

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0118554 (43) 공개일자 2011년10월31일
(51) Int. Cl. C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01) C12R 1/85 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0101754 (22) 출원일자 2010년10월19일 심사청구일자 2010년10월19일 (30) 우선권주장 1020100038140 2010년04월23일 대한민국(KR)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내 (72) 발명자 최원자 서울특별시 서대문구 대현동 11-1, 이화여자대학교 자연과학대학 생명과학전공 김현수 경기도 안양시 동안구 평촌동 꿈마을 라이프아파트 105동 2305호 (74) 대리인 양부현	

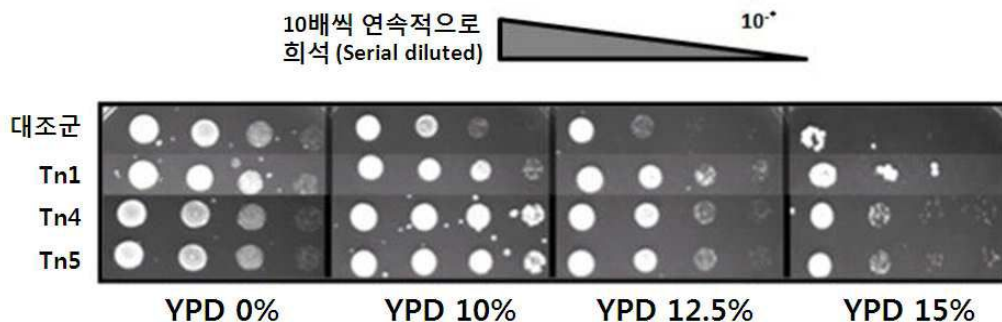
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 에탄올-저항성 효모 균주 및 이의 유전자

(57) 요약

본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 효모 균주는 고농도 에탄올, 바람직하게는 10-15% 에탄올에서 성장할 수 있는 효모 균주다. 따라서, 본 발명의 효모 균주들은 기존의 비효율적인 다단계 공정을 극복하는 통합공정에 필요한 고 에탄올 조건에서 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345072522

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 미래유망파이오니아사업

연구과제명 미생물 오닉스 융합기반 바이오에너지 생산 및 온실가스 저감 기술 개발 연구

기여율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2008.07.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 형질변형 효모 균주는 5-15% 에탄올 농도 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 형질변형 효모 균주는 12.5-15% 에탄올 농도 조건에서 성장할 수 있는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 형질변형은 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 균주에서 실시하는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 형질변형은 사카로마이세스 종에서 실시하는 것을 특징으로 하는 효모 균주.

청구항 7

제 1 항의 형질변형 효모 균주를 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양배지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 C6 당은 글루코오스인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 에탄올-저항성 효모 균주 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 효모 사카로미세스 세레비지에(*S. cerevisiae*)는 바이오매스 자원으로부터 바이오에탄올의 생산을 포함하는 여러 산업 분야에서 다양하게 이용되어 왔다. 효모 세포는 산업적 에탄올 발효 과정 동안 발생하는 고농도 에탄올을 같은 여러 환경적 스트레스에 항상 노출되고, 이는 결국 세포 성장, 세포 생존을 및 에탄올 생산에 있어서의 감소를 초래한다(Casey & Ingledew, 1986). 따라서, 고농도 에탄올에 의해 야기된 스트레스를 극복할 수 있는 효모 균주의 개발이 요구되어져 왔다. 한편, 새로운 기술로서 제안되어 지는 목질계 분해효소 생산라인과 목질계 분해라인, 발효라인이 한 반응기(reactor)에서 일어나도록 균주체계를 개발하고자 하는 통합공정(CBP: Consolidated BioProcess)은 목질계 분해효소의 적정환경 과 효모의 발효환경의 차이를 극복할 조건에 맞는 고 에탄올 및 열 저항성을 보유한 효모균주를 개발 하는 것이 향후 효율적인 에탄올 생산을 위한 가장 중요한 요소이다.

[0003] 에탄올 스트레스 저항성에 대한 기작을 조사하기 위해, 많은 연구들이 있었다. 특히, 막 유동성과 관계된 불포화 지방산은 효모에서 에탄올 저항성의 중요한 결정인자로 간주되어 보고되었다(Kajiwara, *et al.*, 2000; You, *et al.*, 2003). 또한, 트리할로오스(Kim, *et al.*, 1996) 또는 프롤린(Takagi, *et al.*, 2005)의 세포내 축적이 효모의 에탄올 저항성을 개선시키고 에르고스테롤이 사카로미세스 세레비지에의 에탄올 저항성과 관련된 중요한 인자(Inoue, *et al.*, 2000)라는 것이 보고되었다.

[0004] 더 나아가, 마이크로어레이 및 포괄적 발현 패턴 분석 같은 지놈 전반에 걸친(genome-wide) 분석들의 이용이 에탄올 스트레스 관련된 신규한 유전자들을 동정하는 데 유용하였다(Hirasawa, *et al.*, 2007; Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 이러한 접근방법을 통해, 에탄올 저항성에 관련된 많은 유전자들이 비-필수(nonessential) 유전자들로 동정되었다. 또한, 에탄올 저항성에 관련된 결과들은 각각 매치하지 않았고, 이러한 불일치는 균주 및 성장 조건에 기인한다고 보고하였다(Teixeira, *et al.*, 2009). 따라서, 상술한 유전 정보로부터 구축된 균주는 항상 에탄올 스트레스 조건에 대한 변화를 초래하지 않는다(Yoshikawa, *et al.*, 2009). 또한, 상업적으로 유용한 사카로미세스 세레비지에의 결실 돌연변이 라이브러리는 에탄올 저항성에 관련된 유전자들의 지놈 전반에 걸친 스크리닝에 이용되었다(Fujita, *et al.*, 2006; Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 상술한 연구들은 주로 에탄올 민감성을 나타내는 돌연변이체들을 선택하여 상응하는 유전자를 고농도 에탄올 조건 하에서 성장에 필요한 유전자들로 동정하였다.

[0005] 현재까지, 에탄올-민감성 돌연변이들의 스크리닝이 이미 실시되었으며, 이를 통해 에탄올 저항성을 책임지는 유전자들이 동정되었지만(Takahashi, *et al.*, 2001; Auesukaree *et al.*, 2009), 임의적 트랜스포존 삽입에 의해 에탄올 저항성 효모 균주를 직접적으로 구축하고 이에 관계된 타겟 유전자들을 동정하는 방법에 대해서는 아직까지 보고되어 있지 않다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 고 에탄올 저항성을 보유한 효모 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 효모에서 트랜스포존-매개된 유전자 상동 재조합으로 효모 염색체 내에 돌연변이를 유발함으로써 에탄올-저항성 효모 형질전환체를 동정하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 성장할 수 있다는 것

을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 에탄올-저항성 효모 균주와 이와 관련된 유전자를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 에탄올 생산방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 고 에탄올 저항성을 보유한 효모 균주를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 효모에서 트랜스포존-매개된 유전자 상동 재조합으로 효모 염색체 내에 돌연변이를 유발함으로써 에탄올-저항성 효모 형질전환체를 동정하였으며, 이들이 고농도 에탄올(예컨대, 10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 성장할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0013] 발화성, 휘발성 무색 액체인 에탄올은 가장 널리 이용되는 용매이다. 산업적으로, 에탄올은 자동차 연료 및 연료 첨가제로서 이용되며, 향수(scents), 향료(flavorings), 착색제(colorings) 및 의약품(medicines)으로도 이용된다. 또한, 에탄올은 알코올 음료 내 주요 정신활성 구성성분으로 중추신경계에 진정 효능을 가진다. 에탄올은 에틸렌의 수화를 통해 석유화학적으로 생산될 수 있으며, 효모를 이용하여 당을 발효시킴으로써 생물학적으로 생산될 수 있는데, 이러한 생물학적 생산은 석유 및 곡물 사료제의 가격에 의존적인 석유화학적 과정에 의한 생산보다 훨씬 경제적이다. 따라서, 생물학적 에탄올의 생산을 위한 효모 균주의 개발은 매우 중요하다.

[0014] 트랜스포존 돌연변이유발법은 여러 연구들에서 세포 형태학에 포함된 유전자들을 분석하기 위해 이용되었고, 유전자 파괴 돌연변이들의 생존이 유지된 유전자들을 포괄적으로 스크리닝하기 위해 효과적인 수단을 제공한다. 본 연구의 목적은 임의적 트랜스포존 삽입에 의해 에탄올-저항성 효모 균주를 직접적으로 구축하고 이에 관계된 타겟 유전자들을 동정하는 것이다.

[0015] 본 발명은 효모에서 트랜스포존-매개된 돌연변이에 의해 에탄올-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주를 제공한다.

[0016] 본 명세서의 용어 “트랜스포존(transposon)”은 단일 세포의 지놈 내에서 다른 위치로 이동(transposition)할 수 있는 DNA 서열로, 돌연변이를 유발하는 DNA 서열을 의미한다. 점핑 유전자로 불리는 트랜스포존은 모바일 유전성 엘리먼트의 좋은 예이다. 다양한 종류의 모바일 유전성 엘리먼트들은 트랜스포지션 기작에 따라 다음과 같이 분류될 수 있다: (a) 그룹 I 레트로트랜스포존, RNA로 전사된 후 DNA로 역전사되어 이동해 가는 트랜스포존; 및 (b) 그룹 II 점핑 트랜스포존, 트랜스포사제에 의해 DNA의 한 위치에서 다른 위치로 점핑(“cut and paste”)하는 트랜스포존. 본 발명에서 이용된 트랜스포존 컨스트럭트는 mTn3-lacZ/LEU2 컨스트럭트로 유전자 상동 재조합(Homologous recombination)을 통해 효모 염색체 내로 도입된다.

[0017] 본 발명은 (a) 효모 염색체에 돌연변이(mutations)를 유발시키는 단계; 및 (b) 상기 돌연변이된 효모를 고농도 에탄올 포함 배지에서 배양시키는 단계를 포함하는 에탄올-저항성이 증가된 형질변형 효모 균주의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0018] 상기 (a) 단계는 다양한 방법, 바람직하게는 트랜스포존을 이용하여 실시한다. 본 발명자들은 예일지놈분석센터(Yale Genome Analysis Center, New Haven, CT: <http://ygac.med.yale.edu/mtn/reagent>)로부터 얻어진 mTn3-lacZ/LEU2 컨스트럭트를 포함하는 효모(*S. cerevisiae*) 라이브러리 풀을 이용하였다(참고: 도 1). 제한효소를 이용하여 트랜스포존 컨스트럭트를 플라스미드 DNA로부터 절단하고 그 단편을 효모 염색체로 유전자 상동 재조합을 통해 형질전환시킴으로써 돌연변이를 유발시켰다. 일반적인 재조합 과정으로 알려진 유전자 상동 재조합은 유사한 또는 동일한 두 개의 DNA 가닥 사이에서 발생하는 뉴클레오타이드 서열의 교환을 지칭하는 유전 재조합의 한 형태로, 대부분의 생명체에서 이용된다.

[0019] 이후, 상기 (b) 단계에서 형질전환된 효모 균주를 고농도 에탄올에서 배양하여 성장이 가능한 균주를 분리/동정

한다. 본 발명에서는 다양한 농도의 에탄올(10%, 12.5%, 15% 에탄올)에서 대조군과 함께 형질변형된 효모 균주에 대한 성장 어세이(spot assay)를 실시하여 최종적으로 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주를 선택한다.

[0020] 본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 효모 균주들을 분리/동정하였다.

[0021] 본 명세서의 용어 “불활성화된(inactivated)”은 타겟 유전자의 기능이 차단되면 불활성화되었다고 표현하며, 예를 들어 트랜스포존-유발된 돌연변이, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 대체 돌연변이, 결실 돌연변이, 등을 포함하는 돌연변이에 의해서 유발된 타겟 유전자의 불활성화를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된 돌연변이를 통한 불활성화를 의미한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 타겟 유전자의 불활성화는 트랜스포존에 의해 유발된다.

