(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0043794
(43) 공개일자 2024년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12P 19/32 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/1241 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7007949
(22) 출원일자(국제) 2022년09월09일
심사청구일자 2024년03월08일
(85) 번역문제출일자 2024년03월08일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/033972
(87) 국제공개번호 WO 2023/038128
국제공개일자 2023년03월16일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-147985 2021년09월10일 일본(JP)

(71) 출원인
교와 핫꼬 바이오 가부시키가이샤
일본 도꾜도 찌요다꾸 오떼마찌 1쪼메 6-1
(72) 발명자
호리 가즈마사
일본 100-8185 도꾜도 찌요다꾸 오떼마찌 1쪼메 6-1 교와 핫꼬 바이오 가부시키가이샤 나이
모리타 도시히코
일본 100-8185 도꾜도 찌요다꾸 오떼마찌 1쪼메 6-1 교와 핫꼬 바이오 가부시키가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

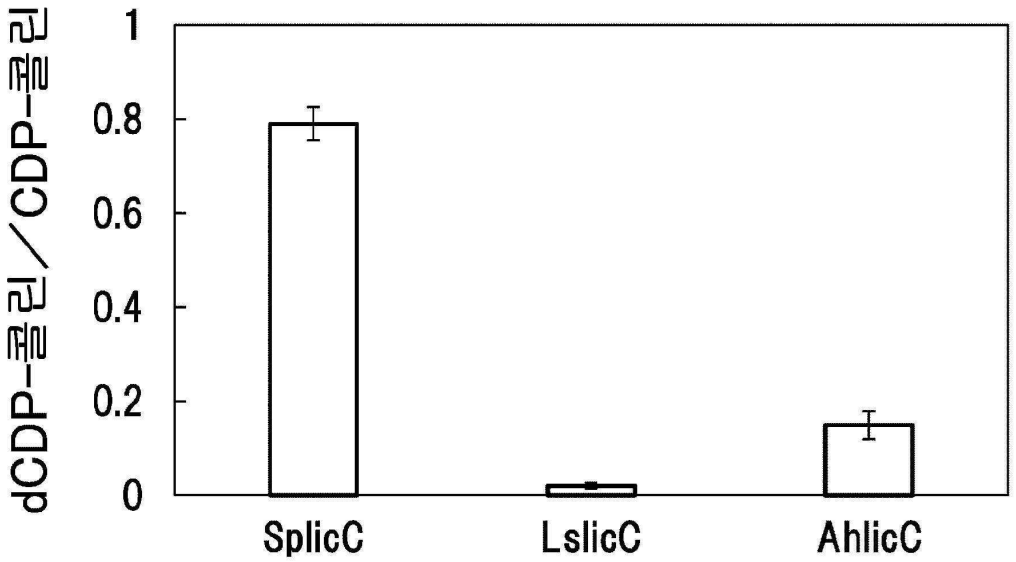
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **CDP-콜린의 제조에 이용하는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용하는 CDP-콜린의 제조 방법**

(57) 요 약

이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물로서, 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제가 특정 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드인 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용하여 CDP-콜린을 생성하는 것을 포함하는 CDP-콜린의 제조 방법.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12P 19/32 (2013.01)
C12Y 207/07015 (2013.01)
(72) 발명자
니시노 츠네요
일본 100-8185 도쿄도 찌요다꾸 오떼마찌 1쪼메 6-1 교와 핫꼬 바이오 가부시키가이샤 나이
우지하라 데츠로
일본 100-8185 도쿄도 찌요다꾸 오떼마찌 1쪼메 6-1 교와 핫꼬 바이오 가부시키가이샤 나이

명 세 서

청구범위

청구항 1

이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물로서, 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제가 하기 (A1)~(A3) 및 (B1)~(B3)에서 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드인 재조합 미생물.

(A1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드

(A2) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

(A3) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

(B1) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드

(B2) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

(B3) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 (a1)~(a3) 및 (b1)~(b3)에서 선택되는 어느 하나의 DNA가 발현 가능하게 도입된 재조합 미생물.

(a1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA

(a2) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

(a3) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

(b1) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA

(b2) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

(b3) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA와 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 DNA로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 대장균인 재조합 미생물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제는, CTP에 대한 반응성을 1로 한 경우, dCTP에 대한 반응성이 0.75 이하인 재조합 미생물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재한 재조합 미생물을 이용하여 CDP-콜린을 생성하는 것을 포함하는, CDP-콜린의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 기질 특이성이 우수한, 시티딘이인산콜린을 합성하는 활성을 갖는 단백질을 생산하는 능력을 갖는 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용한 효율적인 시티딘이인산콜린의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 시티딘이인산콜린(Cytidine 5'-diphosphate Choline; 이하, CDP-콜린)은 고등생물의 인지질을 구성하는 성분인 포스파티딜콜린의 생합성 전구체이며, 신경 보호 작용 등이 알려져 있다(비특허문헌 1).

[0003] 상기한 유용성에도 불구하고, CDP-콜린은 천연으로부터의 추출이나 화학 합성에 의해 대량으로 얻기가 어렵고, 주로 생물이 갖는 효소 반응에 의해서 시티딘일인산(이하, CMP라고 한다)이나 오로트산을 출발 원료로 합성되고 있다(특허문헌 1과 2 및 비특허문헌 2와 3).

[0004] 오로트산으로 CDP-콜린을 제조하는 경우, 우선 오로트산으로부터 복수의 효소 반응에 의해 시티딘삼인산(이하, CTP라고 한다)을 합성한다. 이어서, 얻어진 CTP를, 콜린으로부터의 효소 반응에 의해 합성한 포스포콜린(이하, P-콜린이라고 한다)의 존재 하에서 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기능에 의해 축합시킴으로써 CDP-콜린을 합성할 수 있다(비특허문헌 3).

[0005] CMP를 출발 원료로 한 경우도 마찬가지로, CMP로부터 CTP를 생산하게 하여, P-콜린 존재 하에서 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제에 의해서 축합시킴으로써 CDP-콜린을 얻을 수 있다(비특허문헌 3).

[0006] 이상의 점으로부터 효소 반응을 이용한 CDP-콜린의 생산에 있어서는 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제가 중요한 역할을 담당하고 있다는 것을 알 수 있다.

[0007] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제는 인간을 포함하는 포유류나 효모 등의 진핵생물이나 박테리아 등에 널리 분포되어 있다(비특허문헌 4, 5 및 6). 이들 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제는 기본적으로는 CTP과 P-콜린으로부터 CDP-콜린을 합성하는 활성을 갖는다.

[0008] 그러나, 데옥시시티딘삼인산(이하, dCTP)가 존재하는 경우에는, CTP 대신에 dCTP를 기질로서 받아들여, dCTP와 P-콜린로부터 데옥시시티딘이인산콜린(이하, dCDP-콜린)을 생성하는 것이 알려져 있다(비특허문헌 7).

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 국제공개 제2003/095660호

(특허문헌 0002) [특허문헌 2] 국제공개 제2007/023830호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) [비특허문헌 1] Nutrients (2020) Vol. 12(3), 793, p. 1-17

(비특허문헌 0002) [비특허문헌 2] Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto U. (1976) Vol. 53, p. 546-562

(비특허문헌 0003) [비특허문헌 3] Appl. Microbiol. Biotechnol. (2017) Vol. 101, p. 1409-1417

(비특허문헌 0004) [비특허문헌 4] J. Bio. Chem. (1998) Vol. 273, p. 14022-14029

(비특허문헌 0005) [비특허문헌 5] Eur. J. Biochem. (1987) Vol. 169, p. 477-486

(비특허문헌 0006) [비특허문헌 6] J. Bio. Chem.(2002) Vol. 277, p. 4343-4350

(비특허문헌 0007) [비특허문헌 7] Eur. J. Biochem. (1983) Vol. 131, p. 223-229

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] dCTP는 DNA의 합성 원료로서 생명 활동에 필수적인 화합물이기 때문에, 미생물을 이용한 CDP-콜린의 생산에 있어서는 dCDP-콜린의 부생을 완전히 억제할 수는 없어, 효율적인 CDP-콜린 생산의 장해가 된다. 아울러, dCDP-콜린은 CDP-콜린과 매우 가까운 물성을 갖기 때문에, 이들을 분리하기는 어렵다.

[0012] 그래서, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높은 기질 특이성을 보이는 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제가 요구되지만, 그와 같은 효소는 지금까지 알려져 있지 않다. 또한, 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 등에서는 결정 구조가 밝혀져 있지만(비특허문헌 6), dCTP에 대한 반응성은 예측하지 못하고 있다.

