

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 18일 (18.07.2013)



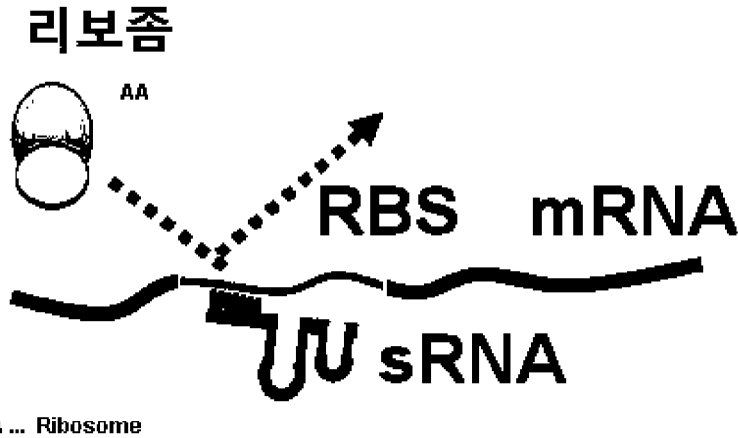
(10) 국제공개번호
WO 2013/105807 A3

- (51) 국제특허분류: C12N 15/113 (2010.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/000235
- (22) 국제출원일: 2013년 1월 11일 (11.01.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0003609 2012년 1월 11일 (11.01.2012) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 구성동 373-1, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이상엽 (LEE, Sang Yup); 305-761 대전시 유성구 엑스포로 448 엑스포 아파트 212-702, Daejeon (KR).
나도균 (NA, Dokyun); 631-865 경상남도 창원시 마산
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 135-080 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, 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, KM, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL SYNTHESIS-REGULATING SRNA AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭 : 신규한 합성 조절 SRNA 및 그 제법



(57) Abstract: The present invention relates to a customized synthesized sRNA for reducing gene expression in a prokaryotic cell having a new structure, to a method for preparing the synthesized sRNA and to a use of the synthesized sRNA. More particularly, the present invention relates to a synthesized sRNA which contains an Hfg binding site derived from any one sRNA of MicC, SgrS and MicF, and a zone for forming complementary binding with target gene mRNA. The present invention also relates to a method for preparing the synthesized sRNA and to a use of the synthesized sRNA. The synthesized sRNA according to the present invention has the advantages of regulating the degree of inhibition by regulating the binding force to mRNA of the target gene, and can be effectively produced without deleting an existing gene through synthesized sRNA for regulating gene expression and may reduce an expression of the target gene, thus enabling the synthesized sRNA of the present invention to be valuably used in the production of recombinant microorganisms. The synthesized sRNA of the present invention may be quickly applied to various strains, and therefore, is very suitable for measuring the metabolizability of each strain and selecting an optimum strain. In addition, recombinant microorganisms for producing tyrosine or cadaverine at a high efficiency according to the present invention, obtained by regulating metabolic flux of microorganisms by means of synthesized sRNA can be valuably used as microorganisms for drugs and industrial solvents. That is, selecting an expression inhibitory target gene for high efficiency production of metabolites can be easily performed using the sRNA of the present invention. Thus, the sRNA of the present invention can be used in producing recombinant strains for the efficient production of various metabolites and in establishing methods for producing efficient production, and thus is very useful.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/105807 A3



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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(88) 국제조사보고서 공개일: 2013년 10월 10일

본 발명은 신규 구조의 원핵세포 내에서 유전자 발현을 감소시키는 맞춤형 합성 sRNA, 그 제법 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위(Hfq binding site) 및 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역을 포함하는 합성 sRNA, 그 제법 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 합성 sRNA는 표적 유전자의 mRNA와의 결합력을 조절함으로써 억제 정도를 조절할 수 있는 장점이 있으며, 유전자 발현을 조절하는 합성 sRNA를 통해 기존의 유전자 결실을 통한 과정 없이 효과적으로 제작, 목적 유전자 발현을 감소시킬 수 있어 재조합 미생물 제조에 유용하며, 다양한 균주에서 빠르게 적용할 수 있어 균주별 대사 능력 측정 및 최적 균주 선정에 매우 적합하다. 아울러, 합성 sRNA를 통한 미생물 대사 흐름 조작에 의해 수득된 본 발명에 따른 tyrosine 혹은 cadaverine을 고효율로 생산하는 재조합 미생물은 의약품 및 산업용제 미생물로 유용하다. 즉, 본 발명에 따른 sRNA를 이용하여 대사산물의 고효율 생산을 위한 발현 억제 타겟 유전자 선별을 용이하게 할 수 있다. 이에 다양한 대사 산물의 효율적 생산을 위한 재조합 균주의 제작 및 효율적 생산방법 확립에 사용할 수 있는바 매우 유용하다.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/000235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 1/21(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 15/113; C12N 15/63; C12N 1/21

