(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0007610
(43) 공개일자 2025년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/38 (2006.01) *C12N 15/80* (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/38 (2013.01)
C12N 15/80 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7039586
(22) 출원일자(국제) 2023년05월30일
심사청구일자 2024년11월27일
(85) 번역문제출일자 2024년11월27일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/020131
(87) 국제공개번호 WO 2023/234307
국제공개일자 2023년12월07일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-089120 2022년05월31일 일본(JP)
JP-P-2022-112588 2022년07월13일 일본(JP)

(71) 출원인
기꼬만 가부시키가이샤
일본국 지바켄 노다시 노다 250반지
(72) 발명자
다지마 료코
일본 2788601 지바켄 노다시 노다 250 기꼬만 가부시키가이샤 나이
이치카와 게이이치
일본 2788601 지바켄 노다시 노다 250 기꼬만 가부시키가이샤 나이
이토 고타로
일본 2788601 지바켄 노다시 노다 250 기꼬만 가부시키가이샤 나이
(74) 대리인
김진희, 김태홍

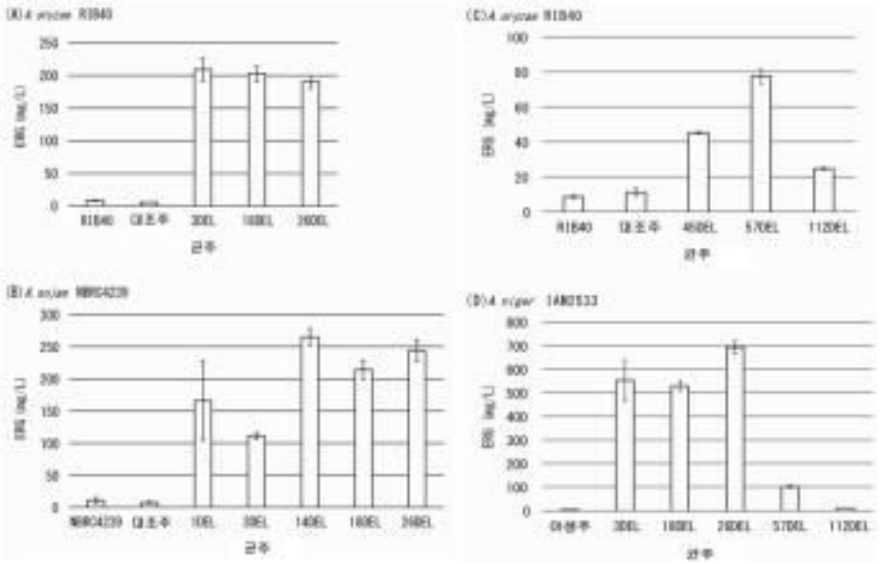
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **에르고티오네인 생산성을 높이도록 개변된 핵산, 및 유전자 개변된 미생물**

(57) 요 약

에르고티오네인 생산 사상균을 배양하는 것에 의한 에르고티오네인 생산에 있어서, 에르고티오네인 생산성을 높이는 것을 목적으로 한다. 에르고티오네인 생산 사상균에 있어서, 에르고티오네인 생산을 항진하는 유전자 변이를 특정했다. 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역을 포함하는, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역을 결실시킨 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 사상균을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12P 13/04 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 번호 1에 포함되는 보존 영역을 포함하는, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역에, 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이를 포함하는 서열; 또는

당해 서열에 적어도 90%의 동일성을 갖는 서열

을 코딩하고, 에르고티오네인 생산 미생물에 도입된 경우에 에르고티오네인 생산을 항진하는, 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 보존 영역이, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역인, 핵산.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역의 결실인, 핵산.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치를 포함하는, 핵산.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 1~120개의 아미노산의 결실로 이루어진, 핵산.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치, 427 위치~444 위치, 및 419 위치~444 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 핵산.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 431 위치~475 위치, 419 위치~475 위치, 및 404 위치~515 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 핵산.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치의 G 및/또는 459 위치에 대응하는 위치의 C에 있어서 변이를 갖는, 핵산.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 핵산이, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속, 탈라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 미생물 유래의 핵산인, 핵산.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 기재된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 기재된 핵산을 포함하는 미생물.

청구항 12

제11항에 기재된 미생물을 배양하는 것을 포함하는, 에르고티오네인의 제조 방법.

청구항 13

에르고티오네인 생산능이 향진된 미생물의 제조 방법으로서, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역을 포함하는, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역에, 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이를 도입하는 것을 포함하고, 상기 미생물이, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 및 탈라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 에르고티오네인 생성 미생물인, 상기 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역의 결실인, 제조 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 보존 영역이, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역인, 제조 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치를 포함하는, 제조 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 1~120개의 아미노산으로 이루어진, 제조 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 428 위치, 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치, 427 위치~444 위치, 및 419 위치~444 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 제조 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 431 위치~475 위치, 419 위치~475 위치, 및 404 위치~515 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 제조 방법.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치의 G 및/또는 459 위치에 대응하는 위치의 C에 있어서 변이를 갖는, 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는, 에르고티오네인(이하, ERG로 표기하는 경우가 있음) 생산성을 높이도록 개변된 핵산, 및 ERG 생산성을 높이도록 유전자 개변된 미생물에 관한 것이다. 또한, 유전자 개변된 미생물을 이용한 ERG 생성 방법에도 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 에르고티오네인은, 호밀 맥각균(*Claviceps purpurea*)에서 분리된 함황 아미노산으로서 발견되고, 식물이나 동물의 생체 내에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 식물이나 동물은, 에르고티오네인을 합성할 수 없고, 생체 내의 에르고티오네인은, 담자균류 등의 미생물에 의해 합성된 에르고티오네인에 유래한다고 생각되고 있다. 특히 담자균류의 일부인 버섯, 예컨대, 느타리 버섯, 표고 버섯, 잎새 버섯, 새송이 버섯 등의 식용 버섯에도 포함되어 있으며, 특히 타모기 버섯에 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 에르고티오네인은, 히스티딘에서의 생합성 경로가 알려져 있으며, 유황 원자는 시스테인에서 공급된다. 에르고티오네인은, 높은 항산화성을

가지고 있고, 또한, 엘라스타제 억제 작용, 티로시나아제 억제 작용이 보고되고 있으며, 미백과 주름 방지와 같은 미용·식품 분야에서 특히 주목받고 있다. 또한, 에르고티오네인이 생체 산화 방어 시스템에 관여하는 것이 판명되어, 의료 분야에서의 응용도 시도되고 있다. 에르고티오네인은, 열 안정성과 pH 안정성이 높고, 고온에서도 그 항산화 작용을 유지할 수 있으며, 생리 작용을 기대하여 식품에 배합되거나, 항산화제로서 식품으로의 사용도 기대되고 있다.

[0003] 에르고티오네인의 제조 방법으로서는, 노랑 느타리 버섯 등의 담자균에서의 추출, 화학 합성, 미생물을 이용한 발효가 이용되고 있다. 노랑 느타리 버섯 등의 담자균에서의 추출은, 원재료의 취득에 시간이 걸려, 대량 생산에는 적합하지 않다. 대량 생산에는 화학 합성이 적합하지만, 고가의 합성 시약을 이용할 필요가 있으며, 또한, 정제 비용이 높아진다는 문제가 있다(특허문헌 1). 따라서, C1 화합물 자화성의 세균이나 효모를 이용한 발효(특허문헌 2, 비특허문헌 1), 나아가서는 에르고티오네인 생합성 유전자를 과잉 발현시킨 미생물을 이용한 발효(특허문헌 3)가 제조 방법으로서는 유력하며, 미생물 발효물을 그대로, 또는 간단한 추출 조작에 의해 얻어진 추출물을 사용할 수 있다는 점에서 유력하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 특허 공개 제2006-160748호 공보

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 국제 공개 제2016/104437호

(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 국제 공개 제2017/150304호

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: PLOS One 2014 vol.9(5) e97774

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 미생물 배양에 의한 ERG 생산에 있어서, ERG 생산성을 높이는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들이, 누룩균의 ERG 생산성을 높이는 것을 목적으로 하여, 예의 연구를 행한 바, 기능 미지의 유전자에 있어서, 특정한 유전자 변이를 도입함으로써, 에르고티오네인 생산성이 향진한 것을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명은 이하에 관한 것이다:

[0009] [1] 서열 번호 1에 포함되는 보존 영역을 포함하는, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역에, 상기 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이를 포함하는 서열; 또는

[0010] 상기 서열에 적어도 90%의 동일성을 갖는 서열

[0011] 을 코딩하고, 에르고티오네인 생산 미생물에 도입된 경우에 에르고티오네인 생산을 향진하는, 핵산.

[0012] [2] 상기 보존 영역이, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역인, 항목 1에 기재된 핵산.

[0013] [3] 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역의 결실인, 항목 1에 기재된 핵산.

[0014] [4] 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치를 포함하는, 항목 1에 기재된 핵산.

[0015] [5] 상기 결실된 영역이, 1~120개의 아미노산의 결실로 이루어진, 항목 1에 기재된 핵산.

[0016] [6] 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치, 427 위치~444 위치, 및 419 위치~444 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 항목 4에 기재된 핵산.

[0017] [7] 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 431 위치~475 위치, 419 위치~475 위치, 및 404 위치~515 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 항목 3에 기재된 핵산.

[0018] [8] 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치의 G 및/또는 459 위치에 대응하는 위치의 C에 있어서 변이를 갖는, 항목 1에 기재된 핵산.

[0019] [9] 상기 핵산이, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속, 타라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 미생물 유래의 핵산인, 항목 1에 기재된 핵산.

[0020] [10] 항목 1 내지 9 중 어느 하나에 기재된 핵산을 포함하는 벡터.

[0021] [11] 항목 1 내지 9 중 어느 하나에 기재된 핵산을 포함하는 미생물.

[0022] [12] 항목 11에 기재된 미생물을 배양하는 것을 포함하는, 에르고티오네인의 제조 방법.

[0023] [13] 에르고티오네인 생산능이 향진된 미생물의 제조 방법으로서, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역을 포함하는, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역에, 상기 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이를 도입하는 것을 포함하고, 상기 미생물이, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 및 탈라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 에르고티오네인 생성 미생물인, 상기 제조 방법.

[0024] [14] 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역의 결실인, 항목 13에 기재된 제조 방법.

[0025] [15] 상기 보존 영역이, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치의 보존 영역인, 항목 13에 기재된 제조 방법.

[0026] [16] 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치를 포함하는, 항목 14에 기재된 제조 방법.

[0027] [17] 상기 결실된 영역이, 1~120개의 아미노산을 포함하는, 항목 14에 기재된 제조 방법.

[0028] [18] 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 428 위치, 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치, 427 위치~444 위치, 및 419 위치~444 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 항목 16에 기재된 제조 방법.

[0029] [19] 상기 결실된 영역이, 서열 번호 1의 431 위치~475 위치, 419 위치~475 위치, 및 404 위치~515 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역인, 항목 14에 기재된 제조 방법.

[0030] [20] 상기 당해 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이가, 서열 번호 1의 428위치에 대응하는 위치의 G 및/또는 459 위치에 대응하는 위치의 C에 있어서 변이를 갖는, 항목 14에 기재된 제조 방법.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 의하면, A0090005000664에 대응하는 유전자에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역에, 상기 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이를 포함하는 미생물은, ERG 생산을 항진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은, A0090005000664의 아미노산 서열(서열 번호 1) (A) 및 A0090005000664의 염기 서열(서열 번호 2)을 나타내는 (B). 411 위치~467 위치의 보존 영역을 착색하여 나타낸다.

도 2는, A0090005000664의 아미노산 서열 중, 보존 영역(서열 번호 1의 411 위치~479 위치:)을, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 및 타라로마이시스속의 오르소로그 유전자와 비교한 도면을 나타낸다.

도 3은, 아스페르길루스·오리제의 A0090005000664에 있어서, G428S 변이 및 C459F 변이를 도입한 변이 도입주에 있어서의 ERG 생산량을 나타낸다.

도 4는, 아스페르길루스·소야의 AO090005000664 오르소로그 유전자에 있어서, 서열 번호 1의 G428S에 대응하는 변이를 도입한 변이 도입주에 있어서의 ERG 생산량을 나타낸다.

도 5는, 아스페르길루스·니거의 AO090005000664 오르소로그 유전자(An16g07990)에 있어서, G428S에 대응하는 변이(G442S)을 도입한 변이 도입주에 있어서의 ERG 생산량을 나타낸다.

도 6은, AO090005000664의 아미노산 서열을 BLAST에 의해 해석한 결과를 나타낸다. 412 위치~462 위치를 더 확대하여 나타낸다.

도 7의 (A)~(B)는, AO090005000664 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에 있어서, 428 위치를 포함하는 영역(427 위치~429 위치의 결실(3DEL), 427~444 위치의 결실(18DEL), 및 419 위치에서 444 위치(26 DEL))를 결실시킨 아스페르길루스·오리제(A)에 있어서의 ERG 생산량과, AO090005000664 유전자와 98% 동일성을 갖는 오르소로그 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에 있어서, 428 위치를 포함하는 영역 428 위치(1DEL), 427 위치~429 위치(3DEL), 427~440 위치(14DEL), 427~444 위치(18DEL), 및 419 위치에서 444 위치(26DEL)를 결실시킨 아스페르길루스·소야(B)에 있어서의 ERG 생산량을 나타낸다.

도 7의 (C)~(D)는 또한, AO090005000664 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에 있어서, 431 위치~475 위치의 결실(45DEL), 419~475 위치의 결실(57DEL), 및 404에서 515 위치(112DEL))를 결실시킨 아스페르길루스·오리제에 있어서의 ERG 생산량을 나타낸다(C). 또한, AO090005000664 유전자와, 67% 동일성을 갖는 An16g07990 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에 있어서, 441~443 위치(3DEL), 441~458 위치(18DEL), 433~458 위치의 결실(26DEL), 433 위치~489 위치(57DEL), 및 418 위치~529 위치(112DEL)를 결실시킨 아스페르길루스·니거에 있어서의 ERG 생산량을 나타낸다(D).