[0013] 본 발명은 CDP-콜린의 제조에 이용하는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용하는 CDP-콜린의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은, 상기 과제를 검토한 결과, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높은, 우수한 기질 특이성을 보이는 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 발견했다. 또한, 이종의 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물을 이용함으로써 효율적으로 CDP-콜린을 제조할 수 있다는 것을 알아내어, 이들의 지견에 기초하여 본 발명을 완성시켰다.

[0015] 즉, 본 발명은 이하에 관한 것이다.

[0016] 1. 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물로서, 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제가 하기 (A1)~(A3) 및 (B1)~(B3)에서 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드인 재조합 미생물.

[0017] (A1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드

[0018] (A2) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0019] (A3) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0020] (B1) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드

[0021] (B2) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0022] (B3) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0023] 2. 하기 (a1)~(a3) 및 (b1)~(b3)에서 선택되는 어느 하나의 DNA를 발현할 수 있게 도입된 상기 1에 기재한 재조합 미생물.

[0024] (a1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA

[0025] (a2) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0026] (a3) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0027] (b1) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA

[0028] (b2) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0029] (b3) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA와 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 DNA로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0030] 3. 대장균인 상기 1 또는 2에 기재한 재조합 미생물.

[0031] 4. 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제는, CTP에 대한 반응성을 1로 한 경우, dCTP에 대한 반응성이 0.75 이하인 상기 1~3의 어느 하나에 기재한 재조합 미생물.

[0032] 5. 상기 1~4의 어느 하나에 기재한 재조합 미생물을 이용하여 CDP-콜린을 생성하는 것을 포함하는, CDP-콜린의 제조 방법.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 재조합 미생물은, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높은 우수한 기질 특이성을 보이는, 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는다. 본 발명의 재조합 미생물을 이용함으로써, dCDP-콜린의 부생을 억제하여, 효율적으로 CDP-콜린을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] [도 1] 도 1은 SplicC, LslicC 또는 AhlicC의 CTP 또는 dCTP에 대한 반응성을 도시하는 도면이다. 종축은 CTP 또는 dCTP 및 P-콜린을 기질로서 이용하여 생성된 CDP-콜린량에 대한 dCDP-콜린량의 비율이다. SplicC, LslicC, AhlicC는 각각 스트렙토코커스 뉴모니아 유래, 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 유래, 아나에로코커스 하이드로게날리스(*Anaerococcus hydrogenalis*) 유래의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 1. 재조합 미생물 및 그 조성 방법

[0036] 본 발명의 재조합 미생물은 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물이다. 본 발명에 있어서, 상기 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제는 하기 (A1)~(A3) 및 (B1)~(B3)에서 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드이다.

[0037] (A1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드

[0038] (A2) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0039] (A3) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0040] (B1) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드

[0041] (B2) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0042] (B3) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드

[0043] 상기 (A2) 또는 (B2)에 기재한 폴리펩티드로서는, 서열 번호 10 또는 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 이하 순서로 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다.

[0044] 상기 (A3) 또는 (B3)에 기재한 폴리펩티드로서는, 서열 번호 10 또는 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1

~20개, 바람직하게는 1~10개, 더욱 바람직하게는 1~8개, 가장 바람직하게는 1~5개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다.

[0045] 아미노산 서열 및 염기 서열의 동일성은, Lipman-Pearson법[Science, 227(4693), 1435-41(1985)], Karlin 및 Altschul에 의한 알고리즘 BLAST[Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90,5873(1993)]나 FASTA[Methods Enzymol., 183,63(1990)]을 이용하여 결정할 수 있다. 상기 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다[J. Mol. Biol., 215,403(1990)]. BLAST에 기초하여 BLASTN에 의해서 염기 서열을 해석하는 경우에는, 파라미터는 예컨대 Score=100, wordlength=12로 한다. 또한, BLAST에 기초하여 BLASTX에 의해서 아미노산 서열을 해석하는 경우에는, 파라미터는 예컨대 score=50, wordlength=3으로 한다. BLAST와 Gapped BLAST 프로그램을 이용하는 경우에는, 각 프로그램의 디폴트 파라미터를 이용한다. 이들의 해석 방법의 구체적인 수법은 공지되어 있다.

[0046] 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열이란, 기초가 되는 아미노산 서열 내 아미노산 잔기를 인위적으로 결실 혹은 치환, 또는 상기 아미노산 서열 내에 인위적으로 아미노산 잔기를 삽입 혹은 부가하여 얻어지는 아미노산 서열을 말한다.

[0047] 결실, 치환, 삽입 또는 부가되는 아미노산은 천연형과 비천연형을 불문한다. 천연형 아미노산으로서는, L-알라닌, L-아스파라긴, L-아스파라긴산, L-글루타민, L-글루타민산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-아르기닌, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, L-발린, L-시스테인 등을 들 수 있다.

[0048] 이하에, 서로 치환 가능한 아미노산의 예를 나타낸다. 동일 군에 포함되는 아미노산은 서로 치환 가능하다.

[0049] A군: 류신, 이소류신, 노르류신, 발린, 노르발린, 알라닌, 2-아미노부탄산, 메티오닌, O-메틸세린, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 시클로헥실알라닌

[0050] B군: 아스파라긴산, 글루타민산, 이소아스파라긴산, 이소글루타민산, 2-아미노아디프산, 2-아미노수베르산

[0051] C군: 아스파라긴, 글루타민

[0052] D군: 리신, 아르기닌, 오르니틴, 2,4-디아미노부탄산, 2,3-디아미노프로피온산

[0053] E군: 프롤린, 3-히드록시프롤린, 4-히드록시프롤린

[0054] F군: 세린, 트레오닌, 호모세린

[0055] G군: 페닐알라닌, 티로신

[0056] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성이란, CTP와 P-콜린로부터 CDP-콜린을 합성하는 활성을 말한다.

[0057] 상기 폴리펩티드가 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖고 있는 것은 예컨대 이하의 방법에 의해 확인할 수 있다. 우선, 후술하는 방법에 의해 상기 폴리펩티드를 코드하는 DNA를 포함하는 재조합체 DNA를 제작한다. 이어서, 상기 재조합체 DNA로, CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 확인할 수 없는 미생물, 예컨대 에세리키아 콜리 BL21주를 형질전환하여 얻어지는 미생물을 배양하고, 얻어지는 배양물로부터 상기 폴리펩티드를 포함하는 세포 추출액을 조제한다. 이어서, 상기 세포 추출액을 기질인 CTP와 P-콜린에 접촉시켜 CDP-콜린을 생성하게 한다. 마지막으로 고속 크로마토그래피 또는 가스 크로마토그래피 등을 이용하는 일반적인 분석 방법에 의해 반응액 내 CDP-콜린을 검출함으로써, 대상 폴리펩티드가 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있다.

[0058] 「CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물」은, CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA를 갖는 재조합체 DNA를, 발현 가능하게 친주(親株)에 도입함으로써 얻을 수 있다.

[0059] 친주란, 유전자 개변 및 형질전환 등의 대상이 되는 원주(元株)를 말한다. DNA의 도입에 의한 형질전환의 대상이 되는 원주를 숙주주(宿主株)라고 한다.

[0060] 친주로서는 원핵생물 또는 효모 균주가 바람직하고, 보다 바람직하게는 에세리키아속, 세라티아속, 바실러스속, 브레비박테륨속, 코리네박테륨속, 미크로박테륨속 혹은 슈도모나스속 등에 속하는 원핵생물, 또는 사카로마이세스속, 시조사카로마이세스속, 쿨루이베로미세스속, 트리코스포론속, 쉬와니오미세스속, 피키아속, 혹은 칸디다속 등에 속하는 효모 균주이며, 이들 중에서도 에세리키아속에 속하는 원핵생물(대장균)이 바람직하다.

