

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-512877

(P2018-512877A)

(43) 公表日 平成30年5月24日(2018.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C O 7 K 14/34 (2006.01)	C O 7 K 14/34	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
C 1 2 P 13/08 (2006.01)	C 1 2 P 13/08 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2017-555259 (P2017-555259)	(71) 出願人	513178894
(86) (22) 出願日	平成28年3月11日 (2016. 3. 11)		シージェイ チェイルジェダン コーポレ ーション
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月20日 (2017. 10. 20)		大韓民国、ソウル 100-400、チュ ング、トンホーロ、330
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/002480	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開番号	W02016/171392		弁理士 高島 一
(87) 国際公開日	平成28年10月27日 (2016. 10. 27)	(74) 代理人	100125070
(31) 優先権主張番号	10-2015-0055495		弁理士 土井 京子
(32) 優先日	平成27年4月20日 (2015. 4. 20)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100163658
			弁理士 小池 順造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルコネートリプレッサー変異体、これを含むL-リシンを生産する微生物及びこれを利用したL-リシン生産方法

(57) 【要約】

本発明は新規グルコネートリプレッサー変異体、それを含む微生物及び、それをを用いたL-リシン生産方法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、グルコネートリプレッサー活性を有するポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2 の塩基配列を有するものである、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリペプチドを発現する、L-リシンを生産するコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 6】

前記コリネバクテリウム属微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項 5 に記載の L-リシンを生産するコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 7】

(a) 請求項 5 または 6 に記載のコリネバクテリウム属微生物を培地で培養する段階；及び

(b) 前記 (a) 段階で培養された微生物または培養培地から L-リシンを回収する段階を含む、L-リシンを生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規グルコネートリプレッサー変異体、それを含む微生物、及びそれを利用した L-リシン生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アミノ酸など有用産物の大量生産のためにコリネバクテリウム菌株で糖の流入とペントースリン酸化経路の調節は非常に重要である（非特許文献 1）。

【0003】

グルコネートリプレッサー（Gluconate repressor、GntR）は、糖流入及びペントースリン酸化経路を介して炭素の流れを調節する重要な調節タンパク質であって、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株には、2つのグルコネートリプレッサー（GntR1及びGntR2）が知られている。GntR1及びGntR2はグルコネート（gluconate）代謝に関連するグルコネートパーミアーズ（gluconate permease、gntP）、グルコネートキナーゼ（gluconate kinase、gntK）、6-ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼ（6-phosphogluconate dehydrogenase、gnd）を暗号化する遺伝子の発現を強く抑制し、ペントースリン酸化経路の主要な遺伝子である t k t - t a l - z w f - o p c A - d e v B オペロンの発現を弱く抑制する役割をする。一方、コリネバクテリウム菌株の主要な糖流入代謝経路であるホスホトランスフェラーゼシステム（Phospho-Transferase System、PTS）のブドウ糖特異的トランスポーター酵素II（glucose-specific transpoter enzyme II、ptsG）及び原糖特異的トランスポーター酵素II（sucrose-specific transpoter enzyme II、ptsS）を暗号化する遺伝子の発現を促進し、糖流入に関しても重要に参与する（非特許文献 2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

10

20

30

40

50

【特許文献1】韓国特許登録特許第10-0924065号

【特許文献2】韓国特許登録特許第10-0159812号

【特許文献3】韓国特許登録特許第10-0397322号

【特許文献4】韓国特許登録特許第10-0073610号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. 2005. 215-240

【非特許文献2】Julia Frunzke, Verena Engels, Sonja Hasenbein, Cornelia Gatgens and Michael Bott, *Molecular Microbiology* (2008) 67(2), 305-322

【非特許文献3】Binder et al. *Genome Biology* 2012, 13:R40

10

【非特許文献4】*J. Biol. Chem.* 1948. 176:367-388

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らはL-リシン生産性に有効な効果を与える遺伝子を発掘しようとして鋭意努力した結果、新規変異型グルコネートリプレッサー1 (Gluconate repressor、GntR1)を開発し、それを含むL-リシンを生産する微生物の場合、野生型グルコネートリプレッサー1を含む微生物に比べて、糖の消費速度及びL-リシン生産性の向上が確認されることにより、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

20

【0007】

本発明の一つの目的は、グルコネートリプレッサータンパク質の新規な変異体を提供することにある。

【0008】

本発明の他の目的は、前記変異体をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供することにある。

【0009】

本発明のもう一つの目的は、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体を発現する、L-リシンを生産する微生物を提供することにある。

【0010】

30

本発明のもう一つの目的は、(a)前記L-リシンを生産する微生物を培地で培養する段階;及び(b)前記(a)段階で培養された微生物または培養培地からL-リシンを回収する段階を含む、L-リシンを生産する方法を提供することにある。

【発明の効果】

【0011】

本発明に係るグルコネートリプレッサー変異体を含むL-リシンを生産する微生物は、前記変異体を含まない微生物に比べて、向上された糖の消費速度を示し、L-リシンの効果的な生産をもたらすことができる。特に、L-リシンは、動物飼料の必須アミノ酸で産業的に大量生産が要求されるところ、本発明に基づいて、高効率でL-リシンを生産すると、飼料製造のコストの削減効果も得ることができる。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明を具現する一つの様態は、グルコネートリプレッサータンパク質の新規な変異体を提供する。

【0013】

本発明における用語、「グルコネートリプレッサータンパク質」は、グルコネート代謝または糖流入などに関与する調節タンパク質を意味する。前記グルコネートリプレッサータンパク質は、特にこれに限定されないが、コリネバクテリウム属微生物、具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のグルコネートリプレッサータンパク質であってもよく、より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のGntR1タンパク

