

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 12월 5일 (05.12.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/180488 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/11 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004762
- (22) 국제출원일: 2013년 5월 30일 (30.05.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0059411 2012년 6월 1일 (01.06.2012) KR
10-2012-0149832 2012년 12월 20일 (20.12.2012) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HAN-YANG) [KR/KR]; 133-791 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 진언선 (JIN, Eon Seon); 110-782 서울시 종로구 동망산길 47, 종로센트레빌아파트 104동 1203호, Seoul (KR). 이재혁 (LEE, Jae Hyeok); V6T 1Z4 브리티시 컬럼비아주 벤쿠버 웨스트몰 2329, 브리티시컬럼비아대학교 식물학, Columbia (CA). 박승혜 (PARK, Seung Hye); 430-843 경기도 안양시 만안구 병목안로 220, 홍화아파트 101동 1005호, Gyeonggi-do (KR). 백광열 (BAEK, Kwang Ryul); 410-362 경기도 고양시 일산동구 중앙로 1005, 현대밀라트 1차 B동 811호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2, 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

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

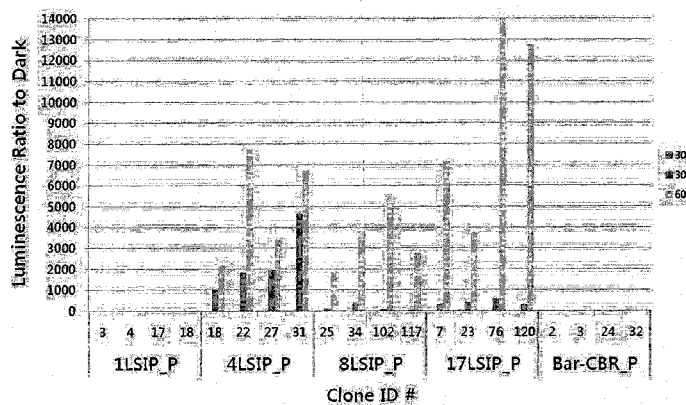
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: LIGHT-INDUCIBLE PROMOTER AND GENE EXPRESSION SYSTEM CONTAINING SAME

(54) 발명의 명칭: 광 유도성 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템



(57) Abstract: The present invention relates to a light-inducible promoter and a gene expression system containing the same, and provides: a light-inducible promoter comprising a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 12; and a method for producing heterologous proteins using the same. Since the light-inducible promoter of the present invention induces the expression of a gene by the irradiation of light and regulates an expression amount of the gene according to an intensity of light, it is possible to conveniently regulate the expression of the gene without straining the growth or metabolic process of an organism. In addition, the present invention can be applied to various types of organisms, and thus has a wide range of application.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/180488 A1



본 발명은 광 유도성 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템에 관한 것으로서, 서열번호 12로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성 프로모터 및 이를 이용한 외래 단백질의 생산 방법을 제공한다. 본 발명의 광 유도성 프로모터는 광의 조사에 의하여 유전자의 발현을 유도하고 광의 광도에 따라 유전자의 발현량을 조절하므로, 생물체의 성장이나 대사과정에 무리를 주지 않고 간편하게 유전자의 발현을 조절할 수 있는 효과가 있고, 다양한 종류의 생물체에 적용가능하여 활용 범위가 넓은 장점이 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

광 유도성 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템

5 【기술분야】

본 발명은 교육과학기술부의 지원 하에서 과제번호 2011-0031999 에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터, 연구사업명은 “거대과학연구개발사업(korea CCS 2020 사업)”, 연구과제명은 “분자생물학적 개량을 통한 고효율 이산화탄소고정 미세조류 개발”, 10 주관기관은 한양대학교 산학협력단, 연구기간은 2011. 11. 01 ~ 2012. 05. 31 이다.

본 특허출원은 2012 년 6 월 1 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2012-0059411 호 및 2012 년 12 월 20 일에 15 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2012-0149832 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 신규한 프로모터에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 광 유도성 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템에 관한 것이다.

20

【배경기술】

최근 바이오 연료 개발, 이산화탄소 발생 저감, 고부가가치 물질 생산 등 최신 생명공학 기술에 미세조류를 이용하고자 하는 시도와 함께 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 분석하려는 노력들이 진행되고 있다. 25 이러한 노력의 일환으로서, 기존의 미세조류에 유용한 유전자를 도입하여 원하는 형질을 나타내도록 하려는 시도가 계속되고 있다. 그러나 미세조류는 형질전환 효율이 낮고, 도입된 유전자의 발현 효율이 낮은 등의 형질전환 기술 상에 문제가 있다.(Lumbreras et al., Plnat J. 1998; 14: 441-447).

30 이러한 문제를 해결하기 위한 중요한 수단 중의 하나로 미세조류를 위한 각종 프로모터들이 개발되고 있고, 미세조류에서 유래한 프로모터를

사용함으로써 기존에 알려진 고등식물용 프로모터를 사용하는 경우보다 효과적인 형질전환 및 유전자 발현을 유도할 수 있었다(Walker et al., J. Applied Phycol. 2005; 17: 363-368). 최근에 연구 및 발표되고 있는 클라미도모나스 속 조류(Schroda et al., The Plant Journal 2000; 21(2): 121-131)와 두날리엘라 속 조류(Li et al., Mol Biol. Rep. 2010; 37: 1143-1154)를 위한 프로모터에 대한 연구도 이러한 연구의 한 결과이다.

상기 Schroda et al.에서 발표된 클라미도모나스 속 조류 유래의 프로모터는 두 가지 서로 다른 프로모터를 융합시킨 것으로 주로 열 충격에 의해 유전자의 발현을 유도하는 프로모터이다. 상기 프로모터를 이용하는 경우, 유전자의 발현 유도를 위해 열을 가하게 되면, 조류의 생장이나 대사과정에 무리를 줄 수 있는 문제가 있다.

상기 Li et al.에서 발표된 두날리엘라 속 조류 유래의 프로모터는 염농도가 높은 조건(2M NaCl)에서 유전자의 발현을 유도하는 프로모터이다. 상기 프로모터는 호염성의 생물종에만 적용될 수 있을 뿐이어서, 활용 범위가 좁은 문제가 있다.

이에, 다양한 종류의 생물체에 적용가능하여 활용 범위가 넓으면서도, 생물체의 생장이나 대사과정에 무리를 주지 않고, 간편하게 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터의 개발이 절실한 실정이다.

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】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명의 목적은 다양한 종류의 생물체에 적용가능하면서도, 광의 조사에 의하여 간편하게 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터 및 이를 포함하는 유전자 발현 시스템을 제공하는 것이다.

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

【과제 해결 수단】

5 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성 프로모터를 제공한다.

10 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 다른 측면은 상기 광 유도성 프로모터를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

15 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성 프로모터에 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 발현 컨스트럭트, 상기 발현 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

 아울러, 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 또 다른 측면은 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 단계를 포함하는 외래 단백질의 생산 방법을 제공한다.

20 【발명의 효과】

25 본 발명의 광 유도성 프로모터는 광의 조사에 의하여 유전자의 발현을 유도하고 광의 광도에 따라 유전자의 발현량을 조절하므로, 생물체의 생장이나 대사과정에 무리를 주지 않고 간편하게 유전자의 발현을 조절할 수 있는 효과가 있고, 다양한 종류의 생물체에 적용가능하여 활용 범위가 넓은 장점이 있다.

 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 및 1b 는 본 발명의 실시예 <1-2>에서 LSIP_P 가 클로닝된 pGEM^(R)-T easy 벡터를 뉴클레오타이드 서열 분석한 결과를 나타낸 그림으로서,

- 5 회색 음영으로 표시한 부분은 첫 번째 엑손을 나타낸 것이고;
회색 음영으로 표시된 부분을 제외한 나머지 부분의 뉴클레오타이드 서열이 LSIP_P 의 뉴클레오타이드 서열이다.

도 2 는 두날리엘라 에스피. (*Dunaliella* sp.) 의 LSIP_P 와 두날리엘라 바다빌 (*Dunaliella bardawil*) 의 cbr 프로모터의 뉴클레오타이드 서열을
10 비교한 그림으로서,

bar 는 두날리엘라 바다빌 (*Dunaliella bardawil*) 의 cbr 프로모터의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸 것이고;

sp 는 두날리엘라 에스피. 의 LSIP_P 의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸 것이다.

15 도 3 은 클라미도모나스용 발현벡터인 pN7-AR_P-LUC-TPsaD 의 벡터 맵으로서,

nic7 유전자는 형질전환시 선별 마커로 작용하는 quinolinate synthetase 유전자를 나타낸 것이고;

AR-P 는 클라미도모나스 유래의 재조합 프로모터를 나타낸 것이며;

20 Renilla luciferase CDS 는 기질(Coelenterazine)을 분해하면서 빛을 내도록 하는 효소를 암호화하는 유전자를 나타낸 것이고;

PsaD-T 는 클라미도모나스 유래의 PsaD 유전자의 터미네이터 부분을 나타낸 것이다.

도 4 는 상기 도 3 의 pN7-AR_P-LUC-TPsaD 에서 AR_P 가 제거된 부위에
25 1LSIP_P, 4LSIP_P, 8LSIP_P, 17LSIP_P 또는 Bar-CBR_P 를 삽입한 발현벡터의 벡터 맵이다.

도 5 는 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-Bar-CBR_P-LUC-TPsaD 가
도입된 형질전환체에서 분리한 genomic DNA 에서 PCR 을 수행하여 936 bp
30 길이의 루시퍼라제 유전자에 해당하는 밴드가 각각 검출됨을 확인함으로써
상기 벡터들이 정상적으로 도입되었는지 여부를 확인한 젤 사진으로서,

+와 -는 각각 형질전환에 이용한 플라스미드 벡터, 그리고 형질전환시키지 않은 원래의 클라미도모나스를 나타낸 것을 의미하고;

1 내지 6 은 1LSIP_P, 7 내지 12 는 4LSIP_P, 13 내지 18 은 8LSIP_P, 19 내지 24 는 17LSIP_P 및 25 내지 30 은 Bar-CBR_P 를 각각 리포터 유전자 앞에 넣은 형질전환체를 의미한다.

