

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 3일 (03.09.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/175735 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/77* (2006.01) *C12P 19/32* (2006.01) 공개:
C12N 9/00 (2006.01)
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/004119
- (22) 국제출원일: 2019년 4월 8일 (08.04.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0022546 2019년 2월 26일 (26.02.2019) KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 백민지 (BAEK, Min Ji); 16515 경기도 수원시 영통구 광고호수로 15, 102동 902호, Gyeonggi-do (KR). 이지혜 (LEE, Ji Hye); 13922 경기도 안양시 동안구 관악대로 121, 106동 1301호, Gyeonggi-do (KR). 박소정 (PARK, So-jung); 16496 경기도 수원시 팔달구 중부대로 223번길 92, 205동 1406호, Gyeonggi-do (KR). 배지연 (BAE, Jee Yeon); 16493 경기도 수원시 팔달구 권광로 373, 101동 2013호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 범원로 135 6층 한일국제특허사무소, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: NOVEL PROMOTER AND PURINE NUCLEOTIDE PRODUCTION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규 프로모터 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오타이드 제조방법

(57) Abstract: The present application relates to a novel polynucleotide having promoter activity, a composition comprising same for gene expression, and a purine nucleotide production method using same.

(57) 요약서: 본 출원은 신규한 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 유전자 발현용 조성물, 미생물, 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오타이드 제조방법에 관한 것이다.

WO 2020/175735 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 프로모터 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오타이드 제조방법

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 유전자 발현용 조성물, 미생물, 이를 이용한 퓨린 뉴클레오타이드 제조방법 및 상기 폴리뉴클레오타이드의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 핵산계 물질 중 하나인 5'-이노신산 (5'-inosine monophosphate; 이하 IMP)은 핵산 생합성 대사계의 중간물질로서, 의약품 및 각종 의료적 이용 등 다방면에 이용되고 있다. 또한, 5'-구아닐산 (5'-guanine monophosphate; 이하 GMP)과 더불어 식품 조미 첨가제 또는 식품용으로 널리 이용되고 있는 물질이다. IMP는 자체로 소고기 맛을 내는 것으로 알려져 있으며, GMP와 같이 모노소디움 글루탐산(MSG)의 풍미를 강화하는 것으로 알려져 정미성 핵산계 조미료로 각광을 받고 있다.
- [4] IMP를 제조하는 방법으로는, 효모 세포로부터 추출한 리보핵산을 효소적으로 분해하는 방법, 발효에 의해 생산된 이노신을 화학적으로 인산화하는 방법(Agri. Biol. Chem., 36, 1511(1972) 등) 및 IMP를 직접 생산하는 미생물을 배양하고 배양액 내의 IMP를 회수하는 방법 등이 있다. 이러한 방법 중에서 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법은 IMP를 직접 생산 가능한 미생물을 이용한 방법이다.
- [5] 또한, GMP를 제조하는 방법으로 미생물 발효법으로 생산한 5'-크산틸산 (5'-xanthosine monophosphate; 이하, XMP)을 코리네형 미생물을 이용하여 GMP로 전환하는 방법, 미생물 발효법으로 생산한 XMP를 에세리키아 콜리를 이용하여 GMP로 전환시키는 방법이 있다. 상기 방법 중 XMP를 생산한 후, GMP로 전환시키는 방법으로 생산시킬 경우, 미생물 발효 시 전환 반응의 전구체인 XMP의 생산성이 강화되어야 하고, 생산된 XMP 뿐만 아니라 전환 반응의 전 과정 동안 이미 생성된 GMP가 손실되지 않도록 하여야 한다.
- [6] 한편, 자연상태에서 효소들은 산업적 활용에 있어서 요구되는 활성, 안정성, 광학 이성질체에 대한 기질 특이성 등에 있어 항상 최적의 특성을 나타내지 않으므로 아미노산 서열의 변이 등을 통해 목적하는 용도에 적합하게 효소를 개량하는 다양한 시도가 이루어져 왔다. 그 중, 효소의 합리적 디자인(rational design) 및 위치-지정 치환변이(site-directed mutagenesis) 방법이 효소 기능의 향상을 위해 적용된 예가 있으나, 많은 경우, 목적 효소의 구조에 대한 정보가 부족하거나 구조-기능의 상관관계가 명확하지 않아 효과적으로 적용될 수 없다는 단점을 가지고 있다. 이러한 경우, 효소 유전자의 무작위 변이를 통해

구축된 변이효소 라이브러리로부터 원하는 형질의 효소를 스크리닝하는 방향적 진화(directed evolution) 방법을 통해 효소의 개량을 시도하여 활성을 개선한다고 보고된 바 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 상기 미생물 발효를 통하여 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 방법으로 고수율의 퓨린 뉴클레오티드를 생산하기 위해 발명자들은 광범위한 연구를 수행하였고, 보다 높은 퓨린 뉴클레오티드 생산에 유용한 프로모터를 발굴함으로써 본 출원을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 본 출원의 하나의 목적은 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 발현용 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[13] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

[14] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

[15] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드 제조방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 출원의 또 다른 목적은 목적 단백질 발현 증가를 위한, 상기 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 출원의 신규한 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 이용하여, 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 경우, 고수율의 퓨린 뉴클레오티드 생산이 가능하다. 또한, 제조된 퓨린 뉴클레오티드는 동물 사료 또는 동물 사료 첨가제뿐만 아니라 인간의 식품 또는 식품 첨가제, 조미료, 의약품 등 다양한 제품에 응용될 수 있다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본

출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[21]

[22] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열 내 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다. 구체적으로, 본 출원은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열 내 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 상기 폴리뉴클레오티드 치환은 143번째 뉴클레오티드의 치환 및 189번째 뉴클레오티드의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함한다.

[23] 본 출원의 또 하나의 양태는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 a) 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, b) 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, 또는 c) 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환되고 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[24]

[25] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 가닥이다.