50

質であってもよいが、これらに限定されない。前記グルコネートリプレッサータンパク質は、その例として、配列番号4のアミノ酸配列を有するG n t R 1であってもよいが、これらに限定されない。例えば、前記グルコネートリプレッサータンパク質は配列番号4のアミノ酸配列及びこれと80%以上、具体的には、90%以上、より具体的には、95%以上、さらに具体的には、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。また、前記配列番号4のアミノ酸配列を有するグルコネートリプレッサータンパク質は、配列番号3の塩基配列を有するg n t R 1遺伝子によりコードされるものであってもよいが、これらに限定されない。例えば、前記配列番号3の塩基配列及びこれと80%以上、具体的には、90%以上、より具体的には、95%以上、さらに具体的には、99%以上の同一性を有する塩基配列であってよい。

10

【0014】

本願における用語、「同一性」は、二つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド部分(moiety)間の同一性のパーセントをいう。一つの部分から他の一つの部分までの配列間の同一性は周知の当該技術により決定されうる。例えば、同一性は、配列情報を整理して容易に入手可能なコンピュータプログラムを利用して二つのポリヌクレオチド分子または二つのポリペプチド分子間の配列情報を直接に整理して決定されてもよい。前記コンピュータプログラムはB L A S T (NCBI), C L C M a i n W o r k b e n c h (CLC bio), M e g A l i g n T M (DNASTAR Inc)などであってもよい。また、ポリヌクレオチド間の同一性は、相同領域間の安定された二本鎖を形成する条件下で、ポリヌクレオチドを混成化した後、一本鎖特異的ヌクレアーゼにより分解させて、分解された断片のサイズを決定することにより、決定してもよい。

20

【0015】

前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体は、配列番号4のアミノ酸配列から102番目のアミノ酸であるアルギニン(arginine、R)がアルギニン以外のアミノ酸に置換されたポリペプチドであってもよい。具体的には、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体は、102番目の位置のアルギニンがシステイン(cysteine、C)に置換されて、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。

【0016】

これらのグルコネートリプレッサータンパク質の変異体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドだけでなく、これと80%以上、具体的には、90%以上、より具体的には、95%以上、さらに具体的には、99%以上の同一性を有する変異体であって、実質的に配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質と同一であるか、相応する生物学的活性を有するアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたアミノ酸配列を有する場合も、本発明の範囲に含まれるのは自明である。

30

【0017】

本発明のもう一つの形態は、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体をコードするポリヌクレオチド及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターである。

【0018】

前記グルコネートリプレッサータンパク質及びその変異体については、前記で説明した通りである。

40

【0019】

具体的に、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドだけでなく、80%以上、具体的には、90%以上、より具体的には、95%以上、さらに具体的には、99%以上の同一性を有するポリヌクレオチドであってもよい。前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体をコードするポリヌクレオチドは、その例として、配列番号2の塩基配列を有してもよいが、これに限定されるものではない。

【0020】

本発明における用語、「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチド単位体が共有結合により長く鎖状に繋がったヌクレオチドの重合体であって、一般的に一定の長さ以上のDNAま

50

たはRNA鎖を意味する。前記ポリヌクレオチドは、遺伝暗号の縮退性 (genetic code degeneracy) に起因して、同一のアミノ酸配列をコードする、多様なヌクレオチド配列を有することができる。また、宿主細胞の種類に応じて発現を最適化するために、コドン最適化された配列を有することができる。

【0021】

本発明における用語、「ベクター」は、宿主細胞へのポリヌクレオチドのクローニング及び/または転移のための任意の媒介物をいう。ベクターは他のDNA断片が結合して、結合された断片の複製をもたらすことができる複製単位 (replicon) であってもよい。「複製単位」とは、生体内でDNA複製の自家ユニットとして機能する、即ち、自らの調節により複製可能である任意の遺伝的単位 (例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウィルス) をいう。本発明において、ベクターは宿主の中で複製可能であるものであれば、特に限定されず、当業界に公知の任意のベクターを用いてもよい。前記組換えベクターの製作に使用されるベクターは、天然状態であるか、組換えされた状態のプラスミド、コスミド、ウィルス、及びバクテリアファージであってもよい。例えば、ファージベクターまたはコスミドベクターとして、pWE15、M13、EMBL3、EMBL4、FIXII、DASHII、ZAPII、gt10、gt11、Charon4A、及びCharon21Aなどを使用してもよく、プラスミドベクターとしてpDZベクター、pBR系、pUC系、pBluescriptII系、pGEM系、pTZ系、pCL系及びpET系などを使用してもよい。使用可能なベクターは、特に制限されるものではなく、公知された発現ベクターを使用してもよい。具体的には、pDZ (特許文献1;本願発明の全体として引用されて含まれる。) が使用されてもよいが、これに限定されない。

【0022】

本発明では、「形質転換」は、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体をコードするポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入して宿主細胞内で発現させることができるようにすることであり、形質転換された前記ポリヌクレオチドが宿主細胞内で発現することができれば、宿主細胞の染色体内挿入または染色体外に位置しているものであれ、制限なく含まれてもよい。

【0023】

前記ポリヌクレオチドは、自体的に発現されるに必要なすべての要素を含むポリ構造体である、発現カセット (expression cassette) の形態で宿主細胞に導入される。前記発現カセットは、通常、前記遺伝子に作動可能に連結されているプロモーター、転写終結信号、リボソーム結合部位及び翻訳終結信号を含む。前記発現カセットは、それ自体の複製が可能な発現ベクターの形態であってもよい。また、前記ポリヌクレオチドは、それ自体または発現カセットの形態として宿主細胞に導入され、宿主細胞で発現に必要な配列と作動可能に連結されているものであってもよいが、これに制限されない。