[0023] 상술한 타겟 유전자들, 즉 CMP2, IMD4, DLD3 및 MSN2 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열목록 제1서열 내지 서열목록 제4서열, 및 서열목록 제5서열 내지 서열목록 제8서열에 기재되어 있으며, 상기 유전자들의 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 변형체도 이용될 수 있음은 당업계에서 자명하다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 5-15% 에탄올, 보다 바람직하게는 10-15% 에탄올, 및 가장 바람직하게는 12.5-15% 에탄올 배양 조건에서 성장할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 효모 균주는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 시조사카로마이세스 종(*Schizosaccharomyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 파피아 종(*Paffia* spp.), 클루이베로미세스 종(*Kluyveromyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 탈라로미세스 종(*Talaromyces* spp.), 브레타노미세스 종(*Brettanomyces* spp.), 파키솔렌 종(*Pachysolen* spp.) 또는 데바리오미세스 종(*Debaryomyces* spp.) 효모 균주이며, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 종이고, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에 L3262(MAT-*ura3-52 leu2-3,112 his4-34*)이다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)가 삽입된 효모 균주를 에탄올로 대사될 수 있는 하나 이상의 기질을 포함하는 배양매지에서 배양하는 단계를 포함하는 에탄올 생산방법을 제공한다. 보다 바람직하게는, 상술한 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)가 삽입된 효모 균주를 이용하여 기존의 비효율적인 다단계 공정을 극복하는 통합공정에 필요한 고 에탄올 조건에서 보다 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)로 형질전환된 효모 균주를 유효성분으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상술한 효모 균주에 돌연변이를 유발하는 단계를 포함하는 에탄올-저항성 효모 균주 제조방법으로서 이용될 수 있다.

[0029] 본 발명은 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 재조합 벡터 또는 그의 전사체에 의해 감염된 세포 및 유전자 도입에 의한 형질전환된 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 재조합 벡터, 또는 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 에탄올로 대사될 수 있는 기질은 C6 당(sugars)을 포함하고, 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 C6 당은 글루코오스를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 재조합 벡터는 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 및 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 원핵세포는 박테리아 세포 및 고세균을 포함하며, 진핵세포는 효모세포, 포유동물세포, 식물세포, 곤충세포, 줄기세포 및 곰팡이를 포함하고, 가장 바

람직하게는 효모세포이다.

- [0032] 바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터는 (i) 상술한 본 발명의 발현대상물질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터를 포함하며, 보다 바람직하게는 (i) 상술한 본 발명의 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적인 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 상기 동물세포, 바람직하게는 효모세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 재조합 발현벡터를 포함한다.
- [0033] 바람직하게는, 상술한 발현대상물질은 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “프로모터”는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 발현벡터에서 발현대상물질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된(operatively linked)”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.
- [0035] 본 발명의 벡터가 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lac* UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터, T7 프로모터, 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 숙주 세포는 *E. coli*이며, 가장 바람직하게는 *E. coli* DH5 α 이다. 또한, 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(p_L^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pRS316, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt10, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 재조합 벡터가 진핵세포, 바람직하게는 효모 세포에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 발현대상물질의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 효모 세포에서 유래된 프로모터, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, 효모(*S. cerevisiae*) GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터, 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 또는 AOX2 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).
- [0038] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법(Cohen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)); 및 Hanahan, J. *Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 트랜스덕션(transduction), 전기천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 발현대상물질-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 “프로

모터-발현대상물질 인코딩 뉴클레오타이드 서열-폴리 아데닐화 서열”의 구조를 갖는다.

[0040] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0041] 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 형질전환된 효모 세포의 제조는 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 리튬 아세테이트/DMSO 방법(Hill, *et al.*, (1991), DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19, 5791), 리포솜-매개 전이방법(Wong, *et al.*, 1980), 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, *et al.*, (1990), *J. Reprod. Fert.* 41:173-182; Kopchick, *et al.*, (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In *Transgenic Animals*, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.* 16, 107-110) 등을 이용하여 실시하며, 가장 바람직하게는 리튬 아세테이트/DMSO 방법을 이용하여 실시한다.

[0042] 한편, 본 발명의 발현대상물질 단백질을 유효성분으로써 유전자 도입에 이용하기 위해 발현대상물질 단백질이 효과적으로 세포 내로 침투할 수 있어야 한다. 예를 들어, 상술한 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 단백질(Tn-1); DLD3 단백질(Tn-4); 또는 MSN2 단백질(Tn-5)을 유효성분으로 이용하는 경우, 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 단백질(Tn-1); DLD3 단백질(Tn-4); 또는 MSN2 단백질(Tn-5)에 부착시키는 것이 바람직하다. 즉, 유효성분으로서 본 발명의 불활성화된 CMP2 또는 IMD4 단백질(Tn-1); DLD3 단백질(Tn-4); 또는 MSN2 단백질(Tn-5)을 세포 내로 도입(permeable peptide transduction)하기 위하여 단백질 운반 도메인(PTD: protein transduction domain)을 상기 단백질과 융합하여 융합 단백질을 만든다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 라이신/아르기닌 등 기본 아미노산 잔기들을 주로 포함하고 있어서 이와 융합된 단백질들을 세포막을 투과하여 세포내로 침투시키는 역할을 한다. 상기 단백질 운반 도메인(PTD)은 바람직하게는 HIV-1 Tat 단백질, 드로소필라 안테나페디아의 homeodomain, HSV VP22 전사조절단백질, vFGF에서 유도된 MTS 펩타이드, 페네트라틴, 트랜스포탄 또는 Pep-1 펩타이드에서 유래된 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0044] (a) 본 발명은 불활성화된(inactivated) CMP2 또는 IMD4 유전자(Tn-1); DLD3 유전자(Tn-4); 또는 MSN2 유전자(Tn-5)를 포함하는 에탄올-저항성 형질변형 효모 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0045] (b) 본 발명의 효모 균주들은 고농도 에탄올, 바람직하게는 10-15% 에탄올에서 성장할 수 있는 효모 균주다.

[0046] (c) 본 발명의 효모 균주들은 고 에탄올 저항성을 보유함으로써 향후 통합공정에서 에탄올을 보다 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 트랜스포존에 의해 돌연변이 유발된 효모 DNA 라이브러리를 이용한 사카로마이세스 세레지비에 L3262의 형질전환 과정을 나타내는 도식이다.

도 2는 사카로마이세스 세레지비에 트랜스포존 돌연변이체들의 에탄올 저항성을 조사하기 위한 성장 어세이 결과이다.

도 3은 트랜스포존 삽입 위치를 나타내는 도식이다. 트랜스포존 삽입 위치는 3개의 에탄올-저항성 스트레인으로부터 회복된 트랜스포존의 시퀀싱을 통해 결정하였다. 주변 유전자 위치(genetic loci)가 보여진다.

도 4는 트랜스포존에 의해 영향받은 유전자들의 발현을 나타내는 결과이다. 대조군 L3262로부터 추출한 총 RNA를 이용하여 노던 블롯 분석을 실시하였다. 스캐닝 밀도측정기(scanning densitometer)를 이용하여 시그널을 상대적으로 정량하고 ACT1으로 표준화하였으며, % 대조군으로 제시하였다.

도 5는 SGK0 돌연변이체들의 에탄올-저항성을 나타내는 성장 어세이 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 SGK0 돌연변이체들을 0%, 10%, 12.5% 및 15% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%), 3일(10%), 4일(12.5%) 또는 5일(15%) 동안 성장시킨 결과이다.

도 6은 보충(complementation)에 의한 스트레스 민감성 회복을 보여주는 성장 어세이 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 보충된 스트레인들을 0% 및 10% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%) 또는 4일(10%) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316을 Tn 돌연변이체들에 형질전환시킴으로써 제조하였다. IMD4 유전자가 GAPDH 프로모터 조절 하에 위치하기 때문에, IMD4 대조군으로서 pRS316-GAPDH를 Tn1에 형질전환시켰다.

도 7은 스트레스 민감성에 대한 과다-발현의 효과를 관찰한 결과이다. 10배씩 연속적으로 희석된 과다-발현 스트레인들을 0% 및 10% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에 스팟팅한 후, 30℃에서 1일(0%) 또는 4일(10%) 동안 성장시킨 결과이다. 대조군 스트레인들은 pRS316-GAPDH를 L3262에 형질전환시킴으로써 제조하였다.

도 8은 Tn 돌연변이체들의 발효 프로파일을 보여주는 그래프이다. 지수적으로 성장하는 세포(0.5 OD₆₀₀)를 30℃에서 30% 글루코오스 및 6% 에탄올이 보충된 YPD 배지에서 성장시켰다. 발효 동안 세포 성장(도 8A) 및 에탄올 생산(도 8B)을 모니터링하였다. 심볼: L3262, 빈 삼각형; Tn1, 채워진 삼각형; Tn4, 채워진 다이아몬드; 및 Tn5, 빈 다이아몬드.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] 실시예

[0050] 실험재료 및 실험방법

[0051] 균주, 배지 및 배양 조건

[0052] 본 연구에서 균주, 파괴된 유전자 및 트랜스포존-삽입위치는 표 1 및 도 3에 기재되어 있다. 사카로미세스 세레지비에(*Saccharomyces cerevisiae*) L3262(MAT-*ura3-52 leu2-3, 112 his4-34*: 한국생명공학연구원 제공)를 숙주 균주로 이용하였다. 사카로미세스 세레지비에를 YPD 배지(1% 박토 효모 추출물, 2% 박토 펩톤, 2% 텍스트로오스, w/v; Difco, MI)에서 30℃로 배양하였다. 사카로미세스 세레지비에 형질전환체를 SD-루이신 배지[0.67% Difco YNB(yeast nitrogen base; 아미노산 부재), 2% 글루코오스, 0.069% 보충 혼합물(complete supplement mixture, CSM)-*leu*: MP, OH)에서 선택하였다. 플라스미드 구축을 위해, *E. coli* DH5α(Stratagene, CA)를 숙주로 이용하여 100 mg/l의 암피실린(Sigma-Aldrich, MO)이 보충된 루리아-베르타니 배지(LB): Difco, MI)에서 37℃ 배양시켰다.

[0053] 트랜스포존 돌연변이법

[0054] 트랜스포존의 임의적 삽입(random insertion)에 의해 mTn3-*lacZ/LEU2*를 가지는 사카로미세스 세레지비에 지놈 라이브러리 풀을 예일지놈분석센터(Yale Genome Analysis Center, New Haven, CT: <http://vgac.med.yale.edu/mtn/reagent>)로부터 얻었다. mTn3-돌연변이된 지놈 라이브러리 풀로부터 추출한 플라스미드 DNA를 *NotI*으로 절단하여 사카로미세스 세레지비에 L3262의 형질전환을 위해 이용하였다. 효모 형질전환을 리튬 아세테이트 방법으로 실시하였다. 형질전환체를 SD-루이신 배지에서 선택하였다(도 1).

[0055] 에탄올-저항성(tolerant) 돌연변이체의 분리

[0056] 형질전환체들을 YPD 배지 및 12.5% 에탄올을 포함한 YPD 배지 플레이트에 두 쌍으로(replica) 플레이팅하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 모든 배지 조건에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체들을 선택하였다. 이들 돌연변이체들을 선택하기 위해 YPD 배지에서 OD₆₀₀ 값 1까지 배양한 후, 살균수로 연속적으로 10배씩 희석시켰다. 각

희석액의 분취액(5 μ l)을 에탄올이 없거나, 또는 10%, 12.5%, 15% 에탄올을 함유한 YPD 아가(Difco, MI)에 플레이트하고 30°C에서 3-6일 동안 배양하였다. 성장 여세이를 세 번에 걸쳐서(triplicate) 실시하였다. 대조군 균주와 비교하여 에탄올을 함유한 YPD 플레이트에서 잘 자랄 수 있는 돌연변이체들을 에탄올-저항성 돌연변이체로 최종적으로 선택하였다. 이후, 돌연변이체들을 YPD 플레이트에 플레이트하여 30°C에서 배양하였다.

[0057] **에탄올-저항성 표현형에 관련된 유전자의 동정**

[0058] 에탄올-저항성 돌연변이체에서 lacZ 서열에 인접한 lacZ 서열을 이용한 플라스미드 회수(plasmid rescuing)에 의해 mTn3-lacZ/LEU2 삽입 위치를 결정하였다. 복제 원점(origin of replication; ori)을 도입하기 위해, URA3로 표시된 플라스미드(회수 플라스미드; pRSQ2-URA3, 예일지놈분석센터 제공)가 lacZ 서열의 플라스미드-유래(borne) 카피 및 트랜스포존-유래 카피 간의 재조합에 의해 트랜스포존의 일부로 대체된다. 이들 형질전환체로부터 효모 DNA를 회수하여 적절한 효소(EcoRI, SalI, HindIII, PstI 또는 KpnI)로 절단하였다. 이후 절단된 단편들을 원형화시켜 E. coli DH5 α 에서 회복시켰다. 얻어진 플라스미드를 트랜스포존의 5' 말단에 상보적인 lacZ 프라이머를 이용하여 시퀀싱하였으며 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 5' -GTTTCCAGTCACGAC-3'. 사카로미세스 지놈 데이터베이스의 BLAST 서버(<http://www.yeastgenome.org/>)를 이용하여 트랜스포존이 삽입된 유전자들을 분석하였다.

