



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0090947
(43) 공개일자 2023년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12P 7/40 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0180175
(22) 출원일자 2021년12월15일
심사청구일자 2021년12월15일

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

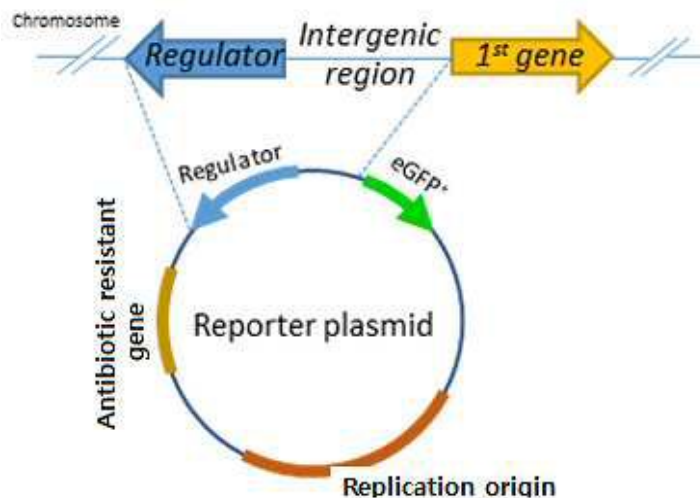
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 메틸로루브룸속 균주에서 탄소원 유도 발현이 가능한 발현 벡터 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템

(57) 요약

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

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 7/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131237
과제번호	2015M3D3A1A01064919
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	Non-acetogen 기반 CO 가스 이용 바이오폴리머 생산용 바이오촉매 및 원천기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재시 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 HpdR 전사인자는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 코딩되는 것인, 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 P_{hpdH} 프로모터는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것인, 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 메틸로루브룸속 균주는 *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium podarium*, *Methylobacterium pseudosasaiae*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Methylobacterium rhodinum*, *Methylobacterium salsuginis* 및 *Methylobacterium suomiense*에서 선택되는, 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터.

청구항 6

제1항의 벡터를 포함하는, 형질전환체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 형질전환체는 *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium podarium*, *Methylobacterium pseudosasaiae*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Methylobacterium rhodinum*, *Methylobacterium salsuginis* 및 *Methylobacterium suomiense*에서 선택되는, 형질전환체.

청구항 8

HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 메틸로루브룸속 균주를 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는, 유전자 발현 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 배양 단계에서 레불린산이 0.01 mM 내지 30 mM의 농도로 배지에 포함되는, 유전자 발현 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

배양 시간은 6시간 내지 48시간인, 유전자 발현 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메틸로루브룸속 균주에서 탄소원 유도 발현이 가능한 발현 벡터 및 이를 이용한 유전자 발현 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연료, 화학 물질 및 기타 부가가치 제품을 생산하기 위한 공급원료로서 단일 탄소(C1) 화합물과 미생물을 이용하는 것은 화석 연료의 고갈 및 환경 문제를 해결하기 위한 이상적인 전략으로 평가된다. 그 중 포름산염(formate) 및 메탄올(methanol)과 같은 환원된 단일 탄소(C1) 화합물을 비교적 저렴한 비용으로 합성할 수 있으며 다양한 산업에서 발생하는 풍부하므로, 지속 가능하고 친환경적인 미생물의 공급원료로 평가된다(Belkhelfa *et al.*, Front Microbiol. 2019 Jun 20;10:1313).

[0003] 한편, 메틸영양미생물 중 메틸영양 알파-프로테오박테리움인 *Methylobacterium extorquens* AM1은 포르메이트(C1) 및 메탄올(C1)과 같은 단일 탄소뿐만 아니라 아세테이트(C2), 피루브산(C3) 및 석시네이트(C4)와 같은 다중 탄소 화합물을 모두 사용할 수 있다. 또한, *M. extorquens*은 다양한 대사 모델 및 과발현, 녹아웃 및 트랜스포존 돌연변이 유발 등이 용이한 유전자 세트를 가지고 있어 생명공학적인 적용을 위한 매력적인 숙주로 평가받고 있다.

[0004] 그러나, 상기 *M. extorquens*의 유전자를 과발현 시키는데 사용되는 λ PL 및 λ PR 프로모터는 비활성 상태인 경우가 많으며, Plac 프로모터는 *M. extorquens*에서 약한 발현을 나타내므로 적합하지 않은 것으로 알려져 있다. 또한, *M. extorquens*의 유전자 발현에 사용된다 보고된 PmxAF, PcoxB, PfumC 및 Ptuf 프로모터 세트는 발현 시스템의 통제가 어려우며 이로 인해 구조적 불안정한 표적 단백질을 생산하므로, 세포에 유해하다는 문제가 있었다(Schada Von Borzyskowski *et al.*, ACS Synth Biol. 2015 Apr 17;4(4):430-43).

[0005] 따라서, *M. extorquens*에서도 화학적 유도제 없이 안정적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 시스템 또는 방법에 대한 개발이 필요한 실정이다. 또한, *M. extorquens*을 이용한 생합성 과정에서 이용되는 기질과 이를 통해 생산된 생산물에 대한 안정적인 유전자 발현 시스템은 미생물의 생합성을 이용하는 폭 넓은 분야의 산업에서 이용 가능하므로 지속적인 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Belkhelfa *et al.*, Front Microbiol. 2019 Jun 20;10:1313

(비특허문헌 0002) Schada Von Borzyskowski *et al.*, ACS Synth Biol. 2015 Apr 17;4(4):430-43

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 메틸로루브룸속 균주에서 안정적으로 유전자를 발현하는 방법에 대해 연구한 결과, 탄소원 기질을 유도제로 하는 유전자 발현 벡터 및 이를 메틸로루브룸속 균주에 도입시켜 유전자 발현이 안정적으로 증가하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재시 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터를 제공하는 것이다.

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

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은, HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 메틸로루브룸속 균주를 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는 유전자 발현 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체를 이용함으로써, 저비용의 탄소원 기질을 유도제로 하여 안정적이고 효율적으로 유전자를 발현시킬 수 있으며 상기 형질전환체를 배양하는 데 있어서 탄소원 기질의 농도를 조절함으로써 유전자 발현을 조절할 수 있다.

[0012] 따라서, 본 발명의 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체는 미생물을 이용한 생화학 내지 생물학적 물질 생산에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 탄소원 기질 유도성 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터의 모식도이다.

도 2는 메틸로루브룸속 균주의 탄소원 기질 유도성 유전자 발현 시스템과 IPTG 유도성 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 형광 강도 측정을 통해 비교한 것이다.

도 3은 HpdR/ P_{hpdH} 유전자 발현 시스템과 LacI/ $P_{\text{L}}/04$ 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량을 유세포 분석을 통해 비교한 것이다.

도 4는 레불린산(LA) 첨가 시간별 HpdR/ P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 발현량을 형광 강도 측정을 통해 확인한 것이다.

도 5는 레불린산 첨가 농도별 HpdR/ P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 발현량을 형광 강도 측정을 통해 확인한 것이다.

도 6은 레불린산 첨가 농도별 HpdR/ P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 발현량을 MHRH01의 세포 성장을 통해 확인한 것이다.

도 7은 첨가 농도별 HpdR/ P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 발현량을 유세포 분석을 통해 확인한 것이다.

도 8은 pMHRH-eGFP⁺ 벡터를 도입한 여러 *Methylobacterium* 균주(MHRH01, CM4, DM4, PA1, TK0001 및 ATCC55366)의 유전자 발현량을 형광 강도 측정을 통해 확인한 것이다.

도 9는 형질전환체 MHRH01의 레불린산(LA) 첨가 직후, 24 시간 후 및 48시간 후 LA 잔류량을 확인한 것이다.