[26] 본 출원에서 용어, "프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드"는 뒤에 연결시키는 목적 유전자의 발현을 위해 RNA 폴리머라제 또는 인핸서 등이 결합하는 부위를 포함하는 목적 유전자의 전사시키는 부위 근처에 존재하는 DNA 영역을 의미한다. 본 출원의 목적상 상기 폴리뉴클레오티드는 범용적 약화 프로모터로 이용될 수 있다. 그 예로, 아데닐로석시네이트 신세타아제의 발현을 약화시킬 수 있는 프로모터로 사용될 수 있다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 퓨린 뉴클레오티드를 생산 또는 증가시키는데 관여하는 폴리뉴클레오티드를 의미하나, 이에 제한되지 않는다.

[27]

[28] 본 출원에서 상기 서열번호 1은 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 코리네박테리움 속 (*Corynebacterium sp.*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[29]

또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 서열에서 143번째 및/또는 189번째 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 이와 같은 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology)

또는 동일성(identity)을 가지는 뉴클레오티드 서열에서 143번째 및/또는 189번째 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것을 의미한다. 상동성 또는 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열은 상기 범주 중 100% 동일성을 갖는 서열은 제외되거나, 100% 미만의 동일성을 갖는 서열일 수 있다.

- [30] 일 예로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 a) 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, b) 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, 또는 c) 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환되고 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로는, 본 출원의 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2, 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3 또는 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환되고 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 폴리뉴클레오티드는, 상기 서열번호 2, 3, 또는 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 것일 수 있다. 상기 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열은 상기 범주 중 100% 동일성을 갖는 서열은 제외되거나, 100% 미만의 동일성을 갖는 서열일 수 있다.

[31]

- [32] 또한, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 특정 활성을 부여하는 상기 특정 143번째 또는 189번째 변이 이외에 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[33]

- [34] 상동성(homology) 및 동일성(identity)은 두 개의 주어진 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

- [35] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

- [36] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 값

페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

- [37] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [38] 폴리뉴클레오티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.

[39]

- [40] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리뉴클레오티드 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에

다양한 변형이 이루어질 수 있다. 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열에서 143번째 및/또는 189번째 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열에서 143번째 및/또는 189번째 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성(homology) 또는 동일성(identity)이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

- [41] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [42] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [43] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [44]
- [45] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 발현용 조성물 제공하는 것이다.
- [46] 상기 유전자 발현용 조성물은 본 출원의 프로모터에 의해 발현시킬 수 있는 유전자를 발현할 수 있는 조성물을 의미한다. 그 예로, 상기 유전자 발현용

조성물은 신규한 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 추가로 상기 폴리뉴클레오티드를 프로모터로 작동시킬 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다. 본 출원의 유전자 발현용 조성물에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 도입된 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있게 벡터내에 포함된 형태일 수 있다.

[47]

[48] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함한다. 구체적으로, 상기 목적 단백질은 아테닐로석시네이트 신세타아제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[49]

본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.

[50]

본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[51]

일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동 재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[52]

[53] 본 출원은 또 하나의 양태로서, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[54] 또한, 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[55] 구체적으로 상기 미생물은 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환에 의해 제조되는 미생물이거나, 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 포함된 미생물 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[56] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[57] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[58]

[59] 본 출원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 포함하는 미생물"이란, 상기 폴리뉴클레오티드로 목적 단백질의 발현이 조절된 미생물을 의미한다. 상기 미생물은, 퓨린 뉴클레오티드를 생산할 수 있는 미생물, 자연적으로 약한 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 없는 모균주에 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 부여된 미생물일 수 있다. 구체적으로 상기 미생물은 아데닐로석시네이트

신세타아제를 약화한 미생물일 수 있으며, 예를 들면, 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열에서 143번째 및/또는 189번째 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 미생물은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열 내 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물로서, 상기 상기 폴리뉴클레오티드 치환은 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, 및/또는 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환을 포함하는 것일 수 있다.

[60] 상기 숙주세포 또는 미생물은, 본 출원의 목적상 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 포함하여 퓨린 뉴클레오티드를 생산할 수 있는 것이라면 모두 본 출원의 범주에 속할 수 있다.

[61] 본 출원에서 상기 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물은 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물, 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물과 혼용되어 사용될 수 있다.

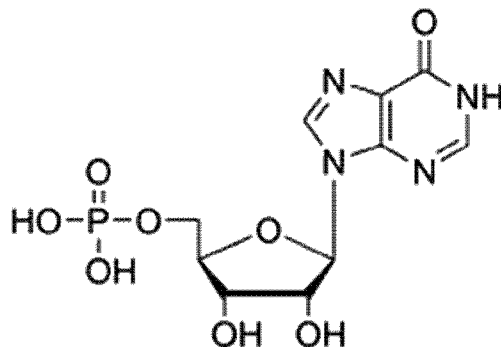
[62]

[63] 본 출원의 목적상 "퓨린 뉴클레오티드"는 퓨린계 구조를 포함하고 있는 뉴클레오티드를 의미한다. 그 예로, IMP, XMP 또는 GMP일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[64] 구체적으로, 상기 용어 "IMP(5'-inosine monophosphate)"는 하기의 화학식 1로 구성되어 있는 핵산계 물질 중의 하나이다.

[65] [화학식 1]

[66]



[67]

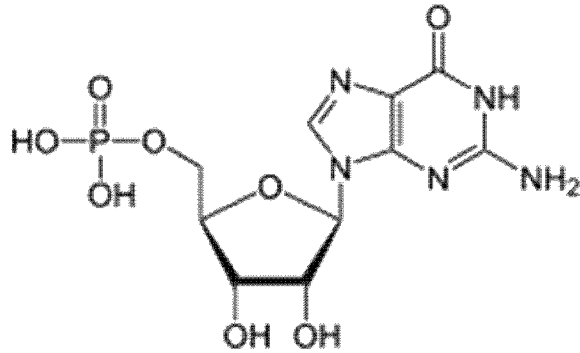
[68] IUPAC명으로는 5'-inosine monophosphate, 5'-inosine acid라고도 불리워지며, 식품에서는 XMP, 또는 GMP와 더불어 풍미 증진제로 널리 사용되고 있다.

[69]

[70] 상기 용어 "GMP(5'-guanine monophosphate)"는 하기의 화학식 2로 구성되어 있는 핵산계 물질 중의 하나이다.

