



등록특허 10-2590888



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월18일
(11) 등록번호 10-2590888
(24) 등록일자 2023년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12P 19/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/1205 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0070803
(22) 출원일자 2021년06월01일
심사청구일자 2021년06월01일
(65) 공개번호 10-2022-0162390
(43) 공개일자 2022년12월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180074550 A
Biochemistry, 2001, vol. 40, no. 13, pp.
3938-3942.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이동우
대구광역시 북구 대현로10길 82 (대현동, 대현 e-편한세상) 104동 303호
주윤희
서울특별시 서대문구 연희로10길 29-5 (연희동) 404호
성재윤
서울특별시 서대문구 신촌로9길 53-9 402호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 11 항

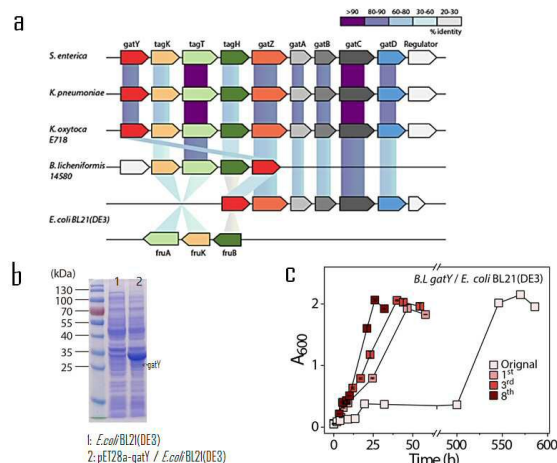
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 회귀당 비대사성 균주의 회귀당 자화능 결정 유전자군 제공방법

(57) 요약

본 발명은 회귀당 비대사성 균주의 회귀당 자화능 결정 유전자군 제공방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 발현 카세트, 이를 포함하는 벡터를 통해 새로운 당 대사경로를 구축할 수 있고, 이를 통해 형질 전환된 돌연변이 또는 변이된 유전자를 포함하는 돌연변이 균주는 새로운 당 대사경로가 구축되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 19/24 (2013.01)

C12Y 207/01056 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021662
과제번호	918012043SB020
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
연구과제명	농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술

개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134244
과제번호	2021M3A9I4021431
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	컬처로믹스 기반 마이크로바이옴 생태 시스템 분석 및 활용 플랫폼 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 39번째 알라닌 (A)이 세린 (S)으로 치환된 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자는 서열번호 2인 발현 카세트.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 발현 카세트는 cra 결합부위가 결손된 발현 카세트.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 cra 결합부위의 결손은 상기 발현 카세트에서 서열번호 3의 서열을 포함하지 않음으로 이루어진 것인 발현 카세트.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 발현 카세트는 lacI 를 암호화 하는 서열 및 T7 RNAP 를 암호화 하는 서열 사이의 돌연변이 서열로서 서열번호 4의 서열을 더 포함하는 발현 카세트.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 9

제 8항의 재조합 벡터로 형질 전환된 돌연변이 균주.

청구항 10

서열번호 1의 아미노산 서열에서 39번째 알라닌 (A)이 세린(S)으로 치환된 신규한 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화하는 유전자인 서열번호 2의 유전자 서열을 포함하는 돌연변이 균주에 있어서,

- 1) cra 결합부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손; 및
- 2) 서열번호 4의 유전자 돌연변이 서열 중 어느 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 돌연변이 균주.

청구항 11

제 9항 또는 제10항에 있어서,

상기 재조합 균주는 대장균인 돌연변이 균주.

청구항 12

제 9항 또는 제 10항에 있어서,

상기 재조합 균주는 D-타가토스 대사능을 갖는 돌연변이 균주.

청구항 13

제9항 또는 제10항의 돌연변이 균주를 D-타가토스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 를 포함하는 D-타가토스 대사능을 갖는 균주를 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 희귀당 비대사성 균주의 희귀당 자화능 결정 유전자군 제공방법 에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] D-타가토스는 D-갈락토오스의 이성질체이며 과일, 우유, 치즈 등에 존재하는 천연 당류이다. D-타가토스는 다양한 건강 기능적 특성과 설탕과 매우 유사한 단맛을 가지고 있기 때문에 여러 제품 적용 시 건강과 맛을 동시에 만족시킬 수 있는 대체 감미료로 사용된다.