도 6 은 1LSIP_P, 4LSIP_P, 8LSIP_P, 17LSIP_P 및 Bar-CBR_P 의 조절을 받는 루시페라제(luciferase)의 조사되는 광의 세기(light intensity)에 따른 발현 정도를 측정한 그래프이다.

도 7 은 1LSIP_P, 4LSIP_P, 8LSIP_P, 17LSIP_P 및 Bar-CBR_P 의 조절을 받는 루시페라제(luciferase)의 조사되는 광의 세기(light intensity)에 따른 발현 비율을 측정한 그래프로서, Luminescence ratio 는 (빛에 노출된 세포에서의 발광량) / (암처리 세포에서의 발광량)를 의미한다.

15 【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

먼저, 본 발명의 명세서에서 이용된 용어를 설명한다.

본 발명에서 일컫는 '두날리엘라 에스피.(*Dunaliella* sp.)'는 종래 Kim et al.(Phycological Research 2010; 58: 17-28) 문헌에서 전형적인 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*)와는 서로 구분되는 것으로 분류하여 새롭게 재명명한 두날리엘라 속의 조류를 의미하는 것으로서, 종래의 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*)와는 동속이종의 조류이다.

본 발명에서 일컫는 'LSIP(Light and Salt Inducible Protein)'는 상기 *Dunaliella* sp.에서 유래한, 서열번호 3 의 아미노산 서열을 갖는 단백질로서, 상기 Kim et al.(Phycological Research 2010; 58: 17-28) 문헌에서 cbr 단백질(carotenoid biosynthesis related protein)이라고 알려져 있다. 상기 Kim et al. 문헌에서는 상기 서열번호 3 의 아미노산 서열을 갖는 단백질이 다른 두날리엘라 속의 조류인 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*) 및 두날리엘라 바다빌(*Dunaliella bardawil*) 등의 cbr 단백질과 80% 정도의 높은 상동성을 나타낸다 하여, 이를 cbr 단백질이라고 명명하고 있다. 그러나 상기 *D. salina* 및 *D. bardawil* 종과는 달리, 상기 두날리엘라 에스피.(*Dunaliella* sp.)는

카로테노이드(carotenoid)를 축적하지 않는 종으로서, 특히 두날리엘라 에스피. (*Dunaliella* sp.)에서 상기 서열번호 3의 단백질이 수행하는 기능이나 상기 서열번호 3의 단백질과 카로테노이드(carotenoid) 간의 연관성에 관해서는 전혀 밝혀진 바가 없다는 측면에서, 두날리엘라 에스피. (*Dunaliella* sp.)에서 유래한 상기 서열번호 3의 단백질은 상기 *D. salina* 및 *D. bardawil*의 cbr 단백질과 구분될 필요가 있다. 따라서, 본 발명에서는 상기 서열번호 3의 단백질을 LSIP(Light and Salt Inducible Protein)이라고 재명명하고, 이를 *D. salina* 및 *D. bardawil*의 cbr 단백질과 구분되는 것으로 정의한다.

본 발명에서 일컫는 '프로모터'는 특정한 숙주세포에서 작동 가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다.

본 발명에서 일컫는 '발현벡터'는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서와 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.

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 있다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

1. 두날리엘라 에스피. 유래 프로모터

본 발명의 일 측면은 서열번호 18로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 두날리엘라 에스피. 유래 프로모터를 제공한다.

본 발명의 상기 두날리엘라 에스피. 유래 프로모터는 서열번호 18로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

상기 프로모터는 100 bp 길이의 서열번호 18 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 서열번호 18 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열은 그 하류(downstream) 즉 상기 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단 쪽에 작동가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 '발현'을 유도 및 향상시킨다. 그러나, 상기 서열번호 18 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열은 상기와 같은 유전자의 발현을 유도 및 향상시키는 성질을 갖는 프로모터의 최소 단위일 뿐, 상기 프로모터의 서열이 상기 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 아니한다. 따라서, 상기 프로모터는 서열번호 4 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열에서, 5
10
상기 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열이 포함되도록 선택되는 100 bp 내지 2084 bp 길이의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 일 예로서, 상기 프로모터는 439 bp 길이를 갖는 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열, 845 bp 길이를 갖는 서열번호 1 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열 또는 1702 bp 의 길이를 갖는 서열번호 2 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 15

상기 프로모터는 두날리엘라 에스피. (*Dunaliella* sp.)에서 유래한 것으로서, 상기 두날리엘라 에스피.의 LSIP 단백질을 코딩하는 유전자의 상류(upstream)에서 존재하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다. 따라서, 자연 유래 또는 인위적으로 합성한 뉴클레오타이드 서열이 모두 20
상기 프로모터로서 이용될 수 있다.

본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프로모터인 1LSIP_P 에 루시페라제(luciferase) 유전자를 작동가능 하게 연결하여, 도 4 와 같은 맵을 갖는 발현벡터 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD 를 제조하였고, 상기 1LSIP_P 가 25
유래한 두날리엘라 에스피.와는 이속이종인 클라미도모나스 레인하르트 JL173(*Chlamydomonas reinhardtii* JL173) 세포에 상기 발현벡터를 도입하여 형질전환체를 제조하였다. 그런 다음, 상기 형질전환체를 암처리하거나 또는 상기 형질전환체에 광도 30, 300 또는 600 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 각각 조사하여, 리포터 유전자인 루시페라제의 발현 여부 및 루미네선스 30
비(luminescence ratio)를 측정하였다. 그 결과, 리포터 유전자인 루시페라제는 본 발명의 1SLIP_P 하에서 광의 조사 여부 및 조사된 광의

세기(light intensity)에 관계없이, 광이 조사된 형질전환체에서만 발현되었다(표 3 및 도 6 참조).

상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 서열번호 18 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열은 프로모터 활성을 갖는 기본 단위로서, 상기 서열번호 18 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열의 하류에 작동가능하게 연결되는 외래 유전자를 안정적이면서도 매우 효율적으로 발현시킬 수 있음을 알 수 있다.

2. 광 유도성 프로모터

본 발명의 다른 측면은 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성 프로모터를 제공한다.

또한, 본 발명의 다른 측면은 상기 광 유도성 프로모터를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 상기 광 유도성 프로모터는 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

상기 프로모터는 439 bp 길이의 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 서열번호 12 의 뉴클레오타이드 서열은 프로모터 활성을 갖는 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열을 기본 단위로 하여, 상기 서열번호 18 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열의 5' 부분에 상기 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열이 나타내는 프로모터 활성을 조사되는 광의 세기에 따라 조절할 수 있는 339 bp 길이의 뉴클레오타이드 서열이 추가적으로 포함된 것이다.

상기 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열은 광의 조사에 의해 그 하류(downstream) 즉 상기 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단 쪽에 작동가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 유도하고, 특히 조사되는 광의 세기에 따라 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 조절한다. 그러나, 상기 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열은 상기와 같은 광의 세기(light intensity)에 따라 그 하류에 연결된 유전자 발현의 정도를 조절하는 성질을 갖는 프로모터의 최소 단위일 뿐, 상기 프로모터의 서열이 상기 서열번호 12 의 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 아니한다. 따라서, 상기 프로모터는 서열번호 4 로 기재되는

뉴클레오타이드 서열에서, 상기 서열번호 12 의 뉴클레오타이드 서열이 포함되도록 선택되는 439 bp 내지 2084 bp 길이의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 일 예로서, 상기 프로모터는 845 bp 길이를 갖는 서열번호 1 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열 또는 1702 bp 의 길이를 갖는 서열번호 2 로
5 기재되는 뉴클레오타이드 서열로 구성될 수 있다.

상기 프로모터는 두날리엘라 에스피. (*Dunaliella* sp.)에서 유래한 것으로서, 상기 두날리엘라 에스피.의 LSIP 단백질을 코딩하는 유전자의 상류(upstream)에서 존재하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다. 따라서, 자연 유래 또는 인위적으로 합성한 뉴클레오타이드 서열이 모두
10 상기 프로모터로서 이용될 수 있다.

상기 광 유도성 프로모터는 발현벡터에 포함되어, 상기 프로모터의 하류에 작동가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 광 의존적으로 조절할 수 있다.

상기 발현벡터는 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 상기 프로모터에
15 작동가능하게 삽입될 수 있는 다중클로닝부위(multiple cloning site, MCS)를 더 포함할 수 있다. 상기 다중클로닝부위를 이용하여, 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 발현벡터 내로 손쉽게 삽입할 수 있다.

상기 발현벡터에는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선별하기 위한 선별 마커를 더 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 종래 공지된 모든 종류의
20 선별 마커일 수 있으며, 항생제 내성 유전자, 발광 유전자 및 quinolinate synthetase 유전자 등이 이용될 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

상기 발현벡터는 종래의 모든 발현벡터에 상기 광 유도성 프로모터를 도입한 것일 수 있고, 공지의 방법에 의하여 인위적으로 디자인된 재조합 발현벡터일 수 있다. 상기 광 유도성 프로모터를 도입하여 발현벡터를
25 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시가능하다.

상기 발현벡터의 제조를 위한 벡터는 상기 광 유도성 프로모터를 도입할 수 있는 것이라면 무엇이든 사용가능하고, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등 일 수 있다.
30 특히, 미세조류 또는 고등식물과 같은 숙주세포 내에서 안정하게 존재하고 카피수가 많은 벡터를 사용하는 것이 바람직하다.

상기 발현백터는 숙주세포에 도입되어, 상기 숙주세포를 상기 발현백터로 형질전환할 수 있다.

상기 형질전환은 종래 공지된 형질전환 기술에 의해 당업자가 용이하게 수행할 수 있고, 상기 형질전환 기술은 Kindle(1990)에 의해
5 공지된 글라스 비드를 이용한 형질전환법, 칼슘/폴리에틸렌 글리콜법을 이용한 원형질체의 형질전환법, 전기천공법, 미량주사법, 입자 충격 투입법(particle bombardment), 전기충격법(electroporation), 아그로박테리움을 매개로 한 방법, 유전자 총 또는 물리적 도입법 등이 있다. 상기 형질전환 기술은 숙주세포의 종류 및 특성에 맞게 당업자가
10 적절히 선택하여 수행할 수 있다.