【0024】

本発明のもう一つの形態は、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体を発現する、L-リシンを生産する微生物である。

【0025】

前記グルコネートリプレッサータンパク質及びその変異体については、前記で説明した通りである。

【0026】

本発明における用語、「L-リシン」は、塩基性 -アミノ酸の一つであって、体内で合成されない必須アミノ酸であり、化学式は $[NH_2(CH_2)_4CH(NH_2)COOH]$ であるL-アミノ酸の一種を意味する。L-リシンは、オキサロ酢酸からリシン生合成経路を介して生合成され、NADPH依存性還元酵素がリシン生合成のための中間過程を触媒する。1分子のL-リシン生合成過程で3分子のNADPHが糖酵素によって直接的に消費され、1分子のNADPHが間接的に利用される。

【0027】

前記微生物は、突然変異によって前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体を含むか、前記グルコネートリプレッサータンパク質の変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターによって形質転換されたものであってもよい。

【0028】

前記微生物は、当該グルコネートリプレッサータンパク質の変異体の活性を有するタンパク質を含むか、当該タンパク質が発現できるように形質転換されるものであれば、原核微生物及び真核微生物いずれのものであっても含まれてもよい。例えば、エシェリキア (*Escherichia*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属、エンテロバクテリア (*Enterobacteria*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属またはコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属などの微生物菌株が含まれてもよい。具体的には、コリネバクテリウム属に属する微生物であり、より具体的にはコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) であってよいが、これに限定されない。

10

【0029】

本発明のグルコネートリプレッサータンパク質の変異体タンパク質が、L-リシンを生産する微生物に含まれる場合、野生型グルコネートリプレッサータンパク質を含む微生物に比べて糖を効果的に消費してL-リシンの生産能を高めることができる。

【0030】

前記L-リシンを生産する微生物は、L-リシン生産能を有するものであれば、微生物の種類に制限なく含まれ、天然型菌株及び組換え菌株の形態をすべて含む。

20

【0031】

L-リシン生産能を有し得るコリネバクテリウム属微生物は、L-リシン類似体に耐性を持つ変異株になることもある。L-リシン類似体は、コリネ微生物の生育を阻害するが、これらの阻害は、L-リシンが培地に共存するときには、完全にまたは部分的に解除される。L-リシン類似体の例としては、オキサL-リシン、L-リシンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)、 α -メチルL-リシン、 α -クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのL-リシン類似体に対して耐性を有する変異株は、コリネバクテリウム属微生物に通常的人工変異処理で処理することにより得ることができるが、これに限定されない。これに対する非限定的な例として、コリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11016P(特許文献2、特許文献3)、コリネバクテリウム・グルタミカムKFCC11001、コリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11347P(特許文献4)が含まれるが、これに限定されない。

30

【0032】

また、L-リシン生産能を有し得るコリネバクテリウム属微生物は、L-リシン生合成関連タンパク質の活性が非変異菌株に比べて強化されるように変形されたものであってもよい。即ち、L-リシン生合成関連遺伝子1種以上の発現を向上させる場合を挙げることができる。これらの発現向上は、遺伝子増幅、プロモーターまたは開始コドンのような配列の交替あるいは変形、発現が向上されるように変異導入などでなされることがあるが、これに限定されない。これに対する非限定的な例として、コリネバクテリウム・グルタミカムCJ3P(非特許文献3)が含まれるが、これに限定されない。

40

【0033】

また、L-リシン生合成関連遺伝子の例としては、L-リシン生合成経路上に位置する遺伝子を挙げることができ、具体的にジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子(dapA)、アスパルトキナーゼ遺伝子(lysC)、ジヒドロジピコリン酸リダクターゼ遺伝子(dapB)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ddh)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(ppc)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(asd)、アスパルターゼ遺伝子(aspA)、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(PyC)を挙げることができるが、これらに限定されない。また、ペントースリン酸経路上に存

50

在するトランスケトラーゼ (t k t) などを挙げることができるが、これに限定されない。

【 0 0 3 4 】

一方、前記 L - リシン生産能を有することができるコリネバクテリウム属微生物は L - リシン生産と関連された当業界に公知された変異を含むようにして、L - リシン生産能を現すことができるが、これに制限されない。

【 0 0 3 5 】

本発明のもう一つの様態は、(a) 前記 L - リシンを生産する微生物を培地で培養する段階；及び(b) 前記(a) 段階で培養された微生物または培養培地から L - リシンを回収する段階を含む、L - リシンを生産する方法である。

10

【 0 0 3 6 】

前記 L - リシン、及びそれを製造する微生物については、前記で説明した通りである。

【 0 0 3 7 】

本願における用語、「培養」は、前記微生物を適当に人工的に調節した環境条件で生育させることを意味する。本願の培養過程は、当業界で知られている適当な培地と培養条件に応じて行うことができる。具体的な培養温度、培養時間及び培地の pH などの条件は、当業者の一般的な知識または従来公知の方法によって行うことができ、これにより適切に調節されてもよい。具体的には、これらの公知の培養方法は、文献[Chmiel; Bioprozesstechnik 1 Einfuhrung indie Bioverfahrenstechnik(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)、及びStorhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen(Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)]に詳細に記述されている。また、培養方法には回分式培養(batch culture)、連続式培養(cintinuous culture)及び流加式培養(fed-batch culture)が含まれてもよく、具体的には、パッチ工程または注入パッチまたは反復注入パッチ工程(fed batch or repeated fed batch process)において連続式で培養してもよいが、これに限定されるものではない。

