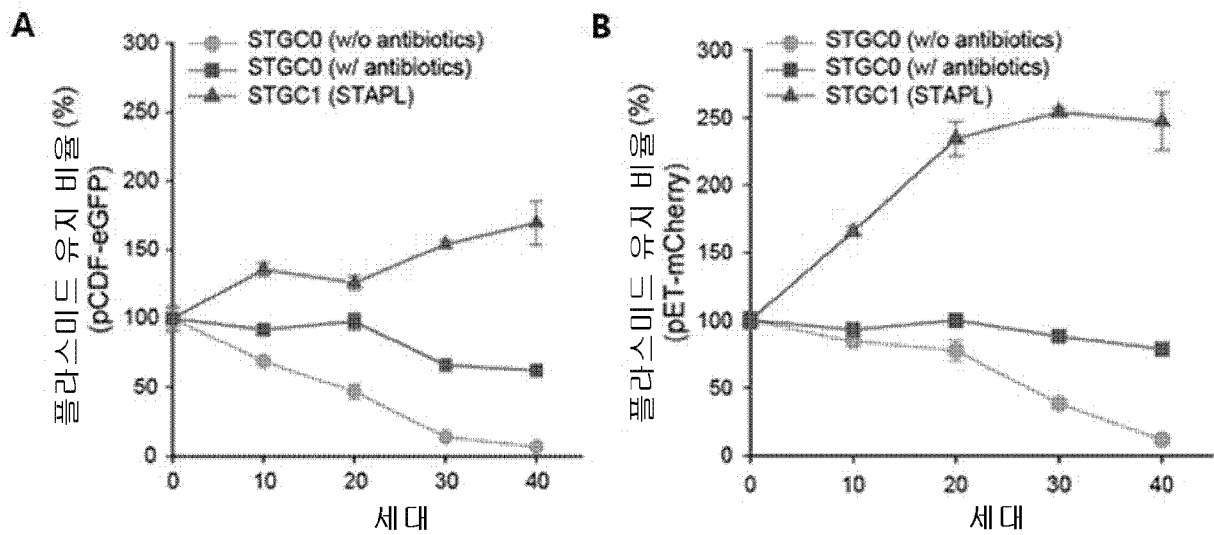
[도2]



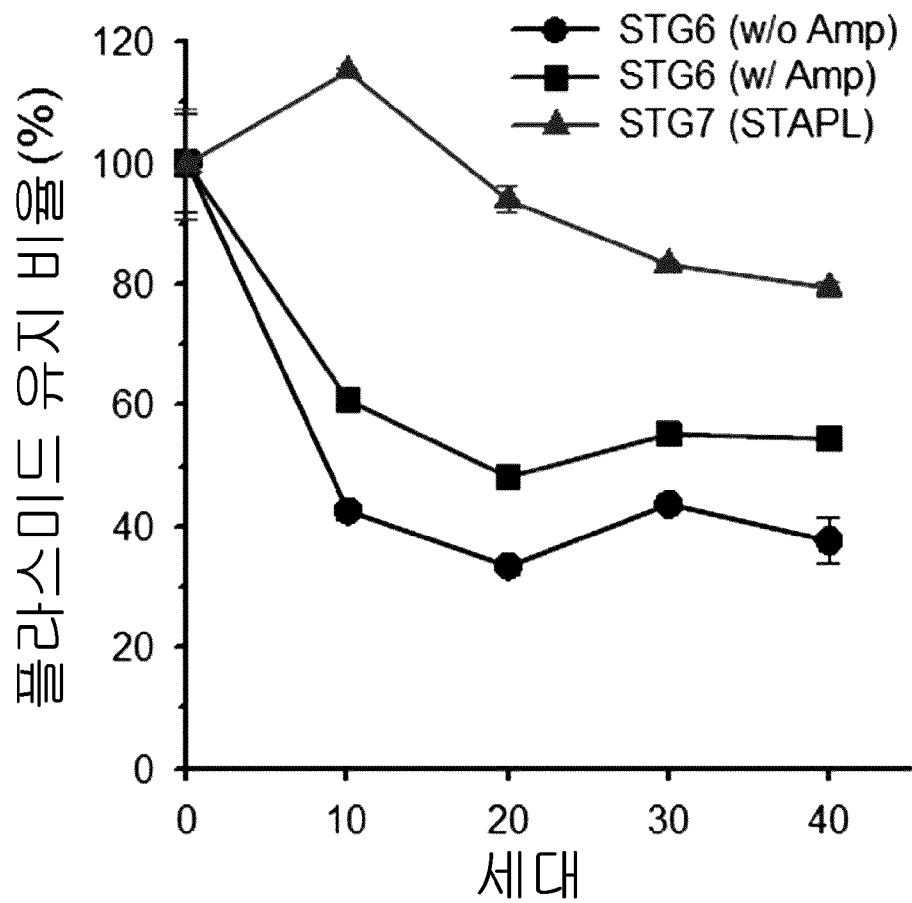
[도3]



