



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0077782  
(43) 공개일자 2009년07월15일

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)  
C12P 19/00 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7007775

(22) 출원일자 2007년09월26일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년04월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/079496

(87) 국제공개번호 WO 2008/097366

국제공개일자 2008년08월14일

(30) 우선권주장

60/826,919 2006년09월26일 미국(US)

(71) 출원인

시라큐즈유니버시티

미국뉴욕13244시라큐즈보운홀113

(72) 발명자

바디, 크리스토퍼 엔.

미국, 뉴욕 13224, 시라큐즈, 스콧홀름 테라스 217

룬드그렌, 벤자민 알.

미국, 뉴욕 13224, 시라큐즈, 아파트 에이. 크로이텐 레인 141

(74) 대리인

강명구

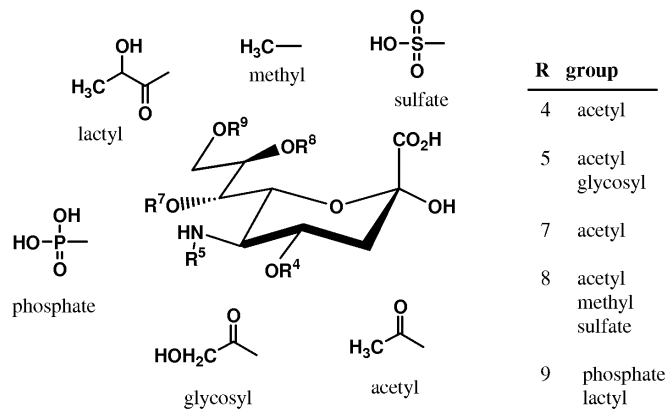
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 시알산의 생산 강화를 위해 대사적으로 조작된 대장균

(57) 요약

시알산을 생산하는 대사적으로 조작된 대장균 균주와 이 균주를 만드는 방법. 조작된 대장균 세포에서, *nanT*(시알산 운반물질) 및 *nanA*(시알산 알돌라제)를 비활성화시키고, *Neisseria meningitidis* 그룹 B의 *neuC* 및 *neuB* 유전자를 *nanT nanA* 대장균 세포에 도입시키고 과다발현시켰다. 추가로, 대장균의 글루코사민 합성효소 유전자, *glmS*를 *neuC* 및 *neuB* 유전자와 함께 과다발현시켰다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

미생물의 제1 DNA 분자내에 비활성 돌연변이, 이때 제1DNA 분자는 시알산 운반물질을 인코딩하고;  
 미생물의 제2DNA 분자내에 비활성 돌연변이, 이때 제2DNA 분자는 시알산 알돌라제를 인코딩하고; 그리고  
 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자로 구성되며, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 구성을 가진 유전공학적으로 조작된 미생물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 미생물에는 추가로 제2효소 인코딩 재조합 DNA 분자를 포함하며, 이때 제2효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 야생형 균주와 비교하였을 때 UDP-GlcNAc 수준을 증가시키기 위해 *glm* 또는 *nag* 경로에 DNA 분자에 돌연변이 또는 재조합 DNA 분자를 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 글루코사민 합성효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 글루코사민 합성효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자는 *glmS* 유전자인 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 대장균인 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 비활성 돌연변이는 *nanT* 및 *nanA* 유전자에 있는 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 8

제 2 항에 있어서, 제1과 제2 효소 인코딩 재조합 DNA 분자는 *neuC* 및 *neuB* 유전자인 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서, *neuC* 및 *neuB* 유전자는 *Neisseria meningitidis*에서 유래된 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서, 미생물은 세포 밖으로 시알산을 운반할 능력이 있는 것을 특징으로 하는 미생물.

### 청구항 11

시알산을 생산하기 위해 유전공학적으로 조작된 미생물을 만드는 방법에 있어서,  
 미생물에서 시알산 운반물질을 인코딩하는 제1 DNA 분자내에 비활성 돌연변이를 도입시키고;  
 미생물에서 시알산 알돌라제를 인코딩하는 제2DNA 분자내에 비활성 돌연변이를 도입시키고; 그리고  
 미생물에 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자를 도입시키고, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서, 미생물에 추가로 제2효소 인코딩 재조합 DNA 분자를 도입시키는 단계를 포함하며, 이때 제2 효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N- 아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제 11 항에 있어서, 야생형 균주와 비교하였을 때 UDP-GlcNAc 수준을 증가시키기 위해 *glm* 또는 *nag* 경로에 DNA 분자에 돌연변이 또는 재조합 DNA 분자를 추가 도입시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서, 글루코사민 합성효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 도입시키는 단계를 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제 11 항에 있어서, 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제 11 항에 있어서, 미생물은 세포 밖으로 시알산을 운반할 능력이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

시알산을 생산하는 방법에 있어서,

유전공학적으로 조작된 미생물을 제공하고, 이때 미생물은 미생물의 제1 DNA 분자내에 비활성 돌연변이, 이때 제1DNA 분자는 시알산 운반물질을 인코딩하고; 미생물의 제2DNA 분자내에 비활성 돌연변이, 이때 제2DNA 분자는 시알산 알돌라제를 인코딩하고; 그리고 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자로 구성되며, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 구성을 가지고; 그리고

탄소원 존재하에서 미생물을 배양하는 단계로 구성된 방법.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서, 미생물에 추가로 제2효소 인코딩 재조합 DNA 분자를 도입시키는 단계를 포함하며, 이때 제2 효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N- 아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 17 항에 있어서, 야생형 균주와 비교하였을 때 UDP-GlcNAc 수준을 증가시키기 위해 *glm* 또는 *nag* 경로에 DNA 분자에 돌연변이 또는 재조합 DNA 분자를 추가 도입시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제 19 항에 있어서, 글루코사민 합성효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 도입시키는 단계를 추가 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제 17 항에 있어서, 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

제 17 항에 있어서, 미생물은 세포 밖으로 시알산을 운반할 능력이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 23**

제 17 항에 있어서, 탄소원은 포도당, 글리세롤, 푸락토즈, 그리고 N-아세틸글루코사민에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 24**

- 미생물의 DNA 분자에 비활성 돌연변이, 이때 DNA 분자는 시알산 알돌라제를 인코딩하고;
- 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소를 인코딩하고; 그리고
- 제2효소 인코딩 재조합 DNA 분자, 이때 제2효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 UDP-N- 아세틸글루코사민 2-에피메라제를 인코딩하는 구성을 가지는 것을 특징으로 하는 미생물.

**청구항 25**

N-아실 시알산 유사체를 생산하는 방법에 있어서,  
 유전공학적으로 조작된 미생물을 제공하고, 이때 미생물은 미생물의 제1 DNA 분자에 비활성 돌연변이, 이때 제1DNA 분자는 시알산 운반물질을 인코딩하고; 미생물의 제2DNA 분자에 비활성 돌연변이, 이때 제2DNA 분자는 시알산 알돌라제를 인코딩하고; 그리고 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자로 구성되며, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하는 구성을 가지고; 그리고  
 세포내 UDP-N-아실글루코자인이 생성되도록 하는 물질 존재하에서 미생물을 배양하는 단계로 구성된 방법.

**명세서**

**기술분야**

- <1> 본 출원은 미국 예비 출원 60/826,919, (2006년 9월 26일자 출원됨)을 우선권으로 주장한다.
- <2> 본 발명은 대사적으로 조작된 대장균(이하 "*E. coli*"), 좀더 구체적으로는 시알산 생산 강화를 위해 대사적으로 조작된 *E. coli*에 관계한다.

**배경기술**

- <3> **2. 선행기술의 설명**
- <4> 시알산은 세포 시그널링, 세균성 병인 및 중앙 전이에 중요한 역할을 하는 생물학적 복합 탄수화물이다. 시알산의 물리화학적 성질은 의약 및 생명공학에 필요가 증가하면서 가치있는 공급원이 되었다.
- <5> 좀더 정확하게는, 시알산은 진핵세포의 세포 표면상에서 주로 볼 수 있는 산성을 띤 슈가 거대 패밀리를 설명하는데 이용되는 일반적인 용어이다. 가장 흔한 시알산은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid) 또는 Neu5Ac로써, 산성을 띤 9개 탄소 슈가는 몇 차례 변형되어 시알산 패밀리를 구성요소들을 만든다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 시알산 패밀리의 다양성은 50개이상의 구성요소로 나타낼 수 있다. 시알산은 N-아세틸뉴라민산 또는 Neu5Ac으로 불리는 산성을 띤 9개 탄소의 모화합물에서 유도된 세포-표면 탄수화물의 거대 패밀리를 나타낸다. Neu5Ac에 흔히 아세틸, 포스페이트, 설페이트, 락틸 기가 붙기도 하는데 이는 시알산에 의해 증개되는 바람직한 세포 시그널링 및 세포 흡착 과정에 필요한 것들이다.
- <6> 시알산은 당단백질 안정성, 세포 면역성, 용매 운반, 자가-인지, 신경 가소성(neuronal plasticity) 및 세포 시그널링과 같은 주요 생물학적 과정을 포함하는 다양한 기능을 수행한다. 시알산은 또한 사람의 질환에 주요한 역할을 한다. 예를 들면, 암 세포는 이들 표면에 시알산 수준이 상승되어 있거나 또는 시알화반응(sialylation)이 높은 것으로 나타났다. 과도한 시알화반응은 중앙 전이의 특징이 되는 침투성을 촉진시키고 세포간 상호작용을 감소시키는 것으로 나타났다. 시알산은 *in vivo*에서 암 조직의 비-침투성 이미지를 위한 도구로 현재 연구되고 있다. 심장 맥관 질환, 알코올 중독 및 당뇨병에서 시알산 수준이 증가된 것을 관찰할 수 있고, 따라서, 이와 같은 치명적 질환을 진단하고 감지하는 마커로 시알산을 이용한다. 일부 세균성 병인균은 포유류 세포의 세포의 표면을 모방함으로써 마스킹제(masking agent)로 작용하는 폴리시알산 캡슐을 보유한다. 폴리시알산 캡슐은 숙주 면역 반응으로부터 숨어있는 세균을 보호하여 세균이 감염을 일으킬 수 있도록 한다. 폴리시알산 캡슐화된 세균은 성인과 어린이들에서 생명을 위협하는 질병인 뇌수막염의 선두적인 원인 물질이다. 마지막

