

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019 년 6 월 20 일 (20.06.2019) **WIPO | PCT**

WO 2019/117671 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/77* (2006.01) *C12P 19/32* (2006.01) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/015935 공개:
- (22) 국제출원일: 2018 년 12 월 14 일 (14.12.2018) — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- (25) 출원언어: 한국어 — 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- (26) 공개언어: 한국어 — 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- (30) 우선권정보: 10-2017-0173504 2017 년 12 월 15 일 (15.12.2017) KR — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- (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). 이백석 (**LEE, Baek Seok**); 04161 서울시 마포구 토정로 31길 23, 103-1502, Seoul (KR). 이지혜 (**LEE, Ji Hye**); 13922 경기도 안양시 동안구 관악대로 121, 106동 1301호, Gyeonggi-do (KR). 권나라 (**KWON, Nara**); 16823 경기도 용인시 수지구 동천로63번길 10, 206동 503호, Gyeonggi-do (KR). 김주정 (**KIM, Ju Jeong**); 16509 경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5408동 3203호, Gyeonggi-do (KR). 조진만 (**CHO, Jin Man**); 13499 경기도 성남시 분당구 장미로 101, 827동 1704호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (**SON, Min**); 05836 서울시 송파구 범원로 135 6층 한얼국제특허사무소, 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

(54) Title: 5'-INOSINE MONOPHOSPHATE PRODUCING MICROORGANISM AND 5'-INOSINE MONOPHOSPHATE PRODUCING METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 5'-이노신산을 생산하는 미생물 및 이를 이용한 5'-이노신산의 생산 방법

(57) Abstract: The present application pertains to a *Corynebacterium* sp. microorganism producing 5'-inosine monophosphate and having a reinforced activity of IMP release protein, a 5'-inosine monophosphate producing method using the same, a composition for producing 5'-inosine monophosphate, and a method for increasing the release of 5'-inosine monophosphate.

(57) 요약서: 본 출원은 IMP 배출 단백질의 활성이 강화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물, 이를 이용한 5'-이노신산 제조방법, 5'-이노신산 생산용 조성물 및 5'-이노신산의 배출 증가 방법에 관한 것이다.



WO 2019/117671 A1

명세서

발명의 명칭: 5'-이노신산을 생산하는 미생물 및 이를 이용한 5'-이노신산의 생산 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 IMP 배출 단백질의 활성이 강화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물, 이를 이용한 5'-이노신산 제조방법, 5'-이노신산 생산용 조성물 및 5'-이노신산의 배출 증가 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 핵산계 물질 중 하나인 5'-이노신산(5'-inosine monophosphate; 이하 IMP)은 핵산 대사 경로의 중간물질로서, 식품, 의약품 및 각종 의료적 이용 등 다방면에 이용되고 있다. 특히, 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 있으나, 모노소듐 글루탐산(MSG)의 풍미를 강화하는 것으로 알려져 정미성 핵산계 조미료로 각광을 받고 있다.
- [4] IMP를 제조하는 방법으로는, 효모 세포로부터 추출한 리보핵산을 효소적으로 분해하는 방법(일본 특허공고 제1614/1957호), 발효에 의해 생산된 이노신을 화학적으로 인산화하는 방법(Agri. Biol. Chem., 36, 1511 등) 및 IMP를 직접적으로 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]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 미생물 발효를 통하여 직접 IMP를 생산하는 방법으로 고수율의 IMP를 생산하기 위해서는 IMP의 배출이 원활하게 이루어져야 한다. 본 목적을 달성하기 위해 발명자들은 광범위한 연구를 수행하였고, IMP 배출능에 관여하는 배출 단백질에 대한 연구를 진행하여 배출에 관여하는 단백질인 ImpE1, ImpE2를 규명하였다. IMP 배출에 관여하는 단백질 ImpE1, ImpE2의 활성을 강화시켜 주었을 경우, IMP 농도가 상승하는 것을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

[7]

과제 해결 수단

- [8] 본 출원의 하나의 목적은 IMP 배출 단백질의 활성이 강화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 출원의 또 다른 목적은 본 출원의 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서

배양하는 단계를 포함하는 5'-이노신산 제조방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 또 다른 목적은 본 출원의 IMP 배출 단백질의 활성이 강화된 단백질을 포함하는 5'-이노신산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 목적은 본 출원의 IMP 배출 단백질을 코리네박테리움 속 미생물에서 강화하는 단계를 포함하는, 5'-이노신산의 배출 증가 방법을 제공하는 것이다.

[12]

발명의 효과

[13] 본 출원에서 IMP 배출 단백질의 활성이 강화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 이용하여 5'-이노신산을 제조할 수 있다.

[14]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 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.

[16]

[17] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는, IMP 배출 단백질의 활성이 강화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.

[18]

[19] 본 출원에서 용어, "5'-이노신산 배출 단백질"은 5'-이노신산 (5'-inosine monophosphate, 이하 IMP) 를 세포외로 배출하는데 관여하는 단백질을 의미한다. 본 출원의 목적상 상기 용어는 IMP 배출능을 가지는 단백질, 5'-이노신산 배출능을 가지는 단백질, 5'-이노신산 배출 단백질 등과 혼용되어 사용될 수 있으며, 구체적으로 ImpE로 나타낼 수 있으며, 더욱 구체적으로는 ImpE1, ImpE2로 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 단백질은 코리네박테리움 속 유래일 수 있으며, 구체적으로는 코리네박테리움 스테이셔니스 유래인 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를들어, 코리네박테리움 스테이셔니스 유래이고, 5'-이노신산 배출능을 가지는 단백질로서 상응하는 활성을 가지는 단백질은 본 출원의 단백질로 사용될 수 있다.