[0059] **노던 블롯 분석**

[0060] 총 RNAs가 추출되어 15 μ g을 이용하였다. 프로브로 이용된 DNA 단편들은 L3263 게놈 DNA로부터 적절한 유전자-특이적 프라이머들을 이용한 PCR을 통해 제조하였다. 정제된 PCR 단편들은 랜덤 프라이머를 이용하여 ³²P-dCTP(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)로 표지되었다. 이후 과정들은 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다(Adams, A., D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, and T. Stearns. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.(1997)). ACT1은 내적 대조군으로 이용하였다. 밴드 강도는 NIH image J, version 1.61을 이용하여 정량하였다. 각 유전자에 대한 실험들은 세 번에 걸쳐서 실시하였다.

[0061] **유전자 클로닝 및 분석 방법들**

[0062] 과다발현 실험을 위해, 동정된 유전자들의 ORFs(open reading frames)가 pRS316-GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 내로 클로닝되었다. 보충 실험(complementation experiments)을 위해, 프로모터 및 종결 서열(terminator sequences)과 융합된 ORFs를 pRS316 벡터에 서브클로닝하였다. 증폭된 산물 및 벡터를 적합한 제한 효소로 절단한 후, E. coli DH5 α 에 형질전환시켰다. 이용된 프라이머 쌍 및 얻어진 플라스미드는 표 2에 기재되어 있다. 클론들은 시퀀싱을 통해 확인하였으며, 사카로미세스 세레비지에(S. cerevisiae) L3262 또는 상응하는 트랜스포존 돌연변이체들에 형질전환시켰다.

[0063] 유전자들은 표준 프로토콜에 의해 제조된 게놈 DNA를 템플레이트로 이용하여 pfu DNA 폴리머라제에 의해 PCR-증폭되었다(Adams, A., D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, and T. Stearns. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.(1997)). PCR 단편들을 QIAquick 젤 추출 키트(Qiagen, Valencia, CA)로 정제하였다. 모든 PCR 컨스트럭트를 시퀀싱하여 확인하였다. ORF 중간에 존재하는 인트론으로 인하여, IMD4의 ORF는 역전사(Reverse transcription, RT)-PCR을 통해 제조하였다. 이후, 단일-가닥 cDNA는 분리된 총 RNA로부터 AMV(Avian Myeloblastosis virus) 역전사 효소(Promega, Madison, WI)에 의해 합성하였다. 일 μ g의 총 RNA, 1X 역전사 완충액[10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% 트라이톤 X-100], 1 mM 디옥시뉴클레오시드 트리포스페이트(dNTPs), 0.5 유닛의 RNase 억제제, 100 pmol/ μ l의 특이적인 다운스트림 프라이머(IMD4-R; 표 1)을 포함하는 20 μ l의 역전사 반응 혼합물과 15 유닛의 AMV 역전사 효소를 42°C에서 15분 동안 반응시키고, 99°C에서 5분 동안 열을 가한 후, 0-5°C에서 5분 동안 반응시켰다. PCR 조건은 다음과 같이 실시하였다: 95°C에서 3분 동안 변성시키는 단계; 35 사이클(95°C에서 1분 동안 변성, 65°C에서 1분 동안 어닐링, 및 72°C에서 2분 동안 연장하는 단계로 구성된 한 사이클)을 실시하는 단계; 및 72°C에서 10분 동안 최종적으로 연장하는 단계. 세포 성장은 Beckman DU730 분광광도계(Beckman Coulter, Fullerton, CA)를 이용하여 600 nm에서 측정하였으며, 혈구계측기(hemocytometry)로 모니터링하였다.

[0064] 발효

[0065] 지수적으로 성장하는 세포를 수득하여 100 ml의 YPD30E6[30% 글루코오스 및 6%(v/v) 에탄올로 보충된 YP]로 옮겼다. 시작 세포 밀도는 0.3의 OD₆₀₀ 값으로 조정하였다. 세포를 120 rpm으로 흔들면서 30℃에서 배양하였다. 시료를 12시간 마다 취한 후, 세포 성장 및 에탄올 농도를 각각 세포 밀도 측정 및 HPLC(high-pressure liquid chromatography)를 이용하여 결정하였다. 시료를 60℃로 세팅된 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 로딩하였다. 글루코오스 및 에탄올을 0.5 mM H₂SO₄를 이용하여 0.6 ml/분의 유동속도로 용출시켰다. 피크들은 굴절율(refractory index)에 의해 검출되고 지연시간(retention time)에 따라 동정되어 표준 곡선에 따라 정량화되었다. 세포 성장은 600 nm에서 광학밀도를 측정함으로써 모니터링하였다.

[0066] 실험결과

[0067] 에탄올-저항성 돌연변이체들의 선택

[0068] 약 3,000개의 형질전환체들을 루이신 원영양체(prototroph)로서 선택하였으며(도 1), YPD 배지 및 10% 에탄올을 포함한 YPD 배지 플레이트에 두 쌍으로(replica) 플레이팅하였다. 선택된 약 40개의 돌연변이체들을 30℃에서 3일 동안 배양한 후 대조군 균주(사카로미세스 세레비지에 L3262)과 비교하여 10% 에탄올을 포함한 YPD 플레이트에서 잘 성장한 돌연변이체들을 에탄올-저항성 스트레인으로 선택하였다. 선택된 40개의 돌연변이체들을 확인해 본 결과, 3개의 돌연변이체들이 에탄올-저항성 돌연변이체들로 최종 선택되어 Tn1, Tn4 및 Tn5로 명명되었다. 이들 돌연변이체들은 모두 대조군 균주와 비교하여 10%, 12.5% 또는 15% 에탄올을 포함한 YPD 플레이트에서 잘 성장하였다(도 2).

[0069] 저항성 돌연변이체들에서 트랜스포존 삽입 위치의 동정

[0070] 각 저항성 돌연변이체들로부터 트랜스포존에 인접한 효모 염색체 DNA를 대장균에서 회수하여 시퀀싱(마크로젠, 한국)하였다. 동정된 유전자들의 트랜스포존 삽입 위치 및 기능을 표 1 및 도 3에 요약하여 기재하였다.

표 1

[0071] 에탄올-저항성 표현형을 야기할 수 있는 동정된 유전자들.

균주	파괴된 유전자	삽입 위치 ^a	기능 ^c
Tn-1	<i>YML057W/CMP2</i> ~ <i>YML056C/IMD4</i>	110 bp ^b 90 bp ^b	CMP2: 칼시뉴린 A; 칼시뉴린의 촉매 서브유닛의 이소형(CNA1)으로, Crz1p(스트레스-반응성 전사인자)를 조절하는 Ca ⁺⁺ /칼모둘린-조절된 단백질 포스파타제이며, 다른 칼시뉴린 서브유닛은 CNB1. IMD4: 이노신 모노포스페이트 디하이드로게나제; GMP 생합성의 첫 번째 단계를 촉매하는 단백질로, 사카로미세스 세레비지에에서는 4개의 유전자 패밀리가 존재하여 항상 발현된다.
Tn-4	<i>YEL072W/RMD6</i> ~ <i>YEL071W/DLD3</i>	946 bp ^b -994 bp	RMD6: 포자형성에 필요한 단백질 DLD3: D-락테이트 디하이드로게나제; 레트로등급 레굴론의 한 부분으로, 미토콘드리아 손상에 의해 자극되고 글루타메이트가 유일한 질소원인 조건에서 성장한 세포에서 감소되는 세포질 유전자들로 구성되어 있다.

Tn-5	<i>YMR037C/MSN2</i>	1152 bp	Msn4p에 관계된 전사 활성인자; 스트레스 조건에서 활성화되며, 그 결과 세포질에서 핵으로 전이(translocation)되며, 스트레스-반응성 유전자들의 DNA 내 반응 엘리먼트에 결합하여 이들의 발현을 유도한다.
------	---------------------	---------	---

[0072] a: 삽입 위치는 각 코딩 서열의 개시 ATG로부터의 위치이다.

[0073] b: 삽입 위치는 각 코딩 서열의 종결 코돈으로부터의 위치이다.

[0074] c: 효모 지놈 데이터베이스(YGD)의 주석.

[0075] 파괴된 유전자들의 동정

[0076] 트랜스포존이 삽입된 위치는 다음과 같았다: Tn1, CMP2의 종결 부위 및 IMD4의 종결 부위; Tn4, RMD6의 종결 부위 및 DLD3의 프로모터 부위; 및 Tn5, MSN2의 ORF 부위. Tn1 및 Tn4에서 영향받은 유전자를 결정하고 Tn5에서 이의 파괴를 확인하기 위해, CMP2, IMD4, RMD6, DLD3 및 MSN2의 발현 레벨을 노던 블롯 분석을 통해 조사하였다(도 4). 대조군과 비교하여, CMP2 및 IMD4의 레벨은 각각 약 10% 및 20% 정도 더 낮았다. 대조군과 비교하여, DLD3의 레벨은 약 25% 정도 더 낮았지만, RMD6의 레벨은 변화가 없었기 때문에 RMD6는 향후 실험에서 제외시켰다. 예상한 바와 같이, MSN2의 발현은 검출되지 않았다. 따라서, 트랜스포존 삽입은 CMP2, IMD4 및 DLD3의 발현에 부분적으로 영향을 미쳤으며, MSN2의 발현을 완전하게 억제시켰다.

[0077] 에탄올-저항성에 대한 기여

[0078] 상술한 결과에 따르면, Tn1에서는 CMP2 및 IMD4가 동시에 하향-조절(co-down-regulation)되며, Tn4에서는 DLD3가 하향-조절되고, Tn5에서는 MSN2가 파괴되었음을 확인할 수 있었다. CMP2, IMD4, DLD3 및 MSN2의 하향-조절 또는 결실의 에탄올- 및/또는 열-저항성에 대한 기여도를 알아보기 위해, BY4741 백그라운드의 사카로미세스 세레비지에 단일 유전자 녹-아웃(single gene knockout, SGKO) 라이브러리(collection library)로부터 얻어진 4개 유전자에 대한 녹-아웃 돌연변이체들을 이용하여 개별적으로 조사하였다. 상기 라이브러리가 허원기 박사(Seoul National University, Seoul, Korea)로부터 친절하게도 제공되었으며, 동정된 유전자의 확인에 이용되었다. 사카로미세스 세레비지에 BY4741 스트레인이 상술한 결실 돌연변이체들의 모 스트레인(mother strain)이었다. *cmp2*, *imd4*, *dld3* 및 *msn2*의 배양물을 10%, 12.5% 및 15% 에탄올을 포함하는 YPD 플레이트에서 성장(spot-assay)시켰을 경우, 모든 결실 돌연변이체들의 성장이 대조군 BY4741 스트레인과 비교하여 조사된 모든 에탄올 농도에서 증대되었다(도 5). 그러므로, 4개의 유전자에 대한 SGKOs이 에탄올-저항성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, CMP2 및/또는 IMD4, 그리고 DLD3 추가적인 하향-조절이 에탄올 저항성에 중요하였다. 상술한 결과들은 RNA 발현 레벨 및 아마도 단백질 레벨(비록 확인되지 않았을 지라도)이 에탄올- 및 열-저항성을 부여하는 데 중요하다는 것을 의미한다.