[71] [화학식 2]

[72]



[73]

[74] IUPAC명은

[(2R,3S,4R,5R)-5-(2-Amino-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methyl dihydrogen phosphate이며, 다른 이름으로는 5'-guanydic acid, 5'-Guanylic acid, 또는 guanylic acid로 불리워진다.

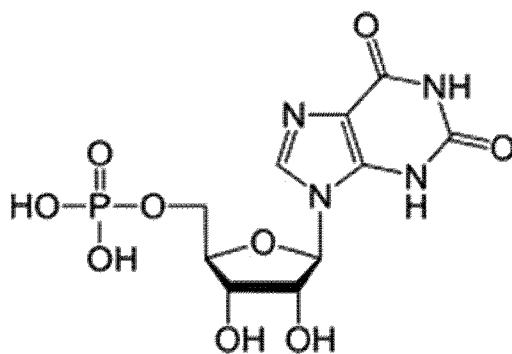
[75] GMP는 염의 형태로 구아닐산 나트륨, 구아닐산 디칼륨, 구아닐산 칼슘과 같은 식품 첨가제로 널리 이용되며, IMP와 함께 첨가물로 사용시 풍미를 강화하는 시너지 효과를 갖는다. GMP는 XMP로부터 전환되어 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 일실시예에서 확인된 바와 같이, 본 출원의 프로모터는 XMP의 생산을 증가시킬 수 있으며, 생산량이 증가된 XMP로부터 GMP 역시 전환되어 그 생산량이 증가될 수 있는 바, 상기 GMP 역시 본 출원의 범위에 포함됨은 자명하다.

[76]

[77] 상기 용어, "XMP(5'-xanthosine monophosphate)"는 하기의 화학식 3으로 구성되어 있는 퓨린 대사의 중간체 물질이다. IUPAC명으로는 5'-inosine monophosphate, 5'-xanthylic acid라고도 불리워지며, IMP 탈수소 효소의 작용을 통해 IMP로부터 형성되거나, XMP는 GMP 신타제의 작용을 통해 GMP로 전환될 수 있다. 또한, XMP는 (d) XTPase 활성을 포함하는 효소 deoxyribonucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase에 의해 XTP로부터 형성될 수 있다.

[78] [화학식 3]

[79]



[80]

[81] 본 출원에서 용어, "퓨린 뉴클레오타이드를 생산하는 미생물"은 야생형

미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 퓨린 뉴클레오티드 생산을 위하여 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화시킨 미생물 일 수 있다. 본 출원의 목적상 상기 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하여, 목적하는 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 증가된 것을 특징으로 하며, 구체적으로 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물 또는 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물은, 퓨린 뉴클레오티드 생합성 경로 내 유전자 일부가 강화 또는 약화되거나, 퓨린 뉴클레오티드 분해 경로 내 유전자 일부가 강화 또는 약화된 미생물일 수 있다. 예를 들면, 상기 미생물은, 포스포리보실피로포스페이트 아미도트랜스퍼라아제를 코딩하는 유전자인 *purF*의 발현이 강화되거나 *purA*의 발현이 강화된 것일 수 있다. 추가적으로 퓨린 뉴클레오티드에 따라 5'-이노신산 디하이드로게네이스(*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*)를 코딩하는 유전자인 *guaB* 발현이 조절될 수 있다. 구체적으로 퓨린 뉴클레오티드가 IMP인 경우 *guaB* 발현이 약화된 것일 수 있고 퓨린 뉴클레오티드가 XMP 또는 GMP인 경우에는 *guaB* 발현이 강화된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[82]

[83] 본 출원에서 용어 "퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 (the genus *Corynebacterium*) 미생물"이란, 천연형 또는 변이를 통하여 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지고 있는 코리네박테리움 속 미생물 일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환되어, 향상된 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다. 상기 '향상된 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지게 된 코리네박테리움속 미생물'은 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물보다 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 향상된 미생물을 의미한다. 상기 '비변형 미생물'은 천연형 균주 자체이거나, 상기 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 단백질 변이체를 포함하지 않는 미생물, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 미생물을 의미한다.

[84]

본 출원에서 "코리네박테리움 속 미생물"은 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 락토퍼멘텀 (*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범 (*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 써모아미노게네스 (*Corynebacterium thermoaminogenes*),

코리네박테리움 에피션스 (*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) 등이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[85]

[86] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다. 일 예로, 본 출원의 방법은 상기 배양하는 단계 이후, 상기 미생물 또는 배지로부터 목적 물질을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 목적 물질은 퓨린 뉴클레오티드 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[87] 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45 °C, 구체적으로는 25 내지 40 °C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 퓨린 뉴클레오티드는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[88] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물 (예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방 (예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산 (예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올 (예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산 (예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물 (예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 배지에는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

[89] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 퓨린 뉴클레오티드를 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 퓨린 뉴클레오티드를 수집(collect)할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 퓨린 뉴클레오티드를 회수 할 수 있다.

[90] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 퓨린 뉴클레오티드는 정제된 형태 또는 퓨린 뉴클레오티드를 함유한 미생물 발효액일 수 있다(Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

[91] 또한, 본 출원의 목적상 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물의 경우, 목적 물질 생산량이 증가하는 것을 특징으로 한다. 특히, 야생형 코리네박테리움속 균주가 퓨린 뉴클레오티드를 생산하지 못하거나, 퓨린 뉴클레오티드를 생산하더라도 아주 극미량을 생산할 수 있는 것에 반해, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 통해 퓨린 뉴클레오티드 생산량을 증가시킬 수 있다.

[92] 본 출원의 하나의 양태로서, 목적 단백질 발현 증가를 위한, 상기 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공하는 것이다.

[93]

발명의 실시를 위한 형태

[94] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

[95]

[96] **실시예 1: 야생형 기반 IMP 생산주 제작**

[97]

[98] 코리네박테리움 속 야생형의 균주는 IMP를 생산하지 못하거나, IMP를 생산하더라도 아주 극미량을 생산할 수 있다. 따라서, 야생형 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) ATCC6872를 기반으로 IMP 생산주를 제작하였다. 보다 구체적으로는, 포스포리보실피로포스페이트 아미도트랜스퍼라아제를 코딩하는 유전자인 *purF*의 활성을 강화시키고, 5'-이노신산 디하이드로게네이즈를 코딩하는 유전자인 *guaB*의 활성을 약화시킨 IMP 생산 균주를 제조하였다.

