



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0168151  
(43) 공개일자 2022년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/533 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)  
C12Q 1/6827 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/533 (2013.01)  
C12N 9/90 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-0067643  
(22) 출원일자 2022년06월02일  
심사청구일자 2022년06월02일  
(30) 우선권주장  
1020210076938 2021년06월14일 대한민국(KR)

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

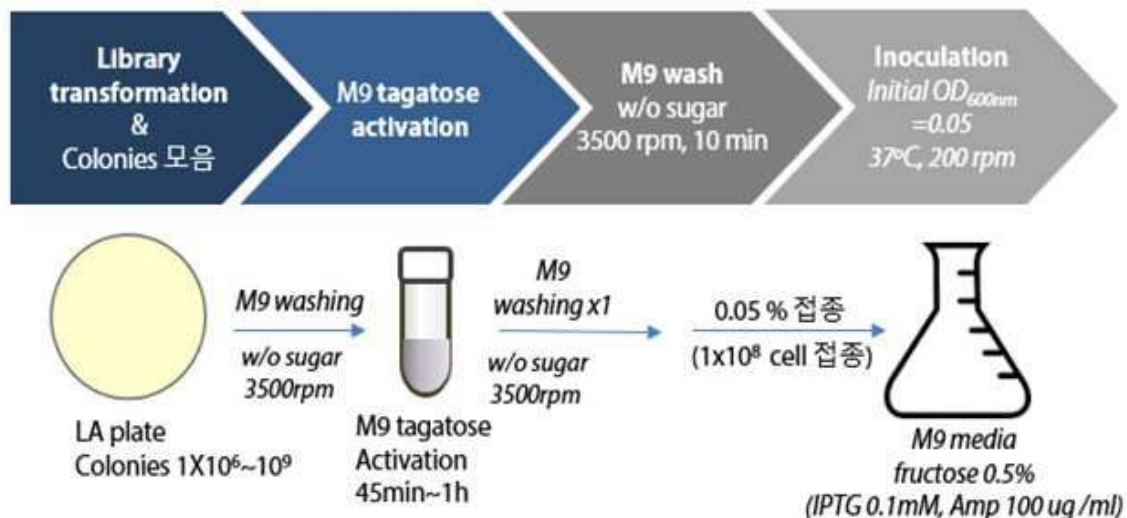
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 활성이 증가된 변이체 선별을 위한 방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 활성이 증가된 변이체 선별을 위한 방법에 관한 것으로, 활성이 증가된 변이체 선별용 조성물은 서열번호 1의 돌연변이를 확인하여 활성이 증가된 변이체 선별에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12Q 1/6827** (2018.05)

**C12Y 501/02** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545023887
과제번호	918012044SB020
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	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

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	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129740
과제번호	2017M3A9F3043837
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	아토피피부염 파마바이오틱스 발굴 및 기전 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.05.24

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 16, 92, 95, 105, 129, 148, 193, 236, 324, 341 및 362 번째 위치 중 어느 하나 이상 위치에서의 돌연변이를 확인할 수 있는 제제를 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별용 조성물.

#### 청구항 2

제1항 있어서,

상기 돌연변이는 V16, R92, F95, T105, N129, F148, K193, R236, K324, H341 및 H362 중 어느 하나 이상의 위치의 돌연변이인 변이체 선별용 조성물.

#### 청구항 3

제1항 있어서,

상기 돌연변이는 V16A, R92S, F95I, T105A, N129Y, F148S, K193E, R236S, K324N, H341L 및 H362I 중 어느 하나 이상인 변이체 선별용 조성물.

#### 청구항 4

제1항 있어서,

상기 제제는 중합효소연쇄반응, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 차세대 염기서열 분석 및 노던 블랏팅(Northern blotting) 중 어느 하나에서 사용되는 것을 특징으로 하는 변이체 선별용 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1의 조성물을 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별용 키트.

