

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2023년 12월 28일 (28.12.2023) WIPO | PCT

WO 2023/249421 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/195* (2006.01) *C12P 13/24* (2006.01) 공개:
CI2N 15/77 (2006.01) — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/008656

(22) 국제출원일: 2023년 6월 22일 (22.06.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0076773 2022년 6월 23일 (23.06.2022) KR

(71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(72) 발명자: 허란 (HUH, Lan); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 서창일 (SEO, Chang Il); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 정기용 (CHEONG, Ki Yong); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울특별시 강남구 테헤란로 115, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: L-HISTIDINE EXPORT PROTEIN AND METHOD FOR PRODUCING L-HISTIDINE BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: L-히스티딘 배출 단백질 및 이를 이용한 L-히스티딘 생산 방법

(57) Abstract: The present application discloses a histidine export protein or a variant thereof having the ability to export L-histidine, which can dramatically enhance the production of L-histidine when expressed in a microorganism having the ability to produce L-histidine.

(57) 요약서: 본 출원은 L-히스티딘 배출능을 갖는 히스티딘 배출 단백질 또는 이의 변이체를 발구하고, 이를 L-히스티딘의 생산능을 가지는 미생물에서 발현시킨 결과, L-히스티딘 생산량을 획기적으로 향상시킬 수 있다.



WO 2023/249421 A1

명세서

발명의 명칭: L-히스티딘 배출 단백질 질 및 이를 이용한 L-히스티딘 생산 방법

기술분야

- [1] 관련 출원(들)과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2022년 6월 23일자 대한민국 특허출원 제10-2022-0076773호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 본 출원은 히스티딘 배출 활성을 갖는 신규 단백질, 상기 단백질이 발현되도록 변형된 L-히스티딘 생산 미생물, 및 상기 미생물을 이용하여 L-히스티딘을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] L-히스티딘은 20개의 표준 아미노산들 가운데 하나의 아미노산으로, 영양학적인 관점에서 볼 때 성인에게는 많은 양이 요구되지 않지만, 성장기 어린이들에게는 해당하는 필수 아미노산으로 분류된다. 또한, L-히스티딘은 항산화와 면역 조절 등 중요한 생리적 과정에 관여하여 위장 궤양 치료제, 순환기계 치료제의 원료 및 아미노산 수액 제제 등 의학 산업에 사용된다.
- [6] L-히스티딘은 특히 헤모글로빈에 많이 들어 있어서, 혈분을 원료로 하는 단백질 가수 분해 추출법을 통해 주로 생산된다. 그러나, 이러한 방법은 낮은 효율과 환경 오염 등의 단점을 지니고 있다. 반면, 미생물 발효법을 통하여 L-히스티딘을 생산하는 것은 가능하나, 대규모 공업화는 아직 이루어지지 않았다. 이는 L-히스티딘의 생합성이 뉴클레오타이드 합성 전구체인 포스포리보실 피로인산 (PRPP) 과 경쟁 관계를 가지며, 고 에너지를 요구하는 복잡한 생합성 과정 및 조절 메커니즘을 가지고 있기 때문이다.
- [7] 다른 종류의 아미노산의 배출능을 갖는 단백질의 발현 및/또는 기능이 강화되면 해당 아미노산의 생산이 증가되는 예는 알려져 있으나, L-히스티딘 특이적 배출능을 갖는 단백질에 대한 선행 연구는 거의 진행된 바 없다.
- [8] 이러한 배경하에서, 히스티딘 특이적 배출능을 갖는 단백질의 발굴 및 이를 이용한 히스티딘 생산 기술의 개발이 요구된다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 출원의 목적은 (1) 서열번호 43의 아미노산 서열의 72번째 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나,

- [11] (2) 서열번호 43의 아미노산 서열의 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나,
- [12] (3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된, 변이형 L-히스티딘 배출 단백질을 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 다른 목적은 상기 단백질을 또는 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 미생물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 미생물을 포함하는 L-히스티딘 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 미생물을 L-히스티딘 생산에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.
- [16] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 미생물을 L-히스티딘 생산용 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.
- [17] 본 출원의 또 다른 목적은, 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-히스티딘 생산 방법을 제공하는 것이다.