도 10은 형질전환체 MHRH01 및 MPL04의 eGFP⁺ 발현량을 SDS-PAGE를 통해 확인한 것이다.

도 11은 형질전환체 MHRH01 및 MPL04이 생성한 GFP 단백질을 정량 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명의 일 측면은 HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재시 메틸로루브룸속 균주에서 발현 가능한 벡터를 제공한다.

[0016] 상기 HpdR 전사인자는 LysR 타입의 전사활성인자로서, 3-하이드록시프로피온산(3-HP)의 이화 작용을 조절할 수 있으며 3-HP가 HpdR에 결합함으로써, 하위 유전자(downstream gene)의 프로모터 서열과 RNA 중합효소의 결합을 유도할 수 있다. 본 발명의 하나의 태양에 따르면, 상기 HpdR 전사인자는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열

을 포함할 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 코딩될 수 있다.

- [0017] 상기 P_{hpdH} 프로모터는 HpdR 전사인자와 결합하는 염기서열이며, 구체적으로 HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자와 HpdR 전사인자가 조절하는 *hpdH* 유전자 사이에 존재할 수 있다. 본 발명의 하나의 태양에 따르면, 상기 P_{hpdH} 프로모터는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "전사인자"는 DNA의 특정 부위에 결합하여 유전자의 발현을 촉진하거나 억제하는 단백질을 의미한다. 특히, 전사인자는 DNA-결합 영역(DNA-binding domain, DBD)과 트랜스크립션 조절 영역(transcriptional regulation domain)을 갖는다.
- [0019] 본 발명의 용어 "프로모터"는 유전자의 기본 전사 및/또는 조절 전사에 필요한, 일반적으로 코딩 서열 바로 상류의 DNA 서열을 의미한다. 특히, 프로모터는 전사의 개시를 가능하게 하는 정보를 가지며, 일반적으로 전사 개시 시작 부위 및 중합효소 복합체에 대한 결합 부위를 갖는다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 염기서열은, 서열 목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 여기서, "실질적인 동일성"은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열로서 70% 이상의 상동성, 구체적으로 80% 이상의 상동성, 보다 더 구체적으로 90% 이상의 상동성을 갖는 서열이며, 이들 상동성 범위에 있는 염기서열도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석된다.
- [0021] 본 발명에 따르면, 상기 메틸로루브룸속 균주는 *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium podarium*, *Methylobacterium pseudosasaiae*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Methylobacterium rhodinum*, *Methylobacterium salsuginis* 또는 *Methylobacterium suomiense*일 수 있으며, 구체적으로, *Methylobacterium extorquens*일 수 있다. 더욱 구체적으로, 메틸로루브룸속 균주는 *Methylobacterium extorquens* M1, *Methylobacterium extorquens* CM4, *Methylobacterium extorquens* DM4, *Methylobacterium extorquens* PA1, *Methylobacterium extorquens* TK0001 및 *Methylobacterium extorquens* ATCC55366 균주일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 *Methylobacterium extorquens* AM1을 이용하였다.
- [0022] 본 발명의 용어 "발현 가능한 벡터(이하, 발현 벡터)"는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다.
- [0023] 상기 발현 벡터는 형질전환체에 의해서 발현되는 유전자 및 조절 서열로 구성되는 DNA 벡터로서, 오픈 리딩 프레임, 폴리아데닐화 부위를 포함하는 3' 비번역 영역을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 공지된 방법에 의하여 인위적으로 디자인된 재조합 발현 벡터일 수 있다.
- [0024] 상기 발현 벡터는 공지된 다양한 벡터를 사용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 발현 벡터로 pCM110_P_{mxaf}-Fdh1을 사용하였다.
- [0025] 본 발명의 다른 측면은, 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 용어 "형질전환체"는 외래의 유전물질을 포함하여 유전형질이 변화된 미생물과 같은 생물체를 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환체는 유전자 조작이 용이하며 다양한 발현 시스템에 적용될 수 있으며, 대량 배양에 이용될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따르면, 상기 형질전환체는 *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium podarium*, *Methylobacterium pseudosasaiae*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Methylobacterium rhodinum*, *Methylobacterium salsuginis* 또는 *Methylobacterium suomiense*일 수 있으며, 구체적으로, *Methylobacterium extorquens*일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 형질전환체는 *Methylobacterium extorquens* M1, *Methylobacterium extorquens* CM4, *Methylobacterium extorquens* DM4, *Methylobacterium extorquens* PA1, *Methylobacterium extorquens* TK0001 및 *Methylobacterium extorquens* ATCC55366 균주일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 *Methylobacterium extorquens* AM1을 이용하였다.
- [0028] 상기 발현 벡터는 형질전환 방법을 통해 미생물, 균주 내로 도입시킬 수 있다.
- [0029] 상기 형질전환시키는 방법으로는, 당해 분야에서 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated

transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 또는 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 전기침공법을 사용하였다.

[0030] 본 발명에 따르면 HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 메틸로루브룸속 균주를 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산 존재 하에 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 메틸로루브룸속 균주를 배양하는 단계는 균주를 MSM 배지에서 전-배양(pre-cultures)하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 균주를 리터당 1.62 g NH_4Cl , 0.2 g MgSO_4 , 2.21 g K_2HPO_4 , 1.25 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mg H_3BO_3 , 2.5 mg CaCl_2 , 0.4 mg of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and 4 g succinate를 포함하는 MSM 배지에서 전-배양하였다.

[0032] 본 발명의 또 다른 측면은, HpdR 전사인자를 코딩하는 유전자 및 P_{hpdH} 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 메틸로루브룸속 균주를 3-하이드록시프로피온산 또는 레불린산의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는, 유전자 발현 방법을 제공한다.

[0033] 상기 메틸로루브룸속 균주를 레불린산의 존재하에 배양하는 경우 레불린산은 0.01 mM 내지 50 mM, 0.01 mM 내지 45 mM, 0.01 mM 내지 40 mM, 0.01 mM 내지 35 mM 0.01 mM 내지 30 mM, 0.05mM 내지 25mM, 0.1mM 내지 20mM의 농도로 포함될 수 있으며, 구체적으로, 0.1 mM 내지 20 mM의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도 범위일 때, 최소한의 탄소원 기질을 사용하여 유전자를 최대로 발현시키는 것이 가능할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는, 레불린산 농도에 따른 메틸로루브룸속 균주의 유전자 발현을 확인하였다. 구체적으로, 레불린산을 0.1 에서 20 mM까지 농도를 증가시키에 따라 유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, 레불린산을 20 mM 이상으로 농도를 증가시키에 따라 형광 강도가 감소하는 것을 확인하였으며, 특히, 40, 50, 및 100 mM의 레불린산을 첨가할 때는 20 mM의 레불린산을 첨가할 때에 비해 각각 약10%, 28%, 및 68% 감소된 효율이 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 0.1 내지 20 mM의 농도를 첨가한 샘플들의 경우, 유전자 발현이 균일하게 유지됨을 확인하였다.

[0035] 상기 유전자 발현 방법에 있어 배양 시간은 1시간 내지 58시간, 2시간 내지 56시간, 3시간 내지 54시간, 4시간 내지 52시간, 5시간 내지 50시간, 또는 6시간 내지 48시간일 수 있으며, 바람직하게, 6시간 내지 48시간일 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0037] 참고예: 유전자 발현 시스템

[0038] 유전자 발현 시스템의 세부사항을 하기 표 1에 나타낸다. 또한, 표 2에 전사인자 및 프로모터의 유전자 서열정보를 나타낸다.