[20]

[21] 상기 단백질은 예를 들어 서열번호 1 또는 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있으나, 상기 단백질과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함하며, 당업자는 공지 데이터베이스인 NCBI의 GenBank 등에서 서열 정보를 얻을 수 있다. 또한, 상기 단백질은, 서열번호 1 또는 서열번호 2의

아미노산 서열 또는 이와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 단백질로 사용될 수 있음은 자명하다.

- [22] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질' 또는 '특정 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 단백질'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 변이형 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 아미노산 서열 앞뒤에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[23]

- [24] 본 출원에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

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

- [26] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

- [27] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 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 공지된 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 ET AL.](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.

- [28] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 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)을 나타낸다.

[29]

- [30] 본 출원에서 용어, "활성의 강화"는 단백질의 활성이 도입되거나, 미생물이 가진 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미한다. 상기 활성의 "도입"은, 자연적 혹은 인위적으로 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성이 나타나게 되는 것을 의미한다. "내재적 활성"은, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다.

- [31] 예를 들어, 상기 활성 강화는 외래의 IMP 배출 단백질을 숙주세포에 도입하거나 도입하여 강화하는 것, 또는 내재적 IMP 배출 단백질의 활성을 증가시키는 것을 모두 포함할 수 있다.

- [32] 구체적으로, 본 출원에서 활성 증가는,

- [33] 1) 상기 단백질을 코딩(즉, 암호화)하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,

- [34] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,

- [35] 3) 상기 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는

- [36] 4) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [37] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로

삽입됨으로써 수행될 수 있다. 또한 카피수 증가의 한 양태로, 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다. 상기 카피수 증가는 폴리뉴클레오티드가 tandem 형태로 연속적으로 존재할 수 있으며, 이 경우 서로 다른 IMP 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 교차적으로, 순차적으로, 동일한 서열이 반복적으로, 존재할 수 있으며, tandem 형태로 연속적으로 존재할 경우, 서로 간에 중첩 부분이 생길 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 출원은 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5로 기재된 폴리뉴클레오티드 서열의 카피수가 증가된 것일 수 있다.

- [38] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 가지는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있는데, 상기 강력한 프로모터의 예로는 CJ7 프로모터, lysCP1 프로모터, EF-Tu 프로모터, groEL 프로모터, aceA 혹은 aceB 프로모터 등이 있다. 상기 프로모터와 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현율을 향상시킬 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [39] 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [40] 마지막으로, 4) 상기 1) 내지 3)의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법은, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 변형 중 1 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.

- [41] 또한, 본 출원의 서열번호 1, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 1 또는 2 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 예를 들어 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5로 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 구성된 것일 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 1 또는 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 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.
- [42] 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.
- [43] 구체적으로, 상동성을 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.
- [44] 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).
- [45]
- [46] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 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 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

- [47] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 발현 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [48] 본 출원에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 또한, 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 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 단백질의 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.
- [49] 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 및 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. 상기 형질전환 하는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 (CaPO_4) 침전, 염화칼슘 (CaCl_2) 침전, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[50] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[51] 본 출원에서 용어 "5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 (the genus *Corynebacterium*) 미생물"이란, 천연형 또는 변이를 통하여 5'-이노신산 생산능을 가지고 있는 코리네박테리움 속 미생물을 의미한다. 구체적으로, 본 출원에서 5'-이노신산 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물이란 천연형 균주 자체 또는 외부 5'-이노신산 생산 기작과 관련된 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성을 강화시키거나 약화시켜 향상된 5'-이노신산 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다. 보다 구체적으로 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물보다 5'-이노신산 생산능이 향상된 미생물일 수 있다.

[52]

[53] 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. 더욱 구체적으로는, 본 출원에서 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*)일 수 있다. 구체적인 예를 들어, 5'-이노신산을 세포 밖으로 배출하는 기능을 갖는 단백질의 활성을 강화하여 5'-이노신산 생산능이 향상된 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[54]

[55] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 상기 IMP 배출 단백질의 활성이 강화된 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 5'-이노신산

제조방법을 제공한다.

[56] 구체적으로, 본 출원의 방법은 상기 미생물 또는 배지에서 5'-이노신산을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[57]

[58] 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 5'-이노신산은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[59] 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.

[60] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 5'-이노신산을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 5'-이노신산을 수집할 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 5'-이노신산을 회수할 수 있다.

[61] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 5'-이노신산은 정제된 형태 또는 5'-이노신산을 함유한 미생물 발효액일 수 있다.

[62]

[63] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 본 출원의 서열번호 1 또는 서열번호 2의

아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 5'-이노신산 생산용 조성물을 제공한다.

[64] 본 출원의 조성물은, 추가로 상기 폴리뉴클레오티드를 작동시킬 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 조성물에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 도입된 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있게 벡터 내에 포함된 형태일 수 있다.

[65] 또한, 상기 조성물은 5'-이노신산 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 부형제로는, 예를 들어, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[66]

[67] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의, 코리네박테리움 속 미생물의 5'-이노신산 생산 증가를 위한 용도를 제공한다.

[68]

[69] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코리네박테리움 속 미생물에서 강화하는 단계를 포함하는, 5'-이노신산의 배출 증가 방법을 제공한다.

[70]

[71] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의, 코리네박테리움 속 미생물의 5'-이노신산 배출 증가를 위한 용도를 제공한다.

[72]

[73] 상기 용어, "서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질", "강화" 및 "코리네박테리움 속 미생물"은 전술한 바와 같다.

[74]

발명의 실시를 위한 형태

[75] 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.