#### 청구항 6

시료로부터 청구항 1의 조성물로 돌연변이를 확인하는 단계; 및

상기 확인된 돌연변이를 통해 시료가 활성이 증가된 변이체인지 확인하는 단계를 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별 정보를 제공하는 방법.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 활성이 증가된 변이체 선별을 위한 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0003] 타가토스는 우유, 치즈, 카카오 등의 식품, 사과와 꿀과 같은 단맛이 나는 천연과일에 소량 존재하는 천연감미료, 물리적 성질 또한 설탕과 비슷하다. 타가토스의 칼로리는 1.5 kcal/g으로 설탕의 1/3 수준이며 GI(Glycemic index, 혈당지수)는 3으로 설탕의 5% 수준인데 반해, 설탕과 유사한 단맛을 내면서 다양한 건강 기능성을 가지고 있기 때문에 여러 제품 적용 시 건강과 맛을 동시에 만족시킬 수 있는 대체 감미료로 이용될 수 있다.

[0004] 이러한 기능성을 가진 타가토스의 생산을 위하여 균주가 가진 효소에 돌연변이를 추가하거나, 다른 균주가 가진 유전자를 도입하는 등 타가토스 생산 경로를 다양하게 재구성하는 시도가 이루어지고 있다. 그러나 이러한 시도는 개별적인 타가토스 생산 가능성만을 확인한 것이어서 실질적으로 다른 균주와의 대사능 비교 또는 대상 균주의 당 대사능 선별의 예측에 있어서는 연구가 이루어지지 않았다.

[0005] 이에 본 발명자들은 당대사능이 개선된 균주를 선별할 수 있는 방법을 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 미국 특허출원 제16/503092 호  
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1783170B1호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 일 구체예에 따르면 서열번호 1의 아미노산 서열에서 16, 92, 95, 105, 129, 148, 193, 236, 324, 341 및 362 번째 위치 중 어느 하나 이상 위치에서의 돌연변이를 확인할 수 있는 제제를 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별용 조성물을 제공한다.

[0009] 다른 구체예에 따르면 상기 조성물을 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별용 키트를 제공한다.

[0010] 또 다른 구체예에 따르면 시료로부터 상기 조성물로 돌연변이를 확인하는 단계; 및 상기 확인된 돌연변이를 통해 시료가 활성이 증가된 변이체인지 확인하는 단계를 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 16, 92, 95, 105, 129, 148, 193, 236, 324, 341 및 362 번째 위치 중 어느 하나 이상 위치에서의 돌연변이를 확인할 수 있는 제제를 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별용 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 프룩토오스/타가토스 전환효소 (Tagaturonate/fructuronate epimerase, uxaE)로서 D-타가투로네이트 (D-tagaturonate, D-TagA)와 D-프룩투로네이트 (D-fructuronate, D-FruA) 사이의 변환을 촉매하는 효소이다.

표 1

서열명	Sequence	서열번호
uxaE	MVLKVKDHF GRGYEVEKS YREKDSLSFF LTKGEEGKIL VVAGEKAPEG LSFFKKQORVE GVSFFFCERN HENLEVLARKY FPDLPVVRAG LRASFGTGDR LGITTPAHVR ALKDSGLFPI FAQQSVRENE RTGRTWRDVL DDATWGVFQE GYSEGFADA DHVKRPEDLV SAAREGFTMF TIDPSDHVRN LSKLSEREKN EMFEEILKKE RIDRIYLGKK YTVLGERLEF DEKNLRDAAL VYYDAIAHVD MMYQILKDET PDFDFEVSVD ETETPTSPLF HIFVVEELRR RGVEFTNLAL RFIGEWKGI DYKGDLAQFE REIKMHAETI RMFEGYKISL HSGSDKFSVY PAFASATGGL FHVKTAGTSY LEAVKVISMV NPELFREIYR CALDHFEEDR KSYHISADLS KVPEVEKVKD EDLPGLFEDI NVRQLIHVTY GSVLKDASLK ERLFKTLEQN EELFYETVAK HIKRHVDLLK G	1

[0016] 한편, 본 발명의 다른 일 구체예로, 본 발명의 제제는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 16, 105, 148 및 236 번째 위치 중 어느 하나 이상이거나 92, 95, 129, 193, 324, 341 및 362번째 위치 중 어느 하나 이상의 위치에서 돌연변이를 확인하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 16, 105, 148 및 236번째 위치 또는 92, 95, 129, 193, 324, 341 및 362번째 위치에서 돌연변이를 확인하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구체예로, 상기 돌연변이는 V16, R92, F95, T105, N129, F148, K193, R236, K324, H341 및 H362, 더욱 구체적으로 V16A, R92S, F95I, T105A, N129Y, F148S, K193E, R236S, K324N, H341L 및 H362I일 수 있다.

