



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0055169
(43) 공개일자 2012년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0116726

(22) 출원일자 2010년11월23일

심사청구일자 2010년11월23일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수
기자촌아파트201-1601호 (방이동)

전은영

서울특별시 중구 퇴계로90길 59-8, C동 402호 (신당동, 동남빌라)

이선희

서울특별시 은평구 불광로6길 10-10, 101호 (불광동)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 12 항

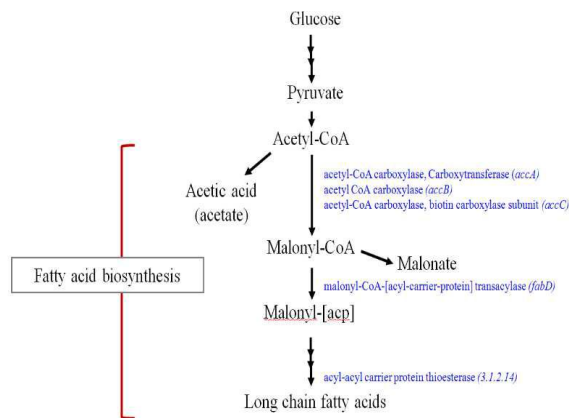
(54) 발명의 명칭 말로닐?C o A와 말로닐? [a c p] 를 이용한 지방산 생합성 경로 과발현용 형질전환 대장균 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 지방산 생합성 경로에 관여하는 효소들을 암호화하는 유전자로 형질전환된 지방산 과발현용 대장균 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 지방산 과발현용 대장균은 유전적 안정성이 높을 뿐만 아니라 지방산의 생산 증진에 중요한 역할을 하며 야생종 대장균이 생산하지 못하는 효소인 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 유전자를 지방산 생합성 초기 유도 유전자들과 함께 도입하여 지방산 과발현 효과가 매우 뛰어나다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-N-B108-P-03

부처명 지식경제부

연구사업명 신재생에너지기술개발사업

연구과제명 당화 바이오매스를 이용한 탄화수소계 바이오에너지 생산 균주 및 공정 최적화 원천기술 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2008.10.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음을 포함하는 발현벡터로 공동형질전환된(cotransformed) 지방산 과발현용 대장균:

- (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛(acetyl CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein(BCCP) subunit)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛(acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제(malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균:

- (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 발현벡터는 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균:

- (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제는 서열목록 제1서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 서열목록 제3서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지고, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛은 서열목록 제5서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지고, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛은 서열목록 제7서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지고, 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제는 서열목록 제9서열로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열로 표시되고, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제6서열로 표시되고, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제8서열로 표시되고, 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제10서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 서열목록 제11서열로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 백본벡터에 상기 뉴클레오타이드 서열 (a) 및 상기 뉴클레오타이드 서열 (b)를 도입한 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 대장균.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및

아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및

(b) 상기 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 발현벡터는 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법:

(a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및

(b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 대장균을 형질전환시키는 단계(b)는 전기충격 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법.

청구항 12

(a) 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 대장균을 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

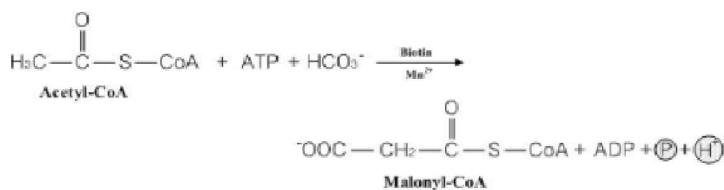
[0002] 세계적 경제 성장에 따른 에너지 사용증가와 지속적인 가격상승을 보이는 화석연료 자원의 한정성으로 인하여 에탄올, 부탄올, 바이오디젤과 같은 바이오에너지에 대한 관심이 증가하고 있다. 언급된 종류의 바이오에너지 모두 전력생산이나 수송용 연료로 사용될 수 있으나, 실적용 및 생산 방법의 몇몇 단점으로 인해 새로운 신재생에너지 자원인 탄화수소 형태의 화합물에 대한 관심이 증가되고 있다. 이에 따라 장쇄 지방산을 대산물로서 생성할 수 있는 재조합 균주에 대한 관심도 증대되고 있다.

[0003] 지방산(fatty acid)은 화학 또는 생화학적으로 카복시산을 말한다. 사슬 모양의 포화 혹은 불포화 모노카복시산을 말하며, 지방을 가수분해하면 글리세롤과 지방산이 분리되어 생기기 때문에 이러한 이름이 붙었다. 가장 단순한 지방산은 부티르산(4 carbons)이지만, 자연에 존재하는 지방산은 탄소 수가 8개(caprylic acid) 이상이며 모두 짝수의 탄소 수를 갖고 있다.

[0004] 미생물 생체 내에서의 지방산합성은 아세틸-CoA(acetyl-CoA)에서 시작하여, 그 뒤 탄소원자가 한 번에 두 개의 원자씩 탄화수소사슬에 붙어 사슬이 길어지게 된다. 이화작용은 그와 반대방향으로 진행이 되어진다. 즉, 카복실 그룹에서 시작하여 아세틸-CoA로 끝나며, 탄화수소사슬의 단편과 아세틸-CoA는 대장균(*Escherichia coli*)의 시트르산회로(TCA cycle)에서 산화되어 ATP 형태로 저장되는 에너지를 제공한다.

[0005] 본 발명의 지방산 생합성의 첫 단계는 아세틸-CoA(지방산 합성에 필수적인 전구체)를 세포질로 운반하는 것이다. 아세틸-CoA는 지방산의 β -산화나 피루브산의 탈카복실화에 의해 생길 수 있다(특정 아미노산들이 분해되면 아세틸-CoA가 생성되기도 한다).

[0006] 세포질에서 아세틸-CoA는 카복실화되어서, 지방산 생합성에 있어 중요한 중간체가 되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA)를 생산한다. 아래의 식에서 보여지듯이, 이 반응은 아세틸-CoA 카복실라아제 복합체에 의해 촉매되는데, 이 복합체는 세 개의 효소로 구성되어 있고, 효소 활성을 위해 ATP뿐만 아니라 Mn^{2+} 과 바이오틴을 요구한다. 아세틸-CoA 카복실라아제는 세 개의 단백질인 바이오틴 카복실라아제, 바이오틴 운반 단백질, 그리고 카복실기 전달효소로 구성되어있다.



[0007]

[0008] 지방산 생합성은 연속적으로 두 개의 탄소단위가 성장 사슬에 덧붙여지며 이루어진다. 말로닐-CoA의 말로닐 그룹에 있는 세 개의 탄소원자 중 두 개가 생합성 반응의 각 단계마다 지방산 사슬에 더해진다. 이 반응은 말로닐-CoA 형성과 마찬가지로 세포질에 있고 막과 결합되어 있지 않는 다효소 복합체가 필요하다. 개별적인 효소들로 구성되어 있는 이 복합체는 지방산 합성효소를 말한다. 이러한 지방산 합성 효소 복합체의 일부인 아실 운반 단백질(acyl carrier protein: ACP)은 아세틸-CoA의 아세틸 그룹이 지방산의 탄소 수를 증가시키기 위한 결합에 관여한다.

Step 1. Priming of the system by acetyl-CoA

a. ACP-Acyltransferase reaction



b. Transfer to β -ketoacyl-ACP synthase



Step 2. ACP-malonyltransferase reaction (malonyl transfer to system)



[0009]

[0010]

미생물을 사용하여 FAS(Fatty Acid Synthesis) 경로의 활발한 대사흐름을 꾀한 아세틸-CoA, 말로닐-CoA의 과발현 목적에 해당하는 시도와 노력은 끊임없이 있어왔다. 대장균은 효소 생산 시스템으로 타 생물체에 비해 많은 대사정보가 알려져 있고, 유전자에 대한 정보가 거의 다 밝혀져 재조합 단백질 생산에 널리 이용되고 있다.

[0011]

FAS의 핵심이 되는 유전자와 대사경로의 반응 메카니즘에 대한 정보는 문헌(H. Marrakchi, Y.-M. nWhang 및 C. O. Rock, Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis, *Biochemical Society Transactions*, 30(6):1050-1055(2002))에 언급되어있다. 대장균의 지방산 생합성을 위한 도입단계의 대사 작용에 아세틸-CoA와 말로닐-CoA가 중요한 역할을 한다는 것에 대해 문헌(Ethan S. James 및 John E. Cronan, Expression of Two *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase Subunits Is Autoregulated, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 279(4):25202527(2004))에 언급되어있다. 또한 ACP 트랜스아실라제에 의해 말로닐-CoA가 말로닐-ACP로 전환되어 지방산 합성을 위한 대사 네트워크가 진행됨이 참고 문헌에 나타났다 (Satyanrayana subrahmanyam 및 John E. Cronan, JR., Overproduction of a Functional Fatty Acid Biosynthetic Enzyme Blocks Fatty Acid Synthesis in *Escherichia coli*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 180(17):4596-4602(1998)).

[0012]

하지만 대부분의 연구는 지방산 생합성 경로의 내부 사이클, 즉 말로닐-ACP이후의 대사 경로의 핵심 키가 되는 fab 계열 유전자의 기작에 의한 세포 영향과 지방산 생산과 저해에 대해 논하고 있다.

[0013]

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

[0014]

본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 지방산 생합성 대사 경로(fatty acid biosynthesis pathway)에서 필요한 상위단계 물질과 자연적으로 야생종이 생산하지 못하는 하부의 특정 단계 물질들의 세포내 생산 증대 및 도입을 위해 표적 유전자 및 대사산물을 설정하고, 특정 대사산물을 효율적으로 생산하는 균주를 개발하기 위해서 미생물의 게놈 정보와 대사 네트워크를 이해함과 동시에 야생형 대장균에 적용하여, 표적 유전자의 삽입을 통한 재조합 균주를 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0015] 따라서 본 발명의 목적은 상기 대사 네트워크에 따른 하나 또는 둘, 또는 그 이상의 개수의 유전자 조합에 따른 지방산 생합성 미생물의 특정 대사산물의 생산 증대를 위한 유전자 선정 및 이를 도입한 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균을 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 대장균의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 대장균을 이용하여 지방산을 생합성하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛(acetyl CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein(BCCP) subunit)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛(acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제(malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터로 공동형질전환된(cotransformed) 지방산 과발현용 대장균을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 발현벡터는 (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 발현벡터는 (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 모두 포함한다.
- [0022] 본 발명자들은 유전자 조작을 통해 지방산 생합성 대사산물을 안정적이고 효과적으로 생산하는 균주의 개발을 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 지방산 생합성 내부의 신장의 마지막 단계에 위치하고 야생종 대장균이 생산하지 못하는 효소인 E3.1.2.14의 유전자가 지방산의 생산 증진에 중요한 역할을 하며, 이 유전자를 지방산 생합성 초기 유도 유전자들과 함께 대장균을 공동형질전환 시키는 경우 매우 효과적으로 지방산 생합성 경로가 과발현됨을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0023] 본 발명의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)는 지방산 생합성 경로 상에서 장쇄 지방산들의 생물학적 생산을 위해 필수적인 촉매로서 말로닐-acp에서 여러 전구체를 거친 사슬 지방산을 얻기 위한 효소이지만 야생종 대장균이 생산하지 못하는 효소이다.
- [0024] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제는 특히 제한되지는 않으나 스트렙토코커스(*Streptococcus*)로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제1서열로 표시되는 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)의 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제2서열로 표시될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제(acetyl-CoA carboxylase carboxytransferase)는 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 변환하는 과정에 관여하는 촉매이며, 두 개의 알파 서브유

닛과 두 개의 베타 서브유닛으로 구성된 테트라머이다. 본 발명의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 상기 서브유닛 중 하나이며, *accA* 유전자가 이를 코딩하는 유전자이다.