[0004] 한편, 일반적으로 효소의 활성 및 구조적 안정성을 증진시키거나 새로운 기질에 대한 활성을 부여하는 등 원하는 목적에 부합하도록 효소의 특성을 변환시키는 개량기술로 분자진화 (directed evolution) 기술이 사용되고 있다. 이러한 기술을 수행하기 위한 변이주 라이브러리를 제조하기 위해 가장 일반적인 방법으로 많이 사용되는 것은 error-prone PCR 방법으로 PCR 수행시 DNA 중합효소의 에러발생율을 조절하여 무작위적으로 돌연변이를 도입하는 방법이다. 이렇게 만들어진 변이주들을 이용하여 단백질을 발현시킨 후, 활성이 좋은 변이주를 선별함으로써 우수한 활성을 갖는 개량 효소를 수득하게 되는데 원하는 효소의 특징과 목적에 맞는 효율적인 스크리닝 기술을 개발하는 것이 분자진화의 핵심기술이라 할 수 있다.

[0005] 대한민국 공개특허 제10-2018-0074550호에서는 균주에 타 균주 유래의 효소를 도입하여 변형된 당 대사 경로를 갖는 재조합 균주 및 이를 통해 D-타가토스를 수득하는 가능성을 개시하고 있으나, 최근 원자재 값의 상승으로 인해 수익률이 떨어지게 되어, 신규한 대사경로를 통해 D-타가토스를 수득할 수 있는 균주의 개발 필요성이 높아지고 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 연구를 통해 변형된 당 대사 경로를 갖는 돌연변이 균주 및 이의 용도를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. KR 10-2018-0074550 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 39번째 알라닌 (A)이 세린 (S)으로 치환된 신규한 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자를 포함하는, 발현 카세트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 돌연변이 균주를 제공하는 것을 목적으로 하고 이를 통해 D-타가토스 비대사성 균주에서 D-타가토스 대사능을 가진 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 일 양상은 1) 서열번호 2의 신규한 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 서열; 2) cra 결합부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손; 및 3) 서열번호 4의 유전자 서열 중 어느 하나 이상의 유전자 서열을 포함하는 돌연변이 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 돌연변이 균주를 D-타가토스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 를 포함하는 D-타가토스 대사능을 갖는 균주를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 39번째 알라닌 (A)이 세린 (S)으로 치환된 신규한 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자를 포함하는, 발현 카세트를 제공한다.

[0016] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 야생형 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제(fruK)의 아미노산 서열을 의미하고, 본 발명에서는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 39번째 알라닌 (A)이 세린 (S)으로 치환된 신규한 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제를 통해 D-프룩토오스 대신 D-타가토스를 대사할 수 있게 된다.

[0017] 상기 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제(fruK)는 1-포스포프룩토키나아제로도 불리는 체내 효소로서 생체내 (in vivo)에서 프룩토오스-1-포스페이트 및 ATP를 프룩토오스-1,6-디포스페이트 및 ADP로 변환시키는 기능을 한다.

[0018] 본 발명의 일 구체예로, 상기 프룩토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자는 서열번호 2인 것일 수 있다.

표 1

서열명	Sequence
E.coli BL21(DE3) FruK WT amino acid sequence (서열번호 1)	MSRRVATITLNPAYDLVGFCEIERGEVNLVKTTLGLHAAGKGINVAKVLKDLGIDVTVGGFGLGKDNQDGFQQLFSELGIAN RFQVVQGRTRINVKLTEKDGEVTDNFNSGFEVTPADWERFVTDLSWLGGQFDMVCVSGSLPSGVSPEAFTDWMTRLRSQCP CIIFDSSREALVAGLKAAPWLKPNRRELEIWAGRKLPEMKDVEAAHALREQGIAHVVISLGAEGALWVNASGEWIAKPP SVDVVSTVGAGDSMVGGLIYGLLMRESSEHTLRLATAVAALAVSQSNVGITDRPQLAAMMARVDLQPFN
E.coli BL21(DE3) FruK A39S mutant amino acid sequence	MSRRVATITLNPAYDLVGFCEIERGEVNLVKTTLGLHASGKGINVAKVLKDLGIDVTVGGFGLGKDNQDGFQQLFSELGIAN RFQVVQGRTRINVKLTEKDGEVTDNFNSGFEVTPADWERFVTDLSWLGGQFDMVCVSGSLPSGVSPEAFTDWMTRLRSQCP CIIFDSSREALVAGLKAAPWLKPNRRELEIWAGRKLPEMKDVEAAHALREQGIAHVVISLGAEGALWVNASGEWIAKPP SVDVVSTVGAGDSMVGGLIYGLLMRESSEHTLRLATAVAALAVSQSNVGITDRPQLAAMMARVDLQPFN