상기 발현백터를 형질전환시키기 위한 숙주세포는 미세조류 또는 고등식물인 것이 바람직하고, 클라미도모나스 또는 두날리엘라인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 프로모터를 인식할 수 있는 RNA 중합효소를 가진 세포는 모두 사용가능하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프로모터인 4LSIP_P, 상기 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프로모터인 8LSIP_P 및 상기 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프로모터인 17LSIP_P에 각각 루시페라제(luciferase) 유전자를 작동가능하게 연결하여, 도 4와 같은
20 맵을 갖는 발현백터 pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD를 제조하였고, 상기 LSIP_P가 유래한 두날리엘라 에스피.와는 이속이종인 클라미도모나스 레인하르티 JL173(*Chlamydomonas reinhardtii* JL173) 세포에 상기 세 발현백터 pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD를 각각 도입하여
25 형질전환체를 제조하였다. 그런 다음, 상기 형질전환체를 암처리하거나 또는 상기 형질전환체에 광도 30, 300 또는 600 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 각각 조사하여, 리포터 유전자인 luciferase의 발현 여부 및 luminescence ratio를 측정하였다. 그 결과, 리포터 유전자인 luciferase는 광이 조사된 형질전환체에서만 발현되었고, 조사된 광의 광도가 증가할수록 높은
30 luminescence ratio를 나타냄을 확인하였다(도 6 및 표 2 참조).

상기와 같은 결과로부터, 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열, 및 상기 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 서열번호 1 또는 서열번호 2 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열이 광 유도성 프로모터의 활성을 나타냄을 알 수 있다. 즉, 상기 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열이 상기와 같은 광 유도성 프로모터 활성의 최소 단위로서 역할을 하고, 서열번호 4 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열에서, 상기 서열번호 12 의 뉴클레오타이드 서열이 포함되도록 선택되는 다양한 길이의 뉴클레오타이드 서열 또한 상기와 같은 광 유도성 프로모터의 활성을 갖는 다는 것을 알 수 있다. 또한, 상기 LSIP_P 는 상기 LSIP_P 가 유래한 두날리엘라 속의 조류가 아닌 이속이종의 생물체에서도 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 광 의존적으로 조절할 수 있음이 확인된 바, 다양한 종의 생물체에 폭 넓게 적용될 수 있음을 알 수 있다.

3. 광 유도성 프로모터를 이용한 외래 단백질의 생산

본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성 프로모터에 외래 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동가능하게 연결된 발현 컨스트럭트, 상기 발현 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

또한, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 단계를 포함하는 외래 단백질의 생산 방법을 제공한다.

본 발명의 상기 발현 컨스트럭트는 서열번호 1 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성 프로모터 및 상기 광 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다.

상기 광 유도성 프로모터에 관해서는 상기 "2. 광 유도성 프로모터" 항목에서 설명한 바와 동일하다. 따라서 이에 관해서는 상기 "2. 광 유도성 프로모터" 항목의 설명을 원용하여 상세한 설명은 생략하도록 하고, 이하에서는 상기 발현 컨스트럭트에 특이적인 구성에 대해서만 설명한다.

상기 외래 단백질은 생산하고자 하는 단백질을 의미하는 것으로서, 유전자의 뉴클레오타이드 서열이 알려진 모든 종류의 단백질일 수 있다. 특히, 상기 외래 단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소 저해제, 신호전달단백질 또는 그 일부분, 항체 또는 그 일부분, 단쇄항체, 어피바디, 펩타이드 앵타머, 결합단백질 또는 그 결합도메인, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자 및 혈액 응고 인자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자는 상기 광 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 상기 작동가능하게 연결된다는 것은 상기 외래 단백질의 발현이 상기 광 유도성 프로모터의 활성화에 의해 조절될 수 있도록 연결되는 것을 의미한다. 따라서, 상기 광 유도성 프로모터에 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결되어 형성되는 상기 발현 컨스트럭트는 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트가 된다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 발현 컨스트럭트는 외래 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 다운스트림에 터미네이터 서열을 추가적으로 포함한다. 본 발명에 이용될 수 있는 터미네이터 서열(즉, 폴리 A 시그널 서열)은 당업계에 공지된 조류(algae)에서 작동가능한 다양한 터미네이터 서열을 포함하며, 예를 들어 PsaD-T(클라미도모나스 유래의 PsaD 유전자의 터미네이터)를 포함한다.

상기 발현 컨스트럭트는 발현벡터에 포함되어, 상기 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 광 의존적으로 조절할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 발현 컨스트럭트를 포함하는 형질전환체는 조류(algae)이며, 구체적으로 녹조류(Green algae)이고, 예컨대 *Dunaliella*, *Chlamydomonas* 등과 같은 녹조류이다.

또한, 상기 발현 컨스트럭트를 포함하는 상기 발현벡터는 숙주세포에 도입되어, 상기 숙주세포를 상기 발현벡터로 형질전환할 수 있다. 상기와 같이 형성된 형질전환체는 상기 외래 단백질의 생산에 이용될 수 있다.

본 발명의 상기 외래 단백질의 생산 방법은 1) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 2) 상기 배양된 형질전환체에 광을 조사하는 단계를 포함한다.

상기 단계 1)의 배양은 상기 형질전환체의 종류 및 특성에 따라 배양 방법, 배양 배지, 배양 조건 등을 달리하여 당업자가 적절히 수행할 수 있다.

상기 단계 2)의 광 조사는 상기 단계 1)에서 배양된 형질전환체에서
5 외래 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 유도하는 단계로서, 상기 유전자는 광 유도성 프로모터의 활성화에 의하여 그 발현이 조절된다.

상기 단계 2)의 광은 외래 단백질의 목표 생산량에 따라 그 광도를 당업자가 적절히 선택될 수 있고, 상기 조사 광의 광도는 10 내지 1000 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 또한 상기 단계
10 2)의 광은 외래 단백질의 목표 생산량에 따라 그 조사 시간을 당업자가 적절히 선택될 수 있고, 상기 광의 조사 시간은 1 내지 5 시간일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

상기 외래 단백질의 생산 방법은 3) 상기 형질전환체로부터 발현된 외래 단백질을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

상기와 같은 발현 컨스트럭트, 이를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터가 포함된 형질전환체를 이용하여 외래 단백질을 용이하게 생산할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

20 단, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

【실시예 1】

광 유도성 프로모터 LSIP_P의 클로닝 및 뉴클레오타이드 서열 분석

25 종래 Park et al.(Marine Biotechnology, 2006; 8: 120-128) 및 Kim et al.(Phycological Research 2010; 58: 17-28) 문헌을 참조하여, 두날리엘라 에스피.(*Dunaliella* sp.)에서 광의 광도에 따라 발현량이 변하는 것으로 알려진 단백질인 LSIP의 업스트림(upstream) 부분을 클로닝하여 그 뉴클레오타이드 서열을 분석하였고, 이를 LSIP_P 라고
30 명명하였다.

<1-1> 광 유도성 프로모터 LSIP_P의 클로닝

종래 Park et al.(Marine Biotechnology, 2006; 8: 120-128) 및 Kim et al.(Phycological Research 2010; 58: 17-28) 문헌에서 확립한 두날리엘라 에스피.(*Dunaliella* sp.)의 genomic DNA 에서, GenomeWalker™ Universal Kit(Cat. #638904)(Clontech, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 광 유도성 프로모터인 LSIP_P 를 pGEM^(R)-T easy 벡터(Promega, USA)에 클로닝하여 pGEM^(R)-T-LSIP_P 를 제조하였다. 상기 Kit 를 이용하여 상기 LSIP_P 의 클로닝 과정에서, 서열번호 6 으로 기재되는 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 7 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 각각 GSP1(gene specific primer 1) 및 GSP2(gene specific primer 2)로 이용하였다.

<1-2> 광 유도성 프로모터 LSIP_P의 뉴클레오타이드 서열 분석

상기 실시예 <1-1>에서 클로닝된 LSIP_P 를 (주)마크로젠(한국)에 의뢰하여 뉴클레오타이드 서열을 분석하였다. 뉴클레오타이드 서열 분석에는 서열번호 6 의 GSP1 과 서열번호 7 의 GSP2, 및 상기 GenomeWalker™ Universal Kit 에서 제공되는 어댑터 프라이머를 이용하였다.

그 결과, 상기 pGEM^(R)-T easy 벡터에는 서열번호 5 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열이 클로닝되어 있음을 확인하였다(도 1a 및 도 1b). 상기와 같은 뉴클레오타이드 서열 분석 결과로부터, 상기 서열번호 5 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열에서 LSIP 의 첫 번째 엑손 서열의 상류(upstream)에 존재하는 서열이 LSIP_P 의 뉴클레오타이드 서열이 되고, 결국 LSIP_P 는 서열번호 4 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것으로 확인되었다.

<1-3> 광 유도성 프로모터 LSIP_P의 상동성 분석

상기 실시예 <1-2>에서 수득한 LSIP_P 의 뉴클레오타이드 서열을, 종래 Lers et al.(The Journal of Biological Chemistry 1991; 266(21): 13598-13705) 문헌에서 밝혀진 두날리엘라 바다빌(*Dunaliella bardawil*) 유래의 cbr 프로모터의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 14)과 비교하여 상동성을 분석하였다.

그 결과, 본 발명의 LSIP_P 와 *D. bardawil* 의 cbr 프로모터는 상동성이 32 %로 매우 낮음을 확인하였다(도 2).

【실시예 2】

LSIP_P를 포함하는 발현벡터의 제조

상기 실시예 1에서 클로닝된 LSIP_P의 효과 및 이숙이종의 생물체에 대한 상기 LSIP_P의 적용가능성을 확인하기 위하여, 두날리엘라 속의
 5 조류가 아닌 다른 속의 생물체인 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 발현 시스템을 이용하였다.

상기 *C. reinhardtii*의 발현 시스템을 이용하기 위하여, 본 발명자들이 자체적으로 개발한 클라미도모나스용 발현벡터인 pN7-AR_P-LUC-TPsaD를 이용하였다. 상기 pN7-AR_P-LUC-TPsaD는 서열번호 8의
 10 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 도 3에 도시된 바와 같은 맵으로 구성되어 있다.