[0026] 본 발명의 발현벡터에서 발현되는 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파는 대장균 (*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 서열목록 제3서열로 표시되는 *E. coli* K-12 MG1655의 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 아세틸-CoA 카복실라제 카복실트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열목록 제4서열로 표시될 수 있다.

[0027] 상기 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛; 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛; 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제도 각각 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 유래한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 각각 서열목록 제5서열, 제7서열 및 제9서열로 표시되는 *E. coli* K-12 MG1655의 효소를 발현하도록 할 수 있으며, 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 각각 서열목록 제6서열, 제8서열 및 제10서열로 표시될 수 있다.

[0028] 상기 각 유전자의 반응 메카니즘을 간단히 요약하면 다음과 같다.

[0029] *accA*, *accB* 유전자; $ATP + \text{아세틸-CoA} + HCO_3^- \rightleftharpoons ADP + \text{오쏘포스페이트} + \text{말로닐-CoA}$,

[0030] *accC* 유전자; $ATP + \text{바이오틴-카복시-운반단백질} + CO_2 = ADP + \text{포스페이트} + \text{카복시바이오틴-카복시-운반단백질}$,

[0031] *fabD* 유전자; $\text{말로닐-CoA} + \text{아실-운반단백질} \rightleftharpoons CoA + \text{말로닐[아실-운반단백질]}$,

[0032] E.3.1.2.14 유전자; $\text{올레오일-[아실-운반단백질]} + H_2O \rightleftharpoons [\text{아실-운반단백질}] + \text{올레이트}$.

[0033] 상기에서 기술한, (a) 내지 (b)의 지방산 생합성 과정에 관여하는 효소들을 코딩하는 각각의 뉴클레오타이드 서열들은 발현 조절서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동 가능하게 연결된다(operably linked to)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0034] 또한 이와 관련하여 용어 '증폭'은 예를 들어 강력한 프로모터를 사용하거나 활성이 높은 적절한 효소를 암호화하는 유전자를 사용하고 임의로 이들 수단을 함께 사용하여 유전자(들)의 카피수를 증가시킴으로써, 적합한 DNA에 의해 암호화되는 하나 이상의 효소의 세포내 활성을 미생물 내에서 증가시키는 것을 기술한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터에 포함되는 프로모터는 강력한 발현능력을 가지는 것을 사용하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 *trc* 프로모터를 사용할 수 있다. 본 발명의 발현 벡터는 터미네이터 서열 또한 포함하며, 상기 터미네이터는 바람직하게는 *rrnB* 터미네이터일 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열, 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열 및 터미네이터 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.

[0037] 더욱 바람직하게는, 본 발명의 발현 벡터는 강력한 발현능력을 가지는 프로모터(*trc* promoter) 서열, *accA*, *accB*, *accC* 및 *fabD*로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 서열, E3.1.2.14효소의 유전자의 서열, 박테리아에서 유래된 터미네이터(*rrnB* terminator)서열이 5'-3' 순서대로 연결된 것일 수 있다. 이와 같은 유전자의 배열은 대장균의 염색체 내에서의 위치에 따른 발현 순서에 해당하는 것으로, 세포성장곡선에서 말로닐-CoA가 먼저 생산되어 소비되면서 말로닐-acp가 생산되는 생합성 경로를 적용한 것이다.

[0038] 본 발명의 발현벡터는 바람직하게는 유도성 발현 시스템(inducible expression system)이며 보다 바람직하게는 *lacI* 유전자를 포함한다. *lacI* 유전자는 숙주 세포가 Lac 리프레서를 코딩하는 유전자를 포함하고 있는지 불문하고, 프로모터를 조절할 수 있도록 한다. 이 경우 구조 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드의 발현을 유도하기 위하여, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 발현벡터는 E3.1.2.14 유전자; 및 *accA*, *accB*, *accC* 및 *fabD*로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상의 유전자 시퀀스 전체를 포함할 수도 있다. 그러나, 본 발명의 발현벡터에는 상기

유전자들이 효소의 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(ribosomal binding site) 및 효소 발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하다. 발명의 실시예에서는 pJE105 내지 pJE111 발현벡터가 사용되었다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 발현벡터란 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미하며 바람직하게는 플라스미드 벡터일 수 있다.

[0041] 상기 플라스미드로는 대장균에서 복제 및 발현이 가능한 운반체라면 당업계에 공지된 그 어떠한 것이라도 사용할 수 있으며, 바람직하게는 서열목록 제11서열로 표시되는 플라스미드 벡터 pTrc99A를 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명의 지방산 과발현용 대장균은 글루코오스로부터 말로닐-CoA에 의한 말론산, 말로닐-acp와 지방산을 생산할 수 있다. 본 발명의 숙주 세포인 상기 에세리키아 속 미생물은 박테리아 그람 음성형 대장균인 *Escherichia coli*이며, 예를 들어 MG1655, W3110, DH5 α , XL1-Blue 및 BL21 등을 포함하나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 대장균 K-12 MG1655를 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 에세리키아 속 미생물은 내재적으로 지방산 생합성 경로를 가지고 있는 것이나, 아세틸-CoA로부터 지방산(fatty acid)를 생산하기 위한 효소를 코딩하는 유전자가 추가적으로 도입된 균주이며, 특히 또한 말로닐-acp에서 여러 전구체를 거쳐 긴 사슬 지방산을 얻기 위한 효소 중 야생종 대장균이 생산하지 못하는 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제 효소를 생산하는 유전자가 도입된 균주이다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 일 이상의 뉴클레오타이드 서열을 발현벡터에 삽입시키는 단계; 및 (b) 상기 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 발현벡터로 대장균을 형질전환시키는 단계를 포함하는 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 일 구현예에서 상기 발현벡터는 (a) 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및 (b) 아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 모두 포함한다.

[0046] 본 발명의 지방산 생합성 경로의 과발현용 형질전환 대장균의 제조방법은 상술한 형질전환 대장균을 생산하는 방법에 관한 것이므로 상술한 내용과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0047] 상기에서 상술하게 기술한 본 발명의 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, CaCl₂ 완충액을 사용한 컴피트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 발현벡터를 숙주세포 내로 넣는 방법, 전기 충격에 의한 형질전환 방법, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기침공법(electroporation) 등에 의해 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해서는 전기 충격에 의한 형질전환 방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기에서 상술한 형질전환 대장균을 배양하여 지방산을 생합성 하는 단계; 및 (b) 상기 생합성된 지방산을 수득하는 단계를 포함하는 지방산 생합성 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 지방산 과발현용 형질전환 대장균의 배양은 당업계에 공지된 통상의 대장균 배양 방법에 의해 배양될 수 있다.

[0050] 바람직하게는, 단계 (a)는 발현 유도제인 IPTG의 존재 하에서 실시된다.

[0051] 상기 형질전환 대장균 내에서 생합성된 지방산을 분리하는 단계는 당업계에 공지된 통상의 분리 또는 정제 방

법에 따라 실시될 수 있다(참조: B. Aurousseau et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57(3):1558-9331(1980); Frank C. Magne et al., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(3):127-129(1957)).

발명의 효과

[0052]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0053]

(i) 지방산 생합성 경로에 관여하는 효소들을 암호화하는 유전자로 형질전환된 지방산 과발현용 대장균 및 그 제조방법을 제공한다.

[0054]

(ii) 본 발명의 지방산 과발현용 대장균은 유전적 안정성이 높을 뿐만 아니라 지방산의 생산 증진에 중요한 역할을 하며 야생종 대장균이 생산하지 못하는 효소인 아실-아실 운반단백질 티오에스터라제를 코딩하는 유전자를 지방산 생합성 초기 유도 유전자들과 함께 도입하여 지방산 과발현 효과가 매우 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1은 *Escherichia coli* 생체 내에서 글루코오스에서부터 지방산 생합성(FAS)까지의 경로를 보여주는 도식이다.

도 2는 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accA*와 *fabD*유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE105라 명명한다.

도 3은 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accA*, *accB* 와 *accC*유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE106라 명명한다.

도 4는 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accB*, *accC* 와 *fabD*유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE107라 명명한다.

도 5는 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accA*, *accB*, *accC*와 *fabD*유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE108라 명명한다.

도 6은 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accA*, *accB*, *accC*, *fabD* 유전자와 E3.1.2.14의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE109라 명명한다.

도 7은 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 *accA*와 E3.1.2.14의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE110라 명명한다.

도 8은 *Escherichia coli*와 같은 박테리아용 발현벡터인 pTrc99A에 E3.1.2.14의 유전자가 삽입되어있는 구조의 도식화이다. pJE111라 명명한다.

도 9는 재조합 *Escherichia coli*의 생장곡선을 야생종 *Escherichia coli* 와 비교한 결과를 그린 그래프이다. 범례의 표시는 wt *E.coli* MG1655는 야생형(wildtype) *E.coli* MG1655를 의미하며, *E.coli*.AD는 *E.coli* JES1011, *E.coli*.ABC는 *E.coli* JES1012, *E.coli*.BCD는 *E.coli* JES1013, *E.coli*.ABCD는 *E.coli* JES1014, *E.coli*.ABCD14는 *E.coli* JES1015, *E.coli*.A14는 *E.coli* JES1016, *E.coli*.14는 *E.coli* JES1017를 의미한다.

도 10은 야생종 *Escherichia coli*와 재조합 *Escherichia coli*들의 세포내(intracellular, 도 10a), 세포외(extracellular, 도 10b)에서 분석된 말론산의 양을 분석한 실험결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 GC-MS로 분석한 야생종 *Escherichia coli*와 재조합 *Escherichia coli*들의 세포내부에서 헥사데칸산(C16)의 생산량 차이를 보여주는 것이다.

도 12은 GC-MS로 분석한 야생종 *Escherichia coli*와 재조합 *Escherichia coli*들의 세포내부에서 옥타데칸산(C18)의 생산량 차이를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구

체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1: 각 유전자 조합의 발현을 위한 플라스미드 pJE105, pJE106, pJE107, pJE108, pJE109, pJE110 및 pJE111의 제조

대장균 K-12(ATCC, USA)의 염색체를 주형으로 하여 말로닐-CoA와 말로닐-*acp*의 생산을 위한 효소를 암호화하는 *accA*, *accB*, *accC*, *fabD* 및 E3.1.2.14의 유전자서열(GenBank, NCBI)을 중합효소연쇄반응(PCR, TaKaRa Korea) 방법을 통해 클로닝 하였다(표 1-2). 상기 유전자 중 *accB*, *accC*는 크로모조멀 염색체 안의 위치가 순차적이어서 두 유전자를 하나의 PCR 생산물로 얻기 위해 한 쌍의 유전자단편(primers)으로 유전자 증폭을 실시하였다. 각 유전자가 코딩하는 효소명 및 상기유전자를 증폭하기 위한 프라이머 및 제한효소를 각각 하기 표 1 및 표 2에 정리하였다.