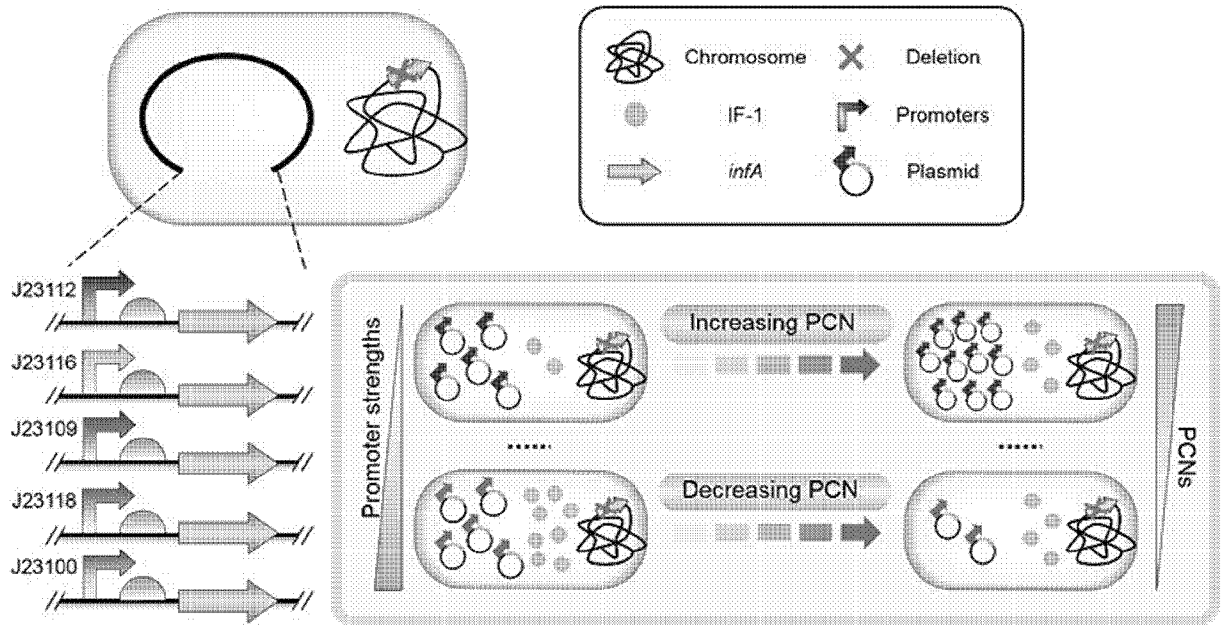
[도4]