[0018] 상기 위치에서의 돌연변이 확인은 단백질 서열 또는 돌연변이를 암호화하는 염기서열을 확인하여 이루어질 수 있다. 확인방법은 당업계에서 이용되는 통상의 발현 수준 방법 모두 사용될 수 있으며, 분석 방법의 예로 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA:RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0019] 일 구체예에 따르면, 상기 제제는 중합효소연쇄반응, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 차세대 염기서열분석 및 노던 블랏팅(Northern blotting) 중 어느 하나에서 사용되는 것일 수 있다.

[0020] 상기 중합효소연쇄반응에서 프라이머가 사용될 수 있다. 상기 “프라이머(primer)”는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, T<sub>m</sub>)가 달라진다.

[0021] 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명의 변이체를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 변이체 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 변이체의 mRNA 또는 변이체의 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 변이체의 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 변이체의 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 변이체의 mRNA 또는 cDNA 염기서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.

[0022] 상기 마이크로어레이는 변이체의 유전자 mRNA, 변이체 및 이들의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 프로브로 할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브(probe)”는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧게는 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 변이체의 mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 변이체의 mRNA의 발현양을 측정함으로써 감염성 염증 질환의 진단에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 다른 양상은 변이체 선별용 조성물을 포함하는 변이체 선별용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양상은 시료로부터 상기 조성물로 돌연변이를 확인하는 단계; 및 상기 확인된 돌연변이를 통해 시료가 활성이 증가된 변이체인지 확인하는 단계를 포함하는 활성이 증가된 변이체 선별 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0027] 돌연변이를 확인하는 방법은 전술한 바와 같다.
- [0028] 상기 방법은 시료에서 돌연변이를 확인하고, 개시된 돌연변이 부위를 포함한 경우 활성이 증가한 변이체로 선별하는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0030] 본 발명의 활성이 증가된 변이체 선별용 조성물은 서열번호 1의 돌연변이를 확인하여 활성이 증가된 변이체 선별에 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 변이체 라이브러리 제작 과정을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 변이체에 따른 활성 수준을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 변이에 따른 변이체 활성을 구조 예측으로 도출한 결과를 기재한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034]

#### [0035] 실시예 1: 라이브러리의 제작

- [0036] 도 1과 같이 D-프록토스 에피머화효소 *uxaE* 유전자의 변이를 유발하기 위해, PCR 무작위 돌연변이 키트(Clontech, 미국)로 변이 PCR을 수행하였다. 변이-유발 PCR 라이브러리 DNA 50 ng을 프록토스 대사 유전체가 변이된 대장균 BL21(DE3)에 형질전환 하였으며, 0.5% 프록토스가 포함된 제한(M9)배지에서 배양을 수행하였다. 그 후, 형성된 콜로니를 모아 플라스미드 정제 키트를 이용하여 플라스미드를 추출하였다. 그 중 일부 플라스미드 염기서열을 분석하였으며, 라이브러리의 유전자 다양성을 확인하였다 (표 2).

표 2

[0037]

	Lib1	Lib2	Lib3
1	V16A	R92S	V16A
2	T105A	F95I	T105A
3	F148S	N129Y	F148S
4	R236S	K193E	R236S
5		K324N	
6		H341L	
7		H362I	

#### [0039] 실시예 2: 변이체의 선별 및 활성확인

- [0040] 상기 다양성이 확인된 당전환효소 라이브러리 유전자 변이 프록토스 에피머화 유전자 pET-21a(+)-*uxaE* library

DNA가 형질전환된 프룩토스 대사 유전체가 변형된 BL21(DE3)를 0.5% D-프룩토스, 및 최종 농도 0.2 mM IPTG가 포함 된 제한 (M9)배지에서 배양하고 균체 성장을 확인하였으며, 그 결과를 도 3에 나타 내었다.