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: small regulatory RNA, sRNA, Hfq binding site, target gene, deregulation, tyrosine, cadaverine, biosynthesis, production

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAWAMOTO, H. et al., "Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq," Molecular Microbiology, vol. 61(4), pp. 1013-1022 (online 12 July 2006) See abstract, figures 1, 6 and 7	1-26
A	ZHANG, Y. et al., "Identifying Hfq-binding small RNA targets in Escherichia coli," Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 343, pp. 950-955 (online 20 March 2006) See abstract and table 1	1-26
A	LUTKE-EVERSLOH, T. & STEPHANOPOULOS, G. "L-Tyrosine production by deregulated strains of Escherichia coli," Appl. Microbiol. Biotechnol. vol. 75, pp. 103-110 (online January 2007) See abstract and table 1	27-36
A	QIAN, Z.-G. et al., "Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of cadaverine: a five carbon diamine," Biotechnol. Bioeng. vol. 108(1), pp. 93-103 (online 01 September 2010) See abstract, figure 1 and table 1	37-43

 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

"I" 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

03 JULY 2013 (03.07.2013)

Date of mailing of the international search report

03 JULY 2013 (03.07.2013)

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.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/000235

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- I. Claims 1-26 pertain to an sRNA inhibiting the gene expression in a prokaryote, comprising any one sRNA-derived Hfq-binding site selected from MicC, SgrS and MicF and a target gene mRNA base-pairing region, a preparation method therefor, and a use therefor.
- II. Claims 27-32 and 35-36 pertain to a recombinant microorganism with improved tyrosine productivity, wherein the function of the tyrR and csrA genes is lost in a host cell having the tyrosine biosynthesis pathway, and a preparation method therefor.
- III. Claims 33 and 34 pertain to a recombinant microorganism capable of producing phenol, wherein the tp1 gene is introduced into a recombinant microorganism with improved tyrosine productivity or is amplified.
- IV. Claims 37-43 pertain to a recombinant microorganism with improved cadaverine productivity, wherein the function of a specific gene is lost in a host cell having the cadaverine biosynthesis pathway, and a preparation method therefor.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/000235

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 15/113(2010.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/113; C12N 15/63; C12N 1/21

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: small regulatory RNA, sRNA, Hfq binding site, target gene, deregulation, tyrosine, cadaverine, biosynthesis, production

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KAWAMOTO, H. et al., "Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq," Molecular Microbiology, Vol. 61(4), pp. 1013-1022 (online 12 July 2006) See abstract, Figs 1, 6 and 7	1-26
A	ZHANG, Y. et al., "Identifying Hfq-binding small RNA targets in Escherichia coli," Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 343, pp. 950-955 (online 20 March 2006) See abstract and Table 1	1-26
A	LUTKE-EVERSLOH, T. & STEPHANOPOULOS, G. "L-Tyrosine production by deregulated strains of Escherichia coli," Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 75, pp. 103-110 (online January 2007) See abstract and Table 1	27-36
A	QIAN, Z.-G. et al., "Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of cadaverine: a five carbon diamine," Biotechnol. Bioeng. Vol. 108(1), pp. 93-103 (online 1 September 2010) See abstract, Fig. 1 and Table 1	37-43

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 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2013년 07월 03일 (03.07.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 07월 03일 (03.07.2013)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 조영균 전화번호 82-42-481-8298
--	-----------------------------------



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:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- I. 청구항 1-26은 원핵생물에서 유전자 발현을 억제하는 sRNA에 있어서 MicC, SgrS 및 MicF 중 어느 하나의 sRNA 유래의 Hfq 결합 부위 및 표적 유전자 mRNA와 상보적 결합을 형성하는 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 sRNA, 이의 제조방법 및 이의 이용에 관한 것입니다.
- II. 청구항 27-32, 35-36은 타이로신 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서 tyrR 및 csrA 유전자의 기능이 상실된 것을 특징으로 하는 타이로신 생산능력이 향상된 재조합 미생물 및 이의 제조방법에 관한 것입니다.
- III. 청구항 33-34는 타이로신 생산능력이 향상된 재조합 미생물에 tpl 유전자를 도입하거나 증폭시킨 것을 특징으로 하는 페놀 생산능을 가지는 재조합 미생물에 관한 것입니다.
- IV. 청구항 37-43은 카다베린 생합성 경로를 가지는 숙주세포에서 특정 유전자의 기능이 상실된 것을 특징으로 하는 카다베린 생산능력이 향상된 재조합 미생물 및 이의 제조방법에 관한 것입니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음