도 8은, SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/)을 이용하여 AO090005000664 유전자로부터 발현되는 단백질에 대해서 호모로지 모델링한 3 차원 입체 예측 구조를 나타낸다(A). 점선으로 둘러쌓인 초이차 구조 부분의 확대를 도 8의 (B)에 나타낸다(B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명에 있어서 유전자 변이를 도입하는 미생물로서는, 에르고티오네인 생산성을 갖는 미생물이다. 이러한 미생물로서는, 사상균이 바람직하고, 보다 바람직하게는 아스페르길루스(*Asperugillus*)속, 페니실륨(*Penicilliu m*)속, 라삼소니아속(*Rasamsonia*), 타라로마이시스(*Talaromyces*)속에 속하는 임의의 균을 사용할 수 있다. 아스페르길루스속의 사상균의 일례로서, 아스페르길루스·오리제(*Aspergillus oryzae*), 아스페르길루스·소야(*Aspergillus sojae*), 아스페르길루스·루추엔시스(*Aspergillus luchuensis*), 아스페르길루스·타마리(*Aspergillus tamarii*), 아스페르길루스·니거(*Aspergillus niger*), 아스페르길루스·니쥬란스(*Aspergillus nidulans*)를 들 수 있다. 사상균의 균주로서는, 예컨대, 아스페르길루스·오리제 RIB40 주(株), RIB326 주 등 공적으로 입수 가능한 균주, 종균 상점 등에서 시판되고 있는 종균에 포함되는 균주, 또는 청주, 간장 양조장 등의 식음료 제조 환경 등으로부터 분리하여 얻어지는 균주를 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 변이를 도입하는 유전자는, 아스페르길루스·오리제 RIB40 주에 있어서의 AO090005000664로 명명된 유전자, 및 그 오르소로그 유전자에 관한 것이다. 이 유전자는 기능 미지의 번역 영역을 가지고 있으며, 657 잔기의 아미노산 서열(서열 번호 1)로 이루어진 단백질을 코딩하는 염기 서열(서열 번호 2)로 이루어진다. AO090005000664 유전자의, 아스페르길루스·소야의 오르소로그 유전자의 염기 서열은, Accession No.BaCA02000013의 REGION 19840.. . 21877에 대응하고(서열 번호 4), 그 아미노산 서열은 서열 번호 3으로 표시된다. AO090005000664 유전자의, 아스페르길루스·타마리, 아스페르길루스·루츄엔시스, 아스페르길루스·니거, 아스페르길루스·니쥬란스에서의 오르소로그 유전자는, 각각, BDV40DRAFT_264902(아미노산 서열: 서열 번호 5, 염기 서열: 서열 번호 6), AAWM_07753(아미노산 서열: 서열 번호 7, 염기 서열: 서열 번호 8), An16g07990(아미노산 서열: 서열 번호 9, 염기 서열: 서열 번호 10), 및 ANIA_10201(아미노산 서열: 서열 번호 11, 염기 서열: 서열 번호 12)이다. 아스페르길루스속에 있어서 높게 보존되어 있으며, 아스페르길루스·소야에서는 98%, 아스페르길루스·타마리에서는 96%, 아스페르길루스·루츄엔시스에서는 67%, 아스페르길루스·니거에서는 67%, 아스페르길루스·니쥬란스에서는 62%의 아미노산 서열의 동일성을 갖는다. 이들 유전자는, 아스페르길루스·소야에서는 100%, 아스페르길루스·타마리에서는 98%, 아스페르길루스·루츄엔시스에서는 79%, 아스페르길루스·니거에서는 79%, 아스페르길루스·니쥬란스에서는 75%의 아미노산 서열의 상동성을 갖는다.

[0035] AO090005000664에는, 다른 종과 고도로 보존되는 복수의 보존 영역이 존재한다. 이러한 보존 영역으로서, 특히 서열 번호 1의 411~479 위치에 대응하는 영역(서열 번호 13)을 들 수 있다. 보다 보존성이 높은 영역이라는 관

점에서, 보존 영역은, 서열 번호 1의 411 위치~467 위치에 대응하는 영역(서열 번호 14)이 바람직하고, 411 위치~462 위치(서열 번호 15)에 대응하는 영역이 보다 바람직하고, 411 위치~444 위치(서열 번호 16)에 대응하는 영역이 더 바람직하고, 427 위치~444 위치(서열 번호 17)에 대응하는 영역이 더 바람직하고, 433 위치~440 위치(서열 번호 18)에 대응하는 영역이 보다 더 바람직하다. 433 위치~440 위치(서열 번호 18)에 대응하는 영역은, 아스페르길루스속에서 매우 높게 보존되어 있으며, 보다 바람직하게는 완전히 일치할 수 있다.

[0036] 본 발명의 핵산은, 사상균, 예컨대, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 또는 타라로마이시스속에 유래하여도 좋다. 본 발명의 핵산은, 이들 사상균에 있어서 보존성이 높다. 아스페르길루스속에 속하는 사상균 유래의 핵산은, 서열 번호 1에 대하여 75~100%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 코딩한다. 페니실륨속에 속하는 사상균 유래의 핵산은, 서열 번호 1에 대하여 68~75%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 코딩한다. 라삼소니아속에 속하는 사상균 유래의 핵산은, 서열 번호 1에 대하여 70%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 코딩한다. 타라로마이시스속에 속하는 사상균 유래의 핵산은, 서열 번호 1에 대하여 64~68%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 코딩한다.

[0037] 본 발명에 있어서, 서열 번호 1에 대응하는 서열이란, 특정한 사상균이 갖는, AO090005000664의 오르소로그가 되는 유전자의 아미노산 서열을 말한다. 오르소로그가 되는 유전자는 NCBI의 blastp의 프로그램을 이용함으로써, NCBI에 등록된 단백질 데이터 베이스 중에서 선택 가능하다. 이러한 오르소로그는, 통상 40% 이상, 50% 이상, 또는 60% 이상의 상동성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 이러한 서열 번호 1에 대응하는 서열은, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 또는 타라로마이시스속의 오르소로그 유전자가 코딩하는 아미노산 서열이다. 보다 바람직하게는, 아스페르길루스·오리제, 아스페르길루스·소야, 아스페르길루스·타마리, 아스페르길루스·루츄엔시스, 아스페르길루스·니거, 또는 아스페르길루스·니쥬란스의 오르소로그 유전자의 아미노산 서열이다. 본 발명의 일 양태에서는, 서열 번호 1에 대응하는 서열은, 보존 영역을 포함함으로써, 정의할 수 있다. 따라서, 서열 번호 1에 대응하는 서열은, AO090005000664의 오르소로그가 되는 유전자를 코딩하는 아미노산 서열이며, 서열 번호 1에 포함되는 소정의 보존 영역에 의해 특정된다. 서열 번호 1에 대응하는 서열의 구체예로서는 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 및 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 들 수 있다.

[0038] 보존 영역은, 일례로서, 서열 번호 1의 427 위치~444 위치(서열 번호 17), 411~444 위치(서열 번호 16), 411~462 위치(서열 번호 15), 또는 433 위치~440 위치(서열 번호 18)에 위치한다. 그 중에서도, 아스페르길루스속에서 일치하는 관점에서, 서열 번호 1의 433 위치~440 위치(서열 번호 18)의 보존 영역을 포함함으로써, 서열 번호 1에 대응하는 서열은 정의될 수 있다. 서열 번호 1에 대응하는 서열이 포함하는 보존 영역은, 이 보존 영역을 대신하여, 이하의 서열:

[0039]
```
427             444
|               |
SGLXXXXWXGXXAAXDSH     (서열 번호 43)
```

[0040] [서열 중에 있어서,

[0041] X430은, Q, H, P, 및 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0042] X431은, Q, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0043] X432는, P, Q 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0044] X433은, D, 및 E로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0045] X435는, R, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0046] X437은, L 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0047] X438은, V, 및 M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0048] X441은, V, I 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이다]

[0049] 에 의해 특정되어도 좋다.

[0050] 또 다른 예로서는, 보존 영역은, 특히 아스페르길루스속에서 보존되는 서열이 바람직하다. 이러한 보존 영역으로서, 이하의:

```
427             444
|               |
SGLXXXDWRGLVAAXDSH     (서열번호１９)
```

[0051]

[0052] [서열 중에 있어서,

[0053] X430은, Q, H, 및 P로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0054] X431은, Q, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0055] X432는, P, 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0056] X441은, V 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이다]를 들 수 있다.

[0057] 추가적인 예로서, 보존 영역으로서, 이하의

```
411             428             444
|               |               |
YXAYNXXXELDXLXXXSGLXXXDWRGLVAAXDSH     (서열번호４４)
```

[0058]

[0059] [서열 중에 있어서,

[0060] X412는, E 및 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0061] X416은, Q, H 및 E로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0062] X417은, N, H 및 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0063] X418은, Y, F 및 C로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0064] X422는, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0065] X424는, W, C, 및 M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0066] X425는, Y, Q, S, A 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0067] X426은, L, I, V 및 M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0068] X430은, Q, H, 및 P로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0069] X431은, Q, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0070] X432는, P, 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0071] X441은, V 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이다]를 들 수 있다. 추가적인 예로서, 보존 영역으로서, 이하의

```
411             428                             459     467
|               |                               |       |
YXAYNXXXELDXLXXXSGLXXXDWRGLVAAXDSHXXXXXHXXXXCXAPCEXEXXXXI (서열번호４５)
```

[0072]

[0073] [서열 중에 있어서,

[0074] X412는, E 및 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0075] X416은, Q, H 및 E로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0076] X417은, N, H 및 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0077] X418은, Y, F 및 C로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0078] X422는, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0079] X424는, W, C, 및 M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0080] X425는, Y, Q, S, A 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0081] X426은, L, I, V 및 M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0082] X430은, Q, H, 및 P로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0083] X431은, Q, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0084] X432는, P, 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되다 적어도 1의 아미노산이며;

[0085] X441은, V 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0086] X445는, Y, 및 F로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0087] X446은, Q, 및 K로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0088] X447은, V, 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0089] X448은, F, V, I, Y, C, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0090] X450은, N, G, D, H, E, Q, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0091] X452는, S, G, D, H, A, 및 E로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0092] X453은, F, Y, D, C, 및 H로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0093] X454는, D, E, N, K, 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0094] X

[0095] 456은, P, H, T, S, 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0096] X461은, D, N, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0097] X464는, I, L, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0098] X465는, N, D, S, C, Q, R, H, 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0099] X466은, H, 및 R로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이다]를 들 수 있다.

[0100] 이러한 보존 영역을 갖는 아미노산 서열로서, 서열 번호 1의 아미노산 서열에 대하여, 적어도 60%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을, 서열 번호 1에 대응하는 서열로 정의할 수 있다. 서열 번호 1에 대응하는 서열은, 전술한 보존 영역을 포함함과 더불어, 서열 번호 1에 대하여 적어도 60%, 적어도 63%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 998%, 또는 적어도 99%의 상동성 또는 동일성을 가짐으로써 특정될 수 있다.

[0101] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명은, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역에, 상기 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이를 포함하는 서열; 또는 상기 서열에 적어도 90%의 동일성을 갖는 서열을 코딩하고, 에르고티오네인 생산 미생물에 도입된 경우에 에르고티오네인 생산을 항진하는, 핵산에 관한 것이다.

[0102] 본 발명에 있어서, 기능 도메인이란, AO090005000664 유전자 또는 그 오르소로그 유전자가 코딩하는 단백질에 있어서의, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인, 또는 상기 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인을 가리킨다. 이러한 기능 도메인은 5개의 α헬릭스로 구성되는 초이차 구조를 갖는 도메인이 존재하는 것으로 나타났다(도 8의 (A) 및 (B)). 이 기능 도메인의 구체적인 기능은 불명확하지만, 기능 도메인을 구성하는 427 위치~429 위치의 결실(3DEL), 427~444 위치의 결실(18DEL), 및 419 위치~444 위치(26 DEL), 431 위치~475 위치(45 DEL), 419 위치~475 위치(57DEL), 및 404 위치~515 위치(112DEL)가 결실되었을 때에, 에르고티오네인 생산을 항진하기 때문에, 기능 도메인의 기능 변조가, 에르고티오네인 생산에 기여할 수 있다. 특히, 기능 도메인을 구성하는 아미노산의 결실에 의해 에르고티오네인 생산이 증대되는 관점에서, 에르고티오네인 생산 증대에는, 기능 도메인에 있어서의 기능의 방해가 필요할 수 있다. 또한, 서열 번호 1의 428 위치 및 459 위치는, 5개의 α헬릭스의 접속 영역에 위치하고 있으며, 이러한 위치에 있어서의 변이는, 초이차 구조에 있어서의 구조 변화를 미칠 가능성이 높다고 생각된다.

[0103] 기능 도메인의 기능을 변조하는 변이란, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인, 또는 상기 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인의 기능에 영향을 미치는 변이면 좋고, 이러한 변이는, 상기 기능 도메인에 있어서의 1 또는 복수의 아미노산의 결실, 부가 또는 치환일 수 있다. 대응하는 기능 도메인이란, AO090005000664라고 명명된 유전자의 오르소로그 유전자에 있어서의, 기능 도메인을 말한다. 이러한 기능 도메인의 기능에 영향을 미침으로써, AO090005000664 유전자 또는 그 오르소로그 유전자를 갖는 에르고티오네인 생산 미생물에 있어서, 에르고티오네인 생산성을 항진할 수 있다. 에르고티오네인 생산을 항진하는 관점에서, 기능 도메인을 변조하는 변이는, W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역의 결실이거나, 또는 428 위치에 대응하는 위치의 G 및/또는 459 위치에 대응하는 위치의 C에 있어서의 변이, 특히 치환이다.