[99]

[100] **실시예 1-1: *purF* 강화 균주 제작**

[101] *purF*의 개시코돈이 변경된 균주를 제작하기 위해 우선 *purF*가 포함된 삽입용 벡터를 제작하였다. 삽입용 벡터에 *purF* 유전자를 클로닝하기 위해 구체적으로 PCR은 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 게노믹 DNA(genomic DNA)를 주형으로 서열번호 6와 7 및 서열번호 8와 9의 프라이머를 이용하여 수행되었으며, 94°C에서 30초의 변성(denaturation), 55°C에서 30초의 어닐링(annealing), 및 72°C에서 2분의 연장(extension) 과정이 30회 반복

수행되었다. 상기 PCR 반응으로 획득한 2개의 DNA 절편을 주형으로 하여 서열번호 6와 9를 프라이머로 다시 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초의 변성(denaturation), 55°C에서 30초의 어닐링(annealing), 및 72°C에서 2분의 연장(extension) 과정이 30회 반복 수행하였고, 얻어진 DNA 단편을 XbaI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pDZ (대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호) 벡터에 클로닝하였다. 상기 방법으로 제작된 벡터를 pDZ-purF-g1a라 명명하였다.

[102] [표1]

서열 번호	프라이머명	서열(5'-3')
6	purF g1a-1	GCTCTAGACCACTCTAAGACGCGGCCACC
7	purF g1a-2	AAGTAGTGTTTACCATGACGCTGATTCTACTAAG TTT
8	purF g1a-3	AGTAGAATCAGCGTCATGGTGAACACTACTTTCC CCAG
9	purF g1a-4	GCTCTAGACTGTGCGCCCACGATATCCAG

[103]

[104] 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) ATCC6872에 재조합 벡터 pDZ-purF-g1a를 전기천공법(electroporation)으로 형질전환 한 후, 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주는 카나마이신(kanamycin) 25mg/ℓ를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 선정된 균주로 시킨싱을 진행하여 최종적으로 변이가 도입된 균주를 선별하였고, 선별균주는 6872-purF(g1a)으로 명명하였다.

[105]

[106] 실시예 1-2: *guaB* 약화 균주 제작

[107] *guaB*의 개시코돈이 변경된 균주를 제작하기 위해 우선 *guaB*가 포함된 삽입용벡터를 제작하였다. 삽입용 벡터에 *guaB* 유전자를 클로닝하기 위해 구체적으로 PCR은 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 게노믹 DNA를 주형으로 서열번호 11과 12 및 서열번호 13과 14의 프라이머를 이용하여 수행되었으며, 상기 PCR 산물을 주형으로 하여 서열번호 11와 14를 프라이머로 다시 PCR을 진행하였고, 얻어진 DNA 단편을 실시예 1-1 같이 클로닝을 진행하였다. 제작된 벡터를 pDZ-*guaB*-alt라 명명하였다. 이를 같은 방법으로 6872-purF(g1a)에 도입하였고 최종적으로 변이가 도입된 균주를 선별하였다. 상기 선별된 균주는 CJ12330라 명명하였다.

[108] [표2]

서열 번호	프라이머명	서열(5'-3')
11	guaB alt-1	GCTCTAGACTACGACAACACGGTGCCTAA
12	guaB alt-2	CACGATTTTCGGTCAATACGGGTCTTCTCCTTCGCAC
13	guaB alt-3	AGGAGAAGACCCGTATTGACCGAAAATCGTGTTTCT
14	guaB alt-4	GCTCTAGAATCGACAAGCAAGCCTGCACG

[109]

[110] 실시예 1-3: CJI2330의 발효역가 실험

[111] 종배지 2ml를 지름 18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJI2330을 각각 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 29ml를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2ml를 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 170rpm, 온도 30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[112] 배양 종료 후 HPLC (SHIMADZU LC20A)를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 3와 같다. 하기와 같은 결과는 상기 CJI2330이 IMP 생산능을 갖는 것을 시사한다.

[113] [표3]

균주명	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2330	0.50

[114]

[115] - 종배지: 포도당 1%, 펩톤 1%, 육즙 1%, 효모엑기스 1%, 염화나트륨 0.25%, 아데닌 100mg/l, 구아닌 100mg/l, pH 7.5

[116] - 발효배지: 글루타민산 나트륨 0.1%, 암모늄클로라이드 1%, 황산마그네슘 1.2%, 염화칼슘 0.01%, 황산철 20mg/l, 황산망간 20mg/l, 황산아연 20mg/l, 황산구리 5mg/l, L-시스테인 23mg/l, 알라닌 24mg/l, 니코틴산 8mg/l, 비오틴 45µg/l, 티아민염산 5mg/l, 아데닌 30mg/l, 인산(85%) 1.9%, 포도당 2.55%, 과당 1.45% 되게 첨가하여 사용하였다.

[117]

[118] 실시예 2: purA 프로모터 활성 약화 변이 발굴

[119]

[120] 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 향상시키기 위하여 아데닐로석시네이트 신테타아제의 발현을 약화시키고자, 이를 코딩하는 유전자인 *purA*의 프로모터 변이 라이브러리를 제작하고 퓨린 뉴클레오티드 생산능이 증가하는 프로모터

약화 변이를 발굴하고자 하였다.

[121]

[122] 실시예 2-1: *purA* 프로모터를 포함하는 벡터 제작

[123] *purA* 프로모터 변이 라이브러리를 제작하기 위해 우선 서열번호 1의 *purA* 프로모터를 포함하는 GFP(green fluorescent protein) 발현 벡터를 제작하였다. PCR은 코리네박테리움 스테이스니스 ATCC6872의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 15와 16의 프라이머를 이용하여, 94°C에서 30초의 변성(denaturation), 55°C에서 30초의 어닐링(annealing), 및 72°C에서 2분의 연장(extension) 과정이 30회 반복 수행되었다. 얻어진 DNA 단편을 KpnI과 EcoRV으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 p117-gfp 벡터(대한민국 공개특허 10-0620092)에 클로닝하였다. 상기 방법으로 제작된 벡터를 p117-PpurA-gfp라 명명하였다.