<2-1> pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD의 클로닝

상기 실시예 1에서 제조한 pGEM^(R)-T-LSIP_P를 주형으로 하여, XbaI 제한효소 부위를 갖는 서열번호 19 및 EcoRI의 제한효소 부위를 갖는
 15 서열번호 11의 프라이머 쌍으로 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써, 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 1LSIP_P를 수득하였다.

그런 다음, 상기 pN7-AR_P-LUC-TPsaD에서 XbaI 및 EcoRI의 제한효소를 이용하여 AR_P를 제거하고, AR_P가 제거된 부위에 상기 수득된
 20 1LSIP_P를 삽입함으로써, 도 4와 같은 맵을 갖는 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD 발현벡터를 제조하였다.

<2-2> pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD의 클로닝

상기 실시예 1에서 제조한 pGEM^(R)-T-LSIP_P를 주형으로 하여, XbaI 제한효소 부위를 갖는 서열번호 13 및 EcoRI의 제한효소 부위를 갖는
 25 서열번호 11의 프라이머 쌍으로 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써, 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 4LSIP_P를 수득하였다.

그런 다음, 상기 pN7-AR_P-LUC-TPsaD에서 XbaI 및 EcoRI의 제한효소를 이용하여 AR_P를 제거하고, AR_P가 제거된 부위에 상기 수득된
 30 4LSIP_P를 삽입함으로써, 도 4와 같은 맵을 갖는 pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD 발현벡터를 제조하였다.

<2-3> pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 의 클로닝

상기 실시예 1 에서 제조한 pGEM^(R)-T-LSIP_P 를 주형으로 하여, XbaI 제한효소 부위를 갖는 서열번호 9 및 EcoRI 의 제한효소 부위를 갖는 서열번호 11 의 프라이머 쌍으로 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써, 서열번호 1 의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 8LSIP_P 를

수득하였다.

그런 다음, 상기 pN7-AR_P-LUC-TPsaD 에서 XbaI 및 EcoRI 의 제한효소를 이용하여 AR_P 를 제거하고, AR_P 가 제거된 부위에 상기 수득된 8LSIP_P 를 삽입함으로써, 도 4 와 같은 맵을 갖는 pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 발현벡터를 제조하였다.

<2-4> pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 의 클로닝

상기 실시예 1 에서 제조한 pGEM^(R)-T-LSIP_P 를 주형으로 하여, XbaI 제한효소 부위를 갖는 서열번호 10 및 EcoRI 의 제한효소 부위를 갖는 서열번호 11 의 프라이머 쌍으로 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써, 서열번호 2 의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 17LSIP_P 를

수득하였다.

그런 다음, 상기 pN7-AR_P-LUC-TPsaD 에서 XbaI 및 EcoRI 의 제한효소를 이용하여 AR_P 를 제거하고, AR_P 가 제거된 부위에 상기 수득된 17LSIP_P 를 삽입함으로써, 도 4 와 같은 맵을 갖는 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 발현벡터를 제조하였다.

【실시예 3】클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)로의 형질전환<3-1> gamete autolysine 의 제조

상기 실시예 2 에서 제조한 발현벡터 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 를 *C. reinhardtii* 로 형질전환하는 과정에서, 상기 *C. reinhardtii* 의 세포벽 제거를 위해 이용되는 gamete autolysine 을 종래의 Harris et al.(*Chlamydomonas Handbook*(Academic, New York), 00.47, 593-594) 문헌에서 확립된 방법으로 제조하였다. 상기 gamete autolysine 의 제조를

위하여, 교배(mating) 효율이 좋은 야생형인 클라미도모나스 레인하르티 CC620(*Chlamydomonas reinhardtii* CC620) 및 클라미도모나스 레인하르티 CC621(*Chlamydomonas reinhardtii* CC621) 을 이용하였다. 구체적으로, 하기 표 1 의 조성을 갖는 TAP 액체 배지에서 배양된 각각의 *C. reinhardtii* CC620 및 *C. reinhardtii* CC621 세포들을 약 1×10^6 cell/plate 의 농도로 TAP 고체배지 상에 플레이팅하고, 1 주일 동안 배양한 다음, 배양된 세포들을 질소원이 없는 TAP 액체배지에 풀어 5 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 각각의 *C. reinhardtii* CC620 및 *C. reinhardtii* CC621 세포수를 계수하여, 두 세포를 1:1 의 세포수 비율이 되도록 섞어 15 분 동안 배양하였다. 상기와 같이 혼합되어 배양된 *C. reinhardtii* CC620 및 *C. reinhardtii* CC621 세포들을 원심분리하여 상층액을 수득하였고, 상기 수득된 상층액을 0.45 μm 의 주사기 필터로 여과함으로써 gamete autolysine 를 제조하였다. 상기와 같이 제조된 gamete autolysine 은 -80 내지 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

【표 1】

성분	농도
TRIS	2.42 g/L
NH ₄ Cl	0.4 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g/L
K ₂ HPO ₄	54 mg/L
KH ₂ PO ₄	27 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	50 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 mg/L
H ₃ BO ₃	11.4 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.2 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.1 mg/L

Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.6 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.6 mg/L
acetic acid	1 mL/L
pH 7.2	

<3-2> pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD의 도입 및 형질전환체의 선별

종래의 Kindle et al.(Proc. Natl Acad. Sci. USA 1990; 87: 1228-1232) 문헌에서 확립된 방법에 따라, 상기 실시예 2에서 제조한 발현벡터 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD를 클라미도모나스 레인하르티 JL173(*Chlamydomonas reinhardtii* JL173) 세포에 도입하였다. 구체적으로, 대수 성장기까지 배양된 *C. reinhardtii* JL173 세포를 원심분리하여 수득하고, 상기 실시예 <3-1>에서 준비한 gamete autolysine에 재현탁한 후, 상온에서 60 분 정도 반응시켰다. 상기과 같이 gamete autolysine과 반응시킨 *C. reinhardtii* JL173 세포를 다시 원심분리하여 수득한 후, TAP 액체배지에 재현탁시켜 세포 농도를 1×10^8 내지 3×10^8 cell/mL로 맞추었다. 직경 425 내지 600 μ m의 글라스 비드(glass bead)(G8772)(Sigma, USA)가 0.3 g 씩 담긴 시험관에 상기 세포현탁액을 0.3 mL 씩 분주하였다. 상기 각각의 시험관에 1 μ g의 KpnI 으로 절단하여 선형화(linearization)시킨 상기 실시예 2의 벡터 5 μ L와 100 μ L의 20 % PEG(polyethylene glycol) 8000을 넣고 25 초 동안 볼텍싱(vortexing)한 다음, TAP 액체배지를 더 첨가하고 원심분리하여 세포를 수득하였다. 상기과 같이 수득한 세포를 다시 10 mL의 TAP 액체배지에 재현탁하고 원심분리하여 세포를 재수득한다. 상기과 같이 재수득된 세포를 0.3 mL의 TAP 액체배지에 재현탁하였다. 그런 다음, 0.5 %의 아가로즈를 첨가하고 가열하여 45 °C까지 식힌 TAP 배지에, 상기 재현탁된 세포를 첨가하여 잘 섞는다. 그런 다음, 1 ppm의 3-아세틸피리딘(3-acetylpyridine)(Sigma, USA)이 첨가된 TAP 고체 배지 상에 상기 세포를 플레이팅하여 굳히고, 5 내지 7 일 동안 배양하였다.

상기 5 내지 7 일 동안 배양한 세포가 녹색의 콜로니를 형성하기 시작하면, 상기 콜로니를 이쑤시개로 찍어 새로운 TAP 고체배지 상에 옮김으로써 발현벡터 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 형질전환된 *C. reinhardtii* JL173 형질전환체를 선별하였다.

<3-3> pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 의 도입여부 확인

상기 실시예 <3-2>에서 선별된 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체를 TAP 액체배지에서 대수 성장기 정도까지 배양하여 각각 수득한 다음, DNeasy plant mini kit(69104)(QIAGEN, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 genomic DNA 를 각각 분리하였다.

상기 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 가 정상적으로 도입된 형질전환체 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 에서 분리한 genomic DNA 를 주형으로, 서열번호 20 및 서열번호 21 의 프라이머 쌍으로 각각 PCR 을 수행하여 936 bp 길이의 루시페라제(luciferase)의 유전자가 도입되었는지 여부를 확인하였다.

그 결과, 각각의 genomic DNA 에서 약 936 bp 의 루시페라제 유전자에 해당하는 밴드가 검출되었고(도 5, 레인 1 내지 레인 24), 상기과 같은 결과로부터 상기 4 종류의 벡터 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 가 *C. reinhardtii* JL173 세포에 정상적으로 도입되었음을 확인하였다.

【실시예 4】

LSIP_P 의 활성 측정

상기 실시예 <3-2>에서 선별된 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체를 각각 TAP 액체배지가 포함된 여러

개의 시험관에 나누어 배양하면서, 상기 시험관을 암처리하거나 또는 30, 300 또는 600 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 3 시간 정도 조사하였다. 그런 다음, 상기 형질전환체를 수득하고, Renilla Luciferase assay kit(E2810)(Promega, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜에

5 따라 Luminometer(GloMaxTM 20/20)(Promega, USA)로 루시페라제(luciferase)의 발광량을 측정하였다. 각각의 세기에서의 루시페라제 발현 정도를 분석하기 위하여, 0, 30, 300 또는 600 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 조사한 형질전환체의 루미네선스(luminescence)를 암처리한 형질전환체의 루미네선스(luminescence)로 나누어, 루미네선스

10 비(luminescence ratio)를 비교하였다.

그 결과, 리포터 유전자인 루시페라제는 1LSIP_P 의 하류에서 조사된 광의 세기(light intensity)에 관계없이 높은 루미네선스를 나타내었다. 또한, 리포터 유전자인 루시페라제는 4LSIP_P, 8LSIP_P 및 17LSIP_P 의 하류에서 조사된 광의 세기가 증가할수록 높은 루미네선스를 나타내었고,

15 약한 세기의 광(0 또는 30 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$)과 강한 세기의 광(300 또는 600 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$)에서 발광된 루미네선스 비의 차이가 크게 나타났다(표 2, 도 6 및 도 7). 상기와 같은 결과로부터, 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 1LSIP_P 이 본 발명의 LSIP_P 가 프로모터 활성을 갖도록 하는 기본 단위임을 알 수 있다. 따라서, 상기 1LSIP_P 의 5'

20 말단에 일부 뉴클레오타이드 서열이 추가된 4LSIP_P, 8LSIP_P 또는 17LSIP_P 등과 같은 본 발명의 LSIP_P 는 조사되는 광의 세기(light intensity)에 의존적으로 그 하류(downstream)에 연결된 유전자의 발현을 조절함을 알 수 있다.