[0041] 도 3에 나타낸 바와 같이, 야상형 보유 균주 대비 변이 라이브리리 유전자가 포함 균주의 균체 성장의 수준은 다르게 나타남을 확인하였으며, 이를 통해 *uxaE* 유전자의 도입 및 이의 변이에 따라 D-프룩토스를 탄소원으로 이용할 수 있는 능력이 각각 상이하게 나타날 수 있음을 확인하였다.

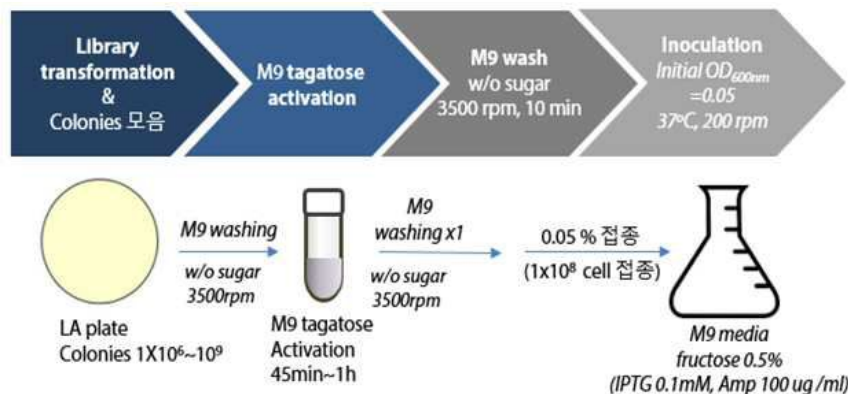
[0043] 실시예 3: 구조 예측에 따른 변이체의 활성 확인

[0044] 상기에서 확인된 돌연변이 11개 부위는 metal binding 부위에 인접해 있어 단백질이 3차 구조를 이루어 활성을 증진시키는데 영향을 미칠것으로 보인다.

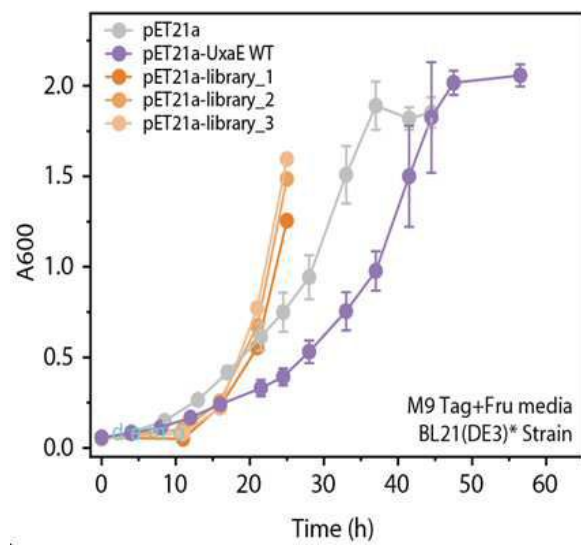
[0046] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

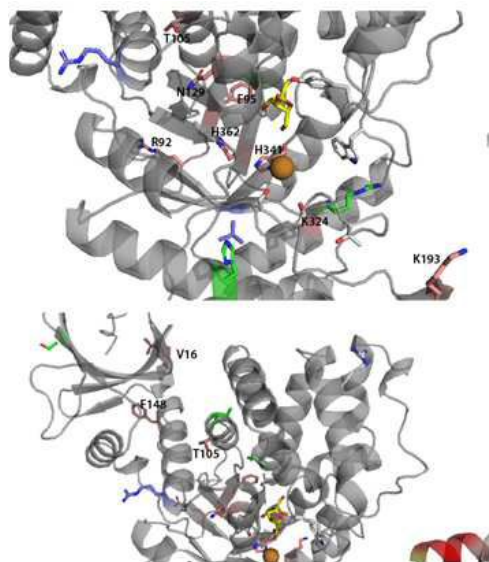
### 도면1



도면2



도면3



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Method for screening mutant with increased activity
- <130> BPN210161-P1
- <150> KR 10-2021-0076938
- <151> 2021-06-14
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 481
- <212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220><223> uxaE