20

【 0 0 3 8 】

培養に使用される培地は、適切な方法で特定菌株の要件を満たす必要がある。前記培地で用いられる炭素源としては、ブドウ糖、サッカロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、でん粉、セルロースのような糖及び炭水化物、大豆油、ひまわり油、ヒマシ油、ココナツ油などの油及び脂肪、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸のような脂肪酸、グリセロール、エタノールのようなアルコール、酢酸のような有機酸などが含まれてもよいが、これに限定されるものではない。これら物質は、個別または混合物として用いられてもよく、これに限定されない。用いられてもよい窒素源としては、ペプトン、酵母エキス、肉汁、麦芽エキス、トウモロコシ浸漬液、大豆、小麦、及び尿素または無機化合物、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムなどが含まれてもよく、窒素源も個別または混合物として用いられてもよく、これに限定されない。用いられてもよいリン源としては、リン酸二水素カリウムまたはリン酸水素二カリウムまたは相応するナトリウム含有塩などが含まれてもよく、これに限定されない。また、培養培地は成長に必要な硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄のような金属塩を含有してもよい。最後に、前記物質に加えてアミノ酸及びビタミンのような必須成長物質が用いられてもよい。また、培養培地に適切な前駆体が用いられてもよい。前記原料は、培養過程で培養物に適切な方法によって回分式または連続式で添加してもよいが、これに限定されない。

30

40

【 0 0 3 9 】

また、培養中に水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸及び硫酸のような化合物を培養物に適切な方法で添加して、培養物の pH を調整してもよい。培養中には脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を使用して気泡生成を抑制してもよい。また、培養物の好気状態を維持するために、培養物内に酸素または酸素含有気体を注入したり、嫌気及び微好気状態を維持するために気体の注入なしに、あるいは窒素、水素または二酸化炭素ガスを注入してもよい。培養物の温度は、通常 20 ~ 40、具体的に

50

は、30 ~ 35、または、これらに限定されるものではない。培養期間は、所望の有用物質の生成量を得るまで継続されてもよく、具体的には10 ~ 100時間であってもよい。L-リシン酸は、培養培地中に排出されるか、微生物中に含まれてもよい。

【0040】

また、本願のL-リシンを生産する方法には、培養された微生物または培養培地からL-リシンを回収する方法は、当業界に広く知られている。前記L-リシンの回収方法には、濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化及びHPLCなどが使用されてもよいが、これらの例に限定されるものではない。

【実施例】

【0041】

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0042】

実施例1：変異型コリネバクテリウム・グルタミカムゲノミック (genomic) DNAライブラリ製作

【0043】

本実施例では、L-リシン生産能及び生産性に有効な効果を与える遺伝子及び変異を発掘するためにコリネバクテリウム・グルタミカムATCC 13032菌株にN-メチル-N-ニトロ-N-ニトログアニジン (NTG) による人工突然変異を誘導した後、通常の公知の抽出法によってゲノミックDNAを抽出した。用意されたDNAに制限酵素Sau3AIを処理して、1 ~ 3 kbの部分切片を獲得した。前記切片を制限酵素BamHI末端を有する大腸菌及びコリネバクテリウムの形質転換用のシャトルベクターpECCG122に連結した後、大腸菌DH5に形質転換して、カナマイシン (25 mg/L) を含むLB固体培地に塗抹した。PCR (配列番号5及び6のプライマーを使用) を介して前記切片が挿入されたベクターで形質転換されたコロニーを選別した後、これらをすべて混合培養し、通常の公知であるプラスミド抽出法によってプラスミドを抽出した。

【0044】

配列番号5 : T C A G G G T G T A G C G G T T C G G T T T A T

【0045】

配列番号6 : C C G C G C G T A A T A C G A C T C A C T A T A

【0046】

実施例2：人工変異ライブラリの導入及びL-リシン生産能の向上菌株選別

【0047】

KCCM11016P (前記微生物はKFCC10881と公開されたが、ブダベスト条約下の国際寄託機関に再寄託されてKCCM11016Pと寄託番号を与えられた、特許文献2) 菌株を親菌株にして、前記製作されたベクターを形質転換して、下記の複合平板培地に塗抹した。

【0048】

<複合平板培地>

ブドウ糖20g、(NH₄)₂SO₄50g、ペプトン10g、酵母エキス5g、尿素1.5g、KH₂PO₄5g、K₂HPO₄10g、MgSO₄·7H₂O0.5g、ビオチン100μg、チアミン塩酸塩1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチン酸アミド2000μg、寒天20g、カナマイシン25mg (蒸留水1L基準)

【0049】

確保された約10,000個のコロニーをそれぞれ300μlの選別培地に接種して、96ディープウェルプレート (deep well plate) で32、1000rpmで約16時間培養した。培養中に生産されたL-リシンの生産量を分析するためにニンヒドリン方法を用いた (非特許文献4)。培養が完了した後、培養上清液10μlとニンヒドリン反応

10

20

30

40

50

溶液 190 μ l (63%グリセロール、27%ニンヒドリン溶液)を65 で30分間反応させた後、波長570nmで分光光度計で吸光度を測定し、対照区(KCCM11016P/pECCG122)の吸光度と比較して、類似または増加された吸光度を示す変異菌株248種を選別した。前記条件の培養時、対照区菌株は、1~2g/Lの残留糖が残っているため、対照区に比べ糖の消費速度が速くなったり、リシン生産能が増加された菌株を選別することができた。