[0079] 보충(complementation)에 의한 저항성 확인

[0080] Tn1, Tn4 및 Tn5가 특정 유전자들의 결실 또는 동시에 하향-조절을 통해 에탄올-저항성을 획득한다는 사실은 상술한 유전자들의 보충이 상기 스트레스에 대한 세포의 민감성으로 다시 나타낼 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 고찰을 확인하기 위해, 프로모터, ORF 및 종결자(ORF +/- 700 bp)를 포함하는 증폭된 DNA 단편들을 pRS316 벡터에 클로닝하여 상응하는 Tn1, Tn4 및 Tn5 돌연변이체에 형질전환시킴으로써, IMD4를 제외한 각 유전자들을 자가적으로 발현시켰다(표 2). ORF 중간에 존재하는 인트론을 가지는 IMD4의 경우, RT-PCT를 실시하여 pRS316-GAPDH에 클로닝함으로써 전체 ORF를 얻은 후, GAPDH 프로모터의 조절 하에서 클로닝된 DNA를 과발현시켰다. 대조군은 pRS316 벡터를 형질전환시킴으로써 구축하였다.(IMD4의 경우는 대조군 pRS316-GAPDH) 스팟 어세이(Spot assay)가 10% 에탄올을 포함하는 YPD 아가에서 실시하는 경우, 보충된 세포의 저항성은 Tn 돌연변이체들과 비교하여 현저하게 감소하였다(도 6).

[0081]

본 연구에서 이용된 올리고뉴클레오타이드.

올리고뉴클레오타이드	서열(5' → 3')
과다-발현 실험	
CMP2-F	CGCGGATCCATGTCTTCAGACGCTATA
CMP2-R	CGCCTTAAGCTATTTGCTATCATTCTT
IMD4-F	CGCGGATCCATGAGTGCTGCTCCATTG
IMD4-R	CGGGTCGACTCAATTGTATAGACGTTT
DLD3-F	CGCGGATCCATGACGGCCGCACAT
DLD3-R	CGGGTCGACTCAAATGTACTTGTA
MSN2-F	CGCGGATCCATGACGGTCGACCATGAT
MSN2-R	CGCCTTAAGTTAAAAAATGGGGTCTA
보충(complementation) 실험	
CMP2-FU	CGCGGATCCATGGCTGAGGTTCTATGTTGTCT
CMP2-RL	CGCGGCCGCTGCCGGTGCCGATGGTTTA
DLD3-FU	CGCGGATCCCTTTAAAGTGCTATG
DLD3-RL	CGGGTCGACTAGTCGCTTTAAAGT
MSN2-FU	CGCGGATCCCGGCCGGAACGTACCTAAAG
MSN2-RL	CGCGGCCGCAAGCGCCATATAAACATTGA

[0082]

* 밑줄 친 서열은 제한효소 위치이다.

[0083]

CMP2(10%까지) 및 IMD4(20%까지)의 동시 하향-조절, 그리고 DLD3의 하향-조절이 에탄올 저항성을 부여한다는 사실은 스트레스 저항성이 특정 유전자(들)의 발현 레벨이 중요하다는 것으로 추측될 수 있다. 이를 확인하기 위해, IMD4를 제외한 각 유전자의 ORF를 PCR-증폭하고 과다발현용 pRS316-GAPDH 벡터로 클로닝하여 L3262 스트레인으로 형질전환시켰다. pRS316-GAPDH 벡터는 대조군으로서 형질전환되었다. 에탄올에 대한 스팟 어세이(도 7)를 실시한 경우, 과다발현된 스트레인들은 일반적으로 대조군보다 에탄올에 대해 더욱 민감하였는데, 이는 에탄올-민감성에 대한 유전자량 효과(dosage effect)를 의미한다.

[0084]

Tn 돌연변이체들의 발효 능력

[0085]

일반적으로 에탄올-저항성 세포들은 고농도의 에탄올에서 세포 생존율이 높기 때문에 비-저항성 스트레인에 비해 더 많은 에탄올을 생산한다는 것으로 알려져 있다. 발효능력(fermentation capacity)을 30% 글루코오스를 포함하는 배지 배양에서 30℃로 조사하였을 때, 돌연변이체들의 증가된 성장(약 20%)에도 불구하고 대조군 스트레인과 돌연변이체들 간에 유의한 차이점이 발견되지 않았다(결과를 보이지 않음). 대조군 스트레인은 기본적으로 30% 글루코오스로부터 최대 9%의 에탄올을 생산할 수 있을 것으로 판단되며, 이는 증가된 에탄올 저항성의 효과로 보기 어렵다. 따라서, 최종적인 에탄올 역가(titer)가 9%를 초과하는 조건을 확립하는 것이 필요하였다. 이러한 면에서, 본 발명자들은 0.5의 OD₆₀₀ 값을 가지는 개시 세포 및 6% 에탄올을 포함하는 배양액에서 발효를 시작하였다. 도 8A 및 도 8B에서 볼 수 있듯이, Tn 돌연변이체들은 대조군과 비교하여 보다 빠르게 성장하였으며 더 많은 에탄올을 생산하였다.

[0086]

추가논의사항

[0087]

효모 및 다른 생명체에서, 스트레스에 대한 대부분의 세포내 경로는 조절되는 많은 유전자들로 재프로그래밍된다(K, 2005). 현재까지 많은 수의 연관 유전자들이 동정되었을 지라도, 시그널링 경로의 관점에서 에탄올 및 열을 포함하는 많은 스트레스 유발자들에 대한 저항성이 어떻게 획득되는 지에 대해서 거의 알려져 있지 않다. 일반적으로, 에탄올-저항성의 기작은 매우 복잡하고 전체적으로 조절되며, 연관된 경로들의 포괄적 관점을 통해 이해될 필요가 있는 것으로 받아들여 진다(Ma, *et al.*, 2010; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 에탄올 및 열 스트레스 모두는 세포막 지질 조성을 유사하게 변화(Okuyama, *et al.*, 1979; Suutari, *et al.*, 1994) 시키고 세포막 H⁺-ATPase 활성(Coote, *et al.*, 1994) 열충격 단백질을 인코딩하는 유전자들의 상향-조절(Ma, *et al.*, 2010)

을 감소시킨다. 상술한 결과들은 에탄올-저항성에 필요한 경로들이 열-저항성에 필요한 경로들과 중첩된다는 것을 나타낸다. 하지만, 지놈 전반에 걸친(genome-wide) 분석에 기반하여 제조된 스트레인들은 에탄올-저항성 또는 열-저항성 만을 나타냈다(Teixeira, *et al.*, 2009; Yoshikawa, *et al.*, 2009). 본 연구에서, 본 발명자들은 3,000개의 트랜스포존-매개된 파괴 돌연변이들을 스크리닝하여 에탄올에 대한 증가된 저항성을 가지는 다섯 개의 스트레인들을 분리하였다.

[0088] 본 발명자들은 증가된 에탄올-저항성을 책임지는 4개의 유전자들(CMP2, IMD4, DLD3 및 MSN2)을 동정하였다. CMP2 및/또는 IMD4, 그리고 DLD3의 하향-조절은 에탄올-저항성을 주었다. 표 1 및 도 3에서 볼 수 있듯이, 트랜스포존은 영향받은 유전자들의 예상되는 조절 부위에 삽입되었다. 이는 트랜스포존 돌연변이유발법에 의해 발생된 라이브러리는 이론적으로 ORFs에만 영향을 가지는 SGKO 라이브러리에 포함된 클론의 수와 유사한 4,500개 이상의 클론들로 구성된다는 것을 의미한다. 본 연구에서, 본 발명자들은 이론적으로 필요한 클론 수보다 더 적은 3,000개의 클론으로 구성된 라이브러리를 이용하여 증가된 에탄올 저항성을 가지는 세 개의 스트레인(Tn1, Tn4 및 Tn5)을 분리하였다. 따라서, 적절한 클론 수를 포함하는 라이브러리를 스크리닝한다면, 증가된 저항성을 가지는 더 많은 수의 스트레인을 분리하는 것이 가능할 것이다. 영향받은 유전자들의 하향-조절을 나타내는 Tn1 및 Tn4의 분리는 트랜스포존 삽입방법이 아닌 SGKO 라이브러리를 이용하였다면 불가능했을 것이다. 본 발명자들의 지식으로는, 본 발명자들의 연구가 RNA 레벨이 에탄올-저항성에 대한 결정 인자라는 것을 처음으로 규명한 것이다.

[0089] 하향-조절되는 Tn1의 경우, 본 발명자들은 하나의 유전자만 하향-조절되는 스트레인의 부재로 인해 상기 유전자가 실제로 스트레스 저항성을 담당하는 지 여부를 결정할 수 없었다. CMP2 유전자는 Crz1p(스트레스-반응 전사인자)를 조절하는 Ca^{2+} /칼모듈린-의존성 포스파타제의 활성 서브유니트의 이소형인 칼시뉴린 A(calcineurin A)를 인코딩한다. 칼시뉴린은 Crz1p를 탈인산화시켜 세포질로부터 핵으로의 빠른 전이(translocation)을 야기한다. 이후, Crz1p는 세포 생존과 관련된 유전자들의 전사를 활성화시킨다(Cyert, 2003; Panadero, *et al.*, 2007). CRZ1은 에탄올-유도된 칼시뉴린/Crz1 경로에서의 기능을 통해 에탄올 스트레스 하에서 세포 성장에 중요하다(Araki, *et al.*, 2009). 한편, 칼시뉴린은 Msn2p의 분해를 증가시켜 스트레스-반응 엘리먼트(stress-response element, STRE)를 가지는 유전자들의 불충분한 유도를 야기한다(Takatsume, *et al.*, 2010). 따라서, 칼시뉴린-Crz1p 경로가 효모에서 에탄올-보호성 기작으로 기능하는 지 여부는 논쟁의 여지가 있다. CMP2 핵-아웃이 증가된 에탄올 저항성을 초래한다는 본 발명의 결과는 후자를 지지한다. 한편, IMD4는 GMP 생합성의 첫 번째 단계를 촉매하는 이노신 모노포스페이트 디하이드로게나제(IMPDH)의 이소자임을 인코딩한다. 사카로미세스 세레비지에의 에탄올 저항성에 관련된 IMD4에 대한 보고는 없다. 하지만, 젯산 박테리아인 오에노코커스 오에니(*Oenococcus oeni*)에서 에탄올 스트레스는 IMPDH의 레벨을 감소시켜 니코틴아미드 뉴클레오타이드의 생산을 감소시킴으로써 글루타티온 환원효소의 유도를 초래하여 NADPH 레벨의 감소를 야기한다(Silveira, *et al.*, 2004). 이는 레독스 밸런스의 유지가 에탄올 적응(ethanol adaptation)에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다(Bro, 2006; Silveira, *et al.*, 2004). 따라서, 비록 IMD4의 기능이 사카로미세스 세레비지에서 확인될 필요가 있을 지라도 CMP2 및 IMD4 모두가 에탄올 저항성에 중요할 것이다.

[0090] DLD3는 미토콘드리아 손상에 의해 자극되어 발현되는 유전자들로 구성된 레트로등급 레굴론의 한 부분으로, D-락테이트 디하이드로게나제를 인코딩 한다. 현재까지 스트레스 저항성에 대한 이 유전자의 관련성에 대한 보고는 없다.

[0091] MSN2는 일반적인 스트레스 반응을 조절하는 전사인자를 인코딩한다(Mart, *et al.*, 1996; Schmitt, *et al.*, 1996). Msn2p와 41%의 동일성을 가지는 Msn4p와 연계하여 Msn2p는 열 및 고농도 에탄올을 포함한 여러 스트레스에 반응하는 약 200개의 유전자들의 발현을 이들 유전자들의 프로모터에 위치한 스트레스-반응 엘리먼트(Stress-response element, STRE)에 결합함으로써 조절한다(Causton, *et al.*, 2001; Gasch, *et al.*, 2000; Mart, *et al.*, 1996). MSN4 유전자 발현은 스트레스에 의해 유도되는 반면에, MSN2 유전자는 항상 발현된다(Gasch, *et al.*, 2000). msn2 및 msn4의 단일염기 결실 돌연변이는 어떠한 표현형도 나타내지 않지만, msn2 및 msn4 이중 널 돌연변이(double null mutants)는 탄소원 결핍(starvation), 열충격, 삼투 스트레스 및 산화 스트레스에 과민반응성을 나타낸다. MSN2 및 MSN4 유전자의 과다-발현은 결핍 및 열 스트레스에 대한 민감성을 감소시킨다(Estruch, *et al.*, 1993). 따라서, MSN2 및 MSN4는 비록 각각 특이 유전자들 및 특정 스트레스 조건에 따라 다를 지라도, 많은 생물학적 반응들에서 한 팀으로 기능한다(Fujita, *et al.*, 2006). 에탄올 저항성과 관련하여, MSN2의 과다-발현은 셰이크 효모 스트레인에서 에탄올 저항성을 촉진시키고 발효능을 증진시킨다(Watanabe, *et al.*, 2009). 본 연구에서, MSN2 핵-아웃은 이전 연구들과는 상충하는 표현형(증가된 에탄올 저항성)을 나타냈다. Msn2p는 에탄올 저항성과 관련된 유전자들에 대한 음성 조절자로서 기능하는 것이 가능하다.