[18]

과제 해결 수단

- [19] 본 출원은 L-히스티딘 배출능을 갖는 히스티딘 배출 단백질의 변이체를 발굴하고, 이를 L-히스티딘의 생산능을 가지는 미생물에서 발현시킨 결과, L-히스티딘 생산량을 획기적으로 향상시킬 수 있음을 제안한다.
- [20] 본 명세서에서, 헬코바실러스 마시리엔시스 (*Helcobacillus massiliensis*) 유래의 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 (AzlC family ABC transporter permease)를 발현하는 미생물이 L-히스티딘 생산능이 우수함을 확인하고, 상기 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소의 특정 위치에 아미노산 치환 변이가 도입되는 경우, L-히스티딘 생산능이 보다 증가하는 것을 확인하였다.

[21]

[22] 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 및 재조합 벡터

- [23] 일 양상은 L-히스티딘 배출 활성을 갖는 변이형 단백질(또는 폴리펩타이드)을 제공한다. 상기 단백질은 L-히스티딘 특이적 배출능을 갖는 단백질일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 변이형 단백질은 변이형 L-히스티딘 배출 단백질로 표현될 수 있다. 상기 변이형 단백질은 AzlC 계열 ABC 수송체 투과 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [24] 일 예에서 상기 변이형 단백질은 야생형 L-히스티딘 배출 단백질 (예컨대, AzlD 도메인-함유 단백질 (AzlD domain-containing protein), 또는 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질 (AzlC family ABC transporter permease) 등)과 동등하거나 보

다 강화된 L-히스티딘 배출 활성을 가지는 것일 수 있다. 상기 AzlD 도메인-함유 단백질 또는 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질은 헬코바실러스 마시리엔시스 (*Helcobacillus massiliensis*) 유래의 것일 수 있다. 본 명세서에서, 헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 AzlD 도메인-함유 단백질은 HmaE 단백질 (또는 HmaE), 헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질은 HmaF 단백질 (또는 HmaF)로 기재될 수 있다.

- [25] 일 예에서, 상기 변이형 단백질 (예컨대, AzlD 도메인-함유 단백질의 변이형 단백질, 구체적으로 헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 AzlD 도메인-함유 단백질의 변이형 단백질)은 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질과 동일한 오픈 유전자에서 함께 발현되는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 변이형 단백질은 상기 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질과 결합하여 L-히스티딘 배출 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [26]
- [27] 일 예에서 상기 변이형 단백질은 헬코바실러스 마시리엔시스 (*Helcobacillus massiliensis*) 유래의 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질의 변이형 단백질일 수 있다.
- [28] 상기 변이형 단백질은, 헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 야생형 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질의 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 또는 삽입된 변이가 도입된 변이형 단백질일 수 있다.
- [29] 상기 헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 야생형 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질은 서열번호 43의 아미노산 서열(WP_055090792.1)을 포함하거나 상기 서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [30] 일 예에서, 상기 변이형 단백질은 서열번호 43의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 (1) 72번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나,
- [31] (2) 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나, 또는
- [32] (3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [33] 상기와 같이 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 아미노산을 계수하는 것은, 개시코돈으로부터 번역된 메티오닌(Met, M)을 1번째 아미노산으로 하여 계수하는 것을 의미할 수 있다.
- [34] 일 예에서, 상기 변이형 단백질은 서열번호 43의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 (1) 72번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산, 즉 원래의 아미노산과 상이한 아미노산으로서, 류신(Leu, L), 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H), 리신(Lys, K), 아스파르트산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 아스파라긴(Asn, N), 글루타민(Gln, Q), 시스테인(Cys, C), 글리신(Gly, G), 프롤린(Pro, P), 알라닌(Ala, A), 발린(Val, V), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 타이로신(Tyr, Y), 또는 트립토판(Trp, W)으로 치환된 서열을 포함하거나,