으로, 시알산 유사체들은 인플루엔자 뉴라미니다제 저해물질, 예를 들면 Relenza, 치료 또는 진단 물질의 안정 화제로써 약학 산업에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

<7> 시알산 공급원의 이용성이 제한적이며 고가이다. 일반적으로 시알산은 난황, 유장, 식용가능한 새 등지로부터 분리가능하나 이 방법은 시간이 많이 소요되고 번거로운 정제 과정을 요한다. 일반적으로 전체적인 수율은 낮고(~10-20%), 순도도 최저이다. 시알산 화학물의 합성 경로는 표적 분자의 복잡함으로 인하여 힘들다. 시알산 분리, 정제 및 합성으로 인한 어려움을 회피하기 위해 시알산 생산 방법으로 효소 합성이 현재 바람직하다. 시알산의 생합성 및 분해에 관여하는 효소의 클로닝 및 연속 분리로 직접적인 효소 반응에 의해 *in vitro*에서 시알산을 생산하게 되었다. 시알산의 효소 합성 수율이 높고(80%), 효소 혼합물의 직접적인 재결정을 통하여 순수 산물이 생성된다. 시알산 생산에서 효소 합성의 주요 단점은 비용 및 산업적인 규모로의 확장성에 있다.

<8> 상기에서 언급한 바와 같이, 시알산 생산 방법은 의학 및 바이오 산업에 광범위한 요구를 맞추기에 불충분하다. 대사적 조작 방법이 관련 문제들, 예를 들면, 시알산 분리, 정제, 합성 화학, 수율, 비용 및 산업 규모로 확장 등과 같은 문제를 성공적으로 극복하여 이 분야에서 의미있는 그리고 오래 기다려온 진전이라고 볼 수 있을 것이다.

<9> **3. 목적 및 장점들**

<10> 시알산 생산과 연관된 언급된 문제들을 해결하기 위해, 대사적으로 조작된 대장균(*E. coli*) 세포를 제공하는 것이 본원 발명의 주요 목적이자 장점이며, 이때 세포가 시알산을 생산한다.

<11> 본 발명의 추가 목적 및 장점은 대사적으로 조작된 대장균 세포를 만드는 방법을 제공하는 것이며, 이때 세포가 시알산을 생산한다.

<12> 본 발명의 추가 목적 및 장점은 대사적으로 조작된 대장균 세포를 이용하여 시알산을 만드는 방법을 제공하는 것이다.

<13> 본 발명의 다른 목적 및 장점들은 이하에서 명백하게 들어날 것이다.

<14> **발명의 요약**

<15> 본 발명의 구체예에 따르면, 시알산을 만드는 대사적으로 조작된 대장균 세포 및 이와 같은 세포를 만드는 방법이 제공된다. 구체적으로, 대사적으로 조작된 대장균 세포가 제공되는데, 이때 *nanT* (시알산 운반물질) 및 *nanA* (시알산 알돌라제) 유전자들이 비활성화되고, *Neisseria meningitidis* 그룹 B에 시알산 생합성의 *neuC* 및 *neuB* 유전자를 *nanT<sup>-</sup>nanA<sup>-</sup>* 대장균 세포로 도입시키고, 대장균의 글루코사민 합성 유전자, *glmS*를 *neuB*, *neuC*와 함께 공동발현시켰다. 본 발명의 추가 구체예에 따르면, 대사적으로 조작된 대장균 세포를 이용하여 시알산을 만드는 방법이 제공된다.

<16> 본 발명은 다음과 같은 구성의 유전공학적으로 조작된 미생물을 제공하는데: 미생물(microbe)내에 제1 DNA 분자에 비활성 돌연변이, 이때 제1 DNA 분자는 시알산 운반물질을 인코딩하고; 미생물내에 제2 DNA에 비활성 돌연변이, 이때 제2 DNA는 시알산 알돌라제를 인코딩하고; 그리고 제1효소-인코딩 DNA 분자, 이때 제1효소 인코딩 재조합 분자는 시알산 합성효소, UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩한다.

<17> 본 발명의 일부 구체예에서, 미생물은 추가로 제2효소-인코딩 재조합 DNA 분자를 추가로 포함하며, 이때 제2 효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩한다. 적절하게는, 미생물은 *glm* 또는 야생형 균주와 비교하여 UDP-GlcNAc 수준을 증가시키는 *nag* 경로내에 DNA에 재조합 DNA 분자 또는 돌연변이로 구성된다. 본 발명의 일부 구체예에서, 미생물에는 글루코사민 합성 효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 추가 포함한다. 바람직하게는, 글루코사민 합성효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자는 *glmS* 유전자이다.

<18> 본 발명의 일부 구체예에서, 미생물은 대장균이다.

<19> 바람직하게는, 미생물에서 비활성 돌연변이는 *nanT* 및 *nanA* 유전자내에 있다. 본 발명의 추가 구체예에서, 제1 및 제2 효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 *neuC* 및 *neuB* 유전자이다. 바람직하게는 *neuC* 및 *neuB* 유전자는 *Neisseria meningitidis*에서 유도된다. 바람직하게는 본 발명의 미생물은 세포 밖으로 시알산을 운반할 수 있다.

<20> 본 발명은 또한 시알산 생산을 위해 유전공학적으로 조작된 미생물을 만드는 방법도 제공하는데; 다음의 단계로 구성된다: 미생물(microbe)내에 시알산 운반물질을 인코딩하는 제1 DNA 분자내에 비활성 돌연변이를

도입시키고, 미생물에 시알산 알돌라제를 인코딩하는 제2 DNA내에 비활성 돌연변이를 도입시키고, 이때 제1효소 인코딩 재조합 분자를 도입시키고, 이때 제1효소 인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소, UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된다.

- <21> 본 발명의 일부 구체예에서, 시알산을 생산하는 유전공학적으로 조작된 미생물을 만드는 방법에는 제2 효소-인코딩 재조합 DNA 분자를 도입시키는 단계가 추가로 구성되는데, 이때, 제2효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소, UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된다. 적절하게는 본 발명의 방법은 *glm* 또는 야생형 균주와 비교하여 증가된 UDP-GlcNAc 수준을 증가시키는 *nag* 경로의 DNA에 재조합 DNA 분자 또는 돌연변이를 도입시키는 단계가 추가로 구성된다. 본 발명의 일부 방법은 미생물내로 글루코사민 합성효소를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 도입시키는 단계가 추가로 포함된다.
- <22> 본 발명의 방법을 시알산을 생산하는 방법을 추가로 제공하는데, 이 방법의 단계는 다음으로 구성된다:
- <23> -유전공학적으로 조작된 미생물을 제공하고, 이때 미생물내에 시알산 운반물질을 인코딩하는 제1 DNA 분자에 비활성 돌연변이를 포함하고; 미생물내에 시알산 알돌라제를 인코딩하는 제2 DNA 분자에 비활성 돌연변이로 구성되며, 그리고 미생물에 제 1 효소-인코딩 재조합 DNA 분자로 구성되며, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소, UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택되며;
- <24> -탄소원 존재하에 상기 미생물을 배양한다.
- <25> 본 발명의 일부 구체예에서, 탄소원은 포도당, 푸락토즈 또는 N-아세틸글루코사민이 될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.
- <26> 본 발명은 또한 유전공학적으로 조작된 미생물을 추가로 제공하는데;
- <27> -미생물내에 DNA 분자에 비활성 돌연변이, 이때 DNA 분자는 알돌라제를 인코딩하고;
- <28> -제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소를 인코딩하고;
- <29> -제2효소-인코딩 재조합 DNA 분자, 이때 제2효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제를 인코딩한다.
- <30> 본 발명은 또한 N-아실 시알산 유사체를 생산하는 방법도 제공하는데, 이 방법은 다음의 단계로 구성된다:
- <31> -유전공학적으로 조작된 미생물을 제공하고, 이때 미생물은 시알산 운반물질을 인코딩하는 제1 DNA에 비활성 돌연변이를 포함하고; 시알산 알돌라제를 인코딩하는 제2 DNA 분자에 비활성 돌연변이를 포함하고; 그리고 미생물에 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자, 이때 제1효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2- 에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하고; 그리고
- <32> -세포내 UDP-N- 아실글루코사민이 생성되는 시약 존재하에 미생물을 배양시킨다. 일부 구체예에서, 시약은 N-아실글루코사민 유사체가 될 수 있으나 이에 국한시키지는 않는다.

