



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I734995 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：108120295

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 12 日

(51)Int. Cl. : **C07K14/32 (2006.01)** **C12N15/52 (2006.01)**
C12N15/77 (2006.01) **C12N9/14 (2006.01)**
C12N15/15 (2006.01) **C12N15/63 (2006.01)**
C12P19/32 (2006.01)

(30)優先權：2018/08/01 南韓 10-2018-0089855

(71)申請人：南韓商 C J 第一製糖股份有限公司 (南韓) CJ CHEILJEDANG CORPORATION
 (KR)
 南韓

(72)發明人：白珉知 BAEK, MIN JI (KR) ; 李智惠 LEE, JI HYE (KR) ; 朴素靜 PARK, SO-JUNG
 (KR) ; 裴智研 BAE, JEE YEON (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(83)生物材料寄存：

財團法人食品工業研究院	BCRC910927	2019 年 08 月 22 日
財團法人食品工業研究院	BCRC910928	2019 年 08 月 22 日
財團法人食品工業研究院	BCRC910929	2019 年 08 月 22 日
財團法人食品工業研究院	BCRC910930	2019 年 08 月 22 日

(56)參考文獻：

CN 102549144A

NCBI, Genbank accession no. WP_075723579.1, adenylosuccinate synthase [Corynebacterium stationis] (2017/01/12).

Jiangchao Qian et al., "Nucleotide mutations in purA gene and pur operon promoter discovered in guanosine- and inosine-producing Bacillus subtilis strains", Biotechnol Lett. 2006 Jun;28(12): 937-41. Epub 2006 Jun 13.

Xiaoyue Wang et al., "Directed evolution of adenylosuccinate synthetase from Bacillus subtilis and its application in metabolic engineering", J Biotechnol. 2016 Aug 10;231:115-121. Epub 2016 May 24.

Takayuki Asahara et al., "Accumulation of gene-targeted Bacillus subtilis mutations that enhance fermentative inosine production", Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Aug;87(6):2195-207. Epub 2010 Jun 4.

Rodrigo Ledesma-Amaro et al., "Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in Ashbya gossypii", Microb Cell Fact. 2015 Apr 17;14:58.

審查人員：王顥棣

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：0 共 54 頁

(54)名稱

新穎的腺苷醯琥珀酸合成酶及使用該合成酶製造嘌呤核苷酸的方法

(57)摘要

本揭示內容有關腺苷醯琥珀酸合成酶變體、含有該變體的微生物、以及使用該微生物製備嘌呤核苷酸的方法。

The present disclosure relates to an adenylosuccinate synthetase variant, a microorganism containing the same, and a method for preparing purine nucleotides using the microorganism.

I734995

【發明摘要】

【中文發明名稱】 新穎的腺苷醯琥珀酸合成酶及使用該合成酶製造嘌呤核苷酸的方法

【英文發明名稱】 NOVEL ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE
AND METHOD FOR PRODUCING PURINE
NUCLEOTIDES USING THE SAME

【中文】

本揭示內容有關腺苷醯琥珀酸合成酶變體、含有該變體的微生物、以及使用該微生物製備嘌呤核苷酸的方法。

【英文】

The present disclosure relates to an adenylosuccinate synthetase variant, a microorganism containing the same, and a method for preparing purine nucleotides using the microorganism.

【指定代表圖】 本案無圖式。

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 新穎的腺苷鹽琥珀酸合成酶及使用該合成酶製造嘌呤核苷酸的方法

【英文發明名稱】 NOVEL ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE
AND METHOD FOR PRODUCING PURINE
NUCLEOTIDES USING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本揭示內容涉及新穎的腺苷鹽琥珀酸合成酶、含有該合成酶之微生物、以及使用該微生物製備嘌呤核苷酸之方法。

【先前技術】

【0002】 5'-肌苷單磷酸(後文稱為 IMP)為核酸系材料，係用於多個領域(例如，醫藥、多種醫學應用等)的核酸生物合成代謝系統的中間體，並且係與 5'-鳥嘌呤單磷酸鹽(後文稱為 GMP)一起廣泛用作食品調味添加劑或食品。已知 IMP 本身產生牛肉風味並增強麩胺酸鈉(MSG)如 GMP 的風味，因此以基於口味的核酸系調味品引起公眾注意。

【0003】 製備 IMP 的方法可包括酶促降解從酵母細胞提取的核糖核酸的方法、化學磷酸化由醱酵產生的肌苷的方法(*Agri. Biol. Chem.*, 36, 1511(1972)等)、培養直接產生 IMP 之微生物並從培養基回收 IMP 的方法等。在這些方法中，最廣泛使用的方法是使用能夠直接產生 IMP 的微生物的方法。

【0004】 另外，製備 GMP 的方法可以包含使用棒狀桿菌微生物將由微生物發酵產生的黃苷 5'-單磷酸(後文稱為 XMP)轉化為 GMP 的方法和使用大腸桿菌將由微生物發酵產生的 XMP 轉化為 GMP 的方法。在上述方法中，當藉由首先產生 XMP 然後轉化為 GMP 的方法生產 GMP 時，必須提高 XMP(即，微生物發酵過程中轉化反應的前驅物)的生產力，此外，應該保護在轉化反應的整個過程中已經產生的 XMP 和 GMP 免於流失。

【0005】 同時，由於在工業應用中，自然界中的酶在活性、安定性、對光學異構體的基質特異性等態樣並不總是表現出最佳性質，已經進行了多種嘗試來改進酶以藉由改變它們的胺基酸序列而達成所欲用途。其中，酶的合理設計和定點誘變已被應用於某些情況下改善酶的功能；然而，這些方法的缺點在於，關於目標酶結構的資訊不充足或結構-功能相關性不清楚，因此它們不能有效應用。在這種情況下，已報導經由定向演化方法改進酶可以增強酶的活性，其中從經由酶基因的隨機變異構建的酶的突變體庫中篩選出具有所欲性狀的酶。本揭示內容的發明人已藉由經由微生物發酵生產含有 IMP 或 XMP 的嘌呤核苷酸的方法，而對嘌呤核苷酸的高產量生產進行了廣泛的研究。結果，他們已發現具有更高的嘌呤核苷酸生產力的蛋白質變體，從而完成了本發明。

【發明內容】

[技術問題]

【0006】 本揭示內容的目的係提供腺苷醯琥珀酸合成酶變體。

【0007】 本揭示內容的另一個目的係提供編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的多核苷酸。

【0008】 本揭示內容的又一個目的係提供含有多核苷酸的載體。

【0009】 本揭示內容的又一個目的係提供能夠產生嘌呤核苷酸的微生物，該微生物含有腺苷醯琥珀酸合成酶變體和載體。

【0010】 本揭示內容的又一個目的係提供製備嘌呤核苷酸的方法，該方法包括在培養基中培養棒狀桿菌屬微生物；及從該微生物或該培養基回收嘌呤核苷酸。

[技術方案]

【0011】 在後文中，將詳細描述本揭示內容的例示性具體例。同時，本文揭露的各解釋和例示性具體例可以應用於其他解釋和例示性實施例。也就是說，本文揭露的各種因素的所有組合都屬於本揭示內容的範疇。此外，本揭示內容的範疇不應受後文提供的具體揭示內容的限制。

【0012】 為了達成上述目的，本揭示內容的一個態樣提供了腺苷醯琥珀酸合成酶變體，其中從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的 N 端算起第 85 個位置的胺基酸經以不同的胺基酸取代。修飾的腺苷醯琥珀酸合成酶對從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的 N 端算起第 85 個位置的胺基酸有修飾。具體地，本揭示內容提供了在 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中具有至少一個胺基酸變異的腺苷醯琥珀酸合成酶變體，其中該修飾包括以不同的胺基酸在從 N 端算起第 85 個位置取代。

【0013】 如本文所用，術語“腺苷醯琥珀酸合成酶”是指在嘌呤生物合成中具有重要作用的酶。為了本揭示內容的目的，酶是指涉及嘌呤核苷酸生產的蛋白質，包括 5'-肌苷單磷酸(IMP)或 5'-黃苷單磷酸(XMP)。

【0014】 在本揭示內容中，SEQ ID NO：2 是指具有腺苷醯琥珀酸合成酶活性的胺基酸序列。具體地，SEQ ID NO：2 係具有由 *purA* 基因編碼的腺苷醯琥珀酸合成酶活性的蛋白質序列。SEQ ID NO：2 的胺基酸序列可以從 NCBI GenBank 獲得，NCBI GenBank 是已知的數據庫。在一個具體例中，SEQ ID NO：2 的胺基酸序列可以衍生自棒狀桿菌屬微生物，但不限於此，並且可以包括具有與上述胺基酸序列相同活性的任何序列而沒有限制。另外，SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的範疇可包括具有腺苷醯琥珀酸合成酶活性的 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列或具有 80% 或更高的同源性或同一性的胺基酸序列，但不限於此。具體地，上述胺基酸序列可包括 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列及/或與 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的同源性或同一性的胺基酸序列。具有同源性或同一性的胺基酸序列可以是彼等上述範圍內者，排除具有 100% 同一性的序列，或者可為具有不到 100% 的同一性的序列。另外，明顯地，具有在序列的一部分中具有刪除、修飾、取代或添加的胺基酸序列的任何蛋白質也可以用於本揭示內容，只要其具有同源性或同一性並且表現出與上述蛋白質所具者相應的功效。

【0015】 在本揭示內容中，術語“腺苷醯琥珀酸合成酶變體”可與具有嘌呤核苷酸生產力的多肽變體、產生嘌呤核苷酸的變異多肽、產生嘌呤核苷酸的多肽變體、具有腺苷醯琥珀酸合成酶活性的多肽變體、腺苷醯琥珀

酸合成酶變體等互換使用。另外，蛋白質可以源自停滯棒狀桿菌屬，但該蛋白質不限於此。

【0016】 腺苷鹽琥珀酸合成酶變體包括從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的 N 端算起第 85 個位置的胺基酸的修飾。腺苷鹽琥珀酸合成酶變體是其中 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的第 85 個胺基酸被不同的胺基酸取代者。腺苷鹽琥珀酸合成酶變體可以包含 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列，或者它可以是與衍生自野生型微生物的非變異腺苷鹽琥珀酸合成酶相比具有較弱活性的腺苷鹽琥珀酸合成酶變體。如上所述，此腺苷鹽琥珀酸合成酶變體表示在從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的 N 端算起第 85 個胺基酸有修飾，或胺基酸與 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或更高的同源性或同一性的胺基酸序列。

【0017】 具體地，腺苷鹽琥珀酸合成酶變體係其中 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的第 85 個胺基酸經以絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬鹽胺、麩鹽胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸或麩胺酸取代的變體，且腺苷鹽琥珀酸合成酶變體與包含 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的多肽者相比，可具有較弱的腺苷鹽琥珀酸合成酶活性，但腺苷鹽琥珀酸合成酶變體不限於此。