- [35] (2) 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산, 즉 원래의 아미노산과 상이한 아미노산으로서, 발린, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 글리신, 프롤린, 알라닌, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신, 또는 트립토판으로 치환된 서열을 포함하거나,
- [36] (3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [37] 일 예에서, 상기 변이형 단백질은 서열번호 43의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 (1) 72번째 잔기에 상응하는 아미노산이 류신, 글리신, 프롤린, 알라닌, 발린, 또는 메티오닌으로 치환되거나;
- [38] (2) 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 발린, 글리신, 프롤린, 알라닌, 류신, 또는 메티오닌으로 치환되거나; 또는
- [39] (3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [40] 일 구체예에서, 상기 변이형 단백질은 서열번호 43의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 72번째 잔기에 상응하는 아미노산이 류신으로 치환되고, 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환된 것일 수 있다. 상기 변이형 단백질 중 서열번호 43의 N-말단으로부터 72번째 및/또는 124번째 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산을 제외한 일부 아미노산 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가되더라도 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 활성을 나타내는 한 본 출원의 변이형 단백질에 포함될 수 있음은 자명하다.
- [41] 또한, 일 예에서 상기 변이형 단백질은 서열번호 43로 기재되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열에서, 서열번호 43의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 (1) 72번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나, (2) 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나, 또는 (3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 즉 서열번호 43의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 72번째 및/또는 124번째 잔기에 상응하는 위치에서 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고 서열번호 43의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가지며 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 활성을 가지는 폴리펩타이드는 본 출원의 변이형 단백질에 포함될 수 있다.
- [42] 일 구체예에서 상기 변이형 단백질은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하거나 상기 서열로 이루어지는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 변이형 단백질에서 서열번호 56의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 72번째 및/또는 124번째 잔기에 상응하는 아미

노산을 제외한 일부 아미노산 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가되더라도 AzIC 계열 ABC 수송체 투과효소 활성을 나타내는 한 본 출원의 변이형 단백질에 포함될 수 있음은 자명하다. 또한 일 예에서 상기 변이형 단백질은 서열번호 56의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 72번째 및/또는 124번째 잔기에 상응하는 아미노산은 고정되고, 서열번호 56의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가지는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 즉, 서열번호 56의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 72번째 및/또는 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 56의 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는, AzIC 계열 ABC 수송체 투과효소 활성을 가지는 폴리펩타이드는 본 출원의 변이형 단백질에 포함될 수 있다.

- [43] 일 예에서, 상기 변이형 단백질은 야생형 단백질 (예컨대, 야생형 AzID 도메인-함유 단백질)보다 L-히스티딘 배출 활성이 보다 강화된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 변이형 단백질은 야생형 AzIC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질과 함께 발현되는 경우, L-히스티딘 배출 활성이 보다 강화될 수 있다.
- [44] 상기 야생형 L-히스티딘 배출 단백질은 서열번호 43 (헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 야생형 AzIC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질), 서열번호 44 (헬코바실러스 마시리엔시스 유래의 야생형 AzID 도메인-함유 단백질) 또는 이들의 조합과 60% 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질일 수 있다. 예컨대, 일 구체예에서, 상기 야생형 L-히스티딘 배출 단백질은 서열번호 43, 44, 또는 이들의 조합과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 갖는 것일 수 있다. 상기 서열번호 43으로 표현되는 단백질은 서열번호 45의 핵산서열에 의하여 암호화되고, 서열번호 44로 표현되는 단백질은 서열번호 46의 핵산서열에 의하여 암호화되거나, 서열번호 43 및/또는 서열번호 44으로 표현되는 단백질은 서열번호 47 핵산서열 (서열번호 45의 3' 말단과 서열번호 46의 5' 말단의 중복 부위에서 융합된 오픈로딩 서열)에 의하여 암호화되는 것일 수 있다.
- [45]
- [46] 다른 양상은, 상기 변이형 단백질을 암호화하는 (코딩하는) 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [47] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오타이드의 중합체

- (polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이형 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 의미한다.
- [48] 본 출원의 변이형 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 56의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [49] 본 명세서에서, 폴리뉴클레오타이드("유전자"와 혼용될 수 있음) 또는 폴리펩타이드("단백질"과 혼용될 수 있음)가 "특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다, 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어진다, 또는 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 표현된다" 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 것을 의미할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 범위에서 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열에 변이(결실, 치환, 변형, 및/또는 부가)가 가해진 "실질적으로 동등한 서열"을 포함하는 것(또는 상기 변이를 배제하지 않는 것)으로 해석될 수 있다.
- [50] 일 예에서, 본 명세서에서 제공되는 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 이들의 본래의 기능 또는 목적하는 기능을 유지하는 범위에서 통상적인 돌연변이 유발법, 예를 들면 방향성 진화법(direct evolution) 및/또는 부위특이적 돌연변이법(site-directed mutagenesis) 등에 의하여 변형된 것을 포함할 수 있다. 일 예에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 "특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다 또는 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열로 이루어진다" 함은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 (i) 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 필수적으로 포함하거나, 또는 (ii) 상기 특정 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 필수적으로 포함하고 본래의 기능 및/또는 목적하는 기능을 유지하는 것을 의미할 수 있다. 본 명세서에서, 상기 목적하는 기능은 미생물의 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 부여하거나, 증가시키는 기능을 의미할 수 있다.
- [51] 본 명세서에 기재된 핵산 서열은 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 상기 단백질을 발현시키고자 하는 미생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열 및/또는 기능을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다.
- [52] 본 명세서에서, 용어 "상동성(identity)"은 주어진 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율(%)로 표시될 수 있다. 핵산 서열에 대한 상동성의 경우, 예를 들면, 문헌에 의한 알고리즘 BLAST(참조: Karlin 및 Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, 1993)나 Pearson에 의한 FASTA(참조: Methods Enzymol., 183, 63, 1990)를 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에