표 1

유전자 발현 시스템	플라스미드	공급원
HexR/ P_{zwf1}	pMHRZ_eGFP^+	<i>P. putida</i> KT2440
LvaR/ P_{lvaA}	pMLRL_eGFP^+	<i>P. putida</i> KT2440
HpdR/ P_{hpdH}	pMHRH_eGFP^+	<i>P. putida</i> KT2440
MmsR/ P_{mmsA}	pMMRM_eGFP^+	<i>P. putida</i> KT2440
XutR/ P_{xutA}	pMXRX_eGFP^+	<i>P. fluorescens</i> SBW25
<i>LacI</i> / P_{L04}	pMPL04_eGFP^+	Synthetic promoter

표 2

유전자	유전자 서열(5' - 3')	서열번호
HpdR	ctactcggctagcaactcgtttgttcggccgcgcacacccagcaggtagtcacacaccacccgcagggcgca cagacttgtgcagctcgccgggtgcagatccagtagctgcgtggatggtttctcccggcagcacgcgcacc agtgtcgggtcgtggcgggcatgtagtgggcagcacggcgatgccagccggcgccggcgccggttgcgtg ggcgatcacgctggtgcttcgaacaccacgttgggtactcggcagaaactgttgagaaacagcagttcctggc tgaacagcaaatcgtcaacgtagccgatccagctgtgccgggcccaggtcttcgcggtggcgagtgccggcgcg cggccaggtaggcctggctggcgtatagcggcagggcggttagtcggtgagtttgcgggtgatcagcagatcggc gttgggcccgtccagatggatgctgatttctgcctcgcggtttaggatgctgacgaagcgcggcaccgctacca attccacctccagccgggtagcgctcgaacaacgcgttcatgcgtggggtgaagaacatgatgccgatgcct tcggttaccgccagggcgaatcttgccagcgggggtgatggcctgggtgatttctcctgtgccagcagggcgac gttctccatggcttcggcatgcttgagcagggcttgaccgaggggggtcagctcgtaccctggcgatgttgca cgaacagcgcggtccccaggtctgctcgatgctctcgatatgccgggcccaggtgctgtgggtagtgtcagg cgcttggcggcggtcagcaagcggcgctgcgctgcaactcgaggaaaaccgcagatcatccagtcgaacat	2
P _{hpdH}	gcttgtcttattatggcagttcgttcggcctcttaacgggcatgccacaggtgcggtgaacacctgaaggt acgtgatccctgagctgcgggcgagccgtgaagaggtcggtacaggttgcccctgtgctaaaacgcacagcg gctgcgcgaatctcgtgttcatccagaaattactcactaagatggatcgggacaagaataaaaaacaggcg cgaggttgcac	3

제조예 1. HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 제조

HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제조하기 위해서, 먼저, *P. putida* KT2440 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하며 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트를 포함하는 pPROBE-eGFP⁺ 벡터(이하, pHRH_eGFP⁺)를 제조하였다(Sathesh-Prabu *et al.*, Scientific Reports, 2021, 11:18079).

이후, 상기 pHRH_eGFP⁺를 주형으로 하여 Q5TM DNA 중합효소(New England Biolabs, USA)를 이용해서 하기 표 3의 조건으로 PCR을 진행하였다. 이때, PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 4에 나타내었다.

표 3

PCR 단계	온도	시간
1단계	98℃	3 분
2단계	98℃	20 초
3단계	64.5℃(Ta)	20 초
4단계	72℃	49 초
5단계	72℃	5 분
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장		

표 4

프라이머	서열	서열번호
Pro-FP	tgcattcctgcaggtcgactctagacaggaattggggatcggaag	4
Pro-RP	gttagcagccctcgagtttggatccgtccaagctcagctaattaagc	5

상기 PCR을 통해 얻은 유전자 단편을 인서트 DNA로 사용하고, pCM110_P_{mxAF}_Fdh1 벡터를 *Xba*I/*Bam*HI 제한효소로 절단하여 백본 벡터로 사용하였다. 이때, 인서트 DNA와 백본 벡터의 라이게이션은 Gibson assembly cloning kit(New England Biolabs, USA)를 이용하여 수행하였다. 상기의 과정을 통해 제조된 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 pMHRH_eGFP⁺로 명명하였다.

제조예 2. HexR/P_{zwf1}, LvaR/P_{lvaA} 또는 MmsR/P_{mmsA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 제조

HexR/P_{zwf1}, LvaR/P_{lvaA} 또는 MmsR/P_{mmsA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제조하기 위해서, 먼저, *P. putida* KT2440 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하며 HexR/P_{zwf1}, LvaR/P_{lvaA} 또는 MmsR/P_{mmsA} 유전자 발현 카세트를 포

함하는 pPROBE-eGFP⁺ 벡터를 각각 제조하였다(Sathesh-Prabu *et al.*, Scientific Reports, 2021, 11:18079).

[0049] 이후, 상기 제조에 1과 동일한 방법 및 조건으로 PCR을 수행하였으며, 얻어진 DNA 단편을 인서트로 하여 pCM110_P_{mxnF}_Fdh1 벡터에 각각 클로닝하였다. 상기 과정을 통해 제조된 HexR/P_{zwf1} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터는 pMHRZ_eGFP⁺, LvaR/P_{lvaA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터는 pMLRL_eGFP⁺, 그리고 MmsR/P_{mmsA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터는 pMMRM_eGFP⁺로 각각 명명하였다.

[0050] 제조예 3. XutR/P_{xutA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 제조

[0051] XutR/P_{xutA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 제조하기 위해서, 먼저, *P. fluorescens* SBW25 균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 XutR/P_{xutA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 pPROBE-eGFP⁺ 벡터를 제조하였다(Sathesh-Prabu *et al.*, Scientific Reports, 2021, 11:18079).

[0052] 이후, 상기 제조에 1과 동일한 방법 및 조건으로 PCR을 수행하였으며, 얻어진 DNA 단편을 인서트로 하여 pCM110_P_{mxnF}_Fdh1 벡터에 클로닝하였다. 상기 과정을 통해 제조된 XutR/P_{xutA} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터를 pMXRX_eGFP⁺로 명명하였다.

[0053] 제조예 4. LacI/P_{L/04} 유전자 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터 제조

[0054] *E. coli* MG1655균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여 LacI/P_{L/04} 유전자 발현 카세트를 포함하는 pCM110 플라스미드의 제조는 ACS Synth. Biol. 8, 2451-2456. doi:10.1021/acssynbio.9b00220.를 참고하였다.

[0055] 구체적으로, *E. coli* MG1655균주의 게놈 DNA를 주형으로 하여, LacI 전사인자를 코딩하는 유전자 및 이에 결합하는 P_{L/04} 프로모터를 포함하는 영역을 Q5TM DNA 중합효소(New England Biolabs, USA), PL04-FP 및 PL04-RP 프라이머를 이용하여 하기 표 5의 조건으로 1차 PCR을 수행하였다. 이후, 제조된 1차 PCR 단편을 주형으로 PL04-FP 및 PL04-RP2 프라이머를 이용하여 하기 표 5의 조건으로 2차 PCR을 수행하였으며, PL04 promoter 단편을 제작하였다. 이때, PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 6에 나타내었다.