[0061] 친주로서, 구체적으로는 예컨대 에세리키아 콜리(*Escherichia coli*) BL21 codon plus, 에세리키아 콜리 XL1-Blue, 에세리키아 콜리 XL2-Blue(모두 애질런트테크놀로지사 제조), 에세리키아 콜리 BL21(DE3) pLysS(메르크밀리포아사 제조), 에세리키아 콜리 BL21, 에세리키아 콜리 DH5α, 에세리키아 콜리 HST08 Premium, 에세리키아 콜리 HST02, 에세리키아 콜리 HST04 dam-/dcm-, 에세리키아 콜리 JM109, 에세리키아 콜리 HB101, 에세리키아 콜리 CJ236, 에세리키아 콜리 BMH71-18 mutS, 에세리키아 콜리 MV1184, 에세리키아 콜리 TH2(모두 다카라바이오사 제조), 에세리키아 콜리 W(ATCC9637), 에세리키아 콜리 JM101, 에세리키아 콜리 W3110, 에세리키아 콜리 MG1655, 에세리키아 콜리 DH1, 에세리키아 콜리 MC1000, 에세리키아 콜리 W1485, 에세리키아 콜리 MP347, 에세리키아 콜리 NM522, 세라티아 피카리아(*Serratia ficaria*), 세라티아 폰티콜라(*Serratia fonticola*), 세라티아 리퀴페시언스(*Serratia liquefaciens*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 브레비박테륨 임마리오필룸(*Brevibacterium immariophilum*) ATCC14068, 브레비박테륨 사카롤리티쿰(*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC14066, 코리네박테륨 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테륨 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC14067, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC13869, 코리네박테륨 아세트애시드필룸(*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870, 미크로박테륨 암모니아필룸(*Microbacterium ammoniaphilum*) ATCC15354 혹은 슈도모나스속(*Pseudomonas sp.*) D-0110 등의 원핵생물, 또는 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 시조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베르마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 트리코스포론 풀루란스(*Trichosporon pullulans*), 쉬와니오미세스 알리비우스(*Schwanniomyces alluvius*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 혹은 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*) 등의 효모 균주를 들 수 있다.

[0062] 또한, 친주로서 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기질인 CTP 및/또는 P-콜린을 생성하는 능력을 인공적으로 부여 또는 강화한 육종주도 적합하게 사용할 수 있다.

[0063] 친주로서 이용하는 미생물에, CTP 및/또는 P-콜린을 생성하는 능력을 인공적으로 부여 또는 강화하는 방법으로서는 하기 (1)~(5) 등을 들 수 있고, 상기 공지된 방법은 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0064] (1) CTP 및/또는 P-콜린의 생합성 경로를 제어하는 기구의 적어도 하나를 완화 또는 해제하는 방법

[0065] (2) CTP 및/또는 P-콜린의 생합성 경로에 관여하는 효소의 적어도 하나를 발현 강화하는 방법

[0066] (3) CTP 및/또는 P-콜린의 생합성 경로에 관여하는 효소 유전자의 적어도 하나의 카피수를 증가시키는 방법

[0067] (4) CTP 및/또는 P-콜린의 생합성 경로로부터 상기 목적 물질 이외의 대사 산물로 분기되는 대사 경로의 적어도 하나를 약화 또는 차단하는 방법

[0068] (5) 야생주에 비해서 CTP 및/또는 P-콜린의 아날로그에 대한 내성도가 높은 세포주를 선택하는 방법

[0069] 상기한 CTP 및 P-콜린을 생성하는 능력을 인공적으로 부여 또는 강화하는 방법의 구체예로서는, 각종 유전자 조작에 의한 방법(특허문헌 1, 특허문헌 2, 비특허문헌 3) 등의 공지된 방법을 들 수 있다.

[0070] 미생물이 CTP 및 P-콜린을 생성할 수 있는 미생물인 것은, 육종주와 친주를 각각 배지에 배양하여, CTP 및 P-콜린의 생성량을 비교함으로써 확인할 수 있다. 또한, 서열 번호 10 또는 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 코드하는 DNA를 포함하는 재조합체 DNA로 상기 미생물을 형질전환하고, 형질전환한 상기 미생물을 배지에 배양하고, 배양물 내에 축적한 CDP-콜린을 후술하는 HPLC를 이용하여 검출함으로써 확인할 수도 있다.

[0071] 친주로서 이용하는 미생물이 상기 (A1)~(A3) 및 (B1)~(B3) 이외의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 생산하는 능력을 갖고 있는 경우에는, 상기 폴리펩티드의 기능을 저하 또는 결손시킨 주를 친주로서 이용함으로써, dCDP-콜린의 부생을 억제하면서 효율적으로 CDP-콜린을 제조할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 기능을 저하 또는 결손시키는 방법으로서는, 상기 폴리펩티드의 기능을 저감 혹은 완전히 정지시키는 형태라면 특별히 한정되지 않고, 예컨대 상기 폴리펩티드를 코드하는 DNA의 전부 또는 일부를 제거하는 등, 공지된 방법을 적절하게 사용할 수 있다.

[0072] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA로서는 이하의 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)에서 선택되는 어느 하나를 들 수 있다.

[0073] (a1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA

[0074] (a2) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0075] (a3) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0076] (b1) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA

[0077] (b2) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 있어서, 1~20개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0078] (b3) 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 DNA와 적어도 60% 이상의 동일성을 갖는 DNA로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0079] (c1) 서열 번호 7 또는 11로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA

[0080] (c2) 서열 번호 7 또는 11로 표시되는 염기 서열과 상보적인 염기 서열로 이루어진 DNA와 엄격한(stringent) 조건으로 하이브리다이즈하며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 폴리펩티드를 코드하는 DNA

[0081] (c3) 서열 번호 7 또는 11로 표시되는 염기 서열과 95% 이상, 바람직하다는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 염기 서열로 이루어지며 또한 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제 활성을 갖는 DNA를 코드하는 DNA

[0082] 「하이브리다이즈한다」란, 특정 염기 서열을 갖는 DNA 또는 상기 DNA의 일부에 DNA가 하이브리다이즈하는 것이다. 따라서, 상기 특정 염기 서열을 갖는 DNA 또는 그 일부는 노던 또는 서던 블롯 해석의 프로브로서 사용할 수 있고, 또한 PCR 해석의 올리고뉴클레오티드 프라이머로서 사용할 수 있는 DNA이다.

[0083] 프로브로서 이용되는 DNA로서는 적어도 100 염기 이상, 바람직하게는 200 염기 이상, 보다 바람직하게는 500 염기 이상의 DNA를 들 수 있다. 프라이머로서 이용되는 DNA로서는 적어도 10 염기 이상, 바람직하게는 15 염기 이상의 DNA를 들 수 있다.

[0084] DNA의 하이브리다이제이션 실험 방법은 잘 알려져 있고, 예컨대 몰레큘러 클로닝 제4판(Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012)), Methods for General and Molecular Bacteriology(ASM Press(1994)), Immunology methods manual(Academic press(1997)) 외에, 다수의 다른 표준 교과서에 따라서 하이브리다이제이션 조건을 결정하여 실험을 행할 수 있다.

[0085] 또한, 시판되는 하이브리다이제이션 키트에 부속된 설명서에 따름으로써 엄격한 조건 하에서 하이브리다이즈하는 DNA를 취득할 수도 있다. 시판되는 하이브리다이제이션 키트로서는, 예컨대 랜덤프라임법에 의해 프로브를 제작하여, 엄격한 조건으로 하이브리다이제이션을 행하는 랜덤 프라임드 DNA 라벨링 키트(로슈다이아그노스틱스사 제조) 등을 들 수 있다.

[0086] 상기한 엄격한 조건으로서는, 예컨대 DNA를 고정화한 필터와 프로브 DNA를 50% 포름아미드, 5×SSC(750 mM의 염화나트륨, 75 mM의 시트르산나트륨), 50 mM의 인산나트륨(pH 7.6), 5×덴하트 용액, 10%의 황산 텍스트란 및 20 μg/l의 변성시킨 연어정자 DNA를 포함하는 용액 내에서 42℃에서 하룻밤 인큐베이트한 후, 예컨대 약 65℃의 0.2×SSC 용액 내에서 상기 필터를 세정하는 조건을 들 수 있다.

[0087] 상기한 다양한 조건은, 하이드리다이제이션 실험의 백그라운드를 억제하기 위해서 이용하는 블로킹 시약을 첨가 또는 변경함으로써 설정할 수도 있다. 상기한 블로킹 시약의 첨가는, 조건을 적합하게 하기 위해서, 하이브리다이제이션 조건의 변경을 동반하여도 좋다.

[0088] 상기한 엄격한 조건 하에서 하이브리다이즈 가능한 DNA로서는, 예컨대 BLAST나 FASTA 등을 이용하여 상기한 파라미터 등에 기초하여 계산했을 때에, 서열 번호 7 또는 11로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA와 적어도 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 DNA를 들 수 있다.