【표 2】

	Clone ID	Luminescence				Luminescence ratio (light/dark)		
		Light intensity (μmol photons/m ² /s)						
		0	30	300	600	30	300	600
1LSIP_P	3	283639	238069	300044	108731	0.84	1.06	0.38
	4	135213	141029	356974	236853	1.04	2.64	1.75
	17	520749	435440	819162	220960	0.84	1.57	0.42
	18	397822	311136	640419	406800	0.78	1.61	1.02
4LSIP_P	18	1151	1231	1145962	2485491	1.07	995.62	2159.41
	22	1028	6075	1881269	7930784	5.91	1830.92	7718.52
	27	866	1185	1693262	2923951	1.37	1956.40	3378.34
	31	545	1163	2529379	3658318	2.13	4641.06	6712.51
8LSIP_P	25	641	3700	67514	1177278	6	105	1837
	34	262	1424	86388	994563	5	330	3796
	102	306	1127	24174	1570141	4	79	5131
	117	270	989	13905	744517	4	52	2757
17LSIP_P	7	112	1552	34841	799686	14	311	7140
	23	1045	35776	420050	3923813	34	402	3755
	76	407	6144	267140	6639544	13	568	14127
	120	142	1848	44330	1811656	13	312	12758

【실시예 5】

5 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터와의 활성 비교

종래 Lers et al. (The Journal of Biological Chemistry 1991; 266(21): 13598-13705) 문헌에서 밝혀진 두날리엘라 바다빌(*Dunaliella bardawil*) 유래의 cbr 프로모터와 본 발명의 두날리엘라 에스피. 유래 LSIP 프로모터에 있어서, 광에 의한 프로모터 활성 유도능을 비교하였다.

10 상기 Lers et al. 문헌에서 확립한 두날리엘라 바다빌의 genomic DNA 를 주형으로 하여, XbaI 제한효소 부위를 갖는 서열번호 16 및 EcoRI 의 제한효소 부위를 갖는 서열번호 17 의 프라이머 쌍으로 PCR(Polymerase

Chain Reaction)을 수행함으로써, 서열번호 14 의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 Bar-CBR_P 를 수득하였다.

그런 다음, 실시예 2 와 동일한 방법으로 pN7-AR_P-LUC-TPsaD 에서 XbaI 및 EcoRI 의 제한효소를 이용하여 AR_P 를 제거하고, AR_P 가 제거된 부위에 상기 수득된 Bar-CBR_P 를 삽입함으로써, 도 4 와 같은 맵을 갖는 pN7-Bar-CBR_P-LUC-TPsaD 발현벡터를 제조하였다.

상기와 같이 제조된 pN7-Bar-CBR_P-LUC-TPsaD 발현벡터를 실시예 3 과 동일한 방법으로 *C. reinhardtii* 로 형질전환하고, 제대로 형질전환된 형질전환체를 선별한 다음, 상기 형질전환체에서 분리한 pN7-Bar-CBR_P-LUC-TPsaD genomic DNA 를 주형으로, 서열번호 20 및 서열번호 21 의 프라이머 쌍으로 각각 PCR 을 수행하여 936 bp 의 루시페라제 유전자에 해당하는 밴드를 확인함으로써(도 5, 레인 25 내지 레인 30), 상기 pN7-Bar-CBR_P-LUC-TPsaD 가 *C. reinhardtii* JL173 세포에 정상적으로 도입되었음을 확인하였다.

상기와 같이 선별된 pN7-Bar-CBR_P-LUC-TPsaD 형질전환체와 상기 실시예 <3-2>에서 선별된 pN7-1LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체, pN7-4LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체, pN7-8LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체 및 pN7-17LSIP_P-LUC-TPsaD 형질전환체를 각각 TAP 액체배지가 포함된 여러 개의 시험관에 나누어 배양하면서, 상기 시험관을 암처리하거나 또는 30 또는 300 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 3 시간 정도 조사하였다. 그런 다음, 상기 형질전환체를 수득하고, Renilla Luciferase assay kit(E2810)(Promega, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 Luminometer(GloMax™ 20/20)(Promega, USA)로 루시페라제(luciferase)의 발광량을 측정하였다. 각각의 세기에서의 루시페라제 발현 정도를 분석하기 위하여, 300 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 조사한 형질전환체의 루미네선스를 30 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ 의 광을 조사한 형질전환체의 루미네선스로 나누어, 루미네선스 비(luminescence ratio)를 비교하였다.

그 결과, 리포터 유전자인 루시페라제는 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터 하에서 보다 본 발명의 1LSIP_P 하에서 더욱 안정적이고, 일정한 발현 패턴을 보였다(표 3 및 도 6). 즉, 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터는 클론마다 프로모터 활성이 큰 편차를 나타냈으나, 본 발명의

1LSIP_P 프로모터는 클론마다 일정한 수준의 프로모터 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 상기 리포터 유전자인 루시페라제는 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터 하에서 보다 두날리엘라 에스피. 유래 LSIP_P(4LSIP_P, 8LSIP_P 및 17LSIP_P) 하에서 더욱 높은 루미네선스 비를 나타내었다(표 3 및 도 7). 이는 두날리엘라 에스피. 유래의 LSIP_P 가 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터 보다, 조사되는 광의 세기(light intensity)에 더욱 민감하게 반응하여 루시페라제의 발현을 조절함을 의미한다.

상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 LSIP_P 는 기본적으로 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터보다 안정적인 프로모터 활성을 나타내는 서열번호 18 의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 1LSIP_P 를 기본 단위로 하여, 상기 두날리엘라 바다빌 유래 cbr 프로모터보다 광의 세기에 더욱 민감하게 의존적이며, 더욱 민감하게 그 하류(downstream)에 연결된 유전자의 발현을 조절함을 알 수 있다.

【표 3】

	Clone ID	Luminescence				Luminescence ratio (light/dark)		
		Light intensity (μmol photons/m ² /s)						
		0	30	300	600	30	300	600
Bar-CBR_P	2	3104	1443	5682	4147	0.46	1.83	1.34
	3	39057	18840	215677	181575	0.48	5.52	4.65
	24	173306	386508	2177840	2951550	2.23	12.57	17.03
	32	497853	418948	9686064	4408146	0.84	19.46	8.85

상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 특허청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 12로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성
5 프로모터.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 1로 기재되는
뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 광 유도성 프로모터.
10

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 2로 기재되는
뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 광 유도성 프로모터.

15 【청구항 4】

제 1 항의 광 유도성 프로모터를 포함하는 발현벡터.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 발현벡터는 외래 단백질을 코딩하는
20 뉴클레오타이드 서열이 상기 프로모터에 작동가능하게 삽입될 수 있는
다중클로닝부위(multiple cloning site, MCS)를 더 포함하는 것을 특징으로
하는 발현벡터.

【청구항 6】

25 제 4 항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 7】

서열번호 12로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광 유도성
프로모터에 외래 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동가능하게
30 연결된 발현 컨스트럭트.

【청구항 8】

제 7 항의 발현 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터.

【청구항 9】

5 제 8 항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 10】

다음 단계를 포함하는 외래 단백질의 생산 방법:

10 (a) 서열번호 12 로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 광
유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는
뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터에 의해 형질전환된 제 6 항 또는
제 9 항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 외래 단백질을 생산하기 위하여 상기 배양된 형질전환체에
광을 조사하는 단계.

15

1/8

도 1a

1 10 20 30 40 50
 CCGGGGCTGGTAAAATCCCATATGCATGCTAAACACAAGCTGGGCTATGC 50
 TGACAGGAAGACAGGCTACTATACTTACTACCAGAGCTTGCTACCTCACG 100
 TAAACAAGAAAATTAGCAATGCCTTTTGGAAACATGCCCGGTCTCTCAACT 150
 CGAATGAAACGCCACTGTCTTCCAATACAGCACAGGCACCCCTCTACAATCA 200
 GAAACATGCGGTCCGATATAAAAGATCCACTAGGCTGACATGCCCCCTAG 250
 CTGATTGCCATCACATGGGTAGCGCTCTCCACATCCTATCTGGCTGCCAA 300
 TGTCTGTCTATGCGTAACATGGTAACGTGACAATATCGCTTGCAG 350
 GATGATTTTGAAACTGGTCAGTGAAGGCTCATATGGGGCCAATCTTGTGC 400
 17LSIP →
 AGTTGGATGCCGGCAACACAGACCGTTTGGCCCAGCACAACTGCAAGTC 450
 CCTGAGCAAGTCTCTAATCGTGCTGTACCTTCCAACCTCTTCAAACCCAC 500
 GGTTCGGTGCAATCCAGACGAACTCCAGCGCGCCCTGATGCAATCTTGG 550
 TCACTCCTCACCCAACTAACCCAAACAGACCACCCACTTCACCCTCATAC 600
 CGAGTACTGCCGAGTATGGGGAGTACCACAACTCCAGCCCCGTGATATTCA 650
 CTTGATAGAAATCAAATACTGCAAAGATACGAGGCCTGGTGCCCAGCTAG 700
 AAGCCTCACAGCAACAACACAGTGAACCTTTGCAAACAACCTCCAAGGTGCA 750
 GAGATCACTATCCACCCCAATCCTCCTGGGTGTGGGTGGGACTATCTACAC 800
 TGCCCATACCCCTTGATCAATTAAAAAAAATAGGGATTGACTCACAGAGAT 850
 CTGAAACACTTTGCAAGAAAATCCATGCCCATTTCTGTACAATTTGCGCAC 900
 AAACCTACCTCTACCAGACGTGCCATTGAAAATAAAAAACACTCATCATGA 950
 CACTGGTGCCCTGGAGCAGCGTGCTGCCAGAAACCCACCTGATCCACATT 1000
 CACTCCCTCTCATCTTCTGGTGGGGGAGACTCAGGGCTCTTTGAGCCAA 1050
 TGTGTCTCTCTTTTCTTAATTGATGTAGGGAGAGTTTTCTCTGCCACAT 1100
 AGTTTTTTCTCTTTCTTTTCTTTTCTAGCTCCTTACCTATTGTGGTGGAA 1150
 GAGCTGAGACCTTTTGAAGCAATGAGTGTAAGTAATATGGAATCATACCT 1200
 TACAAAGGGAGCTAGAGGAACCAAGTCGCTATTGCCCCATGACAGCATTAC 1250
 8LSIP →
 CGCTGACTCAGCTCGACATATGGTGTTGGTAATTGAGCACAAATTGGGCTC 1300
 AACAAAGTTTTTTGCTGTCAGTGAGAGGGCCGTAGACGTCTACACTCATAC 1350
 ATACACACGTCGACAGGAGTGTAGATGGGAGTGTGTGTGTGTAGTGTGT 1400
 GCGTGACGCGCGTATATGCATGTGTATATACGTGTTTGCCTATATATGT 1450
 GTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTTTCATATGTATGTTGTGTTTCATGCGTGCT 1500
 GAGAACGCGTGTTTCATGCACACCTGTAGCCTGTGCACCGTTAGCATTCTG 1550
 GAAATGTCTTTTCCAGCCTCTGAGCACACCTCTTGGATCCTGTTGTGTCT 1600
 GTGCCCCCTGGATCCTTTATTACCTCGAGGGTAGAGCTCTGGATCCCAG 1650
 4LSIP