기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다(참조: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

- [53] 일 예에서, 본 명세서에 제공되는 특정 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 특정 핵산 서열 또는 이와 실질적으로 동등한 핵산 서열뿐만 아니라, 상기 특정 핵산 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 구체적으로, 상기 상보성을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절 가능한 T_m 값, 예컨대, 55°C, 60°C, 63°C 또는 65°C의 T_m 값에서 혼성화하고, 후술하는 조건에서 분석할 수 있다: 이러한 조건은 공지의 문헌에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 높은 상보성을 갖는 유전자끼리 혼성화하고, 그보다 낮은 상보성을 갖는 유전자끼리는 혼성화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1x SSC(saline-sodium citrate buffer), 및 0.1%(w/v) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate); 60°C, 0.1x SSC, 및 0.1% SDS; 또는 68°C, 0.1x SSC, 및 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세척하는 조건을 열거할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 혼성화에는 두 개의 뉴클레오타이드가 상보적 서열을 가질 것이 요구되거나, 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 허용될 수 있다. 상기 용어 "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오타이드 염기 간의 관계를 기술하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들면, DNA의 경우, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 폴리뉴클레오타이드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오타이드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고, 이는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다 (Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [54] 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터의 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "형질전환"은 특정 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 과정으로 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내에서 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치할 수 있다. 일 예로 형질전환은 표적 단백질(외래 단백질)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드나 이를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 그 도입되는 형태는 제한이 없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주 세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리

보존 결합부위 및/또는 번역 종결신호 등의 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다. 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 발현조절 요소가 목적 단백질(외래 단백질)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 조절 (예, 전사 개시)를 수행할 수 있도록 발현조절 요소 (예, 프로모터)와 폴리뉴클레오타이드가 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미할 수 있다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 수행할 수 있으며, 예컨대, 통상적인 부위-특이적 DNA 절단 및 연결에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[55]

[56] 상기 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포에 형질전환 하는 방법은 핵산을 세포 (미생물) 내로 도입하는 어떠한 방법으로도 수행 가능하며, 숙주 세포에 따라 당 분야에서 공지된 형질전환 기술을 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 상기 공지된 형질전환 방법으로 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 (CaPO₄) 침전법, 염화칼슘 (CaCl₂) 침전법, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 침전법 (polyethylene glycol-mediated uptake), DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 리포펙션 (lipofection), 초산 리튬-DMSO법 등이 예시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[57]

[58] 상기 폴리뉴클레오타이드의 숙주 세포 유전체 (염색체) 내 도입 (삽입)은 공지된 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 예컨대, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 시스템 (RNA-guided endonuclease system 또는 CRISPR system; 예컨대, (a) RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (예, Cas9 단백질 등), 이의 암호화 유전자, 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터; 및 (b) 가이드 RNA (예, single guide RNA (sgRNA) 등), 이의 암호화 DNA, 또는 상기 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는 혼합물 (예컨대, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 단백질과 가이드 RNA의 혼합물 등), 복합체 (예컨대, 리보핵산 융합단백질 (RNP), 재조합 벡터 (예컨대, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 암호화 유전자 및 가이드 RNA 암호화 DNA를 함께 포함하는 벡터 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상)을 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59]

다른 양상은, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현 벡터로서 사용될 수 있다. 상기 재조합 벡터는 상기 폴리뉴클레오타이드를 숙주세포의 유전체에 삽입 또는 숙주 세포 유전체의 대응 유전자를 대체하기 위한 것일 수 있다.

[60]

본 명세서에서, 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기

조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 암호화하는 서열, 및/또는 전사 및/또는 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주 세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포의 게놈(유전체)과 무관하게 발현되거나, 숙주 세포의 게놈 내에 통합될 수 있다.