[124]

[125] [표4]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
15	<i>purA</i> promoter F	GGGGTACCGGCAAAATTGCCGCCGCAGCT
16	<i>purA</i> promoter R	GGGATATCGGTTATTCACCTTCCTAGATTT
17	<i>purA</i> promoter lib R	TTATTTGTAGAGCTCATCCAT

[126]

[127] 실시예 2-2: *purA* 프로모터 변이 라이브러리 제작

[128] 상기 실시예 2-1에서 제작된 벡터를 기반으로 *purA* 프로모터 변이 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리는 error-prone PCR kit (clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit)를 이용하여 제작하였다. 변이가 발생할 수 있는 조건에서, 서열번호 15 및 서열번호 17을 프라이머로 하여 PCR 반응을 수행하였다. 구체적으로는, 1000bp 당 2에서 4개의 변이가 발생하는 조건으로 94 °C에서 30초 pre-heating 후, 94 °C에서 30초, 68 °C에서 1분 30초의 과정을 25회 반복 수행하였다. 이 때 얻어진 PCR 산물을 megaprimer(500~125ng)로 하여 95 °C에서 50초, 60 °C에서 50초, 68 °C에서 12분의 과정을 25회 반복 수행한 후 DpnI 처리하여, 대장균 DH5α에 형질전환하여 카나마이신(25mg/L)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환 된 콜로니 20종을 선별한 후 플라스미드를 획득하여 폴리뉴클레오티드 서열을 분석한 결과 3.5mutations/kb 빈도로 서로 다른 위치에 변이가 도입된 것을 확인하였다. 약 10,000개의 형질전환 된 대장균 콜로니를 취하여 플라스미드를 추출하였고, 이를 p117-PpurA-gfp-library로 명명하였다.

[129]

[130] 실시예 3: 제작한 라이브러리 평가 및 변이체 선별

[131]

[132] 실시예 3-1: 라이브러리 평가

[133] 상기 실시예 2-2에서 제작된 p117-PpurA-gfp-library를 실시예 1에서 제작한 균주 CJI2330에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 영양배지에 도말하여 변이 벡터가 삽입된 균주 5,000개의 콜로니를 확보 하였으며, 각 콜로니를 CJI2330_p117-PpurA(mt1)부터 CJI2330_p117-PpurA(mt5000)까지로 명명하였다.

[134]

[135] - 영양배지: 펩톤 1%, 육즙 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모 엑기스 1%, 한천 2%, pH 7.2

[136]

[137] 확보된 5,000개의 콜로니를 각각 가압 살균한 중 배지 200 μ l에 접종하여 96 deep well plate에서 마이크로플레이트 진탕기(Microplate shaker (TAITEC))를 이용하여 30°C 온도, 1200rpm에서 24시간 진탕 배양하여 중 배양액으로 사용하였다. 가압 살균한 발효배지 290 μ l를 96 deep well plate에 분주한 후 중 배양액 20 μ l씩 접종하고, 상기 조건과 동일하게 72시간 진탕 배양하여 원심분리하여 세포를 얻었다. 다음으로 회수된 세포를 1X 포스페이트 버퍼(10X phosphate-buffered saline: 염화나트륨 80g, 염화칼륨 2g, 인산나트륨 14.4g, 인산칼륨 2.4g, 멸균수 0.8L)에 세척 후, 같은 버퍼에 재현탁 시킨 후, 형광강도를 측정하였다. 형광강도는 마이크로플레이트 리더(Microplate reader)를 이용하여 488nm에서 여기광을 조사하고, 511nm 발출광을 이용하여 측정함으로써, GFP 유전자의 발현정도를 측정하였다. 측정 후, 야생형의 PpurA-gfp에 비해 형광강도가 약화된 2개의 변이 콜로니 PpurA(mt3) 및 PpurA(mt378)를 선별하였다.

[138]

[139] 실시예 3-2: *purA* 프로모터 변이 확인

[140] 상기 돌연변이 균주의 유전자 변이를 확인하기 위하여 서열번호 15와 17의 프라이머를 이용하여 PpurA(mt3) 및 PpurA(mt378) 각각에서 PCR을 수행하고 시퀀싱을 진행하여, *purA* 프로모터 내에 변이를 확인하였다.

[141] 구체적으로 PpurA(mt3)은 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에서 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하였다. 또한, PpurA(mt378)은 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에서 143번째 뉴클레오티드가 티민(t)으로 치환된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하였다. 따라서, 이하 실시예에서는, 상기 변이가 각각 코리네박테리움 속 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생성량에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

[142]

[143] **실시예 4: ATCC6872 유래의 IMP 생산 균주에서의 IMP 생산능 확인**

[144]

[145] ATCC6872 유래의 IMP 생산 균주를 제작하고, 실시예 3에서 확인된 변이를

도입하여 IMP 생산능을 확인하였다.

[146]

[147] 실시예 4-1: ATCC6872 유래의 IMP 생산 균주 선별

[148] ATCC6872 유래의 IMP 생산주를 제작하기 위해 ATCC6872를 인산염 완충액(pH7.0) 또는 시트레이트 완충액(pH5.5)에 $10^7 \sim 10^8$ 세포/ml로 현탁시켰다. 여기에 UV 처리하여 실온 또는 32°C에서 20~40 분간 처리하여 돌연변이를 유발시켰다. 2회에 걸쳐 0.85% 식염수로 세척하고, 1.7% 한천을 함유한 최소배지에 내성을 부여하고자 하는 물질을 적정 농도로 함유한 배지에 희석하여 도말 한 후 콜로니를 얻었다. 각각의 콜로니를 영양배지에서 배양하고 종배지에서 24시간 배양하였다. 발효배지에서 3~4일간 배양한 결과, 배양액에 축적된 IMP 생산량이 가장 우수한 콜로니를 선별하였다. 고농도 IMP 생산주를 제작하기 위해 아데닌 요구성, 구아닌 누출형, 라이소자임 감수성, 3,4-디하이드로프로롤린 내성, 스트렙토마이신 내성, 설파구아니딘 내성, 노르발린 내성, 트리메조프림 내성을 부여하기 위해 상기 과정을 각각의 물질에 대해 순차적으로 수행하였으며, 상기 물질들에 대한 내성이 부여되고 IMP 생산능이 우수한 CJI2332을 최종 선별하였다. 표 5에 ATCC6872 대비 CJI2332의 내성 정도를 비교하여 나타냈다.