[76]

[77] **실시예 1: 게놈 DNA 라이브러리 제작**

[78]

[79] IMP의 배출에 관여하는 코리네박테리움의 막 단백질을 동정하기 위해 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*) ATCC6872의 게놈 DNA 라이브러리를 제작하였다.

- [80] 이후 코리네박테리움속 야생형의 균주는 IMP를 생산하지 못하거나, IMP를 생산하더라도 아주 극미량이 생산될 뿐이므로, IMP 생산능을 확인하기 위하여, IMP 생산능을 갖는 ATCC6872 유래의 CJI0323 균주를 제작하였다. 제작된 CJI0323 균주에 상기 ATCC6872의 게노믹 DNA 라이브러리를 형질전환하여 IMP 배출에 관여하는 야생형의 막 단백질 스크리닝을 진행하였다. 구체적인 실험은 다음과 같다.
- [81]
- [82] **실시예1-1: IMP 생산주 CJI0323 균주 선별**
- [83] ATCC6872 유래의 IMP 생산주를 제작하기 위해 ATCC6872를 인산염 완충액(pH 7.0) 또는 시트레이트 완충액(pH5.5)에 $10^7 \sim 10^8$ 세포/ml로 현탁시켰다. 여기에 UV 처리하여 돌연변이를 유발시켰다. 2회에 걸쳐 0.85% 식염수로 세척하고, 1.7% 한천을 함유한 최소배지에 내성을 부여하고자 하는 물질을 적정 농도로 함유한 배지에 희석하여 도말한 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-디하이드로프로플린 내성, 스트렙토마이신 내성, 아제티딘 카복실산 내성, 티아프롤린 내성, 아자세린 내성, 설파구아니딘 내성, 노르발린 내성, 트리메토프림 내성을 부여하기 위해 상기 과정을 각각의 물질에 대해 순차적으로 수행하였으며, 상기 물질들에 대한 내성이 부여되고 IMP 생산능이 우수한 CJI0323을 최종 선별하였다. 표 1에 ATCC6872 대비 CJI0323의 내성정도를 비교하여 나타냈다.

[84]

[85] [표1]

특성	ATCC6872	CJI0323
아데닌 요구성	비요구성	요구성
구아닌 누출형	비요구성	누출형
라이소자임 감수성	80 ug/ml	8 ug/ml
3,4-디하이드로프로틴 내성	1000 ug/ml	3500 ug/ml
스트렙토마이신 내성	500 ug/ml	2000 ug/ml
아제티딘 카복실산 내성	5 mg/ml	30 mg/ml
티아프롤린 내성	10 ug/ml	100 ug/ml
아자세린 내성	25 ug/ml	100 ug/ml
설과구아니딘 내성	50 ug/ml	200 ug/ml
노르발린 내성	0.2 mg/ml	2 mg/ml
트리메조프림 내성	20 ug/ml	100 ug/ml

[86]

[87] - 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, pH7.3

[88]

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

[90]

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

[92]

[93] - 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 45ug/l, 티아민염산 5mg/l, 아데닌 30mg/l, 인산(85%) 1.9%, 포도당 2.55%, 과당 1.45% 되게 첨가하여 사용하였다.

[94] 실시예 1-2: CJI0323의 발효역가 실험

[95] 종배지 2ml를 지름18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJI0323를 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, 온도 30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[96] 배양 종료 후 HPLC (SHIMADZU LC20A)를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 2와 같다.

[97]

[98] [표2]

균주명	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI0323	9.52

[99]

[100] **실시예 1-3: 배출 단백질 발굴**

[101] 1.7%의 한천을 첨가한 최소 배지내에 추가적으로 IMP를 첨가하여 CJI0323 균주의 생육 저하(growth inhibition)를 보이는 스크리닝 조건을 수립하였다. ATCC6872 게노믹 라이브러리 플라스미드를 CJI0323 균주에 전기천공법으로 형질전환시키고(van der Rest et al. 1999), 과량의 IMP가 첨가된 배지 조건에서 생육 저하가 해제되는 콜로니들을 선별하였다. 선별된 콜로니로부터 플라스미드를 획득하여 시퀀싱 기법을 통해 염기서열을 분석하였다. 이로부터 과량의 IMP 첨가 조건에서 생육 저하를 해제시키는데 관여하는 막 단백질 1종을 동정하였다.

[102] 상기의 1종의 코리네박테리움 막 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열, 및 서열번호 5의 염기서열 (NCBI GenBank: NZ_CP014279, WP_066795121, MFS transporter) 로 확인되었다. 상기 막 단백질은 MFS transporter로 알려져 있으나 명확한 기능이 확인되지 않았으며, 더욱이 IMP 배출에 관한 기능은 알려져 있지 않다. 본 출원에서는 이를 ImpE2(WT)로 명명하였다.

[103]

[104] **실시예 2: ImpE1, ImpE2 동정**

[105]

[106] **실시예 2-1: *impE1*, *impE2* 확인**

[107] 상기 막 단백질 ImpE2의 기능을 알아보기 위해 NCBI에서 서열번호 5의 유전자 구조를 확인하였다 (NCBI GenBank: NZ_CP014279, WP_066795121, MFS transporter). 서열번호 5(*impE2*)는 ORF 시작 부분 7bp가 *impE2* upstream에 위치한 유전자 (NCBI GenBank: NZ_CP014279, WP_066795119, transcriptional regulator)와 중첩되는 것을 확인하였다. *impE2* upstream에 위치한 해당 유전자 및 유전자로부터 코딩되는 단백질은 아직 기능이 확인되지 않았으며 본 출원에서 이를 ImpE1(WT)으로 명명하였다 (서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 4의 염기서열).