[61] 본 명세서에서 사용가능한 벡터는 숙주 세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 통상 사용되는 모든 벡터들 중에서 선택될 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 박테리오파지 등을 들 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터로서, 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 예시할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[62] 본 명세서에서 사용 가능한 벡터는 공지된 발현 벡터 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 숙주 세포 염색체 내 삽입용 벡터일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드의 숙주 세포 염색체 내 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합 또는 CRISPR 시스템에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 벡터는 상기 염색체 내 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉, 상기 폴리뉴클레오타이드의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 유전자들 중에서 선택되어 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[63]

[64] 미생물

[65] 다른 양상은, 상기 변이형 단백질, 상기 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상(1종, 2종, 또는 3종 모두)를 포함하는 미생물을 제공한다. 상기 미생물은 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 가지는 것일 수 있다. 상기 미생물은 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 상기 변이형 단백질, 상기 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하지 않는 미생물과 비교하여 강화된(또는 증가된, 향상된) 것일 수 있다.

- [66] 상기 변이형 단백질은 외래의 것일 수 있다. 본 명세서에서 "외래의 것"은 미생물 내재적으로 존재하는 것이 아니라, 상기 미생물과 다른 종으로부터 유래한 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [67] 본 명세서에서, "L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 강화된 미생물"은 앞서 설명한 변이형 단백질을 발현하도록 조작(변이)됨으로써, L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 없던 미생물이 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 갖게 되거나, 본래의 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능보다 높은 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 갖게된 것일 수 있다.
- [68] 본 명세서에서 "미생물"은 단세포 박테리아를 포괄하는 것으로, "세포"와 혼용될 수 있다.
- [69] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"는 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 폴리펩타이드, 단백질 또는 산물(예컨대, L-히스티딘)의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.
- [70] 본 출원의 미생물은 L-히스티딘 배출 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 활성이 강화되도록 벡터를 통해 유전적으로 변형된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [71] 본 명세서에서, 상기 변이형 단백질을 발현하도록 변이되기 전의 미생물을 상기 변이된 미생물과 구별하기 위하여, "모균주 (parent microorganism or parent strain) 또는 숙주 세포 (host cell)"로 표현될 수 있다.
- [72] 상기 미생물(또는 균주, 재조합 세포)이 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 갖거나, L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 강화된다는 것은, L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 없는 비변형 미생물, 재조합 전의 세포, 모균주, 및/또는 야생형 균주와는 달리 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 부여된 것이거나, 비변형 미생물, 재조합 전의 세포, 모균주, 및/또는 야생형 균주와 비교하여 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 향상된 것을 의미할 수 있다.
- [73] 본 출원의 미생물은 본 출원의 변이형 단백질, 본 출원의 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 본 출원의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 본 출원의 변이형 단백질 또는 본 출원의 폴리뉴클레오타이드를 발현하도록 변형된 미생물; 본 출원의 변이형 단백질, 또는 본 출원의 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 미생물 (예컨대, 재조합 균주); 또는 본 출원의 변이형 단백질 활성을 갖는 미생물 (예컨대, 재조합 균주)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [74] 일 예에서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 (the genus *Corynebacterium*) 미생물, 에세리키아 속 (*Escherichia*) 미생물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스 (*Corynebacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 락토퍼멘텀 (*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범 (*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 써모아미노게네스 (*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 에피션스 (*Corynebacterium efficiens*) 등을 포함할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 더욱 구체적으로는, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다. 상기 에세리키아 속 균주는 대장균 (*Escherichia coli*)일 수 있다.
- [75] 상기 미생물은 변이형 단백질, 상기 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상(1종, 2종, 또는 3종 모두)을 포함하는 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 변이형 단백질을 발현하도록 하는 변이는 앞서 설명한 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 도입하는 것에 의하여 수행되거나, 또는 인공 돌연변이 (예컨대, Error-prone PCR 등) 등에 의하여 수행되는 것일 수 있다. 이와 같이 모균주에 도입되는 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 모균주 내재의 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 암호화 유전자를 대체하거나 이에 더하여 추가로 포함되는 것일 수 있다.
- [76] 일 예에서, 상기 미생물은, 상기 변이형 단백질을 야생형 AzlC 계열 ABC 수송체 투과효소 단백질과 함께 포함하는 경우, L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 보다 강화될 수 있다.
- [77] 일 예에서, 상기 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 강화된 미생물은 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 야생형 L-히스티딘 배출 단백질을 포함하는 미생물과 비교하여 L-히스티딘 생산능이 약 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 또는 80% 이상 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [78] 다른 예에서, 상기 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 강화된 미생물은 변이 전 모균주, 비변형 미생물, 야생형 L-히스티딘 배출 단백질을 포함하는 미생물과 비교하여 L-히스티딘 생산능이 약 1 g/L 이상, 1.5 g/L 이상, 2 g/L 이상, 2.5 g/L 이상, 3 g/L 이상, 3.5 g/L 이상, 또는 4 g/L 이상 증가된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [79] 상기 용어 “약(about)”은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [80]