[0089] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA 중, 상기 (a1) 또는 (c1)에 기재한 DNA는, 예컨대 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 7로 표시되는 염기 서열에 기초하여 설계할 수 있는 프로

브 DNA를 이용한, 미생물의 염색체 DNA 라이브러리에 대한 서던 하이브리다이제이션, 또는 상기 염기 서열에 기초하여 설계할 수 있는 프라이머 DNA를 이용한 미생물의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR[PCR Protocols, Academic Press(1990)]에 의해 취득할 수 있다. 상기 조작에 이용하는 미생물의 염색체 DNA의 유래는 특별히 한정되지 않지만, 예컨대 락토바실러스속 유산균, 아나에로코커스속, 스트렙토코커스속, 푸소박테륨속, 바실러스속, 파에니바실러스속, 그래뉼리카텔라속, 클로스트리듐속의 세균을 들 수 있다. 이들 중에서도 락토바실러스속의 유산균, 아나에로코커스속의 세균이 바람직하고, 락토바실러스 살리바리우스가 보다 바람직하다. 락토바실러스 살리바리우스 ATCC11741주는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC)으로부터 입수할 수 있다.

[0090] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA 중, 상기 (b1) 또는 (c1)에 기재한 DNA는, 예컨대 서열 번호 14로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열 번호 11로 표시되는 염기 서열에 기초하여 설계할 수 있는 프로브 DNA를 이용한, 미생물의 염색체 DNA 라이브러리에 대한 서던 하이브리다이제이션, 또는 상기 염기 서열에 기초하여 설계할 수 있는 프라이머 DNA를 이용한 미생물의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR에 의해 취득할 수 있다. 상기 조작에 이용하는 미생물의 염색체 DNA의 유래는 특별히 한정되지 않지만, 예컨대 락토바실러스속의 유산균, 아나에로코커스속, 스트렙토코커스속, 푸소박테륨속, 바실러스속, 파에니바실러스속, 그래뉼리카텔라속, 클로스트리듐속의 세균을 들 수 있다. 이들 중에서도 락토바실러스속의 유산균, 아나에로코커스속의 세균이 바람직하고, 아나에로코커스 하이드로게날리스가 보다 바람직하다. 아나에로코커스 하이드로게날리스 ATCC49630주는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC)으로부터 입수할 수 있다.

[0091] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA 중, 상기 (a2), (b2) 또는 (c2)에 기재한 DNA는, 예컨대 각종 단백질 서열 데이터베이스에 대하여 서열 번호 10 혹은 14로 표시되는 아미노산 서열과 60% 이상, 바람직하게는 이하의 순서로 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 검색하거나, 또는 각종 유전자 서열 데이터베이스에 대하여 서열 번호 7 혹은 11로 표시되는 염기 서열과 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 염기 서열을 검색하고, 상기 검색에 의해서 얻은 아미노산 서열 또는 염기 서열에 기초하여 설계할 수 있는 프로브 DNA 또는 프라이머 DNA 및 이 DNA를 갖는 미생물을 이용하여, 상기한 DNA를 취득하는 방법과 같은 서던 하이브리다이제이션 또는 PCR을 이용한 방법 등에 의해서 취득할 수 있다.

[0092] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA 중, 상기 (a3), (b3) 또는 (c3)에 기재한 DNA는, 예컨대 서열 번호 10 혹은 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열, 또는 서열 번호 7 혹은 11로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 주형으로 하여 에러-프론 PCR 등에 제공함으로써 취득할 수 있다.

[0093] 또한, 목적의 변이(결실, 치환, 삽입 또는 부가)가 삽입되도록 설계한 염기 서열을 각각의 5' 끝에 갖는 1조의 PCR 프라이머를 이용한 PCR[Gene, 77,51(1989)]에 의해서도 상기 (a3), (b3) 또는 (c3)에 기재한 DNA를 취득할 수 있다. 즉, 우선 서열 번호 10 혹은 14로 표시되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열, 또는 서열 번호 7 또는 11로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA의 5' 끝에 대응하는 센스 프라이머와, 5' 끝에 변이의 서열과 상보적인 서열을 갖는, 변이 도입 부위의 직전(5' 측)의 서열에 대응하는 안티센스 프라이머로 상기 DNA를 주형으로 하여 PCR을 행하여, 상기 DNA의 5' 끝에서부터 변이 도입 부위까지의 단편 A(3' 측에 변이가 도입되어 있다)를 증폭한다. 이어서, 5' 끝에 변이의 서열을 갖는, 변이 도입 부위의 직후(3' 측)의 서열에 대응하는 센스 프라이머와, 상기 DNA의 3' 끝에 대응하는 안티센스 프라이머로 상기 DNA를 주형으로 하여 PCR를 행하여, 5' 끝에 변이가 도입된 상기 DNA의 변이 도입 부위에서부터 3' 끝까지의 단편 B를 증폭한다. 이들 증폭 단편끼리를 정제 후, 혼합하여 주형이나 프라이머를 가하지 않고서 PCR를 행하면, 증폭 단편 A의 센스쇄와 증폭 단편 B의 안티센스쇄는 변이 도입 부위가 공통되어 있기 때문에 하이브리다이즈하고, 프라이머 겸 주형으로서 PCR의 반응이 진행되어, 변이가 도입된 DNA가 증폭한다.

[0094] 취득한 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)에 기재된 DNA는, 그대로 또는 적당한 제한 효소 등으로 절단하여, 통상의 방법에 의해 벡터에 삽입하고, 얻어진 재조합체 DNA를 숙주세포에 도입한 후, 통상 이용되는 염기 서열 해석 방법, 예컨대 디데옥시법[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74,5463(1977)] 또는 어플라이드바이오시스템즈 3500 제네틱 애널라이저나 어플라이드바이오시스템즈 3730 DNA 애널라이저(모두 서모피셔사이엔티픽사 제조) 등의 염기 서열 분석 장치를 이용하여 분석함으로써 상기 DNA의 염기 서열을 결정할 수 있다.

[0095] DNA의 염기 서열을 결정할 때에 사용할 수 있는 숙주세포로서는, 예컨대 에세리키아 콜리 DH5α, 에세리키아 콜리 HST08 Premium, 에세리키아 콜리 HST02, 에세리키아 콜리 HST04 dam-/dcm-, 에세리키아 콜리 JM109, 에세리키아 콜리 HB101, 에세리키아 콜리 CJ236, 에세리키아 콜리 BMH71-18 mutS, 에세리키아 콜리 MV1184, 에세리키

아 콜리 TH2(모두 다카라바이오사 제조), 에세리키아 콜리 XL1-Blue, 에세리키아 콜리 XL2-Blue(모두 애질런트 테크놀로지사 제조), 에세리키아 콜리 DH1, 에세리키아 콜리 MC1000, 에세리키아 콜리 W1485, 에세리키아 콜리 W3110, 에세리키아 콜리 MP347, 에세리키아 콜리 NM522 등을 들 수 있다.

[0096] 상기한 벡터로서는, 예컨대 pBluescriptII KS(+), pPCR-Script Amp SK(+)(모두 애질런트테크놀로지사 제조), pT7Blue(메르크밀리포아사 제조), pCRII(서모피셔사이엔티픽사 제조), pCR-TRAP(진헌터사 제조) 및 pDIRECT[Nucleic Acids Res., 18,6069(1990)] 등을 들 수 있다.

[0097] 본 발명의 DNA를 삽입하여 얻는, 재조합 DNA의 숙주세포에의 도입 방법으로서는, 숙주세포에 DNA를 도입하는 방법이라면 어느 것이나 사용할 수 있다. 예컨대 칼슘 이온을 이용하는 방법(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69,2110, 1972), 프로토플라스트법(일본 특허공개 소63-248394호 공보), 일렉트로포레이션법(Nucleic Acids Res., 16,6127, 1988) 등을 들 수 있다.

[0098] 염기 서열을 결정한 결과, 취득된 DNA가 부분 길이였던 경우는, 상기 부분 길이 DNA를 프로브에 이용한 염색체 DNA 라이브러리에 대한 서던 하이브리다이제이션법 등에 의해, 전체 길이 DNA를 취득할 수 있다.

[0099] 또한, 결정된 DNA의 염기 서열 또는 서열 번호 7 혹은 11로 표시되는 염기 서열에 기초하여, 니혼테크노서비스사 제조의 NTS M 시리즈 DNA 합성 장치 등을 이용하여 화학 합성함으로써, 목적으로 하는 DNA를 조제할 수도 있다.

[0100] 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)에 기재한 DNA를 갖는 재조합체 DNA란, 예컨대 상기 DNA가 친주에 있어서 자율 복제 가능한 DNA이고, 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)의 어느 하나 이상에 기재한 DNA를 전사할 수 있는 위치에 프로모터를 함유하고 있는 발현 벡터에, 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)의 어느 하나 이상에 기재한 DNA가 삽입되어 있는 DNA를 말한다.

[0101] 친주에 있어서 염색체 내에 삽입할 수 있는 DNA이며, 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)의 어느 하나 이상에 기재한 DNA도 또한 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)에 기재한 DNA를 갖는 재조합체 DNA이다. 재조합체 DNA가 친주의 염색체 DNA에 삽입할 수 있는 DNA인 경우는 프로모터를 함유하고 있지 않아도 좋다.