FruK nucleotide sequence	wt	ATGAGCAGAC GTGTTGCTACTATCACCCCTTAATCCGGCTTATGACCTTGTGGTTTCTG CCCGAAATTGAACGCGGCGAA GTGAACCTGGTGAACACACCGGTCTGCATGCG CGGGTAAAGGCATCAACGTGGCCAAAGTATTAAAGACCTGGGAATT GATGTCACCGTTGGCGGCTTCTCGGTAAGACAATCAGGATGGTTTTCAGCAACTGTTACGCGAGCTGGGCATTGCCAAC CGTTTCCAGGTTGTACAGGGCGCACTCGAATTAAACGTTAAGCTGACGGAAAAAGACGGCGAAGTGACCGACTTCAACTTC TCGGGTTTTGAAGTCACCCCGCGGACTGGGAACGCTTTGTGACTGATTCTCTGAGCTGGCTCGGTCAAGTTCGATATGGTC TGTGTCAGCGGAAGCTTACCGTCAGGCGTCAGCCCGGAAGCGTTACCGACTGGATGACTCGCTGCGTAGTCAGTGTCTT TGCATTATCTTTGATAGTAGCCGTGAAGCGTTAGTAGCAGGTTTGAAGCGGCACCGTGGCTGGTGAAACCTAACCGCCGC GAGCTGGAATCTGGGCGAGCGCTAACTGCCTGAAATGAAAGATGTGATTGAAGCTGCGCATGCGCTGCGTGAAACAAGGT ATCGCGCATGTTGTTATTTACTGGGTGCCGAAGGCGCGCTTTGGGTTAATGCCTCCGCGAATGGATCGCCAAACCACCG TCAGTCGATGTCGTAAGCACCGTTGGCGCAGGGGATTCTATGGTTGGTGGCCTGATTTATGGCTTGCTGATGCGTGAATCC AGTGAACACACACTGCGTCTGGCGACAGCTGTTGCAGCCCTGGCGGTAAGTCAAAGCAATGTGGGTATTACCGATCGTCCG CAGT TGGCCGCAATGATGGCGCGCTCGACTTACAACCTTTTAACTGA
mutant FruK A39S nucleotide sequence(서열번호 2)		ATGAGCAGAC GTGTTGCTACTATCACCCCTTAATCCGGCTTATGACCTTGTGGTTTCTG CCCGAAATTGAACGCGGCGAA GTGAACCTGGTGAACACACCGGTCTGCATGCG TCGGGTAAAGGCATCAACGTGGCCAAAGTATTAAAGACCTGGGAATT GATGTCACCGTTGGCGGCTTCTCGGTAAGACAATCAGGATGGTTTTCAGCAACTGTTACGCGAGCTGGGCATTGCCAAC CGTTTCCAGGTTGTACAGGGCGCACTCGAATTAAACGTTAAGCTGACGGAAAAAGACGGCGAAGTGACCGACTTCAACTTC TCGGGTTTTGAAGTCACCCCGCGGACTGGGAACGCTTTGTGACTGATTCTCTGAGCTGGCTCGGTCAAGTTCGATATGGTC TGTGTCAGCGGAAGCTTACCGTCAGGCGTCAGCCCGGAAGCGTTACCGACTGGATGACTCGCTGCGTAGTCAGTGTCTT TGCATTATCTTTGATAGTAGCCGTGAAGCGTTAGTAGCAGGTTTGAAGCGGCACCGTGGCTGGTGAAACCTAACCGCCGC GAGCTGGAATCTGGGCGAGCGCTAACTGCCTGAAATGAAAGATGTGATTGAAGCTGCGCATGCGCTGCGTGAAACAAGGT ATCGCGCATGTTGTTATTTACTGGGTGCCGAAGGCGCGCTTTGGGTTAATGCCTCCGCGAATGGATCGCCAAACCACCG TCAGTCGATGTCGTAAGCACCGTTGGCGCAGGGGATTCTATGGTTGGTGGCCTGATTTATGGCTTGCTGATGCGTGAATCC AGTGAACACACACTGCGTCTGGCGACAGCTGTTGCAGCCCTGGCGGTAAGTCAAAGCAATGTGGGTATTACCGATCGTCCG CAGT TGGCCGCAATGATGGCGCGCTCGACTTACAACCTTTTAACTGA

[0021] 본 발명의 일 구체예로, 상기 발현 카세트는 cra 결합부위가 결손된 것일 수 있고, 상기 cra 결합부위의 결손은 상기 발현 카세트에서 서열번호 3의 서열을 포함하지 않음으로 이루어진 것일 수 있다.