[108]

[109] 실시예 2-2: *impE1* 또는 *impE2* 결손 벡터 제작

[110] 실시예 1과 2-1을 통하여 동정한 IMP에 의한 생육 저하를 해제시키는 데 관여하는 *ImpE1* 또는 *ImpE2*를 IMP 생산 균주에서 결손 시켰을 경우, IMP 배출능이 줄어드는지 확인하기 위하여 각 유전자의 결손 벡터를 제작하고자 하였다.

[111] 벡터를 제작하기 위한 유전자 단편은 ATCC6872 게노믹 DNA를 주형으로 PCR을 통하여 획득하였다.

[112] 구체적으로, 상기 *impE1*에 대한 PCR은 서열번호 6, 7의 프라이머 및 서열번호 8, 9의 프라이머를, *impE2*에 대한 PCR은 서열번호 10, 11의 프라이머 및 서열번호 12, 13의 프라이머를 이용하였다(표 3).

[113]

[114] [표3]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
6	<i>impE1</i> kop-1	GCTCTAGACGAGAAAGCTAAAGCCGGTGA
7	<i>impE1</i> kop-2	GTTTTTAGCTACCATTGTTACACCCCGTGCAA GTTT
8	<i>impE1</i> kop-3	GCACGGGGTGTAACAATGGTAGCTAAAACT CCACC
9	<i>impE1</i> kop-4	GCTCTAGAAATAGTTGGGGAAGTCCACTC
10	<i>impE2</i> kop-1	GCTCTAGACTTGGATGACCTGGTGGAAAA
11	<i>impE2</i> kop-2	CTTGGAGAAAATTCCTACCATTCCAGTCCTT TCGT
12	<i>impE2</i> kop-3	GGACTGGAATGGTAGGAAATTTTCTCCAAGG GAAAT
13	<i>impE2</i> kop-4	GGACTAGTGGATTGTGTTGACGCACGATG
14	<i>impE1E2</i> kop-2	CTTGGAGAAAATTTCTGTTACACCCCGTGCAA GTTT
15	<i>impE1E2</i> kop-3	GCACGGGGTGTAACAGAAATTTTCTCCAAGG GAAAT

[115]

[116] 이때 이용한 프라이머는 미국 국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에 등록되어 있는 *Corynebacterium stationis* (ATCC6872) 유전자(NCBI Genbank: NZ_CP014279) 및 주변 염기서열에 대한 정보를 바탕으로 제작하였다.

[117] PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 52°C 3분 어닐링, 72°C 1분

중합을 25회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 서열번호 6과 7의 프라이머, 서열번호 8과 9의 프라이머를 이용해 증폭된 *impE1* 유전자 두 단편을 주형으로 중첩 중합효소 연쇄 반응을 실시하여 1.8 kbp의 폴리뉴클레오티드 주형을 얻을 수 있었다. 얻어진 유전자의 단편을 제한효소 *XbaI* 으로 절단하였다. T4 리가아제를 이용하여 상기 유전자 단편으로 *XbaI* 제한효소로 절단시킨 선상의 pDZ (대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호) 벡터에 하여 pDZ- Δ *impE1*를 제작하였다. 또한 서열번호 10과 11의 프라이머를 이용해 증폭된 *impE2* 유전자 단편과 서열번호 12와 13의 프라이머를 이용해 증폭된 *impE2* 유전자 두 단편을 주형으로 중첩 중합효소 연쇄 반응을 실시하여 1.7kbp의 폴리뉴클레오티드 주형을 얻을 수 있었다. 얻어진 유전자의 단편을 제한효소 *XbaI*, *speI* 으로 절단하였다. T4 리가아제를 이용하여 상기 유전자 단편으로 *XbaI* 제한효소로 절단시킨 선상의 pDZ 벡터에 클로닝하여, pDZ- Δ *impE2*를 제작하였다.

[118]

[119] 실시예 2-3: *impE1*, *impE2* 통합 결손 벡터 제작[120] 상기 IMP에 의한 생육 저하를 해제시키는데 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자 *impE1*과 *impE2*는 중첩되어 있으므로 두 유전자는 동시에 조절되어야 할 필요성이 있다. 따라서 *impE1*과 *impE2*가 모두 결손된 벡터를 제작하고자 하였다.[121] *impE1*과 *impE2* PCR은 서열번호 6 와 14의 프라이머 및 서열번호 15와 13의 프라이머를 이용하였다. 이때 이용한 프라이머는 미국 국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에 등록되어 있는 코리넨박테리움 스테이셔니스 (ATCC6872) 유전자(NCBI Genbank: NZ_CP014279) 및 주변 염기서열에 대한 정보를 바탕으로 제작하였다. 서열번호 6과 14의 프라이머를 이용해 증폭된 *impE1* 유전자 단편과 서열번호 15와 13의 프라이머를 이용해 증폭된 *impE2* 유전자 두 단편을 주형으로 중첩 중합효소 연쇄 반응을 실시하여 2.0kbp의 폴리뉴클레오티드 주형을 얻을 수 있었다. 얻어진 유전자의 단편을 각각 *XbaI*, *speI* 으로 절단하였다. T4 리가아제를 이용하여 상기 유전자 단편으로 *XbaI* 제한효소로 절단시킨 선상의 pDZ 벡터에 클로닝하여, pDZ- Δ *impE1E2*를 제작하였다.

[122]

[123] 실시예 2-4: *impE1*, *impE2* 결손 균주 제작

[124] 실시예 2-2에서 제작된 2종과 실시예 2-3에서 제작된 1종의 플라스미드를 각각 CJ10323에 일렉트로포레이션법으로 형질전환한 후 (Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545에 의한 형질 전환법 이용), 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 수행하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 결손 여부는 서열번호 6, 9 및 서열번호 10, 13 및 서열번호 6, 13의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을

수행함으로써 확인하였다.