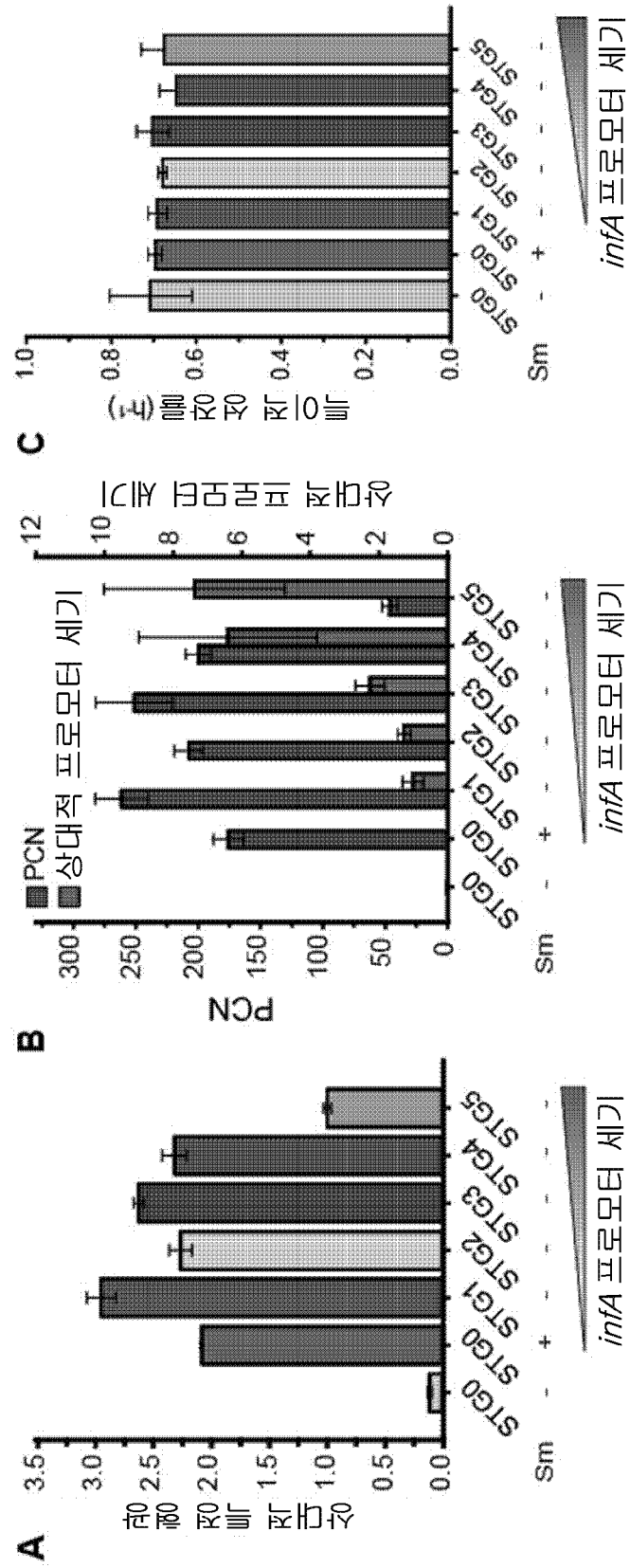
[도5]



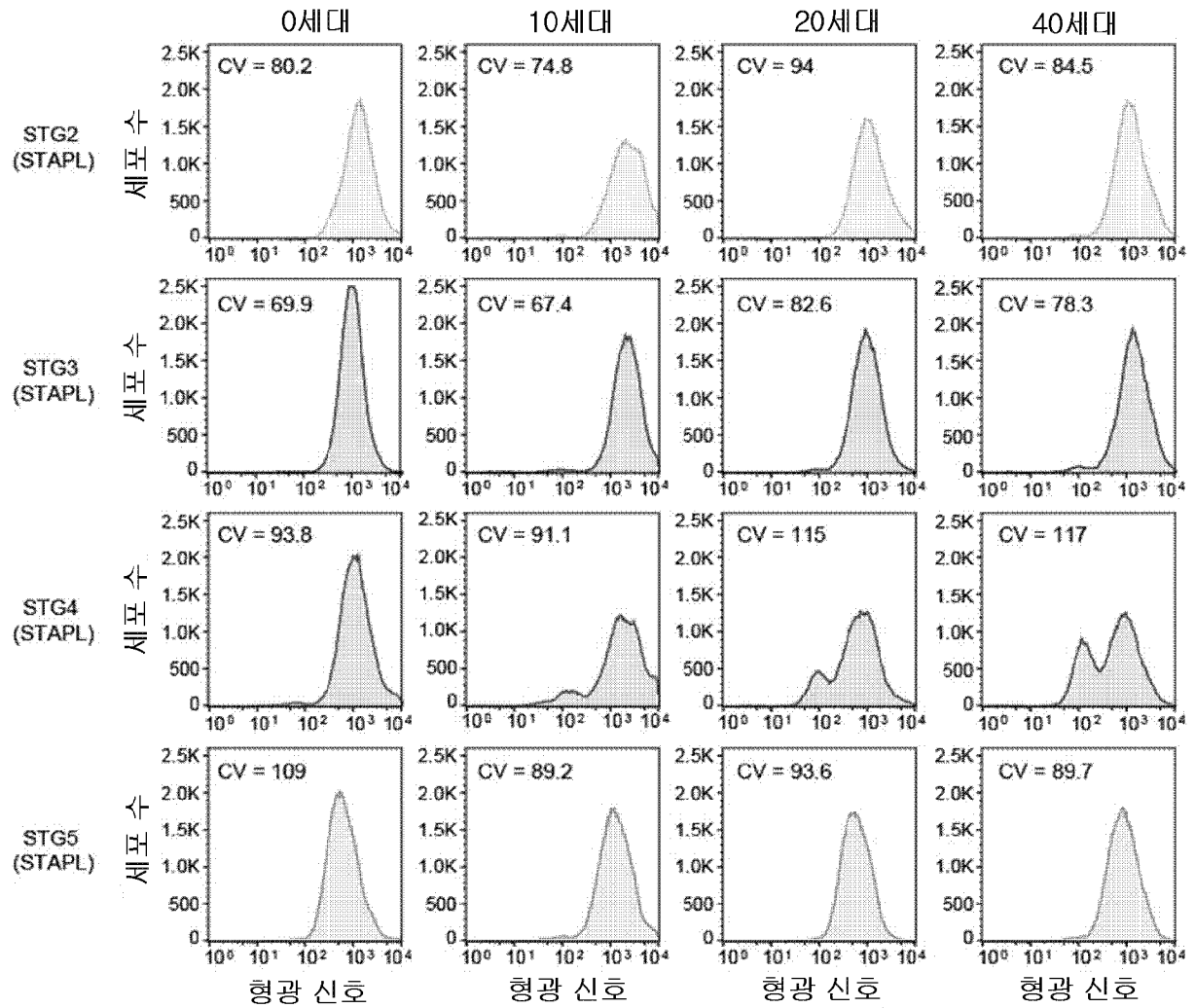
[도6]