【0018】 為了本揭示內容的目的，當微生物包含腺苷鹽琥珀酸合成酶變體時，包含 IMP 或 XMP 的嘌呤核苷酸產量增加。這是有意義的，因為本揭示內容能夠經由本揭示內容的腺苷鹽琥珀酸合成酶變體增加 IMP 或

XMP 產量，而野生型棒狀桿菌屬菌株不能產生 IMP 或 XMP，或者即使產生 IMP 或 XMP，也是非常少量的。

【0019】 腺苷鹽琥珀酸合成酶變體可包括選自由其中從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的 N 端算起第 85 個胺基酸經以由絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬鹽胺、麩鹽胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸和麩胺酸所組成的群組選出的胺基酸取代的胺基酸序列所組成的群組。具體地，腺苷鹽琥珀酸合成酶變體可以由包含胺基酸序列的多肽組成，該胺基酸序列係選自由其中從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的 N 端算起第 85 個胺基酸經以由絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬鹽胺、麩鹽胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸和麩胺酸所組成的群組選出的胺基酸取代的胺基酸序列的群組。另外，腺苷鹽琥珀酸合成酶變體可包括其中從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的 N 端算起第 85 個胺基酸經以不同胺基酸取代的胺基酸序列，其具有腺苷鹽琥珀酸合成酶變體的胺基酸序列或與腺苷鹽琥珀酸合成酶變體的胺基酸序列具有 80% 或更高的同源性或同一性的胺基酸序列，但該胺基酸序列不限於此。具體地，本揭示內容的腺苷鹽琥珀酸合成酶變體可包含與胺基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或更高的同源性或同一性的多肽，其中 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的第 85 個胺基酸經以由絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬鹽胺、麩鹽胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸和麩胺酸所組成的群組選出的胺基酸取代。另外，明顯地，除了第 85 個位置的胺基酸外，具有上述序列同源性或同一性且表現出與蛋

白質相應的效果的任何胺基酸序列也必須屬於本揭示內容的範疇，即使部分胺基酸序列可能具有刪除、修飾、取代或添加。

【0020】也就是說，儘管本揭示內容描述了“具有特定 SEQ ID NO 的胺基酸序列的蛋白質或多肽”，顯然具有在序列的一部分中具有刪除、修飾、取代或增加的胺基酸序列的蛋白質也可以在本揭示內容中使用，只要該蛋白質具有與由相應的 SEQ ID NO.的胺基酸序列組成的多肽相同或相應的活性。例如，只要蛋白質具有與多肽變體相同或相應的活性，就不排除在胺基酸序列之前或之後有不改變蛋白質的功能的序列增加、天然發生的突變、靜默突變或其保守取代。顯然，具有這種序列增加或突變的蛋白質也落入本發明的範疇。

【0021】“保守取代”是指用另一種具有相似結構及/或化學性質的胺基酸取代胺基酸。此胺基酸取代通常可基於殘基極性、電荷、溶解度、疏水性、親水性及/或兩親性質的相似性而發生。例如，帶正電荷的(鹼性)胺基酸包括精胺酸、離胺酸和組胺酸；帶負電的(酸性)胺基酸包括麩胺酸和天冬胺酸；芳香族胺基酸包括苯丙胺酸、色胺酸和酪胺酸；及疏水性胺基酸包括丙胺酸、纈胺酸、異亮胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸。

【0022】因此，在本揭示內容中，“變體”可以進一步包括“特定 SEQ ID NO 的胺基酸序列的蛋白質或多肽”中的至少一個胺基酸的保守取代及/或修飾。例如，某些變體可包括其中除去至少一部分(例如，N 端前導序列或跨膜結構域)的變體。其他變體可包括其中一部分從成熟蛋白的 N 端及/或 C 端除去的變體。變體還可以包括其他修飾，包含對多肽的性質和二級

結構具有最小的影響的胺基酸的缺失或增加。例如，多肽可以與蛋白質 N 端的訊號(或前導)序列接合，該蛋白質的共轉譯或轉譯後導向蛋白質的轉移。多肽還可以與另一個序列或連接子接合，以促進多肽的鑑定、純化或合成。術語“變體”可以與修飾、修飾的蛋白質、修飾的多肽、突變體、突變蛋白、趨異等互換使用，並且可以使用任何術語而沒有限制，只要其以被修飾的意義使用即可。

【0023】 同源性和同一性意指兩個給定胺基酸序列或核苷酸序列之間的相關程度，並且可以表示為百分比。

【0024】 術語“同源性”和“同一性”通常可彼此互換使用。

【0025】 保守多核苷酸或多肽的序列同源性或同一性可以藉由標準序列比對演算法測定，並且可以組合使用由欲使用的程式建立的預設空位罰分。實質上，同源或相同序列可以在中度或高度嚴格條件下，沿其整個序列雜交或與至少約 50%、約 60%、約 70%、約 80%或約 90%之全長雜交。關於欲雜交的多核苷酸，還可以考慮包括簡併密碼子替代密碼子的多核苷酸。

【0026】 任何兩個多核苷酸或多肽序列是否具有同源性、相似性或同一性可以藉由例如已知的電腦演算法來測定，諸如，使用如 Pearson 等人 (1988)(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85):2444)的預設參數之“FASTA”程式。或者，它們可以使用 Needleman-Wunsch 演算法(Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443 to 453)在 EMBOSS 套組的 Needleman 程式(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276 to 277)(5.0.0 或更高的版本)(包含 GCG

程式套組(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 和[CARILLO ET AL.](1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073)中進行測定。例如，可以使用國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)的 BLAST 或 ClustalW 確定同源性，相似性或同一性。

【0027】多核苷酸或多肽的同源性、相似性或同一性可以藉由使用如 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482 中揭露的 GAP 電腦程式(例如，Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol* 48:443)比較序列資訊來測定。簡而言之，GAP 程式將相似性定義為相似的序列比對符號(即，核苷酸或胺基酸)的數量除以兩個序列中較短的符號的總數。GAP 程式的預設參數可以包括：(1)如 Schwartz and Dayhoff eds., *Atlas Of Protein Sequence And Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353 to 358(1979)中揭露的一元比較矩陣(包含對同一性給 1 的值，對於非同一性給 0 的值)和 Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids. Res.* 14:6745 之加權比較矩陣(或 EDNAFULL (NCBI NUC4.4 的 EMBOSS 版本)取代矩陣)；(2)對各空位罰分 3.0，對各空位中之各符號額外罰分 0.10(或對空位開放罰分 10，對空位延長罰分 0.5)；以及(3)對最終空位不予罰分。因此，如本文所用，術語“同源性”或“同一性”表示序列之間的相關性。

【0028】另外，明顯地，由於密碼子簡併性，多核苷酸可以轉譯成由其中從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的 N 端算起第 85 個胺基酸經以不同

胺基酸取代的胺基酸序列組成的多肽變體，或也可以包含與其具有同源性或同一性的多肽變體。另外，藉由在嚴格條件下與可以從已知基因序列(例如，與全部或部分核苷酸序列互補的序列)製備的探針雜交，可包含編碼包含胺基酸序列之腺苷醯琥珀酸合成酶變體的任何多核苷酸序列，該胺基酸序列中之 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的第 85 個胺基酸經以由絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸和麩胺酸所組成的群組選出的胺基酸取代，但不限於此。

【0029】 本揭示內容的另一態樣涉及編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的多核苷酸，或包含該多核苷酸的載體。

【0030】 如本文所用，術語“多核苷酸”是指具有超過一定長度的 DNA 或 RNA 股作為核苷酸聚合物，其是以共價鍵連接的核苷酸單體的長鏈，更具體地，是指編碼多肽變體的多核苷酸片段。

【0031】 編碼本揭示內容的多肽變體的多核苷酸可包括但不限於任何多核苷酸序列，只要其編碼具有腺苷醯琥珀酸合成酶活性的多肽變體即可。在本揭示內容中，編碼腺苷醯琥珀酸合成酶的胺基酸序列的基因是 *purA* 基因，具體地，該基因可以源自停滯棒狀桿菌(*Corynebacterium stationis*)，但不限於此。

【0032】 具體地，由於密碼子簡併或藉由考慮其中能較夠表現多肽的微生物的密碼子，可以在不改變多肽的胺基酸序列的範疇內對多核苷酸的編碼區進行各種修飾。可以包括任何多核苷酸序列而沒有限制，只要它編

碼其中 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的第 85 個胺基酸經以不同的胺基酸取代之腺苷鹽琥珀酸合成酶變體。

【0033】 另外，藉由在嚴格條件下與可以從已知基因序列(例如，與全部或部分核苷酸序列互補的序列)製備的探針雜交，可以包含編碼具有其中 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列中的第 85 個胺基酸經以不同胺基酸取代的腺苷鹽琥珀酸合成酶變體的活性的蛋白質的任何序列，但不限於此。

【0034】 “嚴格條件”是指能夠在多核苷酸之間進行特異性雜交的條件。這些條件在文獻中有詳細描述(例如，J. Sambrook 等人，同上)。嚴格條件可包含具有高同源性或同一性的基因的條件(例如，具有 40%或更高，特別是 90%或更高，更具體地 95%或更高，更具體地 97%或更高，特別是 99%或更高的同源性或同一性的基因)可以相互雜交的條件；具有較低同源性或同一性的基因不能相互雜交的條件；或者是作為用於南方雜交的常見洗滌條件的條件(例如，相應於 60°C，1×SSC，0.1%SDS 的鹽濃度和溫度；具體為 60°C，0.1×SSC，0.1%SDS；更具體為 68°C，0.1×SSC，0.1%SDS，一次，具體為兩次或三次)。

【0035】 雜交需要兩個核酸具有互補序列，儘管取決於雜交嚴格性，鹼基之間的錯配可能是可能的。術語“互補”係用於描述可彼此雜交的核苷酸鹼基之間的關係。例如，就 DNA 而言，腺嘌呤與胸腺嘧啶互補，胞嘧啶與鳥嘌呤互補。因此，本揭示內容還可以包括與整個序列以及實質相似的核酸序列互補的單離的核酸片段。

【0036】 具體地，可以使用包含在 T_m 為 55°C 的雜交步驟的雜交條件和藉由利用上述條件，而偵測具有同源性或同一性的多核苷酸。另外，

T_m 值可為 60°C、63°C 或 65°C，但不限於此，並且可以根據目的由彼等發明所屬技術領域技術人員適當地調控。

【0037】 用於雜交多核苷酸的適當嚴格性係取決於多核苷酸的長度和互補程度，並且變數在發明所屬技術領域中是眾所周知的(參照 Sambrook 等人，同上，9.50 至 9.51、11.7 至 11.8)。

【0038】 在本揭示內容中，編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的胺基酸序列的基因是 *purA* 基因，並且編碼該基因的多核苷酸與上述者相同。

【0039】 在本揭示內容中，編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的多核苷酸也與上述者相同。