[125] 선별된 균주는 CJI0323_ΔimpE1, CJI0323_ΔimpE2, CJI0323_ΔimpE1E2로 명명하고, 상기 균주들의 IMP의 생산능을 평가하였다.

[126]

[127] 종배지 2ml를 지름18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, CJI0323, CJI0323_ΔimpE1, CJI0323_ΔimpE2, CJI0323_ΔimpE1E2를 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.

[128] 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 4와 같다.

[129]

[130] [표4]

균주명	IMP (g/L)
CJI0323	9.52
CJI0323_ΔimpE1	1.92
CJI0323_ΔimpE2	1.88
CJI0323_ΔimpE1E2	1.80

[131]

[132] 이때, 모균주인 코리네박테리움 스테이셔니스 CJI0323과 배지 내 IMP 축적량을 비교한 결과, 상기의 표 4에 나타난 바와 같이 CJI0323_ΔimpE1, CJI0323_ΔimpE2, CJI0323_ΔimpE1E2 균주가 동일한 조건하에서 모균주 대비 IMP의 농도가 대략 8g/L 감소함을 확인하여 ImpE1, ImpE2가 IMP 배출에 관여하는 단백질을 확인하였다.

[133]

[134] 실시예 3: 야생형 *impE1*, *impE2* 강화

[135]

[136] 코리네박테리움속 야생형의 균주는 IMP를 생산하지 못하거나, IMP를 생산하더라도 아주 극미량이 생산될 뿐이므로, IMP 생산능을 갖는 CJI0323 균주에서 ImpE 단백질을 결손한 후, 야생형의 ImpE 단백질을 도입함으로써 복원하고, 또한 ImpE 단백질의 활성을 강화함으로써 야생형 ImpE 단백질 강화에 의한 IMP 배출능 증가를 확인하였다. 상기 단백질의 활성 강화는 강화의 방법 중 하나인 '카피수 증가' 방법 및 프로모터 강화 방법을 이용하였다.

[137]

[138] 실시예 3-1: 야생형의 *impE1*, *impE2* 통합 도입 벡터 제작

- [139] ImpE가 야생형으로 도입된 균주를 제작하고자 먼저, 벡터를 제작하기 위한 유전자 단편을 ATCC6872 게노믹 DNA를 주형으로 PCR을 통하여 획득하였다. 야생형 *impE1*과 *impE2*의 PCR은 서열번호 6과 13의 프라이머를 이용하였다. 서열번호 6과 13의 프라이머를 이용해 증폭된 야생형 *impE1-impE2* 유전자 전체 단편은 XbaI, SpeI 의 제한 효소로 처리하였으며, pDZ 벡터에 XbaI 제한 효소 자리에 클로닝하여, pDZ-impE1E2(WT) 를 제작하였다.
- [140]
- [141] 실시예 3-2: 야생형의 *impE1* 강화 벡터 제작
- [142] ImpE1강화 벡터를 제작하고자 먼저, 벡터를 제작하기 위한 유전자 단편을 ATCC6872 게노믹 DNA를 주형으로 PCR을 통하여 획득하였다. *impE1*를 강화하기 위해서 프로모터 부위로 생각되는 *impE1* upstream약 370bp를 포함한 서열번호 16과 17의 프라이머를 이용해 증폭하였다. 증폭된 *impE1* 유전자 단편을 XbaI의 제한 효소로 처리하였으며, pDZ 벡터에 XbaI 제한 효소 자리에 클로닝하여, pDZ-impE1(WT)2-1를 제작하였다. 이후 2copy 벡터 제작을 위해 *impE1*은 서열번호 18과 19의 프라이머 한쌍으로 PCR을 수행하였다. 확보된 각각의 DNA 단편은 DNA 제한효소인 NotI으로 절단하고, 동일한 DNA 제한효소로 절단한 pDZ-impE1(WT)2-1에 클로닝 하였다. 제조된 벡터는 pDZ-impE1(WT) 2X으로 명명하였다.
- [143]
- [144] 실시예 3-3: 야생형 *impE1*, *impE2* 통합 강화 벡터 제작
- [145] *impE1*과 *impE2*가 통합 강화된 균주를 제작하고자, 야생형 *impE1*과 *impE2*의 통합 유전자를 서열번호 16과 20의 프라이머를 이용해 PCR을 통하여 증폭하였다. 증폭된 유전자 단편을 XbaI의 제한 효소로 처리하였으며, pDZ 벡터에 XbaI 제한 효소 자리에 클로닝하여, pDZ-impE1E2(WT)2-1를 제작하였다. 이후 2copy 벡터 제작을 위해 *impE1E2*은 서열번호 18과 21의 프라이머 한쌍으로 PCR을 수행하였다. 확보된 각각의 DNA 단편은 DNA 제한효소인 NotI으로 절단하고, 동일한 DNA 제한효소로 절단한 pDZ-impE1E2(WT)2-1에 클로닝하였다. 제조된 벡터는 pDZ-impE1E2(WT) 2X로 명명하였다.
- [146]

[147] [표5]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
16	impE1 2-1	GCTCTAGAGAACGGAGTCATCTCCTTTGC
17	impE1 2-2	GGGTCTAGAGAAGCGGCCGCCTACCATTC CAGTCCTTTTCGT
18	impE1 2-3	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAACGGAGTC ATCTCCTTTTGC
19	impE1 2-4	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCTACCATTTCCA GTCCTTTTCGT
20	impE1E2 2-2	GGGTCTAGAGAAGCGGCCGCCCAAACGCT CTGCAAGAAACTG
21	impE1E2 2-4	ATAAGAATGCGGCCGC CCAAACGCTCTGCAAGAAACTG

[148]

[149] 실시예 3-4: 야생형 *impE1*, *impE2* 도입/강화 균주 평가

[150] 실시예 3-1에서 제작된 pDZ-*impE1E2*(WT)를 실시예 2에서 제작된 CJI0323_Δ*impE1E2* 균주에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환 한 후 (Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545에 의한 형질 전환법 이용), 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 수행하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 도입 여부는 서열번호 6, 13의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 확인하였다. 이후 제작된 균주 CJI0323_Δ*impE1E2_impE1E2*(WT)을 평가하여 CJI0323 균주에 *impE1* 및 *impE2*의 야생형이 도입된 경우 IMP 생산능을 확인하였다.