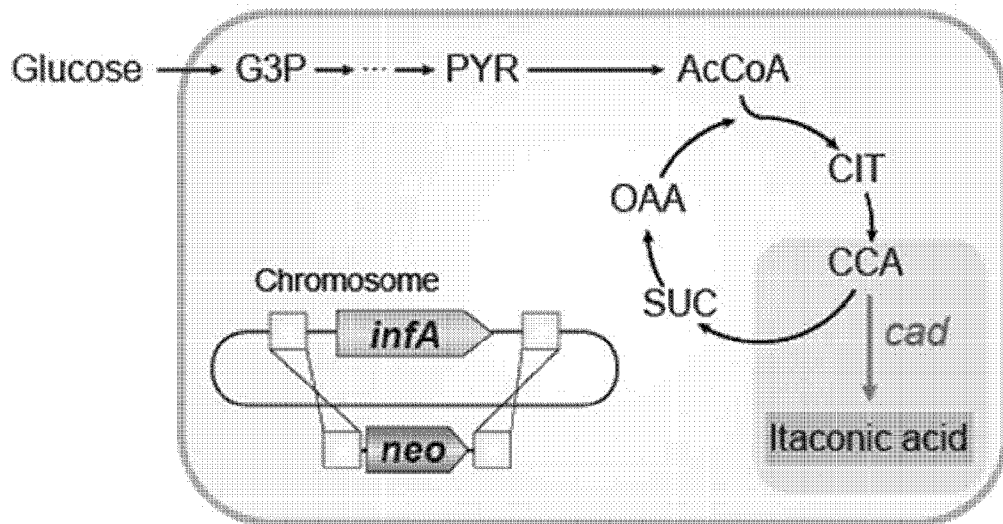
[도7]



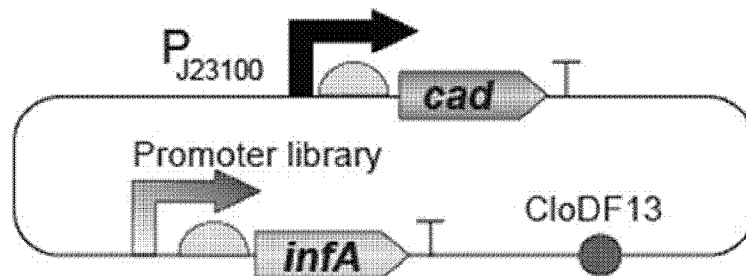
[도8]