**발명의 상세한 설명**

- <39> 세균성 시알산 대사는 잘 이해되고, 이화 및 동화 작용 경로가 모두 확인되었다. *nan* 오페론은 시알산 대사에 필수적인 단백질을 인코딩하고, 수백종의 세균에서 발견된다. 대장균에서 이 경로는 도 2에서 볼 수 있는 것과 같이, 시알산 운반물질, NanT, 시알산 알돌라제, NanA, ManNAc 키나제, NanK, ManNAc-6-포스페이트 에피메라제, NanE로 구성된다. NanT는 시알산 이화 작용에 그 기능이 한정되지 않는데, 그 이유는 시알산의 취입 및 시알산이 폴리시알산 캡슐로 결합되는 것을 증대함으로써 폴리시알산 캡슐 합성에 관련된 것으로 설명되었기 때문이다.
- <40> 도 2에서 대사적으로 조작된 대장균에서 시알산 생산을 설명한다. "X"는 유전자 비활성화로 인하여 경로가 차단되었음을 나타낸다. 굵은 화살표는 유전자의 과다발현에 의해 대사의 상승된 유출을 나타낸다. 시알산 이화작용(catabolism)은 *nanT* (시알산 운반물질) 및 *nanA* (시알산 알돌라제) 유전자에 의해 차단되었다("X"). *Neisseria meningitidis* 그룹 B에서 시알산 생합성에서 *neuC* 및 *neuB* 유전자를 *nanT* *nanA* 대장균 균주내로 도입시켜 과다발현시킨다(굵은 화살표). *neuBC* 경로의 기질인 UDP-GlcNAc의 대사적 유입의 증가는 이 경로(굵은 화살표)로 *glmS* 과다발현을 조작함으로써 얻어졌다. 점선은 미확정 대사과정에 의한 시알산 유입을 나타낸다. 약어는 다음과 같다: Neu5Ac: N-아세틸뉴라미닌산, ManNAc: N-아세틸만노사민, ManNAc-6-P: N-아세틸만노사민-6-포스페이트, GlcNAc-6-P: N-아세틸글루코사민-6-포스페이트, UDP-GlcNAc: 우리딘 디포스페이트 N-아세틸글루

코사민, GlcN-6-P: 글루코사민-6-포스페이트, Fru-6-P: 프락토즈-6-포스페이트, PEP: 포스포페놀피루베이트, Gln: 글루타민, Glu: 글루타메이트, UDP: 우리딘 디포스페이트, *nanT*: 시알산 운반물질, *nanA*: 시알산 알돌라제, *nanK*: ManNAc 키나제, *nanE*: ManNAc-6-P 에피메라제, *glmS*: 글루코사민 합성효소, *gluM*: 글루코사민 무타제, *gluU*: GlcNAc-1-P 우리딘트랜스퍼라제/GlcN-1-P 아세틸트랜스퍼라제, *neuC*: UDP-GlcNAc 2-에피메라제, *neuB*: 시알산 합성효소, *glm*: UDP-GlcNAc 생합성, *nag*: GlcNAc 분해. *nan* 시스템의 산물은 GlcNAc 및 피루베이트이고, 이는 주요 대사과정에서 주요 분자들이다.

<41> 시알산 이화과정과는 대조적으로, 세균성 시알산 생합성은 대장균 K1 및 폴리시알산 캡슐을 합성하는 *N. meningitidis* 그룹 B를 포함하는 병원균 세균의 하위군에 한정된다. 시알산 생합성에 참여하는 두 가지 단백질은 NeuC 및 NeuB이다. NeuC는 ManNAc를 생성시키는 가수분해성 UDP-GlcNAc 2-에피메라제이다. NeuB는 ManNAc 및 포스포에놀피루베이트를 복합하여 시알산을 형성하는 합성효소이다. *neu* 경로의 다른 단백질은 시알산을 폴리시알산 캡슐로 결합시킨다. *nan* 및 *neu* 시스템의 효소들로부터 두 가지 시알산 생합성 경로가 조작되었다. 첫째로 조작된 경로는 이화성 NanAEK 단백질이다. NanA는 *in vitro*에서 과량의 피루베이트 존재하에 시알산을 합성하는 것으로 밝혀졌기 때문에, *nanAEK* 경로는 대사적으로 조작된 대장균 세포의 배양물로 과량의 GlcNAc를 공급함으로써 역전될 수 있을 것이다. GlcNAc가 바로 대장균 세포에 의해 취입되고, 세포내 GlcNAc는 NanEK 단백질의 지원을 통하여 ManNAc으로 전환될 수 있을 것으로 기대하였다. ManNAc의 높은 세포내 농도로 NanA 이화를 통하여 시알산 합성을 유도한다. BRL01(*lac*-제어된 T7 RNA 폴리메라제 유전자를 보유하는 *nanT*<sup>-</sup> 대장균 균주)/*nanAEK*의 웨이크-플라스크 실험으로부터 관찰되지 않았고, 그 결과, *nanAEK*는 시알산 생산에 효과가 없는 것으로 결론내렸었다.

<42> *N. meningitidis* 그룹 B의 NeuC 및 NeuB 단백질에 초점을 둔 두 번째로 조작된 경로를 하기에서 논의할 것이다. 이 경로의 장점은 NeuC의 기질 특이성으로, 도 2에서 볼 수 있는 것과 같이 통상의 세균 대사물질인 UDP-GlcNAc를 ManNAc으로 전환시킨다. NeuC, 가수분해성 UDP-GlcNAc 2-에피메라제는 에피머화(epimerization)를 조정하기 위해 가수분해 반응으로부터 에너지를 결합시키는 능력으로 인하여 다른 에피메라제보다 더 효과적이다. 후속 반응을 조정하기 위해 제1 반응으로부터 유리된 에너지를 사용하는 능력을 통한 에너지 효율로 인하여 본 발명에 따른 시알산 생산에는 UDP-GlcNAc 2-에피메라제가 적절하다.

<43> *neuBC* 경로의 직접적인 기질로서, 세포내 UDP-GlcNAc 풀(pools)은 시알산 합성 경로로 대사적 유입을 조절하여 시알산 역가를 조정한다. 도 5에서는 UDP-GlcNAc 풀의 유지에 관여하는 경로들을 보여준다. UDP-GlcNAc 풀의 증가는 시알산 생산성과 배양 역가를 증가시킨다. UDP-GlcNAc는 세균성 세포 벽 생합성의 주요 성분이며, 프락토즈-6-포스페이트 (Fru-6P)를 UDP-GlcNAc로 전환시키는 *glm* 경로와 가수분해된 UDP-GlcNAc를 Fru-6P로 복귀시키는 *nag* 경로에 의해 중앙 대사과정에 연결되어있다. 이들 두 경로는 강력하게 주요 세포 대사과정을 세포 벽 합성과 시알산 생산에 결합시킨다. 본 발명은 UDP-GlcNAc 풀을 증가시키기 위해 *nag* 경로를 통한 유입을 강화시켜 시알산 생산성을 개선시키는 방법을 제공한다. 주요 대사적 린치핀(linchpin) Fru-6P와 UDP-GlcNAc사이에 크로스 토크(cross talk)의 정도와 방향의 조절로 시알산 생산성을 최적화시킬 수 있을 것이다. 본 발명에서 제공되는 것과 같이, *glm* 및/또는 *nag* 경로의 조절과 UDP-GlcNAc 수준의 증가는 와일드 타입과 비교하였을 때, 상업적으로 시알산을 효과적으로 생산하는데 필수적이다.

<44> 본 발명의 구체예에 따르면, 의약 및 바이오기술 분야에 중요한 용도를 가지는 생물학적으로 중요한 복합체 분자인 시알산을 생산하도록 대장균을 성공적으로 조작하였다. 대사적으로 조작된 대장균으로부터 시알산을 생산하는 비용은 화학적 합성보다 실질적으로 낮으며, 효율적 합성과는 달리, 대사적으로 조작된 대장균은 산업 규모로 바로 생산할 수 있다.

<45> 낮은 세포 밀도의 웨이크-플라스크 배양물로부터, 시알산 생산은 최대 1.5g l<sup>-1</sup>에 이른다. 본 발명에 따라 이와 같이 대사적으로 조작된 균주를 고밀도 세포 발효에 결합시켜 시알산 생산을 리터당 몇 그램 수준으로 증가시킬 수 있을 것이다. 사실, 고밀도 세포 배양물, 예를 들면, 15g l<sup>-1</sup> 이상의 배양물로부터 시알산 생산을 10배 증가시키는 것도 가능하다. 산업 규모에서의 생산에서, 본 발명의 방법은 의학, 바이오산업 및 과학연구재단등의 지속적으로 늘어나는 수요에 부합하기 위해 충분한 시알산을 공급함으로써 시알산의 비용-효과적인 공급원으로도 기능을 한다.

<46> 본 발명의 일부 구체예에서, 시알산 생산은 기존의 조작된 *neuBCglmS* 경로를 변형시켜 추가 강화시킬 수도 있을 것이다. 예를 들면 글루코사민 합성에서 더 높은 턴오버 비율(turnover rate)을 가지고, 세포질 가용성이 더 많은 *GlmS* 단백질의 조작을 실행할 수도 있다.