표 1

유전자서열 (GenBank 허가번호)	유전자	생산 효소
서열번호 4 (Gene ID: 944895)	<i>accA</i>	아세틸-CoA 카복실라제 카복시트랜스퍼라제 서브유닛 알파(acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit)
서열번호 6 (Gene ID: 947758)	<i>accB</i>	아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복시 운반단백질 서 브유닛(acetyl CoA carboxylase, BCCP subunit)
서열번호 8 (Gene ID: 947761)	<i>accC</i>	아세틸-CoA 카복실라제 바이오틴 카복실라제 서브유닛(acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit)
서열번호 10 (Gene ID: 945766)	<i>fabD</i>	말로닐-CoA-[아실운반단백질] 트랜스아실라제(malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase)
서열번호 2 (Gene ID: 3572131)	E3.1.2.14	아실-아실 운반단백질 티오에스터라제(acyl-acyl carrier protein thioesterase)

표 2

유전자	프라이머 서열		제한 효소
<i>accA</i>	F	5 '-GGATCCATGAGTCTGAATTCCTTGATTTT-3'	EcoR I
	R	5 '-TCTAGATTACGCGTAACCGTAGCTCATC-3'	Sac I
<i>accB</i>	F	5 '-GAGCTCACGGAACCCACTCATGGATATTC-3'	Sac I
<i>accC</i>	R	5 '-GGATCCTTGTCGATCCCCAGTAATAAAAAA-3'	BamH I
<i>fabD</i>	F	5 '-GGATCCAAGGATTAACATGACGCAATTT-3'	BamH I
	R	5 '-TCTAGAAAATTCATGATTTTCTCTTTTAAA-3'	Xba I
E3.1.2.14	F	5 '-TCTAGAGGAGAGTATTGGGATTAAGTTA-3'	Xba I
	R	5 '-CTGCAGTAGTCTATCTCGCTTCTGTTT-3'	Pst I

표 1의 유전자들은 표 2에 열거된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 산물을 표 2에 열거된 제한 효소를 이용하여 pTrc99A 벡터(서열번호 11, Seon-Won Kim et al., *Biotechnol. Prog.* 23:599-605(2007))에 도입하여 pJE105(*accA* 및 *fabD* 삽입), pJE106(*accA*, *accB* 및 *accC* 삽입), pJE107(*accB*, *accC* 및 *fabD* 삽입), pJE108(*accA*, *accB*, *accC* 및 *fabD* 삽입), pJE109(*accA*, *accB*, *accC*, *fabD* 및 E3.1.2.14의 유전자 삽입), pJE110(*accA* 및 E3.1.2.14의 유전자 삽입) 및 pJE111(E3.1.2.14의 유전자 삽입)를 제조하였다.

도 2 내지 도 8은 각각 상기 pJE105, pJE106, pJE107, pJE108, pJE109, pJE110 및 pJE111라 명명된 벡터의 지도를 나타내는 도면이다. 각각의 중합효소연쇄반응은 통상적인 반응조건(10mM Tris-HCl(pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2mM MgSO₄ 및 Taq DNA 중합효소(TaKaRa))아래에서 95℃/5분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72/1분(extension)로 1회 수행한 후, 95℃/1분(denaturation), 60℃/30초(annealing), 72/1분

(extension)로 30회 반복수행하였다. 마지막 단계로 안정적인 신장을 위해 95℃/1분(denaturation), 60℃/1분(annealing), 72/5분(extension) 반응시켰다. 중합효소연쇄반응 후 증폭된 DNA는 1% 아가로스 젤 상에서 확인 후 정제하여 제한효소반응에 이용하였다. 제한효소 처리된 각각의 DNA 조각들을 pTra99A백터의 다중삽입부위(multicloning site)에 삽입하였다. 각 단계마다 삽입된 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 형질전환된 대장균(*E. coli* AG1 competent cell, stratagene)에서 플라스미드를 추출하여 이를 다시 원래 삽입부위의 제한효소로 처리하여 잘린 DNA 조각의 크기를 1% 아가로스 젤 상에서 전기영동하여 비교하는 방법을 사용하였다.

실시예 2: 대장균 형질전환체(transformant)의 제조

통상적으로 클로닝용으로 많이 쓰이는 대장균의 경우 CaCl_2 버퍼를 사용한 컴피턴트 세포를 만든 후 열충격(42℃) 방법에 의해 플라스미드를 숙주세포내로 넣지만, 본 발명에서는 형질전환체의 안정적 제조와 효율을 높이기 위해 전기충격에 의한 형질전환방법을 사용하였다.

상기 전기충격에 의한 형질전환방법을 위해 16시간동안 배양된 200 μl 의 야생종 대장균 배양액을 250 ml 플라스크에 들어있는 50 ml의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 이스트 추출물)배지에 접종하여 배양액의 흡광도(absorbance)가 600 nm파장에서 0.6에 이르렀을 때, 배양액 전체에 해당하는 50 ml의 배양액은 원심분리하여 상등액과 세포를 분리하였다. 모아진 세포는 10% 글리세롤 5 ml로 2 내지 3회 반복적으로 세척해준 후, 10% 글리세롤 100 내지 200 μl 로 희석하였다. 희석한 세포를 50 μl 씩 분주하고 1 내지 3 μl 의 플라스미드를 넣어주었다.

상기의 플라스미드가 들어있는 분주된 50 μl 의 액체는 전기천공용 큐벳에 담아 전기 충격(1800v, 25uF, 200 Ω)을 가하였다. 미리준비해둔 1 ml LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 이스트 추출물)를 첨가한 뒤 1시간동안 37℃에서 배양하였다. 배양된 형질전환체는 선택배지(엠펜실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 LB 고체배지)에서 단일균체가 생성될 때까지 배양하였다.

상기와 같은 방법에 의해 도 2 내지 도 8에서 보여지는 구성의 발현백터가 삽입된 재조합 대장균(형질전환체) 8종을 개발하였고, 이를 하기 표 3에 정리하였다.

표 3

개발균주	유전형
<i>E. coli</i> JES1011	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::accA::fabD
<i>E. coli</i> JES1012	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::accA::accBC
<i>E. coli</i> JES1013	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::accBC::fabD
<i>E. coli</i> JES1014	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::accA::accBC::fabD
<i>E. coli</i> JES1015	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::accA::accBC::fabD::3.1.2.14
<i>E. coli</i> JES1016	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::accA::3.1.2.14
<i>E. coli</i> JES1017	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655::pTrc99A::3.1.2.14

실시예 3: 대장균의 배양 및 재조합 균주로부터 단백질의 생산

형질 전환의 정확성이 확인된 각각의 균들을 LB배지에 12시간정도 배양시키고 글리세롤 농도가 25%가 되게 보관용 균액으로 만든 다음 -80℃에서 배양실험 시까지 저장하였다. 배양은 전기 보관용 균액 1 ml을 10 ml 저면 튜브 dp에 들어있는 엠펜실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 3 ml의 LB에 24시간동안 배양한 후, 이를 다시 500 ml 플라스크에 들어있는 엠펜실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 200 ml의 LB(10 g/L tripton, 10 g/L NaCl 및 5 g/L 이스트 추출액)배지에 1/200의 전기 배양액을 접종하여 37℃, 170rpm상태에서 24시간동안 배양하였다(도 5). 단백질 발현을 위해 배양액의 흡광도(absorbance)가 600nm파장에서 0.6에 이르렀을 때 유도물질인 IPTG(isopropylthio- β -D-galactoside, Sigma, USA)를 첨가(1 mM)하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

상기예를 따라 배양된 재조합 대장균종들과 야생종의 생장곡선은 도 9에 나타내었다.

[0073] 실시예 4: 재조합 대장균 세포내외로부터의 말론산(malonic acid)의 측정

[0074] 배양액 내의 말론산의 농도는 배양 중 특정시간마다 채취한 시료를 4℃에서 원심분리(10분, 4500rpm)후 상등액과 세포를 분리하여 -80℃에서 보관하고, 이 중 세포는 인트라셀룰라(intracellular) 물질의 추출을 위해서 아래와 같은 과정을 거쳤다.

[0075] 상등액과 분리된 세포는 영하 -80℃에 넣어둔 메탄올 250 μ l로 세포를 희석한 후, -80℃에 넣어두고 5-10분 뒤 유동성 있는 액체로 변화되어 있는지 확인하였다. 이 과정을 3번 반복하여 -9℃에서 원심분리 후 상등액은 보관(-80℃)하였다. 남은 셀을 가지고 다시 위와 같은 과정을 반복하여 얻어진 용액을 합쳐서 총 500 μ l의 샘플을 획득하였다. 이것이 인트라셀룰라 물질로서 세포내의 메타볼라이트(metabolites)를 추출한 것이다.

[0076] 상기 배양액 50 ml로부터 분리된 상등액과 세포에서 추출된 인트라셀룰라 물질은 각각 500 μ l씩을 0.2um 필터를 이용하여 정제한 후, 하기 표 4의 조건하에서 HPLC 정량 분석을 실시하였다(도 10).

표 4

품 목	조 건
HPLC 모델	(영린기기, Korea), UV730D (영린기기, Korea)
컬럼	Aminex HPX-87H(Biorad, USA)
유속	0.6 ml/min
주입부피	30 μ l
이동상	0.005N 황산
오븐 온도	50℃
작동 시간	30분
UV 검출파장	210 nm

[0078] 상기 실시예를 통해 도 10에서 보여지듯이, 재조합 대장균은 야생종 대장균의 인트라셀룰라(intracellular)나 엑스트라셀룰라(extracellular)에서 분석되어지는 말론산의 생산량과 분비 경향에 큰 차이를 보였다.

[0079] 특히, 배양이 시작된 후 6시간이 지난 이후부터 말론산의 생산이 야생종에서는 감소하는 경향을 보이지만, pJE105, pJE106, pJE107, pJE108, pJE109, pJE110 및 pJE111 플라스미드가 내재된 재조합 대장균에서는 IPTG에 의한 발현유도로 말론산의 생산이 유지됨을 확인할 수 있었다(도 10).