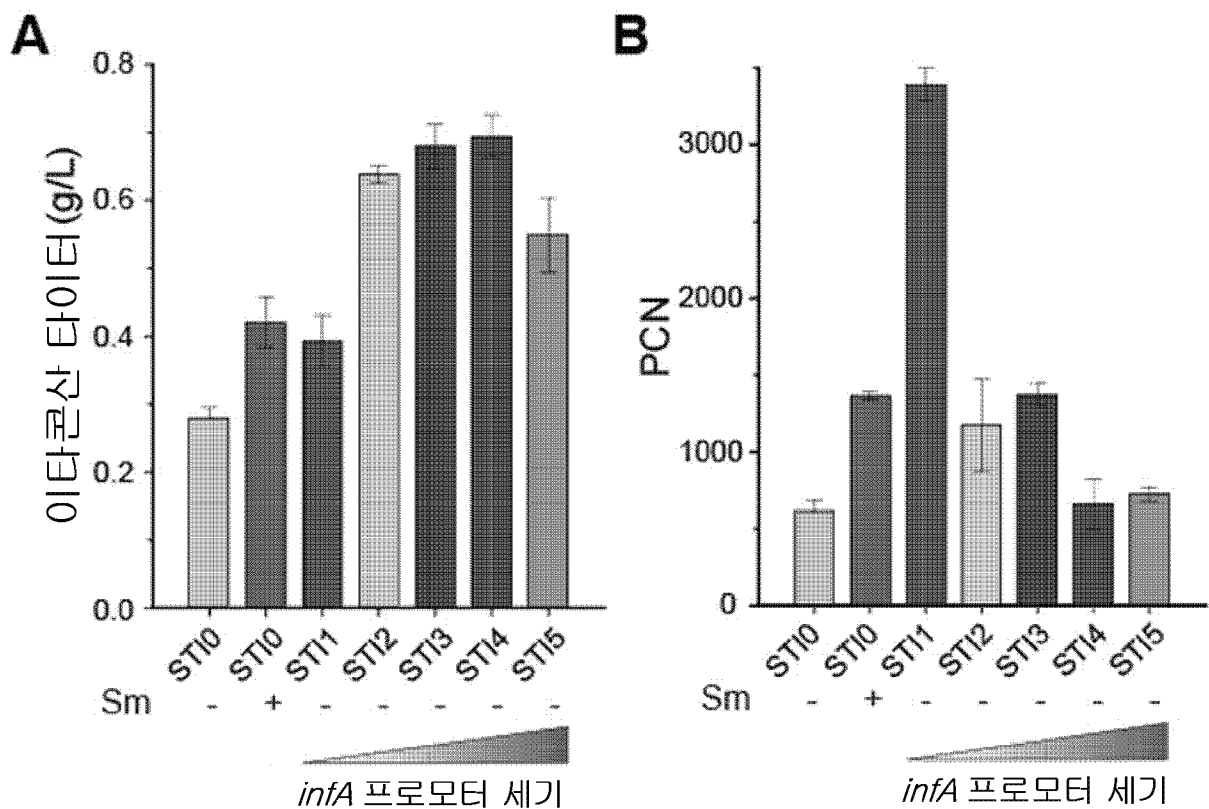
[도9]