표 2

서열명	Sequence
Cra binding site deleted nucleotide sequence(서열번호 3)	Tgaaacgatt cagcctctat gagaataaaaaa gcgccaacct ggcttagggg taaagacaag atcgcg

[0024] 상기 cra (catabolite repressor/activator)는 상기 프록토오스-1-포스페이트 및 프록토오스-1,6-바이포스페이트에 의해 유도되는 것으로, 발현 카세트 내 cra 결합 부위가 있는 경우 상기 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제의 유전자의 발현이 제한될 수 있으나, 이러한 결합 부위를 결손시킴으로써 상기 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제의 유전자의 발현량을 증가시킨다.

[0025] 본 발명의 일 구체예로, 상기 발현 카세트는 lacI 를 암호화 하는 서열 및 T7 RNAP 를 암호화 하는 서열 사이의 돌연변이 서열을 더 포함하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 상기 lacI 를 암호화 하는 서열 및 상기 T7 RNAP 를 암호화 하는 서열 사이의 돌연변이 서열은 T7 RNAP 코어 프로모터 영역 (T7 RNAP core promoter region) 일 수 있으며, 더욱 구체적으로 상기 lacI 를 암호화 하는 서열 및 상기 T7 RNAP 를 암호화 하는 서열 사이의 돌연변이 서열은 서열번호 4일 수 있다.

표 3

서열명	Sequence
Wt T7RNAP core promoter region	gcaaaccgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcacaggtttcccgactggaaagcgggcagtg agcgcaacgcaattaatgtaagttagctcactcatttaggcacccaggtttacactttatgcttccggctcgtat aat gt gt gga attgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacggattcactggccgtcgttttaciaa cgtcgtgactgggaaaaccctggcggttacccaactt
Mutated T7RNAP core promoter region(서열번호 4)	gcaaaccgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcacaggtttcccgactggaaagcgggcagtg agcgcaacgcaattaatgtaagttagctcactcatttaggcacccaggtttacactttatgcttccggctcgtat gt gt gt gga attgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacggattcactggccgtcgttttaciaa cgtcgtgactgggaaaaccctggcggttacccaactt

- [0028] 상기 lacI은 미생물에서 락토오스의 대사에 참여하는 단백질을 암호화 하는 유전자의 발현을 억제하는 DNA-결합 단백질인 lac repressor (LacI)를 암호화 하는 유전자를 의미한다.
- [0029] 상기 T7 RNAP는 5'→3' 방향으로 DNA로부터 RNA의 형성을 촉매하는 T7 박테리오파지로부터 유래된 RNA 폴리머라아제를 의미한다 (EC:2.7.7.).
- [0031] 본 발명의 일 양상은 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, "재조합 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, "작동가능하게 연결된"은 유전자 발현 조절 서열과 다른 뉴클레오티드 서열사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 유전자 발현 조절 서열은 복제원점(replication origin), 프로모터 및 전사 종결 서열(terminator) 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 전사 종결 서열은 폴리아데닐화 서열(pA)일 수 있으며, 복제 원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 또는 BBV 복제원점 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에 따른 재조합 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 재조합 발현벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 사용되는 플라스미드(예를 들어, pcDNA 시리즈, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pUC19 등), 파지(예를 들어, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1, M13 등) 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터 등) 등을 기본으로 하여 제작될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 재조합 벡터는 하나 이상의 선택성 마커를 더 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질주입된 세포를 비형질주입 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 예를 들어, 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 암피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 재조합 벡터의 제작은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 돌연변이 균주를 제공한다.
- [0039] 상기 재조합 벡터로 형질전환하는 방법은 당업계에 널리 알려진 삽입 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl2 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법, 열충격 및 유전자 발바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0040] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 1) 서열번호 2의 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 서열; 2) cra 결합부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손; 및 3) 서열번호 4의 유전자 돌연변이 서열 중 어느 하나 이상의 유전자 서열을 포함하는 돌연변이 균주를 제공한다.
- [0041] 상기 돌연변이 균주는 전술한 재조합 벡터로 형질 전환된 돌연변이 균주외에도 다양한 방법의 돌연변이를 통해 전술한 1) 서열번호 2의 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 돌연변이 서열; 2) cra 결합부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손; 및 3) 서열번호 4의 유전자 서열 중 어느 하나 이상의 유전자 돌연변이 서열을 포함하게 된 것일 수 있다.
- [0042] 상기 돌연변이 균주에 포함되는 유전자 서열은 1) 서열번호 2의 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 돌연변이 서열; 2) cra 결합부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손; 또는 3) 서열번호 4의 유전자 돌연변이 서열 중 어느 하나의 유전자 서열을 포함하는 것일 수 있고,
- [0043] 1) 서열번호 2의 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 돌연변이 서열; 및 2) cra 결