[149] [표5]

특성	ATCC6872	CJI2332
아데닌 요구성	비요구성	요구성
구아닌 누출형	비요구성	누출형
라이소자임 감수성	80 ug/ml	8ug/ml
3,4-디하이드로프로롤린 내성	1000 ug/ml	3500ug/ml
스트렙토마이신 내성	500 ug/ml	2000ug/ml
설파구아니딘 내성	50 ug/ml	200ug/ml
노르발린 내성	0.2 mg/ml	2mg/ml
트리메조프림 내성	20 ug/ml	100ug/ml

[150]

[151] - 최소배지: 포도당 2%, 황산나트륨 0.3%, 인산제1칼륨 0.1%, 인산제2칼륨 0.3%, 황산마그네슘 0.3%, 염화칼슘 10mg/l, 황산철 10mg/l, 황산아연 1mg/l, 염화망간 3.6mg/l, L-시스테인 20mg/l, 칼슘 판토테네이트 10mg/l, 티아민 염산염 5mg/l, 바이오틴 30ug/l, 아데닌 20mg/l, 구아닌 20mg/l, pH7.3되게 첨가하여 사용하였다.

[152] 상기 CJI2332는 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 6월 22일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12277P를 부여받았다.

[153]

[154] 실시예 4-2: CJI2332 발효역가 실험

[155] 종배지 2ml를 지름18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJI2332를 각각 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 29ml를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2ml을 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 170rpm, 온도30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[156] 배양 종료 후 HPLC (SHIMAZDU LC20A)를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 6와 같다.

[157] [표6]

균주명	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2332	1.74

[158]

[159] 실시예 4-3: *purA* 프로모터 변이를 포함하는 삽입 벡터 제작

[160] 상기 실시예 3에서 선별된 변이를 균주내로 도입하기 위해 삽입용 벡터를 제작하고자 하였다. PpurA(c143t), PpurA(a189t), PpurA(c143t, a189t) 변이 도입용 벡터 제작 과정은 다음과 같다.

[161] ATCC6872 균주의 게노믹 DNA를 주형으로 하여 서열번호 18와 서열번호 19 및 서열번호 20과 서열번호21을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C 에서 1분을 20회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 얻어진 DNA 단편을 주형으로 하여 서열번호 18과 서열번호 21을 이용하여 상기와 같은 방법으로 PCR수행하여 얻어진 유전자 단편을 XbaI으로 절단하였다. T4 리가아제를 이용하여 상기 DNA 단편을 XbaI 제한효소로 절단 시킨 선상의 pDZ 벡터에 클로닝하여 pDZ-purA(c143t)-purA를 제작하였다. ATCC6872 균주의 게노믹 DNA를 주형으로 하여 서열번호 18와 서열번호 22 및 서열번호 23과 서열번호21을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C 에서 1분을 20회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 얻어진 DNA 단편을 주형으로 하여 서열번호 18과 서열번호 21을 이용하여 상기와 같은 방법으로 PCR수행하여 얻어진 DNA 단편을 XbaI으로 절단하였다. T4 리가아제를 이용하여 상기 DNA 단편을 XbaI 제한효소로 절단 시킨 선상의 pDZ 벡터에 클로닝하여 pDZ-purA(a189t)-purA를 제작하였다.

[162] 또한, 두 변이가 동시에 도입되었을 때 영향성을 보기 위해 두 변이가 도입된 벡터를 제작하였다. 제작된 pDZ-purA(c143t)를 백본(backbone)으로 하여

위치선택적 돌연변이(Site-directed mutagenesis)를 수행하였다. 구체적으로는, 서열번호 24과 서열번호 25의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고, 이때 94°C에서 30초의 변성(denaturation), 55°C에서 30초의 어닐링(annealing), 및 68°C에서 12분의 연장(extension) 과정을 포함하며, 상기 과정들은 18회 반복 수행되었다. 그 결과 얻어진 산물을 DpnI 처리 후, DH5 α 에 형질 전환하여 pDZ-PpurA(c143t, a189t)-purA 벡터를 획득하였다.

[163]

[164] [표7]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
18	PDZ purA F	GCTCTAGA ACGGTCACGCGCAAATCAG
19	purA c143t-1R	CTACCTTTATCGCCAaTGATAATGTATTTAGCCATG
20	purA c143t-2F	CTAAATACATTATCAaTGGCGATAAAGGTAGAGTT
21	PDZ purA R	GCTCTAGA TCGTAGGCGACGCAAATAGG
22	purA a189t-1R	GGTTATTCACCTACCTAGATTTAAG
23	purA a189t-2F	TTAAATCTAGGtAGTGAATAACC
24	Site-directed mutagenesis F	TAGCCTTAAATCTAGGTAGTGAATAACCATGGCAGCTA
25	Site-directed mutagenesis R	TAGCTGCCATGGTTATTCACCTACCTAGATTTAAGGCTA

[165]

[166] 실시예 4-4: ATCC6872 유래의 CJI2330, 및 CJI2332 균주 내 *purA* 프로모터 변이체 도입 및 평가

[167] 상기 실시예 1에서 제작된 야생형 유래 IMP 생산 균주 CJI2330과 실시예 4-1에서 선별된 균주 CJI2332에 *purA* 변이를 도입하여 IMP 생산량을 평가하였다. CJI2332 균주의 *purA* 프로모터 내 변이가 포함되어 있는지를 확인하기 위해 CJI2332의 게놈 DNA를 PCR을 통하여 증폭하였다. 구체적으로, 먼저 상기 CJI2332의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 15와 21의 프라이머를 이용하여 94 °C에서 1분, 58°C에서 30초, 72 °C에서 1분간 Taq DNA 중합효소로 증합하는 조건을 28 회 반복하는 PCR 방법을 통하여 *purA* 프로모터 단편을 증폭하여 염기서열을 분석하였다. CJI2332 균주의 *purA* 프로모터의 염기서열은 야생형 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 *purA* 프로모터 서열과 동일하였다.