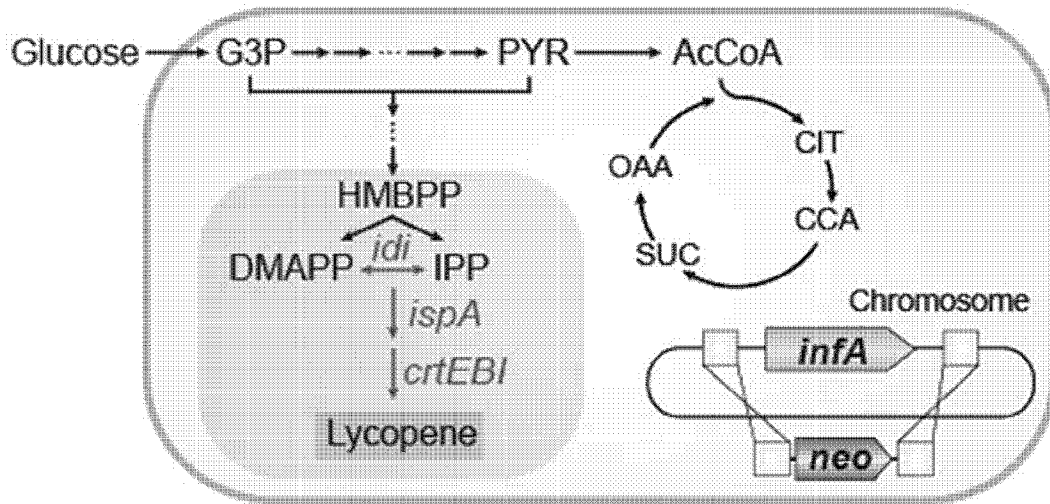
이타콘산 생산을 위한 플라스미드



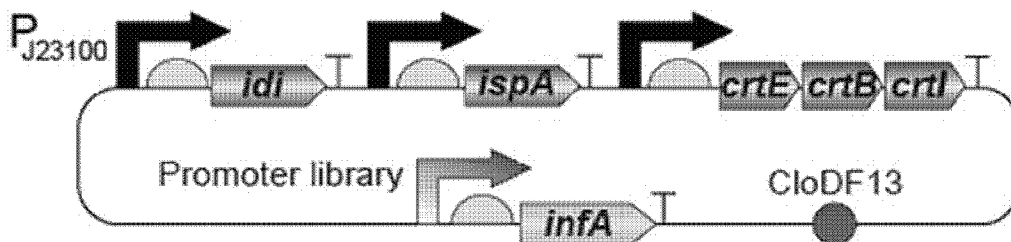
[도10]



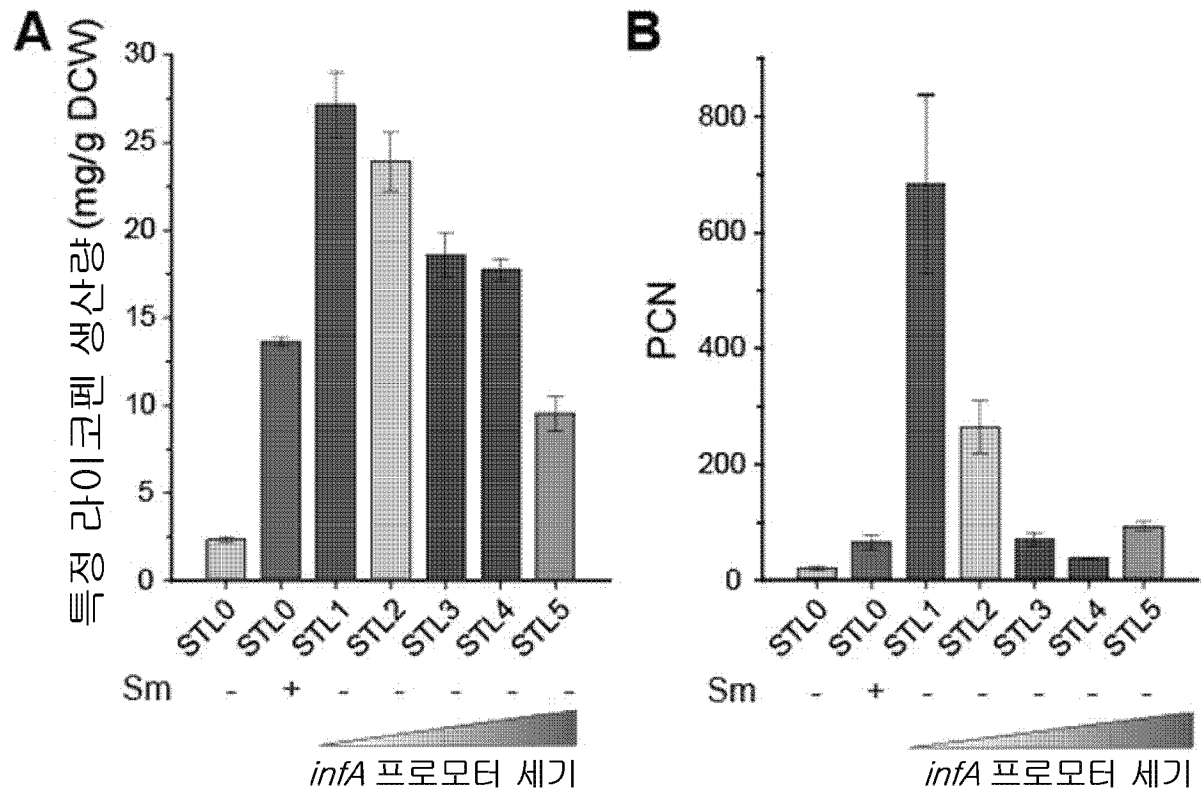
[도11]



라이코펜 생산을 위한 플라스미드



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/69(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 5/02(2006.01)i, C12P 7/46(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)