또한, Msn2p 및 Msn4p는 스트레스 반응에서 부분적으로 중복된(redundant) 기능을 가진다(Estruch, *et al.*, 1993). 이런 맥락에서, 본 발명자들은 MSN4가 MSN2 핵-아웃 스트레인에서 MSN2를 대신하여 에탄올 스트레스 반응을 조절한다는 것을 제안한다.

[0092] 본 연구는 증가된 에탄올-저항성을 책임지는 4개의 유전자들(CMP2, IMD4, DLD3 및 MSN2)을 밝혔다. 상술한 표현형을 나타낸다는 보고는 아직까지 없었다. 상술한 유전들 간의 내적연관성(interrelationship)은 기재된(annotated) 기능들로부터 유추될 수 없었다. 하지만, CMP2 및 MSN2는 세포 경로에 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 에탄올 저항성에 관계된 분자 기작을 이해하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다. 특히, 동정된 유일한 전사인자인 Msn2p는 에탄올 저항성을 책임지는 유전자들을 음적으로 조절하기 때문에 관심의 대상이다.

[0093] 결론적으로, 에탄올 스트레스에 대한 증가된 저항성을 가지는 스트레인을 개발하고자 하는 목적들 중 하나는 스트레스에 대한 저항성에 포함된 기작을 이해하는 것 이외에 산업적 적용에 대한 정보를 제공하는 것이다. 본 연구에서 동정된 신규한 유전자들은 에탄올 생산 능력의 측면에서 산업적 효모 스트레인을 개선하는 데 유용할 것이다. 또한, 본 연구는 트랜스포존 돌연변이유발법이 발현 레벨이 저항성 결정인자(tolerance determinant)인 유전자들의 동정에 특히 유용하다는 것을 실증하였다.

[0094] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였던 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0095] 참고문헌

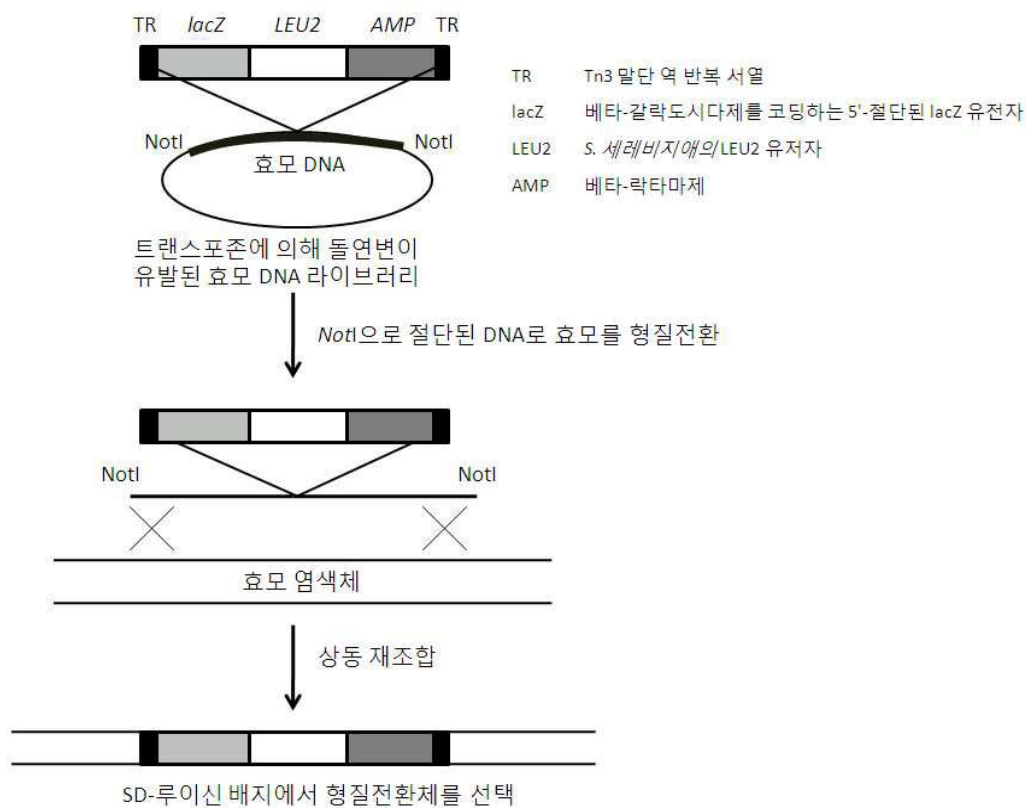
- [0096] Araki, Y., H. Wu, H. Kitagaki, T. Akao, H. Takagi, and H. Shimoi. Ethanol stress stimulates the Ca^{2+} -mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107: 1-6(2009).
- [0097] Auesukaree, C., *et al.*, Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet*, 50(3): 301310(2009).
- [0098] Bro, C., B. Regenber, J. F., and J. Nielsen. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.*, 8: 102-111(2006).
- [0099] Casey, G. P., *et al.*, ETHANOL TOLERANCE IN YEASTS. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol 13(3): 219-280(1986).
- [0100] Causton, H. C., B. Ren, S. S. Koh, C. T. Harbison, E. Kanin, E. G. Jennings, T. I. Lee, H. L. True, E. S. Lander, and R. A. Young. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 12: 323-337(2001).
- [0101] Coote, P. J., M. V. Jones, I. J. Seymour, D. L. Rowe, D. P. Ferdinando, A. J. McArthur, and M. B. Cole. Activity of the plasma membrane H^{+} -ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 140: 1881-1890(1994).
- [0102] Cyert, M. S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311: 1143-1150(2003).
- [0103] Estruch, F., and M. Carlson. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 3872-3881(1993).
- [0104] Fujita, K., *et al.*, The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. FEMS Yeast Research, Vol 6(5): 744-750(2006).
- [0105] Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Elisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 11: 4241-4257(2000).

- [0106] Hirasawa, T., *et al.*, Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *Journal of Biotechnology*, 131: 3444(2007).
- [0107] Inoue, T., *et al.*, Cloning and Characterization of a Gene Complementing the Mutation of an Ethanol-sensitive Mutant of Sake Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(2): 229-236(2000).
- [0108] Kajiwar, S., *et al.*, Overexpression of the OLE1 gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 568-574(2000).
- [0109] Kim, J., *et al.*, Disruption of the Yeast ATH1 Gene Confers Better Survival after Dehydration, Freezing, and Ethanol Shock: Potential Commercial Applications. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 62(5): 1563-1569(1996).
- [0110] K, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67: 225-257(2005).
- [0111] Ma, M., and Z. L. Liu. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87: 829-845(2010).
- [0112] Mart, M. T., G. Marchler, C. Sch, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, and F. Estruch. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.*, 15:2227-2235(1996).
- [0113] Okuyama, H., and M. Saito. Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. *J. Biol. Chem.*, 254: 12281-12284(1979).
- [0114] Panadero, J., M. J. Hern, J. A. Prieto, and F. Randez-Gil. Overexpression of the calcineurin target *CRZ1* provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 4824-4831(2007).
- [0115] Schmitt, A. P., and K. McEntee. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5777-5782(1996).
- [0116] Schubert, C. Can biofuels finally take center stage? *Nat. Biotechnol.* 24:777-784 (2006).
- [0117] Silveira, M. G., M. Baumg, F. M. Rombouts, and T. Abee. Effects of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2748-2755(2004).
- [0118] Suutari, M., K. Liukkonen, and S. Laakso. Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1469-1474(1990).
- [0119] Suutari, M. and S. Laakso. Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(4): 255-328(1994).
- [0120] Takagi, H., *et al.*, Effect of L-Proline on Sake Brewing and Ethanol Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 71(12): 8656-8662(2005).
- [0121] Takahashi, T., *et al.*, Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, Vol 265(6): 1112-1119(2001).
- [0122] Takatsume, Y., T. Ohdate, K. Maeta, W. Nomura, S. Izawa, and Y. Inoue. Calcineurin/Crz1 destabilizes Msn2 and Msn4 in the nucleus in response to Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 427: 275-287(2010).
- [0123] Teixeira, MC., *et al.*, Genome-Wide Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 75(18): 5761-5772(2009).

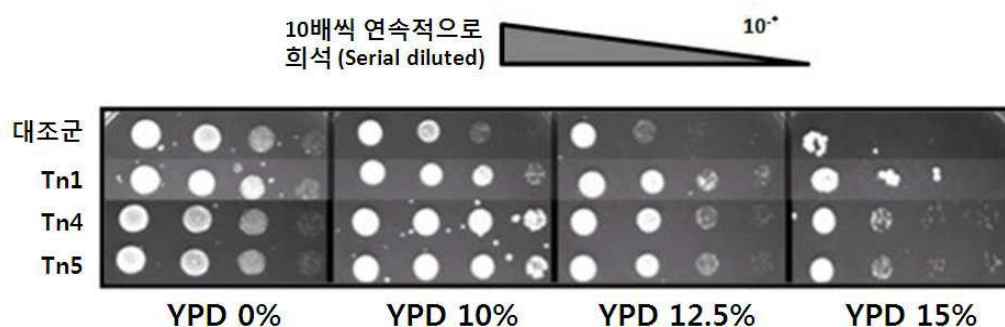
- [0124] Watanabe, M., D. Watanabe, T. Akao, and H. Shimoi. Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, 107: 516-518(2009).
- [0125] Yoshikawa, K., *et al.*, Genome-Wide Analysis of the Effects of Location and Number of Stress Response Elements on Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, vol 106(5): 507-510(2008).
- [0126] Yoshikawa, K., T. Tadamasu, C. Furusawa, K. Nagahisa, T. Hirasawa, and H. Shimizu. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9: 32-44(2009).
- [0127] You, K. M., *et al.*, Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 69(3): 1499-1503(2003).