- [168] 이후 pDZ-PpurA(c143t)-purA, pDZ-PpurA(a189t)-purA, pDZ-PpurA(c143t, a189t)-purA 벡터를 CJI2330과 CJI2332에 형질전환하고 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주는 카나마이신(kanamycin) 25 mg/L를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차(cross-over)를 거쳐, 목표 유전자의 프로모터 변이가 도입된 균주를 선정하였다. 최종 형질전환된 균주 내 변이 도입 여부는 서열번호 15와 서열번호 21의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 염기서열을 분석함으로써 확인할 수 있었다. 제작된 균주는 각각, CJI2330_PpurA(c143t)-purA, CJI2330_PpurA(a189t)-purA, CJI2330_PpurA(c143t, a189t)-purA, CJI2332_PpurA(c143t)-purA, CJI2332_PpurA(a189t)-purA, CJI2332_PpurA(c143t, a189t)-purA로 명명하였다.
- [169] 상기 CJI2332_PpurA(c143t)-purA는 CJI2352으로 지칭되며, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 9월 10일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12315P를 부여받았다. 또한, 상기 제작된 CJI2332_PpurA(a189t)-purA는 CJI2365로 지칭되며, 이를 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 9월 10일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12314P를 부여받았다.
- [170]
- [171] 각각의 균주의 IMP 생산능을 평가하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 8과 같다.
- [172] [표8]

균주명	IMP (g/L)
CJI2330	0.50
CJI2330_PpurA(c143t)-purA	0.58
CJI2330_PpurA(a189t)-purA	0.67
CJI2330_PpurA(c143t, a189t)-purA	0.72
CJI2332	1.74
CJI2332_PpurA(c143t)-purA	2.01
CJI2332_PpurA(a189t)-purA	2.29
CJI2332_PpurA(c143t, a189t)-purA	2.42

- [173]
- [174] 실시예 5: purA 프로모터 변이체 도입시 5'-크산틸산 생산능 확인
- [175]
- [176] **실시예 5-1: ATCC6872 유래의 XMP 생산 균주 선별**
- [177] ATCC6872 유래의 XMP 생산주를 제작하기 위해 코리네박테리움 스테이스니스 ATCC6872를 인산염 완충액(pH7.0) 또는 시트레이트

완충액(pH5.5)에 $10^7 \sim 10^8$ 세포/ml 로 현탁시켰다. 여기에 UV 처리하여 실온 또는 32°C에서 20~40 분간 처리하여 돌연변이를 유발시켰다. 2회에 걸쳐 0.85% 식염수로 세척하고, 1.7% 한천을 함유한 최소배지에 내성을 부여하고자 하는 물질을 적정 농도로 함유한 배지에 희석하여 도말 한 후 콜로니를 얻었다. 각각의 콜로니를 영양배지에서 배양하고 종배지에서 24시간 배양하였다. 발효배지에서 3~4일간 배양한 결과, 배양액에 축적된 XMP 생산량이 가장 우수한 콜로니를 선별하였다. 구체적으로는, 플루오로트리프트판이 농도별로 첨가된 배지(첨가배지)에서 생육할 수 있는 변이주들 중에서 선별하였으며, 보다 구체적으로는, 플루오로트리프트판 농도 100mg/l에서도 생육하는 5'-크산틸산 농도가 향상된 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 CJX1664이라 명명되었다.

[178]

[179] - 최소배지: 포도당 20g/l, 인산제1칼륨 1g/l, 인산제2칼륨 1g/l, 우레아 2g/l, 황산암모늄 3g/l, 황산마그네슘 1g/l, 염화칼슘 100mg/l, 황산철 20mg/l, 황산망간 10mg/l, 황산아연 10mg/l, 비오틴 30ug/l, 티아민산염 0.1mg/l, 황산구리 0.8mg/l, 아데닌 20mg/l, 구아닌 20mg/l, pH 7.2

[180] - 첨가배지: 최소배지에 플루오로트리프트판 10, 20, 50, 70, 100, 200mg/l 첨가한 배지

[181]

[182] 상기 CJX1664의 생화학적 특성은 하기 표 9에 나타내었다. 표 9를 참고하면, 상기 CJX1664는 100mg/l 농도의 플루오로트리프트판 첨가배지에서도 생육 가능하다.

[183] [표9]

특성	ATCC6872	CJX1664
플루오로트리프트판 내성	10mg/l	100mg/l

[184]

[185] 상기 CJX1664는 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 7월 6일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12285P를 부여받았다.

[186]

[187] 실시예 5-2: CJX1664 발효역가 실험

[188] 종배지 2ml를 지름18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJX1664 를 각각 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 29ml를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2ml를 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 170rpm, 온도30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[189] 배양 종료 후 HPLC(SHIMAZDU LC20A)를 이용한 방법에 의해 XMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 10과 같다.

[190] [표10]

균주명	XMP (g/L)
ATCC6872	0
CJX1664	4.72

[191]

[192] 실시예 5-3: CJX1664 균주 내 변이체 도입 및 평가

[193] 상기 실시예 5-1에서 선별된 CJX1664 균주의 *purA* 프로모터 내 변이가 포함되어 있는지 확인하기 위해 CJX1664 게노믹 DNA를 PCR을 통하여 증폭하였다. 구체적으로, 먼저 상기 CJX1664의 게노믹 DNA를 주형으로 서열번호 15와 서열번호 21의 프라이머를 이용하여 94 °C에서 1 분간 변성, 58 °C에서 30 초간 결합, 72 °C에서 1 분간 Taq DNA 중합효소로 중합하는 조건을 28 회 반복하는 PCR 방법을 통하여 *purA* 프로모터 단편을 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 상기 CJX1664 균주의 *purA* 프로모터의 염기서열은 야생형 코리네박테리움 스테이스니스 ATCC6872의 *purA* 프로모터 서열과 동일하였다.