- [81] 다른 양상은, 상기 변이형 단백질, 상기 폴리뉴클레오타이드, 상기 재조합 벡터, 또는 상기 미생물을 포함하는 L-히스티딘 생산용 조성물을 제공한다.
- [82] 다른 양상은 상기 변이형 단백질, 상기 폴리뉴클레오타이드, 상기 재조합 벡터, 또는 상기 미생물을 L-히스티딘 생산에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [83] 다른 양상은 상기 변이형 단백질, 상기 폴리뉴클레오타이드, 상기 재조합 벡터, 또는 상기 미생물을 L-히스티딘 생산용 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [84] 다른 양상은, 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-히스티딘 생산(제조) 방법을 제공한다. 상기 제조 방법은 상기 배양하는 단계 이후에, 배양된 미생물, 배지, 또는 이들 모두로부터 L-히스티딘을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [85] 다른 양상은, 미생물의 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 강화시키는 단계를 포함하는, 상기 미생물의 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 증가시키는 방법, 또는 상기 미생물에 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능을 부여하는 방법을 제공한다.
- [86] 상기 변이를 도입하는 단계는 변이형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 미생물에 도입(형질전환)시키는 단계를 포함하거나, 인공적으로 돌연변이를 발생시키는 단계(예컨대, Error-prone PCR 등)를 포함할 수 있다.
- [87] 다른 예는 상기 L-히스티딘 배출 활성 및/또는 L-히스티딘 생산능이 강화된 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-히스티딘 생산 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 배양하는 단계 이후에, 상기 배양된 미생물, 배지, 또는 이들 모두로부터 L-히스티딘을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [88] 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 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)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45°C, 또는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 L-히스티딘은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [89] 상기 배양에 사용 가능한 배지는 탄소 공급원으로 당 및 탄수화물(예: 글루코스, 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), 유기산(예: 아세트산) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 개별적으로 사용하거나

또는 2종 이상을 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), 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 개별적으로 사용하거나 또는 2종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인 공급원으로 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 개별적으로 사용하거나 또는 2종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 배지는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산, 및/또는 비타민 등과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

- [90] 상기 L-히스티딘을 회수하는 단계는 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지, 배양액, 또는 미생물로부터 목적하는 아미노산을 수집하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 회수하는 단계는 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화, HPLC 등에서 선택된 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있다. 상기 L-히스티딘을 회수하는 방법은, 그 이전, 동시, 또는 그 이후에, 정제단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[91]

발명의 효과

- [92] 본 출원은 L-히스티딘 배출능을 갖는 히스티딘 배출 단백질 또는 이의 변이체를 발굴하고, 이를 L-히스티딘의 생산능을 가지는 미생물에서 발현시킨 결과, L-히스티딘 생산량을 획기적으로 향상시킬 수 있다.

[93]

발명의 실시를 위한 형태

- [94] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[95]

[96] 실시예 1. 외래 히스티딘 배출 유전자 탐색 및 후보 선별

- [97] L-히스티딘 특이 배출능을 갖는 단백질 후보를 선별하기 위하여 분류별 아미노산(염기 아미노산: L-라이신(L-lys), 방향족 아미노산: 트립토판(Trp), 곁가지 아미노산: 이소류신(Ile))에 대한 배출 단백질(LysE(Arch Microbiol 180: 155-160), Wex(대한민국 등록특허 제10-1968317호), BrnFE(Arch Microbiol 180: 155-160))의 아미노산 서열을 query 서열로 하고, NCBI와 Kegg database를 기반으로 PSI-BLAST 탐색 결과, L-히스티딘을 배출할 가능성이 있는 막단백질로 예측되는 후보 유전자들과 이를 보유하는 미생물을 선정하였다.