- <47> 본 발명의 또 다른 주요 측면은 세포질로부터 배지로 시알산의 예상치 못한 유출이다. 생물학적 막을 통한 수가의 운반에 대하여 당분야에 표준 기술에 따르면 산성 수가는 막을 통과할 수 없다. 이들의 음성 전하에 결합된 높은 수준의 친수성이 막을 통과하지 못하도록 한다. 이는 포스포틸화된 그리고 설페이트화된 수가에 대해 잘 정리되어 있다. 시알산과 이의 유사체와 같은 노눌소닉산(Nonulosonic acid)은 산성 수가로 당분야에서 말한 것과 같이 이들 화합물들은 막을 통과할 수 없을 것이다. 따라서, 당분야에 따르면, 본 발명에서와 같이, 시알산이 세포내에서 생산되면 시알산은 세포를 떠나 배지로 들어갈 수 없을 것이다. 그러나, 본 발명에 따라 생산된 시알산의 경우는 이와 같은 경우가 아니다. 본 발명은 높은 수준의 시알산이 세포질에서 생산되고, 시알산이 막을 통과하여 배지로 들어갈 수 있는, 시알산을 생산하는 미생물 및 방법을 제공한다.
- <48> 생산 세포가 죽어 용해되어 시알산을 방출하지 않아야 하고 오히려 시알산을 방출하고 연속하여 더 많이 생산하기 때문에 이와 같은 막 운반이 시스템의 생산성을 상당히 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 적절한 구체예에서, 시알산을 생산하는데 이용되는 미생물은 세포 밖으로 시알산을 운반시킬 수도 있다.
- <49> 본 발명에 따라 대사적으로 조작된 대장균에서 시알산 생산의 확충은 시알산 유사체(비자연산인 시알산)의 생합성 및 생산에서 상당량이 된다. 시알산 유사체들은 세포 상호작용에 프로브, in vivo에서 세포 표면을 시각화시키는 물질 및 약품의 성분으로 이용된다. 현재, 시알산 유사체는 고가의 유도체 만노스아민 수가로부터 합성, 조작되어 세포 표면으로 간다. 대조적으로, 본 발명에 따른 대사적으로 조작된 대장균으로부터 시알산 유사체 생산은 만노스아민 등가체보다 저가인 글루코사민 유도체를 이용한다. 시알산 유사체가 연관된 하류 공정은 만노스아민 전구물질보다 시알산 유사체에 직접적인 접근으로 더 효과적으로 이루어질 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 대사적으로 조작된 대장균로부터 시알산을 생산하는 것은 시알산 및 이의 유사체들, 예를 들면, N-아실 시알산 유사체를 합성하는 비용 효과적이고 직접적인 경로이다. N-아실 시알산 유사체의 예로는 N-아지도아세틸-시알산, N-레블리노일-시알산, N-부타노일 시알산등이 포함되나 이에 한정시키지는 않는다.
- <50> 본 발명의 일부 구체예에서, N-아실 시알산 유사체를 생산하는 방법은 다음의 단계로 구성된다: 유전공학적으로 조작된 미생물을 제공하는데, 이때 미생물은 시알산 운반물질을 인코딩하는 제1DNA 분자내에 비활성 돌연변이를 포함하고; 시알산 알돌라제를 인코딩하는 제2DNA 분자내에 비활성 돌연변이를 포함하고; 그리고 미생물내에 제1 효소-인코딩 재조합 DNA 분자를 포함하고, 이때 제1 효소-인코딩 재조합 DNA 분자는 시알산 합성효소 및 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피메라제에서 선택된 효소를 인코딩하며; 세포내 UDP-N-아실글루코사민이 생성되는 시약 존재하에 미생물을 배양한다. 임의 적절한 시약이 이용될 수 있는데 예를 들면 N-아실글루코사민 탄소원이 이용될 수도 있다. 바람직하게는 시약은 N-아실글루코사민 유사체이다. 아실전이효소는 세포내 UDP-N-아실글루코사민을 생성하는 또는 시약을 형성하는데 이용될 수 있다.
- <51> 본 발명의 장점들은 다음의 실시예를 통하여 설명된다. 그러나, 이들 실시예에서 언급된 특정 물질 및 이의 양, 뿐만 아니라 다른 조건 등은 당분야에 광범위하게 적용할 수 있는 것으로 이해하고, 임의 방법으로도 본 발명을 이에 한정시키지는 안된다.

**실시예**

<52> **실시예 1**

<53> 이 실시예는 대장균 주요 유전자, *nanT*를 결손시켜 *nanT*<sup>-</sup> 대장균 돌연변이를 만드는 것에 관계하는데, *nanT*<sup>-</sup>는 시알산 운반물질로써 시알산 취입을 담당한다.

<54> *nanT* 녹아웃 대장균 K-12 균주 MG1655, [FB21071으로 명명함]를 Blattner laboratory(the University of Wisconsin, Madison, WI)에 요청하였다. 이 균주는 카나마이신 저항성을 부여하는 *nanT* 유전자로 Tn5 삽입체를 가진다. T7/*lac*-프로모터 플라스미드로부터 유전자 발현을 허용하기 위해, *lac*-프로모터하에 T7 RNA 폴리메라제 유전자를 λDE3 리소화반응 키트(Novagen, San Diego, California)를 이용하여 FB21071 염색체내로 삽입시켜 균주 BRL01을 만들었다.

<55> **실시예 2**

<56> 이 실시예는 상기에서 논의된 바와 같이 조작된 *neuBC* 경로에 관계하는데, 이의 발현은 T7 *lac* 프로모터에 의해 조절된다. 이 실험은 *lac*-조절된 T7 RNA 폴리메라제 유전자를 보유하는 *nanT*<sup>-</sup> 대장균 균주 BRL01로 조작된 *neuBC* 경로를 도입시키는 것을 설명한다.

<57> 여기에서 논의된 바와 같이, *nanT*<sup>-</sup> 대장균 균주 BRL01로 도입된 *Neisseria meningitidis* 그룹 B의 *neuC* 및

*neuB*는 시알산 생합성 유전자이다. *NeuC*는 세균에서 통상적인 대사물질인 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc)을 ManNAc으로 전환시키는 가수분해 에피메라제이다. *Neisseria meningitidis* 그룹 B의 캡슐 폴리사카라이드 생합성에 관계되는 *siaA* 유전자는 N-아실글루코사민-6-포스페이트 2-에피메라제 활성을 인코딩한다. ManNAc를 후속적으로 포스포에놀피루베이트로 응축시켜 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, *NeuB* 촉매작용을 통하여, 시알산을 만든다.

<58> *Neisseria meningitidis* ATCC BAA-335D의 게놈 DNA를 Polymerase Chain Reaction(PCR)에 이용한다. Pfu Turbo DNA 폴리메라제 (Stratagene, La Jolla, California) 및 테르모사이클러 Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 모든 PCR 반응에 이용한다. *neuB* 및 *neuC* 유전자는 PCR을 통하여 *N. meningitidis* MC58 그룹 B 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. *neuC*와 *neuB* 유전자의 클로닝을 위해 이용되는 조각된 제한효소부위(아래 굵게 표시된 부분)를 가지는 프라이머 서열을 PCR 반응에서 0.1 μM이용하였다. 나열된 절단 부위는 벡터 pKH22 내로 유전자를 클론시키는데 이용한 것들이다. 제한효소 부위를 가지는 PCR에 이용되는 *neuB* 및 *neuC* 프라이머는 다음과 같다:

<59> *neuB* (절단부위 - NdeI/EcoRI)

<60> cgccat**atg**caaaacaacaacgaatttaaattgg (forward, SEQ ID NO: 1)

<61> cagc**gaatt**cttattcaatatcagtttttttgattgagca (reverse, SEQ ID NO: 2)

<62> *neuC* (절단부위 - NheI/EcoRI)

<63> cgcag**ctag**caaaaggattctttgcattacaggtacc (forward, SEQ ID No: 3)

<64> cagc**gaattc**ctagtcataactggtgtacatt (reverse, SEQ ID NO: 4)

<65> 모든 증폭에 Touchdown 및 hotstart PCR을 실행하고, 테르모사이클러 조건은 다음과 같다: 95°C 5분간 1 사이클; 95°C에서 30초간; 72-57°C(사이클당 -1°C)에서 30초; 72°C에서 90초; 95°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 90초를 15사이클; 72°C에서 10분간 1 사이클.

<66> 제조업자의 지시에 따라 *neuB* 및 *neuC*의 PCR 산물을 pCR-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, California)내로 클론시켰다. 클론된 유전자를 서열화시켰다. *neuB*에 내부 EcoRI 부위는 Quikchange 부위 직접적인 돌연변이 키트 (Qiagen, Valencia, California)를 통하여 제거하였다. 표준 분자 클로닝 기술을 이용하여 유전자를 연속하여 벡터 pKH22의 T7lac-프로모터 아래에 서브클론시켜 플라스미드 pBRL22 (pKH22-*neuBneuC*)를 만든다. 플라스미드는 암피실린 저항성 마커를 가지고 있다.

<67> 플라스미드 pBRL22를 *nanT*<sup>-</sup> 대장균 균주 BRL01에 삽입하여 BRL01/pBRL22을 만들고, 이때 *neuC* 및 *neuB* 유전자들은 당분야에 공지되고 수용된 방법들을 이용하여 과다발현시켰다.

<68> *nanT*<sup>-</sup> 대장균 숙주 BRL01는 배지로부터 시알산을 취입하지 못하기 때문에 임의 시알산 산물을 이화시킬 수 없다는 가설이 있었지만, BRL01/pBRL22 (BRL01/*neuB C*)와 연관된 셰이크-플라스크 실험은 탄소 공급 원으로 0.5%GlcNAc의 단일 공급으로 20mg l<sup>-1</sup>에서 낮지만 감지가 가능한 양을 생산하였다.

<69> 낮은 수율은 내생 NanA에 의한 분해 때문이다. 따라서, 시알산 수율을 증가시키기 위해, 다음의 실시예에서 논의되는 것과 같이, BRL01의 *nanA* 유전자를 람다 Red 시스템을 이용하여 제거하여 균주 BRL02를 만든다.

<70> 대안으로, 또 다른 미생물(다른 대장균 균주)의 시알산 알돌라제를 인코딩하는 유전자에 비활성 돌연변이(*nanA* 유전자의 결손 또는 비활성 돌연변이와 같은)를 이용하여 시알산을 생산하는데, 이때 미생물은 실시예 5와 6에서 논의되는 바와 같은 기능적 시알산 운반물질을 가진다.