표 5

PCR 단계	온도	시간
1단계	98℃	3 분
2단계	98℃	20 초
3단계	58℃	20 초
4단계	72℃	45 초
5단계	72℃	5 분
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장		

표 6

프라이머	서열	서열번호
PL04-FP	cgtttccaccgaattagcttgcattgcctgcaggtcgactctagatcactgcccgtttccagtcggg	6
PL04-RP	tcttgctgatgtgctcagtatcattgttatccgctcacatgtcaacaccgcagagataatttatcgcatgcaccattccttgcggcggc	7
PL04-RP2	caactcagcttcttttcgggctttgttagcagccggatccgtcagtcgctcctgctgatgtgctcagtatcattg	8

[0058] 상기 PCR을 통해 얻은 유전자 단편을 인서트 DNA로 사용하고, pCM110 벡터를 제한효소로 절단하여 백본 벡터로 사용하였다. 이때, 인서트 DNA와 백본 벡터의 라이게이션은 Gibson assembly cloning kit(New England Biolabs, USA)를 이용하여 수행하였다. 상기의 과정을 통해 제조된 LacI/P_{L/04} 유전자 발현 카세트를 포함하는 pCM110 벡터를 pCM110_P_{L/04}로 명명하였다.

[0059] 이후, 상기 pCM110_P_{L/04}를 주형으로 하여 Q5TM DNA 중합효소(New England Biolabs, USA)를 이용해서 하기 표 7의 조건으로 PCR을 진행하였다. 이때, PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 8에 나타내었다.

표 7

PCR 단계	온도	시간
1단계	98℃	3 분
2단계	98℃	20 초
3단계	64.5℃(Ta)	20 초
4단계	72℃	36 초
5단계	72℃	5 분
1단계: 초기 변성, 2단계: 변성, 3단계: 결합, 4단계: 신장, 5단계: 최종 연장		

표 8

프라이머	서열	서열번호
LacI/P _{L/04} -FP	cgtttccaccgaattagcttgcctgcctgcagtcgactctagatcactgcccgtttccagtcggg	9
LacI/P _{L/04} -RP	cgacggatccatgtatatctcttcttaaagttaaacaaagtcag	10

[0062] 상기 PCR을 통해 얻은 유전자 단편을 인서트 DNA로 사용하고, pCM110_P_{mxaf}-Fdh1 벡터를 제한효소로 절단하여 백본 벡터로 사용하였다. 이때, 인서트 DNA와 백본 벡터의 라이게이션은 Gibson assembly cloning kit(New England Biolabs, USA)를 이용하여 수행하였다. 상기의 과정을 통해 제조된 LacI/P_{L/04} 유전자 발현 카세트를 포함하는 pCM110_P_{mxaf}-Fdh1 벡터를 pMPL04_eGFP⁺로 명명하였다.

[0063] **제조예 5. 유전자 발현 카세트를 포함하는 형질전환체(MHRH01, MRHZ01, MLRL01, MMRM01, MXRX01 및 MPL04) 제조**

[0064] 상기 제조예 1 내지 4에서 제조된 유전자 발현 카세트를 각각 포함하는 발현 벡터를 *Methylobacterium extorquens* AM1(이하, *M. extorquens* AM1)에 도입하여 형질전환체를 제조하였다.

[0065] 구체적으로, *M. extorquens* AM1를 MSM(minimal salt medium)배지에 분주한 후, 인큐베이터 진탕기에서 넣어 200 rpm, 30℃ 조건에서 교반하면서 배양하였다. 이때, MSM배지는 리터당 1.62 g NH₄Cl, 0.2 g MgSO₄, 2.21 g K₂HPO₄, 1.25 g NaH₂PO₄·2H₂O, 15 mg Na₂EDTA·2H₂O, 4.5 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.3 mg CoCl₂·6H₂O, 1 mg MnCl₂·4H₂O, 1 mg H₃BO₃, 2.5 mg CaCl₂, 0.4 mg of Na₂MoO₄·2H₂O, 3 mg FeSO₄·7H₂O, 0.3 mg CuSO₄·5H₂O, and 4 g succinate를 포함하였다.

[0066] 이후, MicroPulser 전기천공기(Bio-Rad, USA)를 사용하여 1.8 kV, 0.1 cm 큐벳 간격(cuvette gap)의 조건에서 배양된 *M. extorquens* AM1를 발현 벡터로 각각 형질전환시켰다.

[0067] *M. extorquens* AM1 균주에 HpdR/P_{hpdH}, HexR/P_{zwf1}, LvaR/P_{lvaA}, MmsR/P_{mmsA}, XutR/P_{xutA} 또는 LacI/P_{L/04}를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 MHRH01, MRHZ01, MLRL01, MMRM01, MXRX01 및 MPL04로 각각 명명하였다.

[0068] **실시예 1. 형질전환체를 이용한 각 유전자 발현 시스템의 유전자 발현량 확인**

[0069] 상기 제조예 5에서 제조한 각각의 형질전환체를 이용하여 각 유전자 발현 시스템별 유전자 발현량을 비교 분석하였다.

[0070] 먼저, 상기 제조예 5에서 제조한 각각의 형질전환체를 MSM 배지에 넣어 late exponential phase에 도달할 때까지 전-배양(pre-cultures) 한 후, 5 ml의 MSM 배지에 다시 계대배양하여 12시간 동안 배양하였다. 이후, OD₆₀₀ 값이 0.5 내지 0.7에 도달하면 각 유전자 발현 시스템의 유도체인 포도당(MRHZ01), 자일로스(MXRX01), 레불린산 또는 3-하이드록시프로피온산(MHRH01, MLRL01 및 MMRM01)를 10 mM 농도로 처리하였으며, IPTG(MPL04)를 1 mM의 농도로 처리하였다. 그 후, 각 유도체가 처리된 형질전환체를 24시간 더 배양한 후, 180 μl씩 수집하여 바닥 Corning 96-웰 플레이트(bottom Corning 96-well plate)에 접종하였으며, Infinite F200 PRO 형광 판독기

(Tecan, Austria)를 사용하여 GFP 형광 강도를 측정하였다.

[0071] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템들이 대조군에 비해 3HP(3-하이드록시프로피온산) 또는 LA(레볼린산)으로 유도된 경우 유의적으로 증가된 형광 강도($P < 0.05$) 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한, LA로 유도된 HpdR/P_{hpdH}의 형광 강도는 HpdR/P_{hpdH}의 공지된 유도제인 3HP로 유도된 HpdR/P_{hpdH}의 형광 강도와 유사한 수준이었으며, LA로 유도된 HpdR/P_{hpdH}(MHRH01)는 IPTG(1 mM)로 유도된 LacI/P_{L/04} 대비 94% 효율을 달성하였음을 확인하였다.

[0072] 이어서, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템과 LacI/P_{L/04} 유전자 발현 시스템을 FACS를 이용하여 비교 분석하였다.

[0073] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 효율이 LacI/P_{L/04} 유전자 발현 시스템의 효율과 유사하다는 것을 확인하였다. 또한, 비-유도 조건에서는 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템이 LacI/P_{L/04} 유전자 발현 시스템 비해 적어도 3배는 적게 누설되는 것을 확인하였다.

[0074] 이를 통해, 3HP 또는 LA을 유도제로 하는 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템은 *M. extorquens* AM1 균주내에서 안정적으로 발현하며, LacI/P_{L/04} 유전자 발현 시스템과 유사한 수준의 효율을 가진다는 것을 확인하였다.

[0075] 실시예 2. HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 레볼린산 첨가 시간 최적화

[0076] HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 LA 유도를 위한 최적 시간을 측정하기 위해, 상기 형질전환체 MHRH01를 실시예 1와 같은 방법으로 배양하여 배양물을 제조한 후에, 초기 접종(OD₆₀₀ $\approx$ 0.1)으로부터 6 시간 간격으로 24 시간까지 10 mM의 LA를 첨가하였으며, GFP 형광 강도를 측정하기 위해 샘플들을 48 시간까지 6 시간 마다 수거하였다. 이후, LA 첨가후 0, 24, 및 48 시간 후의 배양 배지로부터 수득한 샘플의 LA 잔류 농도를 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 측정하였다. 이때, 이동상으로 25 mM 암모늄 포메이트(pH 2.0)를 사용하였으며, 1 mL/분의 유량으로 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m의 조르박스(Zorbax) SB-Aq 컬럼(에이질런트(Agilent), 미국)을 이용하여 용출시켰다.