[151] 또한, CJI0323_Δ*impE1E2_impE1E2*(WT) 균주에 일렉트로

일렉트로포레이션법으로 pDZ-*impE1*(WT) 2X, pDZ-*impE1E2*(WT) 2X 벡터를 형질전환하여 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 수행하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 강화 여부는 서열번호 16, 19 및 서열번호 16, 21의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 확인하였다. CJI0323_Δ*impE1E2_impE1E2*(WT), CJI0323_Δ*impE1E2_impE1E2*(WT)_*impE1*(WT) 2X 및 CJI0323_Δ*impE1E2_impE1E2*(WT)_*impE1E2*(WT) 2X를 실시예 2-4와 동일한 방법으로 배양하여, 균주를 획득하고 상기 균주의 IMP의 생산능을 평가하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양

결과는 아래 표 6와 같다.

[152]

[153] [표6]

균주명	IMP (g/L)
CJI0323_ΔimpE1E2	1.80
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)	2.32
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1(WT) 2X,	2.52
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1E2(WT) 2X	2.97

[154]

[155] 이때, 배지 내 IMP 축적량을 모균주인 코리네박테리움 스테이셔니스 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)과 비교한 결과, 상기의 표 6에 나타난 바와 같이 동일한 조건하에서 ImpE1 또는 ImpE1과 ImpE2 활성이 동시에 강화된 균주는 모균주 대비 IMP의 농도가 최대 28% 증가함을 확인하였다. IMP를 생산하지 않거나 생산하더라도 극미량만을 생산하는 코리네박테리움속 미생물에 있어서, ImpE 단백질의 활성의 증가로 인한 IMP 생산량 증가는 매우 의미 있는 것으로 해석할 수 있다.

[156] 상기 제작된 CJI0323 및 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_impE1E2(WT) 2X(CJI2236)는 각각 코리네박테리움 스테이셔니스 CN01-0323 및 코리네박테리움 스테이셔니스 CN01-2236으로 명명하여 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 각각 2017년 11월 7일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12151P를, 2017년 10월 25일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12137P를 부여 받았다.

[157]

[158] 실시예 3-5: 야생형 *impE1* 또는 *impE2*의 프로모터 강화 벡터 제작

[159] 각 유전자의 프로모터를 강화된 프로모터로 교체하는 벡터를 제작하기 위한 유전자 단편은 ATCC6872 게노믹 DNA를 주형으로 PCR을 통하여 획득하였다.

[160] 상기 강화된 프로모터는 코리네박테리움 스테이셔니스에서 강하게 발현된다고 보고되어있는 Pcj7(대한민국 공개특허 제10-0620092호) 프로모터를 사용하였다.

[161] *impE1*에 대한 PCR은 서열번호 22 와 13의 프라이머, 24 와 25의 프라이머를 이용하여 증폭한 각각의 유전자 단편을 XbaI, NdeI 의 제한 효소로 처리하였으며, pDZ 벡터에 XbaI 제한 효소 자리에 클로닝하였다. Pcj7 유전자 단편을 증폭하기 위해 ATCC6872 게노믹 DNA를 주형으로 하여 서열번호 30과 31의 프라이머로 PCR을 진행하여 얻은 단편을 NdeI으로 처리하고 상기 제작한 벡터를 NdeI으로 처리하여 pDZ-Pcj7_impE1(WT) 벡터를 제작하였다.

[162] *impE2*에 대한 PCR은 서열번호 26과 27의 프라이머, 28과 29의 프라이머를

이용하여 증폭한 각각의 유전자 단편을 XbaI, NdeI의 제한 효소로 처리하였으며, pDZ 벡터에 XbaI 제한효소 자리에 클로닝하였다. 상기 얻어진 Pcj7 유전자 단편과 만들어진 벡터를 NdeI으로 처리하여 pDZ-Pcj7_impE2(WT) 벡터를 제작하였다.

[163]

[164] [표7]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
22	impE1 Pcj7-1	GCTCTAGAGGTGAGCGCGAAGGGGAC GCG
23	impE1 Pcj7-2	GGAATTCCATATGTGTTACACCCCGTG CAAGTTT
24	impE1 Pcj7-3	GGAATTCCATATGCATGCTGTGCAAG AAGTT
25	impE1 Pcj7-4	GCTCTAGATTCAGCATTGGCCACTGGG AA
26	impE2 Pcj7-1	GCTCTAGATTGCATGCTGTGCAAGAA GTT
27	impE2 Pcj7-2	GGAATTCCATATGCTACCATTCCAGTC CTTTCGT
28	impE2 Pcj7-3	GGAATTCCATATGGTAGCTAAAAACT CCACC
29	impE2 Pcj7-4	GCTCTAGAAATAGTTGGGGAAGTCCA CTC
30	Pcj7 F	GGAATTCCATATGTCCCAGCGCTACTA ATAGG
31	Pcj7 R	GGAATTCCATATGGAGTGTTTCCTTTC GTTGGG