【0040】 如本文所用，術語“載體”是指含有編碼目標多肽的多核苷酸的核苷酸序列的 DNA 構建體，該目標多肽可操作地連接合適的調控序列，使得該目標多肽在合適的宿主中表現。調控序列可包括啟動轉錄的啟動子、調控此轉錄的任何操縱基因序列、編碼 mRNA 之合適的核糖體結合位點的序列、以及調控轉錄和轉譯終止的序列。轉形入合適的宿主後，載體可以獨立於宿主基因組複製或發揮作用，或者可以整合到基因組本身中。

【0041】 本揭示內容中使用的載體可以沒有特別限制，只要該載體可在宿主細胞中複製，並且可以使用發明所屬技術領域已知的任何載體。常用載體的實例可包括天然或重組載體、黏質體、病毒和噬菌體。例如，可以使用 pWE15、M13，MBL3，MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、Charon21A 等作為噬菌體載體或黏質體載體，並且可使用彼等基於 pBR、pUC、pBluescriptII、pGEM、pTZ、pCL、pET 者等作為質體

載體。具體地，可以使用 pDZ、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BAC 載體等。

【0042】 在一個具體例中，編碼目標多肽的多核苷酸可以經由用於染色體插入的載體插入染色體中。發明所屬技術領域已知的任何方法(例如，藉由同源重組)可用於將多核苷酸插入染色體中，但是該方法不限於此。可以進一步包含用於確認載體插入染色體的選擇標記。選擇標記係用於選擇經以載體轉形的細胞(即，用於確認目標核酸分子的插入的存在)，以及可以使用能夠提供可選擇的表型(例如，抗藥性、營養缺陷型、對細胞毒性劑的抗性)的標記。在以選擇性試劑處理的情況下，只有能夠表現選擇標記的細胞才能存活或表現其他表型性狀，因此可以容易地選擇轉形細胞。

【0043】 本揭示內容的又一態樣提供了藉由含有腺苷醯琥珀酸合成酶變體或編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的多核苷酸而產生嘌呤核苷酸的微生物。具體地，含有腺苷醯琥珀酸合成酶變體及/或編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的多核苷酸的微生物可以是藉由使用含有多核苷酸的載體轉形而製備的微生物，但該微生物不限於此。

【0044】 如本文所用，術語“轉形”是指將包含編碼目標蛋白的多核苷酸的載體導入宿主細胞，使得由多核苷酸編碼的蛋白質可在宿主細胞中表現的過程。只要轉形的多核苷酸可以在宿主細胞中表現，轉形的多核苷酸是否插入宿主細胞的染色體並位於其上或位於染色體外是無關緊要的。此外，多核苷酸可包括編碼目標蛋白質的 DNA 和 RNA。多核苷酸可以以任何形式導入，只要可以將多核苷酸導入宿主細胞並在其中表現即可。例如，多核苷酸可以以表現盒的形式導入宿主細胞，該表現盒是包括其自主表現

所需的所有因素的基因構建體。表現盒可包括可與多核苷酸可操作地連接的啟動子、轉錄終止訊號、核醣體結合位點和轉譯終止訊號。表現盒可以以表現載體的形式，進行自我複製。另外，可以將多核苷酸導入宿主細胞中，以與宿主細胞中表現所需的序列可操作地連接，但不限於此。

【0045】 另外，術語“可操作地連接”是指基因序列和啟動子序列之間的功能性連接，其啟動和介導編碼本揭示內容的目標多肽的多核苷酸的轉錄。

【0046】 如本文所用，術語“包括多肽變體的微生物”或“包含腺苷醯琥珀酸合成酶變體的微生物”是指在微生物中具有 IMP 生產力或 XMP 生產力的微生物，其自然具有弱的 IMP 生產力，或其親代菌株沒有 IMP 生產力或 XMP 生產力。具體地，微生物可以是表現包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列中的至少一個胺基酸變異的腺苷醯琥珀酸合成酶變體的微生物，並且胺基酸修飾可以包括從 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列的 N 端算起第 85 個胺基酸經以不同的胺基酸取代。另外，微生物可以是表現具有腺苷醯琥珀酸合成酶活性的多肽變體的微生物，其中 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列中的第 85 個胺基酸經以不同的胺基酸取代，但是該微生物不限於此。

【0047】 微生物可以是含有編碼腺苷醯琥珀酸合成酶變體的多核苷酸的細胞或微生物，或用載體轉形並能夠表現腺苷醯琥珀酸合成酶變體的細胞或微生物。為了本揭示內容的目的，宿主細胞或微生物可以是任何能夠藉由含有腺苷醯琥珀酸合成酶變體而表現嘌呤核苷酸的微生物。

【0048】 在本揭示內容中，術語“產生嘌呤核苷酸的微生物 (microorganism producing purine nucleotides)”可與“產生嘌呤核苷酸的微

生物(pure nucleotide-producing microorganism)”和“具有嘌呤核苷酸生產力的微生物”互換使用。

【0049】 為了本揭示內容的目的，術語“嘌呤核苷酸”是指包含基於嘌呤的結構的核苷酸，例如 IMP 或 XMP，但是該嘌呤核苷酸不限於此。

【0050】 在本揭示內容中，術語“產生嘌呤核苷酸的微生物”可以是已發生遺傳修飾或已增強所需嘌呤核苷酸產生活性的微生物，包括野生型微生物或已發生天然或人工基因修飾的微生物，並且微生物可以是由於諸如插入外源基因、內源基因活性的增強或失活等原因而增強或削弱特定機制的微生物。為了本揭示內容的目的，產生嘌呤核苷酸的微生物的特徵在於，藉由含有腺苷鹽琥珀酸合成酶變體，可以提高所需嘌呤核苷酸的生產力，具體而言，該微生物可以是棒狀桿菌屬微生物。具體地，產生嘌呤核苷酸的微生物或具有嘌呤核苷酸生產力的微生物可以是其中涉及嘌呤核苷酸生物合成途徑的部分基因增強或減弱的微生物，或者涉及嘌呤核苷酸降解途徑的部分基因被增強或削弱。例如，微生物可以是其中編碼磷酸核糖基焦磷酸鹽胺轉移酶的 *purF* 的表現增強或編碼相應於 IMP 降解途徑的肌苷-5'-單磷酸脫氫酶的 *guaB* 表現減弱的微生物，但該微生物不限於此。

【0051】 如本文所用，術語“產生 5'-嘌呤核苷酸的棒狀桿菌屬微生物”是指天然或藉由修飾的具有嘌呤核苷酸生產力之棒狀桿菌屬微生物。具體地，如本文所用，具有嘌呤核苷酸生產力的棒狀桿菌屬微生物可以是藉由增強或削弱編碼腺苷鹽琥珀酸合成酶的 *purA* 基因的活性而具有提高的嘌呤核苷酸生產力的棒狀桿菌屬微生物。更具體地，如本文所用，具有嘌呤核苷酸生產力的棒狀桿菌屬微生物可以是藉由包含本揭示內容的腺苷鹽

琥珀酸合成酶變體或編碼該變體之多核苷酸而具有改善的嘌呤核苷酸生產力，或藉由以包含編碼腺苷鹽琥珀酸合成酶變體的多核苷酸的載體轉形棒狀桿菌屬微生物。“具有改善的嘌呤核苷酸生產力的棒狀桿菌屬微生物”是指與其轉形前的親代菌株或非變體微生物相比具有改善的嘌呤核苷酸生產力的微生物。“非變異微生物”是指野生型菌株本身，其為不包括產生嘌呤核苷酸的蛋白質變體的微生物，或不以含有編碼腺苷鹽琥珀酸合成酶變體的多核苷酸的載體轉形的微生物。

【0052】 如本文所用，“棒狀桿菌屬微生物”可以具體為麩胺酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glutamicum*)、產胺棒狀桿菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)、乳酸醱酵短桿菌(*Brevibacterium lactofermentum*)、黃色短桿菌(*Brevibacterium flavum*)、熱產胺棒狀桿菌(*Corynebacterium thermoaminogenes*)、高效棒狀桿菌(*Corynebacterium efficiens*)、停滯棒狀桿菌等，但微生物不限於此。

【0053】 本揭示內容的又一態樣提供了製備嘌呤核苷酸的方法，其包括在培養基中培養產生嘌呤核苷酸的棒狀桿菌屬微生物，並從該微生物或培養基中回收嘌呤核苷酸。

【0054】 在上述方法中，培養微生物可以藉由已知的批式培養、連續培養，補料批式培養等進行，但該培養方法不特別限於此。特別地，培養條件可以不受特別限制，但是可以使用鹼性化合物(例如，氫氧化鈉、氫氧化鉀或氨水)或酸性化合物(例如，磷酸或硫酸)調整最佳 pH(例如，pH 5 至 pH 9，特別是 pH 6 至 pH 8，並且最特別是 pH 6.8)，且可以藉由向培養物中添加氧氣或含氧氣體混合物來維持需氧條件。培養溫度可以維持在 20℃

至 45℃，具體地在 25℃ 至 40℃，並且培養可以進行約 10 小時至約 160 小時，但是條件不限於此。藉由培養而產生的 5'-肌苷酸可以分泌到培養基中或可以保留在細胞內。

【0055】 此外，在所使用的培養基中，糖和碳水化合物(例如，葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麥芽糖、糖蜜、澱粉和纖維素)、油和脂肪(例如，大豆油、葵花籽油、花生油和椰子油)、脂肪酸(例如，棕櫚酸、硬脂酸和亞麻油酸)、醇類(例如，甘油和乙醇)，有機酸(例如，乙酸)等可單獨使用或組合使用作為碳源，但該碳源不限於此。含氮的有機化合物(例如，蛋白腴、酵母提取物、肉提取物、麥芽提取物、玉米漿、大豆粉和尿素)或無機化合物(例如，硫酸銨、氯化銨、磷酸銨、碳酸銨、和亞硝酸銨等)可以單獨使用或組合使用作為氮源，但該氮源不限於此。磷酸二氫鉀、磷酸氫二鉀、與其相應的含鈉鹽等可以單獨使用或組合使用作為磷源，但該磷源不限於此。另外，培養基還可包括必需的生長促進材料，諸如其他金屬鹽(例如，硫酸鎂或硫酸鐵)、胺基酸和維生素。

【0056】 回收在本揭示內容的培養步驟中產生的嘌呤核苷酸的方法是根據培養方法而使用發明所屬技術領域已知的適當方法從培養物中收集所需的嘌呤核苷酸。例如，可以使用離心、過濾、陰離子交換層析術、結晶、HPLC 等，並且可以使用發明所屬技術領域已知的適當方法從培養基或微生物中回收所需的嘌呤核苷酸。

【0057】 另外，回收步驟可包括純化過程。可以使用發明所屬技術領域已知的適當方法進行純化過程。因此，回收的嘌呤核苷酸可以是純化

形式或包含嘌呤核苷酸的微生物醱酵液(Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair, 2008)。