[0102] 세균 등의 원핵생물을 친주로서 이용하는 경우는, 친주에 있어서 자율 복제 가능한 재조합체 DNA는, 프로모터, 리보솜 결합 서열, 상기 (a1)~(a3), (b1)~(b3) 및 (c1)~(c3)의 어느 하나 이상에 기재한 DNA 및 전사 종결 서열에 의해 구성된 재조합체 DNA인 것이 바람직하다. 프로모터를 제어하는 유전자가 포함되어 있어도 좋다. 리보솜 결합 서열인 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열과 개시 코돈의 사이를 적당한 거리(예컨대 6~18염기)로 조절한 재조합체 DNA를 이용하는 것이 바람직하다.

[0103] 친주에 있어서 자율 복제 가능한 재조합체 DNA에서는, 상기 DNA의 발현에는 전사 종결 서열은 반드시 필요하지는 않지만, 구조 유전자의 바로 아래에 전사 종결 서열을 배치하는 것이 바람직하다.

[0104] 발현 벡터로서는, 목적 DNA를 숙주에 도입하여 증식, 발현시키기 위한 적당한 핵산 분자라면 특별히 한정되지 않고, 플라스미드뿐만 아니라, 예컨대 인공 염색체, 트랜스포존을 이용한 벡터, 코스미드를 이용하여도 좋다.

[0105] 친주에 에세리키아속에 속하는 미생물을 이용하는 경우는, 발현 벡터로서는, 예컨대 pColdI, pSTV28, pSTV29, pUC118(모두 다카라바이오사 제조), pMW119(닛폰진사 제조), pET21a, pCOLADuet-1, pCDFDuet-1, pCDF-1b, pRSF-1b(모두 메르크밀리포아사 제조), pMAL-c5x(뉴잉클란드바이오랍스사 제조), pGEX-4T-1, pTrc99A(모두 지이헬스케어바이오사이엔스사 제조), pTrcHis, pSE280(모두 서모피셔사이엔티픽사 제조), pGEMEX-1(프로메가사 제조), pQE-30, pQE80L(모두 키아겐사 제조), pET-3, pBluescriptII SK(+), pBluescriptII KS(-)(모두 애질런트테크놀로지사 제조), pKYP10(일본 특허공개 소58-110600호 공보), pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48,669(1984)], pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53,277(1989)], pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82,4306(1985)], pTrS30[에세리키아 콜리 JM109/pTrS30(FERM BP-5407)로부터 조제], pTrS32[에세리키아 콜리 JM109/pTrS32(FERM BP-5408)로부터 조제], pTK31[APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2007, Vol.73, No.20, p6378-6385], pPAC31(국제공개 제98/12343호), pUC19[Gene, 33,103(1985)], pPA1(일본 특허공개 소63-233798호 공보) 등을 들 수 있다.

[0106] 상기 발현 벡터를 이용하는 경우의 프로모터로서는, 에세리키아속에 속하는 미생물의 세포 내에서 기능하는 것이라면 어떠한 것이라도 좋지만, 예컨대 trp 프로모터나 ilv 프로모터 등의 아미노산 생합성에 관여하는 유전자의 프로모터, uspA 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터, PR 프로모터, PSE 프로모터 등의 에세리키아 콜리나

파지 등에 유래하는 프로모터를 들 수 있다. 또한, trp 프로모터를 2개 직렬시킨 프로모터, tac 프로모터, trc 프로모터, lacT7 프로모터, letI 프로모터와 같이 인위적으로 설계 개변된 프로모터를 이용할 수도 있다.

[0107] 친주에 코리네형 세균을 이용하는 경우는, 발현 벡터로서는, 예컨대 pCG1(일본 특허공개 소57-134500호 공보), pCG2(일본 특허공개 소58-35197호 공보), pCG4(일본 특허공개 소57-183799호 공보), pCG11(일본 특허공개 소57-134500호 공보), pCG116, pCE54, pCB101(모두 일본 특허공개 소58-105999호 공보), pCE51, pCE52, pCE53[모두 Molecular and General Genetics, 196,175(1984)] 등을 들 수 있다.

[0108] 상기 발현 벡터를 이용하는 경우의 프로모터로서는, 코리네형 세균의 세포 내에서 기능하는 것이라면 어떠한 것이라도 좋지만, 예컨대 P54-6 프로모터[Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, p 674-679(2000)]를 들 수 있다.

[0109] 친주에 효모 균주를 이용하는 경우에는, 발현 벡터로서는 예컨대 YEp13(ATCC37115), YEp24(ATCC37051), YCp50(ATCC37419), pHS19, pHS15 등을 들 수 있다.

[0110] 상기 발현 벡터를 이용하는 경우의 프로모터로서는, 효모 균주의 세포 내에서 기능하는 것이라면 어떠한 것이라도 좋지만, 예컨대 PHO5 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터, gal1 프로모터, gal10 프로모터, 열충격 폴리펩티드 프로모터, MFα1 프로모터, CUP1 프로모터 등의 프로모터를 들 수 있다.

[0111] 본 발명의 재조합체 DNA는, 예컨대 상술한 방법에 의해 조제한 DNA 단편을 제한 효소 처리하거나 하여, 상기한 적당한 발현 벡터의 프로모터의 하류에 삽입함으로써 제작할 수 있다.

[0112] 여기서, 상기 DNA의 염기 서열을 숙주에서의 발현에 최적인 코돈으로 되도록 염기를 치환함으로써, 상기 DNA가 코드하는 단백질의 발현량을 향상시킬 수도 있다. 본 발명의 제조 방법에 이용되는 친주에 있어서의 코돈 사용 빈도 정보는 공공의 데이터베이스를 통해 입수할 수 있다.

[0113] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA를 갖는 재조합체 DNA를 숙주세포에 있어서 자율 복제 가능한 플라스미드로서 도입하는 방법으로서는, 예컨대 상술한 칼슘 이온을 이용하는 방법, 프로토플라스트법, 일렉트로포레이션법, 그리고 스페로플라스트법[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81,4889(1984)], 아세트산리튬법[J. Bacteriol., 153,163(1983)] 등의 방법을 들 수 있다.

[0114] 또한, CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA를 갖는 재조합체 DNA를 친주의 게놈에 삽입하는 경우는, 예컨대 상동 재조합에 의한 방법을 이용하면 된다. 즉, 목적 DNA의 도입을 일으키게 하는 염색체 영역의 일부를 결합한 DNA를, 미생물 세포 내에 받아들이게 하여, 상기 염색체 영역의 일부 영역에 있어서의 상동 재조합을 일으키게 함으로써 게놈에 삽입시킬 수 있다. 예컨대 에세리키아 콜리에서 자주 이용되는 상동 재조합을 이용한 방법으로서는, 람다 파지의 상동 재조합계를 이용하여 재조합체 DNA를 도입하는 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97,6641-6645(2000)]을 들 수 있다. 여기서, 도입을 일으키게 하는 염색체 영역으로서는, 특별히 제한되지 않지만, 필수가 아닌 유전자 영역, 혹은 필수가 아닌 유전자 영역 상류의 비유전자 영역이 바람직하다. 상기 DNA를 미생물 세포 내에 받아들이게 하는 방법으로서는, 숙주세포에 DNA를 도입하는 방법이라면 어느 것이나 사용할 수 있으며, 예컨대 상기한 칼슘 이온을 이용하는 방법, 프로토플라스트법, 일렉트로포레이션법 등을 들 수 있다.

[0115] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 코드하는 DNA를 갖는 재조합체 DNA를 발현 가능하게 친주에 도입함으로써 얻어진 미생물이라는 것은, 예컨대 상기 미생물의 상기 DNA의 전사량을 노던 블로팅에 의해, 또는 상기 미생물의 상기 단백질 생산량을 웨스턴 블로팅에 의해, 친주의 그것과 비교함으로써 확인할 수 있다.

[0116] 상기한 방법으로 조성한 미생물이 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물이라는 것은, 예컨대 이하의 방법에 의해 확인할 수 있다. 우선, 친주와 조성한 미생물을 각각 배지에 배양하여, 얻어지는 배양물로부터 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 포함하는 세포 추출액을 조제한다. 이어서, 상기 세포 추출액을 기질인 CTP와 P-콜린에 접촉시켜, CDP-콜린을 생성하게 한다. 마지막으로, 고속 크로마토그래피 또는 가스 크로마토그래피 등을 이용하는 일반적인 분석 방법에 의해 반응액 내 CDP-콜린을 검출함으로써, 조성한 미생물이 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물이라는 것을 확인할 수 있다.