[194] 상기 실시예 4-3에서 제작한 벡터들을 각각 CJX1664에 형질전환하고, 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주를 카나마이신(kanamycin) 25 mg/L를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차(cross-over)를 거쳐, 목표 유전자의 변이가 도입된 균주를 선정하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 변이 도입 여부는 염기서열을 분석하여 확인하였다.

[195] 상기 CJX1664 및 CJX1664_PpurA(c143t)-*purA*, CJX1664_PpurA(a189t)-*purA*, CJX1664_PpurA(c143t, a189t)-*purA* 균주의 XMP 생산능을 평가하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 XMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 11과 같다.

[196] 상기 CJX1664_PpurA(c143t)-*purA*는 CJX1680으로 지칭되며, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 9월 10일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12311P를 부여받았다. 또한, 상기 제작된 CJX1664_PpurA(a189t)-*purA*는 CJX1668로 지칭되며, 이를 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 9월 10일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12310P를 부여받았다.

[197]

[198] [표11]

균주명	XMP (g/L)
CJX1664	4.72
CJX1664_PpurA(c143t)-purA	5.47
CJX1664_PpurA(a189t)-purA	5.91
CJX1664_PpurA(c143t, a189t)-purA	6.01

[199]

[200] 상기 표에서와 같이, CJX1664_PpurA(c143t)-purA, CJX1664_PpurA(a189t)-purA, CJX1664_PpurA(c143t, a189t)-purA 균주는 ATCC6872 기반 XMP 생산 균주인 CJX1664에 대비 XMP 생산량이 약 27% 증가한 것을 확인하였다.

[201]

[202] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[203]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,

대한민국 서울시 중구

동호로 330 CJ 제일제당센터

(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에

따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJ12365	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12314P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 9월 10일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 09. 10.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 2월 26일

변리사 손민



[204]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJ12352	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12315P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 9월 10일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 09. 10.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 2월 26일

변리사 손민



[205]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJI2332	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12277P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 6월 22일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 06. 22.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 8월 1일

변리사 손민



[206]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,

대한민국 서울시 중구

동호로 330 CJ 제일제당센터

(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에

따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJX1668	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12310P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 9월 10일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 09. 10.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 2월 26일

변리사 손민



[207]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJX1680	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12311P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 9월 10일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 _____ 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 _____ 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 09. 10.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 2월 26일

변리사 손민



[208]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJX1664	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12285P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 7월 6일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 07. 06.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 8월 1일

변리사 손민



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 a) 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, b) 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환, 또는 c) 143번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환되고 189번째 뉴클레오티드가 티민(T)으로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 발현용 조성물.
- [청구항 4] 제1항의 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 목적 단백질은 아테닐로석시네이트 신세타아제인, 벡터.
- [청구항 6] 제4항 또는 제5항의 벡터를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 7] 제1항의 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 목적 단백질은 아테닐로석시네이트 신세타아제인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*)인, 미생물.
- [청구항 10] 제7항의 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 배양하는 단계 이후, 상기 미생물 또는 배지로부터 퓨린 뉴클레오티드를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드 제조방법.
- [청구항 12] 목적 단백질 발현 증가를 위한, 제1항의 폴리뉴클레오티드의 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/004119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/77(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12P 19/32(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 15/77; C12N 15/52; C12N 15/70; C12N 9/00; C12P 21/00; C12P 19/32

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: promoter, purine nucleotide, adenylosuccinate synthase, corynebacterium

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. AB003160.1 (15 January 2000) See all sequences.	1-12
A	CN 103952419 A (TIANJIN UNIVERSITY) 30 July 2014 See the entire document.	1-12
A	KR 10-1673080 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION et al.) 07 November 2016 See the entire document.	1-12
A	KR 10-1950141 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 19 February 2019 See the entire document.	1-12
A	KR 10-0242798 B1 (AMERICAN CYANAMID COMPANY et al.) 01 February 2000 See the entire document.	1-12



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

“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

30 OCTOBER 2019 (30.10.2019)

Date of mailing of the international search report

30 OCTOBER 2019 (30.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/004119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 103952419 A	30/07/2014	CN 103952419 B	29/06/2016
KR 10-1673080 B1	07/11/2016	None	
KR 10-1950141 B1	19/02/2019	None	
KR 10-0242798 B1	01/02/2000	CA 2067862 A1	04/11/1992
		CA 2067862 C	30/12/2003
		EP 0512260 A2	11/11/1992
		EP 0512260 B1	04/07/2001
		JP 05-192161 A	03/08/1993
		JP 3320095 B2	03/09/2002
		TW 201794 B	11/03/1993
		US 5919663 A	06/07/1999
		US 5961983 A	05/10/1999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/77(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, C12P 19/32(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/77; C12N 15/52; C12N 15/70; C12N 9/00; C12P 21/00; C12P 19/32

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: 프로모터(promoter), 퓨린 뉴클레오티드(purine nucleotide), 아데닐로석시네이트 신세타아제(adenylosuccinate synthase), 코리네박테리움(corynebacterium)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no. AB003160.1 (2000.01.15) 전체 서열 참조.	1-12
A	CN 103952419 A (TIANJIN UNIVERSITY) 2014.07.30 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-1673080 B1 (씨제이제일제당 (주) 등) 2016.11.07 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-1950141 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2019.02.19 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-0242798 B1 (아메리칸 사이아나미드 컴퍼니 등) 2000.02.01 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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

2019년 10월 30일 (30.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 30일 (30.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



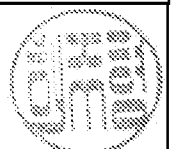
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 103952419 A	2014/07/30	CN 103952419 B	2016/06/29
KR 10-1673080 B1	2016/11/07	없음	
KR 10-1950141 B1	2019/02/19	없음	
KR 10-0242798 B1	2000/02/01	CA 2067862 A1	1992/11/04
		CA 2067862 C	2003/12/30
		EP 0512260 A2	1992/11/11
		EP 0512260 B1	2001/07/04
		JP 05-192161 A	1993/08/03
		JP 3320095 B2	2002/09/03
		TW 201794 B	1993/03/11
		US 5919663 A	1999/07/06
		US 5961983 A	1999/10/05