[本發明之有利功效]

【0058】 當使用本揭示內容的腺苷鹽琥珀酸合成酶變體產生嘌呤核苷酸的棒狀桿菌屬微生物時，可以生產高產率的嘌呤核苷酸。

【實施方式】

【0059】 後文中，將藉由例示性具體例詳細描述本揭示內容。然而，對於本揭示內容所屬技術領域的技術人員顯而易見的是，提供這些例示性具體例僅是為了闡釋性目的，而不是意欲限制本揭示內容的範圍。

實施例 1：野生型產生 IMP 的菌株的製備

【0060】 棒狀桿菌屬的野生型菌株完全不能產生 IMP，或者即使可能也只能產生非常少量。因此，製備基於停滯棒狀桿菌 ATCC6872 的產生 IMP 的菌株。更具體地，產生 IMP 的菌株係藉由增強編碼磷酸核糖焦磷酸鹽胺轉移酶的 *purF* 基因的活性而製備，該磷酸核糖焦磷酸鹽胺轉移酶係嘌呤生物合成的第一種酶，並且弱化編碼相應於 IMP 降解途徑的 5'-肌苷酸脫氫酶的 *guaB* 基因的活性。

實施例 1-1：增強 *purF* 的菌株的製備

【0061】 為了製備其中 *purF* 基因的起始密碼子經修飾的菌株，製備含有 SEQ ID NO：3 的 *purF* 基因的插入載體。為了將 *purF* 基因選殖至插入載體中，具體地，使用停滯棒狀桿菌 ATCC6872 的基因組 DNA 作為模板和 SEQ ID NO：4 和 5 以及 SEQ ID NO：6 和 7 的引子進行 PCR，於 94

℃變性 30 秒，於 55℃黏合 30 秒，以及於 72℃延伸 2 分鐘，進行 30 個循環。將上述 PCR 獲得的兩個 DNA 片段作為模板和 SEQ ID NO：4 和 72 的引子再次進行 30 個循環的 PCR：於 94℃變性 30 秒，於 55℃黏合 30 秒，並於 72℃延伸 2 分鐘，以獲得 DNA 片段。所得 DNA 片段用限制酶 *XbaI* 切割，並選殖至經以相同酶切割的 pDZ 載體(韓國專利第 10-0924065 號和國際公開案第 2008-033001 號)中。將由此製備的載體命名為 pDZ-purF-gla。

【0062】 [表 1]

SEQ ID NO	引子	序列 (5'-3')
4	purF gla-1	GCTCTAGACCACTCTAAGACGCGGCCACC
5	purF gla-2	AAGTAGTGTTCAACATGACGCTGATTCTACTAAGTTT
6	purF gla-3	AGTAGAATCAGCGTCATGGTGAACACTACTTTCCCCAG
7	purF gla-4	GCTCTAGACTGTGCGCCACGATATCCAG

【0063】 藉由電穿孔將重組載體 pDZ-purF-gla 轉形入停滯棒狀桿菌 ATCC6872 中，並在含有 25 mg/L 卡那黴素(kanamycin)的培養基上選擇藉由同源重組而將載體插入基因組 DNA 的菌株。對所選初代菌株進行二次交換，對這些選擇的菌株進行測序，從而選擇導入突變的所需菌株。將該菌株命名為 ATCC6872::purF(gla)菌株。

實施例 1-2：guaB 弱化菌株的製備

【0064】 為了製備其中 *guaB* 基因的起始密碼子經修飾的菌株，製備含有 SEQ ID NO：8 的 *guaB* 基因的插入載體。為了將 *guaB* 基因選殖至插

入載體中，具體地，使用停滯棒狀桿菌 ATCC6872 的基因組 DNA 作為模板和 SEQ ID NO：9 和 10 以及 SEQ ID NO：11 和 12 的引物進行 PCR。如實施例 1-1 中所述者選殖 PCR 產物，並將製備的載體命名為 pDZ-guaB-alt。將載體導入 ATCC6872::purF(gla)，最後選擇導入上述突變的菌株。

【0065】 將最終選擇的產生 IMP 的基於野生型停滯棒狀桿菌 ATCC6872 的菌株命名為 CJI2330。

【0066】 [表 2]

SEQ ID NO	引子	序列(5'-3')
9	guaB alt-1	GCTCTAGACTACGACAACACGGTGCCTAA
10	guaB alt-2	CACGATTTTCGGTCAATACGGGTCTTCTCCTTCGCAC
11	guaB alt-3	AGGAGAAGACCCGTATTGACCGAAAATCGTGTTTCT
12	guaB alt-4	GCTCTAGAATCGACAAGCAAGCCTGCACG

實施例 1-3：CJI2330 的醱酵滴度測試

【0067】 在將菌種培養基(2 mL)分配到試管(直徑：18 mm)中後，將管高壓滅菌。將 ATCC6872 和 CJI2330 中的各者接種，並在 30℃振盪培養 24 小時並用作菌種培養基。將醱酵培養基(29 mL)分配到各 250 mL 振盪的錐形瓶中，並在 121℃高壓滅菌 15 分鐘。將菌種培養物(2mL)接種到培養基中並培養 3 天。將培養條件調整至 170 rpm，30℃和 pH 7.5。

【0068】 培養完成後，以 HPLC(SHIMAZDU LC20A)測量 IMP 生產量，且培養結果如下表 3 所示。以下結果表明 *purF*-增強和 *guaB* 弱化的菌株具有 IMP 生產力。

【0069】 [表 3]

菌株	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2330	0.50

- 種培養基：1%葡萄糖、1%蛋白胨、1%肉提取物、1%酵母提取物、0.25%氯化鈉、100 mg/L 腺嘌呤、100 mg/L 鳥嘌呤，pH 7.5

- 醱酵培養基：0.1%麩胺酸鈉、1%氯化銨、1.2%硫酸鎂、0.01%氯化鈣、20 mg/L 硫酸鐵、20 mg/L 硫酸錳、20 mg/L 硫酸鋅、5 mg/L 硫酸銅、23 mg/L L-半胱胺酸、24 mg/L 丙胺酸、8 mg/L 菸酸、45 µg/L 生物素、5 mg/L 鹽酸硫胺素、30 mg/L 腺嘌呤、1.9%磷酸(85%)、2.55%葡萄糖、1.45%果糖

實施例 2：弱化腺苷醯琥珀酸合成酶之變體的製備

【0070】 為了發掘能夠改善嘌呤核苷酸生產力的腺苷醯琥珀酸合成酶變體，製備了編碼腺苷醯琥珀酸合成酶的 *purA* 基因突變體庫。

實施例 2-1：含有 *purA* 基因的載體的製備

【0071】 為了製備 *purA* 基因的突變體庫，首先製備含有 *purA* 基因的重組載體。使用停滯棒狀桿菌 ATCC6872 的基因組 DNA 作為模板和 SEQ ID NO：13 和 SEQ ID NO：14 的引子進行 PCR，並使用 TOPO 選殖套組(Invitrogen)將 PCR 產物選殖至大腸桿菌載體 pCR2.1 中以獲得 pCR-*purA*。

【0072】 [表 4]

SEQ ID NO	引子	序列(5'-3')
13	purA 5'引子 F(溫度)	ATGGCTAAATACATTATCACT
14	purA 3'引子 R(溫度)	TGTGCTGGAGACCCCTCATAG

實施例 2-2：*purA* 基因的突變體庫的製備

【0073】 基於實施例 2-1 中製備的載體製備 *purA* 基因的突變體庫。將易錯 PCR 套組(Clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit)用於製備庫。在可能發生突變的條件下，使用 SEQ ID NO：15 和 SEQ ID NO：16 的引子進行 PCR。具體地，在每 1000 個鹼基對可以發生 0 至 3 個突變的條件下，在 94℃ 進行預熱 30 秒，然後進行 25 個循環：於 94℃ 維持 30 秒，和於 68℃ 維持 1 分 30 秒。將使用大引子(megaprimer)(500 ng 至 125 ng)獲得的 PCR 產物進行 PCR，進行 25 個循環：於 95℃ 維持 50 秒，於 60℃ 維持 50 秒，和於 68℃ 維持 12 分鐘，用 DpnI 處理，及轉形至大腸桿菌 DH5α 並塗佈在含有卡那黴素(25 mg/L)的 LB 固體培養基。在選擇 20 種不同類型的轉形菌落後，從中獲得質體並進行測序分析。結果證實，突變以 2 個突變/kb 的頻率在不同位點導入。採集約 20,000 個轉形的大腸桿菌菌落，提取質體，並將其命名為 pTOPO-*purA*-庫。

【0074】 [表 5]

SEQ ID NO	引子	序列(5'-3')
15	purA 錯誤 PCR 引子 F	AAGGGCAAAGCTACAGACATC
16	purA 錯誤 PCR 引子 R	CCGCCGAGCATGAGAACCCGA

實施例 3：製備的庫的評估和菌株的選擇

實施例 3-1：庫的評估

【0075】 將實施例 2-2 中製備的 pTOPO-purA-庫藉由電穿孔而轉形入實施例 1 中製備的 CJI2330 菌株中，並將菌株塗佈在含有 25 mg/L 卡那黴素的營養培養基，得到其中插入突變基因的 10,000 個菌落。將各菌落命名為 CJI2330::pTOPO_purA(mt)1 至 CJI2330::pTOPO_purA(mt)10000。

- 營養培養基：1%蛋白胨、1%肉提取物、0.25%氯化鈉、1%酵母提取物、2%瓊脂，pH 7.2

【0076】 將獲得的 10,000 個菌落中的各個接種在 200 μ L 高壓滅菌的種培養基中，並使用微孔板振盪器(TAITEC)在 96 $^{\circ}$ C 深孔板中在 30 $^{\circ}$ C，1200rpm 振盪培養 24 小時，並用作種培養物。將高壓滅菌的醱酵培養基(290 μ L)分配到 96 深孔板中，於其中接種 20 μ L 的種培養物各者，然後在與上述相同的條件下振盪培養 72 小時。

【0077】 為了分析培養基中產生的 5'-肌苷酸，在培養完成後，將 3 μ L 的培養上清液轉移到 96 孔 UV 板中，其中各孔含有 197 μ L 的蒸餾水，並使用微孔盤讀取機振盪 30 秒，及使用分光光度計在 25 $^{\circ}$ C 測量 270 nm 的吸光值。將吸光值與 CJI2330 菌株的吸光值進行比較，選擇 50 個顯示吸光值增加 10%或更高的突變菌株的菌落。與對照相比，其他菌落顯示出相似或降低的吸光值。

【0078】 以與上述相同的方式測量 50 種所選菌株的吸光值，以重複檢查 5'-肌苷酸生產量。選擇一種菌株 CJI2330::pTOPO_purA(mt)333，其與 CJI2330 菌株相比顯示出顯著改善的 5'-肌苷酸產率。