[0117] 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물로서는, 구체적으로는 예컨대 실시예에서 후술하는 BL21/pET21a-LslicC 및 BL21/pET21a-AhlicC를 들 수 있다.

[0118] 본 발명에 있어서의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제는, 기질 특이성이 높고, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높은 것이 바람직하다. 구체적으로는 예컨대 CTP에 대한 반응성을 1로 한 경우, dCTP에

대한 반응성이 0.75 이하인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 이하의 순서로 0.60 이하, 0.50 이하, 0.40 이하, 더욱 바람직하게는 0.30 이하, 특히 바람직하게는 0.20 이하, 가장 바람직하게는 0.15 이하이다. CTP에 대한 반응성을 1로 한 경우의 dCTP에 대한 반응성은, 예컨대 [CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제와 P-콜린 및 dCTP를 공존시켰을 때의 dCDP-콜린의 생성량(mM)]/[CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제와 P-콜린 및 CTP를 공존시켰을 때의 CDP-콜린의 생성량(mM)]으로부터 산출할 수 있다.

[0119] 이와 같이 dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높은 기질 특이성을 보이는 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물을 이용함으로써, dCDP-콜린의 부생을 억제하면서 효율적으로 CDP-콜린을 제조할 수 있다.

[0120] 2. CDP-콜린의 제조 방법

[0121] 본 발명의 CDP-콜린의 제조 방법은, 상기한 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물을 이용하여 CDP-콜린을 제조하는 것을 포함한다.

[0122] CDP-콜린의 제조 방법으로서 종래부터 발효법 또는 생체 촉매를 이용한 방법이 알려져 있다(예컨대 일본 특허 제3369236호 공보; Y. Liu et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 101,1409, 2017.). 본 발명의 CDP-콜린의 제조 방법은, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높은, 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물을 이용함으로써, dCDP-콜린의 부생을 효과적으로 억제할 수 있고, 종래의 방법과 비교하여 효율적으로 CDP-콜린을 제조할 수 있다. 구체적으로는 예컨대 일본 특허 제3369236호 공보 및 Y. Liu et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 101,1409, 2017.에 기재된 CDP-콜린의 제조 방법에 있어서, CCT(choline phosphate cytidylyltransferase) 대신에 본 발명에 있어서의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 이용함으로써 본 발명의 효과를 얻을 수 있다.

[0123] 본 발명의 CDP-콜린을 제조하는 방법으로서는, (I) 발효법에 의해 CDP-콜린을 제조하는 방법, (II) 재조합 미생물의 배양물 및 상기 배양물의 처리물을 이용하여 CDP-콜린을 제조하는 방법을 들 수 있다. 이하, 각 제조 방법에 관해서 설명한다.

[0124] (I) 발효법에 의해 CDP-콜린을 제조하는 방법

[0125] 발효법에 의해 CDP-콜린을 제조하는 방법으로서는, 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물을 배지에 배양하여, 배양물 내에 CDP-콜린을 생성하게 하는 것을 특징으로 하는 CDP-콜린의 제조 방법을 들 수 있다. 상기 제조 방법은, 예컨대 배양물 중에 CDP-콜린을 생성시킨 후, 축적시켜, 상기 배양물 내에서 CDP-콜린을 채취하는 것을 포함하고 있어도 좋다.

[0126] 발효법에 의한 CDP-콜린의 제조 방법에 이용하는 재조합 미생물로서는, 상기 1의 본 발명의 재조합 미생물을 이용하는 것이 바람직하고, 또한, CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기질이 되는 CTP 및 P-콜린을 생성하는 능력을 갖는 미생물 및/또는 CTP, P-콜린 혹은 CDP-콜린의 분해 활성을 인공적으로 약화한 미생물인 것이 바람직하다.

[0127] 미생물의 배양은 통상의 방법에 따라서 실시할 수 있다. 상기 미생물을 배양하는 배지로서는, CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기질 또는 상기 기질의 출발 원료, 상기 미생물이 자화(資化)할 수 있는 탄소원, 질소원 및 무기염류 등을 함유하여 상기 미생물의 배양을 효율적으로 행할 수 있는 배지라면, 천연 배지, 합성 배지의 어느 것을 이용하여도 좋다.

[0128] CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기질로서는 예컨대 CTP 및 P-콜린을 들 수 있다. 기질의 출발 원료로서는 예컨대 오로트산, CMP, 염화콜린, 글루코오스 등을 들 수 있다. 탄소원으로서는, 상기 미생물이 자화할 수 있는 것이면 되며, 예컨대 글루코오스, 프럭토오스, 슈크로오스, 이들을 함유하는 당밀, 전분 및 전분 가수분해물 등의 탄수화물, 아세트산 및 프로피온산 등의 유기산, 그리고 에탄올 및 프로판올 등의 알코올류 등을 들 수 있다.

[0129] 질소원으로서는, 예컨대 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 아세트산암모늄 및 인산암모늄 등의 무기산 혹은 유기산의 암모늄염, 그 밖의 함질소 화합물, 그리고 펩톤, 고기 엑기스, 효모 엑기스, 옥수수 침지액, 카제인 가수분해물, 대두박 및 대두박 가수분해물, 각종 발효 균체 및 그 소화물 등을 들 수 있다.

[0130] 무기염으로서는, 예컨대 인산제1칼륨, 인산제2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨, 황산제1철, 황산망간, 황산구리 및 탄산칼슘 등을 들 수 있다.

[0131] 발효법에 의한 CDP-콜린의 제조 방법에 있어서, 이용하는 미생물이 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기질이 되는 CTP 및 P-콜린을 생성하는 능력을 갖고 있지 않은 경우에는, CTP 및 P-콜린을 배지에 첨가한다.

[0132] 또한, 발효법에 의한 CDP-콜린의 제조 방법에 있어서, 이용하는 미생물이 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 기질이 되는 CTP 및 P-콜린을 생성하는 능력을 갖고 있지 않은 경우에는, CTP 및 P-콜린을 배지에 첨가하는 대신에, CTP 및/또는 P-콜린을 생성하는 능력을 갖는 미생물을 본 발명의 재조합 미생물과 공배양함으로써, 본 발명의 재조합 미생물에 CTP 및 P-콜린을 공급하여도 좋다.

[0133] 배양은 통상 진탕 배양 또는 심부 통기 교반 배양 등의 호기적 조건 하에서 행하는 것이 바람직하다. 배양 온도는 15~40℃가 바람직하고, 배양 시간은 통상 5시간~7일간이다. 배양 중에 pH는 3.0~9.0으로 유지하는 것이 바람직하다. pH는 무기 또는 유기의 산, 알칼리 용액, 요소, 탄산칼슘, 암모니아 등을 이용하여 조정한다.

[0134] 또한, 배양 중 필요에 따라서 암피실린이나 테트라사이클린 등의 항생 물질을 배지에 첨가하여도 좋다. 프로모터로서 유도성의 프로모터를 이용한 발현 벡터로 형질전환한 미생물을 배양할 때에는, 필요에 따라서 인듀서를 배지에 첨가하여도 좋다.

[0135] 예컨대 lac 프로모터를 이용한 발현 벡터로 형질전환한 미생물을 배양할 때에는 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 등을, trp 프로모터를 이용한 발현 벡터로 형질전환한 미생물을 배양할 때에는 인돌아크릴산 등을 배지에 첨가하여도 좋다.

[0136] 상기한 배양에 의해 배양물 내에 CDP-콜린을 생성하게 함으로써 CDP-콜린을 제조할 수 있다. CDP-콜린의 정량은 HPLC(예컨대 시마즈세이사쿠쇼사 제조의 분석 장치 SPD-M20A)를 이용하여 실시할 수 있다.

[0137] 상기 배양물로부터의 CDP-콜린의 채취는 통상 이온 교환 수지법, 침전법, 그 밖의 공지된 방법을 조합함으로써 실시할 수 있다. 또한, 균체 내에 CDP-콜린이 축적하는 경우에는, 예컨대 균체를 초음파 등에 의해 파쇄하고, 원심 분리에 의해서 균체를 제거하여 얻어지는 상청으로부터 이온 교환 수지법 등에 의해서 CDP-콜린을 채취할 수 있다.