[165]

[166] 실시예 3-6: 야생형 *impE1*, *impE2* 프로모터 교체 균주 평가

[167] 실시예 4-1에서 제작된 2종의 플라스미드를 각각 실시예 3-3에서 제작된 CJ10323_Δ*impE1E2*_impE1E2(WT) 균주에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후 (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545에 의한 형질 전환법 이용), 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 수행하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 강화 여부는

서열번호 22, 25 및 서열번호 26, 27의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 확인하였다. 상기 제작된 2종의 균주는 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT), CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT)로 명명하였다. 또한, 제작된 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT) 균주를 기반으로 하여 pDZ-Pcj7_impE2(WT)를 형질전환 한 후, 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 수행하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 강화 여부는 서열번호 26, 29의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 확인하였다. 상기 제작된 균주는 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)_Pcj7/impE2(WT)로 명명하였다. 이후, 상기 제작된 균주 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT), CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT), 및 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)_Pcj7/impE2(WT)를 실시예 2-4와 동일한 방법으로 각각 배양하여, IMP 생산능을 평가하였다.

[168] 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 8과 같다.

[169]

[170] [표8]

균주명	IMP (g/L)
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)	2.32
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)	2.47
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT)	2.81
CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT)_Pcj7/impE2(WT)	2.97

[171]

[172] 이때, 배지 내 IMP 축적량을 모균주인 코리네박테리움 스테이셔니스 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)와 비교한 결과, 상기의 표 8에 나타난 바와 같이 동일한 조건하에서 ImpE1 및/또는 ImpE2 활성이 강화된 균주는 모균주 대비 IMP의 농도가 최대 28% 증가함을 확인하였다.

[173] 상기 제작된 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE1(WT) 및 CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pcj7/impE2(WT) 균주는 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2018년 11월 2일자로 기탁하여 각각 기탁번호 KCCM12357P 및 KCCM12358P를 부여 받았다.

[174]

[175] 실시예 4: IMP 생산주 기반 *impE1*, *impE2* 강화

[176]

[177] 실시예 4-1: IMP 생산주 기반 *impE1*, *impE2* 강화 균주 제작

[178] IMP 생산균주에서 *impE1*, *impE2*의 강화 효과를 확인하기 위해 ATCC6872에서 IMP의 분해경로에 해당하는 아데닐로석시네이트 신타아제(adenylosuccinate synthetase) 및 IMP 디하이드로게나아제(IMP dehydrogenase)의 활성이 약화된 균주를 제작하였다. 상기 두 효소를 코딩하는 유전자 *purA* 및 *guaB*의 각 염기서열에서 1번째 염기를 a에서 t로 변경하여 개시코돈을 변경하였다. ATCC6872에서 상기 두 유전자의 발현이 약화된 균주는 CJI9088으로 명명하였다. 제조된 CJI9088균주에 상기 실시예 3-3에서 제작된 pDZ-*impE1*(WT) 2X 및 pDZ-*impE1E2*(WT)2X 벡터를 일렉트로포레이션 방법으로 형질전환하여 상동성 서열의 제조법에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주는 카나마이신 25mg/l를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 수행하였다. 최종 형질전환된 균주의 유전자 도입 여부는 서열번호 6, 13의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 확인하였다.

[179] 제작된 CJI9088 및 CJI9088_*impE1*(WT)2X, CJI9088_*impE1E2*(WT)2X 균주의 IMP 생산능을 평가하였다. 배양 종료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 9와 같다.

[180]

[181] [표9]

균주명	IMP (g/L)
CJI9088	0.52
CJI9088_ <i>impE1</i> (WT) 2X	0.68
CJI9088_ <i>impE1E2</i> (WT) 2X	0.87

[182]

[183] 배지 내 축적된 IMP를 확인한 결과, 모균주인 CJI9088대비 IMP 생산능이 최대 67% 증가하는 것을 확인하였다. 이로부터 본 출원의 5'-이노신산을 배출하는 단백질(*ImpE*)의 활성을 강화함으로써, IMP 생산량이 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[184]

[185] 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.

[186]

[187]

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> CN01-2236	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12137P
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 2017년 10월 25일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2017. 10. 25.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2017년 12월 15일

변리사 손민



[188]

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> CN01-0323	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12151P
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 2017년 11월 7일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2017. 11. 07.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2017년 12월 15일

변리사 손민



[189]

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> CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pc17/impE1(WT)	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12357P
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 11월 2일에 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. 11. 02.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 12월 10일

변리사 손민



[190]

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> CJI0323_ΔimpE1E2_impE1E2(WT)_Pc17/impE2(WT)	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12358P
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 11월 2일에 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. 11. 02.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 12월 10일

변리사 손민



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성이 강화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*)인, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 강화는 1) 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 3) 상기 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는 4) 이의 조합인, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 미생물은 아데닐로석시네이트 신타아제(adenylosuccinate synthetase) 또는 IMP 디하이드로게나아제(IMP dehydrogenase)의 활성이 추가로 약화된, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 5] 제1항의 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 5'-이노신산 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 방법은 상기 미생물 또는 배지에서 5'-이노신산을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 5'-이노신산 제조방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*)인, 5'-이노신산 제조방법.
- [청구항 8] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 포함하는 5'-이노신산 생산용 조성물.
- [청구항 9] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의, 코리네박테리움 속 미생물의 5'-이노신산 생산 증가를 위한 용도.
- [청구항 10] 서열번호 1, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코리네박테리움 속 미생물에서 강화하는 단계를 포함하는, 5'-이노신산의 배출 증가 방법.
- [청구항 11] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의, 코리네박테리움 속 미생물의 5'-이노신산 배출 증가를 위한 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/015935