【0079】 為了確認所選突變體的存活性，進行醱酵滴度測試。

【0080】 在將種培養基(2mL)分配到試管(直徑：18mm)中後，將管高壓滅菌。將 CJI2330 和 CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 中的各者接種，且在 30℃ 振盪培養 24 小時並用作種培養物。將醱酵培養基(29mL)分配到各 250 mL 振盪錐形瓶中，並在 121℃ 高壓滅菌 15 分鐘。將種培養物(2mL)接種到培養基中，並培養 3 天。將培養條件調整至 170rpm，30℃ 和 pH 7.5。培養完成後，以 HPLC(SHIMAZDU LC20A)測量 IMP 生產量，培養結果如下表 6 所示。

【0081】 [表 6]

菌株	IMP (g/L)
CJI2330	0.50
CJI2330::pTOPO_purA(mt)333	0.61

【0082】 從如上結果可以看出，證實了與 CJI2330 菌株相比，在含有 *purA* 基因突變的載體的菌株中的 IMP 量增加了約 122%。因此，確定了庫中所選突變是有效的。

實施例 3-2：purA 變異的確認

【0083】 為了確認突變菌株的基因變異，使用 SEQ ID NO：17 和 18 的引子在 CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 菌株中進行 PCR，並對 PCR 產物進行測序，從而確認在 purA 基因中存在變異。

【0084】 [表 7]

SEQ ID NO	引子	序列(5'-3')
17	purA seq F	GACGCGTCGGAATCGCCGATA
18	purA seq R	CCGCCGAGCATGAGAACCCGA

【0085】 具體地，證實了 CJI2330::pTOPO_purA(mt)333 菌株的 *purA* 基因包括由 SEQ ID NO：2 表示的 purA 胺基酸序列的第 85 個胺基酸(即，甘胺酸)經以絲胺酸取代的變體(即，第 253 個核苷酸'g'被核苷酸'a'取代)。因此，在後文的實施例中，嘗試確認上述變異是否可以影響各棒狀桿菌屬微生物中的嘌呤核苷酸的生產量。

實施例 4：源自 ATCC6872 的產生 IMP 的菌株中 IMP 產生的確認

【0086】 製備源自 ATCC6872 的產生 IMP 的菌株，並將實施例 3 中確認的變異導入菌株中，並確認菌株的 IMP 生產力。

實施例 4-1：衍生自 ATCC6872 的產生 IMP 的菌株的選擇

【0087】 為了製備衍生自 ATCC6872 菌株的產生 IMP 的菌株，將 ATCC6872 的培養物以 10⁷ 個細胞/mL 至 10⁸ 個細胞/mL 的密度懸浮於磷酸鹽緩衝液(pH7.0)或檸檬酸鹽緩衝液(pH5.5)中，並用室溫或 32℃ 以 UV 紫外線 20 分鐘至 40 分鐘以誘發突變。將菌株以 0.85% 鹽水溶液洗滌兩次，並在稀釋後塗抹在含有 1.7% 瓊脂的基本培養基，從而獲得菌落，該瓊脂補充有適當濃度的提供抗性之材料。將各菌落在營養培養基中培養，

然後在種培養基中培養 24 小時。在醱酵培養基中培養各菌落 3 至 4 天後，選擇在培養基中顯示優異的積累的 IMP 產生的菌落。為了製備產生高濃度 IMP 的菌株，藉由以依序的方式進流程，而提供了腺嘌呤-營養缺陷型、鳥嘌呤-洩漏型、溶菌酶敏感性、3,4-脫氫脯胺酸抗性、鏈黴素抗性、磺胺胍抗性、正纈胺酸抗性和甲氧苄啶抗性。結果為最終選擇了具有對上述材料的抗性並具有優異的 IMP 生產力的 CJI2335 菌株。比較 CJI2332 菌株相對於 ATCC6872 的抗性，結果如下表 8 所示。

【0088】 [表 8]

特性	ATCC6872	CJI2332
腺嘌呤營養缺陷型	非營養缺陷型	營養缺陷型
鳥嘌呤-洩漏型	非營養缺陷型	洩漏型
溶菌酶敏感性	80 µg/mL	8 µg/mL
3,4-脫氫脯胺酸抗性	1000 µg/mL	3,500 µg/mL
鏈黴素抗性	500 µg/mL	2,000 µg/mL
磺胺胍抗性	50 µg/mL	200 µg/mL
正纈胺酸抗性	0.2 mg/mL	2 mg/mL
甲氧苄胺嘧啶耐藥性	20 µg/mL	100 µg/mL

- 基本培養基：2%葡萄糖、0.3%硫酸鈉、0.1%磷酸二氫鉀、0.3%磷酸氫二鉀、0.3%硫酸鎂、10 mg/L 氯化鈣、10 mg/L 硫酸鐵、1 mg/L 硫酸鋅、3.6 mg/L 氯化錳、20 mg/L L-半胱胺酸、10 mg/L 泛酸鈣、5 mg/L 鹽

酸硫胺素、30μg/L 生物素、20 mg/L 腺嘌呤、20 mg/L 鳥嘌呤，調整至 pH 7.3。

實施例 4-2：CJI2332 的醱酵滴度測試

【0089】 在將菌種培養基(2mL)分配到試管(直徑：18mm)中後，將管高壓滅菌。接種 ATCC6872 和 CJI2332 中的各者，並在 30℃振盪培養 24 小時並用作種培養物。將醱酵培養基(29 mL)分配到各 250 mL 振盪錐形瓶中，並在 121℃高壓滅菌 15 分鐘。將種培養物(2 mL)接種到培養基中並培養 3 天。將培養條件調整至 170rpm，30℃和 pH 7.5。

【0090】 培養完成後，以 HPLC(SHIMAZDU LC20A)測量 IMP 生產量，培養結果如下表 9 所示。

【0091】 [表 9]

菌種	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2332	1.74

實施例 4-3：含有 *purA* 變異的插入載體的製備

【0092】 為了將實施例 3 中選擇的變體導入菌株，製備了插入載體。製備用於導入 *purA*(G85S)變異的載體的程序如下。將作為模板的 CJI2330::Topo_ *purA*(G85S)和 SEQ ID NO：19 和 SEQ ID NO：20 的引物用於進行 PCR。PCR 係如下進行：於 94℃變性 5 分鐘；20 個循環的於 94℃變性 30 秒，於 55℃黏合 30 秒，於 72℃聚合 1 分鐘，及於 72℃聚合 5 分鐘。將如此獲得的基因片段各自用 *XbaI* 切割。將 T4 連接酶用於使各

基因片段選殖至以 *XbaI* 切割的線性 pDZ 載體中，從而製備 pDZ-purA (G85S)載體。

【0093】 [表 10]

SEQ ID NO	引子	序列(5'-3')
19	purA(G85S) F'	GCTCTAGATGCCGGCATTTCGAAGC
20	purA(G85S) R	GCTCTAGAAAGTAGTCGGTAAAGCCGTTG

實施例 4-4：將變體導入衍生自 ATCC6872 的 CJI2330 和 CJI2332 菌株及其評估

【0094】 將 *purA* 變異導入實施例 1 中製備的衍生自野生型的產生 IMP 的 CJI2330 菌株和實施例 4-1 中選擇的 CJI2332 菌株中，並評估各菌株的 IMP 生產量。為了確認 *purA* 基因存在變異，藉由 PCR 擴增 CJI2332 菌株的染色體 DNA。具體地，首先，*purA* 基因片段係以使用作為模板的 CJI2332 菌株的染色體 DNA 和 SEQ ID NO：17 和 18 的引子的 PCR 而擴增，其中該 PCR 係進行 28 個循環：於 94℃ 變性 1 分鐘；在 58℃ 黏合 30 秒，以及使用 Taq DNA 聚合酶在 72℃ 聚合 2 分鐘。將相同的引子用於分析擴增的 *purA* 片段的核苷酸序列，結果證實了 CJI2332 菌株的 *purA* 基因中沒有變異。

【0095】 然後，將 pDZ-purA(G85S)載體轉形至 CJI2330 菌株和 CJI2332 菌株中，並在含有卡那黴素(25 mg/L)的培養基選擇藉由同源序列的重組而將載體插入基因組 DNA 的菌株。對所選擇的初代菌株進行二次交換，從而選擇導入了目標基因變異的菌株。為了確認在所需轉形菌株中

導入基因變異，使用 SEQ ID NO：17 和 SEQ ID NO：18 的引子進行 PCR，並藉由序列分析而確認 PCR 產物。結果證實了將基因變異導入菌株中。將如此製備的菌株分別命名為 CJI2330::*purA*(G85S)和 CJI2332::*purA*(G85S)。

【0096】評估了 CJI2330、CJI2332、CJI2330::*purA*(G85S) 和 CJI2332::*purA*(G85S)菌株的 IMP 產率。培養結束後，以使用 HPLC 的方法測定各菌株的 IMP 產生量，培養結果如下表 11 所示。

【0097】 [表 11]

菌株	IMP (g/L)
CJI2330	0.50
CJI2330:: <i>purA</i> (G85S)	0.61
CJI2332	1.74
CJI2332:: <i>purA</i> (G85S)	2.03

【0098】在上述結果中，證實了導入 *purA* 基因變異的菌株顯示與衍生自野生型的產生 IMP 的 CJI2330 和 CJI2332 菌株相比，IMP 生產量分別增加了約 122%和約 116%。

【0099】CJI2332 菌株係根據布達佩斯條約的規定，於 2018 年 6 月 22 日寄存在韓國微生物培養中心 (Korean Culture Center of Microorganisms，KCCM)，寄存號為 KCCM12277P。另外，製備的 CJI2332::*purA*(G85S)菌株，也稱為 CJI2348，於 2018 年 6 月 22 日根據布達佩斯條約的規定寄存在 KCCM，並指定寄存號為 KCCM12280P。

實施例 5：藉由 *purA* 基因變異證實 5'-黃原酸的生產力

實施例 5-1：衍生自 ATCC6872 的產生 XMP 的菌株的選擇

【0100】 為了製備原生自 ATCC6872 的產生 5'-黃苷單磷酸(XMP)的菌株，將停滯棒狀桿菌 ATCC6872 菌株以 10^7 個細胞/mL 至 10^8 個細胞/mL 的密度懸浮於磷酸鹽緩衝液(pH7.0)或檸檬酸鹽緩衝液(pH5.5)中，並在室溫或 32°C 以 UV 處理 20 分鐘至 40 分鐘以誘發突變。將菌株以 0.85% 鹽水溶液洗滌兩次，並在稀釋後塗抹在含有 1.7% 瓊脂的基本培養基，該瓊脂補充有適當濃度的提供抗性的材料，從而獲得菌落。將各菌落在營養培養基中培養，然後在菌種培養基中培養 24 小時。在醱酵培養基中培養各菌落 3 至 4 天後，選擇在培養基中顯示了積累的優異的 XMP 產生的菌落。具體而言，菌株係選自彼等能夠在根據濃度添加氟色胺酸的培養基(添加培養基)中生長的菌株，更具體地，選自彼等能夠在氟色胺酸濃度為 100 mg/L 的培養基中生長且具有改善的 5'-黃原酸濃度的菌株的菌株。將所選菌株命名為 CJX1664。