[0077] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템은 다양한 LA 첨가 시점에서 eGFP⁺의 발현에 유의적인 차이 ($P > 0.05$)를 나타내지 않는 것을 확인하였다.

[0078] 이를 통해, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 발현에 있어 LA 첨가 시점은 크게 상관이 없다는 것을 확인하였으며, 이는 초기 성장기 또는 지수 성장기 동안에도 LA의 첨가가 가능하여 유도제가 최적 세포 밀도에서 첨가되도록 하기 위해 세포 성장을 계속 모니터링할 필요가 없다는 것을 나타낸다.

[0079] 실시예 3. HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 레볼린산 첨가 농도 최적화

[0080] HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 LA 유도를 위한 최적 농도를 측정하기 위해, 상기 형질전환체 MHRH01을 실시예 1와 같은 방법으로 배양하여 배양물을 제조한 후에, 다양한 농도(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 40, 50, 및 100 mM)의 LA를 배양 시작 시에(0 h) 단일 용량으로 첨가하였다. 이후, LA 첨가후 12 내지 24 시간후에 각 샘플들을 수거하여 GFP 형광 강도를 측정하였다.

[0081] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 형광 강도는 LA를 20 mM까지 농도를 증가시키에 따라 증가하는 것을 확인하였으며, 저농도의 LA(0.1 mM)에 의해서도 형광이 발현함을 확인하였다. 다만, LA의 농도가 20 mM를 초과하여 사용하는 경우 형광 강도가 오히려 감소하는 것을 확인하였으며, 40, 50, 및 100 mM의 LA에서는 20 mM의 LA에 비해 각각 약10%, 28%, 및 68% 감소된 효율이 나타내는 것을 확인하였다.

[0082] 이어서, 각 샘플들을 수거하여 세포 성장을 측정하였으며, 이때, 바이오크롬 라이브라S22 분광광도계(Biochrom, 영국)를 사용하여 세포 밀도를 모니터링하였다.

[0083] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, LA의 농도를 20 mM를 초과하여 사용함에 따라 세포 성장이 감소하는 것을 확인하였으며, 50 mM의 LA에서는 세포 성장이 최대 1.5배 감소된다는 것을 확인하였다.

[0084] 또한, 각 샘플들을 수거하여 유세포 분석하였다.

[0085] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, LA를 0.1 내지 20 mM의 농도를 첨가한 샘플들의 경우, 모두 유사한 수준의

발현을 나타냄을 확인하였다.

[0086] 이를 통해, HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템은 용량-의존적으로 발현하며, 유도체인 LA의 농도가 0.1 내지 20 mM 범위일 때, 최적의 효율을 나타내는 것을 확인하였다.

[0087] **실시예 4. HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 균주 무관성 확인**

[0088] HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 균주 무관성을 확인하기 위해 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템을 포함하는 발현 벡터 pMHRH_eGFP⁺를 CM4(KCTC 32005), DM4(DSM 6343), PA1(DSM 23939), TK0001(DSM1337) 및 ATCC55366과 같은 메틸로루브룸(*Methylobacterium extorquens*) 균주에 형질전환시켰으며, 이를 CM4HRH01, DM4HRH01, PA1HRH01, TK01HRH01 및 AT66HRH01로 각각 명명하였다.

[0089] 각 형질전환체를 상기 실시예 1과 같은 방법으로 배양하여 배양물을 제조한 후에, 10 mM의 LA를 배양 시작 시에 (0 h) 첨가하였다. 이후, 각 샘플들을 수거하여 GFP 형광 강도를 측정하였다.

[0090] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 이들 균주에서도 MHRH01에서 관찰된 수준과 유사한 발현을 나타내는 것을 확인하였으며, 이를 통해 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템이 메틸로루브룸속의 다양한 균주에서 균등한 발현 수준을 나타냈고 이러한 균주들에 광범위하게 적용될 수 있음을 확인하였다.

[0091] **실시예 5. 형질전환체 MHRH01의 레블린산 잔류 농도 확인**

[0092] 형질전환체 MHRH01의 LA 잔류 농도를 측정하기 위해, 형질전환체 MHRH01를 실시예 1과 같은 방법으로 배양하여 배양물을 제조한 후에, 10 mM의 LA를 배양 시작 시에(0 h) 첨가하였다. 이후, LA 첨가 직후, 24 시간후 및 48 시간후에 각 샘플들을 수거하여 LA 잔류 농도를 측정하였다.

[0093] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 세포 성장에 따른 흡광도(OD₆₀₀)는 LA 첨가 직후(0 h)에 0.125에서 LA 첨가 48 시간후 1.94로 증가하였으나, LA의 잔류 농도는 거의 변함이 없는 것을 확인하였다.

[0094] 이를 통해, 형질전환체 MHRH01는 충분히 성장한 후에도, 유도체인 LA를 과도하게 소비하지 않는다는 것을 확인하였다.

[0095] **실시예 6. 형질전환체 MHRH01의 eGFP 단백질 생성 효율 확인**

[0096] GFP 단백질을 생성하기 위해 제작된 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 효율을 확인하기 위하여, 형질전환체 MHRH01를 실시예 1과 같은 방법으로 배양하여 배양물을 제조한 후에, 10 mM의 LA를 첨가하여 eGFP⁺의 발현을 유도하였으며 24 시간 후에 세포를 수확하였다. 또한, 대조군으로서 형질전환체 MPL04를 MSM 배지에서 배양한 후, 1 mM의 IPTG를 첨가하여 eGFP⁺의 발현을 유도하였으며 24 시간 후에 세포를 수확하였다. 이후, 수확한 각 세포를 50 mM의 MOPS 및 10 mM의 이미다졸을 포함하는 ice-cold 세포 용해 완충액에 재현탁시키고, VCX130 초음파 처리기(Sonics, 미국)를 사용하여 35% 진폭으로 6분 동안 초음파 처리하여 세포 용해물을 제조하였다. 소혈청 알부민(BSA)을 함유한 브래드포드(Bradford) 분석 시약을 사용하여 단백질 농도를 먼저 측정하였다. 이어서, 세포 용해물을 SDS-PAGE 완충액에 희석시키고, 웰 당 5 µg를 15% 폴리아크릴아미드 겔 상에 부과하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 생성된 단백질 밴드를 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) R-250으로 염색하여 가시화하였다. 각 샘플의 eGFP⁺ 농도는 이미 농도를 알고 있는 정제된 GFP(Abcam, 미국)의 선형 관계에 기반하여 제조사의 프로토콜에 따라 계산하였다.

[0097] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, LA으로 유도된 형질전환체 MHRH01가 IPTG로 유도된 형질전환체 MPL04와 마찬가지로 eGFP⁺(27 kDa)을 강하게 발현하며(w/LA 라인), LA의 부재하에서는 eGFP⁺ 단백질을 거의 생성하지 않는 것을 확인하였다(w/o 라인).

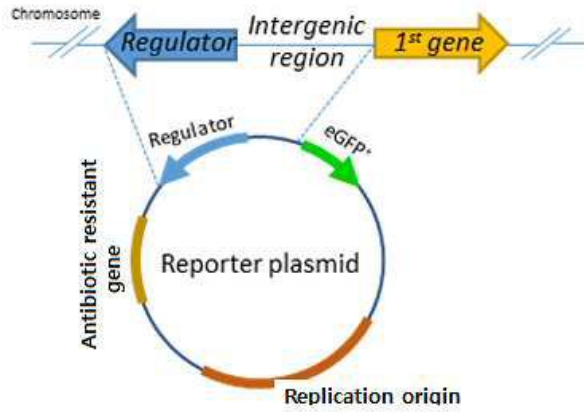
[0098] 이어서, 각 세포 용해물을 수거하여 각 형질전환체가 생성한 GFP의 농도를 측정하였다.