[0080] 실시예 5: 재조합 대장균의 세포내로부터의 지방산(fatty acid) 측정

[0081] 실시예 3의 조건으로 배양한 배양액 중 IPTG를 첨가한 후 4시간 후와 24시간 동안 세포양이 충분히 졌을 때 세포 내에 있는 지방산(fatty acid)를 측정하기 위해서 지방산 추출을 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 추출과정은 5 단계로 나누어지며 첫 번째 과정 배양단계로 배양액 5 ml를 원심분리(4500 rpm, 10분) 후 세포는 -80℃에 저장하였다. 두 번째 과정은 비누화(saponification)단계로 저장된 재조합 세포들에 용액 1(NaOH 45g, MeOH 150 ml 및 탈염증류수 150 ml) 1 ml를 넣고 5-10초간 볼텍스 해주었다. 100℃에서 5분 동안 반응시키고 다시 5-10초 동안 볼텍스하고 다시 100℃, 25분 반응시킨 후 열을 식혀주었다. 세 번째 과정은 메틸화(methylation)단계로, 용액 2(6N HCl 325 ml 및 MeOH 275 ml)를 2 ml를 넣고 5-10초 동안 볼텍스 해 준 뒤 80℃에서 10분 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후에는 빨리 열을 식혀주었다. 네 번째 단계는 추출(extraction)단계로, 용액 3(헥산/메틸 터셔리-부틸 에스테르=1/1)을 1.25 ml를 첨가하고 10분간 위아래로 흔들어 준 뒤 층이 분리 되면 아래층은 추출해서 버렸다. 다섯 번째 단계는 GC로 분석을 용이하게 하기 위한 세척단계로 앞 단계의 남은 상층액에 용액 4(NaOH 10.8 g 및 탈염증류수 900 ml) 3 ml를 첨가해서 5분 동안 위아래로 흔들어 준 뒤 상층액을 추출하여 GC/MS로 분석하였다.

[0082] 본 발명에서 사용한 GC/MS는 5975 시리즈 MSD 및 아질런트 7890A이며 HP-5 컬럼(30m X 0.32 mm, 필름 두께 0.25 μ m)을 사용하였다. 분석하기 위한 GC조건은 온도 프로그램: 40℃ 5분, 분당 3℃로 220℃까지, 분당 3℃로 250℃까지, 그리고 250℃ 5분이었으며 MS 내부 온도 160℃이었다.

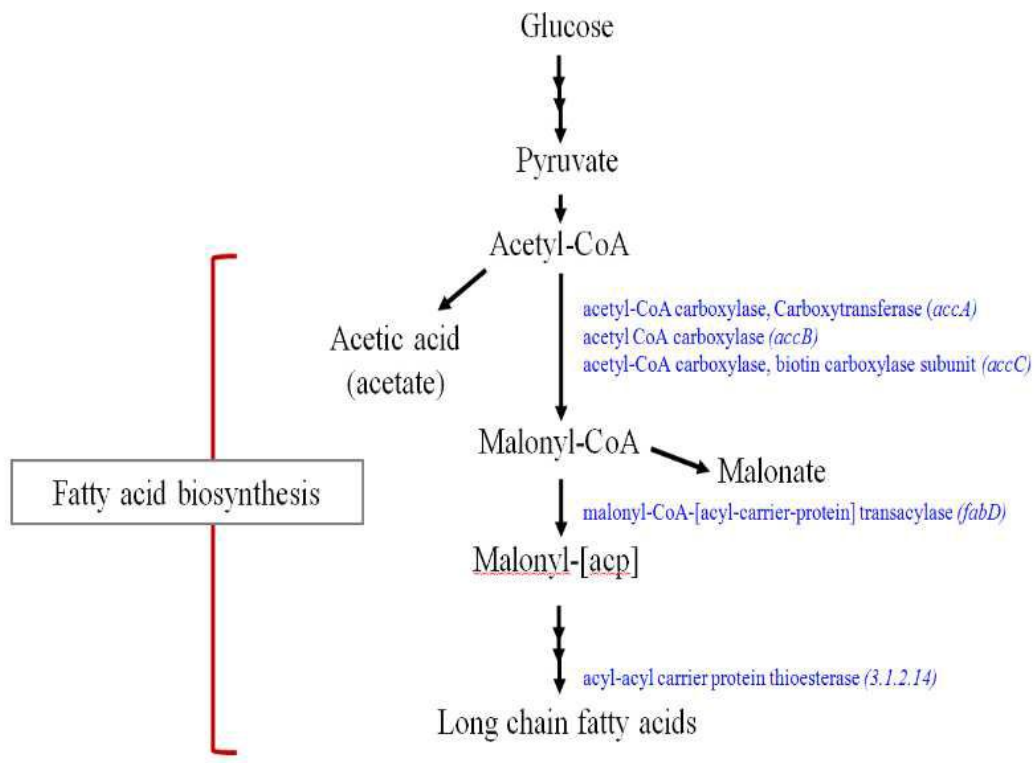
[0083]

[0084] 상기 예를 따라 지방산 함량 증진을 위해 형질전환 된 재조합 대장균종과 야생종 대장균의 지방산 추출 분석

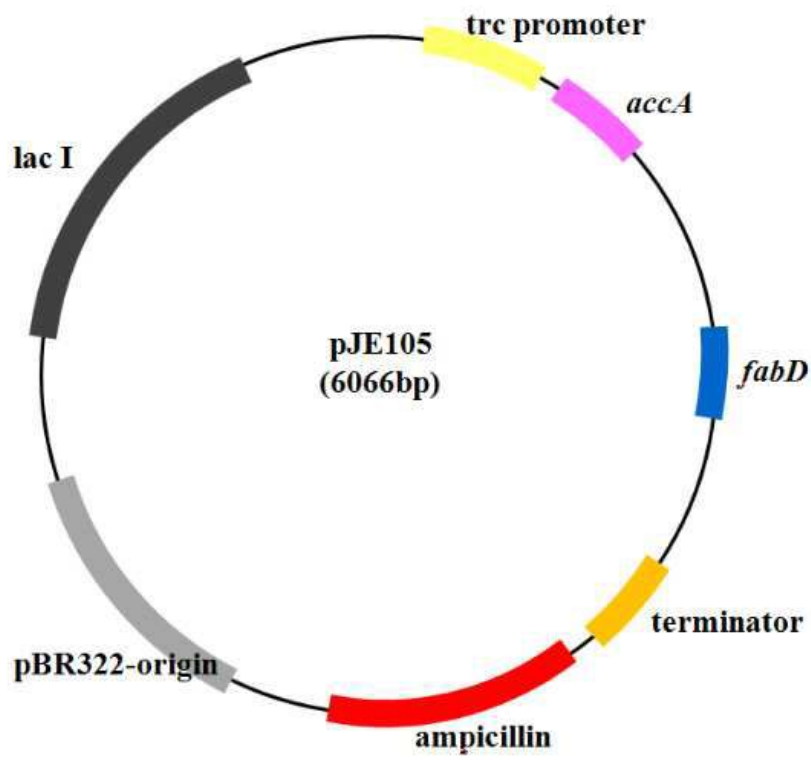
결과를 도 11과 도 12에서 나타내었다. 이 추출 방법으로 헥사데카노산(C16)과 옥타데카노산(C18)이 추출되고 분석됨을 알 수 있었다. 도 11는 배양 24시간 결과 후의 지방산 추출 결과를 나타낸 것이다. 이 결과, 야생종보다 초기 지방산 합성에 관여하는 유전자가 과발현된 재조합 대장균의 지방산, 헥사데카노산(C16)과 옥타데카노산(C18)이 더 생산되는 것을 알 수 있었다. 특히 세포 성장률(도 9)을 고려하면 아실-[아실-운반단백질] (ACP) 티오에스터라제(E3.1.2.14)가 포함된 재조합균(*E. coli* JES15, 16 및 17)이 아세틸-CoA 카복실라제(*accA* 및 *accBC*)와 말로닐-CoA:ACP(아실 운반단백질) 아실트랜스퍼라제(*fabD*)들의 조합으로 이루어진 재조합균주들(*E. coli* JES13 및 14)보다 지방산 생산성이 높은 것을 확인 할 수 있었으며, 야생종에 비해서는 지방산 생산성이 월등히 향상된 것을 알 수 있었다. 따라서 지방산 생합성 내부의 신장의 마지막 단계에 위치한 E3.1.2.14의 유전자가 지방산의 생산 증진에 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.