도면

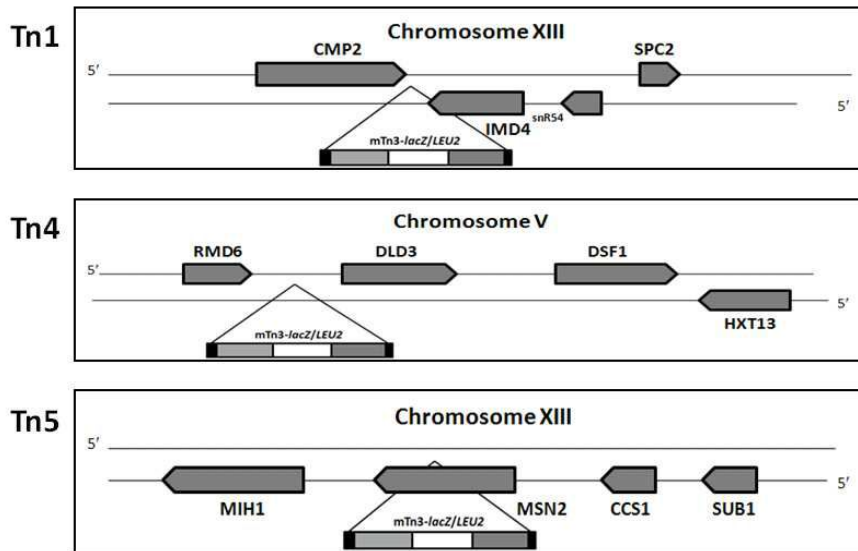
도면1



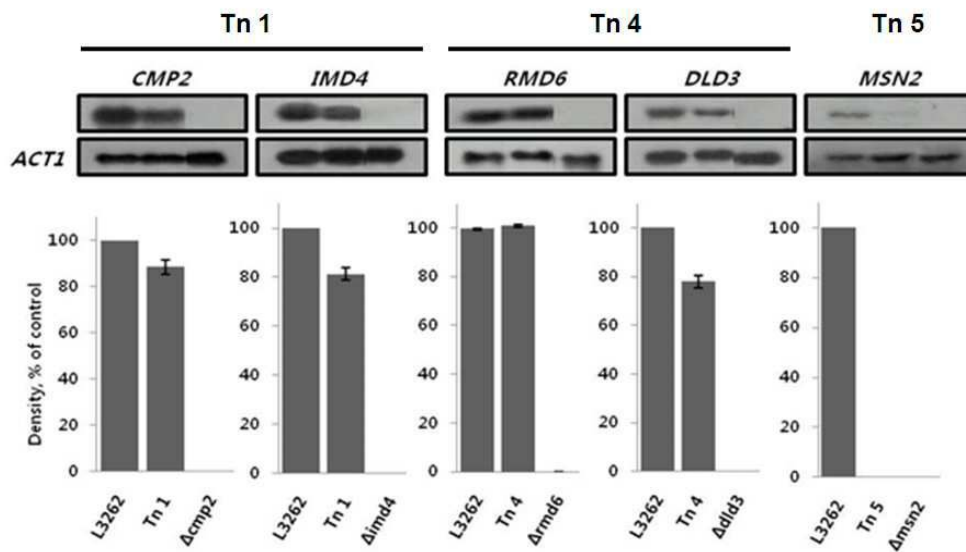
도면2



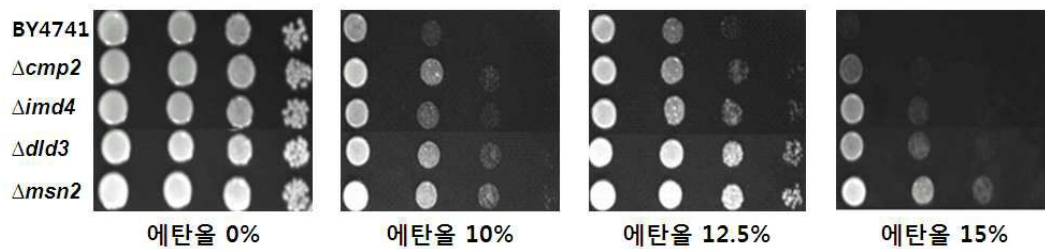
도면3



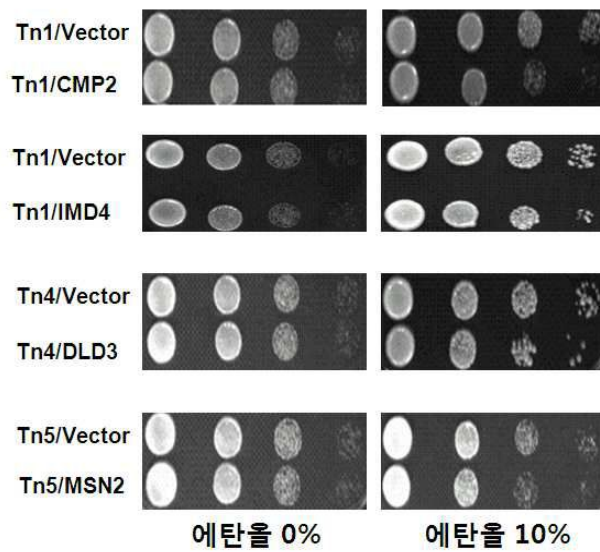
도면4



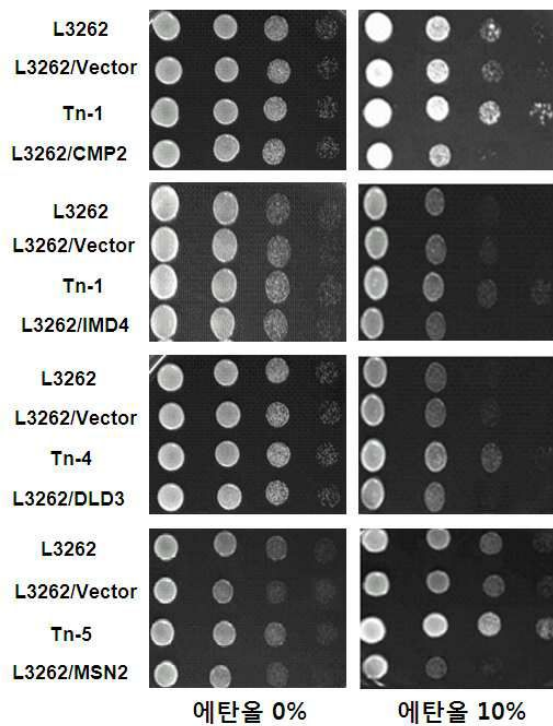
도면5



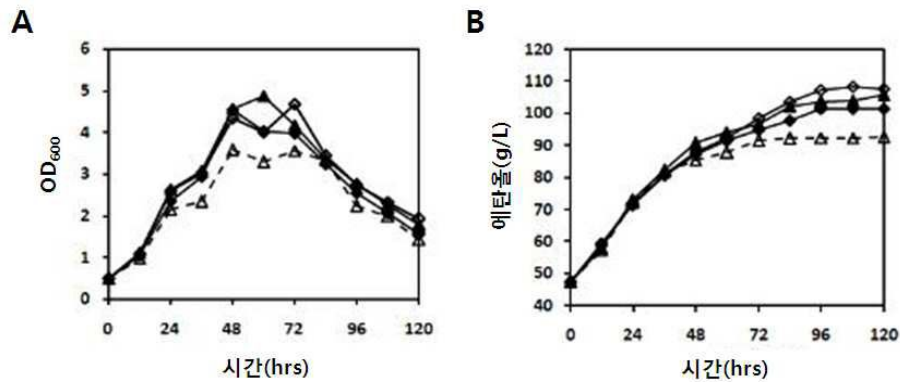
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Ewha Womens University

<120> Ethanol-Tolerant Yeast Strains and Genes Thereof

<130> PN100242D

<150> KR 10-2010-0038140

<151> 2010-04-23

<160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1815

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

atgtcttcag acgtataag aaatactgag cagataaacg ccgctattaa aattatagaa 60

aacaaaacag agcgtccga atcgtccaca acccctatag attcgaaggc tagtacagtt 120

gtgtctgcta attccacggc cacagaaact tccagagacc ttacacaata taccctagat 180

gacggaagag tcgtatcgac aaaccgcaga ataatagaata aagtccccgc catcacgtca 240

catgttccta cagatgaaga gctgttccag cccaatggga tacctcgtca cgaattccta 300

agagatcatt tcaagcgca gggcaaattg tcggctgcgc aggcggccag gatcgttaca 360

cttgcaacgg aactcttcag caaagaaccc aaccttatat ctgttcccgc cccaatcaca 420

gtttgcggtg atatccatgg ccagtacttt gaccttttga agctattcga agttggcgga 480

gatccggcca ctacatcgta tttgttcttg ggagactatg tcgacagagg gtccttttcg 540

tttgagtgtc ttattttatt atattctttg aagctgaatt ttaacgacca tttctggcta 600

ctgaggggta accacgaatg taagcatcta acgtcatatt tcactttcaa aaatgaaatg 660

ctgcacaagt acaatctaga tatttacgag aaatgctgcg aatcgtttaa caacttgccc 720
ctggctgctg taatgaacgg acagtatctt tgtgttcacg gtggtatata tcccgagtta 780
aactctttac aggacattaa caacctaaat agattcaggg agattccctc tcatggcctg 840
atgtgtgacg tgttgtgggc tgacccgatt gaagagtacg acgaagtctt ggataaagac 900
ttgactgagg aagacatagt gaactccaaa accatgggtc ctcatcatgg caagatggca 960
ccttcaaggg atatgtttgt cccaaactca gtaaggggct gttcatatgc ctacacgtat 1020

cgtgctgctg gccattttct gcaagagact ggctgttgt ccatcatcag ggcacacgag 1080
gctcaagacg ctggttatag aatgtacaaa aataccaaga ctttgggctt tccctctctt 1140
ttgacctttt tcagtgcgcc taactacttg gacacctaca ataataaggc tgccatattg 1200
aaatacgaag ataatgttat gaatatcaga caattcaaca tgactccaca cccctattgg 1260
ttaccagatt tcatggacgt ttacacgtgg tcttgccat ttgttggtga aaaagttaca 1320
gagatgcttg tcgcaattct aaacatctgt actgaagatg agctggaaaa cgacaccccc 1380
gtcattgaag aattagtggg taccgataaa aaattgccac aagctggtta gtcggaagca 1440

actccacaac cagccacttc ggcgtcgctt aaacatgctt ccattttaga tgacgaacat 1500
cgaaggaaag cttacgaaa taagattctg gccgtcgcca aagtttcag aatgtattct 1560
gttctcagag aagaaaccaa taaagttcag tttttaaag atcacaattc aggcgtgttg 1620
ccacgtggcg ctttatctaa tgggtgtaaag ggtttagatg aagccctgtc tacctttgaa 1680
agggcaagaa agcacgattt aattaatgaa aaattaccgc cttactaga cgaactgaaa 1740
aacgaaaata agaagtacta cgaaaaagt tggcagaaaag tacatgaaca tgatgcaaag 1800
aatgatagca aatag 1815

<210> 2

<211> 1575

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

atgagtgtg ctccattgga ttacaaaaag gctttagaac atttgaagac atacagttcc 60
aaggacggtc tttctgtcca ggaattgatg gactccacaa ctagagggtg gttgacctac 120
aatgatTTTT tggctttacc aggcttggc aatttcccat cttctgctgt cagtttgcaa 180
accaaattga ccaagaaaat cactttgaac actccttttg tctcttctcc tatggacaca 240
gtcactgaag ctgatatggc ttttatatg gctttattgg gtggtattgg tttcatccat 300
cacaactgta ctccaaagga acaggcttcc atggtcaaga aagttaaaat gtttgaaaac 360

ggtttcatca attctccaat agtaatttct ccaaccacca ctgttgggtga agttaaggtt 420
atgaagagaa agtttgggtt ctctggcttc ccagttactg aagacggtaa gtgtccaggt 480
aagttagttg ggtagtcac ctctcgtgat atacaattct tagaagatga ttctttgggt 540
gtttctgaag tcatgactaa aaatccagtt actggcatca agggatttac ttgaaagaa 600
ggtaatgaaa tcctaaaaca aaccaagaaa ggtaaattgc ttatcgttga tgataacggt 660
aacctcgttt ccatgttgtc aagagcggat ttgatgaaga atcaaaacta cccgttagct 720
tctaaatccg ccaccaccaa gcaattgcta tgtgggtctg caattggtac tatcgaagct 780

gataaggaaa gattaagact attagtcgaa gcaggtttgg atgttgttat cttagattcc 840
tctcaaggta actctgtttt ccaattgaac atgatcaaat ggattaaaga aactttccca 900
gatttggaaa tcattgctgg taacgttgcc accagagaac aagctgctaa cttgattgct 960
gccggtgccg atggtttaag aattggatg ggttctgggt ctatttgtat cactcaagaa 1020
gttatggctt gtggtagacc acaaggtaaca gctgtctaca acgtttgtca atttgctaac 1080
caatttggcg ttccatgtat ggctgatggt ggtgtccaaa acattggcca catcaccaag 1140
gctttggccc ttggttcctc caccgtcatg atgggtggta tgtagctgg tactaccgag 1200

tcaccagggtg aatacttcta caaggatggt aagagattga aggcttatcg tggatatgggg 1260
tccattgacg ccatgcaaaa gaccggtaac aagggtaatg cctctacttc tcgttatttc 1320
tctgagtcag acagtgtctt gggtgcacaa ggtgtttctg gggtgtcgt agacaaaggt 1380
tccatcaaga agtttatcc atattgtac aacggtttac aacattcttg tcaagacatt 1440
ggttgcgaat ctctaacttc attgaaagag aatgttcaaa atggtgaagt tagatttgaa 1500
ttcagaaccg ctctgctca attagaaggt ggtgtccata attgcactc ctatgaaaaa 1560
cgtctataca attga 1575