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/77(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 1/21; C12N 15/52; C12N 15/61; C12P 13/04; C12P 13/14; 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: 5'-Inosin Acid, adenylosuccinate synthetase, IMP dehydrogenase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1744958 B1 (DAESANG CORPORATION) 12 June 2017 See claim 1.	1-11
A	KR 10-2010-0109732 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 11 October 2010 See claim 1.	1-11
A	PEIFER, Susanne et al., "Metabolic Engineering of the Purine Biosynthetic Pathway in Corynebacterium Glutamicum Results in Increased Intracellular Pool Sizes of IMP and Hypoxanthine", Microb. Cell Fact., 2012, vol. 11, page 138. See abstract.	1-11
A	US 9506094 B2 (AJINOMOTO CO., INC.) 29 November 2016 See claim 1.	1-11
A	PARK, Seok Hyun et al., "Metabolic Engineering of Corynebacterium Glutamicum for L-arginine Production.", Nat. Commun., 2014, vol. 5, page 4618. See abstract.	1-11



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

15 MAY 2019 (15.05.2019)

Date of mailing of the international search report

15 MAY 2019 (15.05.2019)

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/KR2018/015935

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1744958 B1	12/06/2017	KR 10-2016-0078694 A	05/07/2016
KR 10-2010-0109732 A	11/10/2010	BR P11014056 A2	30/05/2017
		CN 102549144 A	04/07/2012
		CN 102549144 B	18/06/2014
		DK 2415861 T3	22/01/2018
		EP 2415861 A2	08/02/2012
		EP 2415861 B1	29/11/2017
		EP 3219789 A1	20/09/2017
		ES 2657837 T3	07/03/2018
		JP 2012-522503 A	27/09/2012
		KR 10-1166027 B1	19/07/2012
		MX 2011010250 A	29/11/2011
		PL 2415861 T3	31/07/2018
		RU 2482178 C1	20/05/2013
		US 2012-0021466 A1	26/01/2012
		US 8993272 B2	31/03/2015
		WO 2010-114245 A2	07/10/2010
		WO 2010-114245 A3	23/06/2011
US 9506094 B2	29/11/2016	BR 112015007916 A2	29/09/2015
		CN 105008532 A	28/10/2015
		CN 105008532 B	21/07/2017
		EP 2868745 A1	06/05/2015
		EP 2868745 B1	21/06/2017
		JP 5831669 B2	09/12/2015
		JP W02014-185430 A1	23/02/2017
		KR 10-1773755 B1	01/09/2017
		KR 10-2015-0099809 A	01/09/2015
		PE 06812015 A1	15/05/2015
		PH 12015500792 A1	15/06/2015
		PH 12015500792 B1	15/06/2015
		US 2015-0307907 A1	29/10/2015
		WO 2014-185430 A1	20/11/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

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

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/77; C12N 1/21; C12N 15/52; C12N 15/61; C12P 13/04; C12P 13/14; 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: 5' -Inosin Acid, adenylosuccinate synthetase, IMP dehydrogenase

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1744958 B1 (대상 주식회사) 2017.06.12 청구항 1 참조.	1-11
A	KR 10-2010-0109732 A (씨제이제일제당(주)) 2010.10.11 청구항 1 참조.	1-11
A	PEIFER, SUSANNE 등, 'Metabolic engineering of the purine biosynthetic pathway in Corynebacterium glutamicum results in increased intracellular pool sizes of IMP and hypoxanthine', Microb. Cell Fact., 2012, 제11권, 페이지 138. 초록 참조.	1-11
A	US 9506094 B2 (AJINOMOTO CO., INC.) 2016.11.29 청구항 1 참조.	1-11
A	PARK, SEOK HYUN 등, 'Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for L-arginine production.', Nat. Commun., 2014, 제5권, 페이지 4618. 초록 참조.	1-11

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 05월 15일 (15.05.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 05월 15일 (15.05.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

한인호

전화번호 +82-42-481-3362



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1744958 B1	2017/06/12	KR 10-2016-0078694 A	2016/07/05
KR 10-2010-0109732 A	2010/10/11	BR PI1014056 A2	2017/05/30
		CN 102549144 A	2012/07/04
		CN 102549144 B	2014/06/18
		DK 2415861 T3	2018/01/22
		EP 2415861 A2	2012/02/08
		EP 2415861 B1	2017/11/29
		EP 3219789 A1	2017/09/20
		ES 2657837 T3	2018/03/07
		JP 2012-522503 A	2012/09/27
		KR 10-1166027 B1	2012/07/19
		MX 2011010250 A	2011/11/29
		PL 2415861 T3	2018/07/31
		RU 2482178 C1	2013/05/20
		US 2012-0021466 A1	2012/01/26
		US 8993272 B2	2015/03/31
		WO 2010-114245 A2	2010/10/07
		WO 2010-114245 A3	2011/06/23
US 9506094 B2	2016/11/29	BR 112015007916 A2	2015/09/29
		CN 105008532 A	2015/10/28
		CN 105008532 B	2017/07/21
		EP 2868745 A1	2015/05/06
		EP 2868745 B1	2017/06/21
		JP 5831669 B2	2015/12/09
		JP WO2014-185430 A1	2017/02/23
		KR 10-1773755 B1	2017/09/01
		KR 10-2015-0099809 A	2015/09/01
		PE 06812015 A1	2015/05/15
		PH 12015500792 A1	2015/06/15
		PH 12015500792 B1	2015/06/15
		US 2015-0307907 A1	2015/10/29
		WO 2014-185430 A1	2014/11/20