합부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손을 포함하거나, 1) 서열번호 2의 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 돌연변이 서열; 및 3) 서열번호 4의 유전자 돌연변이 서열을 포함하거나, 2) cra 결함부위인 서열번호 3의 유전자 서열의 결손; 및 3) 서열번호 4의 유전자 돌연변이 서열을 포함하는 것일 수 있으며,

[0044] 1) 서열번호 2의 신규한 프록토오스-1-포스페이트 키나아제를 암호화 하는 유전자 서열; 2) 서열번호 3의 cra 결함부위에서 서열번호 4의 서열이 결손된 유전자 서열; 및 3) 서열번호 4의 유전자 돌연변이 서열을 포함하는 것일 수도 있다.

[0045] 상기 돌연변이 균주의 숙주는 당업계에 공지된 어떠한 숙주를 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, SP2/O, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있고, 구체적으로 상기 돌연변이 균주의 숙주는 대장균일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구체예로 상기 돌연변이 균주는 D-타가토스 대사능을 가질 수 있다. 구체적으로, 상기 재조합 균주는 전술한 발현카세트 또는 돌연변이를 포함하고 있기 때문에 D-타가토스 대사능을 가질 수 있다. 상기 D-타가토스 대사능은 D-타가토스를 에너지원으로 활용하는 것을 의미한다.

[0048] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 돌연변이 균주를 D-타가토스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 를 포함하는 D-타가토스 대사능을 갖는 균주를 생산하는 방법을 제공한다.

[0049] 상기 배양하는 단계는 상기 돌연변이 균주를 D-타가토스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계로서, 상기 배지는 돌연변이 균주를 배양하기 위해 공지의 성분을 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 발현 카세트, 이를 포함하는 벡터를 통해 새로운 당 대사경로를 구축할 수 있고, 이를 통해 형질 전환된 돌연변이 균주 또는 변이된 유전자를 포함하는 돌연변이 균주는 새로운 당 대사경로가 구축되어있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 본 발명의 돌연변이 균주를 제조하는 과정을 나타낸 도면이다. 구체적으로 도 1a는 타가토스 이용이 가능한 네 균주 (*Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus licheniformis*)와 gene cluster와 E. coli를 비교한 것이고, 도 1b는 모균주 (E. coli BL12(DE3))와 제작한 돌연변이 균주 (pET28a-gatY/E. coli BL21(DE3))를 비교하여 돌연변이 부위를 확인한 것이고, 도 1c는 제작한 돌연변이 균주의 계대배양에 따른 성장속도를 확인한 그래프이다.

도 2는 돌연변이 균주의 활성을 확인한 것으로, 도 2a는 kinase WT과 돌연변이 균주의 활성을 비교한 결과이고, 도 2b는 돌연변이 균주의 세가지 당영양원 배지(Glc(글루코스), Fru(프록토스), Tag(타가토스))에서 유전자 발현 정도를 qRT-PCR을 통해 mRNA level 분석 결과이며, 도 2c는 돌연변이로 도입된 타가토스 대사 활성을 나타내는 그림이다.