도 1b

TGTAGGTGTCTTTGCTAGTGTACTCCTACACGTCCTCAATGCACGAGCGT 1700

→
GCACACTAAACACTTGTGCATGCACTGTCACCAGGCTTTGGCAGCGCCAG 1750
GAGGTTCTTAAAGTGACATCCGTGTCCCGCAGCAACTTACATTGACCAAC 1800

← GSP-2

AGTCAACACCCTCCAACCCTCACAGGTTCAAGACACATACAACACTGTTC 1850
ACTCACTCGTGATTTGCAAAATGTAAAGCCTTGGCCCTCTTGGCTTTTTT 1900
TTTCTCACGGGCAGCTCACCCACCGACTCACTCACGCACTCACCAACAGA 1950
GGGTGGCCTCGGAGCGTGAGGGCTCCGGGGCCACACATTTGCCAGCCTGAA 2000

1LSIP →

AACTTGCCAAAAACCACTCATCATCAAAACAACAAAAGCTTCAATCAAAA 2050
CTCGTTCCTACACCCACACGAACCGACCCGAACAATGCAGCTGCACATGA 2100

← LSIP (reverse)

ACCTGTCCGCCTCCCGGATCGCGGCCGGTGCCATCAACGTGCGTCCCGCG 2150
CCCTTCGTACGTGGGGCTGCTACACCCAAGCGCACGAGCAGGCACATCGT 2200
GCGCGCCGAGAACGACCCCTCCACTCCCCCTCCCCCACAAGGATCGCAAG 2250
AGTCCCCCAGCTCCAGCCCTTCCCCACCTCCTCCTCCTCAGCCAACA 2300
GCCGCAGCTCCTACCGTGACAGGTGTGTAAAAGCTGGCCCCAGGAAGTTC 2350
CCCCCTCTGCCAGGCTGGCTGGTTCTTGGGAGTAGTGTCTGCTGAACTTCT 2400
GCATGCAATGTGGTGCAAGCAACGACATGTWAACACACACACACACAC 2450

← GSP-1

ACACACACACACACACACACACACACACACACACGCGCGCGAGAGAGGGA 2500
ATGCGGGCACAGTCATGCAAGCAAACAAGCAGTGTGTGCTGCACCTGCAG 2550
CTCAGAGCATAAGAGCAGTGGCTGAGATCTGTTTTCTGTTGAGCACATTA 2600
AATTTGTTTGCAGCTCTGATGTGCACATCTATGCCAACTGCTGCTTATTT 2650
CTGATCATCAATATTTTTGCCTGTCCGTTTTTGGTGCA 2687

3/8

도 2

>promoters Alignment of 2 sequences: DbCBR-p, DsCBR-p

Score = 1183.0, Identities = 665/2064 (32%), Positives = 665/2064 (32%), Gaps = 1186/2064 (57%)

```

Bar-CBR_P      3 GGAGGGGATTT-----GC TGA      19
                  GGA  GATTT                      G TGA
Sp-LSIP_P      350 GGA--TGATTTTGAAACTGGTCA GTGAAGGCTCATATGGGGCCAATCTTGTGCAGTTGGA 407

Bar-CBR_P      20 CGCACGGCGGGGAGAGAAAGGGAGAAGAGAGTCCGAGTGTCCCGGGGCATGGCGAGCA-A 78
                  GC                      G G A A AG OCG TG OCC          AGCA A
Sp-LSIP_P      408 TGC-----GGGCAACACAGACCGTTTGGCCC-----AGCACA 439

Bar-CBR_P      79 CCTCCAGATCC-----CCATTGCTCTGTTCCTGGC--TCCTCTTAGGCTA 124
                  CCT CA TCC          C A TCGT CTGT CT C CTCTTC A A
Sp-LSIP_P      440 AACTGCAAGTCCCTGAGCAAGTCTCTAATGGTGTCTGTACCTTCCAACCTCTTCAA---A 495

Bar-CBR_P      125 GCTACGTCTAGTGTAGGT-----TCTGAGGCC-TCCTGGT 158
                  C ACG GT T GGT          CTGA GC TC TGGT
Sp-LSIP_P      496 CCCACG---GTTCGGTGCAATCCAGA CGAAACTCCAGCCGCCCTGA TGCAATCTTGGT 551

.
.
.
.

Bar-CBR_P      1028 --GCA---ACGCACTGGTTCACATTTCCGCACTCAAAGCTCCAACAAAGCGCAAGGTTCT 1081
                  GCA AC CAC G TCAC T CGCACTCA CCAACA AGCG G CT
Sp-LSIP_P      1909 GGGCAGCTCACCACCGACTCAC-TCACGCACTCA-----CCAACAGAGCGT--GGCCT 1959

Bar-CBR_P      1082 CGGAATTTGAGGGTTCTCGGCCACAAGTTTGCCACCC TCAAAGGTGG---AAATTCACCA 1138
                  CGGA TGAGGG TC GGCCACA TTGCCA CCT AAA T G AAA CAC
Sp-LSIP_P      1960 CGGAGGTGAGGGCTCCGGGCCACACATTTGCCAGCCTGAAAACCTTGCCAAAAACCACTC 2019

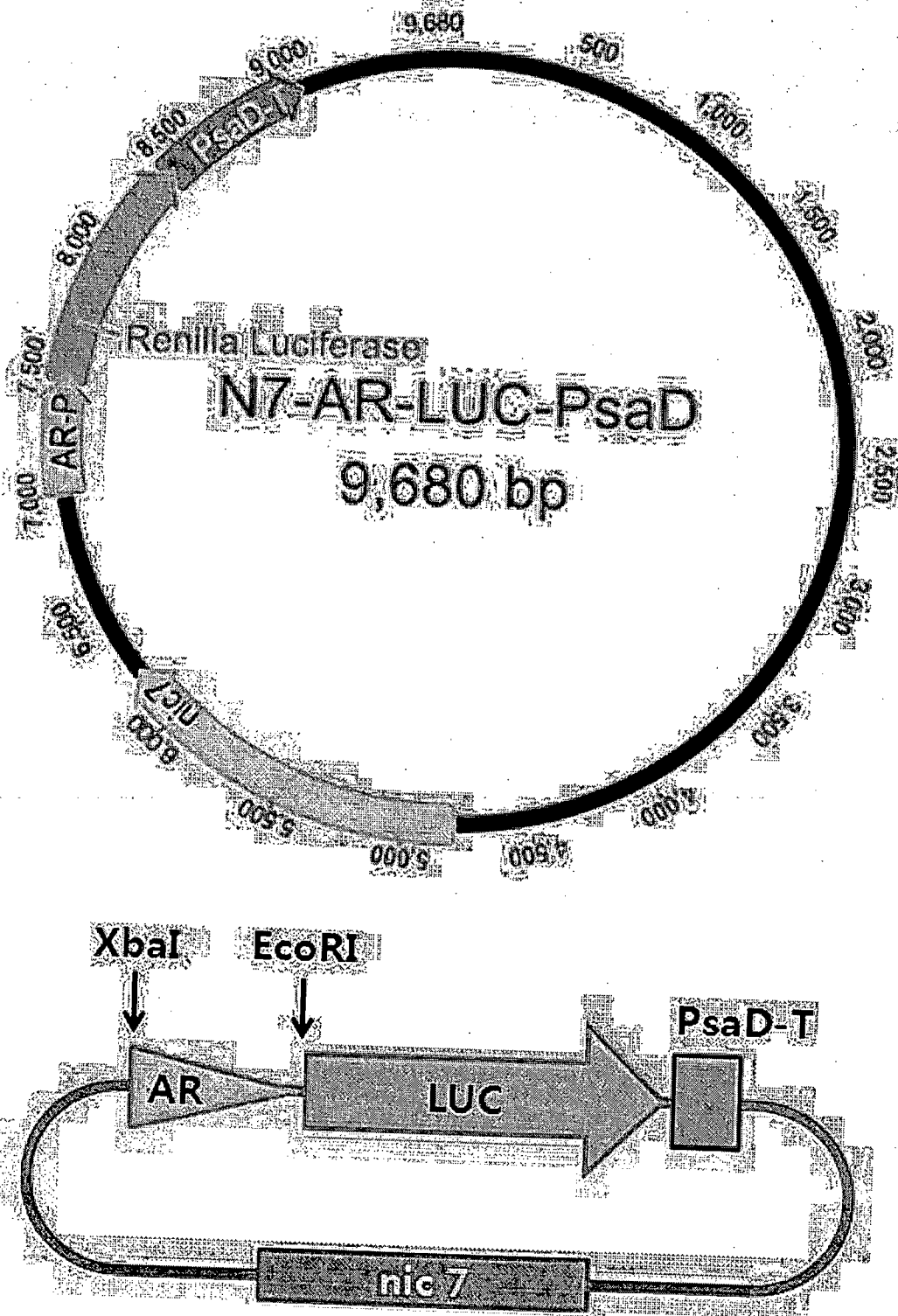
Bar-CBR_P      1139 ATGTAGGATGAAACTAAA-----TACTATCCAAACAC--TTGTGCACCTTATTCCGGC 1191
                  AT AT AAAAC A A T C ATC AAAC C T T CACCC
Sp-LSIP_P      2020 ATC---ATCAAACAAACAAAGCTTCAATCAAACCTCGTTCTACACCC-----2065

Bar-CBR_P      1192 GTAGGACGCTTAATCGATCCGACC 1215
                  A CGA CCGACC
Sp-LSIP_P      2066 -----ACACGAACCGACC 2078