【0050】

<選別培地(pH8.0)>

ブドウ糖10g、硫酸アンモニウム(ammonium sulfate)5.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2g、 KH_2PO_4 0.8g、 K_2HPO_4 16.4g、ビオチン100 μ g、チアミン塩酸塩1000 μ g、パントテン酸カルシウム2000 μ g、ニコチン酸アミド2000 μ g(蒸留水1L基準)

10

【0051】

また、選別された248種の菌株を対象に、前記の方法を繰り返して行い、KCCM11016P/pECCG122菌株に比べて、L-リシン生産能が10%以上向上された上位29種の変異菌株を選別した。

【0052】

実施例3：人工変異選別株のL-リシン生産能及び糖消費速度の分析

【0053】

前記実施例2で選別した29種の菌株のL-リシン生産能と糖消費速度を下記の方法で培養して分析した。

20

【0054】

種培地25mlを含有する250mlコーナープルフラスコに各菌株を接種して、30 で20時間、200rpmで振とう培養した。その後、生産培地24mlを含有する250mlコーナープルフラスコに1mlの種培養液を接種して、30 で72時間、200rpmで振とう培養した。HPLCを利用して、L-リシンの濃度を分析し、菌株の糖の消費速度及び生産性を測定するために時間帯別、培養液中の残留糖濃度を測定した。

【0055】

<種培地(pH7.0)>

ブドウ糖20g、ペプトン10g、酵母エキス5g、尿素1.5g、 KH_2PO_4 4g、 K_2HPO_4 8g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、ビオチン100 μ g、チアミン塩酸塩1000 μ g、パントテン酸カルシウム2000 μ g、ニコチン酸アミド2000 μ g(蒸留水1L基準)

30

【0056】

<生産培地(pH7.0)>

ブドウ糖100g、 $(NH_4)_2SO_4$ 40g、大豆タンパク質2.5g、トウモロコシ浸漬固形分(Corn Steep Solids)5g、尿素3g、 KH_2PO_4 1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、ビオチン100 μ g、チアミン塩酸塩1000 μ g、パントテン酸カルシウム2000 μ g、ニコチン酸アミド3000 μ g、 $CaCO_3$ 30g(蒸留水1L基準)。

40

【0057】

29種の変異菌株の中で対照区に比べてL-リシン濃度は同等レベル以上であり、糖の消費速度及び生産性が向上された3種の菌株を選別して、前記培養及び分析を繰り返して行い、分析された結果は、表1のようである。

【0058】

【表 1】

菌株番号		残留糖 (g/L)		L-リシン (g/L)	平均
		18 時間	28 時間		
KCCM11016P /pECCG122	1	50.9	38.2	43.1	43.4
	2	51.9	39.8	42.5	
	3	51.2	37.6	44.5	
KCCM11016P/ 3	1	47.9	34.2	43.3	43.4
	2	48.6	33.8	43.8	
	3	46.9	31.9	43.0	
KCCM11016P/ 94	1	47	33.7	44.5	44.3
	2	46.7	33.6	44.3	
	3	44.8	32.8	44.1	
KCCM11016P/ 1160	1	42.2	26.8	44.2	43.9
	2	43.5	25.4	44.1	
	3	42.9	24.3	43.5	

10

20

【0059】

前記3つの菌株は対照区と同等レベル以上のL-リシンを生産したが、単位時間当たりの糖の消費速度が対照区より向上されて発酵生産性が改善されたことを確認できた。選ばれた変異株の中、生産性が最も有意に向上された菌株KCCM11016P/1160を最終選別し、糖の消費速度及び生産性増加を誘発した根本的な遺伝子レベルでの塩基配列の突然変異を探索するためにプラスミドを抽出した。その後、配列番号5及び6のプライマーを用いて塩基配列を分析した。KCCM11016P/1160由来のプラスミドは、NCg12440遺伝子ORF開始コドンの上流約450bp地点から終止コドンの下流約350bp付近までが含まれていた。また、米国国立衛生研究所の遺伝子銀行(NIH GenBank)を基にした遺伝子の塩基配列分析を通じて、遺伝子がグルコネートリプレッサーのいずれか一つであるgntR1であることを確認し、KCCM11016P/1160菌株に導入されたgntR1変異は304番目の塩基配列がCからTに置換されて102番目のアミノ酸がアルギニンからシステインに突然変異されたことを確認した。

30

40

【0060】

即ち、配列番号4のアミノ酸配列を有するgntR1の102番目のアミノ酸であるアルギニンがシステインに置換されたことを確認した。

【0061】

実施例4：gntR1変異をL-リシン生産株の染色体に導入するためのベクター製作

【0062】

前記実施例3で確認されたgntR1変異適用効果を確認するために、これを染色体上に導入することができるベクターを製作した。

【0063】

50

報告された塩基配列に基づいて、5'末端にEcoRI制限酵素部位を挿入したプライマー（配列番号7）と3'末端にSalI制限酵素部位を挿入したプライマー（配列番号8）を合成した。このプライマー対を用いて、KCCM11016P/1160のプラスミドを鋳型としてPCRを行い、gntR1遺伝子断片を増幅した。PCR条件は、94で5分間変性後、94で30秒の変性、56で30秒のアニーリング、72で40秒の重合を30回繰り返した後、72で7分間重合反応を行った。