[0104] 결실되는 아미노산의 수는, 결실이 생긴 미생물에 있어서 ERG의 생산이 항진 되는 한 임의의 수이다. 일례로서, 결실되는 아미노산의 수는, 1~120, 1~112, 1~60, 1~57 및 1~47로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 범위의 수가 결실 될 수 있다. 결실되는 아미노산의 수는, 바람직하게는 1~30, 더 바람직하게는 1~26의 임의의 수이다. 일례로서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산이 결실된다. 보다 구체적으로는, 428 위치에 대응하는 위치 아미노산이 결실되거나, 또는 428 위치에 대응하는 위치의 아미노산을 포함하는 복수의 아미노산이 결실 될 수 있다. 다른 양태에서는, 428 위치에 대응하는 위치의 아미노산을 포함하지 않는 아미노산이 결실되어도 좋다.

[0105] 일례로서, 411 위치~462 위치의 보존 영역(서열 번호 15)에 포함되고, 428위치를 포함하는 임의의 서열이 결실 될 수 있다. 일례로서, 428 위치, 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치(서열 번호 20), 427 위치~444 위치(서열 번호 17), 및 419 위치~444 위치(서열 번호 21)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역이 결실될 수 있다. 또한, 다른 예로서, 431 위치~475 위치, 419 위치~475 위치, 및 404 위치~515 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 영역에 대응하는 영역이 결실되어도 좋다.

[0106] 본 발명에 있어서, 아미노산 위치는, AO090005000664 유전자가 코딩하는 서열 번호 1의 아미노산 위치에 기초하여 나타내지만, 대응하는 유전자, 즉 오르소로그 유전자가 코딩하는 단백질에 있어서 대응하는 아미노산 위치를 나타낸다. 대응하는 위치는, 서열 번호 1의 아미노산 서열의 상동 서열을 얼라인먼트함으로써, 결정할 수 있다.

[0107] W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역이 결실된 서열에 대한 동일성은, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는다. 이러한 동일성을 가지며, 또한 사상균에 있어서 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역이 결실된 경우에, 에르고티오네인 생산성을 높이는 서열을 선택할 수 있다.

[0108] 에르고티오네인 생성에 기여하는 기능은, 에르고티오네인의 생성 과정에 있어서의, 어떠한 기능을 담당하는 것을 말한다. 이러한 기능으로서, 에르고티오네인의 합성 경로나 분해 경로에 기여하는 효소의 전사 조절에 관계된 기능이어도 좋고, 에르고티오네인의 합성 경로에 기여하는 효소 반응이어도 좋고, 에르고티오네인 또는 그 전구체의 분해 경로에 기여하는 효소 반응이어도 좋다. 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역이 결실된 서열을 코딩하는 본 발명의 핵산이, 에르고티오네인 생산성의 사상균에 도입됨으로써, 에르고티오네인 생산을 항진하는 기능을 갖는다.

[0109] 본 발명은, 또한, 에르고티오네인 생산능이 항진된 미생물의 제조 방법에도 관한 것이다. 보다 구체적으로, 이러한 제조 방법은, 서열 번호 1에 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역을 결실시키는 것을 포함한다. 상기 결실되는 영역은, 통상, W404~Q515의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역이지만, 에르고티오네인 생산능을 항진 가능한 한, 404~511 위치의 인접하는 영역도 결실되어도 좋다. 서열 번호 1의 404 위치~511 위치의 기능 도메인에 대응하는 기능 도메인에 포함되는 영역이 결실되는 경우, 상기 결실되는 영역은, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치를 포함하여도 좋고, 포함하지 않아도 좋다. 결실되는 영역에는, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치가 포함되는 것이 바람직하다. 결실되는 영역은, 서열 번호 1의 428 위치, 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치, 427 위치~444 위치, 및 419 위치~444 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 영역에 대응하는 영역이다. 결실되는 영역은, 411 위치~462 위치(서열 번호 15)의 보존 영역의 전부를 결실하고 있어도 좋고, 나아가서는 404 위치~515 위치의 기능 도메인 전부를 결실하고 있어도 좋다. 결실의 범위는, 이러한 결실을 갖는 미생물이, 에르고티오네인 생산을 항진 가능한 한 임의의 결실이면 좋다. W404~Q515의 기능 도메인 내, 특히 411 위치~462 위치(서열 번호 15)의 보존 영역 내의 연속하는 아미노산 서열이 결실되지만, 불연속 아미노산

서열이 결실되어 있어도 좋다. 상기 미생물로서는, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 및 타라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 에르고티오네인 생성 미생물이다.

[0110] 본 발명의 다른 양태에서는, 서열 번호 1이 대응하는 서열에 있어서, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치의 G 및/또는 459 위치에 대응하는 위치의 C에 있어서 변이를 가지며, 에르고티오네인 생산 미생물에 도입된 경우에 에르고티오네인 생산을 항진하는, 핵산에 관해서도 좋다. 이러한 위치에 있어서의 변이는, 보다 구체적으로는 G428S 및/또는 C459F의 치환이어도 좋다. 이러한 위치에 변이를 갖는 핵산을 가짐으로써, 에르고티오네인 생산 미생물은 에르고티오네인 생산을 항진한다. 보다 구체적으로는, 서열 번호 1의 대응하는 서열은, 본 명세서에 의해 정의되는 보존 영역을 갖는다.

[0111] 또한, 본 발명은 이하의:

[0112] 1) 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 및 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 있어서, 428 위치에 대응하는 위치에 S를 갖거나, 및/또는 459 위치에 대응하는 위치에 F를 갖는, 아미노산 서열, 또는

[0113] 2) 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대하여, 적어도 60%의 동일성을 갖고, 또한 428 위치에 대응하는 위치에 S를 갖거나, 및/또는 459 위치에 대응하는 위치에 F를 갖는, 아미노산 서열을 코딩하고, 에르고티오네인 생산 사상균에 도입된 경우에 에르고티오네인 생산을 항진하는, 핵산에 관해서도 좋다. G428S, C459F 변이를 가짐으로써, 에르고티오네인 생산을 항진할 수 있다.

[0114] 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11에 대한 동일성은, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 동일성을 갖는다. 특히, 아스페르길루스·소야의 오르소로그 유전자 및 아스페르길루스·니거의 오르소로그 유전자란, 각각 68% 및 67%의 동일성을 갖는 한편, G428S에 대응하는 변이(아스페르길루스·니거로서는 G442S)를 아스페르길루스·소야 및 아스페르길루스·니거에 도입함으로써, ERG 생산의 항진이 확인되고 있다(도 4 및 5).

[0115] 또한, 본 발명은 이하의:

[0116] 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 및 12의 염기 서열에 대하여, 적어도 60%의 동일성을 가지며, 서열 번호 1의 아미노산 서열의 428 위치에 대응하는 위치 및/또는 459 위치에 대응하는 위치에 변이를 코딩하는, 염기 서열,

[0117] 로 이루어지며, 에르고티오네인 생산 미생물에 도입된 경우에 에르고티오네인 생산을 항진하는, 핵산에 관해서도 좋다. G428S, C459F 변이를 가짐으로써, 에르고티오네인 생산을 항진할 수 있다.

[0118] 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 및 12에 대한 동일성은, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 동일성을 갖는다. 특히, 아스페르길루스·소야의 오르소로그 유전자 및 아스페르길루스·니거의 오르소로그 유전자란, 각각 68% 및 67%의 동일성을 갖는 한편, G428S에 대응하는 변이(아스페르길루스·니거로서는 G442S)를 도입함으로써, ERG 생산의 항진이 확인되고 있다(도 4 및 5).

[0119] 본 발명의 핵산은, 사상균, 예컨대, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 또는 타라로마이시스속에 유래하여도 좋다. 본 발명의 핵산은, 이들 사상균에 있어서 보존성이 높다. 아스페르길루스속에 속하는 사상균 유래의 핵산에 코딩되는 아미노산 서열은, 서열 번호 1에 대하여 75~100%의 상동성을 갖는다. 페니실륨속에 속하는 사상균 유래의 핵산에 코딩되는 아미노산 서열은, 서열 번호 1에 대하여 68~75%의 상동성을 갖는다. 라삼소니아속에 속하는 사상균 유래의 핵산에 코딩되는 아미노산 서열은, 서열 번호 1에 대하여 70%의 상동성을 갖는다. 타라로마이시스속에 속하는 사상균 유래의 핵산에 코딩되는 아미노산 서열은, 서열 번호 1에 대하여 64~68%의 상동성을 갖는다.

[0120] 에르고티오네인 생성에 기여하는 기능은, 에르고티오네인의 생성 과정에 있어서의 어떠한 효소 반응을 담당하는 것을 말한다. 에르고티오네인의 합성 경로에 기여하는 효소 반응이어도 좋고, 에르고티오네인 또는 전구체의 분해 경로에 기여하는 효소 반응이어도 좋다. 합성 경로에 기여하는 효소 반응을 담당하는 경우, 본 발명의 핵산이 코딩하는 단백질은, 에르고티오네인 또는 그 전구체의 합성 활성을 가질 수 있다. 분해 경로에 기여하는 효소 반응인 경우, 본 발명의 핵산이 코딩하는 단백질은, 에르고티오네인 또는 그 전구체 혹은 대사물의 분해 활성을 가질 수 있다. 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치에 S를 갖거나, 및/또는 459 위치에 대응하는 위치에 F를 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 본 발명의 핵산은, 에르고티오네인 생산성의 사상균에 도입됨으로써, 에르고티오네인 생산을 항진하는 기능을 갖는다.

[0121] 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치 및 459 위치에 대응하는 위치는, 서열 번호 1의 아미노산 서열의 상동 서열을 얼라인먼트함으로써, 결정할 수 있다. 일례로서는, 근방의 서열로부터 결정할 수 있고, 428 위치의 근방

서열인 LSGLQ의 G의 위치가 428 위치에 대응한다. 428 위치의 G가 S로 변이함으로써, 에르고티오네인 생산성이 향진한다. 459 위치의 근방 서열인 APCED의 C의 위치가 459 위치에 대응한다. 459 위치의 C가 F로 변이함으로써, 에르고티오네인 생산성이 향진한다. 428 위치에 대응하는 위치 및 459 위치에 대응하는 위치는, 별개로 변이가 도입되어 있어도 좋고, 동시에 변이가 도입되어 있어도 좋다.

[0122] 본 발명은, 또한, 에르고티오네인 생산능이 향진된 미생물의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 이러한 제조 방법은, 본 발명에 관한 보존 영역을 코딩하는 미생물의 게놈에 대하여, 서열 번호 1의 428 위치에 대응하는 위치 및/또는 459 위치에 대응하는 위치에 변이를 도입하는 것을 포함한다. 428 위치에 대응하는 위치의 변이는, G428S이며, 459 위치의 변이는 C459F인 것이 바람직하다. 상기 미생물이, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 및 탈라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 에르고티오네인 생성 미생물이다. 일례로서, 서열 번호 1의 부분 서열(427 위치~444 위치)에 대응하는 이하의 보존 영역:

427 444

| |

SGLXXXXWXGXXAAXDSH (서열번호４３)

[0123]

[0124] [서열 중에 있어서,

[0125] X430은, Q, H, P, 및 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0126] X431은, Q, 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0127] X432는, P, Q 및 G로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0128] X433은, D, 및 E로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0129] X435는, R, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0130] X437은, L 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0131] X438은, V, 및 M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이며;

[0132] X441은, V, I 및 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1의 아미노산이다]

[0133] 에 있어서, 428 위치의 G 및/또는 459 위치의 C에 있어서 변이를 갖는 보존 영역을 코딩하는 게놈에 대하여, 이하의:

[0134] 428 위치에 대응하는 위치 및/또는 459 위치에 대응하는 위치에 변이를 도입하는 것을 포함하고, 상기 미생물이, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 라삼소니아속 및 탈라로마이시스속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 에르고티오네인 생성 미생물인, 상기 제조 방법에 관한 것이다.

[0135] 게놈에 대한 변이의 도입은, 임의의 수법을 이용하여 도입되어도 좋다. 정법의 형질 전환계를 이용하여 도입되어도 좋고, 랜덤 변이를 도입한 결과로 도입되어도 좋고, 게놈 편집 기술을 이용하여 도입되어도 좋다. 일례로서, 형질 전환계에서는, 유전자 카세트를 이용하여 도입되어도 좋고, 부위 특이적인 유전자 도입을 행하여도 좋고, 벡터 등에 의해 도입되어도 좋다. 본 발명의 다른 양태에서는, 본 발명의 핵산을 발현 가능하게 삽입된 벡터에 관해서도 좋다. 랜덤 변이의 변이 도입 방법으로서는, 예컨대, 물리적으로 DNA를 손상시켜 변이를 도입하는 자외선(UV)이나 X선 조사, 화학적으로 DNA를 손상시켜 변이를 도입하는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG)이나 에틸메탄술폰산(EMS) 등의 알킬화 시약에 의한 처리 등을 들 수 있다. 게놈 편집 기술로서는, 일례로서, CRISPR/Cas 시스템을 이용한 부위 특이적 절단과 상동 재조합을 이용할 수 있다. 발명은, 본 발명에 관한 핵산을 포함하는 미생물에도 관한 것이다. 본 발명에 관한 제조 방법의 결과 취득된 미생물이다.