```

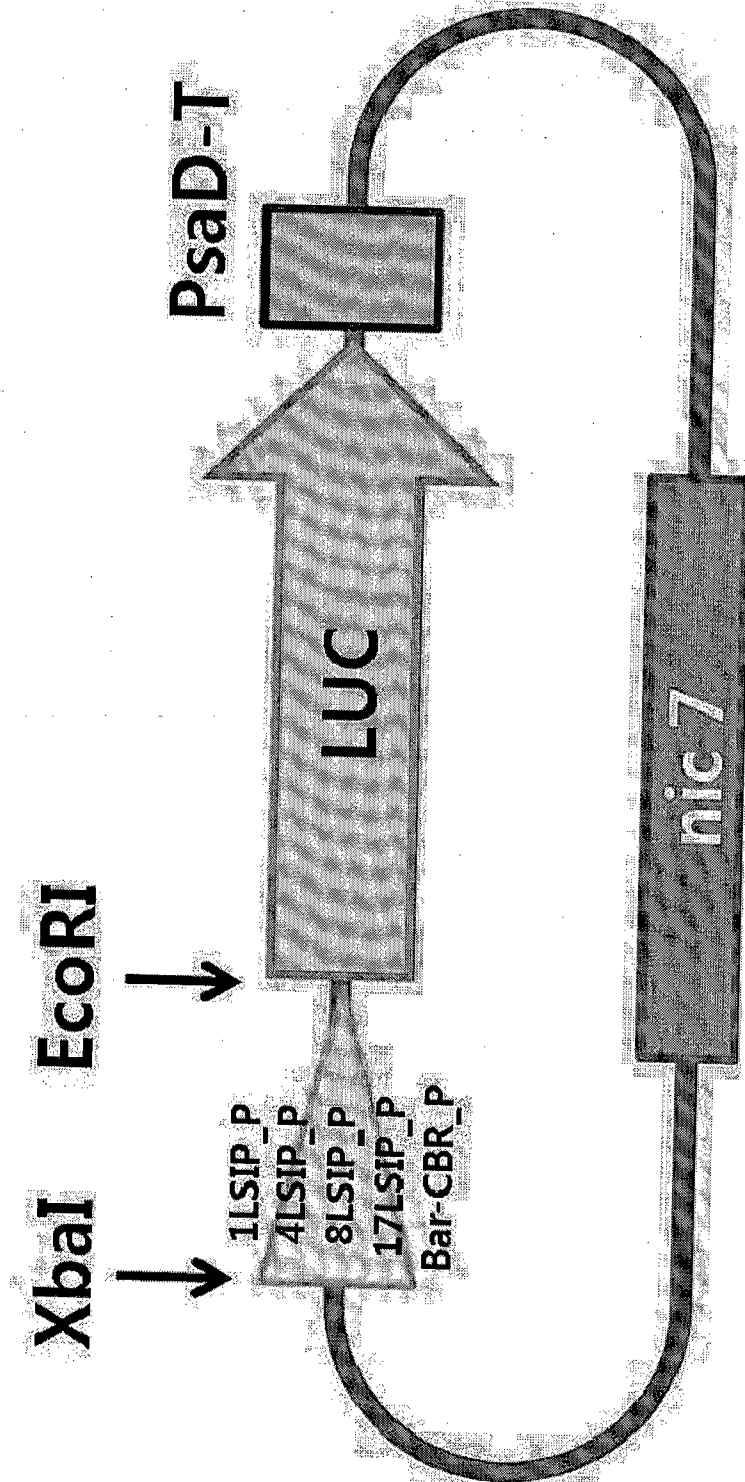
4/8

도 3

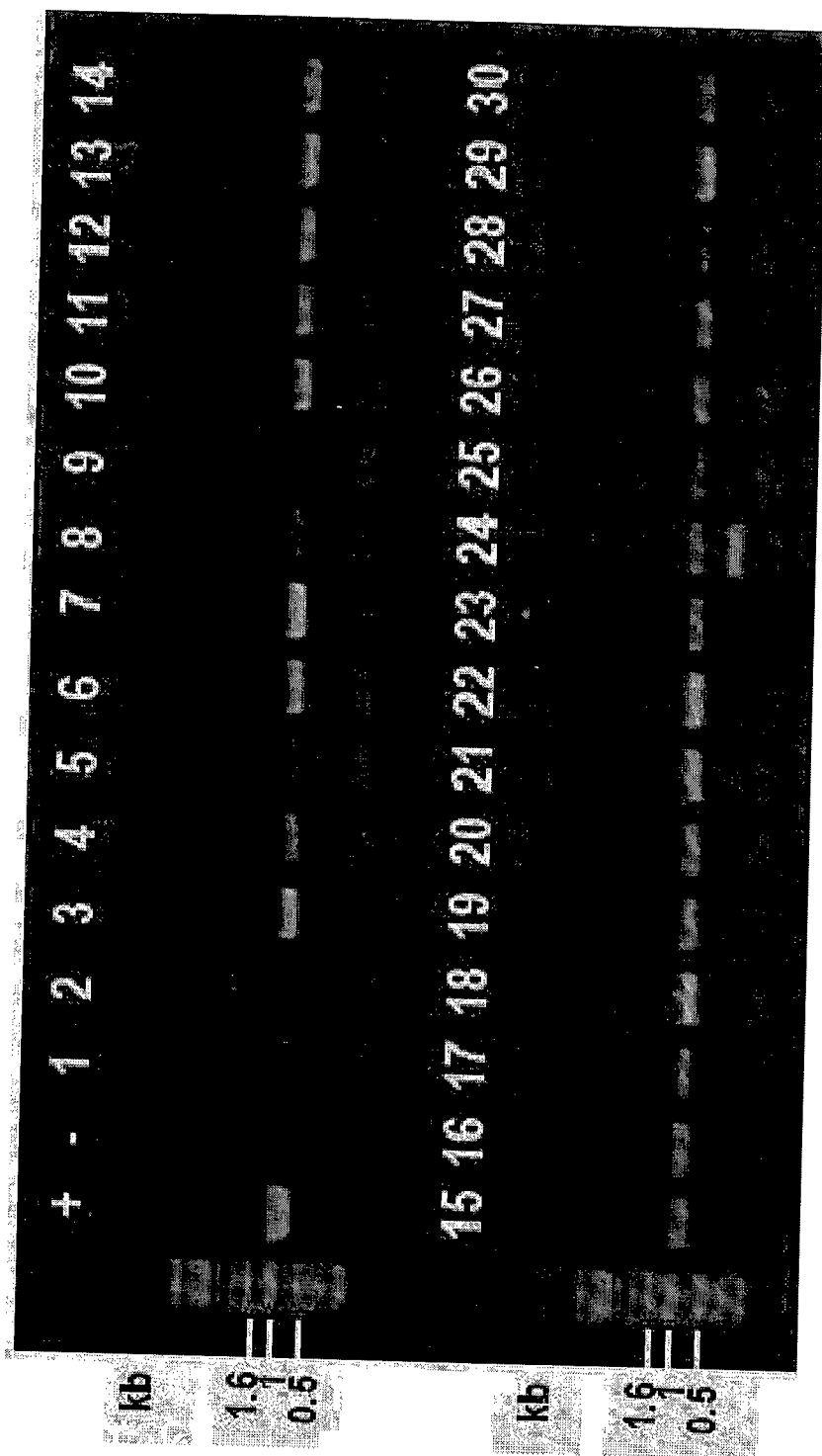


5/8

도 4

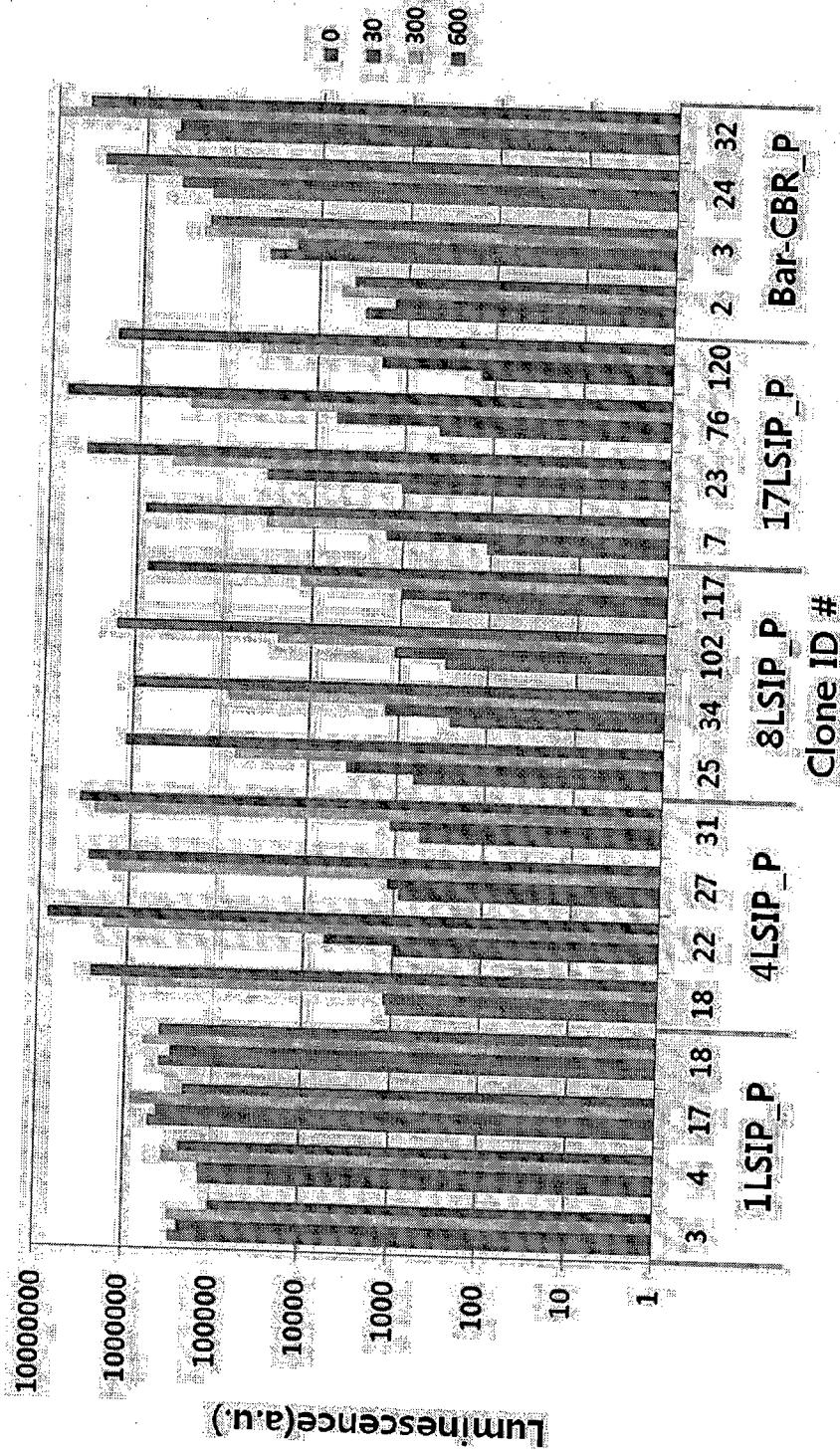


도 5



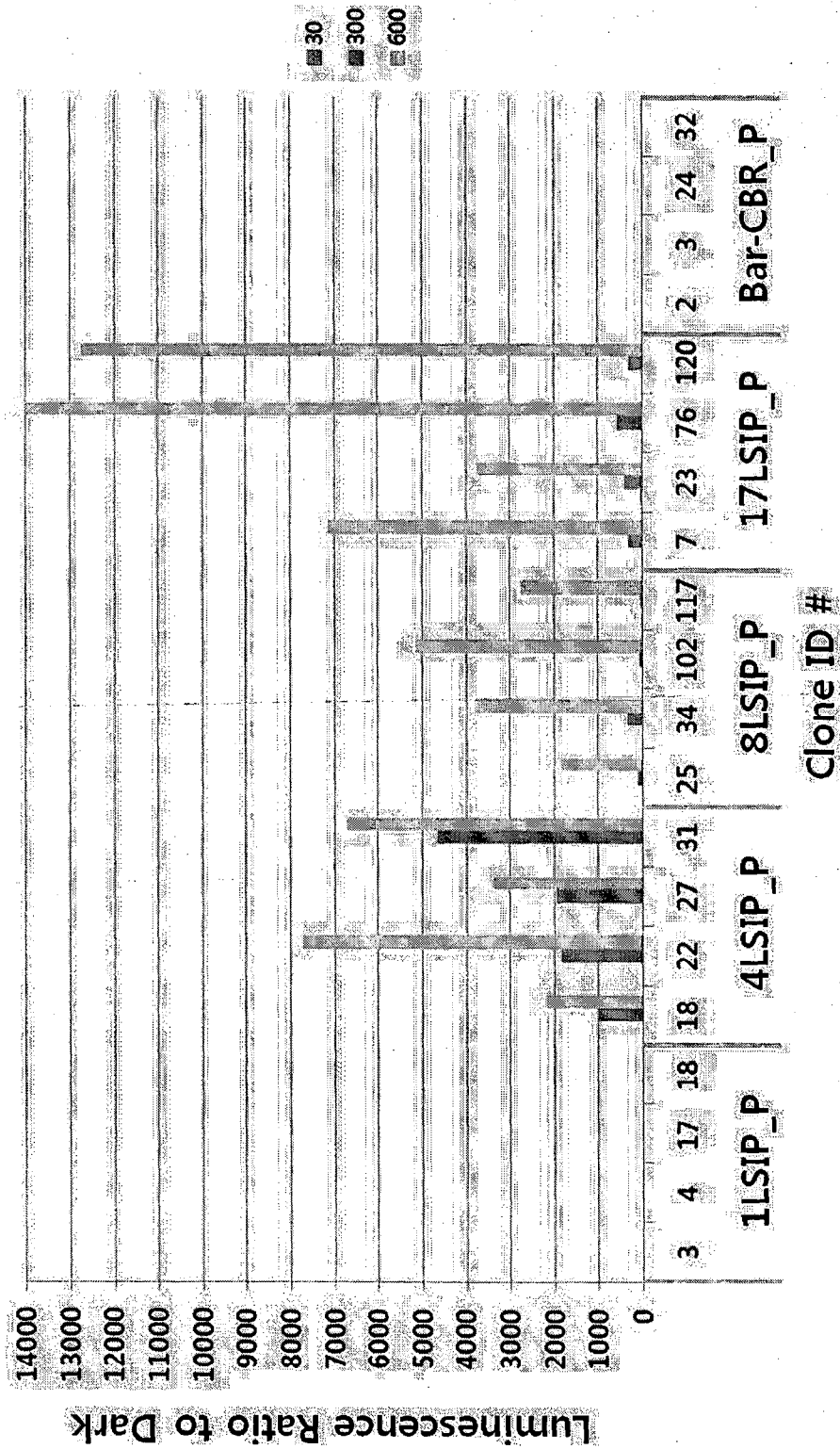
7/8

도 6



8/8

도 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004762**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/11(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/11; C12N 15/70; C12N 15/82; C12N 15/09; C12P 21/02; A01H 1/00; C12N 15/63; C12P 21/00

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: photoinduceable promoter, vector, transformant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession no.AY847686.1 (01 January 2006) See the entire document.	1-10
A	EP 0310619 B1 (UNIVERSITY OF WARWICK) 06 April 1994 See claims 1, 2, 4 and 5.	1-10
A	WO 01-40492 A2 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 07 June 2001 See claims 11, 12, 30 and 31.	1-10
A	JP 2000-083680 A (NIPPON PAPER INDUSTRIES CO., LTD.) 28 March 2000 See abstract; claim 6.	1-10
A	SHIMIZU-SATO, Sae et al., "A light-switchable gene promoter system", Nature biotechnology, October 2002, vol. 20, no. 10, pages 1041-1044 See the entire document.	1-10
A	BALSALOBRE, Josefa M et al., "Light induction of gene expression in Myxococcus xanthus", PNAS, April 1987, vol. 84, no. 8, pages 2359-2362 See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 AUGUST 2013 (26.08.2013)

Date of mailing of the international search report

27 AUGUST 2013 (27.08.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

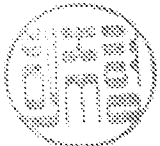
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/004762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
EP 0310619 B1	06/04/1994	AU 1988-42187 A	12/01/1988
		CA 1321563 C	24/08/1993
		DE 3789552 D1	11/05/1994
		EP 0310619 A1	12/04/1989
		GB 8615263 D0	30/07/1986
		IL 82962 D0	20/12/1987
		JP 01-503593 A	07/12/1989
		WO 87-07909 A1	30/12/1987
WO 01-40492 A2	07/06/2001	AU 2001-505401 A	12/06/2001
		AU 779690 B2	03/02/2005