- 基本培養基：葡萄糖 20 g/L、磷酸二氫鉀 1 g/L、磷酸二鉀 1 g/L、尿素 2 g/L、硫酸銨 3 g/L、硫酸鎂 1 g/L、氯化鈣 100 mg/L、硫酸鐵 20 mg/L、硫酸錳 10 mg/L、硫酸鋅 10 mg/L、生物素 30 μ g/L、鹽酸硫胺素 0.1 mg/L、硫酸銅 0.8 mg/L、腺嘌呤 20 mg/L、鳥嘌呤 20 mg/L，pH 7.2

- 添加培養基：將濃度為 10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、70 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L 的氟色胺酸添加到基本培養基中的培養基

【0101】 CJX1664 菌株的生物化學特徵係顯示在下表 12 中。參照表 12，CJX1664 菌株可以在添加濃度為 100mg/L 的氟色胺酸的添加培養基中生長。

【0102】 [表 12]

特徵	ATCC6872	CJX1664
氟色胺酸抗性	10 mg/L	100 mg/L

實施例 5-2：CJX1664 醱酵滴度測試

【0103】 在將菌種培養基(2 mL)分配到試管(直徑：18mm)中後，將管高壓滅菌。接種 ATCC6872 和 CJX1664 中的各者，並在 30℃ 振盪培養 24 小時並用作種培養物。將醱酵培養基(29 mL)分配到各 250 mL 振盪錐形瓶中，並在 121℃ 高壓滅菌 15 分鐘。將種培養物(2 mL)接種到培養基中並培養 3 天。將培養條件調整至 170 rpm，30℃ 和 pH 7.5。

【0104】 培養完成後，以 HPLC(SHIMAZDU LC20A)測量 XMP 生產量，培養結果如下表 13 所示。

【0105】 [表 13]

菌株	XMP (g/L)
ATCC6872	0
CJX1664	4.72

實施例 5-3：將變體導入 CJX1664 菌株及其評估

【0106】 為了確認實施例 5-1 中選擇的 CJX1664 菌株的 *purA* 基因的變異的存在，藉由 PCR 擴增 CJX1664 菌株的染色體 DNA PCR。具體地，首先，藉由使用 CJX1664 菌株的染色體 DNA 作為模板和 SEQ ID NO：17 和 18 的引子的 PCR 擴增 *purA* 片段，其中 PCR 係進行 28 個循環：於 94℃ 變性 1 分鐘；於 58℃ 黏合 30 秒，以及使用 Taq DNA 聚合酶於 72℃ 聚合 2 分鐘。將相同的引子用於分析擴增的 *purA* 基因片段的核苷酸序列，結果證實了 CJX1664 菌株的 *purA* 基因沒有變異。

【0107】 將實施例 4-3 中製備的載體轉形入 CJX1664 菌株，並在含有 25 mg/L 卡那黴素的培養基選擇以同源序列的重組將載體插入基因組 DNA 的菌株。對所選擇的初代菌株進行二次交換，從而選擇彼等導入了目標基因變異的菌株。所需轉形菌株中基因變異的導入係藉由序列分析而確認。

【0108】 評估了 CJX1664 和 CJX1664::*purA*(G85S)菌株各者的 XMP 生產力。培養結束後，以使用 HPLC 的方法測定各菌株的 XMP 生產量，培養結果如下表 14 所示。

【0109】 [表 14]

菌株	XMP (g/L)
CJX1664	4.72
CJX1664:: <i>purA</i> (G85S)	5.19

【0110】 從上表 14 中可以看出，CJX1664::*purA*(G85S)菌株與 CJX1664 菌株(即，基於 ATCC6872 的產生 XMP 的菌株)相比，顯示了 XMP 生產量增加約 109%。

【0111】 CJX1664 菌株係根據布達佩斯條約的規定，於 2018 年 7 月 6 日寄存在韓國微生物培養中心(KCCM)，寄存號為 KCCM12285P。另外，製備的 CJX1664::purA(G85S)菌株，也稱為 CJX1665，於 2018 年 7 月 6 日根據布達佩斯條約的規定寄存在 KCCM，並給定寄存號為 KCCM12286P。

實施例 6：用不同的胺基酸取代 purA 變體中的胺基酸

實施例 6-1：用於在 purA 變異體中插入胺基酸的載體的製備

【0112】經由上述實施例，證實了 purA(G85S)變異可以提高嘌呤核苷酸的生產力。在這方面，為了確認 purA 變異的位置重要性，檢視了用不同的胺基酸取代第 85 個胺基酸對嘌呤核苷酸的生產力的影響。製備用於插入 purA(G85S)變異的載體的程序如下。將實施例 4 中製備的 pDZ-purA(G85S)載體用作骨架以進行定點誘變。具體地，PCR 係使用表 15 中所示序列作為引子而在以下條件下進行 18 個循環：在 94℃變性 30 秒，在 55℃黏合 30 秒，在 68℃延伸 12 分鐘。將得到的 PCR 產物用 DpnI 切割，轉形入 DH5 α 菌株中，從而獲得菌落。如此獲得的菌落的載體係藉由已知的載體提取方法獲得，且獲得的載體的資訊顯示在下表 15 中。

【0113】 [表 15]

SEQ ID NO	引子	序列 (5'-3')
21	purA(G85A) F	CTTTGAGGAAATTGAAGCTCTCGAAGCCCGCGGCGC
22	purA(G85A) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGAGCTTCAATTCCTCAAAG
23	purA(G85V) F	CTTTGAGGAAATTGAAGTCCTCGAAGCCCGCGGCGC
24	purA(G85V) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGACTTCAATTCCTCAAAG
25	purA(G85L) F	CTTTGAGGAAATTGAACTGCTCGAAGCCCGCGGCGC
26	purA(G85L) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCAGTTCAATTCCTCAAAG
27	purA(G85M) F	CTTTGAGGAAATTGAAATGCTCGAAGCCCGCGGCGC
28	purA(G85M) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCATTTCATTCCTCAAAG
29	purA(G85I) F	CTTTGAGGAAATTGAAATCCTCGAAGCCCGCGGCGC
30	purA(G85I) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGATTTCAATTCCTCAAAG
31	purA(G85T) F	CTTTGAGGAAATTGAAACTCTCGAAGCCCGCGGCGC
32	purA(G85T) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGAGTTTCAATTCCTCAAAG
33	purA(G85N) F	CTTTGAGGAAATTGAAAACCTCGAAGCCCGCGGCGC
34	purA(G85N) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGTTTTCAATTCCTCAAAG
35	purA(G85Q) F	CTTTGAGGAAATTGAACAGCTCGAAGCCCGCGGCGC
36	purA(G85Q) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCTGTTCAATTCCTCAAAG
37	purA(G85C) F	CTTTGAGGAAATTGAATGCCTCGAAGCCCGCGGCGC
38	purA(G85C) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGCATTCAATTCCTCAAAG
39	purA(G85P) F	CTTTGAGGAAATTGAACCACTCGAAGCCCGCGGCGC
40	purA(G85P) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGTGGTTCAATTCCTCAAAG
41	purA(G85Y) F	CTTTGAGGAAATTGAATACCTCGAAGCCCGCGGCGC

42	purA(G85Y) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGTATTCAATTCCTCAAAG
43	purA(G85W) F	CTTTGAGGAAATTGAATGGCTCGAAGCCCGCGGCGC
44	purA(G85W) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCCATTCAATTCCTCAAAG
45	purA(G85K) F	CTTTGAGGAAATTGAAAAGCTCGAAGCCCGCGGCGC
46	purA(G85K) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGCTTTTCAATTCCTCAAAG
47	purA(G85R) F	CTTTGAGGAAATTGAACGCCTCGAAGCCCGCGGCGC
48	purA(G85R) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGCGTTCAATTCCTCAAAG
49	purA(G85H) F	CTTTGAGGAAATTGAACACCTCGAAGCCCGCGGCGC
50	purA(G85H) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGGTGTTCAATTCCTCAAAG
51	purA(G85D) F	CTTTGAGGAAATTGAAGATCTCGAAGCCCGCGGCGC
52	purA(G85D) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGATCTTCAATTCCTCAAAG
53	purA(G85E) F	CTTTGAGGAAATTGAAGAACTCGAAGCCCGCGGCGC
54	purA(G85E) R	GCGCCGCGGGCTTCGAGTTCTTCAATTCCTCAAAG

【0114】 [表 16]

編號	質體
1	pDZ-purA G85A
2	pDZ-purA G85V
3	pDZ-purA G85L
4	pDZ-purA G85M
5	pDZ-purA G85I
6	pDZ-purA G85T
7	pDZ-purA G85N
8	pDZ-purA G85Q
9	pDZ-purA G85C
10	pDZ-purA G85P
11	pDZ-purA G85Y
12	pDZ-purA G85W
13	pDZ-purA G85K
14	pDZ-purA G85R
15	pDZ-purA G85H
16	pDZ-purA G85D
17	pDZ-purA G85E

實施例 6-2：根據 purA 變體的變異位置而經以不同的胺基酸取代胺基酸的菌株的製備，以及 5'-肌苷酸生產力的比較

【0115】 將實施例 6-1 中製備的用於導入變體的 18 種載體中的各者轉形入 CJI2332 菌株，並且在含有 25 mg/L 卡那黴素的培養基選擇彼等藉由同源重組而將這些載體插入基因組 DNA 中的菌株。對所選初代菌株進行二次交換，從而選擇彼等導入目標基因變體的菌株。為了確認在所需轉

形菌株中導入基因變異，使用 SEQ ID NO：17 和 SEQ ID NO：18 的引子進行 PCR，並藉由序列分析而確認 PCR 產物。根據插入的變數命名菌株，如表 17 所示。

【0116】 [表 17]

編號	菌株
1	CJI2332::purA(G85A)
2	CJI2332::purA(G85V)
3	CJI2332::purA(G85L)
4	CJI2332::purA(G85M)
5	CJI2332::purA(G85I)
6	CJI2332::purA(G85T)
7	CJI2332::purA(G85N)
8	CJI2332::purA(G85Q)
9	CJI2332::purA(G85C)
10	CJI2332::purA(G85P)
11	CJI2332::purA(G85Y)
12	CJI2332::purA(G85W)
13	CJI2332::purA(G85K)
14	CJI2332::purA(G85R)
15	CJI2332::purA(G85H)
16	CJI2332::purA(G85D)
17	CJI2332::purA(G85E)

【0117】 5'-肌苷酸的濃度係藉由以與實施例 1 相同的方式培養菌株而分析。

【0118】 [表 18]