[0099] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, MHRH01는 42 mg/g의 바이오매스(건조 세포 중량)로 총 단백질의 약 10%에 해당하는 GFP를 생성하였으며, 이는 46 mg/g의 바이오매스(건조 세포 중량)로 총 단백질의 약 11%에 해당하는 GFP를 생성한 MPL04와 유사한 수준임을 확인하였다.

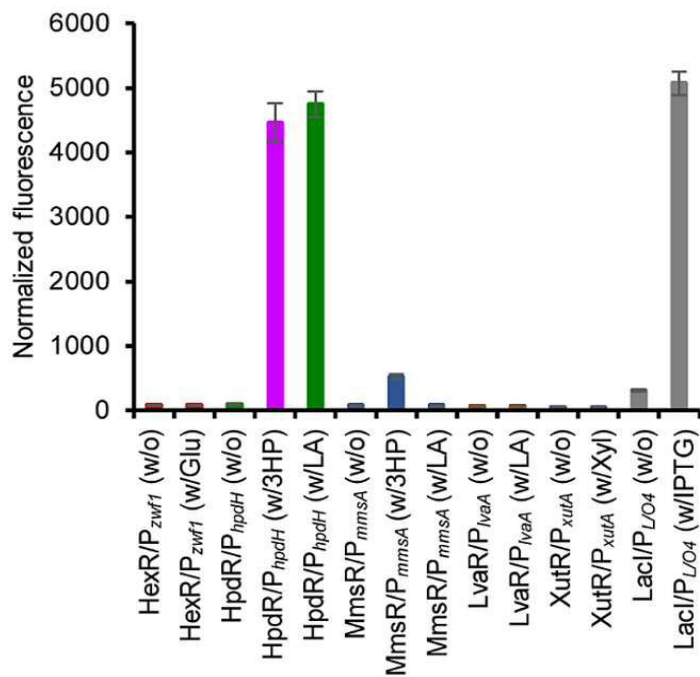
[0100] 이를 통해, LA-유도성 HpdR/P_{hpdH} 유전자 발현 시스템의 효율은 IPTG-유도성 LacI/P_{L/O4} 유전자 발현 시스템과 동등한 수준임을 확인하였다(90%) ($P > 0.05$).