도면

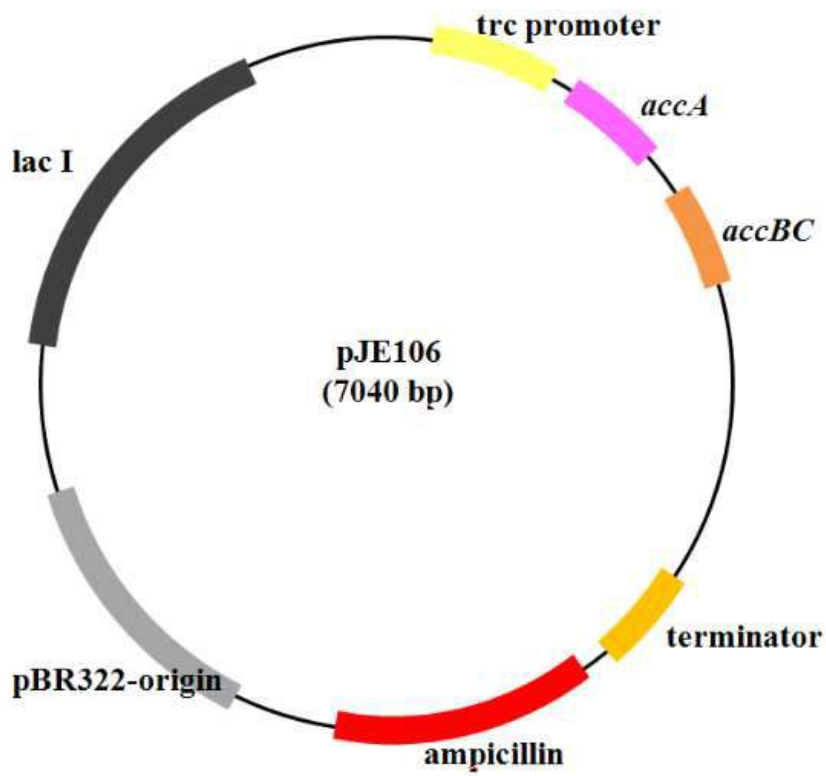
도면1



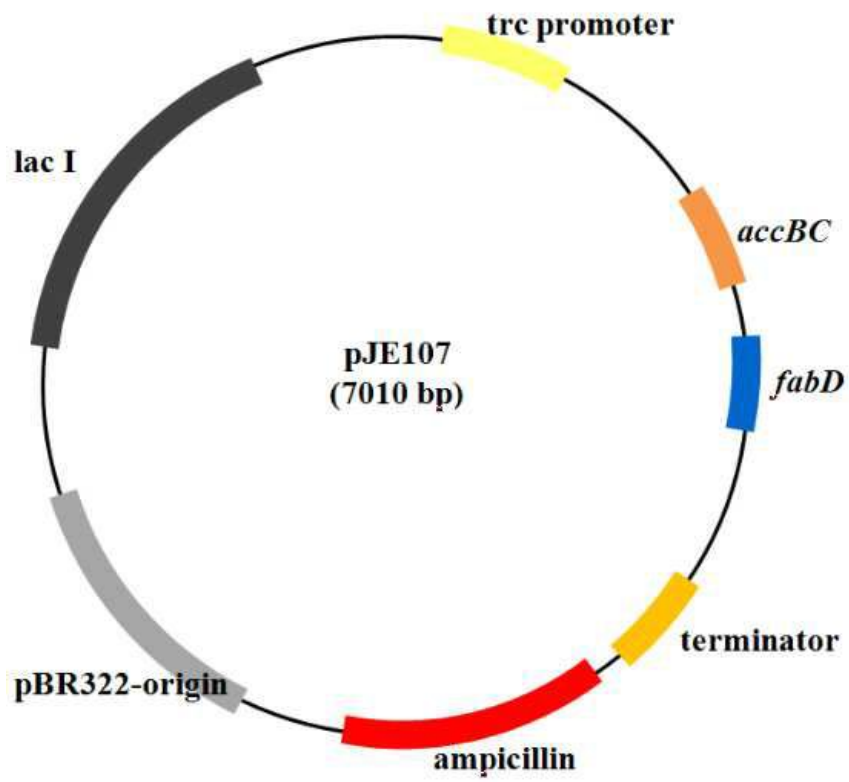
도면2



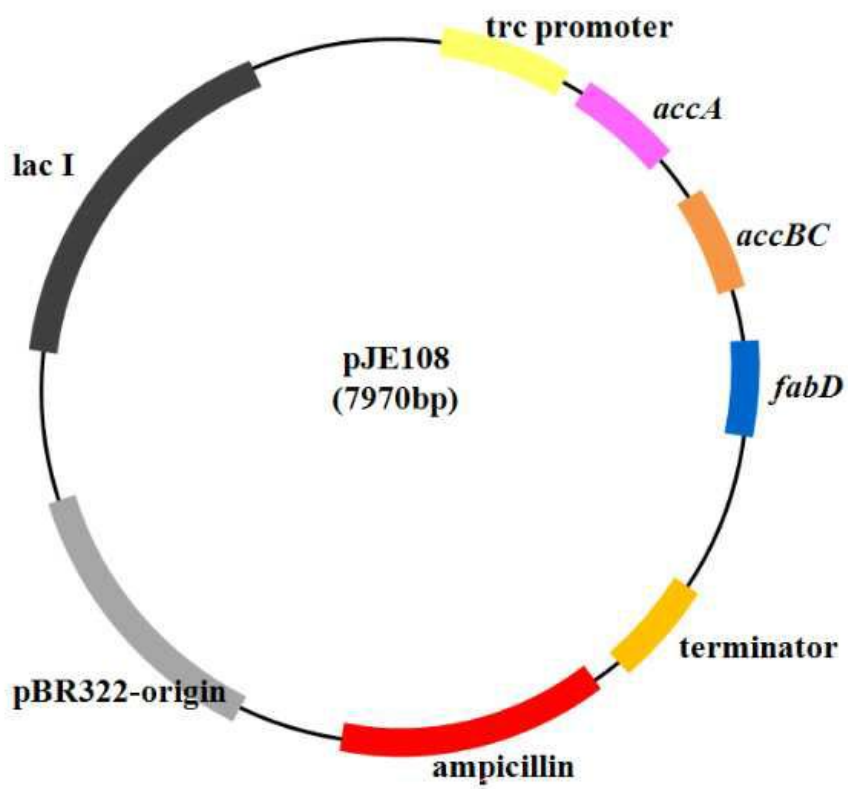
도면3



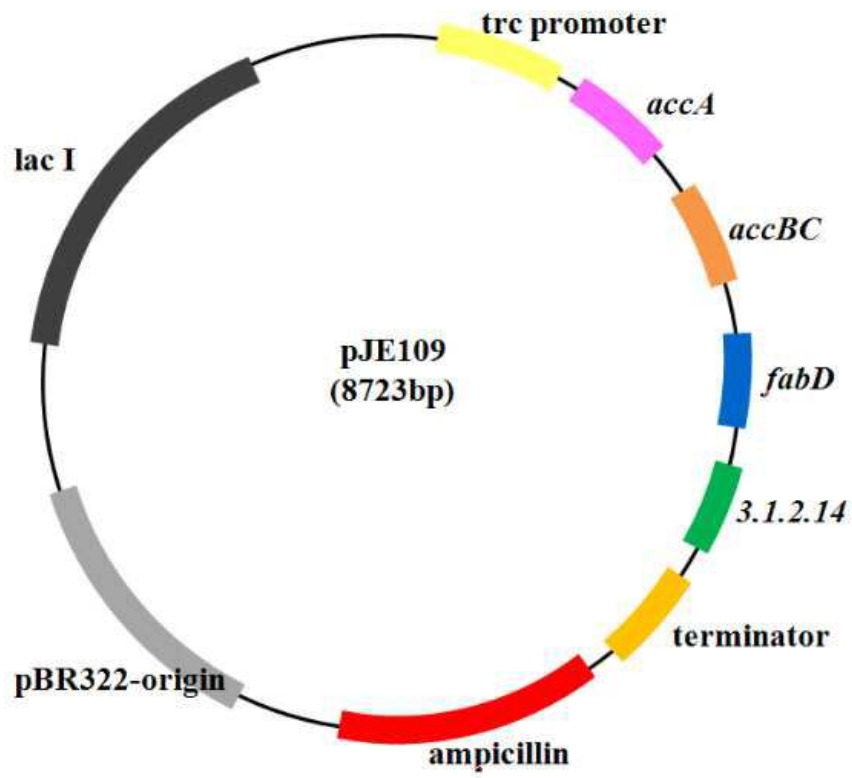
도면4



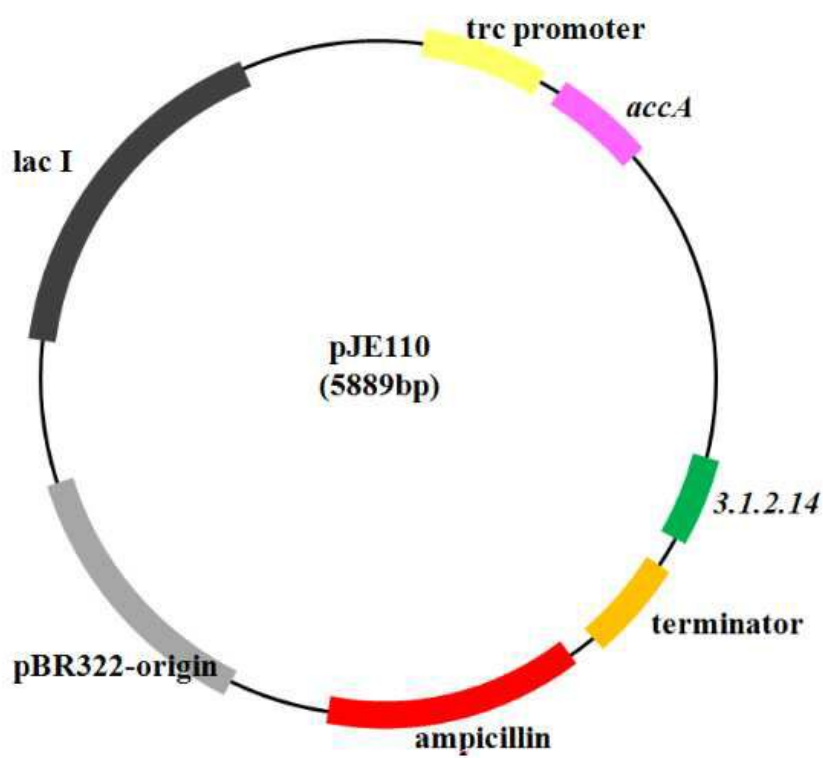
도면5



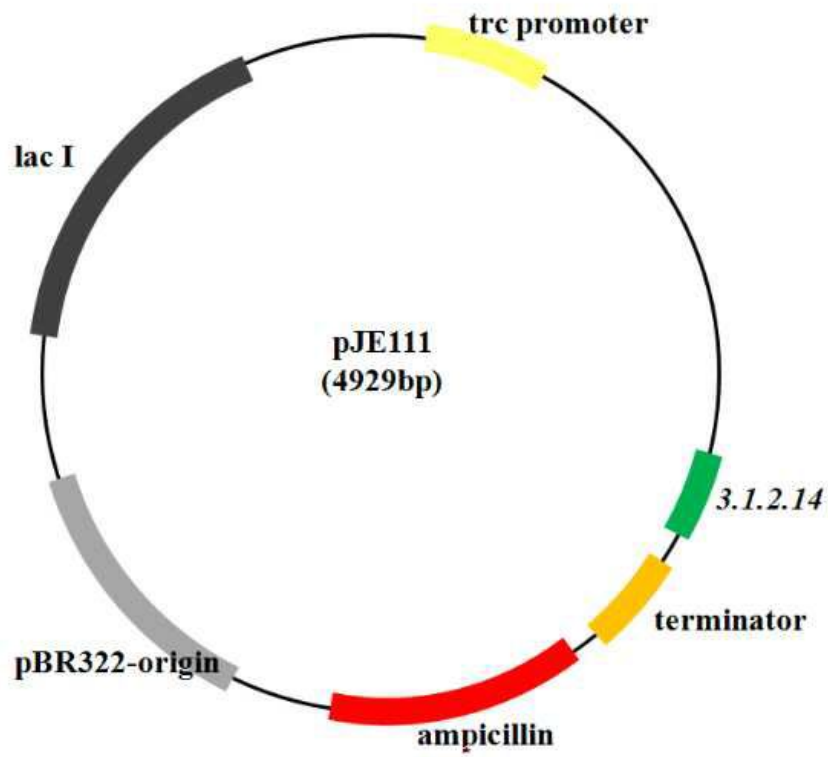
도면6



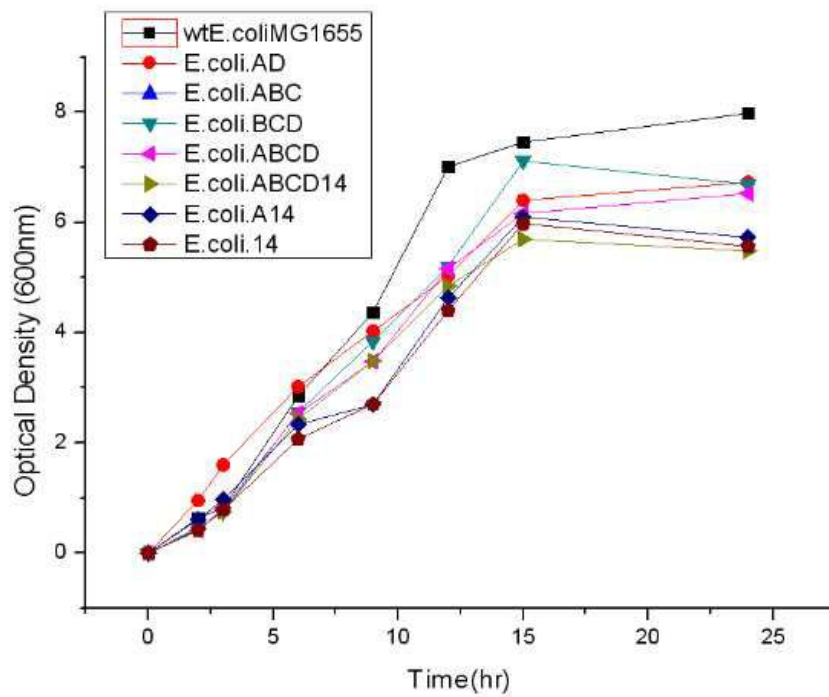
도면7



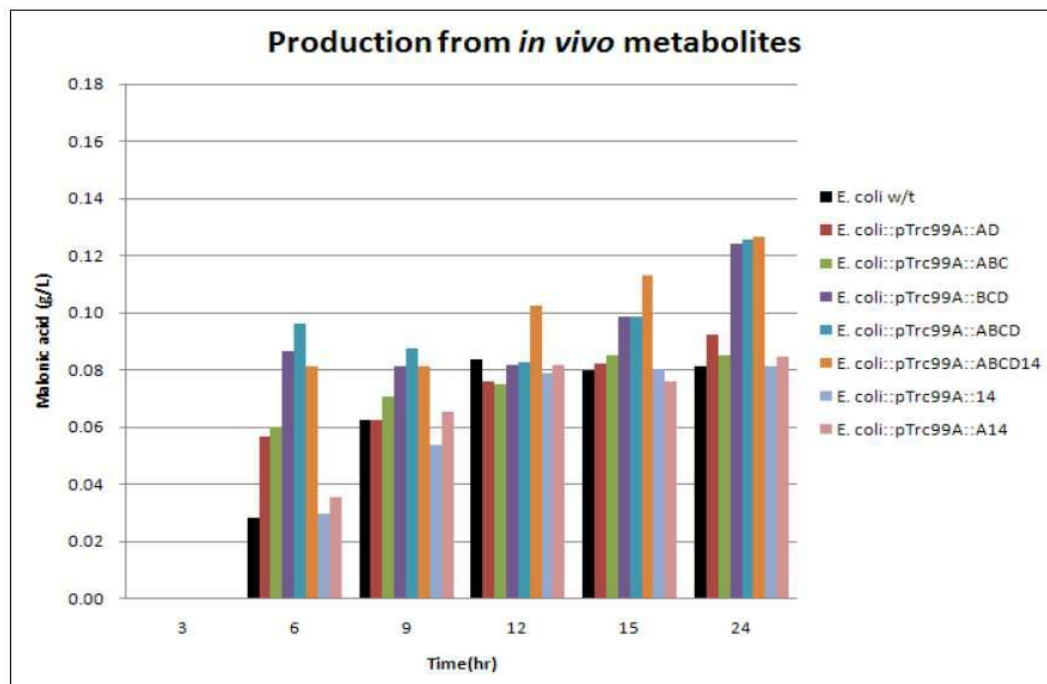
도면8



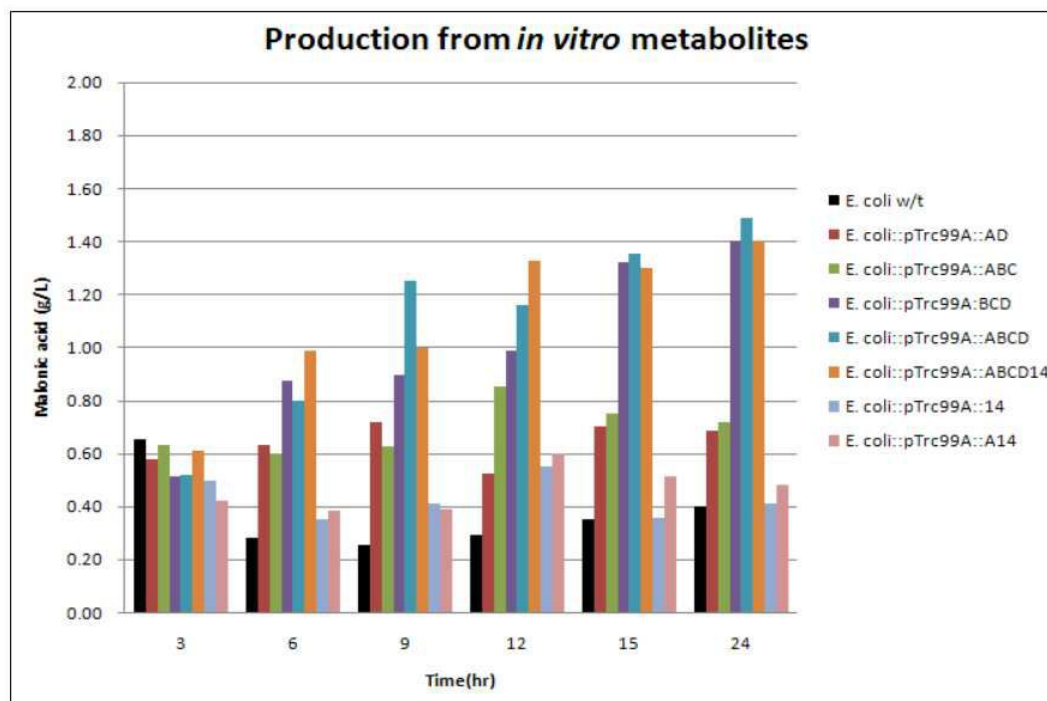