[0136] 본 발명에 관한 미생물을 배양함으로써, 높은 생산성으로 에르고티오네인을 제조할 수 있다. 본 발명에 관한 미생물은, 고체 배양 또는 액체 배양 중 어느 쪽으로 배양되어도 좋다. 일례로서, 본 발명에 관한 미생물을 배양함으로써, 높은 생산성으로 에르고티오네인을 제조할 수 있다. 본 발명에 관한 미생물은, 고체 배양 또는 액체 배양 중 어느 쪽으로 배양되어도 좋다. 일례로서, 찐 쌀에 있어서, 본 발명에 관한 미생물을 배양함으로써, 에르고티오네인 함유량이 높은 쌀 누룩을 제조할 수 있다. 이러한 누룩을 이용하여, 본 기술 분야의 주지(周知)된 공정을 거쳐, 간장, 된장, 소금 누룩, 감주 등을 제조할 수 있고, 또한, 누룩균을 수집하여 마이코프로테인을 얻을 수도 있다. 따라서, 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명은, 고함량의 에르고티오네인을 포함하는 쌀 누룩의

제조 방법에 관하여도 좋다. 생성된 에르고티오네인은, 배양물 중에서 법정에 기초하여 정제할 수 있다. 일례로서, 배양물을 분쇄하고, 물을 증발시켜 건조 분말을 얻을 수 있다. 건조된 에르고티오네인 함유 원료에 대하여, 함수 에탄올을 첨가함으로서, 에르고티오네인이 에탄올 용액 중에 추출된다. 불용성 물질을 제거하고, 에탄올 용액 중의 에르고티오네인을, 크로마토그래피에 제공함으로써 정제하여도 좋다.

[0137] 에르고티오네인은, 항산화 작용을 비롯하여, 엘라스타아제 저해 작용, 티로시나아제 저해 작용, 폴리페놀옥시다아제(PPO) 저해 작용 등 다양한 작용을 갖는 것이 알려져 있다. 따라서, 제조된 에르고티오네인은, 정제되거나 또는 그대로 식품, 화장품, 의약부 외품, 및 의약품 등의 제품에 배합되어도 좋고, 제품에 배합되는 농축물로서 조제되어도 좋다. 식품으로서 배합되는 경우, 기능성 표시 식품으로 할 수도 있다. 이러한 기능성 표시로서, 에르고티오네인의, 엘라스타아제 저해 작용에 기초한 항주름 작용, 티로시나아제 저해 활성에 기초한 아름다운 피부 또는 미백 작용, 과산화지질의 생성에 기초한 생활 습관병 예방 작용, 활성 산소 제거에 기초한 인지증이나 알츠하이머병의 예방 작용 등의 기능을 표시할 수 있다. 제조된 에르고티오네인은, 특히 에르고티오네인의 생리 작용에 주목한, 기능성 표시 식품, 영양 기능 식품, 특정 보건용 식품, 또는 영양 보조 식품(서플리먼트)이어도 좋다.

[0138] 본 개시에 있어서 언급되는 모든 문헌은 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 포함된다. 상동성은, NCBI의 blastp의 프로그램을 이용하여, NCBI에 등록된 단백질 데이터 베이스를 이용하여 결정된다. 본 개시에 있어서 상동성 및 동일성의 %를 제외하고, 특별히 언급이 없는 한 질량%를 의미한다.

[0139] 이하에 설명하는 본 발명의 실시예는 예시만을 목적으로 하고, 본 발명의 기술적 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 기술적 범위는 특허청구의 범위의 기재에 의해서만 한정된다. 본 발명의 취지를 일탈하지 않는 것을 조건으로 하여, 본 발명의 변경, 예컨대, 본 발명의 구성 요건의 추가, 삭제 및 치환을 행할 수 있다.

[0140] **실시예**

[0141] 실시예 1: ERG 고생산주의 해석

[0142] (1) 배양

[0143] 아스페르길루스속의 진핵 생물은, 이하의 배양을 이용하여 배양했다. 액체 배양에서는 Czapek-DOX(Cz-DOX) 배양(3.5% Czapek-DOX 브로쓰, BD사 제조, pH6.0), PD 배양(2% 덱스트린, 1% 폴리펩톤, 0.5% KH_2PO_4, 0.1% $NaNO_3$, 0.05% $MgSO_4$, 0.1% 카자미노산, pH6.0), 파푸민 배지(5% 파푸민 SM, pH 무조정)를 이용했다. 플레이트 배양에서는 주로 Cz-DOX 한천 배지(3.5% zapek-DOX 브로쓰, BD사 제조, 0.1% 미량 원소, 2% 아가 첨가) 또는 맥아 한천 배지(4.5% Malt Agar Nissui, 닛스이 세이야쿠사 제조, 0.1% 미량 원소, 0.5% 효무 추출물)를 이용했다.

[0144] (2) ERG 고생산주의 게놈 해석

[0145] ERG 고생산주의 전(全) 게놈을 해석하여, 그 중에서 기능 미지의 AO090005000664라는 유전자에 있어서의 G428S 또는 C459F의 변이가 ERG 생산 항진에 기여하는 것을 발견했다. AO090005000664의 아미노산 서열(서열 번호 1), 및 염기 서열(서열 번호 2)은, 도 1과 같다.

[0146] AO090005000664의 아미노산 서열에 대해서, NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 BLAST(Basic Logical Alignment Search Tool)의 디폴트 설정으로 상동성 검색을 행한 바, 아스페르길루스속에서 고도로 보존되어 있으며, 서열 번호 1의 411~467 위치에 있어서, 고도로 보존된 보존 영역이 발견되었다(도 2). AO090005000664와, 아스페르길루스·오리제, 아스페르길루스·소야, 아스페르길루스·타마리, 아스페르길루스·루츄엔시스, 아스페르길루스·니거, 및 아스페르길루스·니쥬란스의 오르소로그 유전자와의 상동성은, 각각 100%, 98%, 96%, 67%, 67%, 및 62%였다.

[0147] 실시예 2: 아스페르길루스·오리제 RIB40 주에 있어서의 변이 재현주의 제작 및 ERG 생산성의 확인

[0148] (1) G428S 카세트의 제작

[0149] 아스페르길루스·오리제 RIB40_dKP 주(Δku70, ΔpyrG)를 숙주로 하여, AO090005000664 유전자에 G428S 변이를 도입하기 위한, 유전자 카세트를 제작했다. 프라이머를 표 1에 나타낸다. RIB40 주의 게놈 서열을 주형으로 하고, AoG428S_F1과 R1, AoG428S_F2와 R2, AoG428S_F3와 R3, AopyrG F와 R의 프라이머 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. PCR 조건은 첨부된 프로토콜에 따랐다. 정제한 4개의 PCR 증폭 단편과 선형화된(Linerized) pUC19(Takara)(각 0.5 μL)를 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB) 2.5 μL와 혼합하여, 60℃에서 1시간 반응시켰다. 반응물 4 μL를 ECOS 적격 *E. coli* JM109(닛폰진)에 도입하여 형질 전환

을 행했다. 다음에, 이 형질 전환체에서 추출한 플라스미드를 주형 AoG428S_NF와 NR의 프라이머 세트를 이용하여, PCR에 의해 증폭된 유전자 단편을 G428S 카세트로 했다. PCR 산물 50 μL는 에탄올 침전 처리하여 멸균수 10 μL에 용해시켰다.

표 1

표 1. 아스페르길루스·오리제 RIB40주의 G428S 변이 재현주

프라이머명	서열 (5' → 3')	
AoG428S_F1	CGGTACCCGGGGATCTtagatcaagtgaggaacacctcctaggca	(서열 번호 46)
AoG428S_R1	tagcaataagcccaaCGGCCAGAGATATAGTCACTCAATTCCGTT	(서열 번호 23)
AoG428S_F2	tcttctgaggtgcagATCTCAGTGCCCGATCCGGGTAGAG	(서열 번호 24)
AoG428S_R2	GCTGTTGTAGGCtCGAGAGATACCACAG	(서열 번호 47)
AoG428S_F3	CTGTGGTATCTCTCGaGCCTACAACAGC	(서열 번호 48)
AoG428S_R3	CGACTCTAGAGGATCtccgagagcaacagcgacactctca	(서열 번호 25)
AopyrG_F	ttgggcttattgctatgtccctgaaagg	(서열 번호 26)
AopyrG_R	ctgcacctcagaagaaaaggatgatcaatacc	(서열 번호 27)
AoG428S_NF	TCGGCCTCGCCTTCTTCATCGT	(서열 번호 32)
AoG428S_NR	taagtcatgtccgtaatgggcatcaaaaggg	(서열 번호 33)
AoC459F_R2	ATTCTCATCCTCAaATGGTGCTGGGCAG	(서열 번호 49)
AoC459F_F3	GACTGCCCAGCACCATtTGAGGATGAGAA	(서열 번호 50)

[0150]

[0151] (2) C459F 카세트의 제작

[0152] 전술한 (1)과 마찬가지로 하여 C459F 카세트를 제작했다. 프라이머는 AoG428S_R2를 AoC459F_R2에, AoG428S_F3을 AoC459F_F3으로 바꾸어 실시했다.

[0153] (3) A. oryzae RIB40_dKP의 형질 전환

[0154] RIB40_dKP 주를 10 mM 우리딘, 10 mM 우라실을 포함한 Cz-DOX_UraUri 배지에 도포하여, 5일간, 30℃에서 배양했다. 플레이트 상에서 생육시켜, 분생자를 마이크로 루프로 긁어, 150 mL 용삼각 플라스크에 넣은 10 mM 우리딘, 10 mM 우라실을 포함한 PD 배지 40 mL에 식균(植菌)했다. 30℃에서, 180 rpm으로 선회 배양을 20시간 행하여, 균체를 회수했다.

[0155] 배양 후의 균체를 미라클로스로 집균하고, KCl 버퍼(0.6 MKCl, 0.1 M NaH_2PO_4, pH5.5)로 세정했다. 회수한 균체를 세포벽 용해 효소 20 mL(0.5% Lysing enzyme(Sigma-aldrich), 0.3% Yatalase(Takara), 1.5% Cellurase Onozuka(Yakult)/20 mL KCl 버퍼)에 현탁하고, 30℃에서, 3시간 진탕한 후, 70 μm의 셀 스트레이너에 통과시켜 여액을 회수했다.

[0156] 효소 처리 후, 원심 처리(4℃, 3000 rpm, 10 min)에 의해 프로토플래스트를 침전시켜, 상청을 제거했다. 다음에, SolB 버퍼(1.2 M 소르비톨, 0.1 M KCl, 10 mM Tris-HCl; pH7.5) 30 mL를 더하여 프로토플래스트를 재현탁시켜 에펜 튜브에 옮기고, 원심 처리에 의해 프로토플래스트를 회수했다. 또한, 30 mL의 SolB 버퍼를 더하여 동일한 세정 조작을 재차 반복했다. 회수한 프로토플래스트를 0.4~0.8 mL의 SolB에 현탁시켰다. 상기 프로토플래스트 현탁액 100 μL에 G428S 카세트, 또는, C459F 카세트 5~10 μg, 12.5 μL의 SolC(50% PEG3350, 50 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl; pH7.5)를 더하여 천천히 혼합한 후, 빙상에서 30 min 인큐베이트했다. 그 후, 1 mL의 SolC를 더하여, 피펫팅에 의해 혼합시킨 후, 실온에서 10 min 정치했다. 그 후, 10 mL의 SolB를 더하여, 원심 처리에 의해 프로토플래스트를 침전시키고, 상청을 제거했다. 재생용 한천 배지(3.5% Czapek-DOX 브로쓰, 1.2 M 소르비톨, 0.1% 미량 원소, 2% 아가) 상에 전량을 얹고, 50℃의 상부 아가(3.5% Cz-DOX 브로쓰, 1.2 M 소르비톨, 0.1% 미량 원소, 0.5% 아가)을 중층하고, 30℃에서 약 1주간 배양했다.

[0157] 얻어진 형질 전환체는, Cz-DOX 한천 배지(3.5% Czapek-DOX borth, 0.1% 미량 원소, 1.5% 아가)로 3회 점식하여 순화했다.

[0158] (4) 변이 재현주의 ERG 생산량의 확인

[0159] 상기에서 얻어진 형질 전환체, 및, 컨트롤로서 RIB40 야생주의 ERG 생산량을 비교했다.

[0160] (4-1) 배양·추출

[0161] 50 mL 용삼각 플라스크에 파프민 배지(5% 파프민 SM, pH 무조정) 10 mL를 조제하고, 120℃에서, 30분 오토클레이브 멸균했다. 여기에 분생자 현탁액(1.0× 10^7 개/ml)을 100 μL 첨가하고, 30℃에서, 160 rpm, 4일간 진탕 배양했다. 배양액을 열수 추출(90℃, 1시간)하고, 상청 0.5 mL를 나노셉 원심 여과 디바이스(니혼폴사 제조 3K)로 여과하여, 적절하게 초순수로 희석하여 분석 샘플로 했다.

[0162] (4-2) 분석 조건

[0163] 하기의 분석 조건에 의해, 분석 샘플 중 ERG량을 측정했다.

[0164] LC/MS 해석 조건:

[0165] 분석 장치: UPLC CQ micro; Waters UPLC

[0166] 컬럼: 2.5 HILIC 3.0 mml.D.×150 mm

[0167] 용매 A: 0.1% 포름산/아세토니트릴

[0168] 용매 B: 0.1% 포름산/H_2O

[0169] 유속: 0.5 ml/min 80%A

[0170] 주입량: 3 μl

[0171] 질량 분석계

[0172] ESI: ES+

[0173] ConeV: 21 V

[0174] 모세관 V: 4.5 kV

[0175] 소스 온도: 120℃

[0176] 탈용매 온도: 400℃

[0177] MS 스캔 모드

[0178] LC/MS/MS에서의 ERG 분석 조건:

[0179] 분석 장치: UPLC CQ micro; Waters UPLC

[0180] 컬럼: 2.5 HILIC 3.0 mml.D.×150 mm

[0181] 용매 A: 0.1% 포름산/아세토니트릴

[0182] 용매 B: 0.1% 포름산/H_2O

[0183] 유속: 0.5 ml/min 80%A

[0184] 1 샘플마다 100% B에서 컬럼을 세정

[0185] 주입량: 3 μL

[0186] 질량 분석계

[0187] ESI: ES+

[0188] Cone V: 21 V

[0189] 모세관 V: 4.5 kV

[0190] 소스 온도: 120℃

[0191] 탈용매 온도: 400℃

[0192] 충돌 에너지: 11 V

[0193] 트레이스: m/z 230.1 > 186.1

[0194] 충돌 에너지: 20 V

[0195] 트레이스: m/z 230.1 > 127.0

[0196] (5) 형질 전환주의 서열 확인

[0197] Cz-DOX 한천 배지로 4일 배양한 균체의 분생자를 이쑤시개로 2번 긁어낸 정도를, 100 μL의 TE에 현탁시킨 분생자 현탁액 0.8 μL를 19.2 μL의 KOD one(Toyobo사 제조) PCR 반응액에 더하여, 콜로니 PCR를 행했다. PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(QIAGEN사 제조)로 정제했다. 컬럼으로부터의 용출에는 Elution Buffer(QIAGEN사 제조)를 이용하고, 용출량은, PCR계와 동일량의 50 μL로 용출했다. 정제한 PCR 산물을 Fasmac사에 위탁하여 서열을 확인했다.