<400> 1

Met Val Leu Lys Val Phe Lys Asp His Phe Gly Arg Gly Tyr Glu Val

1 5 10 15

Tyr Glu Lys Ser Tyr Arg Glu Lys Asp Ser Leu Ser Phe Phe Leu Thr

20 25 30

Lys Gly Glu Glu Gly Lys Ile Leu Val Val Ala Gly Glu Lys Ala Pro

35 40 45

Glu Gly Leu Ser Phe Phe Lys Lys Gln Arg Val Glu Gly Val Ser Phe

50 55 60

Phe Phe Cys Glu Arg Asn His Glu Asn Leu Glu Val Leu Arg Lys Tyr

65 70 75 80

Phe Pro Asp Leu Lys Pro Val Arg Ala Gly Leu Arg Ala Ser Phe Gly

85 90 95

Thr Gly Asp Arg Leu Gly Ile Thr Thr Pro Ala His Val Arg Ala Leu

100 105 110

Lys Asp Ser Gly Leu Phe Pro Ile Phe Ala Gln Gln Ser Val Arg Glu

115 120 125

Asn Glu Arg Thr Gly Arg Thr Trp Arg Asp Val Leu Asp Asp Ala Thr

130 135 140

Trp Gly Val Phe Gln Glu Gly Tyr Ser Glu Gly Phe Gly Ala Asp Ala

145 150 155 160

Asp His Val Lys Arg Pro Glu Asp Leu Val Ser Ala Ala Arg Glu Gly

165 170 175

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

180 185 190

Lys Leu Ser Glu Arg Glu Lys Asn Glu Met Phe Glu Glu Ile Leu Lys

195 200 205

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

210 215 220

Gly Glu Arg Leu Glu Phe Asp Glu Lys Asn Leu Arg Asp Ala Ala Leu

225                      230                      235                      240  
 Val Tyr Tyr Asp Ala Ile Ala His Val Asp Met Met Tyr Gln Ile Leu  
                                  245                      250                      255  
 Lys Asp Glu Thr Pro Asp Phe Asp Phe Glu Val Ser Val Asp Glu Thr  
                                  260                      265                      270  
 Glu Thr Pro Thr Ser Pro Leu Phe His Ile Phe Val Val Glu Glu Leu  
                                  275                      280                      285  
 Arg Arg Arg Gly Val Glu Phe Thr Asn Leu Ala Leu Arg Phe Ile Gly  
                                  290                      295                      300  
 Glu Trp Glu Lys Gly Ile Asp Tyr Lys Gly Asp Leu Ala Gln Phe Glu  
  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Glu Ile Lys Met His Ala Glu Ile Ala Arg Met Phe Glu Gly Tyr  
                                  325                      330                      335  
 Lys Ile Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys Phe Ser Val Tyr Pro Ala  
                                  340                      345                      350  
 Phe Ala Ser Ala Thr Gly Gly Leu Phe His Val Lys Thr Ala Gly Thr  
                                  355                      360                      365  
 Ser Tyr Leu Glu Ala Val Lys Val Ile Ser Met Val Asn Pro Glu Leu  
                                  370                      375                      380  
  
 Phe Arg Glu Ile Tyr Arg Cys Ala Leu Asp His Phe Glu Glu Asp Arg  
 385                      390                      395                      400  
 Lys Ser Tyr His Ile Ser Ala Asp Leu Ser Lys Val Pro Glu Val Glu  
                                  405                      410                      415  
 Lys Val Lys Asp Glu Asp Leu Pro Gly Leu Phe Glu Asp Ile Asn Val  
                                  420                      425                      430  
 Arg Gln Leu Ile His Val Thr Tyr Gly Ser Val Leu Lys Asp Ala Ser  
                                  435                      440                      445  
 Leu Lys Glu Arg Leu Phe Lys Thr Leu Glu Gln Asn Glu Glu Leu Phe  
  
 450                      455                      460  
 Tyr Glu Thr Val Ala Lys His Ile Lys Arg His Val Asp Leu Leu Lys  
 465                      470                      475                      480

Gly