<71> **실시예 3**

<72> 이 실시예는 균주 BRL02를 만들기 위해 유전자 치환 전략을 이용하여 BRL01의 *nanA* 유전자의 결손과 실시예 2의 플라스미드 pBRL22를 BRL02로 도입시켜 BRL02/pBRL22를 만드는 것을 설명한다.

<73> *nanT*<sup>-</sup> *nanA*<sup>-</sup> 대장균 돌연변이 생성이 중요한데 그 이유는 *nanT* 유전자가 시알산 취입에 관여하고, *nanA* 유전자가 시알산 분해에 관여하기 때문이다. NanT는 시알산 운반물질이며 상기에서 언급한 바와 같이 시알산 취입을 맡고 있으며, NanA은 시알산을 피루베이트와 N-아세틸만노사민(ManNAc)로 절단하는 알돌라제이다. *nanA* 과

*nanT* 유전자는 도 2에서 볼 수 있는 것과 같이 시알산 대사를 파괴한다.

<74> 시알산 분해를 완벽하게 제거하고, 시알산 역가를 증가시키기 위해, 람다Red 시스템을 이용하여 BRL01의 *nanA* 유전자를 녹아웃시켜 *nanT<sup>-</sup> nanA<sup>-</sup>* 대장균 돌연변이체, BRL02를 만든다.

<75> 간략하게 설명하면, 테트라사이클린 저항성을 인코딩하는 카세트를 다음의 프라이머를 이용하여 벡터 pBR322 (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts)로부터 증폭시켰다;

<76> 5'-atggcaacgaatttacgtggcgtaatggctgcactcctgactccttttgatcatgtttgacagcttatcatcgat-3'

<77> (SEQ ID No: 5) 그리고

<78> 5'-tcacccgcgctcttgatcaactgctggccagcgccttcagttctggcatccaattcttgagtggtgaatccg-3' (SEQ ID No: 6).

<79> 프라이머는 *nanA*와 50 nt 상동성과(밀줄친부분) 그리고 테트라사이클린 저항성 유전자 25nt(밀줄치지 않음)로 구성된다. 이용된 테트라사이클린 조건은 실시예 2에서 언급된 것과 동일하다. 테트라사이클린-저항성 카세트는 PCR 반응으로부터 정제되고 에탄올 침전에 의해 농축된 겔이다. BRL01은 재조합에 필수적인 람다 Red 단백질을 가지는 pKD46로 형질변환시키고, Luria-Bertani (LB) 배지에서, 150rpm으로 웨이킹하면서 30°C에서 OD<sub>600</sub>=0.1이 될 때까지 성장시켰다. 람다 Red 유전자의 발현은 0.1% 아라비노스로 유도되었고, 유도된 세포는 OD<sub>600</sub>=0.5가 될 때까지 지속적으로 성장된다. 세포는 일렉트로컴피턴트(electrocompetent) 세포로 만들고 테트라사이클린-저항성 카세트(세포 50μl당 100ng DNA)로 형질변환시켰다. 형질변환된 세포는 37°C에서 웨이킹하면서 1시간 동안 LB에서 회수하고, 카나마이신(50μg/ml) 및 테트라사이클린(10μg/ml)이 보충된 LB상에 도말하였다. PCR로 *nanA* 및 *nanT* 결손에 대해 형질변환체를 스크리닝하였다.

<80> 실시예 2의 플라스미드 pBRL22를 *nanT<sup>-</sup> nanA<sup>-</sup>* 대장균 돌연변이 BRL02로 삽입시켜 BRL02/pBRL22를 만들고, *neuC* 및 *neuB* 유전자는 당분야에 공지되고 수용되는 방법을 이용하여 과다발현되었다.

<81> **실시예 4**

<82> 이 실시예는 BRL02/pBRL22 균주와 연관된 단일 피딩 웨이크 플라스크 실험을 설명한다. BRL02/pBRL22 균주를 이용하여 시알산 생산을 위한 글리세롤, 말토즈, 글루코즈, 프락토즈 및 GlcNAc를 포함하는 탄소원을 스크리닝하였다. 단일 피딩 실험을 위해 단일 초기 탄소 원을 0.5%로 배양물에 공급하였다. 배양물은 48시간 포스트 유도를 위해 성장시켜, 시알산 역가를 결정하였다.

<83> 상기에서 명시된 바와 같이, 리터당 6.62 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.0 g NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 170.5 mg MgSO<sub>4</sub>, 0.5% 여과-멸균된 탄소로 구성된 F1 미니멀 배지를 모든 웨이크-플라스크 실험에 이용하였다. 모든 배지에는 다른 언급이 없는 한 카나마이신(50μg/ml), 카르벤실린(50μg/ml) 및 테트라사이클린(10μg/ml)이 보충되어 있다. 모든 실험은 3중으로 실행된다. 레플리카당 10ml 스타트 배양물이 18시간 동안 웨이크(250rpm)하면서 37°C에서 LB 배지상에서 성장된다. 스타트 배양물로부터 세포들을 회수하여, 250ml Erlenmeyer 플라스크에 50ml F1으로 희석시켰다. 집중된 배양물을 웨이크(150rpm)하면서 30°C에서 성장시키고, 이들의 OD<sub>600</sub>값이 0.6 내지 0.8인 경우에 0.1mM 이소프로필-[beta]-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도하였다. 유도된 배양물을 48시간 동안 성장시키고, 1ml 샘플들을 공간적으로 떨어진 간격으로 취하였다. 원심분리를 이용하여 샘플로부터 세포를 제거하고, 상층액은 10분간 가열하였다.

<84> Bruker 300MHz 장비를 이용하여 D<sub>2</sub>O에서 프로톤 NMR에 의해 시알산 생산을 확인하였다. 세포 배양액으로부터 원심분리를 통하여 세포들을 제거하고, 설명된 것과 같이 이온-교환 크로마토그래피를 이용하여 상층액을 시알산을 분리하여 시알산을 정제하였다.

<85> 설명된 것과 같이, 가열된 상층액을 NanA/LDH 검사를 통하여 시알산 활성을 수치화하였다. 간략하게 설명하면, 시알산 농도는 설명된 바와 같은 시알산 알돌라제-락테이트 데하이드로게나제(NanA/LDH) 검사를 이용하여 결정하였다. LDH를 Roche (Penzberg, Germany)에서 구입하고, NanA는 재조합 대장균으로부터 분리하였다. GENESYS 20 분광광도계(Thermo Electron Corporation, Madison, Wisconsin)에서 흡수도를 측정하였다. 검사의 역학 범위는 0.035 내지 0.002mg/ml(0.11 내지 0.006 mmol/l) 시알산으로 확인되었다. 반응 조건은 100mM 트리스 완충액(pH 8.0), 0.15mM NADH, 2.5μg/ml LDH, 5μg/ml NanA, 0.010-0.030mg/ml 시알산으로 구성된다. 반응은 1시간 동안 37°C에서 NanA만을 제외하고 상기 모든 성분으로 실행하였다. 340nm에서 초기 흡수도를 기록하였다. 그 다음 NanA을 반응에 첨가하고, 반응을 37°C, 3시간 동안 항온 처리하였다. 최종 흡수도를 측정하였고, 초기와

최종 흡수치의 차이를 표준 곡선에 맞추어 샘플에서 시알산 농도를 정량화하였다.

<86> 도 3에서는 이와 같은 단일-피딩 실험 결과를 제공하는데, 이는 다음과 같다: GlcNAc, 103mg/ml; 포도당, 87mg/ml; 글리세롤, 57mg/ml; 푸락토즈, 40mg/ml; 말토스, 19mg/ml.

<87> 실시예 2의 결과와 비교하였을 때 NanA 없는 경우 역가는 5배 증가하였다. 공급원료로 GlcNAc는 최대 시알산 역가를 만들었고; 세포내 GlcNAc는 neuBC 경로의 결과적인 기질이 되는, 중요한 세포 벽 전구물질인 UDP-GlcNAc로 전환된다.

<88> 푸락토스, 글리세롤 및 포도당과 같은 저가의 원료는 GlcNAc의 경우와 같이 높은 역가를 만들지 못하는데 그 이유는 이들이 첫째로 도 2에서 볼 수 있는 것과 같이, GlcNAc 생합성 경로에 결합되어야 하기 때문이다. 대장균에서 GlcNAc은 GlcNAc 대사에서 주요 효소인 글루코사민 합성효소 G1mS의 작용에 의해 푸락토스가 글루코사민으로 전환되는 것과 함께 시작된다. 따라서, 다음의 실시예는 대장균의 *glmS* 유전자가 *neuBC* 경로로 공동-발현되는 것에 관계한다.

<89> **실시예 5**

<90> 이 실시예는 기능성 NanT를 발현시키거나 기능성 NanA가 부족한 대장균에서 시알산을 생산하는데 요구되는 물질들의 작제에 관계한다. 시알산 운반물질인, NanT를 인코딩하는 유전자를 PCR을 이용하여 XL1Blue 대장균의 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. PCR에 이용된 프라이머들은 다음과 같다;

<91> 5'-GACGCATATGGGCATCGCCACCG-3' (SEQ ID NO: 7) 그리고

<92> 5'-GACGTAACTTTTGGTTTGGACTAAATCGT-3' (SEQ ID No: 8).