[0198] G428S 변이 재현의 형질 전환체 48 주 중 2 주에 G428S 변이가 들어 있었다. C459F 변이 재현의 형질 전환체 40 주 중 1 주에 있어서 C459F 변이가 들어 있었다.

[0199] 각 균주의 ERG 생성량을 도 3에 나타낸다. 변이 도입주의 ERG 생산성을 비교한 바, 대조주 및 야생주와 비교하여 ERG 생산성이 향상되었다. G428S 변이 도입주에 비하여 C459F 변이 도입주 쪽이 ERG 생성량이 적지만, C459F 변이도 본 유전자 변이가 ERG 생산성 향상에 관련된다는 것이 명확해졌다.

[0200] 실시예 3: 아스페르길루스·소야에 있어서의 변이 재현주의 제작 및 ERG 생산성의 확인

[0201] 실시예 1의 아스페르길루스·오리제 RIB40 주 AO090005000664 G428S 변이 재현주의 제작의 항에 기재되어 있는 방법과 같이, 아스페르길루스·소야 NBRC4239_ dKP 주(Δku70, ΔpyrG)를 숙주로 하여, 변이 도입, 형질 전환, ERG 생산량의 확인을 행했다. 아스페르길루스·소야에 있어서의 AO090005000664 유전자의 오르소로그 유전자는, 아미노산 동일성에서 98%, 아미노산 상동성에서는, 100%이다.

표 2

표 2. 프라이머 리스트

[0202]

프라이머명	서열(5' →3')
AsG428S_F1	CGGTACCCGGGGATCcaccgcagccaatccccagtt (서열 번호 ３４)
AsG428S_R1	tagcaataagcccaagacatcgggaattgggtcatccgg (서열 번호 ３５)
AsG428S_F2	tttcttctgaggtgcctcgcacagccatgctgtgcc (서열 번호 ５１)
AsG428S_R2	GCTGTTGCAGGCtCGAGAGATACC (서열 번호 ５２)
AsgG428S_F3	GGTATCTCTCGaGCCTGCAACAGC (서열 번호 ５３)
AsG428S_R3	CGACTCTAGAGGATCgaccaccttggaagaaagctgacctga (서열 번호 ３６)
AopyrG_F AspyrG_R	ttgggcttattgctatgtccctgaaagg (서열 번호 ５４) gcacctcagaagaaaaggatgatcaatacc (서열 번호 ５５)
AsG428S_NF	gccgtgggcataggcacgattg (서열 번호 ４１)
AsG428S_NR	gctagcatcacatctcacgacacgtcc (서열 번호 ４２)

[0203] G428S 변이 재현의 형질 전환체 19 주 중 6 주에 G428S 변이가 들어가 있었다.

[0204] 각 균주의 ERG 생성량을 도 4에 나타낸다. 변이 도입주의 ERG 생산성을 비교한 바, 대조주 및 야생주와 비교하여 ERG 생산성이 향상되었다. 아스페르길루스·소야에서도 본 유전자 변이가 ERG 생산성 향상에 관련된다는 것이 명확해졌다.

[0205] 실시예 4: 아스페르길루스·니거(*Aspergillus niger*)에 있어서의 변이 재현주의 제작 및 ERG 생산성의 확인

[0206] 실시예 1의 아스페르길루스·오리제 RIB40 주 AO090005000664 G428S 변이 재현주의 제작 항에 기재되어 있는 방법과 마찬가지로, 아스페르길루스·니거 A1179 주(별명 MA70.15, Genotyping:kusA::amdS, cspA1(짧은 분생자병(short conidiophores)이 되는 변이), pyrG)를 숙주로 하여, 변이 도입, 형질 전환하여, 배양 일수를 6일로 변경하여 ERG 생산량의 확인을 행했다.

표 3

표 3. 아스페르길루스·니거 A1179 주의 변이 도입 및 유전자 파괴주 제작에 사용한 프라이머

프라이머명	서열 (5' → 3')
Ang7990t_F1	CGGTACCCGGGGATCcccgactgtgcaatatctccaattcctatc (서열 번호 56)
Ang7990 _R1	tagcaataagcccaaaggatggctacgatatcatatgcagtgtct (서열 번호 57)
Ang7990 _F2	tcttctgaggtgcggagtctgaactcgaggagcagttcaaggga (서열 번호 58)
Ang7990 _R2	ggctgttggagactcgagatgtaccacagg (서열 번호 59)
Ang7990 _F3	tgtggtacatctcgagtctccaacagcc (서열 번호 60)
Ang7990 _R3	CGACTCTAGAGGATCaagtcgcccatgtaacgaatcaacgctaa (서열 번호 61)
Ang7990 Nest_F1	cgtcagtccgcttcaatgttacc (서열 번호 62)
Ang7990 Nest_R1	gttcgatgtgtatactagggttcagagtag (서열 번호 63)
AsPyrG2522_F	ttgggcttattgctatgtccctgaa (서열 번호 64)
AsPyrG4359_R	ccgcacctcagaagaaaaggatga (서열 번호 65)

[0207]

[0208] 아스페르길루스·니거에 있어서의 AO090005000664 유전자의 오르소로그 유전자의 아미노산 동일성은 67%, 아미노산 상동성에서는, 79%이다. ERG 고생산성을 나타낸 아스페르길루스·오리제주의 변이점(G428S 및 C459F)은, 아스페르길루스·니거에도 보존되어 있다(G442 및 C473). 따라서, 아스페르길루스·오리제 RIB40 주로 변이 효과가 확인된 G428S에 상당하는 442번째의 글리신을 세린에 치환한 변이주를 제작했다. 각 균주의 ERG 생성량을 도 5에 나타낸다. 변이 도입주의 ERG 생산성을 비교한 바, 대조주 및 야생주와 비교하여 ERG 생산성이 향상되었다. 아스페르길루스·니거에서도 본 유전자 변이가 ERG 생산성 향상에 관련된다는 것이 명확해졌다.

[0209] 실시예 5: ERG 고생산주의 해석

[0210] (1) 배지

[0211] 아스페르길루스속의 진핵 생물은, 이하의 배지를 이용하여 배양했다. 액체 배양에서는 Czapek-DOX(Cz-DOX) 배지(3.5% Czapek-DOX 브로쓰, BD사 제조, pH6.0), PD 배지(2% 덱스트린, 1% 폴리펩톤, 0.5% KH_2PO_4, 0.1% $NaNO_3$, 0.05% $MgSO_4$, 0.1% 카자미노산, pH6.0), 파프민 배지(5% 파프민 SM, pH 무조정)를 이용했다. 플레이트 배양에서는 주로 Cz-DOX 한천 배지(3.5% zapek-DOX 브로쓰, BD사 제조, 0.1% 미량 원소, 2% 아가 첨가) 또는 맥아 한천 배지(4.5% Malt Agar Nissui, 닛스이 세이야쿠사 제조, 0.1% 미량 원소, 0.5% 효무 추출물)를 이용했다.

[0212] (2) ERG 고생산주의 게놈 해석

[0213] ERG 고생산주의 전 게놈을 해석하고, 그 중에서 기능 미지의 AO090005000664라는 유전자에 있어서의 아미노산 결손이 ERG 생산 항진에 기여하는 것을 발견했다. AO090005000664의 아미노산 서열(서열 번호 1), 및 염기 서열(서열 번호 2)은, 도 1과 같다.

[0214] AO090005000664의 아미노산 서열에 대해서, NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 BLAST(Basic Logical Alignment Search Tool)의 디폴트 설정으로 상동성 검색을 행한 바, 아스페르길루스속에서 고도로 보존되어 있으며, 서열 번호 1의 411~467 위치에 있어서, 고도로 보존된 보존 영역이 발견되었다(도 6). AO090005000664와, 아스페르길루스·오리제,아스페르길루스·소야, 아스페르길루스·타마리, 아스페르길루스·루츄엔시스, 아스페르길루스·니거, 및 아스페르길루스·니쥬란스의 오르소로그 유전자와의 동일성은, 각각 100%, 98%, 96%, 67%, 67%, 및 62%였다.

[0215] 실시예 6: 아스페르길루스·오리제 RIB40 주의 아미노산 결손주의 제작

[0216] (1) 아미노산 결손 카세트의 제작 및 아스페르길루스·오리제 RIB40_dKP의 형질 전환주의 취득

[0217] RIB40_dKP 주(Δku70, ΔpyrG)를 숙주로 하여, 아미노산을 결손시키는 유전자 카세트를 제작했다. 결손시키는 아미노산은 G428을 중심으로 한 보존성이 높은 아미노산으로 했다(도 6). 구체적으로 428 위치, 427 위치~429 위치, 427 위치~440 위치, 427 위치~444 위치, 및 419 위치~444 위치를 각각 결실시켰다. 이용한 프라이머를 표 1에 나타낸다.

[0218] RIB40 주의 게놈 서열을 주형으로 하고, 프라이머 1과 2, 프라이머 3과 4, 프라이머 5와 6의 프라이머 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. PCR 조건은 첨부한 프로토콜에 따랐다. 정제한 3개의 PCR 증폭 단편과 선형화된 pUC19 (Takara) (각 0.5 μL)를 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB) 2.5 μL와 혼합하여, 60

℃에서, 1시간 반응시켰다. 반응물 4μL를 ECOS 적격 *E. coli* JM109(닛폰진)에 도입하여 형질 전환을 행했다. 다음에, 이 형질 전환체에서 추출한 플라스미드를 템플릿으로 하여, 프라이머 7과 8(Ao3DEL), 프라이머 9와 8(Ao18DEL), 및, 프라이머 9와 10(Ao26DEL)의 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. PCR 조건은 첨부한 프로토콜에 따랐다. 각 PCR 반응액에 DpnI를 첨가하여 37℃에서, 1시간 반응시켰다. 다음에, DpnI 처리한 각 PCR 산물 2 μL를 Ligation high Ver. 2(Toyobo) 5 μl, T4 Polynucleotide Kinase 1 μl, 멸균수 7 μl와 혼합하여 16℃에서, 1시간 반응시켰다. 각 반응물 5 μL를 ECOS 적격 *E. coli* JM109(닛폰진)에 도입하여 형질 전환을 행했다. 다음에, 이 형질 전환체에서 추출한 각 플라스미드를 주형으로 하여, 프라이머 11과 12의 세트를 이용하여, PCR에 의해 증폭된 유전자 단편을 각각 아미노산 결손 카세트 AoXDEL 카세트(X=3, 18, 26)로 했다. PCR 산물 50 μL는 에탄올 침전 처리하여 멸균수 10 μL에 용해시켰다.

[0219] AoXDEL 카세트를 도입하여 RIB40_dKP 주를 형질 전환했다. 형질 전환주는 Cz-DOX 한천 배지에 점식(点植)에 의해 3회 옮겨 심어 순화(純化)했다.

[0220] (2) 분생자 PCR

[0221] 카세트 도입 위치에 대해서, 프라이머 1과 4를 이용하여, 밴드의 크기에 의해 확인했다. 또한, 이 PCR 산물을 정제하여 시퀀스 해석을 행하여, 아미노산 결손을 확인했다.