[0138] (II) 재조합 미생물의 배양물 및 상기 배양물의 처리물을 이용하여 CDP-콜린을 제조하는 방법

[0139] 재조합 미생물의 배양물 및 상기 배양물의 처리물을 이용하여 CDP-콜린을 제조하는 방법은, 효소원으로서의, 이종의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제를 생산하는 능력을 갖는 재조합 미생물의 배양물 또는 상기 배양물의 처리물과 기질을 수성 매체 내에 존재하게 하여, 상기 수성 매체 내에 CDP-콜린을 생성하게 하는 것을 특징으로 한다. 상기 제조 방법은, 예컨대 수성 매체 내에 CDP-콜린을 생성시킨 후, 축적시켜, 상기 수성 매체 내에서 CDP-콜린을 채취하는 것을 포함하고 있어도 좋다.

[0140] 미생물을 배양하는 방법 및 배지는 (I)에서 상술한 것과 동일하다.

[0141] 본 명세서에 있어서, 배양물의 처리물로서는, 예컨대 상기한 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물을 원심 분리 또는 여과하거나 하여 얻어지는 균체, 상기 균체의 건조물, 상기 균체의 동결 건조물, 상기 균체의 계면활성제 처리물, 상기 균체의 용매 처리물, 상기 균체의 효소 처리물 및 상기 균체의 고정화물 등의 효소원으로서 상기 배양물과 같은 기능을 유지하는 생균체를 포함하고 있는 것, 그리고 상기 균체의 초음파 처리물, 상기 균체의 기계적 마쇄 처리물, 상기 처리한 균체로부터 얻어지는 정제하지 않은 효소 추출물 및 상기 처리한 균체로부터 얻어지는 정제 효소를 들 수 있다.

[0142] 이들 중에서도 바람직하게는 상기한 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물을 원심 분리 또는 여과하거나 하여 얻어지는 균체, 상기 균체의 건조물, 상기 균체의 동결 건조물, 상기 균체의 계면활성제 처리물, 상기 균체의 용매 처리물, 상기 균체의 효소 처리물 및 상기 균체의 고정화물 등의 효소원으로서 상기 배양물과 같은 기능을 유지하는 생균체를 포함하고 있는 것, 그리고 상기 균체의 초음파 처리물, 상기 균체의 기계적 마쇄 처리물을 들 수 있고, 가장 바람직하게는 상기한 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물을 원심 분리 또는 여과하거나 하여 얻어지는 균체, 상기 균체의 건조물, 상기 균체의 동결 건조물, 상기 균체의 계면활성제 처리물, 상기 균체의 용매 처리물, 상기 균체의 효소 처리물 및 상기 균체의 고정화물 등의 효소원으로서 상기 배양물과 같은 기능을 유지하는 생균체를 포함하고 있는 것을 들 수 있다.

[0143] 효소원으로서의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제의 양은 1~500 g/l인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 1~300 g/l이다.

[0144] 기질의 농도는 0.1 mM~10 M인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 1 mM~1 M이다. 기질로서는 예컨대 CTP 및

P-콜린을 들 수 있다.

[0145] 수성 매체로서는, 예컨대 물, 인산염, 탄산염, 아세트산염, 붕산염, 시트르산염 및 트리스 등의 완충액, 메탄올 및 에탄올 등의 알코올류, 아세트산에틸 등의 에스테르류, 아세톤 등의 케톤류, 그리고 아세트아미드 등의 아미드류 등을 들 수 있다. 또한, 효소원으로서 이용한 미생물의 배양액을 수성 매체로서 사용할 수 있다.

[0146] CDP-콜린의 생성 반응에 있어서는, 필요에 따라서 피틴산 등의 킬레이트제, 계면활성제 혹은 유기 용매를 첨가하여도 좋다. 계면활성제로서는, 폴리옥시에틸렌·옥타데실아민(예컨대 나이민 S-215, 니혼유시사 제조) 등의 비이온 계면활성제, 세틸트리메틸암모늄·브로마이드나 알킬디메틸·벤질암모늄클로라이드(예컨대 양이온 F2-40E, 니혼유시사 제조) 등의 양이온계 계면활성제, 라우로일·자르코시네이트 등의 음이온계 계면활성제, 알킬디메틸아민(예컨대 3급 아민 FB, 니혼유시사 제조) 등의 3급 아민류 등, CDP-콜린의 생성을 촉진하는 것이라면 어느 것이라도 좋고, 1종 또는 여러 종류를 혼합하여 사용하여도 좋다. 계면활성제는 통상 0.1~50 g/l의 농도로 이용된다.

[0147] 유기 용매로서는, 크실렌, 톨루엔, 지방족 알코올, 아세톤, 아세트산에틸 등을 들 수 있고, 통상 0.1~50 ml/l의 농도로 이용된다. CDP-콜린의 생성 반응은, 수성 매체 중, pH 5~10, 바람직하게는 pH 6~8, 20~50℃의 조건으로 1~96시간 행한다. 상기 생성 반응을 촉진시키기 위해서, 아데닌, 아데노신-5'-일인산(AMP),아데노신-5'-삼인산(ATP), 황산마그네슘, 염화마그네슘 등을 첨가하여도 좋다. 아데닌, AMP, ATP는 통상 0.01~100 mM의 농도로 이용된다.

[0148] 수성 매체 중에 생성된 CDP-콜린은 (I)에서 상술한 방법에 의해 정량 및 채취할 수 있다.

[0149] **실시예**

[0150] 이하에 본 발명의 실시예를 나타내지만, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0151] [분석예]

[0152] HPLC법에 의한 CDP-콜린 및 dCDP-콜린은 시마즈세이사쿠쇼사 제조의 분석 장치 SPD-M20A를 이용하여 이하의 조건으로 분석했다.

[0153] 컬럼: Shodex Asahipak

[0154] 분석 온도: 50℃

[0155] 유속: 0.5 ml/min

[0156] 용리액 조성: 30 mM 인산이수소칼륨/10% 아세토니트릴(pH 3.5)

[0157] 검출기: SPD-M20A

[0158] 표품으로서 CDP-콜린(교와핫코바이오사 제조)을 각각 0, 0.005, 0.01, 0.02 g/L의 농도로 함유하는 용액을 분석에 제공하여, 유지 시간 10.56 min의 피크의 영역치로부터 검량선을 작성했다. 샘플은 0.005~0.02 g/L의 농도가 되도록 희석하여 분석에 제공하고, 유지 시간 10.56 min의 피크의 영역치로부터 검량선을 이용하여 샘플 내에 포함되는 CDP-콜린의 정량을 행했다. dCDP-콜린의 표품은 입수가 곤란하므로, 유지 시간 9.37 min의 피크의 영역치로부터 CDP-콜린의 검량선을 이용하여 dCDP-콜린의 정량을 행했다.

[0159] [실시예 1] 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제(SplicC)를 코드하는 DNA로 친주를 형질전환하여 얻어지는 미생물의 조성

[0160] 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열을 갖는 염색체 DNA(GenBank: CP053210.1)를 주형으로 하고, 서열 번호 2 및 3으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 프라이머 셋트로 하여 PCR를 행했다. 서열 번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 포함하는 약 700 bp의 DNA 단편을 정제했다.

[0161] 발현 벡터인 pET21a(Novagen사 제조)를 주형으로 하고, 서열 번호 4 및 5로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 프라이머 셋트로 하여 PCR를 행하여, 약 5.2 kbp의 DNA 단편(이하, pET21a Inverse 단편이라고 한다)을 정제했다.

[0162] 상기한 2종류의 DNA 단편을 In-Fusion HD Cloning Kit(다카라바이오사 제조)를 이용하여 연결하고, 상기 연결 반응액을 이용하여 에세리키아 콜리 BL21주를 형질전환함으로써, BL21/pET21a-SplicC를 조성했다(인서트의 아미노산 서열을 서열 번호 6에 기재한다).

[0163] [실시예 2] 락토바실러스 살리바리우스 유래의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제(LslicC)를 코드하는 DNA로 친주를 형질전환하여 얻어지는 미생물의 조성

[0164] 서열 번호 7로 표시되는 염기 서열을 갖는 염색체 DNA(GenBank: CP011403.1)를 주형으로 하고, 서열 번호 8 및 9로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 프라이머 셋트로 하여 PCR를 행했다. 서열 번호 7로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 포함하는 약 700 bp의 DNA 단편을 정제했다.

[0165] 상기 DNA 단편 및 pET21a Inverse 단편을 In-Fusion HD Cloning Kit를 이용하여 연결하고, 상기 연결 반응액을 이용하여 에세리키아 콜리 BL21주를 형질전환함으로써, BL21/pET21a-LslicC를 조성했다(인서트의 아미노산 서열을 서열 번호 10에 기재한다).