C12N 15/69; C12N 15/70; C12P 5/02; C12P 7/46

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: non-antibiotic plasmid, control gene, composite 5' UTR, promoter, gene expression cassette

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTINEZ-GARCIA, Esteban et al., "Mining Environmental Plasmids for Synthetic Biology Parts and Devices", Plasmids-Biology and Impact in Biotechnology and Discovery, Edited by TOLMASKY, Marcelo E. et al., American Society for Microbiology, 2015, Chapter 32, pages 633-649, doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0033-2014 See pages 634, 636-638, 640, 641; table 1 and figure 3.	1,2,4,6-8,10-14
Y		3,9,15-25
A		5
Y	NCBI GenBank: KX353597.1: Synthetic Plasmid pTig-PhiF, complete sequence (07 November 2016) See the entire document.	3,23
Y	NCBI GenBank: KM234321.1: Boolean Integrase Logic Vector NAND Gate BCD-RFP, complete sequence (08 June 2015) See the entire document.	9
Y	SELVAMANI, Ram Shankar Velur et al., "Antibiotic-free Segregational Plasmid Stabilization in Escherichia Coli owing to the Knockout of Triosephosphate Isomerase (tpiA).", Microbial Cell Factories, 2014, vol. 13, Article No: 58, inner pages 1-13 See abstract; and pages 2, 3, 9, 10.	15-25



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

27 JULY 2018 (27.07.2018)

Date of mailing of the international search report

30 JULY 2018 (30.07.2018)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004038

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU, S. et al., "Obtaining a Panel of Cascade Promoter-5'-UTR Complexes in Escherichia Coli", ACS Synthetic Biology, 2017 (Publication date: 02 March 2017), vol. 6, pages 1065-1075 See abstract; figures 1, 5, 6.	1,2,4,6,8,10-12
A	KANORIA, Shaveta et al., "A 28 nt Long Synthetic 5'UTR (synJ) as an Enhancer of Transgene Expression in Dicotyledonous Plants", BMC Biotechnology, 2012, vol. 12, Article No. 85, inner pages 1-14 See abstract; and pages 8-11.	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/004038

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/69(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C12P 5/02(2006.01)i, C12P 7/46(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/69; C12N 15/70; C12P 5/02; C12P 7/46

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: 무항생제 플라스미드, 조절 유전자, 합성 5' UTR, 프로모터, 유전자 발현 카세트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MARTINEZ-GARCIA, ESTEBAN 등, "Mining environmental plasmids for synthetic biology parts and devices", Plasmids-Biology and Impact in Biotechnology and Discovery, Edited by Tolmasky, Marcelo E. 등, American Society for Microbiology, 2015, Chapter 32, 페이지 633-649 doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0033-2014 페이지 634, 636-638, 640, 641; 표 1 및 도면 3 참조.	1,2,4,6-8,10-14
Y A		3,9,15-25 5
Y	NCBI GenBank: KX353597.1: Synthetic plasmid pTig-PhiF, complete sequence (2016.11.07) 전문 참조.	3,23
Y	NCBI GenBank: KM234321.1: Boolean integrase logic vector NAND gate BCD-RFP, complete sequence (2015.06.08) 전문 참조.	9
Y	SELVAMANI, RAM SHANKAR VELUR 등, "Antibiotic-free segregational plasmid stabilization in Escherichia coli owing to the knockout of triosephosphate isomerase (tpiA)", Microbial Cell Factories, 2014, 13권, Article No: 58, 내부 페이지 1-13 요약; 및 페이지 2, 3, 9, 10 참조.	15-25

☒ 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

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 07월 27일 (27.07.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 07월 30일 (30.07.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

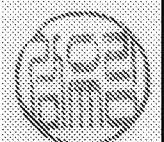
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ZHOU, S. 등. "Obtaining a Panel of Cascade Promoter-5' -UTR Complexes in Escherichia coli", ACS Synthetic Biology, 2017 (공개일: 2017.03.02.), 6권, 페이지 1065-1075 요약; 도면 1, 5, 6 참조.	1,2,4,6,8,10-12
A	KANORIA, SHAVETA 등, "A 28 nt long synthetic 5' UTR (synJ) as an enhancer of transgene expression in dicotyledonous plants", BMC Biotechnology, 2012, 12권, Article No. 85, 내부 페이지 1-14 요약; 및 페이지 8-11 참조.	1-25

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음