표 4

표 4. 아미노산 결손주의 제작에 사용한 프라이머

No.	프라이머명	서열 (5' →3')	
1	AoF1	CGGTACCCGGGGATCttagatcaagtgaggaacacctcctaggca	(서열 번호 22)
2	AoR1	tagcaataagcccaaCGGCCAGAGATATAGTCACTCAATTCCGTT	(서열 번호 23)
3	AoF2	tcttctgaggtgcagATCTCAGTGCCCGATCCGGGTAGAG	(서열 번호 24)
4	AoF3	CGACTCTAGAGGATCtccgagagcaacagcgacactctca	(서열 번호 25)
5	pyrG_F	ttgggcttattgctatgtccctgaaagg	(서열 번호 26)
6	pyrG_R	ctgcacctcagaagaaaaggatgatcaatacc	(서열 번호 27)
7	430F	CAACAGCCGGATTGGCGTGGGTTA	(서열 번호 28)
8	426R	GAGATACCACAGGTTATCGAGCTCGTAGTT	(서열 번호 29)
9	445F	TACCAGGTCTTTCACAACGGTAGTTTTGAC	(서열 번호 30)
10	418R	GTAGTTTTGATTGTAGGCTTCGTATGTTTT	(서열 번호 31)
11	AoNF	TCGGCCTCGCCTTCTTCATCGT	(서열 번호 32)
12	AoNR	taagtcatgtccgtaatgggcatcaaaaggg	(서열 번호 33)
13	AsF1	CGGTACCCGGGGATCcaccgcagccaatccccagtt	(서열 번호 34)
14	AsR1	tagcaataagcccaagacatcgggaattgggtcatccgg	(서열 번호 35)
15	AsR2	CGACTCTAGAGGATCgaccaccttggaagaaagctgacctga	(서열 번호 36)
16	As429F	CTGCAACAGCCGGATTGGCGTG	(서열 번호 37)
17	427R	CGAGAGATACCACAGGTTATCGAGCTCG	(서열 번호 38)
18	As441F	GTTGACAGCCATTACCAAGTCTTTCACAAC	(서열 번호 39)
19	As445F	TACCAAGTCTTTCACAACGGTAGTTTTGAC	(서열 번호 40)
20	AsNF	gccgtgggcataggcacgattg	(서열 번호 41)
21	AsNR	gctagcatcacatctcacgacacgtcc	(서열 번호 42)
22	Ang_F1	CGGTACCCGGGGATCccaagccctctgggttaacatacacga	(서열 번호 66)
23	Ang_R1	Tagcaataagcccaaaggatggctacgatatcatatgcagtgtct	(서열 번호 67)
24	Ang_F2	Tcttctgaggtgcagcgaagaagtctgaactcgaggagcagt	(서열 번호 68)
25	Ang_R2	CGACTCTAGAGGATCtcgcccatgtaacgaatcaacgctaa	(서열 번호 69)
26	Ang444F	Caacagccggattggcgtggac	(서열 번호 70)
27	Ang440R	Gatgtaccacaggttgtcaagttcataatt	(서열 번호 71)
28	Ang459F	Ttccaggtcattcacaacggcgg	(서열 번호 72)
29	Ang432R	Ataattatgattgtacaggtcatacgactt	(서열 번호 73)
30	Ang_NF	Agaataagggtcacgaggtgatggtct	(서열 번호 74)
31	Ang_NR	Tgcatcatgaggtagaactttaggtgctac	(서열 번호 75)
32	476F	TTACGGTGGAGAGTTGGTGGGGATC	(서열 번호 76)
33	430R	TTGTAGGCCCGAGAGATACCACAGG	(서열 번호 77)
34	516F	ACGTCAACCGACGACCACGCT	(서열 번호 78)
35	403R	GTCAGCTGGATAGCCGTCAGGAAGG	(서열 번호 79)

[0222]

[0223] (3) 아미노산 결손주의 ERG 생산량의 확인

[0224] 상기에서 얻어진 형질 전환체, 및, 컨트롤을 50 ml 용삼각 플라스크로 5% 파프민 SM 배지 10 ml, 26℃에서, 7일간 배양했다. 배양 후, 오토 크레이브의 용해·보온 모드로 90℃에서, 1시간 가열하고, 그 상청을 나노셉 원심 여과 디바이스(니혼폴사 제조 3K)로 여과하여, LC/MS/MS로 정량했다(도 7의 (A)).

[0225] (3-2) 분석 조건

[0226] 하기의 분석 조건에 의해, 분석 샘플 중의 ERG량을 측정했다.

[0227] LC/MS 해석 조건:

[0228] 분석 장치: UPLC CQ micro; Waters UPLC

[0229] 컬럼: 2.5 HILIC 3.0 mmI.D.×150 mm

[0230] 용매 A: 0.1% 포름산/아세토니트릴

[0231] 용매 B: 0.1% 포름산/H_2O

[0232] 유속: 0.5 ml/min 80% A

[0233] 주입량: 3 μl

[0234] 질량분석계

[0235] ESI: ES+

[0236] Cone V: 21 V

[0237] 모세관 V: 4.5 kV

[0238] 소스 온도: 120℃

[0239] 탈용매 온도: 400℃

[0240] MS 스캔 모드

[0241] LC/MS/MS에서의 ERG 분석 조건:

[0242] 분석 장치: UPLC CQ micro; Waters UPLC

[0243] 컬럼: 2.5 HILIC 3.0 mmI.D.×150 mm

[0244] 용매 A: 0.1% 포름산/아세토니트릴

[0245] 용매 B: 0.1% 포름산/H_2O

[0246] 유속: 0.5 ml/min 80% A

[0247] 1 샘플마다 100% B로 컬럼을 세정

[0248] 주입량: 3 μl

[0249] 질량 분석계

[0250] ESI: ES+

[0251] Cone V: 21 V

[0252] 모세관 V: 4.5 kV

[0253] 소스 온도: 120℃

[0254] 탈용매 온도: 400℃

[0255] 충돌 에너지: 11 V

[0256] 트레이스: m/z 230.1 > 186.1

[0257] 충돌 에너지: 20 V

[0258] 트레이스: m/z 230.1 > 127.0

[0259] 실시예 7: 아스페르길루스·소야 NBRC4239 주의 아미노산 결손주의 제작

[0260] (1) 아미노산 결손 카세트의 제작 및 아스페르길루스·소야 NBRC4239_dKP의 형질 전환주의 취득

[0261] NBRC4239_dKP 주(Δku70, ΔpyrG)를 숙주로 하여, 전술한 아스페르길루스·오리제 RIB40 주와 동일하게 아미노산 결손시키는 유전자 카세트를 제작했다. NBRC4239 주의 게놈 서열을 주형으로 하고, 프라이머 13과 14, 프라이머 3과 15, 프라이머 5와 6의 프라이머 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. PCR 조건은 첨부된 프로토콜에 따랐다. 정제한 3개의 PCR 증폭 단편과 선형화된 pUC19(Takara)(각 0.5 μl)을 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB) 2.5 μl와 혼합하여, 60℃에서, 1시간 반응시켰다. 반응물 4 μL를 ECOS 적격 *E. coli* JM109(닛폰진)에 도입하여 형질 전환을 행했다. 다음에, 이 형질 전환체에서 추출한 플라스미드를 템플릿으로 하여, 프라이머 16과 17(As1DEL), 프라이머 7과 8(As3DEL), 프라이머 18과 8(As14DEL), 프라이머 9와 8(As18DEL), 및, 프라이머 19와 10(As26DEL)의 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. 전술한 아스페르길루스·오리제 RIB40 주와 동일하게 취득한 각 플라스미드를 주형으로 하여, 프라이머 20과 21의 세트를 이용하여, PCR에 의해 증폭된 유전자 단편을 각각 아미노산 결손 카세트 AsXDEL 카세트(X=1, 3, 14, 18, 26)로 했다. PCR 산물 50 μl는 에탄올 침전 처리하여 멸균수 10 μl에 용해시켰다.

[0262] AsXDEL 카세트를 도입하여 NBRC4239_dKP 주를 형질 전환했다. 형질 전환주는 Cz-DOX 한천 배지에 점식에 의해 3회 옮겨 심어 순화했다.

[0263] (2) 분생자 PCR

[0264] 카세트 도입 위치에 대해서, 프라이머 13과 15를 이용하여, 밴드의 크기에 의해 확인했다. 또한, 이 PCR 산물을 정제하여 시퀀스 해석을 행하고, 아미노산 결손을 확인했다.

[0265] (3) 아미노산 결손주의 ERG 생산량의 확인

[0266] 실시예 2 (3)에 기재된 아스페르길루스·오리제 RIB40 주와 동일하게 행하고, 아미노산 결손주의 ERG 생산량을 확인했다(도 7의 (B)).

[0267] 실시예 8: 아스페르길루스·오리제 RIB40 주의 아미노산 결손주의 제작

[0268] (1) 아미노산 결손 카세트의 제작 및 아스페르길루스·오리제 RIB40_dKP의 형질 전환주의 취득

[0269] RIB40_dKP 주(Δku70, ΔpyrG)를 숙주로 하여, 아미노산을 결손시키는 유전자 카세트를 제작했다. 실시예 10의 예측 구조를 바탕으로, 도메인의 일부 또는 전체를 결실시킨 아미노산으로 했다. 구체적으로 431 위치~475 위치, 419 위치~475 위치, 및 404 위치~515 위치를 각각 결실시켰다. 이용한 프라이머를 표 1에 나타낸다.

[0270] 실시예 2에서 제작한 플라스미드를 템플릿으로 하여, 프라이머 22와 23(Ao45DEL), 프라이머 22와 10(Ao57DEL), 및, 프라이머 24와 25(Ao112DEL)의 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. PCR 조건은 첨부한 프로토콜에 따랐다. 각 PCR 반응액에 DpnI를 첨가하여 37℃에서, 1시간 반응시켰다. 다음에, DpnI 처리한 각 PCR 산물 2 μL를 Ligation high Ver. 2(Toyobo) 5 μl, T4 Polynucleotide Kinase 1 μl, 멸균수 7 μl와 혼합하여 16℃에서, 1시간 반응시켰다. 각 반응물 5 μL를 ECOS 적격 *E. coli* JM109(닛폰진)에 도입하여 형질 전환을 행했다. 다음에, 이 형질 전환체에서 추출한 각 플라스미드를 주형으로 하여, 프라이머 11과 12의 세트를 이용하여, PCR에 의해 증폭된 유전자 단편을 각각 아미노산 결손 카세트 AoXDEL 카세트(X=45, 57, 112)로 했다. PCR 산물 50 μl는 에탄올 침전 처리하여 멸균수 10 μl에 용해시켰다.

[0271] AoXDEL 카세트를 도입하여 RIB40_dKP 주를 형질 전환했다. 형질 전환주는 Cz-DOX 한천 배지에 점식에 의해 3회 옮겨 심어 순화했다.

[0272] (2) 분생자 PCR

[0273] 카세트 도입 위치에 대해서, 프라이머 1과 4를 이용하여, 밴드의 크기에 의해 확인했다. 또한, 이 PCR 산물을 정제하여 시퀀스 해석을 행하여, 아미노산 결손을 확인했다.

[0274] (3) 아미노산 결손주의 ERG 생산량의 확인

[0275] 실시예 2 (3)에 기재된 아스페르길루스·오리제 RIB40 주와 동일하게 행하여, 아미노산 결손주의 ERG 생산량을 확인했다(도 7의 (C)).

[0276] 실시예 9: 아스페르길루스·니거 FGSCA1179 주의 아미노산 결손주의 제작

[0277] (1) 아미노산 결손 카세트의 제작 및 아스페르길루스·니거 FGSCA1179의 형질 전환주의 취득

[0278] FGSC A1179 주(ΔkusA, pyrG-)를 숙주로 하여, 전술한 아스페르길루스·오리제 RIB40 게주와 동일하게 아미노산 결손시키는 유전자 카세트를 제작했다. 아스페르길루스·니거 IAM2533 주의 게놈 서열을 주형으로 하고, 프라이머 26과 27, 프라이머 28과 29의 프라이머 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. PCR 조건은 첨부한 프로토콜에 따랐다. 정제한 2개의 PCR 증폭 단편 및 실시예 2에서 정제한 프라이머 5와 6의 유전자 단편을 선형화된 pUC19(Takara)(각 0.5 μl)를 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB) 2.5 μl와 혼합하여, 60℃에서, 1시간 반응시켰다. 반응물 4 μL를 ECOS 적격 *E. coli* JM109(닛폰진)에 도입하여 형질 전환을 행했다. 다음에, 이 형질 전환체에서 추출한 플라스미드를 템플릿으로 하여, 프라이머 30과 31(Ang3DEL), 프라이머 32와 31(Ang18DEL), 프라이머 32와 33(Ang26DEL), 프라이머 34와 33(Ang57DEL), 및, 프라이머 35와 36(Ang112DEL)의 세트로, PCR에 의해 유전자 단편을 증폭했다. 전술한 아스페르길루스·오리제 RIB40 게주와 동일하게 취득한 각 플라스미드를 주형으로 하여, 프라이머 37과 38의 세트를 이용하여, PCR에 의해 증폭된 유전자 단편을 각각 아미노산 결손 카세트 AsXDEL 카세트(X=3, 18, 26, 57, 112)로 했다. PCR 산물 50 μl는 에탄올 침전 처리하여 멸균수 10 μl에 용해시켰다.

[0279] AngXDEL 카세트를 도입하여 FGSCA1179 주를 형질 전환했다. 형질 전환주는 Cz-DOX 한천 배지에 점식에 의해 3회 옮겨 심어 순화했다.

[0280] (2) 분생자 PCR

[0281] 카세트 도입 위치에 대해서, 프라이머 26과 29를 이용하여, 밴드의 크기에 의해 확인했다. 또한, 이 PCR 산물을 정제하여 시퀀스 해석을 행하여, 아미노산 결손을 확인했다.

[0282] (3) 아미노산 결손주의 ERG 생산량의 확인

[0283] 실시예 2 (3)에 기재된 아스페르길루스·오리제 RIB40 주와 동일하게 행하여, 아미노산 결손주의 ERG 생산량을 확인했다(도 7의 (D)).

[0284] 실시예 10: AO090005000664 유전자에서 발현되는 단백질의 구조 해석

[0285] SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/)의 호모로지 모델링 기능을 사용하여, AO090005000664 유전자에 대해서, PAAG_04735의 예측 입체 구조를 템플릿에 이용하여 입체 구조 예측을 행했다(도 8). 템플릿의 입체 구조로서는, AO090005000664와 상동성이 높은 유전자 중, 입체 구조가 밝혀진 것, 혹은, 예측 입체 구조가 공개된 것을 검색하여, 동일성 43%, *Paracoccidioides lutzii* 유래의 PAAG_04735의 예측 입체 구조를 선택했다. 또한, PAAG_04735의 예측 입체 구조는 Alpha Fold2에서 예측된 것이다. 현재, AO090005000664 유전자와 100% 동일성을 갖는 OAory_01008280의 예측 구조가 Alpha Fold Protein Structure Database(https://alphafold.com/)에서 공개되어 있지만, 호모로지 모델링한 예측 구조는, 이것과 유사했다. 또한, 호모로지 모델링 당시, OAory_01008280의 예측 구조는 공개되지 않았다.

[0286] 본 발명자들의 연구에 의해, AO090005000664 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에 있어서 427 위치~429 위치의 결실(3DEL), 427~444 위치의 결실(18DEL), 및 419 위치~444 위치(26DEL), 431 위치~475 위치(45DEL), 419 위치~475 위치(57DEL), 및 404 위치~515 위치(112DEL)를 각각 결실시켰다(도 7의 (A) 및 (C)). 또한 431 위치~475 위치는, 5개의 α 헬릭스로 구성되는 초이차 구조 도메인 중, 2 번째 α헬릭스 및 3 번째 헬릭스에 상당했다. 404 위치~515 위치는, 상기 초이차 구조 도메인의 전부에 상당했다.