도면9



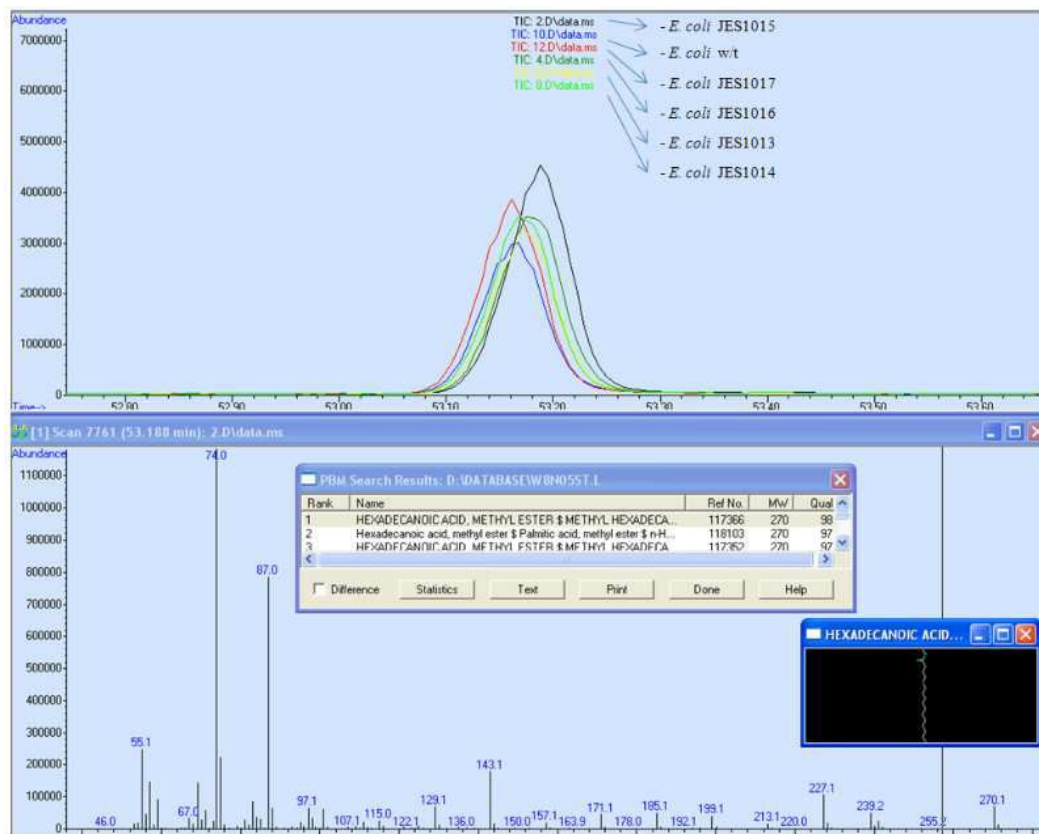
도면10a



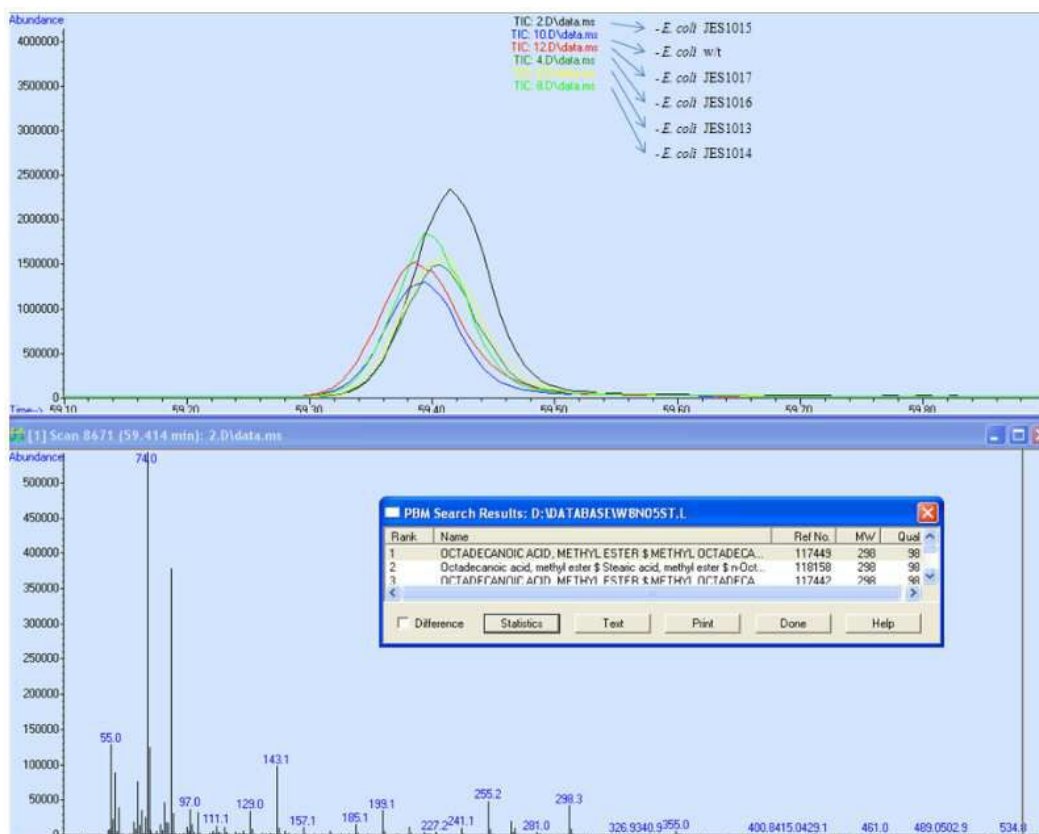
도면10b



도면11



도면12



서열목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
 <120> Transformed Escherichia coli for Over-expression of Fatty Acid
 Biosynthesis Pathway Using Malonyl-CoA and Malonyl-[acp] and
 Method of Preparing the Same
 <160> 11
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes MGAS10270
 <400> 1