<210> 3

<211> 1491

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 3

atgacggccg cacatcctgt tgetcagtt actgccgagg cataccctaa agtcaagaga 60
aacccaaatt tcaaagtct cgactcggaa gatttggcgt acttctgttc gattttgtca 120
aatgatgaaa tcttaaacct tcaagctcca gaagagcttg cttcgtttaa ccaggactgg 180
atgaaaaaat atagaggcca gtccaattta attctcttgc caaactccac tgataaagtg 240
tccaagatta tgaataactg taacgataaa aagtggcag tagtaccaca aggtggtaac 300

accgacttgg tcggagcctc tggtccggtt tttgatgaga ttgttctttc tctaagaaat	360
atgaacaaag tcagagattt tgatccagtt agcgggactt tcaagtgtga cgcgggtgtc	420
gttatgcgtg atgcgcatac atttttacac gaccatgacc atatcttccc attggatctg	480
ccttctagaa acaactgtca agtgggcggt gtagtttcaa caaatgcagg tggtttgaac	540
tttttaagat atgggtctct acacggtaat gttttgggtt tggaagtggg gctaccaac	600
ggtgagatta tcagcaatat caatgcccta aggaaggaca atactggtta tgacttgaaa	660
caattattca tcggtgcaga ggggtactatc ggtgtcgtta ctgggtgtatc catagttgca	720
gcagcaaagc caaaagcctt gaatgccgta ttttttggtt ttgagaattt cgataccgtt	780
cagaaattat ttgtcaaggc taaaagtga ttatctgaga ttttatctgc ttttgaattc	840
atggaccgtg gctccattga atgtacgata gaatacttga aggacttgcc tttccctctg	900
gagaaccaac acaactttta tggtcttatt gaaacgtcag ggtccaataa gagacacgac	960
gatgagaagc tgactgcttt cctcaaagat accacagatt ctaaattaat ttcggagggt	1020
atgatggcta aggacaaagc cgattttgat agactttgga cctggagaaa atctgttcca	1080
acagcttgta attcttacgg tggatatgtac aagtatgaca tgtcacttca attgaaagat	1140
ttatatccg tatctgcggc tgtgacggag agattaaacg cagccggttt gattggtgat	1200
gcacaaaaac cagttgttaa atcatgtggt tatggtcattg tcggtgacgg aaacatccat	1260
ttaaatatcg cggaagaga atttataaaa cagattgagg acttactaga accatttgtt	1320
tatgaatata ttgcatcaaa gaaagggtcc atcagtctg agcatgggat cggtttccat	1380
aagaaaggta agttacta caccagaagt gatattgaaa ttagatttat gaaggatc	1440
aaaaatcact acgatccaaa tggaatctta aaccataca agtacatttg a	1491
<210> 4	
<211> 2115	
<212> DNA	
<213> Saccharomyces cerevisiae	
<400> 4	
atgacggtcg accatgattt caatagcgaa gatattttat tcccataga aagcatgagt	60
agtatacaat acgtggagaa taataacca aataatatta acaacgatgt tatccgtat	120
tctctagata tcaaaaacac tgtcttagat agtgcggatc tcaatgacat tcaaaatcaa	180
gaaacttcac tgaatttggg gcttctcca ctatcttctg actctccact gcccgtaacg	240
gaaacgatac catccactac cgataacagc ttgcatttga aagctgatag caacaaaaat	300
cgcatgcaa gaactattga aaatgatagt gaaattaaga gtactaataa tgctagtggc	360

tctggggcaa atcaatacac aactcttact tcaccttata ctatgaacga cattttgtac	420
aacatgaaca atccgttaca atcacctca ccttcacggt tacctcaaaa tccgactata	480
aatcctccca taaatacagc aagtaacgaa actaatttat cgcctcaaac ttcaaagtgt	540
aatgaaactc ttatatctcc tcgagcccaa caacatacgt ccattaaaga taatcgtctg	600
tccttaccta atgggtgctaa ttcgaaatctt ttcatgaca ctaacccaaa caatttgaac	660
gaaaaactaa gaaatcaatt gaactcagat acaaatcat attctaactc cattttctaat	720
tcaaactcca attctacggg taattttaa tccagttatt ttaattcact gaacatagac	780
tccatgctag atgattacgt ttctagtgat ctcttatga atgatgatga tgatgacact	840
aatttatcac gccgaagatt tagcgacgtt ataacaaacc aatttcgctc aatgacaaat	900
tcgaggaatt ctatttctca ctctttggac ctttgaacc atccgaaaat taatccaagc	960
aatagaaata caaatctcaa tatcactact aattctacct caagttccaa tgcaagtccg	1020
aataccacta ctatgaacgc aaatgcagac tcaaatattg ctggcaaccc gaaaaacaat	1080
gacgctacca tagacaatga gttgacacag attcttaacg aatataatat gaacttcaac	1140
gataatttgg gcacatccac ttctggcaag aacaaatctg cttgccaag ttcttttgat	1200
gccaatgcta tgacaaagat aaatccaagt cagcaattac agcaacagct aaaccgagtt	1260
caacacaagc agctcacctc gtcacataat aacagtagca ctaacatgaa atccttcaac	1320
agcgatcttt attcaagaag gcaaagagct tctttacca taatcgatga ttcactaagc	1380
tacgacctgg ttaataagca ggatgaagac cccaagaacg atatgctgcc gaattcaaat	1440
ttgagttcat ctcaacaatt tatcaaacgg tctatgattc tttcagacaa tgcgtccgtt	1500
attgcgaaag tggcgactac aggcttgagt aatgatatgc catttttgac agaggaaggt	1560
gaacaaaatg ctaattctac tccaaatttc gatctttcca tcaactcaat gaatatggct	1620
ccattatcgc ctgcatcacc atcctccacg tctcttgcaa caaatcattt ctatcaccat	1680
ttcccacagc agggtcacca taccatgaac tctaaaatcg gttcttcctt tcggaggcgg	1740
aagtctgctg tgcctttgat gggtacggtg ccgcttaca atcaacaaaa taatataagc	1800
agtagtagtg tcaactcaac tggcaatggt gctggggtta cgaaggaaag aaggccaagt	1860
tacaggagaa aatcaatgac accgtccaga agatcaagtg tcgtaataga atcaacaaag	1920
gaactcgagg agaaaccgtt ccactgtcac atttgtcca agagctttta gcgcagcgaa	1980
catttgaaaa ggcatgtgag atctgttcac tctaacgaac gaccatttgc ttgtcacata	2040
tgcgataaga aatttagtag aagcgataat ttgtcgcaac acatcaagac tcataaaaaa	2100

catggagaca tttaa

2115

<210> 5

<211> 604

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

Met Ser Ser Asp Ala Ile Arg Asn Thr Glu Gln Ile Asn Ala Ala Ile

1 5 10 15

Lys Ile Ile Glu Asn Lys Thr Glu Arg Pro Gln Ser Ser Thr Thr Pro

20 25 30

Ile Asp Ser Lys Ala Ser Thr Val Ala Ala Ala Asn Ser Thr Ala Thr

35 40 45

Glu Thr Ser Arg Asp Leu Thr Gln Tyr Thr Leu Asp Asp Gly Arg Val

50 55 60

Val Ser Thr Asn Arg Arg Ile Met Asn Lys Val Pro Ala Ile Thr Ser

65 70 75 80

His Val Pro Thr Asp Glu Glu Leu Phe Gln Pro Asn Gly Ile Pro Arg

85 90 95

His Glu Phe Leu Arg Asp His Phe Lys Arg Glu Gly Lys Leu Ser Ala

100 105 110

Ala Gln Ala Ala Arg Ile Val Thr Leu Ala Thr Glu Leu Phe Ser Lys

115 120 125

Glu Pro Asn Leu Ile Ser Val Pro Ala Pro Ile Thr Val Cys Gly Asp

130 135 140

Ile His Gly Gln Tyr Phe Asp Leu Leu Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly

145 150 155 160

Asp Pro Ala Thr Thr Ser Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg

165 170 175

Gly Ser Phe Ser Phe Glu Cys Leu Ile Tyr Leu Tyr Ser Leu Lys Leu

180 185 190

Asn Phe Asn Asp His Phe Trp Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Lys

195 200 205
 His Leu Thr Ser Tyr Phe Thr Phe Lys Asn Glu Met Leu His Lys Tyr
 210 215 220
 Asn Leu Asp Ile Tyr Glu Lys Cys Cys Glu Ser Phe Asn Asn Leu Pro
 225 230 235 240
 Leu Ala Ala Leu Met Asn Gly Gln Tyr Leu Cys Val His Gly Gly Ile
 245 250 255
 Ser Pro Glu Leu Asn Ser Leu Gln Asp Ile Asn Asn Leu Asn Arg Phe
 260 265 270

 Arg Glu Ile Pro Ser His Gly Leu Met Cys Asp Leu Leu Trp Ala Asp
 275 280 285
 Pro Ile Glu Glu Tyr Asp Glu Val Leu Asp Lys Asp Leu Thr Glu Glu
 290 295 300
 Asp Ile Val Asn Ser Lys Thr Met Val Pro His His Gly Lys Met Ala
 305 310 315 320
 Pro Ser Arg Asp Met Phe Val Pro Asn Ser Val Arg Gly Cys Ser Tyr
 325 330 335
 Ala Phe Thr Tyr Arg Ala Ala Cys His Phe Leu Gln Glu Thr Gly Leu

 340 345 350
 Leu Ser Ile Ile Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr Arg Met
 355 360 365
 Tyr Lys Asn Thr Lys Thr Leu Gly Phe Pro Ser Leu Leu Thr Leu Phe
 370 375 380
 Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Thr Tyr Asn Asn Lys Ala Ala Ile Leu
 385 390 395 400
 Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Met Thr Pro
 405 410 415

 His Pro Tyr Trp Leu Pro Asp Phe Met Asp Val Phe Thr Trp Ser Leu
 420 425 430
 Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Ala Ile Leu Asn
 435 440 445
 Ile Cys Thr Glu Asp Glu Leu Glu Asn Asp Thr Pro Val Ile Glu Glu

450 455 460
 Leu Val Gly Thr Asp Lys Lys Leu Pro Gln Ala Gly Lys Ser Glu Ala
 465 470 475 480
 Thr Pro Gln Pro Ala Thr Ser Ala Ser Pro Lys His Ala Ser Ile Leu

 485 490 495
 Asp Asp Glu His Arg Arg Lys Ala Leu Arg Asn Lys Ile Leu Ala Val
 500 505 510
 Ala Lys Val Ser Arg Met Tyr Ser Val Leu Arg Glu Glu Thr Asn Lys
 515 520 525
 Val Gln Phe Leu Lys Asp His Asn Ser Gly Val Leu Pro Arg Gly Ala
 530 535 540
 Leu Ser Asn Gly Val Lys Gly Leu Asp Glu Ala Leu Ser Thr Phe Glu
 545 550 555 560

 Arg Ala Arg Lys His Asp Leu Ile Asn Glu Lys Leu Pro Pro Ser Leu
 565 570 575
 Asp Glu Leu Lys Asn Glu Asn Lys Lys Tyr Tyr Glu Lys Val Trp Gln
 580 585 590
 Lys Val His Glu His Asp Ala Lys Asn Asp Ser Lys
 595 600
 <210> 6
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 6
 Met Ser Ala Ala Pro Leu Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Glu His Leu Lys
 1 5 10 15

 Thr Tyr Ser Ser Lys Asp Gly Leu Ser Val Gln Glu Leu Met Asp Ser
 20 25 30
 Thr Thr Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Val Leu Pro Gly
 35 40 45
 Leu Val Asn Phe Pro Ser Ser Ala Val Ser Leu Gln Thr Lys Leu Thr
 50 55 60

Lys Lys Ile Thr Leu Asn Thr Pro Phe Val Ser Ser Pro Met Asp Thr
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Ala Asp Met Ala Ile Tyr Met Ala Leu Leu Gly Gly Ile
 85 90 95
 Gly Phe Ile His His Asn Cys Thr Pro Lys Glu Gln Ala Ser Met Val
 100 105 110
 Lys Lys Val Lys Met Phe Glu Asn Gly Phe Ile Asn Ser Pro Ile Val
 115 120 125
 Ile Ser Pro Thr Thr Thr Val Gly Glu Val Lys Val Met Lys Arg Lys
 130 135 140
 Phe Gly Phe Ser Gly Phe Pro Val Thr Glu Asp Gly Lys Cys Pro Gly
 145 150 155 160
 Lys Leu Val Gly Leu Val Thr Ser Arg Asp Ile Gln Phe Leu Glu Asp
 165 170 175
 Asp Ser Leu Val Val Ser Glu Val Met Thr Lys Asn Pro Val Thr Gly
 180 185 190
 Ile Lys Gly Ile Thr Leu Lys Glu Gly Asn Glu Ile Leu Lys Gln Thr
 195 200 205
 Lys Lys Gly Lys Leu Leu Ile Val Asp Asp Asn Gly Asn Leu Val Ser
 210 215 220
 Met Leu Ser Arg Ala Asp Leu Met Lys Asn Gln Asn Tyr Pro Leu Ala
 225 230 235 240
 Ser Lys Ser Ala Thr Thr Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile Gly
 245 250 255
 Thr Ile Glu Ala Asp Lys Glu Arg Leu Arg Leu Leu Val Glu Ala Gly
 260 265 270
 Leu Asp Val Val Ile Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Val Phe Gln
 275 280 285
 Leu Asn Met Ile Lys Trp Ile Lys Glu Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ile
 290 295 300
 Ile Ala Gly Asn Val Ala Thr Arg Glu Gln Ala Ala Asn Leu Ile Ala