[0166] [실시예 3] 아나에로코커스 하이드로게날리스 유래의 CTP:포스포콜린 시티딜트랜스페라아제(AhlicC)를 코드하는 DNA로 친주를 형질전환하여 얻어지는 미생물의 조성

[0167] 서열 번호 11로 표시되는 염기 서열을 갖는 염색체 DNA(GenBank: NZ_ABXA01000041.1)를 주형으로 하고, 서열 번호 12 및 13으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 프라이머 셋트로 하여 PCR를 행했다. 서열 번호 11로 표시되는 염기 서열로 이루어진 DNA를 포함하는 약 700 bp의 DNA 단편을 정제했다.

[0168] 상기 DNA 단편 및 pET21a Inverse 단편을 In-Fusion HD Cloning Kit를 이용하여 연결하고, 상기 연결 반응액을 이용하여 에세리키아 콜리 BL21주를 형질전환함으로써, BL21/pET21a-AhlicC를 조성했다(인서트의 아미노산 서열을 서열 번호 14에 기재한다).

[0169] Lipman-Pearson법에 의해, SplicC, LslicC 및 AhlicC를 코드하는 아미노산 서열의 동일성을 해석한 결과를 표 1에 나타낸다.

표 1

[0170]

동일성(%)	SplicC	LslicC	AhlicC
SplicC		33	31
LslicC	33		62
AhlicC	31	62	

[0171] 표 1에 나타내는 것과 같이, LslicC와 AhlicC는 60% 이상의 동일성을 보였다. 한편, SplicC는 LslicC 및 AhlicC와의 동일성이 30% 정도로 낮아, 60% 미만이었다.

[0172] [실시예 4] CTP 또는 dCTP 및 P-콜린을 기질로서 이용하는 CDP-콜린 또는 dCDP-콜린의 제조

[0173] BL21/pET21a-SplicC 그리고 BL21/pET21a-LslicC 및 BL21/pET21a-AhlicC를 암피실린 100 mg/ml를 포함하는 LB 배지[박토트립톤(디프코사 제조) 10 g/l, 효모 엑기스(디프코사 제조) 5 g/l, 염화나트륨 10 g/l] 5 ml가 들어간 대형 시험관에 접종하여, 30℃에서 16시간 배양했다. 상기 배양액을 암피실린 100 mg/ml를 포함하는 LB 배지 50 ml가 들어간 배플이 달린 삼각플라스크에 1% 접종하여, 30℃, 220 rpm으로 24시간 배양했다. 배양 시작에서부터 2시간째에 IPTG 0.1 mM을 첨가했다. 상기 배양액 50 ml분을 원심 분리하여 습균체(濕菌體)를 취득했다.

[0174] 각 균주의 배양액 각 50 ml분을, 현탁 버퍼[50 mM 인산 완충액(pH 7.0)] 5 ml에 현탁하여, 초음파 파쇄를 행했다. 파쇄 후 5,800×g으로 10분간 원심하여, 미파쇄 균체를 침전시킨 후, 상청을 채취했다. 상청은 Bradford법을 이용하여 단백량을 정량하여, 반응에 이용했다.

[0175] 반응은 150 mM의 인산수소이칼륨-HCl(pH 7.0)(후지필름와코쥰야쿠사 제조), 25 mM의 염화마그네슘육수화물(간토가가쿠사 제조), 5 mM의 CTP 또는 dCTP(모두 시그마알드리치사 제조), 5 mM의 P-콜린(도쿄가세이고교사 제조)을 포함하는 반응액에 상술한 상청 단백질액을 종농도 0.1 mg/ml가 되도록 첨가하여, 30℃, 1,000 rpm으로 진탕함으로써 행했다. 반응 시작 후 10분이 경과한 시점에서 1/5량의 0.6N 아세트산(후지필름와코쥰야쿠사 제조)을 첨가함으로써 반응을 종료시켰다.

[0176] 시험은 독립적으로 3회 행하고, HPLC법에 의해 CDP-콜린 및 dCDP-콜린의 정량을 행하여, 평균±표준편차의 값을

구했다. 결과를 표 2 및 도 1에 나타낸다.

표 2

[0177]

	SplicC	LslicC	AhlicC
CDP-콜린(mM)	0.950±0.101	1.717±0.026	1.666±0.149
dCDP-콜린(mM)	0.749±0.057	0.036±0.010	0.252±0.067
dCDP-콜린/CDP-콜린	0.790±0.035	0.021±0.006	0.149±0.030

[0178] 표 2 및 도 1에 나타내는 것과 같이, 결정 구조가 밝혀진 SplicC보다도 LslicC, AhlicC 쪽이 dCDP-콜린/CDP-콜린의 값이 낮아, CTP에 대한 반응성을 1로 한 경우, dCTP에 대한 반응성이 0.15 이하였다. 이 결과로부터, LslicC 및 AhlicC는, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높다고 하는 우수한 기질 특이성을 보이는 것이 드러났다. 또한, 표 1에 나타내는 아미노산 서열의 동일성을 고려하면, LslicC의 아미노산 서열(서열 번호 10) 또는 AhlicC의 아미노산 서열(서열 번호 14)에 대하여 60% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드는, dCTP에 대한 반응성에 비해서 CTP에 대한 반응성이 높다고 하는 우수한 기질 특이성을 보이는 것이 드러났다.

[0179] 본 발명을 특정 양태를 참조하여 상세하게 설명했지만, 본 발명의 정신과 범위를 벗어나지 않고서 여러 가지 변경 및 수정이 가능하다는 것은 당업자에게 있어서 분명하다. 또, 본 출원은 2021년 9월 10일자로 출원된 일본 특허출원(특원 2021-147985)에 기초하며, 그 전체가 인용에 의해 원용된다. 또한, 여기에 인용되는 모든 참조는 전체적으로 받아들여진다.

[0180] **서열목록 자유텍스트**

[0181] 서열 번호 1: SplicC의 염기 서열

[0182] 서열 번호 2: SplicC 클로닝용 프라이머_Fw의 염기 서열

[0183] 서열 번호 3: SplicC 클로닝용 프라이머_Rv의 염기 서열

[0184] 서열 번호 4: pET21a Inverse용 프라이머_Fw의 염기 서열

[0185] 서열 번호 5: pET21a Inverse용 프라이머_Rv의 염기 서열

[0186] 서열 번호 6: pET21a-SplicC의 인서트의 아미노산 서열

[0187] 서열 번호 7: LslicC의 염기 서열

[0188] 서열 번호 8: LslicC 클로닝용 프라이머_Fw의 염기 서열

[0189] 서열 번호 9: LslicC 클로닝용 프라이머_Rv의 염기 서열

[0190] 서열 번호 10: pET21a-LslicC의 인서트의 아미노산 서열

[0191] 서열 번호 11: AhlicC의 염기 서열

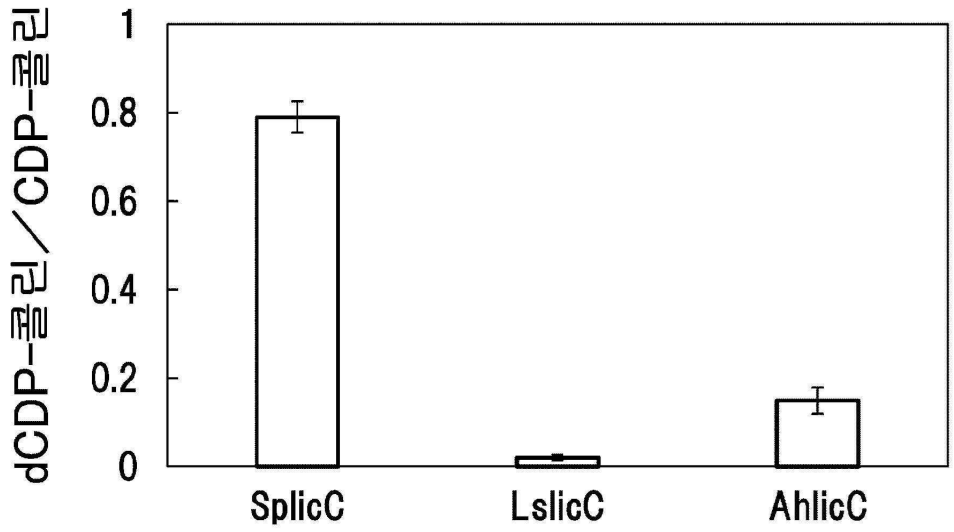
[0192] 서열 번호 12: AhlicC 클로닝용 프라이머_Fw의 염기 서열

[0193] 서열 번호 13: AhlicC 클로닝용 프라이머_Rv의 염기 서열

[0194] 서열 번호 14: pET21a-AhlicC의 인서트의 아미노산 서열

도면

도면1



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.