Met Gly Leu Ser Tyr Gln Glu Glu Leu Thr Leu Pro Phe Glu Leu Cys

1 5 10 15

Asp Val Lys Ser Asp Ile Lys Leu Pro Leu Leu Leu Asp Tyr Cys Leu

20 25 30

Met Val Ser Gly Arg Gln Ser Ala Gln Leu Gly Arg Ser Asn Asn Asn

35 40 45

Leu Leu Val Asp Tyr Lys Leu Val Trp Ile Val Thr Asp Tyr Glu Ile

50 55 60

Thr Ile His Arg Leu Pro His Phe Gln Glu Thr Ile Thr Ile Glu Thr

65 70 75 80

Lys Ala Leu Ser Tyr Asn Lys Phe Phe Cys Tyr Arg Gln Phe Tyr Ile

85 90 95

Tyr Asp Gln Glu Gly Gly Leu Leu Val Asp Ile Leu Ala Tyr Phe Ala

100 105 110

Leu Leu Asn Pro Asp Thr Arg Lys Val Ala Thr Ile Pro Glu Asp Leu

115 120 125

Val Ala Pro Phe Lys Thr Asp Phe Val Lys Lys Leu Tyr Arg Val Pro

130 135 140

Lys Met Pro Leu Leu Glu Gln Ser Ile Asp Arg Asp Tyr Tyr Val Arg

145 150 155 160

Tyr Phe Asp Ile Asp Met Asn Gly His Val Asn Asn Ser Lys Tyr Leu

165 170 175

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

225 230 235 240
Ala Ile Lys Gln Thr Glu Ser Glu Ile Asp
245 250

<210> 2

<211> 753

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes MGAS10270

<400> 2

atgggattaa gttatcagga ggagttgaca cttccttttg aattatgtga tgtcaaatca 60
gatataaaat tgcccccttt attagactat tgtttgatgg tttctggttag acagtctgcg 120
caattaggac gaagtaacaa caacctttta gtcgattaca agcttggttg gattgtaacg 180
gattatgaga tcactattca tcgcttgcca cathttcaag aaaccatcac cattgaaaca 240

aaagcccttt cctataataa atttttttgt tatcgccaat tttatattta tgatcaagag 300
gggggtcttt tagtggatat cttagcctat tttgctttgt taaaccaga tacgcgaaaa 360
gtggcaacta ttccagaaga tttagtagcg ccttttaaga ctgattttgt taaaaagtta 420
taccgtgttc ctaaaatgcc tcttttagaa caatcaattg atcgtgatta ttatgtgcgt 480
tattttgata ttgatatgaa tggatcatgtc aacaacagta aatatttaga ttggatgtat 540
gatgtgttgg ggtgtgcgtt tttaaaaacg catcagcctc ttaagatgac ttgaaatat 600
gttaaagaag tctcaccagg cgggtcaaatt acttccagtt accatttga ccaattaaat 660

tcttaccatc aaatcacctc agatgggcag ctgaatgccc aagccatgat tgaatggcga 720
gcgattaaac aaacagaaag cgagatagac tag 753

<210> 3

<211> 319

<212> PRT

<213> Escherichia coli strain K-12 MG1655

<400> 3

Met Ser Leu Asn Phe Leu Asp Phe Glu Gln Pro Ile Ala Glu Leu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ile Asn Ile Asp Glu Glu Val His Arg Leu Arg Glu Lys Ser Val

35 40 45

Glu Leu Thr Arg Lys Ile Phe Ala Asp Leu Gly Ala Trp Gln Ile Ala

50 55 60

Gln Leu Ala Arg His Pro Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Val Arg

65 70 75 80

Leu Ala Phe Asp Glu Phe Asp Glu Leu Ala Gly Asp Arg Ala Tyr Ala

85 90 95

Asp Asp Lys Ala Ile Val Gly Gly Ile Ala Arg Leu Asp Gly Arg Pro

100 105 110

Val Met Ile Ile Gly His Gln Lys Gly Arg Glu Thr Lys Glu Lys Ile

115 120 125

Arg Arg Asn Phe Gly Met Pro Ala Pro Glu Gly Tyr Arg Lys Ala Leu

130 135 140

Arg Leu Met Gln Met Ala Glu Arg Phe Lys Met Pro Ile Ile Thr Phe

145 150 155 160

Ile Asp Thr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Val Gly Ala Glu Glu Arg Gly

165 170 175

Gln Ser Glu Ala Ile Ala Arg Asn Leu Arg Glu Met Ser Arg Leu Gly

180 185 190

Val Pro Val Val Cys Thr Val Ile Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ala

195 200 205

Leu Ala Ile Gly Val Gly Asp Lys Val Asn Met Leu Gln Tyr Ser Thr

210 215 220

Tyr Ser Val Ile Ser Pro Glu Gly Cys Ala Ser Ile Leu Trp Lys Ser

225 230 235 240

Ala Asp Lys Ala Pro Leu Ala Ala Glu Ala Met Gly Ile Ile Ala Pro

245 250 255
 Arg Leu Lys Glu Leu Lys Leu Ile Asp Ser Ile Ile Pro Glu Pro Leu
 260 265 270
 Gly Gly Ala His Arg Asn Pro Glu Ala Met Ala Ala Ser Leu Lys Ala
 275 280 285
 Gln Leu Leu Ala Asp Leu Ala Asp Leu Asp Val Leu Ser Thr Glu Asp
 290 295 300
 Leu Lys Asn Arg Arg Tyr Gln Arg Leu Met Ser Tyr Gly Tyr Ala
 305 310 315

<210> 4
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli strain K-12 MG1655
 <400> 4

atgagtctga atttccctga ttttgaacag ccgattgcag agctggaagc gaaaatcgat 60
 tctctgactg cggttagccg tcaggatgag aaactggata ttaacatcga tgaagaagtg 120
 catcgctctgc gtgaaaaaag cgtagaactg acacgtaaaa tcttcgccga tctcgggtgca 180
 tggcagattg cgcaactggc acgccateca cagcgtcctt ataccctgga ttacgttcgc 240
 ctggcatttg atgaatttga cgaactggct ggcgaccgcg cgtatgcaga cgataaagct 300
 atcgtcgggtg gtatcgcccg tctcgatggt cgtccggtga tgatcattgg tcatcaaaaa 360

 ggctcgtgaaa ccaaagaaaa aattcgccgt aactttggta tgccagcgcc agaaggttac 420
 cgcaaagcac tgcgtctgat gcaaatggct gaacgcttta agatgcctat catcaccttt 480
 atcgacaccc cgggggctta tcctggcgtg ggcgacagaag agcgtgggtca gtctgaagcc 540
 attgcacgca acctgcgtga aatgtctcgc ctggcggtac cggtagtttg tacggttatc 600
 ggtgaagggtg gttctggcgg tgcgtggcg attggcgtgg gcgataaagt gaatatgctg 660
 caatacagca cctattccgt tatctcgccg gaaggttgtg cgtccattct gtggaagagc 720
 gccgacaaag cgccgtggc ggctgaagcg atgggtatca ttgctccgcg tctgaaagaa 780

 ctgaaactga tcgactccat catcccgga ccaactgggtg gtgctcaccg taaccggaa 840
 gcgatggcgg catcgttgaa agcgcaactg ctggcggatc tggccgatct cgacgtgtta 900
 agcactgaag atttaaaaaa tcgtcgttat cagcgctga tgagctacgg ttacgcgtaa 960
 960

<210> 5
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli strain K-12 MG1655
 <400> 5
 Met Asp Ile Arg Lys Ile Lys Lys Leu Ile Glu Leu Val Glu Glu Ser
 1 5 10 15
 Gly Ile Ser Glu Leu Glu Ile Ser Glu Gly Glu Glu Ser Val Arg Ile
 20 25 30
 Ser Arg Ala Ala Pro Ala Ala Ser Phe Pro Val Met Gln Gln Ala Tyr
 35 40 45
 Ala Ala Pro Met Met Gln Gln Pro Ala Gln Ser Asn Ala Ala Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Val Pro Ser Met Glu Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 His Ile Val Arg Ser Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Pro Ser
 85 90 95
 Pro Asp Ala Lys Ala Phe Ile Glu Val Gly Gln Lys Val Asn Val Gly
 100 105 110
 Asp Thr Leu Cys Ile Val Glu Ala Met Lys Met Met Asn Gln Ile Glu
 115 120 125
 Ala Asp Lys Ser Gly Thr Val Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Gln
 130 135 140
 Pro Val Glu Phe Asp Glu Pro Leu Val Val Ile Glu
 145 150 155

<210> 6
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli strain K-12 MG1655
 <400> 6
 atggatattc gtaagattaa aaaactgatac gagctggttg aagaatcagg catctccgaa 60
 ctggaaattt ctgaaggcga agagtcagta cgcattagcc gtgcagctcc tgccgcaagt 120

ttccctgtga tgcaacaagc ttacgtgca ccaatgatgc agcagccagc tcaatctaac 180
gcagccgctc cgcgaccgt tccttccatg gaagcgccag cagcagcgga aatcagtgg 240
cacatcgta cgttccccgat gggttggtact ttctaccgca cccaagccc ggacgcaaaa 300
gcgttcatcg aagtgggtca gaaagtcaac gtggcgata cctgtgcat cgttgaagcc 360

atgaaaatga tgaaccagat cgaagcggac aaatccggt cgtgaaagc aattctggtc 420
gaaagtggac aaccggtaga atttgacgag ccgctggctg tcacgagta a 471

<210> 7

<211> 449

<212> PRT

<213> Escherichia coli strain K-12 MG1655

<400> 7

Met Leu Asp Lys Ile Val Ile Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Leu Arg

1 5 10 15

Ile Leu Arg Ala Cys Lys Glu Leu Gly Ile Lys Thr Val Ala Val His

20 25 30

Ser Ser Ala Asp Arg Asp Leu Lys His Val Leu Leu Ala Asp Glu Thr

35 40 45

Val Cys Ile Gly Pro Ala Pro Ser Val Lys Ser Tyr Leu Asn Ile Pro

50 55 60

Ala Ile Ile Ser Ala Ala Glu Ile Thr Gly Ala Val Ala Ile His Pro

65 70 75 80

Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ala Asn Phe Ala Glu Gln Val Glu

85 90 95

Arg Ser Gly Phe Ile Phe Ile Gly Pro Lys Ala Glu Thr Ile Arg Leu

100 105 110

Met Gly Asp Lys Val Ser Ala Ile Ala Ala Met Lys Lys Ala Gly Val

115 120 125

Pro Cys Val Pro Gly Ser Asp Gly Pro Leu Gly Asp Asp Met Asp Lys

130 135 140

Asn Arg Ala Ile Ala Lys Arg Ile Gly Tyr Pro Val Ile Ile Lys Ala

145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Arg Gly Met Arg Val Val Arg Gly Asp Ala