[0287] 또한, AO090005000664 유전자와 98% 동일성을 갖는 오르소로그 유전자가 코딩하는 아미노산 서열에서 428 위치의 결실(1DEL), 427 위치~429 위치의 결실(3DEL), 427~440 위치의 결실(14DEL), 427~444 위치의 결실(18DEL), 및 419 위치에서 444 위치의 결실(26DEL)을 갖도록 개변된 유전자를 갖는 A. sojae에 있어서, 에르고티오네인 생산이 항진하는 것으로 나타났다(도 7의 (B)).

[0288] 또한, AO090005000664 유전자에 대하여, 67% 동일성만 갖는 An16g07990 유전자에서, 441 위치~443 위치의 결실(3DEL), 441 위치~458 위치의 결실(18DEL), 433 위치~458 위치의 결실(26DEL), 433 위치~489 위치의 결실(57DEL), 및 418 위치~529 위치의 결실(112DEL)을 갖도록 개변된 유전자를 갖는 A. niger에 있어서, 에르고티

오네인 생산이 항진하는 것으로 나타났다(도 7의 (D)).

[0289] AO090005000664 유전자 및 그 대응하는 유전자에 대해서, G428 위치를 포함하는 W404~Q515에 포함되는 초이차 구조 도메인의 기능은 여전히 불명확하지만, 상기 초이차 구조 도메인의 기능을 적어도 부분적으로 저해함으로써, 에르고티오네인 생산성을 높일 수 있는 것으로 나타났다. 또한, AO090005000664 유전자에 있어서의 위치가 언급되어 있으며, 유전자가 상이하면 그 대응하는 위치가 상이한 것은 당업자라면 충분히 이해할 수 있다.

[0290]

도면

도면1

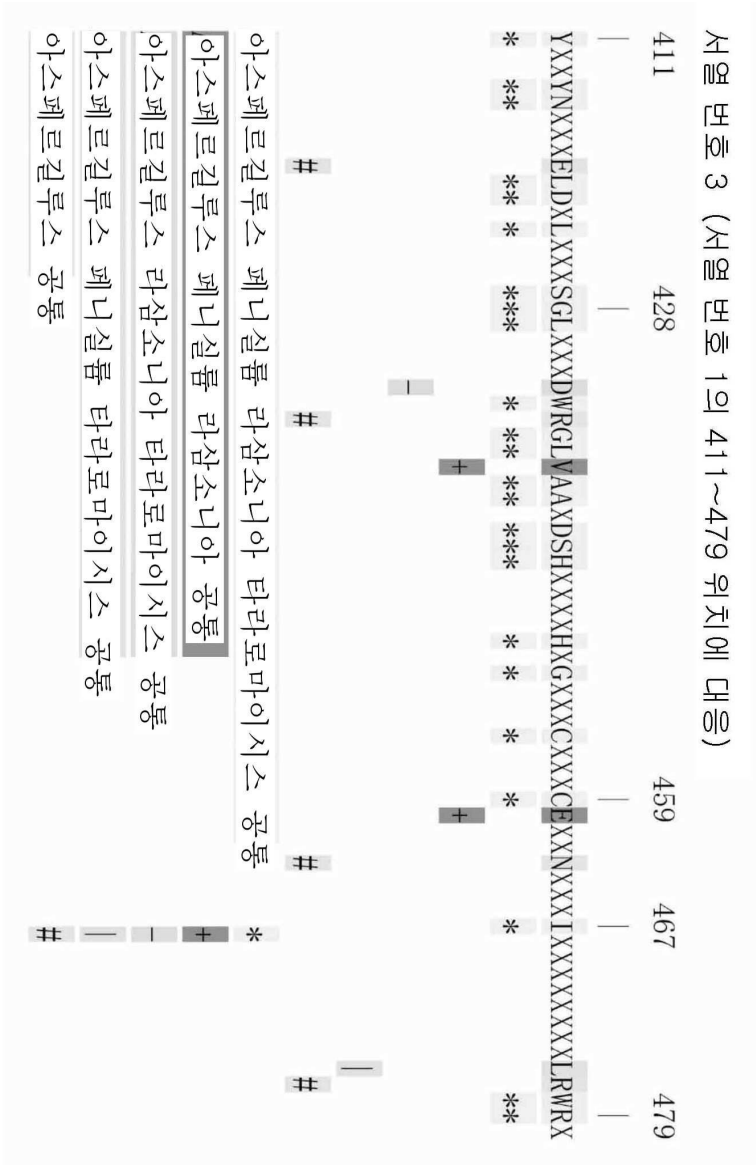
(A) AO090005000664 아미노산 서열 (서열 번호 1)

MTSSASHHQHSSTSAAEFSTHQTAPSSNIDPNGNIATSGYAPNESQLAGLVEAATAAAGQDVSEWAAAAAVAAAAGA
AGHQHHLDGYPPDIHIEDDSFADAGFGTGLSTGRQLRAPGPSPNEHSQPSGLSRTVSKKRKRDGPLDPALTASGPGG
HQQPHQHNSHHYGGETLDIRSAPPQSLSEARAVGLHSAAALFRQPSSNKKYTRPPMSKLFASLELSPENFLHLQAAA
KSYMLDDKHPERRECVGQRGKGDTEMVKLRLWNCVRHFLEIEGHGERFFGENVVNEGMGPRTYVWPRDQQKIIALVI
PLLRRMVTNERQRQYAVETRKGGGSEERRRRKTEDSLQNMNSASPPKFPVEEQLQMHAQHHPPEGYAPTHPELGATS
QDMELGLTDLLPDGYPADWNAISKTYEAYNQNYELDNLWYLSGLQQPDWRGLVAAVDSHYQVFHNGSFDCPAPCEDE
NINHILHANSVSGLRWRVGGDRHQVARNEFASSITRDVSRIIRDNIATKHGVQTSTDDHAPIHPSNFPPLPTGLTMP
NPPTTSQAPISLRINIMQNGKRVLPRVDLPAGHCPDLETLKQLLCRRFAGQLPGLPSDPSLDPAAWMSSVGWRFRVW
LPEGLTPVQNDGEWTIALLSAGNVDWMDGDLRVLVELENTS

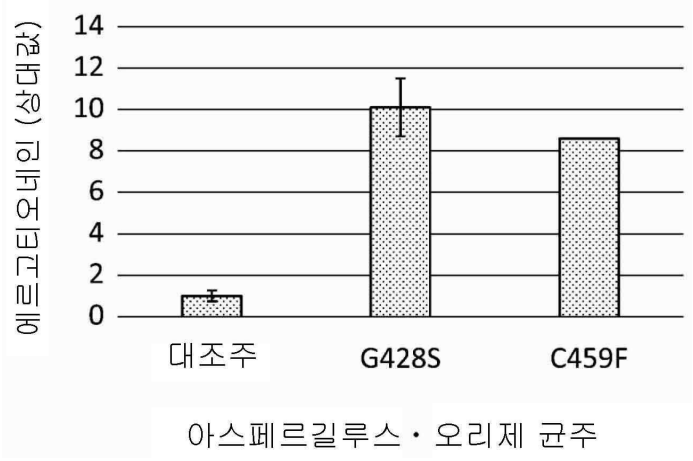
(B) AO090005000664 염기 서열 (서열 번호 2)

ATGACGTCTTCTGCTTCCCATCACCAACATTCTTCGACTTCAGCCGCTGAATTTTCCACTCACCAAACCGCTCCTTC
CTCCAACATCGACCCGAACGGTAACATTGCCACGAGTGGATATGCGCCAAATGAAAGCCAACTTGCTGGGCTGGTAG
AAGCTGCTACTGCAGCGGCTGGCCAGGATGTATCGGAATGGGCGGCCGCCGCTGCAGTCGCTGCTGCAGCTGGTGCT
GCCGGACATCAGCATCATTTAGACGGCTACCCCCCGGATATTCATATCGAAGACGATAGTTTTGCAGATGCAGGTTT
TGGGACAGGGTTGAGCACTGGAAGACAGTTACGAGCACCCGGGCCATCTCCCAACGAGCATAGCCAGCCTTCGGGAC
TGTCAAGAACTGTGTCAAAGAAGAGAAAGAGAGATGGCCCTCTAGACCCAGCCTTAACAGCGTCTGGACCTGGTGGT
CACCAGCAGCCCCATCAGCACAATTCTCATCATTATGGTGGTGAGACGCTAGATATCCGGTCTGCACCTCCCCAGTC
CTTATCGGAGGCGCGCGCTGTTGGTTTACATTCCGCAGCTGCTTTGTTCCGTCAACCCTCGAGCAACAAGAAGTACA
CACGACCACCTATGTCGAAGCTTTTTGCTTCACTCGAACTATCACCGGAGAACTTCCTCCACTTACAAGCCGCTGCT
AAGTCATATATGCTAGATGACAAGCATCCAGAACGACGTGAGTGTGTCGGTCAACGTGGCAAGGGAGACACGGAAAT
GGTTAAACTGAGACTTTGGAATTGTGTGCGCCACTTTCTCGAAATTGAGGGGCATGGTGAACGTTTTTTCGGTGAAA
ATGTAGTCAACGAGGGCATGGGTCCCAGGACCTATGTATGGCCCCGGGACCAGCAAAAAATTATTGCACTTGTCATT
CCACTGCTACGGCGTATGGTCACCAATGAACGACAGAGACAATATGCAGTGGAGACGAGGAAGGGGGGTGGATCTGA
GGAGCGACGACGACGGAAAACCGAAGACAGTCTCCAGAATATGAATAGTGCTAGTCCTCCGAAGTTCCCCGTTGAGG
AACAACTCCAGATGCATGCGCAACATCATCCTCCCGAGGGGTATGCGCCAACACACCCCGAGTTGGGGGCAACTTCC
CAAGACATGGAGTTGGGCCTGACAGATCTCCTTCCTGACGGCTATCCAGCTGACTGGAATGCTATCTCTAAAACATA
CGAAGCCTACAATCAAAACTACGAGCTCGATAACCTGTGGTATCTCTCGGGCCTACAACAGCCGGATTGGCGTGGGT
TAGTAGCTGCTGTTGACAGCCATTACCAGGTCTTTCACAACGGTAGTTTTGACTGCCCAGCACCATGTGAGGATGAG
AATATCAACCATATCTTACACGCAAACTCTGTGTCGGGTTTACGGTGGAGAGTTGGTGGGGATCGCCATCAAGTTGC
CAGGAATGAGTTGTATGTTGCCACACTCCCTTGCCCACTTTCCTTGGTATGTGACATGAAACTAACTCCTTTATAGT
GCAAGCAGCATCACCCGCGACGTTTCTCGCATTATCCGTGATAATATCGCCACGAAGCATGGCGTTCAAACGTCAAC
CGACGACCACGCTCCCATCCATCCATCAAATTTCCCGCCCCTCCCAACGGGTCTAACTATGCCAAACCCGCCCACAA
CCTCTCAAGCGCCAATATCTTTGCGAATTAATATCATGCAGAACGGGAAACGTGTCCTTCCGCGAGTAGATCTTCCT
GCAGGACACTGTCCCGATCTTGAGACTCTGAAACAGCTACTCTGCCGTCGATTCGCGGGCCAGTTGCCAGGTCTGCC
CTCTGACCCTTCGCTGGACCCTGCAGCCTGGATGTCTTCGGTTGGCTGGAGGTTTAGAGTCTGGTTGCCCGAGGGCC
TGACTCCTGTCCAGAATGACGGCGAGTGGACGATCGCACTGCTTTCTGCCGGGAACGTAGACTGGATGGACGGTGAT
CTACGAGTTCTTGTAGAGCTGGAGAACACCTCTTAG