具 purA 變異的 5'-肌苷酸的濃度(g/L)		
編號	菌株	平均
		5'-肌苷酸
	CJI2332	1.74
對照組	CJI2332::purA(G85S)	2.03
1	CJI2332::purA(G85A)	1.93
2	CJI2332::purA(G85V)	1.84
3	CJI2332::purA(G85L)	2.01
4	CJI2332::purA(G85M)	2.01
5	CJI2332::purA(G85I)	2.02
6	CJI2332::purA(G85T)	2.02
7	CJI2332::purA(G85N)	1.83
8	CJI2332::purA(G85Q)	2.03
9	CJI2332::purA(G85C)	1.82
10	CJI2332::purA(G85P)	1.10
11	CJI2332::purA(G85Y)	1.92
12	CJI2332::purA(G85W)	0.39
13	CJI2332::purA(G85K)	1.86
14	CJI2332::purA(G85R)	1.30
15	CJI2332::purA(G85H)	1.67
16	CJI2332::purA(G85D)	2.02
17	CJI2332::purA(G85E)	1.94

【0119】 參照上表 18，證實了含有 *purA* 的菌株(其中編碼 *purA* 基因的胺基酸序列的第 85 個胺基酸經以不同的胺基酸取代)與不含上述變異的其他菌株相比，顯示出 IMP 生產量的顯著變化。也就是說，經證實編碼 *purA*

基因的胺基酸序列的第 85 個胺基酸是與嘌呤核苷酸產生相關的變異的重要位置，並且當編碼 *purA* 基因的胺基酸序列的第 85 個胺基酸是經以自由絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸和麩胺酸所組成的群組選出的胺基酸取代時，具有變異的微生物可顯著增加嘌呤核苷酸的產生。

【0120】綜上所述，本揭示內容所屬領域的技術人員將能夠理解，在不修改本揭示內容的技術概念或本質特徵下，本揭示內容可以以其他具體形式體現。在這方面，本文揭露的例示性具體例僅用於闡釋目的，不應解釋為限制本揭示內容的範疇。相反地，本揭示內容不僅要涵蓋例示性實施例，還要涵蓋可以包含在由所附申請專利範圍界定的本揭示內容的精神和範疇內的各種替換、修正、等效物和其他具體例。

【生物材料寄存】

【0121】

生物材料 1

[寄存國家] TW 中華民國
[寄存機構] 財團法人食品工業發展研究所
[寄存日期] 2019/08/22
[寄存號碼] BCRC 910927

生物材料 2

[寄存國家] TW 中華民國
[寄存機構] 財團法人食品工業發展研究所
[寄存日期] 2019/08/22
[寄存號碼] BCRC 910928

生物材料 3

[寄存國家] TW 中華民國
[寄存機構] 財團法人食品工業發展研究所
[寄存日期] 2019/08/22
[寄存號碼] BCRC 910929

生物材料 4

[寄存國家] TW 中華民國
[寄存機構] 財團法人食品工業發展研究所
[寄存日期] 2019/08/22
[寄存號碼] BCRC 910930

【序列表】

<110> 南韓商CJ第一製糖股份有限公司 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION)
<120> 新穎的腺苷醯琥珀酸合成酶及使用該合成酶製造嘌呤核苷酸的方法

<150> 10-2018-0089855
<151> 2018-08-01

<160> 54

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 1293
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> purA NT

<400> 1
atggcagcta tcgttatcgt cggcgcccaa tggggcgacg aaggcaaggg caaagctaca 60
gacatcctgg gtggacgcgt ggactacgtc gtcaagccca acggtggtaa caatgctggc 120
cacaccgttg tagtcgggtg cgaaaagtac gaactcaagc tgctgcccg cggcatcctc 180
tccgaaaacg ccgtgccagt gctgggcaac ggcgtagtta tcaacctoga agcactcttt 240
gaggaaattg aaggcctcga agcccgggc gctgatgctt cccgcttgcg tatttcggcc 300
aacgcgcacc tggttgcgcc ataccaccag accttagacc gcgtgcagga acgtttcttg 360
ggcaagcgcg cgattggcac caccggccgc ggtatcgcc cagcttatgc cgacaaggtc 420
gcgcgcgttg gagttcgcgt gcaagacatc ttcgacgaat ccatcctcgc tcagaaggtc 480
gaatccgcgc tggatatcaa aaaccagatg ctggtcaaaa tgtacaaccg caaggcgatt 540
gaccttgaga ccatcgtcga atacttcctg tcctaccgcg accgcctcga gcctatggtc 600
gtggactccg agtacgagct caacaccgct ctggatgccg gcaagcacgt gctcatggaa 660
ggcggccagg ccaccatgct cgacgtggac caccggcacc accttctgt gacctcgtcc 720
aaccceaacg ccggtgggtg atcggttaggc tctggcgctg ggcctaccg cateacgcac 780
tccttgggca tcattaaggc gtacaccacc cgcgttggtg ctggccatt cccaaccgag 840
ctctttgaca agtggggcga atacctccag accaccggcg gcgaggtcgg cgtcaacacc 900
ggccgcaccc gtcgttggtg ctggtatgac tctgtcattg cacgtacgc atcgcgcgtc 960
aacggcttta ccgactactt cttactaaa ctcgacgtgc tcaccggcat cggcgaaatc 1020
cctatttgcg tcgcctacga cgtcgatggc gaacgcctcg atgaaatgcc gctgactcag 1080
tcgcagtttc accacgcaca accaatttat gaaaccatgc cagcgtggga agaagacatc 1140
accggttgca ccaccttga ggagctgccg caaaaggcac aggattacgt gctgcggcta 1200
gaggagctgt ccggcaccgc catgtcatac atcgcggttg gccctggccg tgaccagacc 1260
atcgtgcgcc acgacgtgct cgacgagaaa taa 1293

<210> 2
<211> 430
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> purA AA

<400> 2

```

<400>      2
Met Ala Ala Ile Val Ile Val Gly Ala Gln Trp Gly Asp Glu Gly Lys
 1              5              10              15

Gly Lys Ala Thr Asp Ile Leu Gly Gly Arg Val Asp Tyr Val Val Lys
              20              25              30

Pro Asn Gly Gly Asn Asn Ala Gly His Thr Val Val Val Gly Gly Glu
      35              40              45

Lys Tyr Glu Leu Lys Leu Leu Pro Ala Gly Ile Leu Ser Glu Asn Ala
      50              55              60

Val Pro Val Leu Gly Asn Gly Val Val Ile Asn Leu Glu Ala Leu Phe
      65              70              75              80

Glu Glu Ile Glu Gly Leu Glu Ala Arg Gly Ala Asp Ala Ser Arg Leu
              85              90              95

Arg Ile Ser Ala Asn Ala His Leu Val Ala Pro Tyr His Gln Thr Leu
      100              105              110

Asp Arg Val Gln Glu Arg Phe Leu Gly Lys Arg Ala Ile Gly Thr Thr
      115              120              125

Gly Arg Gly Ile Gly Pro Ala Tyr Ala Asp Lys Val Ala Arg Val Gly
      130              135              140

Val Arg Val Gln Asp Ile Phe Asp Glu Ser Ile Leu Arg Gln Lys Val
      145              150              155              160

Glu Ser Ala Leu Asp Ile Lys Asn Gln Met Leu Val Lys Met Tyr Asn
      165              170              175

Arg Lys Ala Ile Asp Pro Glu Thr Ile Val Glu Tyr Phe Leu Ser Tyr
      180              185              190

Arg Asp Arg Leu Glu Pro Met Val Val Asp Ser Glu Tyr Glu Leu Asn
      195              200              205

Thr Ala Leu Asp Ala Gly Lys His Val Leu Met Glu Gly Gly Gln Ala
      210              215              220

Thr Met Leu Asp Val Asp His Gly Thr Tyr Pro Phe Val Thr Ser Ser
      225              230              235              240

Asn Pro Thr Ala Gly Gly Ala Ser Val Gly Ser Gly Val Gly Pro Thr
      245              250              255

Arg Ile Thr His Ser Leu Gly Ile Ile Lys Ala Tyr Thr Thr Arg Val
      260              265              270

Gly Ala Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Phe Asp Lys Trp Gly Glu Tyr
      275              280              285

Leu Gln Thr Thr Gly Gly Glu Val Gly Val Asn Thr Gly Arg Thr Arg
      290              295              300

Arg Cys Gly Trp Tyr Asp Ser Val Ile Ala Arg Tyr Ala Ser Arg Val
      305              310              315              320

Asn Gly Phe Thr Asp Tyr Phe Leu Thr Lys Leu Asp Val Leu Thr Gly
      325              330              335

Ile Gly Glu Ile Pro Ile Cys Val Ala Tyr Asp Val Asp Gly Glu Arg
      340              345              350

Phe Asp Glu Met Pro Leu Thr Gln Ser Gln Phe His His Ala Gln Pro
      355              360              365

Ile Tyr Glu Thr Met Pro Ala Trp Glu Glu Asp Ile Thr Gly Cys Thr
      370              375              380

Thr Phe Glu Glu Leu Pro Gln Lys Ala Gln Asp Tyr Val Leu Arg Leu
      385              390              395              400

```

Glu Glu Leu Ser Gly Thr Arg Met Ser Tyr Ile Gly Val Gly Pro Gly
405 410 415
Arg Asp Gln Thr Ile Val Arg His Asp Val Leu Asp Glu Lys
420 425 430

<210> 3
<211> 1500
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> purF

<400> 3
gtgggtgaaca ctacttttccc cagcgacgtg aatttagatg accaaggcga gcaagaaccc 60
cgcgaagagt gcggtgtctt tggcgtcttg gctcctggtg aagatgttgc gacactgacc 120
tacttttggtc tgttgcatt gcagcatcgt gggcaggaag ctgcaggtat cggcgtcggg 180
gatggagacc gcctcgttgt cttcaaagac atgggcttgg tctcgaatat ttctgatgag 240
tccatttttaa attccctcca tggctccgtg ggcgtggggc atacgcgcta ctgcactgcc 300
ggtggcaaag agtggtcgaa tgtccagccg atgtttaata ccacctcaa tggggtagac 360
atcgctttgt gccacaacgg caacttggtg aactaccaag aactgcgcga tgaagcagta 420
gctctgggac tttaccgaga gaatgaaaaa tccctgtcgg attccatgat catgacagct 480
ttgctggcgc acggagtcgg ggaaggcaac tctgtctttg acgccgctaa gcaactgctg 540
ccaagcatca aaggcgcttt ttgcttgacc ttaccgatg gcaagacctt gtacgccgcg 600
cgtgacccgc acggtgtacg ccccttggtc attggccgct tggcgcaagg ctgggttgtt 660
gcttcgaaa cctgtgcgtt ggatatactg ggcgcacagt ttatccgtga ggtagagccc 720
ggtgaactta tctctgtcaa tgaggcagga atccacagcg aaaaattcgc tgagccgaag 780
cgccagggct gcgtctttga atacgtctac ttggcacgtc cagacaccgt gatcaaaggc 840
cgcaacgttc acgcgacgcg cgtggatatt ggtcgcgcac ttgcgaaatc tcacctgcg 900
ccagaagctg acatggtcat ccccgtgcca gaatccggaa acccggcagc tgttggtac 960
gcccgggaat cgggcctgac atttgcgcac ggcttggtca aaaacgccta cgtgggtcga 1020
accttcattc agcccaacca gaccttgccg cagctgggta ttgcctcaa gctcaacccc 1080
ctgcgcgagg tcatcgaggg caagtcactc gttgtttag atgactctat gtccgcggc 1140
aacacccaac gcgcgctggt gcgcatgctg cgtgaagcag gcgctgctga agtgcacgtg 1200
cgcatigtct caccgccagt caaatggcct tgtttctacg gcattgactt cgcctcgcct 1260
ggtgaattga ttgctaatat caagccttct gatgatectc aggtagtaac cgatgcagtg 1320
tgcaagcta tcggagcaga ctctttaggg tttgtatctg tagatgagat ggttgaggca 1380
acgcaccaac ctatcaattc ctigtgtacc gcttgctttg atggcaacta cgaactcgga 1440
cttccgaccg ctaaccccaa tgctgacgct gtgcgaactt tgetcagcca aaagaactga 1500
1500