165	170	175
Glu Leu Ala Gln Ser Ile Ser Met Thr Arg Ala Glu Ala Lys Ala Ala		
180	185	190
Phe Ser Asn Asp Met Val Tyr Met Glu Lys Tyr Leu Glu Asn Pro Arg		
195	200	205
His Val Glu Ile Gln Val Leu Ala Asp Gly Gln Gly Asn Ala Ile Tyr		
210	215	220
Leu Ala Glu Arg Asp Cys Ser Met Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val		
225	230	235
Glu Glu Ala Pro Ala Pro Gly Ile Thr Pro Glu Leu Arg Arg Tyr Ile		
245	250	255
Gly Glu Arg Cys Ala Lys Ala Cys Val Asp Ile Gly Tyr Arg Gly Ala		
260	265	270
Gly Thr Phe Glu Phe Leu Phe Glu Asn Gly Glu Phe Tyr Phe Ile Glu		
275	280	285
Met Asn Thr Arg Ile Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Met Ile Thr		
290	295	300
Gly Val Asp Leu Ile Lys Glu Gln Leu Arg Ile Ala Ala Gly Gln Pro		
305	310	315
Leu Ser Ile Lys Gln Glu Glu Val His Val Arg Gly His Ala Val Glu		
325	330	335
Cys Arg Ile Asn Ala Glu Asp Pro Asn Thr Phe Leu Pro Ser Pro Gly		
340	345	350
Lys Ile Thr Arg Phe His Ala Pro Gly Gly Phe Gly Val Arg Trp Glu		
355	360	365
Ser His Ile Tyr Ala Gly Tyr Thr Val Pro Pro Tyr Tyr Asp Ser Met		
370	375	380
Ile Gly Lys Leu Ile Cys Tyr Gly Glu Asn Arg Asp Val Ala Ile Ala		
385	390	395
Arg Met Lys Asn Ala Leu Gln Glu Leu Ile Ile Asp Gly Ile Lys Thr		
405	410	415

Asn Val Asp Leu Gln Ile Arg Ile Met Asn Asp Glu Asn Phe Gln His

420 425 430

Gly Gly Thr Asn Ile His Tyr Leu Glu Lys Lys Leu Gly Leu Gln Glu

435 440 445

Lys

<210> 8

<211> 1350

<212> DNA

<213> Escherichia coli strain K-12 MG1655

<400> 8

atgctggata aaattgttat tgccaaccgc ggcgagattg cattgcgtat tcttcgtgcc	60
tgtaaagaac tgggcatcaa gactgtcgct gtgcactcca gcgcggatcg cgatctaaaa	120
cacgtattac tggcagatga aacggctctgt attggccctg ctccgtcagt aaaaagttaa	180
ctgaacatcc cggcaatcat cagcgccgct gaaatcacgc gcgcagtagc aatccatccg	240
ggttacggct tctctccga gaacccaac ttgcccagc aggttgaacg ctccggcttt	300
atcttcattg gcccgaagc agaaaccatt cgctgatgg gcgacaaagt atccgcaatc	360
gcggcgatga aaaaagcggg cgctcccttc gtaccgggtt ctgacggccc gctgggcgac	420
gatatggata aaaaccgtgc cattgctaaa cgcatgtgtt atccggtgat tatcaaagcc	480
tccggcggcg gcggcggtcg cggatatgctc gtagtgccgc gcgacgtga actggcacia	540
tccatctcca tgaccctgic ggaagcgaac gctgctttca gcaacgatat ggtttacatg	600
gagaaatacc tgaaaaatcc tcgccacgtc gagattcagg tactggctga cggtcagggc	660
aacgtatctt atctggcgga acgtgactgc tccatgcaac gccgccacca gaaagtggctc	720
gaagaagcgc cagcaccggg cattaccccg gaactgcgtc gctacatcgg cgaacgttgc	780
gctaaagcgt gtgttgatat cggctatcgc ggtgcaggta ctttcgagtt cctgttcgaa	840
aacggcgagt tctatttcat cgaaatgaac acccgatttc aggtagaaca cccggttaca	900
gaaatgatca ccggcggtga cctgatcaaa gaacagctgc gtatcgctgc cggtaaccg	960
ctgtcgatca agcaagaaga agttcacgtt cgcggccatg cggtggaatg tcgtatcaac	1020
gccgaagatc cgaacacctt cctgccaagt ccgggcaaaa tcaccgttt ccacgcacct	1080
ggcgggtttg gcgtacgttg ggagtctcat atctacggg gctacaccgt accgccgtac	1140
tatgactcaa tgatcggtaa gctgatttgc tacggtgaaa accgtgacgt ggcgattgcc	1200
cgcgtgaaga atgcgctgca ggagctgac atcgacggta tcaaaaccaa cgttgatctg	1260

cagatccgca tcatgaatga cgagaacttc cagcatgggtg gcactaacat ccactatctg 1320
gagaaaaaac tcggtcttca ggaaaaataa 1350

<210> 9

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli strain K-12 MG1655

<400> 9

Met Thr Gln Phe Ala Phe Val Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Thr Val

1 5 10 15

Gly Met Leu Ala Asp Met Ala Ala Ser Tyr Pro Ile Val Glu Glu Thr

20 25 30

Phe Ala Glu Ala Ser Ala Ala Leu Gly Tyr Asp Leu Trp Ala Leu Thr

35 40 45

Gln Gln Gly Pro Ala Glu Glu Leu Asn Lys Thr Trp Gln Thr Gln Pro

50 55 60

Ala Leu Leu Thr Ala Ser Val Ala Leu Tyr Arg Val Trp Gln Gln Gln

65 70 75 80

Gly Gly Lys Ala Pro Ala Met Met Ala Gly His Ser Leu Gly Glu Tyr

85 90 95

Ser Ala Leu Val Cys Ala Gly Val Ile Asp Phe Ala Asp Ala Val Arg

100 105 110

Leu Val Glu Met Arg Gly Lys Phe Met Gln Glu Ala Val Pro Glu Gly

115 120 125

Thr Gly Ala Met Ala Ala Ile Ile Gly Leu Asp Asp Ala Ser Ile Ala

130 135 140

Lys Ala Cys Glu Glu Ala Ala Glu Gly Gln Val Val Ser Pro Val Asn

145 150 155 160

Phe Asn Ser Pro Gly Gln Val Val Ile Ala Gly His Lys Glu Ala Val

165 170 175

Glu Arg Ala Gly Ala Ala Cys Lys Ala Ala Gly Ala Lys Arg Ala Leu

180 185 190

Pro Leu Pro Val Ser Val Pro Ser His Cys Ala Leu Met Lys Pro Ala

195 200 205

Ala Asp Lys Leu Ala Val Glu Leu Ala Lys Ile Thr Phe Asn Ala Pro

210 215 220

Thr Val Pro Val Val Asn Asn Val Asp Val Lys Cys Glu Thr Asn Gly

225 230 235 240

Asp Ala Ile Arg Asp Ala Leu Val Arg Gln Leu Tyr Asn Pro Val Gln

245 250 255

Trp Thr Lys Ser Val Glu Tyr Met Ala Ala Gln Gly Val Glu His Leu

260 265 270

Tyr Glu Val Gly Pro Gly Lys Val Leu Thr Gly Leu Thr Lys Arg Ile

275 280 285

Val Asp Thr Leu Thr Ala Ser Ala Leu Asn Glu Pro Ser Ala Met Ala

290 295 300

Ala Ala Leu Glu Leu

305

<210> 10

<211> 930

<212> DNA

<213

> Escherichia coli strain K-12 MG1655

<400> 10

atgacgcaat ttgcatttgt gttccctgga cagggttctc aaaccgttgg aatgctggct 60
gatatggcgg cgagctatcc aattgtcgaa gaaacgtttg ctgaagcttc tgcggcgctg 120
ggctacgacc tgtgggcgct gaccagcag gggccagctg aagaactgaa taaaacctgg 180
caaaactcagc ctgcgtgtt gactgcatct gttgcgtgt atcgctatg gcagcagcag 240
ggcggtaaag caccggcaat gatggccggt cacagcctgg gggaatactc cgcgctggtt 300
tgcgctggtg tgattgattt cgctgatgcg gtgcgtctgg ttgagatgcg cggcaagtcc 360

atgcaagaag ccgtaccgga aggcacgggc gctatggcgg caatcatcgg tctggatgat 420
gcgtctattg cgaagcgtg tgaagaagct gcagaaggtc aggtcgtttc tccggtaaac 480
tttaactctc cgggacaggt ggttattgcc ggtcataaag aagcggttga gcgtgctggc 540
gtgcctgta aagcggcggg cgcaaacgc gcgctgccgt taccagttag cgtaccgtct 600
cactgtgcgc tgatgaaacc agcagccgac aaactggcag tagaattagc gaaaatcacc 660

tttaacgcac caacagtcc tgttgtgaat aacgttgatg tgaaatgcga aaccaatggt	720
gatgccatcc gtgacgcact ggtacgtcag ttgtataacc cgttcagtg gacgaagtct	780
gltgagtaca tggcagcgca aggcgtagaa catctctatg aagtcggccc gggcaaagt	840
cttactggcc tgacgaaacg cattgtcgac accctgaccg cctcggcgct gaacgaacct	900
tcagcgatgg cagcggcgct cgagctttaa	930
<210> 11	
<211> 4176	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Backbone vector	
<400> 11	
gtttgacagc ttatcatcga ctgcacgggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc	60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc	120
gcactcccg tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatttc	180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga	240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtaaccgg ggatcctcta	300
gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc	360
tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca	420
gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg	480
atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga	540
aaggctcagt cgaagactg ggcctttctg tttatctgtt gttgtcgggt gaacgtctc	600
ctgagttaga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgagggt	660
tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc aggcatacaa ttaagcagaa ggccatcctg	720
acggatggcc tttttgcgtt tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa	780
atatgtatcc gtcctatgaga caataacct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga	840
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttatcc cttttttgcg gcattttgcc	900
ttctgtttt tgctcaccca gaaacgtgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg	960
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc	1020
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt tctgctatgt ggcgcggtat	1080
tatcccggtg tgacgccggg caagagcaac tcggtcggcg catacactat tctcagaatg	1140
acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag	1200

aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta ctctgacaa	1260
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc	1320
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca	1380
cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc	1440
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc	1500
tgcgctcggc ccttcgggt ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg	1560
ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta	1620
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag	1680
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga	1740
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc	1800
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa	1860
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaa	1920
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc	1980
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt	2040
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaattc	2100
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac	2160
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	2220
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg	2280
ccacgcttc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag	2340
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt	2400
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat	2460
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctggc cttttgctgg cttttgctc	2520
acatgttctt tctgcgta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	2580
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagt agcgaggaag	2640
cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca	2700
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata gtttaagccag tataactcc	2760
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgtgacgc	2820
gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg	2880
gagctgcatg tgtcagaggt ttaccacgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa	2940
ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc	3000
tttcgcggtg tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa	3060

ccagtaacgt tatacgaagt cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc	3120
gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg	3180
gcggagctga attacattcc caaccgctg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg	3240
ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgcgcggcg	3300
attaaatctc gcgccatca actgggtgcc agcgtggtgg tgcgatggt agaacgaagc	3360
ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcgtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg	3420
atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat	3480
gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacacca tcaacagtat tattttctcc	3540
catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaate	3600
gcgctgttag cgggcccatt aagtctctgc tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat	3660
aaatatctca ctgcgaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc	3720
atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg	3780
ctggttgcca acgatcagat ggcgtgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg	3840
cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat	3900
atcccgcgt caaccacat caaacaggat ttctgcctgc tggggcaaac cagcgtggac	3960
cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaaggga atcagctgtt gccctctca	4020
ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa ccgctctcc ccgcgcgttg	4080
gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgcgcg	4140
caacgaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctg	4176