		CA 2391312 A1	07/06/2001
		CN 1264984 C	19/07/2006
		CN 1423701 A	11/06/2003
		EP 1232275 A2	21/08/2002
		US 2004-0143874 A1	22/07/2004
		US 6723896 B1	20/04/2004
		WO 01-40492 A3	07/02/2002
JP 2000-083680 A	28/03/2000	CA 2275511 A1	16/01/2000
		US 2003-0221210 A1	27/11/2003
		US 6294714 B1	25/09/2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/11(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류 기재) C12N 15/11; C12N 15/70; C12N 15/82; C12N 15/09; C12P 21/02; A01H 1/00; C12N 15/63; C12P 21/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 광유도성 프로모터, 벡터, 형질전환체		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no.AY847686.1 (2006.01.01) 전체 문헌 참조.	1-10
A	EP 0310619 B1 (UNIVERSITY OF WARWICK) 1994.04.06 청구항 1,2,4 및 5 참조.	1-10
A	WO 01-40492 A2 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 2001.06.07 청구항 11,12,30 및 31 참조.	1-10
A	JP 2000-083680 A (NIPPON PAPER INDUSTRIES CO., LTD.) 2000.03.28 요약; 청구항 6 참조.	1-10
A	SHIMIZU-SATO, SAE 외 3명, `A light-switchable gene promoter system`, Naturebiotechnology, October 2002, 20권, 10호, 1041-1044 페이지 전체 문헌 참조.	1-10
A	BALSALOBRE, JOSEFA M 외 2명, `Light induction of gene expression in Myxococcus xanthus`, PNAS, April 1987, 84권, 8호, 2359-2362 페이지 전체 문헌 참조.	1-10
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 08월 26일 (26.08.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 08월 27일 (27.08.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 0310619 B1	1994/04/06	AU 1988-42187 A CA 1321563 C DE 3789552 D1 EP 0310619 A1 GB 8615263 D0 IL 82962 D0 JP 01-503593 A WO 87-07909 A1	1988/01/12 1993/08/24 1994/05/11 1989/04/12 1986/07/30 1987/12/20 1989/12/07 1987/12/30
WO 01-40492 A2	2001/06/07	AU 2001-505401 A AU 779690 B2 CA 2391312 A1 CN 1264984 C CN 1423701 A EP 1232275 A2 US 2004-0143874 A1 US 6723896 B1 WO 01-40492 A3	2001/06/12 2005/02/03 2001/06/07 2006/07/19 2003/06/11 2002/08/21 2004/07/22 2004/04/20 2002/02/07
JP 2000-083680 A	2000/03/28	CA 2275511 A1 US 2003-0221210 A1 US 6294714 B1	2000/01/16 2003/11/27 2001/09/25