<93> 도입된 *Nde I* 부위는 이텔릭체로 나타낸다. 증폭된 *nanT* PCR 산물은 겔-정제된 것이며, 플라스미드 pBRL50을 만들기 위해 제조업자의 지시에 따라 pCR- Blunt (Invitrogen)로 클론시켰다. *nanT* 내에 내부 *EcoR I* 부위는 QuikChange를 이용하여 제거함으로써 플라스미드 pBRL54를 만든다. *nanT* 유전자를 연속하여 pKH22의 *Nde I* 및 *EcoR I* 부위로 표준 분자 클로닝 과정을 이용하여 클론시켜 플라스미드 pBRL55를 만든다. 플라스미드 pBRL55를 *Avr II* 및 *Xba I*으로 처리하고, *Avr II-Xba I nanT* 단편을 pBRL47의 *Avr II* 부위로 전방 방향으로 클론시켰다. 이와 같이 생성된 pBRL57는 폴리시스트론 전사체 (5'-3' 방향) *neuB-neuC-glmS-nanT*를 인코딩한다.

<94> **실시예 6**

<95> 이 실시예는 기능성 NanT를 발현시키거나 기능성 NanA가 부족한 대장균에서 시알산 생산을 설명한다. BRL02/pBRL47 또는 BRL02/pBRL57 세포들을 250ml 웨이크 플라스크에서 50µg/ml 카르베니실린, 50µg/ml 카나마이신, 10µg/ml 테트라사이클린 및 0.5%(w/v) 포도당이 보충된 50ml F1 미니멀 배지에서 30°C/150rpm상태에서 생장시켰다. 광학 밀도(OD<sub>600</sub>)가 0.7- 0.9 AU가 되면, 배양물을 0.1 mM IPTG로 유도시켜 72시간동안 생장하도록 하였다. 0.5% (w/v) 포도당의 추가량을 유도 후 t = 0, 12, 24, 36, 48시간에 첨가하였다. 주기적으로 샘플을 취하여 정립된 NanN/LDH 검사를 이용하여 시알산을 검사하였다. 간략하게 설명하면, 원심분리를 이용하여 세포를 제거하고, 상층액을 10분간 가열하여 연속 검사하였다.

<96> BRL02/pBRL57 세포는 평균 315mg/ml의 시알산 역가를 만들지만, BRL02/pBRL47 세포는 평균 역가가 568mg/ml이었다. 대조적으로, 세포의 건조 전 중량(wet weight)당 시알산이 BRL02/pBRL47세포 - 64mg(mg/세포 건조 전 중량)보다 mgBRL02/pBRL57 세포가 높았다 - 515mg (mg/세포 건조 전 중량).

<97> **실시예 7**

<98> 이 실시예에서는 대장균의 글루코사민 합성효소 유전자인, *glmS*를 *neuBC* 경로내로 도입 조작하는 것에 관계한다. 특히, 이 실험은 대장균의 글루코사민 합성효소 유전자인 *glmS*를 과다발현시켜(PCR을 이용하여 증폭시키고, pBRL22내로 클론시켜 플라스미드 pBRL47를 만든다), 포도당 및 푸락토스를 포함하는 저가의 슈가 원료로부터 시알산 수율을 증대시키는 것에 관계한다. G1mS 은 *neuBC* 경로의 기질인 UDP-GlcNAc의 생합성에 주요 효소이고, UDP-GlcNAc 생합성으로 이용가능한 원료인 슈가를 더 많이 제공하면 *glmS* 과다발현이 기대되었다.

<99> 이 실시예에서는 플라스미드 pBRL47 (pKH22-*neuBneuCglmS*)를 만들기 위해 *neuC* 및 *neuB* 유전자의 증폭 및 클로닝에 대해 실시예 2의 방법 및 재료를 다음의 것과 함께 이용한다: XL1 Blue 대장균 (Stratagene, La Jolla, California)으로부터 데노믹 DNA를 PCR에 이용한다. Pfu Turbo DNA 폴리메라제 (Stratagene, La Jolla, California) 및 테르모사이클러 Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 모든 PCR 반응에 이용하였다. PCR을 이용하여 대장균 게놈 DNA로부터 *glmS* 유전자를 증폭시켰다. 조작된 제한효소 부위(아래에 굵

게 표시된 부분)를 가진 프라이머 서열을 PCR 반응에서 0.1 μM 농도에서 이용하였다. 절단 부위는 pKH22내로 유전자를 클론하는데 이용된 것들이었다. PCR에 이용된 *gImS* 프라이머는 다음과 같다:

- <100> ***gImS*** (cut site - *NdeI/EcoRI*)
- <101> ggc**ccat**atgtgtggaattggtggcgcg (forward, SEQ ID NO: 9)
- <102> ggc**gaatt**cttactcaaccgtaaccgatttgc (reverse, SEQ ID NO: 10)

<103> 모든 증폭에 Touchdown 및 hotstart PCR을 실행하고, 테르모사이클러 조건은 다음과 같다: 95°C 5분간 1 사이클; 95°C에서 30초간; 72-57°C(사이클당 -1°C)에서 30초; 72°C에서 90초; 95°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 90초를 15사이클; 72°C에서 10분간 1 사이클. 클론된 유전자를 서열화시켰다. 표준 분자 클로닝 기술을 이용하여 유전자를 연속하여 벡터 pKH22의 T7*lac*-프로모터 아래에 서브클론시켜 플라스미드 pBRL47 (pKH22-*neuBneuCgImS*)를 만든다. 플라스미드는 암피실린 저항성 마커를 가지고 있다. 플라스미드47가 T7*lac*-프로모터로부터 *neuBneuCgImS* 전사체를 인코딩하기 때문에 전사를 위해서는 기능을 하는 T7 RNA 폴리메라제를 요구한다. 플라스미드는 암피실린 저항성 마커를 가진다.

<104> 플라스미드 pBRL47은 *nanT nanA* 대장균 균주 BRL02에 삽입하여 BRL02/pBRL47을 만들고, 이때 *neuC* 및 *neuB* 유전자와 함께 *gImS* 유전자들은 당분야에 공지되고 수용된 방법들을 이용하여 과다발현시켰다.

<105> **실시예 8**

<106> 실시예 4에서 설명되는 모든 재료 및 방법을 여기에서 이용하나 BRL02/pBRL47 균주와 연관된 단일 피딩 웨이크-플라스크 실험은 탄소원으로 푸락토스를 이용하는 것만이 차이가 있다.

<107> 결과에서, BRL02/pBRL47의 단일 푸락토스-공급 실험으로 130mg/ml의 시알산 역가를 얻었다. 여기에서, 조작된 경로로 *gImS*를 추가하면, 푸락토스 공급의 경우 시알산 생산이 40mg/ml에서 130mg/ml으로 3배 증가되는 것이 관찰되었다.

<108> 푸락토스 피딩(feeding)은 실시예 4에서 포도당의 경우보다 상당히 낮은 시알산 역가를 만들기 때문에(도 3 참고), 시알산 생산을 위해 BRL02/pBRL47 균주를 다중 포도당 피딩(포도당은 우선 글루코네오제네시스(gluconeogenesis)를 통하여 푸락토스로 전환되기는 하지만)으로 최적화되었다. 도 4에서 볼 수 있는 것과 같이, 웨이크-플라스크 조건하에 포도당 피딩으로 리터당 시알산 생산이 1.5g으로 최적화되었다. 시알산 생산은 NanA/LDH 검사(점선)로 측정하였다. 생장은 600nm 또는 OD<sub>600</sub>(직선)에서 광학 밀도를 측정함으로써 모니터하였다. 유도 후 0, 12, 24, 36, 48시간에 BRU02/*neuBCgImS* 세포에 0.5% 포도당 및 수산화암모늄을 공급하였다. 실험과정동안에 시알산 생산의 상승이 지속되는 반면 생장은 유도 후 48시간에 정지되었다. 이 수치는 조작된 대장균 세포는 성장 요구조건이 맞는다면 지속적으로 시알산을 생산할 수 있다는 것을 나타내는 것이다.

<109> **실시예 9**

<110> 이번 실시예는 탄소 공급원으로 포도당을 제공한 BRL02/pBRL47 균주에 관련된 다중 피딩 웨이크 플라스크 실험만을 설명한다. 실시예 6에 나열된 단일 포도당 피딩으로 필적할 정도의 시알산 역가가 생성될 것으로 기대하였다. 웨이크 플라스크 실험, 시알산 생산 확인 및 시알산 농도 측정을 포함한 실시예 6에서 설명한 동일한 방법 및 재료를 이용하는데, 단 다음의 조건은 예외이다.

<111> 탄소 공급원으로 포도당의 다중 피딩을 통하여 BRL02/pBRL47을 시알산 생산에 최적화시켰다. 0.5% 포도당 및 수산화암모늄을 유도 후 0, 12, 24, 36, 48h에 공급하고, 유도된 BRL02/pBRL47 세포를 98시간(실시예 4에서 논의된 48시간과는 반대) 동안 성장시키고, 시알산 역가를 측정하였다. 수산화암모늄은 pH 6.9-7.1를 유지시키고 질소원으로 작용한다.

<112> 다중 포도당 피딩으로 BRL02/pBRL47(*neuBCgImS*) 관련된 이들 실험 결과에서 시알산 역가는 1.5g/ℓ로 최대 또는 최적화되었음을 나타냈다. 또한, 이 결과는 도 4에서 볼 수 있는 것과 같이 0.5% 포도당(시알산 1.5g당 포도당 30.0g)의 총 6회 피딩으로 얻은 것이다. 이 결과에서 BRL02에서 *gImS*와 *neuBC*의 과다발현으로 낮은 단가의 슈가 공급원보다 시알산 생산이 3배 증가되었다는 것을 알 수 있었다.

<113> 이 역가는 유사한 실험인 GlcNAc의 다중 공급을 이용한 BRL02/pBRL22(*neuBC*)-[1.4g/ℓ 역가]의 경우에서 얻은 결과와 필적할 수준이었다.