[98] 이 중 생산 균주에 적용 가능한 정도의 생물 안전도 (Biosafety level)와 확보 가능성을 고려하여, 아래 표 1 과 같이 LysE 기반 1종, Wex 기반 3종, BrnFE 기반 2 종의 단백질, 이를 암호화하는 유전자, 및 이를 포함하는 미생물을 선정하였다:

[99]

[100] [표1]

L-히스티딘 배출자 후보 list

	No	균 주	Protein Ref Seq.	gDNA Ref Seq.	생물 안전도	아미노산 서열	핵산 서열
Wex 기반	1	<i>Herbaspirillum aquaticum</i> (KCTC42001)	WP_088757482.1	NZ_NJGV01000035.1	1	서열번호 1	서열번호 2
	2	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> (KCTC22125)	WP_041680244.1	CP000091.1	1	서열번호 3	서열번호 4
	3	<i>Kluyvera cryocrescens</i> (KCTC2580)	WP_052283291.1	NZ_LGHZ01000014.1	1	서열번호 5	서열번호 6
LysE 기반	4	<i>Corynebacterium stationis</i> (ATCC6872)	WP_066837457.1	CP014279.1	1	서열번호 7	서열번호 8
BrnFE 기반	5	<i>Leucobacter salsicius</i> (KCTC19904)	WP_026139602.1	NZ_AOCN01000022.1	1	서열번호 9	서열번호 11
			WP_083879221.1			서열번호 10	
	6	<i>Dermabacter vaginalis</i> (KCTC39585)	WP_065248528.1 (DvaF)	NZ_CP012117.1	1	서열번호 12	서열번호 14
			WP_065248527.1(DvaE)			서열번호 13	서열번호 15

			DvaFE			서열번호 12 및 13	서열번호 16 (DvaFE 오픈)
--	--	--	-------	--	--	--------------	--------------------

- [101] (상기 표 1에서, 생물안전도는 미국의 Centers for Disease Control and Prevention에서 정의한 미생물 병원성 지표 (level 1~4)에 따른 것임 (level이 낮을수록 안전함))
- [102] 실시예 2. 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 도입 벡터 및 이를 도입한 재조합 코리네박테리움 속 균주 제작
- [103] 상기 실시예 1에서 선정한 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 6종을 코리네박테리움 속 균주에 도입하기 위한 벡터 6종을 제작하였다.
- [104]
- [105] 실시예 2-1. 타겟 유전자 삽입용 벡터 pDZAN2131 제작
- [106] 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보들을 도입하기 위하여, 코리네박테리움 글루타미쿰의 트랜스포존을 코딩하는 유전자 중 NCgl2131 유전자를 삽입 site로 사용하였다(Journal of Biotechnology 104, 5-25 Jorn Kalinowski et al, 2003). 또한 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보들이 코리네박테리움 유래 gapA 유전자의 프로모터(이하, PgapA, 서열번호 17) 하에서 발현되도록 설계하였다.
- [107] NCgl2131 유전자를 배출자 유전자들로 치환하기 위하여 NCgl2131 결손 및 타겟 유전자 삽입 벡터를 제작하였다. 벡터를 제작하기 위해, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 18 과 서열번호 19, 서열번호 20과 서열번호 21의 프라이머 쌍을 각각 이용하여 PCR을 각각 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 각각 531bp의 del-N2131L(서열번호 22)와 555bp의 del-N2131R(서열번호 23)의 DNA 단편을 획득하였다. 획득한 DNA 산물을 QIAGEN사의 PCR Purification kit를 사용하여 정제한 후 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제 10-0924065호)와 다카라(TaKaRa)의 Infusion Cloning Kit를 사용하여 클로닝하여, NCgl2131유전자결손 및 타겟 유전자 삽입용 벡터 pDZAN2131을 제작하였다.
- [108]
- [109] 실시예 2-2. 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 도입 벡터 6종 제작
- [110] *Herbaspirillum aquaticum* 유래 단백질(이하, Haq, 서열번호 1)를 코딩하는 유전자(이하, haq, 서열번호 2)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. haq를 증폭시키기 위하여 *Herbaspirillum aquaticum* 균주(KCTC42001)의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 24와 서열번호 25의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는

PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 945bp의 *haq* (서열번호 2)를 포함한 977bp의 *haq* 단편을 수득하였다. *haq*와 연결 가능한 PgapA 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 26과 서열번호 27의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 409bp의 PgapA(서열번호 17)를 포함한 441bp의 PgapA 단편을 수득하였다. 상기 수득된 *haq* 단편과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZAN2131 벡터를 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝하여, 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZAN2131-PgapA-Haq로 명명하였다.