도 3은 본 발명의 돌연변이 균주의 성장을 확인한 결과로, 도 3a는 fruK A39S, Cra 유전자 binding 부위가 삭제된 돌연변이 균주(2가지 부위가 돌연변이된 균주)의 성장곡선을 확인한 결과이고, 도 3b는 fruK A39S, Cra 유전자 binding 부위가 삭제되고, T7RNAP 코어 promoter 영역의 돌연변이 균주 (3가지 부위가 돌연변이된 균주)의 성장곡선 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 실시예 1: 타가토스 대사능을 가진 돌연변이 균주의 제조

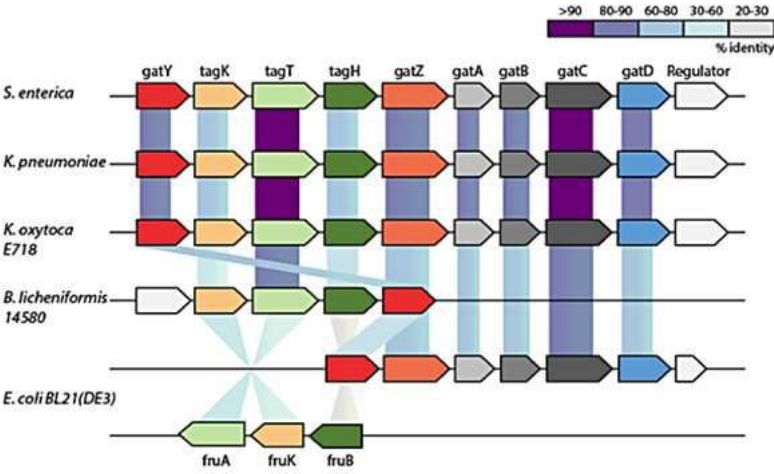
[0057] 실시예 1-1. 돌연변이 균주의 제조

- [0058] 타가토스 이용이 가능한 네 균주 (*Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus licheniformis*)와 gene cluster 비교를 통해 타가토스 비이용성 균주인 *E.coli*는 fructose operon (fruBKA포함)에 tagatose 1,6bp aldolase인 gatY 유전자가 결여되어있는 것을 확인하였다 (도 1a).
- [0059] *B.licheniformis* 유래 gatY 유전자를 *E.coli* 에 형질전환시킨 후 타가토스 배지에서 적응진화 시켰다. 약 500시간 후 성장하는 것을 확인, 연속적으로 계대배양해서 더 이상 성장속도가 증가하지않는 균주를 전장유전체 분석을 시행하여 돌연변이 부위(fruK, Cra binding site, T7RNAP promoter)를 확인하여 (도 1b, 도 1c) 돌연변이 균주를 제조하였다.
- [0061] **실험예 1: 돌연변이 균주의 활성 확인**
- [0062] 타가토스 이용성 획득 영향인자 확인을 위해 kinase WT과 돌연변이 균주의 활성을 비교한 결과, 돌연변이 균주의 경우 Fru-6p에 대해서는 활성이 감소하고 Tag-6p에 대해서는 활성이 증가한 것을 확인하였다 (도 2a).
- [0063] 적응진화를 유도한 전장유전체분석을 완료한 균주(3가지 부위가 돌연변이 유도된 균주)의 세가지 당영양원 배지 (Glc(글루코스), Fru(프록토스), Tag(타가토스))에서 유전자 발현 정도를 qRT-PCR을 통해 mRNA level 분석을 시행하였다. 그 결과, FruK A39S의 발현 정도가 다른 배지에서보다 타가토스에서 증가하는 것을 확인하였고 (도 2b), 이를 통해 타가토스 대사회로의 활성이 있음을 예측하였다 (도 2c).
- [0065] **실험예 2: 돌연변이 균주의 성장 확인**
- [0066] fruK A39S, Cra 유전자 binding 부위가 결손된 돌연변이 균주(2가지 부위가 돌연변이된 균주)의 성장곡선을 확인한 결과, 타가토스를 영양원으로 사용하였을 때 성장이 우수한 것을 확인할 수 있었다 (도 3a).
- [0067] 또한, fruK A39S, Cra 유전자 binding 부위가 결손되고, T7RNAP promoter 부위의 돌연변이 균주 (3가지 부위가 돌연변이된 균주)의 성장곡선 확인한 결과, 타가토스를 영양원으로 사용하였을 때 성장이 우수한 것을 확인할 수 있었다 (도 3b).
- [0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