<114> **실시예 10**

<115> 이 실시예는 N-부타노일 시알산인 시알산 유사체 생산에 관계한다. N-부타노일 시알산을 생산하기 위해, N-부타노일글루코스 아민을 우선 합성하였다. 글루코사민 하이드로클로라이드 (5.0 g, 23 mmol, 1.0 equiv) 및 트리에틸아민(16 mL, 115 mmol, 4.8 equiv)을 실온에서 DMF(48 mL)에 현탁시켰다. 반응 혼합물은 30분간 교반시키고, 부티릭 무수물(butyric anhydride)(4.5 mL, 27 mmol, 1.2 equiv)을 한방울씩 적하시켰다. 반응물을 실온에서 18시간동안 교반시켰다. 에틸 아세테이트 및 hexan(800 mL, 1:3 v:v)을 첨가하여 산물을 침전시켰다. 혼합물을 30분간 교반시키고, 여과시키고, 고체는 진공하여 건조시켜 N-부타노일 글루코사민  $\alpha$ : $\beta$  아노머 1:1 혼합물 5.1g (20 mmol, 87% 수율)을 얻었다.

<116> 기존에 설명된 웨이크 플라스크 실험에서 설명된 것과 같이, BRL02/pBRL47으로부터 N-부타노일 시알산 생산을 실시하고, 0.3% 글리세롤 그리고 0.3% N-부타노일 글루코사민 또는 N-아세틸글루코사민(네가티브 대조군)을 다중 피딩하여 최적화시켰다. 공급원과 수산화암모늄을 유도후 0, 12, 24, 36, 48 시간에 첨가하고, 유도된 BRL02/pBRL47 세포를 98시간 동안 성장시켰다. 수산화암모늄은 pH 6.9 - 7.1를 유지시키고 질소원으로 작용한다. 복합된 시알산 및 N-부타노일 시알산 역가는 NanA/LDH 검사를 이용하여 결정하였다. N-부타노일글루코사민 피딩의 평균 복합 역가는  $67 \pm 26$  mg/L이었다. N-아세틸글루코사민 피딩의 평균 복합 역가는  $822 \pm 23$  mg/L이었다.

<117> **실시예 11**

<118> 이 실시예에서는 기능을 하는 NanT, NanA, NagA 효소를 보유하지 않는 대장균 균주를 삭제하는 것을 설명한다. Red 리콤비나제 시스템을 이용하여 BRL02에서 *nagA* 유전자를 삭제하였다. PCR를 이용하여 다음의 프라이머로 플라스미드 pKD3으로부터 클로람페니콜-카세트를 증폭시켰다:

<119> 5'-ATGTATGCATTAACCCAGGGCCGGATCTTTACCGCCACGAATTTCTTGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' (SEQ ID No: 11) ; 그리고

<120> 5'-TTATTGAGTTACGACCTCGTTACCGTTAACGATGGTCTTGGTGATTTTAACATATGAA TATCCTCCTTAG (SEQ ID NO: 12). 프라이머는 pKD3의 프라이밍 부위(이테리체)와 *nagA*에 상동성이 50bp로 구성된다. PCR-증폭된 카세트는 겔-정제되고, 에탄올 침전에 의해 농축되고, 10 mM Tris 완충액, pH 8.0에 현탁시켜, 40ng/ $\mu$ l 농도로 만든다. 약 80ng 클로람페니콜-카세트를 BRL02/pKD46 세포로 전기천공시키는데, 이는 문헌에 기술된 과정에 따라 준비하였다. 클로람페니콜-저항성 클론을 선별하고, *nagA* 위치에서 PCR를 통하여 스크린하였다; 이로써 균주 BRL03가 만들어졌다. BRL03에서 클로람페니콜 마커의 제거는 FLP 리콤비나제를 인코딩하는 플라스미드 pCP20으로 형질변환시켜 실행하였다. 형질변환체는 암피실린 저항성이 있고 그리고 클로람페니콜에 대해서는 저항성이 없는 것으로 선택되었다. BRL03/pCP20 세포는 18시간 동안 43°C에서 콜로니-정제시켰다. 클론은 클로람페니콜 감응성 테스트를 하고, 클로람페니콜 마커의 제거에 대해서는 PCR로 스크리닝하였다. 클로람페니콜 마커 제거로 *nagA* 균주 BRL04가 생성되었다.

<121> **실시예 12**

<122> 이 실시예는 기능을 하는 NanT, NanA, NagA 효소를 보유하지 않는 대장균 균주로부터 시알산을 생산하는 것을 설명한다. 이 작업은 nag 경로의 하향 조절을 이용하여 단위 세포, 시간당 시알산 생산량과 시알산 역가를 최적화시킬 수 있다. BRL04 세포는 *neuC-neuB-glmS* 폴리시스트론 전사체를 인코딩하는 pBRL47으로 형질변환시켰다. 시알산 생산 실험은 3중 반복하였다. BRL4/pBRL47 세포는 16125mm 멸균 시험관에 100 $\mu$ g/ml 암피실린, 50 $\mu$ g/ml 카나마이신, 10 $\mu$ g/ml 테트라사이클린 및 0.5%(w/v) 포도당이 보충된 2ml F2 미니멀 배지에서 성장시켰다. F2 미니멀 배지는 F1과 동일한데, 단 F2의 경우는 인산완충염의 농도가 F1의 2배이다. 배양물을 6시간 성장시키고, 0.5 mM IPTG로 유도시켜 36시간동안 성장하도록 하였다. 시알산 역가는 NanN/LDH 검사를 이용하여 무세포 상청액으로부터 결정하였다. BRL04/pBRL47 세포는 배양물  $l$  당 0.46g/ $l$ 의 평균 역가를 생성하였다.

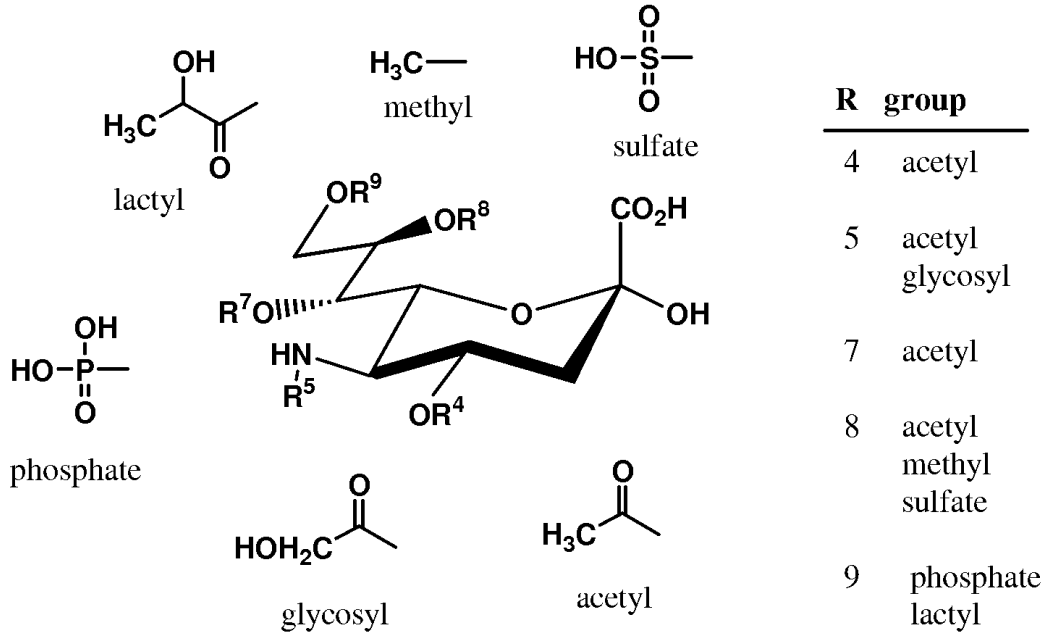
**도면의 간단한 설명**

- <33> 본 발명은 다음의 첨부 도면과 함께 발명의 상세한 설명을 통하여 충분히 이해될 수 있을 것이다.
- <34> 도 1은 다양한 시알산 패밀리의 구조를 설명한다.
- <35> 도 2는 본 발명의 구체예에 따라 대사적으로 조작된 대장균 세포에 의해 시알산 생산을 도식화하여 설명한다.
- <36> 도 3은 본 발명의 구체예에 따라 대사적으로 조작된 대장균 세포에 의한 시알산 생산에서 탄소원의 영향을 그래프로 설명한다.