도면

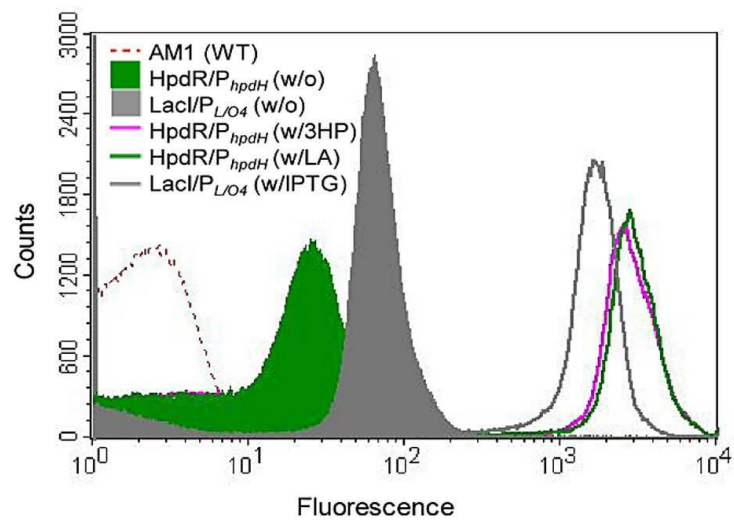
도면1



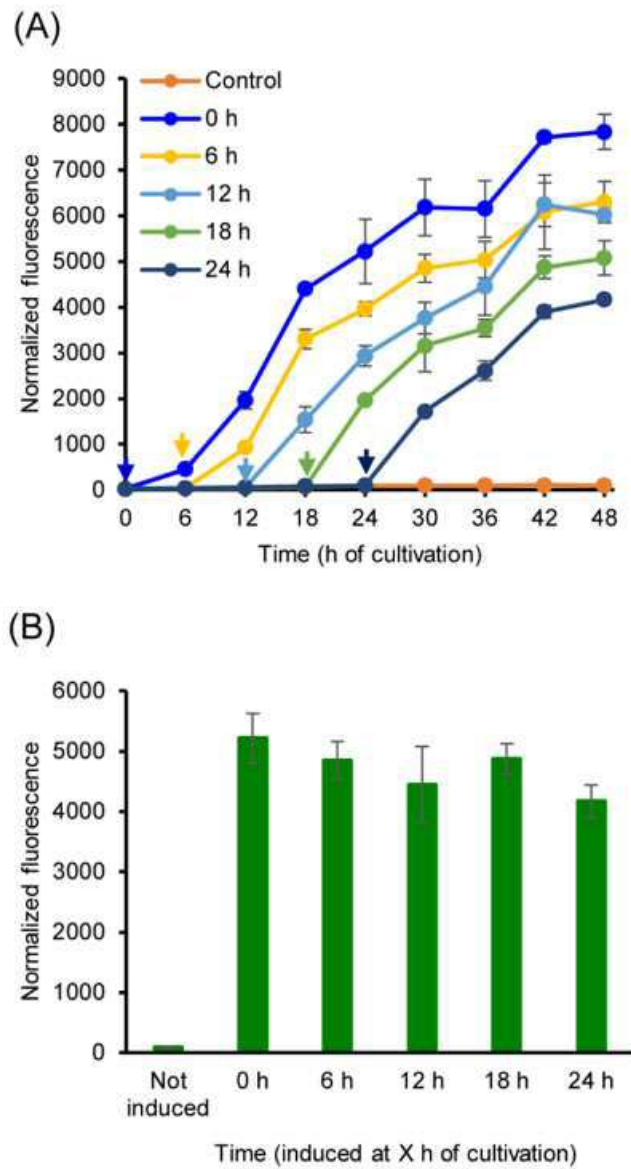
도면2



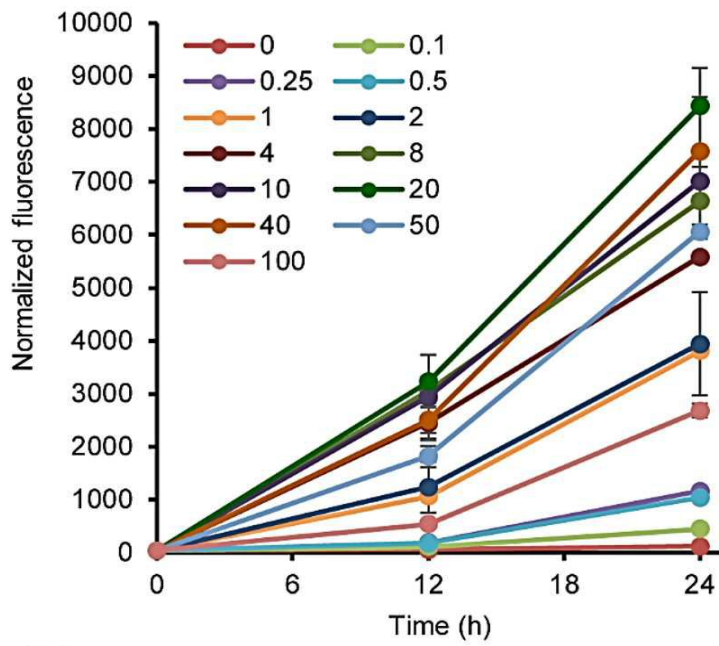
도면3



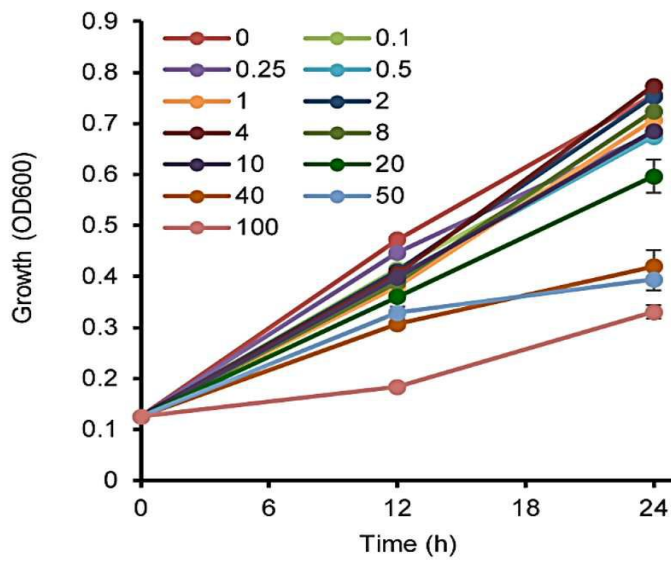
도면4



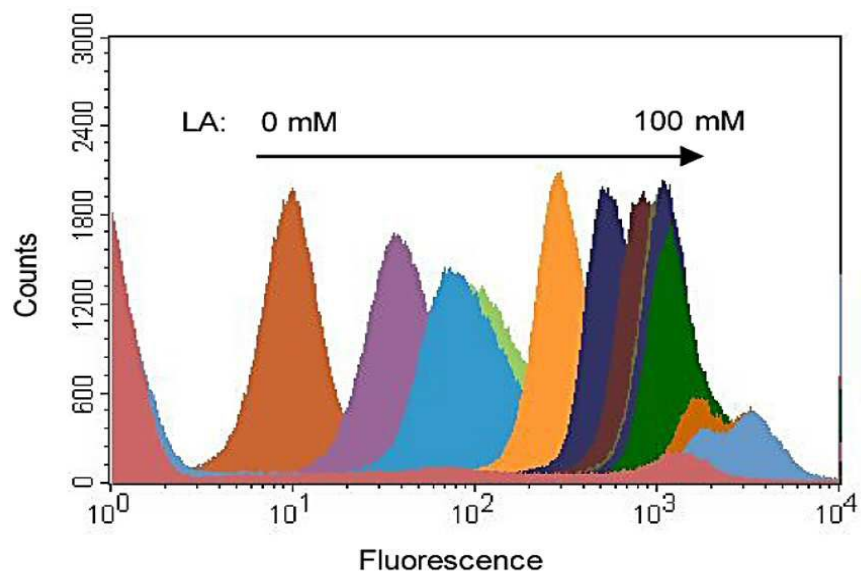
도면5



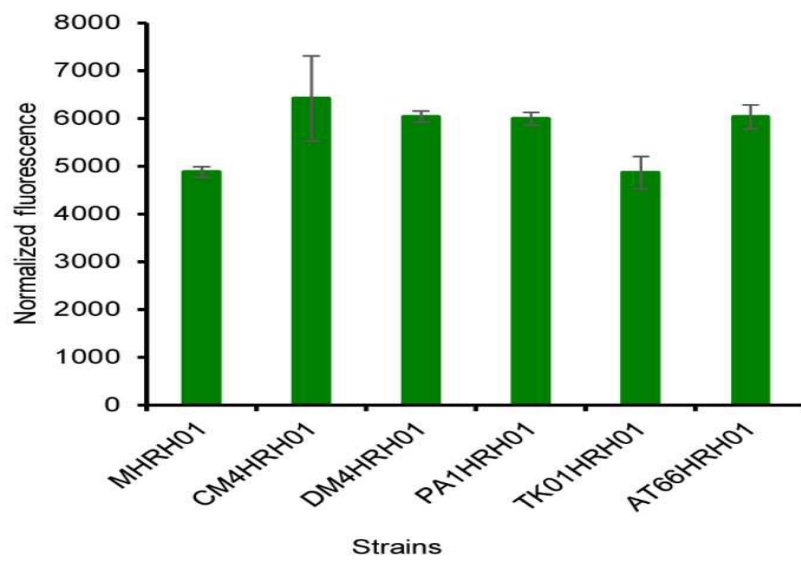
도면6



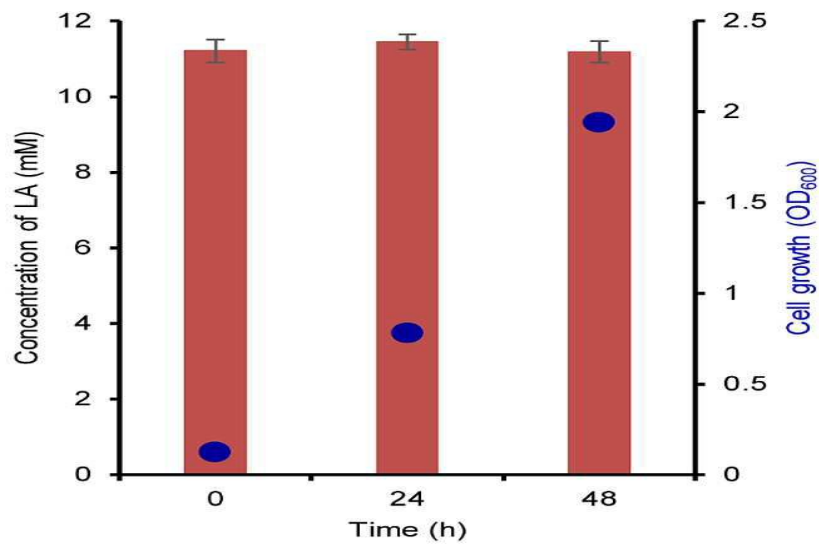
도면7



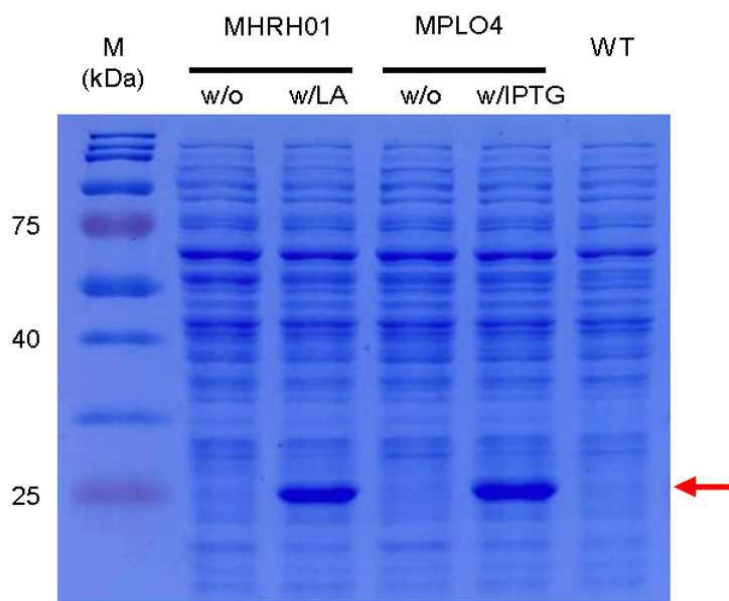
도면8



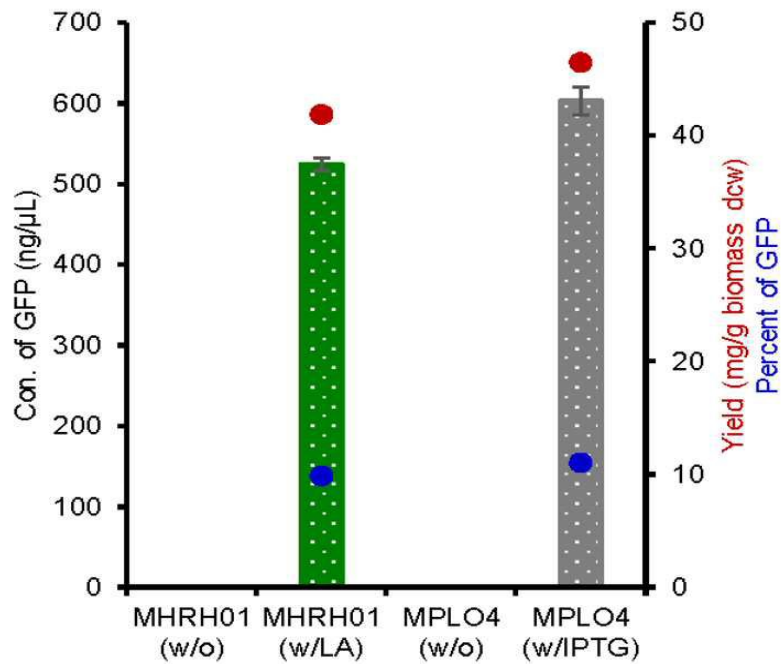
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- <120> CARBON SOURCE-INDUCIBLE EXPRESSION VECTOR EXPRESSABLE IN METHYLORUBRUM STRAIN AND GENE EXPRESSION SYSTEM USING SAME
- <130> FPD/202110-0038
- <160> 10
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 295
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> amino acid sequence for HpdR
- <400> 1

Met Phe Asp Trp Asn Asp Leu Arg Phe Phe Leu Glu Leu Gln Arg Ser

1 5 10 15

Gly Arg Leu Leu Thr Ala Ala Lys Arg Leu Asn Thr Thr His Ser Thr

20 25 30

Val Ala Arg His Ile Glu Ser Ile Glu Gln Ser Leu Gly Thr Ala Leu

35 40 45

Phe Val Gln His Ala Gln Gly Tyr Glu Leu Thr Pro Ser Gly Gln Ala

50 55 60
 Leu Leu Lys His Ala Glu Ala Met Glu Asn Val Ala Leu Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Glu Glu Ile Thr Gln Ala Ile Thr Pro Leu Gly Lys Ile Arg Leu Gly

 85 90 95
 Val Thr Glu Gly Ile Gly Ile Met Phe Phe Thr Pro Arg Met Asn Ala
 100 105 110
 Leu Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Leu Glu Val Glu Leu Val Ala Val Pro
 115 120 125
 Arg Phe Val Ser Ile Leu Asn Arg Glu Ala Glu Ile Ser Ile His Leu
 130 135 140
 Glu Arg Pro Asn Ala Asp Leu Leu Ile Thr Arg Lys Leu Thr Asp Tyr
 145 150 155 160

 Arg Leu Ala Leu Tyr Ala Ser Gln Ala Tyr Leu Asp Arg Ala Pro Pro
 165 170 175
 Leu Arg His Arg Glu Asp Leu Ala Arg His Ser Trp Ile Gly Tyr Val
 180 185 190
 Asp Asp Leu Leu Phe Ser Gln Glu Leu Leu Phe Leu Asn Ser Phe Cys
 195 200 205
 Arg Val Pro Asn Val Val Phe Arg Ser Thr Ser Val Ile Ala Gln Gln
 210 215 220
 Ala Ala Ala Arg Ala Gly Leu Gly Ile Ala Val Leu Pro Asn Tyr Met

 225 230 235 240
 Ala Arg His Asp Pro Thr Leu Val Arg Val Leu Pro Gly Glu Thr Ile
 245 250 255
 Gln Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Thr Arg Arg Glu Leu His Lys Ser Val
 260 265 270
 Arg Leu Arg Val Val Trp Asp Tyr Leu Leu Ala Leu Cys Ala Ala Glu
 275 280 285
 Gln Ser Glu Leu Leu Ala Glu
 290 295
 <210> 2

<211

> 888

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for HpdR

<400> 2

ctactcggct agcaactcgc tttgttcggc cgcgcacaac gccagcaggt agtcccacac	60