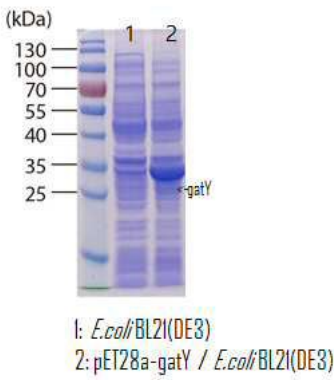
도면

도면1

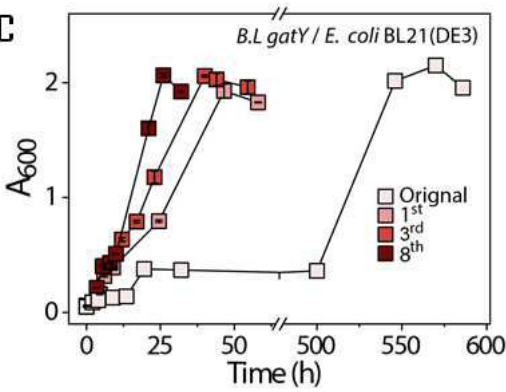
a



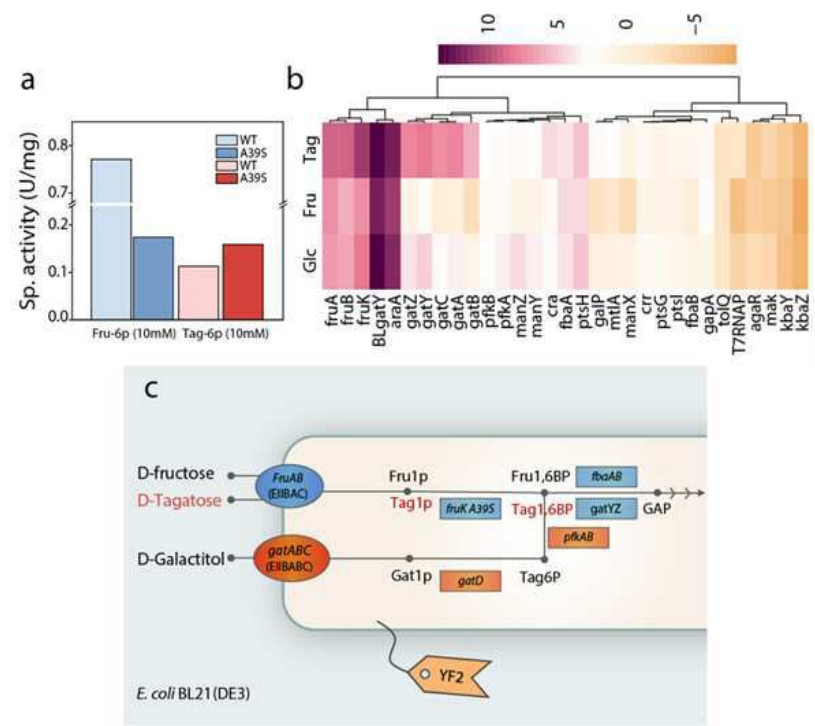
b



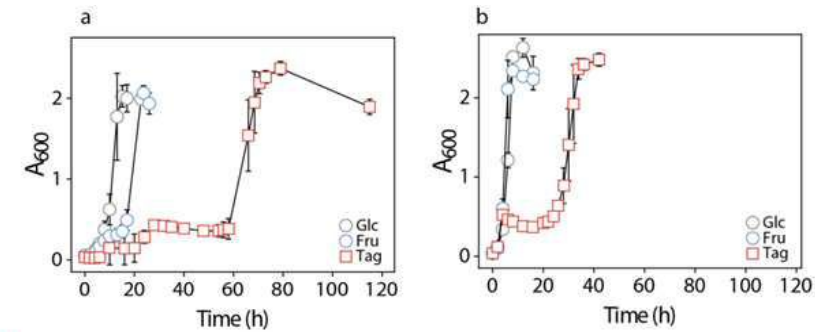
c



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> a method for providing determination gene group for rare sugar metabolizing ability for rare sugar non-metabolizable strain
- <130> PN200407
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 312
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> E.coli BL21(DE3) FruK WT amino acid sequence

<400> 1

Met Ser Arg Arg Val Ala Thr Ile Thr Leu Asn Pro Ala Tyr Asp Leu
1 5 10 15

Val Gly Phe Cys Pro Glu Ile Glu Arg Gly Glu Val Asn Leu Val Lys
20 25 30

Thr Thr Gly Leu His Ala Ala Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala Lys Val
35 40 45