【0064】

配列番号 7 : A A G A A T T C A G C A G A T C G A A G A A G A A G C

【0065】

配列番号 8 : A A G T C G A C G G G A C T A A A A G C T G G C G

10

【0066】

PCRで増幅された遺伝子断片を制限酵素EcoRIとSalIで処理して、それぞれのDNA切片を獲得した後、これを制限酵素EcoRIとSalI末端を有する染色体導入用pDZベクター（特許文献1）に連結した後、大腸菌DH5に形質転換して、カナマイシン（25mg/L）が含まれたLB固体培地に塗抹した。PCRを使用して目的の遺伝子が挿入されたベクターで形質転換されたコロニーを選別した後、通常の公知のプラスミド抽出法を利用して、プラスミドを獲得し、このプラスミドのgntR1に挿入された変異に基づいてpDZ-gntR1（R102C）と命名した。

【0067】

実施例5：L-リシン生産株であるKCCM11016PにgntR1変異を導入した菌株の製作及び生産性の比較

20

【0068】

前記実施例4で製造した新規変異導入ベクターを2段階相同染色体組換えによってL-リシン生産菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11016Pに形質転換させた。その後、染色体上のgntR1変異が導入された菌株を塩基配列分析により選別し、前記gntR1変異が導入された菌株をKCCM11016P::gntR1（R102C）と命名した。

【0069】

実施例3と同様の方法で培養して、そこからL-リシン濃度および残留糖濃度を測定した。また、原糖における培養効果も確認するために、ブドウ糖の生産培地の代わりに原糖生産培地を用いて同様の方法で分析した（表2）。

30

【0070】

<原糖生産培地（pH7.0）>

原糖100g、(NH₄)₂SO₄40g、大豆タンパク質2.5g、トウモロコシ浸漬固形分（Corn Steep Solids）5g、尿素3g、KH₂PO₄1g、MgSO₄・7H₂O0.5g、ビオチン100μg、チアミン塩酸塩1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチン酸アミド3000μg、CaCO₃30g（蒸留水1基準）。

【0071】

【表 2】

	菌株番号	残留糖 (g/L)		L-リシン (g/L)	平均	
		18 時間	28 時間			
ブドウ糖	KCCM11016P	1	47.1	32.5	43.8	43.5
		2	46.2	33.8	42.6	
		3	45	32.0	44.1	
	KCCM11016P::GntR1 (R102C)	1	34.5	21.4	43.5	43.9
		2	39.5	21.2	44.2	
		3	37	20.6	43.9	
原糖	KCCM11016P	1	42.9	28.6	47.3	47.0
		2	42.0	29.1	46.	
		3	41.0	28.4	47.6	
	KCCM11016P::GntR1 (R102C)	1	34.1	17.2	47	47.4
		2	35.2	16.3	47.7	
		3	33.7	15.6	47.4	

10

20

【0072】

その結果、単位時間当たりの糖の消費速度はブドウ糖及び原糖培地で対照区であるKCCM11016Pに比べKCCM11016P::gntR1 (R102C)はL-リシン生産能には影響を与えずに、糖消費速度が増加したことを確認した。また、ブドウ糖及び原糖をすべて消費した時点を確認した結果、対照区は72時間、68時間に完全に消費してL-リシンをそれぞれ43.5g/L、47.0g/L生産しており、gntR1変異導入株は60時間、58時間にL-リシンをそれぞれ43.9g/L、47.4g/L生産した。即ち、gntR1変異を導入した菌株の場合には、時間当たりのL-リシンの生産性がブドウ糖、原糖においてそれぞれ21%、18%増加していることを確認した(表3)

30

【0073】

【表 3】

	菌株番号	生産性 (g/h)	%
ブドウ糖	KCCM11016P	0.60	100
	KCCM11016P::gntR1 (R102C)	0.73	121
原糖	KCCM11016P	0.69	100
	KCCM11016P::gntR1 (R102C)	0.82	118

40

【0074】

前記の結果は、gntR1変異の導入が同等レベルのL-リシン生産能を有しながらも

50

、ブドウ糖及び原糖消費速度に効果的であることが分かった。すなわち、本発明の g n t R 1 変異を導入した場合、L-リシン発酵生産性が改善される効果の優秀性を示唆するものである。そこで、本発明者らは、前記糖消費速度及び生産性が向上された菌株である K C C M 1 1 0 1 6 P :: g n t R 1 (R 1 0 2 C) をコリネバクテリウム・グルタミカム「C A 0 1 - 2 2 9 3」と命名し、2014年12月5日付けでブダペスト条約下の国際寄託機関である韓国微生物保存センター(K C C M)に寄託し、受託番号 K C C M 1 1 6 2 8 P を与えられた。

【0075】

実施例6：L-リシン生産株である K C C M 1 1 3 4 7 P に g n t R 1 変異を導入した菌株の製作及び生産性の比較

10

【0076】

コリネバクテリウム・グルタミカムに属する他の菌株においての効果も確認するために、前記実施例5と同様の方法でL-リシン生産菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカム K C C M 1 1 3 4 7 P (前記微生物は K F C C 1 0 7 5 0 と公開されたがブダペスト条約の下、国際寄託機関に再寄託されて、K C C M 1 1 3 4 7 P を与えられた、特許文献4)に g n t R 1 変異が導入された菌株を製作し、K C C M 1 1 3 4 7 P :: g n t R 1 (R 1 0 2 C) と命名した。前記実施例5と同様の方法で製作された菌株を培養して、リシン生産能と残留糖を比較した(表4)。

【0077】

【表4】

20

	菌株番号		残留糖 (g/L)		L-リシン (g/L)	平均
			18 時間	28 時間		
ブドウ糖	KCCM11347P	1	43.8	27.6	38.5	38.6
		2	42.6	28.8	38.7	
		3	43.2	27.2	38.6	
	KCCM11347P::gntR1(R102C)	1	39.2	18.2	38.6	38.7
		2	37.6	18.0	38.6	
		3	37.0	17.5	38.9	
原糖	KCCM11347P	1	39.9	24.9	41.2	41.3
		2	39.3	25.3	41.4	
		3	38.8	24.7	41.3	
	KCCM11347P::gntR1(R102C)	1	35.7	14.4	41.3	41.4
		2	34.2	13.7	41.3	
		3	33.3	13.1	41.6	