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> purF gla-1

<400>	4	
gctctagacc actctaagac gcggccacc		29
<210>	5	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purF gla-2	
<400>	5	
aagtagtggt caccatgacg ctgattctac taagttt		37
<210>	6	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purF gla-3	
<400>	6	
agtagaatca gcgtcatggt gaacactact ttccccag		38
<210>	7	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purF gla-4	
<400>	7	
gctctagact gtgcgcccac gatatccag		29
<210>	8	
<211>	1521	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	guaB	
<400>	8	
atgaccgaaa atcgtgtttc taccggtgga gatgacccaa ataaggttgc attgcatggc		60
ttgacgtttg atgacgtgct gctgctacct gccgaatcca atgttggtcc gtcggaagta		120
gacacttcgg cgcagttcac ccgcaatact cgtttaggta ttccitttggc atcggctgcg		180
atggacacgg ttactgaggc gcgcatggct attgccatgg cagccagggt tggcattggt		240
gtcttgcacc gcaacttgtc ctcgcaagag caggcggagc aggtcgaaat cgtcaagcgc		300
tctgagtccg gcatgggtcac cgaccctgtg accgcgaatc cagacatgac tatccaggaa		360
gttgatgacc tgtgtgcacg cticcgcata tctggctctc ctgttggtcaa cgaagacggc		420
accttgttgg gcatttgcac caaccgcgat atgcgctttg agcgcgacta ttcccgcaag		480
gtttctgaca tcatgaccgc tatgccgtg gttgtggcaa aagaaggcgt cagcaaggaa		540
gaagccctgg atctgctgtc gacgaacaag gtagaaaagc tacctatcgt tgataaaaac		600
aacaagctgg tcggtctgat taccgttaaa gactttgtta agaccgaaca gttcccgaat		660

3

tcctccaagg atgcttcggg ccgcttgcta gtagcagcag gtattggtac cggcgaggag 720
tcttatgagc gtgcaggcctt gcttgctgat gccggcgtgg acgtttctcat tgtcgactcc 780
gcacacgcgc acaataaccg cgtgctggaa atggctcgcg gcgtcaagaa tgacttcggc 840
tccaagattg atggttgctgg cggcaacctg gcaacacgct cggcagcaaa ggcgatgatt 900
gaggctggcg cagacgccat caaggctgggt attggtcctg gtcttatctg caccacccgt 960
gtggttgctg gtgttggtgc accacagatt accgcgatca tggaagcagc taccgtggct 1020
tgtgctgcgg gcgtgccttt gattgcagac ggcggcgatc agtactcggg tgacgttgct 1080
aaggcctttg ctgctggcgc ggactcggtc atgctgggct cgatgttcgc aggcaccctg 1140
gaggctcctg gtgacatcgt gattgtcggc ggcaagcagt acaagcgcta ccgcggcatg 1200
ggttcgatgg gcgctatgca aggcctgggc ctctccggcg agaagcgctt ttactccaag 1260
gaccgctact tccaggcaga tgtgcgcagc gaagataagc tggttccaga aggcgtggaa 1320
ggcaaggctt cttaccgcgg cgaaattggt cagattacc accagattgt gggcggtttg 1380
cgcgcgccaa tgggctacac tggctccgct actattgaag agctgaagac caagcagttc 1440
gtgcgtatta ccactgctgg ctgggctgag tcgcaccgc accacctgca gcaaactgta 1500
gaagctccga actaccgtta a 1521

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> guaB alt-1

<400> 9
gctctagact acgacaacac ggtgcctaa 29

<210> 10
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> guaB alt-2

<400> 10
cacgattttc ggtcaatacg ggtcttctcc ttgcac 37

<210> 11
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> guaB alt-3

<400> 11
aggagaagac ccgtattgac cgaaaatcgt gtttct 36

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> guaB alt-4

<400>	12	
gctctagaat cgacaagcaa gcctgcacg		29
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA 5' 引子 F (temp)	
<400>	13	
atggctaaat acattatcac t		21
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA 5' 引子 R (temp)	
<400>	14	
tgtgctggag acccctcata g		21
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA error PCR 引子 F	
<400>	15	
aagggcaaag ctacagacat c		21
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA error PCR 引子 R	
<400>	16	
ccgccgagca tgagaacccg a		21
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA seq F	
<400>	17	
gacgcgtcgg aatcgccgat a		21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	purA seq R	
<400>	18	
	ccgccgagca tgagaacccg a	21
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85S) F	
<400>	19	
	gctctagatg ccggcatittt tcgaagc	19
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85S) R	
<400>	20	
	gctctagaaa gtagtcggta aagccgttg	21
<210>	21	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85A) F	
<400>	21	
	ctttgaggaa attgaagctc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	22	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85A) R	
<400>	22	
	gcgcgcggg cttcgagagc ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	23	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85V) F	
<400>	23	
	ctttgaggaa attgaagtcc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	24	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	purA(G85V) R	
<400>	24	
gcgccgcggg	cttcgaggac ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	25	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85L) F	
<400>	25	
ctttgaggaa	attgaactgc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	26	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85L) R	
<400>	26	
gcgccgcggg	cttcgagcag ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	27	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85M) F	
<400>	27	
ctttgaggaa	attgaaatgc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	28	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85M) R	
<400>	28	
gcgccgcggg	cttcgagcat ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	29	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85I) F	
<400>	29	
ctttgaggaa	attgaaatcc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	30	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>			
<223>	purA(G85I)	R	
<400>	30		
	gcgccgcggg	cttcgaggat ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	31		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	purA(G85T)	F	
<400>	31		
	ctttgaggaa attgaaactc tcgaagcccg cggcgc		36
<210>	32		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	purA(G85T)	R	
<400>	32		
	gcgccgcggg	cttcgagagt ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	33		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	purA(G85N)	F	
<400>	33		
	ctttgaggaa attgaaaacc tcgaagcccg cggcgc		36
<210>	34		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	purA(G85N)	R	
<400>	34		
	gcgccgcggg	cttcgagggt ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	35		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	purA(G85Q)	F	
<400>	35		
	ctttgaggaa attgaacagc tcgaagcccg cggcgc		36
<210>	36		
<211>	36		
<212>	DNA		

<213> 人工序列

<220>

<223> purA(G85Q) R

<400> 36
gcgccgcggg cttcgagctg ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 37
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> purA(G85C) F

<400> 37
ctttgaggaa attgaatgcc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 38
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> purA(G85C) R

<400> 38
gcgccgcggg cttcgaggca ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 39
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> purA(G85P) F

<400> 39
ctttgaggaa attgaaccac tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 40
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> purA(G85P) R

<400> 40
gcgccgcggg cttcgagtgg ttcaatttcc tcaaag 36

<210> 41
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> purA(G85Y) F

<400> 41
ctttgaggaa attgaatacc tcgaagcccg cggcgc 36

<210> 42
<211> 36

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85Y) R	
<400>	42	
	gcgccgcggg cttcgaggta ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	43	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85W) F	
<400>	43	
	ctttgaggaa attgaatggc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	44	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85W) R	
<400>	44	
	gcgccgcggg cttcgagcca ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	45	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85K) F	
<400>	45	
	ctttgaggaa attgaaaagc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	46	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85K) R	
<400>	46	
	gcgccgcggg cttcgagctt ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	47	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85R) F	
<400>	47	
	ctttgaggaa attgaacgcc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	48	

<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85R) R	
<400>	48	
	gcgccgcggg cttcgaggcg ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	49	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85H) F	
<400>	49	
	ctttgaggaa attgaacacc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	50	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85H) R	
<400>	50	
	gcgccgcggg cttcgagggtg ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	51	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85D) F	
<400>	51	
	ctttgaggaa attgaagatc tcgaagcccg cggcgc	36
<210>	52	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85D) R	
<400>	52	
	gcgccgcggg cttcgagatc ttcaatttcc tcaaag	36
<210>	53	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	purA(G85E) F	
<400>	53	
	ctttgaggaa attgaagaac tcgaagcccg cggcgc	36

<210> 54
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> purA(G85E) R

<400> 54
gcgccgcggg cttcgagttc ttcaatttcc tcaaag

36

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種腺苷醯琥珀酸合成酶變體，其中從 SEQ ID NO：2 的胺基酸序列的 N 端算起第 85 個胺基酸經以不同的胺基酸取代，其中，該不同的胺基酸係選自由絲胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蛋胺酸、異亮胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、半胱胺酸、酪胺酸、離胺酸、天冬胺酸和麩胺酸所組成的群組。

【第2項】 一種多核苷酸，其編碼如申請專利範圍第 1 項所述之腺苷醯琥珀酸合成酶變體。

【第3項】 一種載體，包含如申請專利範圍 2 項所述之多核苷酸。

【第4項】 一種棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)微生物，其係藉由包括如申請專利範圍第 1 項所述之腺苷醯琥珀酸合成酶變體或如申請專利範圍第 3 項所述之載體而產生嘌呤核苷酸。

【第5項】 如申請專利範圍第 4 項所述之微生物，其中，該棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)微生物是停滯棒狀桿菌(*Corynebacterium stationis*)。

【第6項】 一種用於製備嘌呤核苷酸之方法，包括：

在培養基中培養如申請專利範圍第 4 項所述之棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)微生物；以及

從該微生物或該培養基中回收該嘌呤核苷酸。

【第7項】 如申請專利範圍第 6 項所述之方法，其中，該棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)微生物是停滯棒狀桿菌(*Corynebacterium stationis*)。