305 310 315 320
 Ala Gly Ala Asp Gly Leu Arg Ile Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile Cys
 325 330 335
 Ile Thr Gln Glu Val Met Ala Cys Gly Arg Pro Gln Gly Thr Ala Val
 340 345 350
 Tyr Asn Val Cys Gln Phe Ala Asn Gln Phe Gly Val Pro Cys Met Ala
 355 360 365
 Asp Gly Gly Val Gln Asn Ile Gly His Ile Thr Lys Ala Leu Ala Leu

 370 375 380
 Gly Ser Ser Thr Val Met Met Gly Gly Met Leu Ala Gly Thr Thr Glu
 385 390 395 400
 Ser Pro Gly Glu Tyr Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Arg Leu Lys Ala Tyr
 405 410 415
 Arg Gly Met Gly Ser Ile Asp Ala Met Gln Lys Thr Gly Asn Lys Gly
 420 425 430
 Asn Ala Ser Thr Ser Arg Tyr Phe Ser Glu Ser Asp Ser Val Leu Val
 435 440 445

 Ala Gln Gly Val Ser Gly Ala Val Val Asp Lys Gly Ser Ile Lys Lys
 450 455 460
 Phe Ile Pro Tyr Leu Tyr Asn Gly Leu Gln His Ser Cys Gln Asp Ile
 465 470 475 480
 Gly Cys Glu Ser Leu Thr Ser Leu Lys Glu Asn Val Gln Asn Gly Glu
 485 490 495
 Val Arg Phe Glu Phe Arg Thr Ala Ser Ala Gln Leu Glu Gly Gly Val
 500 505 510
 His Asn Leu His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Tyr Asn

 515 520
 <210> 7
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 7

Met Thr Ala Ala His Pro Val Ala Gln Leu Thr Ala Glu Ala Tyr Pro
1 5 10 15
Lys Val Lys Arg Asn Pro Asn Phe Lys Val Leu Asp Ser Glu Asp Leu
20 25 30
Ala Tyr Phe Arg Ser Ile Leu Ser Asn Asp Glu Ile Leu Asn Ser Gln
35 40 45
Ala Pro Glu Glu Leu Ala Ser Phe Asn Gln Asp Trp Met Lys Lys Tyr
50 55 60
Arg Gly Gln Ser Asn Leu Ile Leu Leu Pro Asn Ser Thr Asp Lys Val
65 70 75 80
Ser Lys Ile Met Lys Tyr Cys Asn Asp Lys Lys Leu Ala Val Val Pro
85 90 95
Gln Gly Gly Asn Thr Asp Leu Val Gly Ala Ser Val Pro Val Phe Asp
100 105 110
Glu Ile Val Leu Ser Leu Arg Asn Met Asn Lys Val Arg Asp Phe Asp
115 120 125
Pro Val Ser Gly Thr Phe Lys Cys Asp Ala Gly Val Val Met Arg Asp
130 135 140
Ala His Gln Phe Leu His Asp His Asp His Ile Phe Pro Leu Asp Leu
145 150 155 160
Pro Ser Arg Asn Asn Cys Gln Val Gly Gly Val Val Ser Thr Asn Ala
165 170 175
Gly Gly Leu Asn Phe Leu Arg Tyr Gly Ser Leu His Gly Asn Val Leu
180 185 190
Gly Leu Glu Val Val Leu Pro Asn Gly Glu Ile Ile Ser Asn Ile Asn
195 200 205
Ala Leu Arg Lys Asp Asn Thr Gly Tyr Asp Leu Lys Gln Leu Phe Ile
210 215 220
Gly Ala Glu Gly Thr Ile Gly Val Val Thr Gly Val Ser Ile Val Ala
225 230 235 240
Ala Ala Lys Pro Lys Ala Leu Asn Ala Val Phe Phe Gly Ile Glu Asn
245 250 255

Phe Asp Thr Val Gln Lys Leu Phe Val Lys Ala Lys Ser Glu Leu Ser

260 265 270
Glu Ile Leu Ser Ala Phe Glu Phe Met Asp Arg Gly Ser Ile Glu Cys

275 280 285
Thr Ile Glu Tyr Leu Lys Asp Leu Pro Phe Pro Leu Glu Asn Gln His

290 295 300
Asn Phe Tyr Val Leu Ile Glu Thr Ser Gly Ser Asn Lys Arg His Asp
305 310 315 320

Asp Glu Lys Leu Thr Ala Phe Leu Lys Asp Thr Thr Asp Ser Lys Leu
325 330 335

Ile Ser Glu Gly Met Met Ala Lys Asp Lys Ala Asp Phe Asp Arg Leu
340 345 350

Trp Thr Trp Arg Lys Ser Val Pro Thr Ala Cys Asn Ser Tyr Gly Gly
355 360 365

Met Tyr Lys Tyr Asp Met Ser Leu Gln Leu Lys Asp Leu Tyr Ser Val
370 375 380

Ser Ala Ala Val Thr Glu Arg Leu Asn Ala Ala Gly Leu Ile Gly Asp
385 390 395 400

Ala Pro Lys Pro Val Val Lys Ser Cys Gly Tyr Gly His Val Gly Asp

405 410 415
Gly Asn Ile His Leu Asn Ile Ala Val Arg Glu Phe Thr Lys Gln Ile

420 425 430
Glu Asp Leu Leu Glu Pro Phe Val Tyr Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Lys

435 440 445
Gly Ser Ile Ser Ala Glu His Gly Ile Gly Phe His Lys Lys Gly Lys

450 455 460
Leu His Tyr Thr Arg Ser Asp Ile Glu Ile Arg Phe Met Lys Asp Ile

465 470 475 480

Lys Asn His Tyr Asp Pro Asn Gly Ile Leu Asn Pro Tyr Lys Tyr Ile
485 490 495

<210> 8

<211> 704

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

Met Thr Val Asp His Asp Phe Asn Ser Glu Asp Ile Leu Phe Pro Ile

1 5 10 15

Glu Ser Met Ser Ser Ile Gln Tyr Val Glu Asn Asn Asn Pro Asn Asn

20 25 30

Ile Asn Asn Asp Val Ile Pro Tyr Ser Leu Asp Ile Lys Asn Thr Val

35 40 45

Leu Asp Ser Ala Asp Leu Asn Asp Ile Gln Asn Gln Glu Thr Ser Leu

50 55 60

Asn Leu Gly Leu Pro Pro Leu Ser Phe Asp Ser Pro Leu Pro Val Thr

65 70 75 80

Glu Thr Ile Pro Ser Thr Thr Asp Asn Ser Leu His Leu Lys Ala Asp

85 90 95

Ser Asn Lys Asn Arg Asp Ala Arg Thr Ile Glu Asn Asp Ser Glu Ile

100 105 110

Lys Ser Thr Asn Asn Ala Ser Gly Ser Gly Ala Asn Gln Tyr Thr Thr

115 120 125

Leu Thr Ser Pro Tyr Pro Met Asn Asp Ile Leu Tyr Asn Met Asn Asn

130 135 140

Pro Leu Gln Ser Pro Ser Pro Ser Ser Val Pro Gln Asn Pro Thr Ile

145 150 155 160

Asn Pro Pro Ile Asn Thr Ala Ser Asn Glu Thr Asn Leu Ser Pro Gln

165 170 175

Thr Ser Asn Gly Asn Glu Thr Leu Ile Ser Pro Arg Ala Gln Gln His

180 185 190

Thr Ser Ile Lys Asp Asn Arg Leu Ser Leu Pro Asn Gly Ala Asn Ser

195 200 205

Asn Leu Phe Ile Asp Thr Asn Pro Asn Asn Leu Asn Glu Lys Leu Arg

210 215 220

Asn Gln Leu Asn Ser Asp Thr Asn Ser Tyr Ser Asn Ser Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Ser Asn Ser Asn Ser Thr Gly Asn Leu Asn Ser Ser Tyr Phe Asn Ser
 245 250 255

 Leu Asn Ile Asp Ser Met Leu Asp Asp Tyr Val Ser Ser Asp Leu Leu
 260 265 270
 Leu Asn Asp Asp Asp Asp Asp Thr Asn Leu Ser Arg Arg Arg Phe Ser
 275 280 285
 Asp Val Ile Thr Asn Gln Phe Pro Ser Met Thr Asn Ser Arg Asn Ser
 290 295 300
 Ile Ser His Ser Leu Asp Leu Trp Asn His Pro Lys Ile Asn Pro Ser
 305 310 315 320
 Asn Arg Asn Thr Asn Leu Asn Ile Thr Thr Asn Ser Thr Ser Ser Ser

 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Asn Thr Thr Thr Met Asn Ala Asn Ala Asp Ser Asn
 340 345 350
 Ile Ala Gly Asn Pro Lys Asn Asn Asp Ala Thr Ile Asp Asn Glu Leu
 355 360 365
 Thr Gln Ile Leu Asn Glu Tyr Asn Met Asn Phe Asn Asp Asn Leu Gly
 370 375 380
 Thr Ser Thr Ser Gly Lys Asn Lys Ser Ala Cys Pro Ser Ser Phe Asp
 385 390 395 400

 Ala Asn Ala Met Thr Lys Ile Asn Pro Ser Gln Gln Leu Gln Gln Gln
 405 410 415
 Leu Asn Arg Val Gln His Lys Gln Leu Thr Ser Ser His Asn Asn Ser
 420 425 430
 Ser Thr Asn Met Lys Ser Phe Asn Ser Asp Leu Tyr Ser Arg Arg Gln
 435 440 445
 Arg Ala Ser Leu Pro Ile Ile Asp Asp Ser Leu Ser Tyr Asp Leu Val
 450 455 460
 Asn Lys Gln Asp Glu Asp Pro Lys Asn Asp Met Leu Pro Asn Ser Asn

465 470 475 480
 Leu Ser Ser Ser Gln Gln Phe Ile Lys Pro Ser Met Ile Leu Ser Asp
 485 490 495
 Asn Ala Ser Val Ile Ala Lys Val Ala Thr Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 500 505 510
 Met Pro Phe Leu Thr Glu Glu Gly Glu Gln Asn Ala Asn Ser Thr Pro
 515 520 525
 Asn Phe Asp Leu Ser Ile Thr Gln Met Asn Met Ala Pro Leu Ser Pro
 530 535 540

 Ala Ser Ser Ser Ser Thr Ser Leu Ala Thr Asn His Phe Tyr His His
 545 550 555 560
 Phe Pro Gln Gln Gly His His Thr Met Asn Ser Lys Ile Gly Ser Ser
 565 570 575
 Leu Arg Arg Arg Lys Ser Ala Val Pro Leu Met Gly Thr Val Pro Leu
 580 585 590
 Thr Asn Gln Gln Asn Asn Ile Ser Ser Ser Ser Val Asn Ser Thr Gly
 595 600 605
 Asn Gly Ala Gly Val Thr Lys Glu Arg Arg Pro Ser Tyr Arg Arg Lys

 610 615 620
 Ser Met Thr Pro Ser Arg Arg Ser Ser Val Val Ile Glu Ser Thr Lys
 625 630 635 640
 Glu Leu Glu Glu Lys Pro Phe His Cys His Ile Cys Pro Lys Ser Phe
 645 650 655
 Lys Arg Ser Glu His Leu Lys Arg His Val Arg Ser Val His Ser Asn
 660 665 670
 Glu Arg Pro Phe Ala Cys His Ile Cys Asp Lys Lys Phe Ser Arg Ser
 675 680 685

 Asp Asn Leu Ser Gln His Ile Lys Thr His Lys Lys His Gly Asp Ile
 690 695 700