도면2

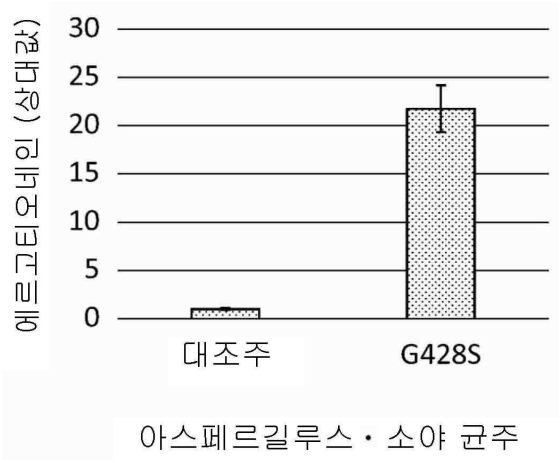


도면3



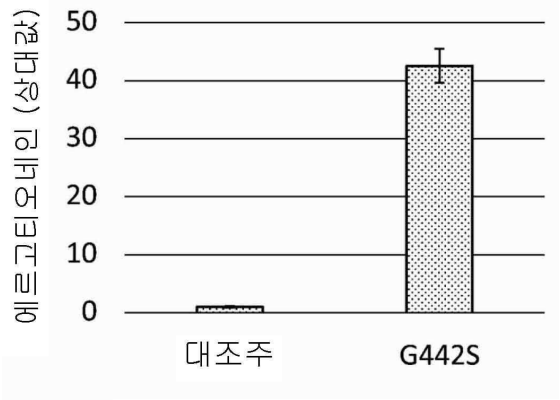
아스페르길루스・오리제 균주

도면4



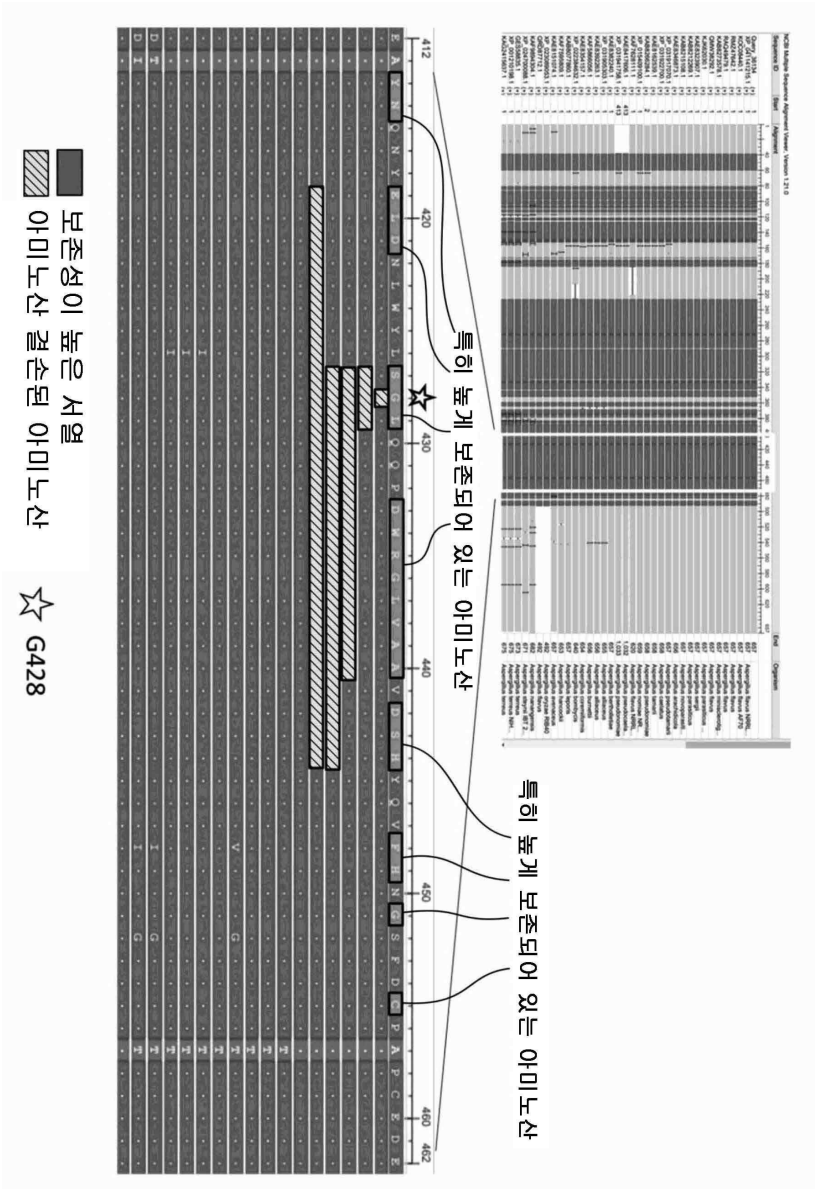
아스페르길루스・소야 균주

도면5

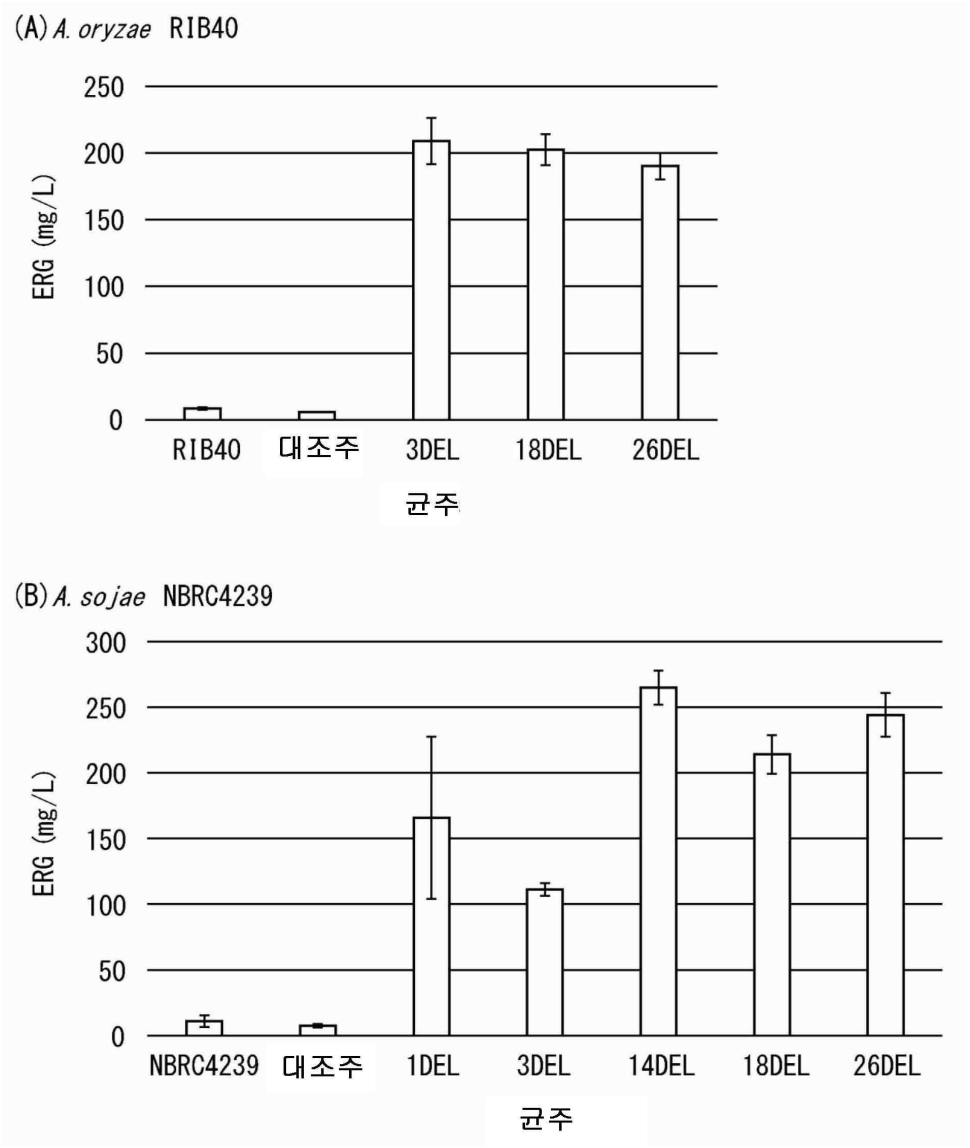


아스페르길루스・니거 균주

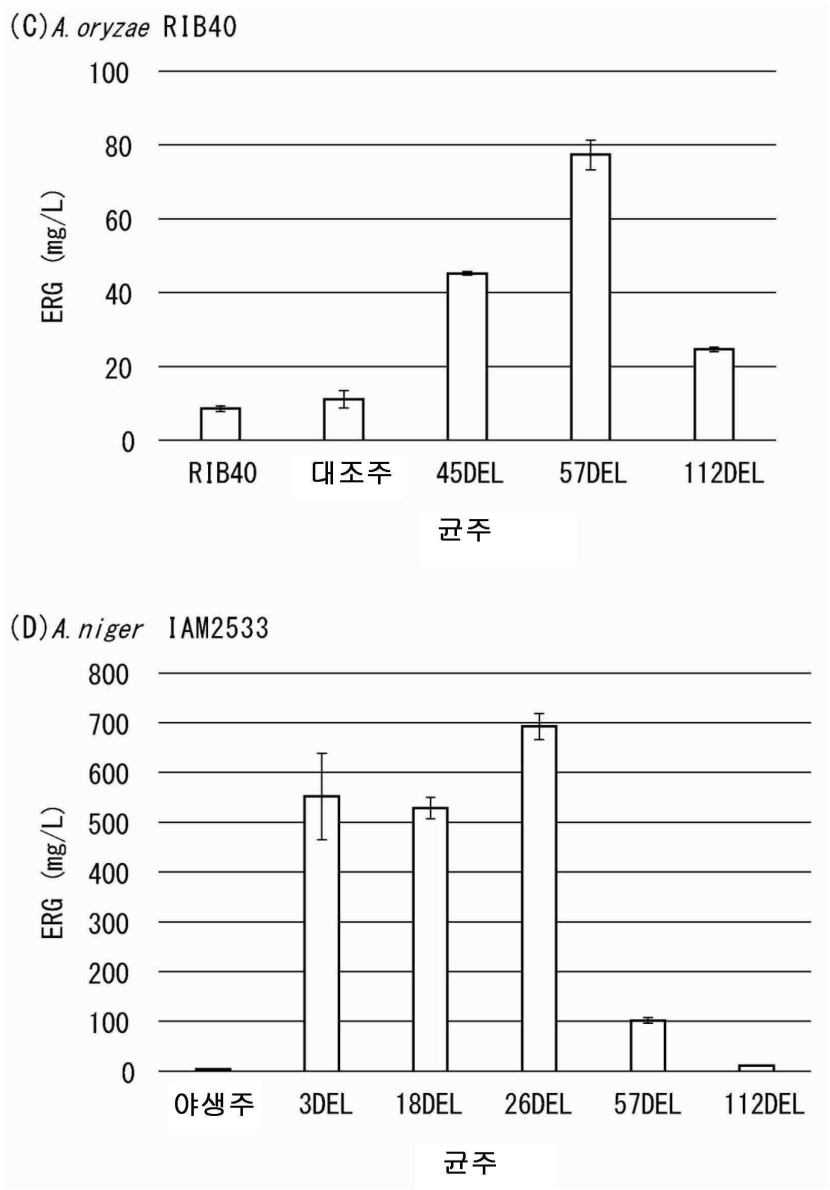
도면6


보존성이 높은 서열
아미노산 결손된 아미노산
G428
특히 높게 보존되어 있는 아미노산
특히 높게 보존되어 있는 아미노산

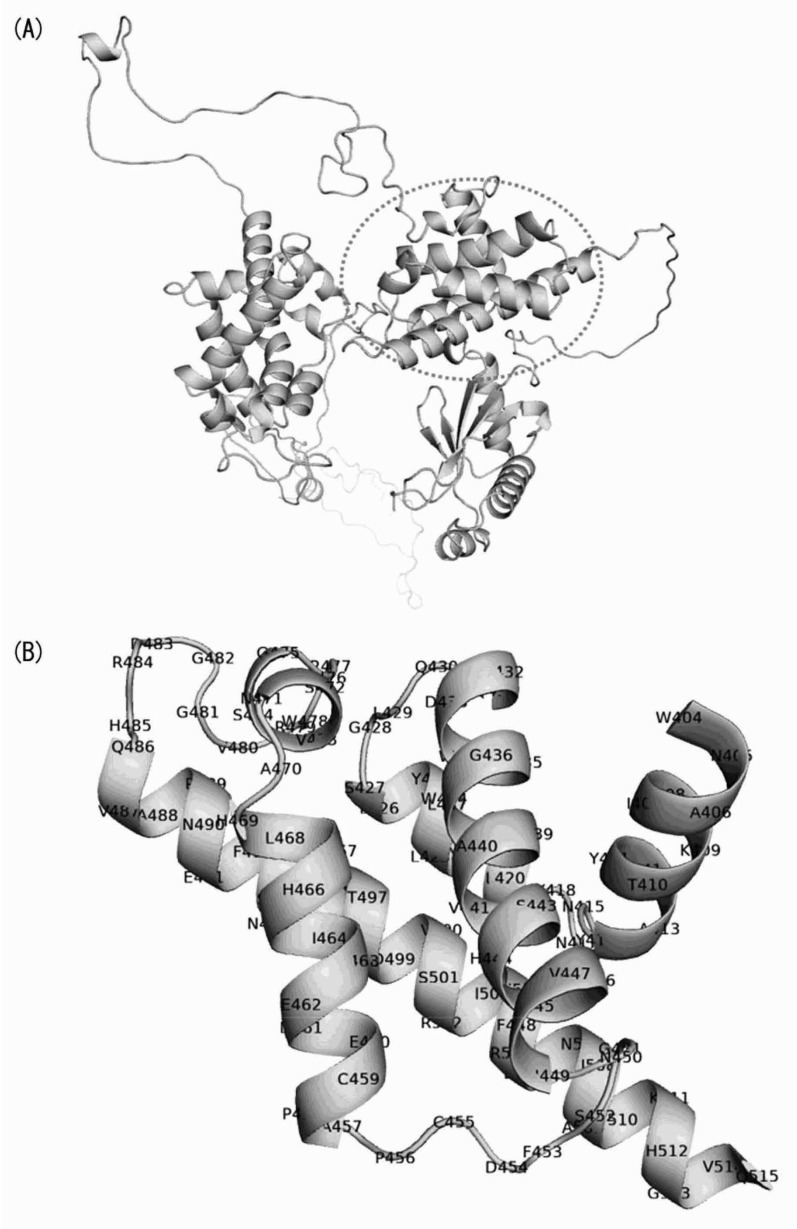
도면7a


(A) A. oryzae RIB40
ERG (mg/L)
250
200
150
100
50
0
RIB40
대조주
3DEL
18DEL
26DEL
균주
(B) A. sojae NBRC4239
ERG (mg/L)
300
250
200
150
100
50
0
NBRC4239
대조주
1DEL
3DEL
14DEL
18DEL
26DEL
균주

도면7b


(C)A. oryzae RIB40
100
80
60
40
20
0
ERG (mg/L)
RIB40
대조주
45DEL
57DEL
112DEL
균주
(D)A. niger IAM2533
800
700
600
500
400
300
200
100
0
ERG (mg/L)
야생주
3DEL
18DEL
26DEL
57DEL
112DEL
균주

도면8


(A)
(B)
R484
G482
G481
H485
Q486
V480
A470
G428
L429
Q430
G436
W404
A406
T410
A440
L468
H466
T497
I464
S501
E462
C459
C455
P456
F453
H512
V447
F448
N450
S453
A310
D454
N490
A488
V480

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.