30

40

【0078】

その結果、前記実施例5と同様に g n t R 1 変異導入株は対照区に比べてブドウ糖、原糖の両方で糖の消費速度が増加したことを確認した。また、ブドウ糖及び原糖をすべて消費した時点を確認した結果、対照区は72時間、69時間に糖を完全に消費し、L-リシンをそれぞれ38.6g/L、41.3g/L生産しており、g n t R 1 変異導入株は61時間、58時間にL-リシンを38.7g/L、41.4g/L生産した。即ち、g n t R 1 変異を導入した菌株の場合、時間当たりのL-リシンの生産性がブドウ糖、原糖においてそれぞれ18%、19%増加することを確認した(表5)。

【0079】

50

【表 5】

	菌株番号	生産性 (g/h)	%
ブドウ糖	KCCM11347P	0.54	100
	KCCM11347P::gntR1 (R102C)	0.63	118
原糖	KCCM11347P	0.60	100
	KCCM11347P::gntR1 (R102C)	0.71	119

10

【0080】

実施例 7 : L-リシン生産株である C J 3 P に g n t R 1 変異を導入した菌株の製作及び生産性比較

【0081】

コリネバクテリウム・グルタミカムに属する別の菌株での効果も確認するために、前記実施例 5 と同様の方法で L-リシン生産菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカム C J 3 P (非特許文献 3) に g n t R 1 変異が導入された菌株を製作し、C J 3 P::G n t R 1 (R 1 0 2 C) と命名した。C J 3 P 菌株は、公知の技術を基に、野生株に 3 種の変異 (p y c (P r o 4 5 8 S e r)、h o m (V a l 5 9 A l a)、l y s C (T h r 3 1 1 I l e)) を導入し、L-リシン生産能を有することになるコリネバクテリウム・グルタミカム菌株である。前記実施例 5 と同様の方法で製作された菌株を培養して、リシン生産能と時間帯別の培養液中の残留糖濃度を測定した (表 6)。

20

【0082】

【表 6】

	菌株番号		残留糖 (g/L)		L-リシン (g/L)	平均
			12時間	18時間		
ブドウ糖	C J 3 P	1	37.2	23.6	8.1	8.2
		2	37.9	23.0	8.2	
		3	37.4	21.1	8.2	
	C J 3 P::g n t R 1 (R 1 0 2 C)	1	35.0	17.7	8.4	8.4
		2	35.5	17.5	8.3	
		3	34.2	16.7	8.4	
原糖	C J 3 P	1	34.3	21.5	8.7	8.8
		2	34.1	20.9	8.8	
		3	32.7	19.2	8.8	
	C J 3 P::g n t R 1 (R 1 0 2 C)	1	30.8	16.1	9.0	9.0
		2	31.8	15.9	8.9	
		3	31.3	15.2	9.0	

10

20

【0083】

その結果、前記実施例5、6と同様にg n t R 1変異導入する対照区に比べてブドウ糖及び原糖の両方で糖の消費速度が増加したことを確認した。また、ブドウ糖及び原糖をすべて消費した時点を確認した結果、対照区はブドウ糖と原糖をそれぞれ48時間、42時間に完全に消費してL-リシンをそれぞれ8.2、8.8g/L生産しており、G n t R 1 (R 1 0 2 C) を導入菌株は42時間、38時間にL-リシンをそれぞれ8.4、9.0g/L生産した、すなわち、G n t R 1変異を導入した菌株の場合には、時間当たりのL-リシンの生産性が17%、13%増加していることを確認した(表7)。

30

【0084】

【表 7】

	菌株番号	生産性 (g/h)	%
ブドウ糖	C J 3 P	0.17	100
	C J 3 P::g n t R 1 (R 1 0 2 C)	0.20	117
原糖	C J 3 P	0.21	100
	C J 3 P::g n t R 1 (R 1 0 2 C)	0.24	113

40

【0085】

50

したがって、前記の結果からコリネバクテリウム属由来のリシン生産菌株の g n t R 1 変異の導入時、糖消費速度の増加によるリシン生産性向上に効果があることを確認した。

【 0 0 8 6 】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者は、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更せず、他の具体的な形で実施されることができ理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的なものではないものとして理解すべきである。本発明の範囲は、前記の詳細な説明ではなく、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導出されるすべての変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈されるべきである。

【 0 0 8 7 】

特許出願のためのブダペスト条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

国際寄託機関により規則7. 1に従って発行された原寄託についての受託証

10

宛先：C J 第一製糖株式会社

大韓民国ソウル特別市中区東湖路330, C J 第一製糖センター

郵便番号100-400

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA01-2293	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM11628P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 [] 科学的性質の説明 [] 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は2014年12月5日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル特別市西大門区弘済1洞ユリムビル3 61-221 郵便番号120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者 又は権限を付与された者の署名： 署名日：2014年12月5日