Leu Lys Asp Leu Gly Ile Asp Val Thr Val Gly Gly Phe Leu Gly Lys
50 55 60

Asp Asn Gln Asp Gly Phe Gln Gln Leu Phe Ser Glu Leu Gly Ile Ala
65 70 75 80

Asn Arg Phe Gln Val Val Gln Gly Arg Thr Arg Ile Asn Val Lys Leu

85 90 95

Thr Glu Lys Asp Gly Glu Val Thr Asp Phe Asn Phe Ser Gly Phe Glu
100 105 110

Val Thr Pro Ala Asp Trp Glu Arg Phe Val Thr Asp Ser Leu Ser Trp
115 120 125

Leu Gly Gln Phe Asp Met Val Cys Val Ser Gly Ser Leu Pro Ser Gly
130 135 140

Val Ser Pro Glu Ala Phe Thr Asp Trp Met Thr Arg Leu Arg Ser Gln
145 150 155 160

Cys Pro Cys Ile Ile Phe Asp Ser Ser Arg Glu Ala Leu Val Ala Gly
165 170 175

Leu Lys Ala Ala Pro Trp Leu Val Lys Pro Asn Arg Arg Glu Leu Glu
180 185 190

Ile Trp Ala Gly Arg Lys Leu Pro Glu Met Lys Asp Val Ile Glu Ala
195 200 205

Ala His Ala Leu Arg Glu Gln Gly Ile Ala His Val Val Ile Ser Leu
210 215 220

Gly Ala Glu Gly Ala Leu Trp Val Asn Ala Ser Gly Glu Trp Ile Ala

225 230 235 240
 Lys Pro Pro Ser Val Asp Val Val Ser Thr Val Gly Ala Gly Asp Ser
 245 250 255
 Met Val Gly Gly Leu Ile Tyr Gly Leu Leu Met Arg Glu Ser Ser Glu
 260 265 270
 His Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ala Val Ala Ala Leu Ala Val Ser Gln
 275 280 285
 Ser Asn Val Gly Ile Thr Asp Arg Pro Gln Leu Ala Ala Met Met Ala
 290 295 300

Arg Val Asp Leu Gln Pro Phe Asn

305 310

<210> 2

<211> 939

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant FruK A39S nucleotide sequence

<400> 2

atgagcagac gtgttgctac tatcacccctt aatccggctt atgaccttgt tggtttctgc	60
ccggaaattg aacgcggcga agtgaacctg gtgaaaacca ccggtctgca tgcgtcgggt	120
aaaggcatca acgtggccaa agtattaaaa gacctgggaa ttgatgtcac cgttggcggc	180
ttcctcggta aagacaatca ggatggtttt cagcaactgt tcagcgagct gggcattgcc	240
aaccgtttcc aggttgtaga ggggcgcact cgaattaacg ttaagctgac ggaaaaagac	300
ggcgaagtga ccgacttcaa ctctcgggt tttgaagtca cccccgccga ctgggaacgc	360
tttgtgactg attctctgag ctggctcgggt cagttcgata tggctctgtgt cagcgggaagc	420
ttaccgtcag gcgtcagccc ggaagcggtt accgactgga tgactgcct gcgtagttag	480
tgctcttgca ttatctttga tagtagccgt gaagcgtag tagcaggttt gaaagcggca	540
ccgtggctgg tgaaacctaa ccgccgcgag ctggaaatct gggcaggccg taaactgcct	600
gaaatgaaag atgtgattga agctcgcgat gcgctgcgtg aacaaggtat cgcgcattgt	660
gttatttcac tgggtgccga aggcgcgctt tgggttaatg cctccggcga atggatcgcc	720
aaaccaccgt cagtcgatgt ctgaagcacc gttggcgag gggattctat ggttggtggc	780
ctgatttatg gcttctgat gcgtgaatcc agtgaacaca cactgcgtct ggcgacagct	840
gttcagccc tggcggtgaa tcaaagcaat gtgggtatta ccgacgtcc gcagttggcc	900

gcaatgatgg cgcgcgtcga cttacaacct tttactga 939

<210> 3

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cra binding site deleted nucleotide sequence

<400> 3

tgaaacgatt cagcctctat gagaaaaaaa gcgccaacct ggcttagggt taaagacaag 60

atcgcgc 67

<210> 4

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated T7RNAP core promoter region

<400> 4

gcaaaccgcc tctccccgcg cggtggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc 60

ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt aagttagctc actcattagg 120

caccccaggc ttacacttt atgcttcggg ctggtatggt gtgtgaaatt gtgagcggat 180

aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgg attcactggc cgtcgtttta 240

caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggt acccaactt 279