caccgcagg cgacagact tgtgcagctc gcggcgggtg cagatccagt agctgcgctg	120
gatggtttct cccggcagca cgcgcaccag tgtcgggtcg tggcgggcca ttagttggg	180
cagcacggcg atgcccagcc cggcgcgggc ggcggttgc tggcgatca cgctggtgct	240
tcgaaacacc acgttgggta ctgcgcagaa actgttgaga aacagcagtt cctggctgaa	300
cagcaaatcg tcaacgtagc cgatccagct gtgccgggcc aggtcttcgc ggtggcgag	360
tggcggcgcg cggtcagggt aggcctggct ggcgtatagc gccaggcggg agtcggtgag	420
tttgcgggtg atcagcagat cggcgttggg ccgtccaga tggatgctga tttctgcctc	480
gcggttgagg atgtgacga agcgcggcac cgtaccaat tccacctca ggccgggta	540
gcgctgaac aacgcgttca tgcgtgggtg gaagaacatg atgccgatgc cttcggttac	600
ccccaggcga atcttgccta gcggggtgat ggcctgggtg atttctcct gtgccagcag	660
ggcgacgttc tccatggctt cggcatgctt gaggaggct tgacccgagg gggtcagctc	720
gtaccctgg gcatgttgca cgaacagcg cgtccccagg ctctgctcga tgctctcat	780
atgccgggcc acggtgctgt gggtagtgtt caggcgttg gcggcgggtca gcaagcgccc	840
gtcgcgctgc aactcgagga aaaaccgcag atcattccag tcgaacat	888

<210> 3

<211> 233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for PhpdH

<400> 3

gcttgctctt tatggcagtt cgttcgggcc tcttaacggg catgccaca ggtgcggtga	60
acacctgaa ggtaacgtga tccctgagct gcgggcgagc ccgtgaagag gtcggtacag	120
gcttgccct gtgctaaaac gcacagcggc tgcgcgaat ctctgtttc atccacgaaa	180
ttactcacta agatggatcg ggacaagaat aaaaaacagg cgcgaggttg cac	233

<210> 4

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pro-FP
 <400> 4
 tgcatgcctg caggtcgact ctagacagga attggggatc ggaag 45
 <210> 5
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pro-RP
 <400> 5
 gttacgagcc ctcgagtttg gatccgtcca agctcagcta attaagc 47
 <210> 6
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PL04-FP
 <400> 6
 cgtttccacc gaattagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagatcactg cccgctttcc 60
 agtcggg 67
 <210> 7
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PL04-RP
 <400> 7
 tcctgctgat gtgctcagta tcattgttat ccgtcacat gtcaacaccg ccagagataa 60
 tttatcgcat gcaccattcc ttgcggcggc 90
 <210> 8
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PL04-RP2

<400> 8

caactcagct tcctttcggg ctttgtagc agccggatcc gtcagtgcgt cctgctgatg 60

tgctcagtat cattg 75

<210> 9

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LacI/PL/04-FP

<400> 9

cgtttccacc gaattagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagatcactg cccgctttcc 60

agtcggg 67

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LacI/PL/04-RP

<400> 10

cgacggatcc atgtatatct ctttcttaaa gttaaacaaa gtcag 45