20

30

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2016年3月8日


弁理士 ソン・ミン 印

40

【配列表】

[2018512877000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2016/002480
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/195(2006.01)i, C07K 14/34(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) C07K 14/195; C07K 14/34; C12N 1/21; C12N 15/54; C12N 15/31 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: gluconate repressor, L-lysine, corynebacterium glutamicum		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession no. CAF21189.1 (27 February 2015) See the entire document.	1-7
A	KR 10-2012-0007965 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 25 January 2012 See paragraph [0019] and claims 1-3, 9-10.	1-7
A	KR 10-2005-0026388 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 15 March 2005 See abstract and claims 1-8.	1-7
A	TANAKA et al., "Genome-wide Analysis of the Role of Global Transcriptional Regulator GntR1 in Corynebacterium Glutamicum", Journal of Bacteriology, vol. 196, no. 18, pages 3249-3258 (30 June 2014) See abstract.	1-7
A	FRUNZKE et al., "Co-Ordinated Regulation of Gluconate Catabolism and Glucose Uptake in Corynebacterium Glutamicum by Two Functionally Equivalent Transcriptional Regulators, GntR1 and GntR2", Molecular Microbiology, vol. 67, no. 2, pages 305-322 (06 November 2007) See abstract and page 315.	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "T" 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		Date of mailing of the international search report
27 JUNE 2016 (27.06.2016)		27 JUNE 2016 (27.06.2016)
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/002480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0007965 A	25/01/2012	CN 102741393 A	17/10/2012
		CN 102741393 B	25/11/2015
		EP 2430152 A2	21/03/2012
		JP 2012-530515 A	06/12/2012
		JP 5682072 B2	11/03/2015
		US 2013-0102037 A1	25/04/2013
		WO 2012-008810 A2	19/01/2012
		WO 2012-008810 A3	24/05/2012
KR 10-2005-0026388 A	15/03/2005	AU 2003-242537 A1	02/12/2003
		AU 2003-242537 A8	02/12/2003
		CA 2484955 A1	27/11/2003
		EP 1362866 A1	19/11/2003
		EP 1506226 A2	16/02/2005
		JP 2005-536194 A	02/12/2005
		US 2005-0196847 A1	08/09/2005
		US 2008-0280333 A1	13/11/2008
		US 7192749 B2	20/03/2007
		WO 03-097678 A2	27/11/2003
		WO 03-097678 A3	04/03/2004

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2016/002480
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/195(2006.01)i, C07K 14/34(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류틀 기재) C07K 14/195; C07K 14/34; C12N 1/21; C12N 15/54; C12N 15/31		
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: 글루코네이트 리프레서, L-라이신, 코리네박테리움 글루타미쿰		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no. CAF21189.1 (2015.02.27) 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2012-0007965 A (씨제이제일제당 (주)) 2012.01.25 문단 [0019] 및 청구항 1-3, 9-10 참조.	1-7
A	KR 10-2005-0026388 A (마스프 약티엔제젤사프트) 2005.03.15 요약 및 청구항 1-8 참조.	1-7
A	TANAKA 등, "Genome-wide analysis of the role of global transcriptional regulator GntR1 in <i>Corynebacterium glutamicum</i> " <i>Journal of Bacteriology</i> , 196권, 18호, 3249-3258 페이지 (2014.06.30) 초록 참조.	1-7
A	FRUNZKE 등, "Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in <i>Corynebacterium glutamicum</i> by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2" <i>Molecular Microbiology</i> , 67권, 2호, 305-322 페이지 (2007.11.06) 초록 및 315 페이지 참조.	1-7
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2016년 06월 27일 (27.06.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 06월 27일 (27.06.2016)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/002480

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0007965 A	2012/01/25	CN 102741393 A	2012/10/17
		CN 102741393 B	2015/11/25
		EP 2430152 A2	2012/03/21
		JP 2012-530515 A	2012/12/06
		JP 5682072 B2	2015/03/11
		US 2013-0102037 A1	2013/04/25
		WO 2012-008810 A2	2012/01/19
		WO 2012-008810 A3	2012/05/24
KR 10-2005-0026388 A	2005/03/15	AU 2003-242537 A1	2003/12/02
		AU 2003-242537 A8	2003/12/02
		CA 2484955 A1	2003/11/27
		EP 1362866 A1	2003/11/19
		EP 1506226 A2	2005/02/16
		JP 2005-536194 A	2005/12/02
		US 2005-0196847 A1	2005/09/08
		US 2008-0280333 A1	2008/11/13
		US 7192749 B2	2007/03/20
		WO 03-097678 A2	2003/11/27
		WO 03-097678 A3	2004/03/04

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 バク、サン ヒ

大韓民国、ソウル 07917、ヤンチョン - グ、ガロゴンウォン - ロ 70 - ギル、7、301
ホ

(72)発明者 キム、ヒョン ジュン

大韓民国、ソウル 08226、グロ - グ、ギョングン - ロ、343、106 - 2104

(72)発明者 キム、ナム ヒュン

大韓民国、ギョングンナム - ド 50626、ヤンサン - シ、ヤンジユ - ロ、114、103 - 1
303

(72)発明者 ムン、ジュン オク

大韓民国、ソウル 07929、ヤンチョン - グ、ウォルジョン - ロ 9 - ギル、17、102 -
807

(72)発明者 オ、ジョン ソク

大韓民国、ソウル 07694、ガンソ - グ、ウヒョン - ロ、67、119 - 404

(72)発明者 リュ、ソン - ギ

大韓民国、キョング - ド 16281、スウォン - シ、ジャンアン - グ、グムダン - ロ 39ペオ
ン - ギル、34、203 - 2003

(72)発明者 チェ、ヒャン

大韓民国、ソウル 07524、ガンソ - グ、ホジュン - ロ、47、204 - 1317

Fターム(参考) 4B064 AE25 CA02 CA19 CC24 DA10 DA20

4B065 AA24X AA24Y AB01 AC14 BA02 CA17 CA42 CA60

4H045 AA10 AA30 CA11 EA01 FA74