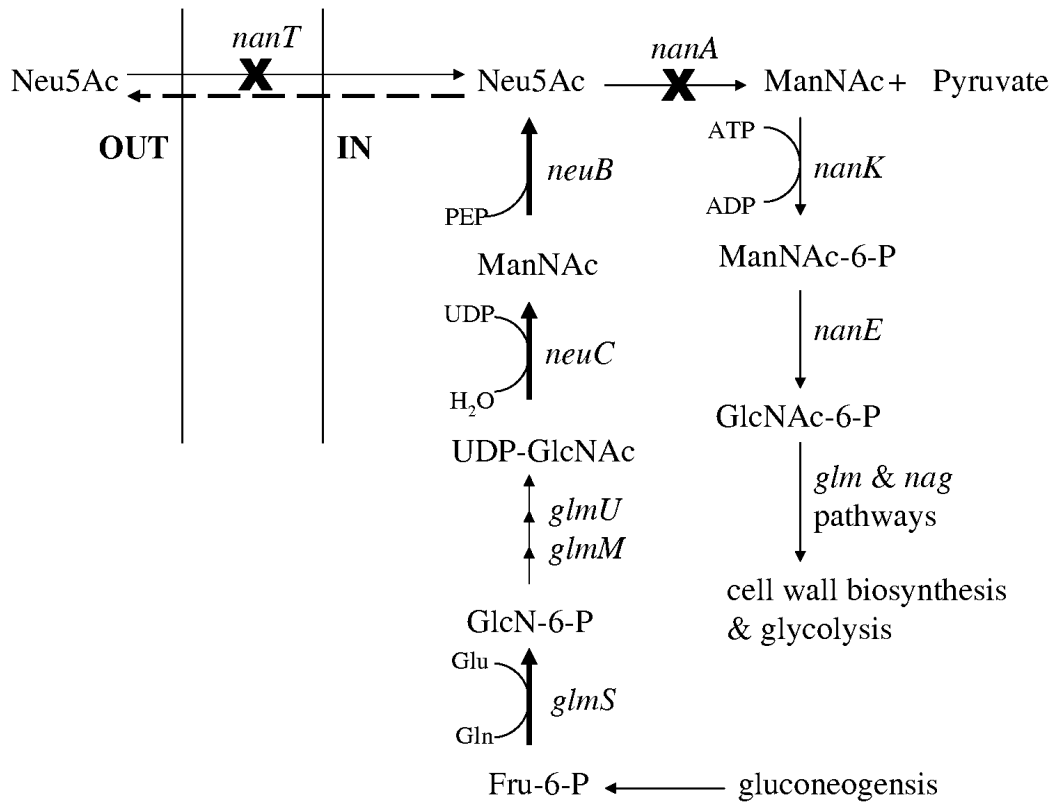
- <37> 도 4는 본 발명의 구체예에 따라 다중 포도당 공급에 의해 시알산 생산의 최적화를 그래프로 설명한다.  
 <38> 도 5는 본 발명의 구체예에 따라 시알산 생산과 연관된 경로를 설명한다.

도면

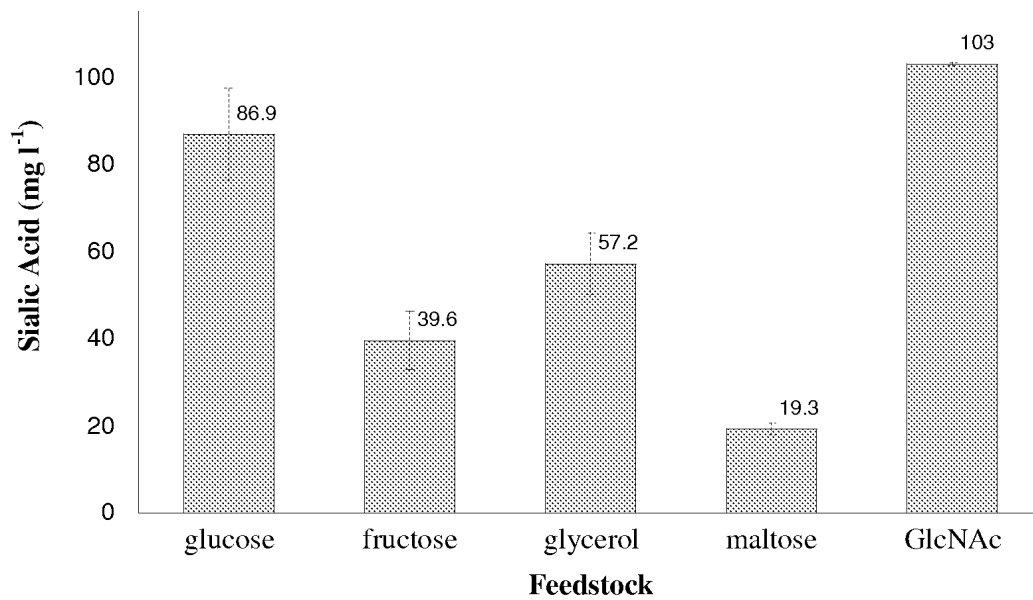
도면1



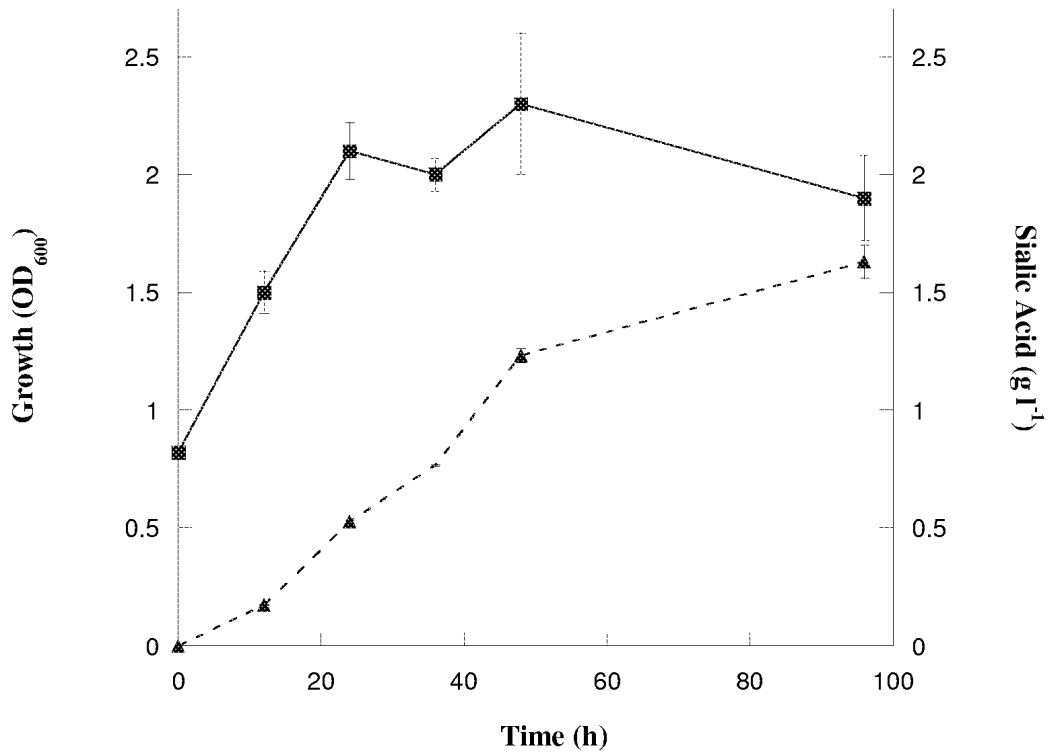
도면2



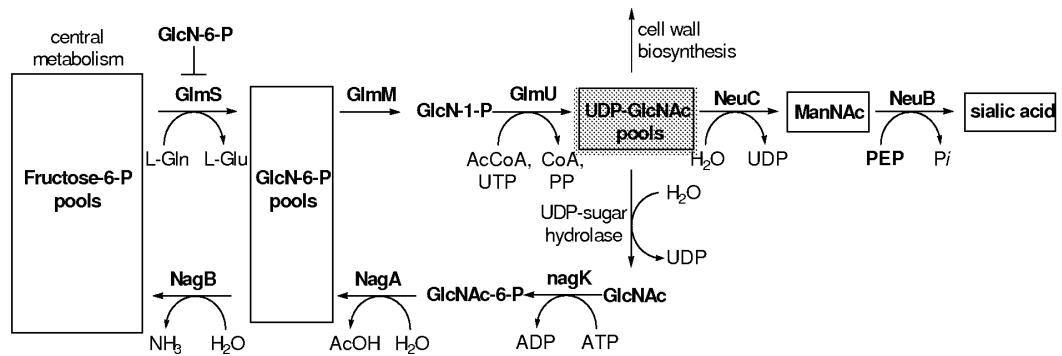
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Syracuse University  
Boddy, Christopher N
- <120> Metabolically Engineered Escherichia Coli For Enhanced Production of Sialic Acid
- <130> 156P121A

<140> PCT/US2007/079496  
<141> 2007-09-26

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Neisseria meningitidis

<400> 1  
cgcacatg caaacaaca acgaatttaa aattgg 36

<210> 2  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Neisseria meningitidis

<400> 2  
cagcgaattc ttattcaata tcagttttt tgatttgagc a 41

<210> 3  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Neisseria meningitidis

<400> 3  
cgcagctagc aaaaggattc tttgcattac aggtacc 37

<210> 4  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Neisseria meningitidis

<400> 4  
cagcgaattc ctagtcataa ctgggtgtac att 33

<210> 5  
<211> 75

<212> DNA  
 <213> Plasmid pBR322

<400> 5  
 atggcaacga atttacgtgg cgtaatggct gcactcctga ctctttttga tcatgtttga 60

cagcttatca tcgat 75

<210> 6  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Plasmid pBR322

<400> 6  
 tcacccgcgc tcttgcata actgctgggc cagcgccttc agttctggca tccaattctt 60

ggagtggatga atccg 75

<210> 7  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<400> 7  
 gacgcatatg ggcategccc accg 24

<210> 8  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<400> 8  
 gacgttaact tttggttttg actaaatcgt 30

<210> 9  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> XL1 Blue Escherichia coli

<400> 9

gcgccatg tgggaattg ttggcgcg 28

<210> 10  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<400> 10  
 gcgcaattc ttactcaacc gtaaccgatt ttgc 34

<210> 11  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Plasmid pKD3

<400> 11  
 atgtatgcat taaccaggg ccggatcttt accggccacg aatttcttga gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

<210> 12  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Plasmid pKD3

<400> 12  
 ttattgagtt acgacctcgt taccgttaac gatgctcttg gtgattttaa catatgaata 60

tcctccttag 70