- [111] *Cupriavidus pinatubonensis* 유래 단백질(이하, Cpi, 서열번호 3)를 코딩하는 유전자(이하, *cpi*, 서열번호 4)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. *Cupriavidus pinatubonensis* 유래 *cpi*를 증폭시키기 위하여, *Cupriavidus pinatubonensis* 균주(KCTC22125)의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 28와 서열번호 29의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행. 그 결과 945bp의 *cpi*(서열번호 4)를 포함한 977bp의 *cpi* 단편을 수득하였다. *cpi*와 연결 가능한 PgapA 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 26과 서열번호 30의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 409bp의 PgapA(서열번호 17)를 포함한 441bp의 PgapA 단편을 수득하였다. 상기 수득된 *cpi* 단편과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZAN2131 벡터를 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여, 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZAN2131-PgapA-Cpi로 명명하였다.

- [112] *Kluyvera cryocrescens* 유래 단백질(이하, Kcr, 서열번호 5)를 코딩하는 유전자(이하, *kcr*, 서열번호 6)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. *Kluyvera cryocrescens* 유래 *kcr*를 증폭시키기 위하여, *Kluyvera cryocrescens* 균주(KCTC2580)의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 31와 서열번호 32의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며,

PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 882bp의 *kcr*(서열번호 6)를 포함한 914bp의 *kcr*단편을 수득하였다. *kcr*와 연결 가능한 PgapA 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 서열번호 26과 서열번호 33의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행. 그 결과 409bp의 PgapA(서열번호 17)를 포함한 441bp의 PgapA 단편을 수득하였다. 상기 수득된 *kcr* 단편과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZAN2131 벡터를 겹친 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여, 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZAN2131-PgapA-Kcr로 명명하였다.

- [113] *Corynebacterium stationis* 유래 단백질(이하, Cst, 서열번호 7)를 코딩하는 유전자(이하, *cst*, 서열번호 8)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. *Corynebacterium stationis* 유래 *cst*를 증폭시키기 위하여, *Corynebacterium stationis* 균주(ATCC6872)의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 34와 서열번호 35의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 717bp의 *cst* (서열번호 8)를 포함한 749bp의 *cst* 단편을 수득하였다. *cst* 와 연결 가능한 PgapA 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 서열번호 26과 서열번호 36의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 409bp의 PgapA(서열번호 17)를 포함한 441bp의 PgapA 단편을 수득하였다. 수득된 *cst* 단편과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZAN2131 벡터를 겹친 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여, 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZAN2131-PgapA-Cst로 명명하였다.

- [114] *Leucobacter salsicius* 유래 단백질(이하, LsaFE, 서열번호 9, 10)를 코딩하는 오피론(이하, *lsa*, 서열번호 11)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. *Leucobacter salsicius* 유래 *lsa* 를 증폭시키기 위하여 *Leucobacter salsicius* 균주(KCTC19904)의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 37와 서열번호 38의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결

과 1048bp의 *lsa* (서열번호 11)를 포함한 1080bp의 *lsa* 단편을 수득하였다. *lsa* 와 연결 가능한 *PgapA* 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 서열번호 26과 서열번호 39의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 409bp의 *PgapA*(서열번호 17)를 포함한 441bp의 *PgapA* 단편을 수득하였다. 수득된 *lsa* 단편과 *PgapA* 단편, 그리고 *ScaI* 제한효소로 절단된 pDZΔN2131 벡터를 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여, 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZΔN2131-PgapA-Lsa로 명명하였다.

- [115] *Dermabacter vaginalis* 유래 단백질(이하, DvaFE, 서열번호 12, 13)를 코딩하는 오피론(이하, *dva*, 서열번호 16)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. *Dermabacter vaginalis* 유래 *dva* 를 증폭시키기 위하여, *Dermabacter vaginalis* 균주(KCTC39585)의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 40와 서열번호 41의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 1081bp의 *dva* (서열번호 16)를 포함한 1113bp의 *dva* 단편을 수득하였다. *dva* 와 연결 가능한 *PgapA* 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 서열번호 26과 서열번호 42의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행한 결과 409bp의 *PgapA*(서열번호 17)를 포함한 441bp의 *PgapA* 단편을 수득하였다. 수득된 *dva* 단편과 *PgapA* 단편, 그리고 *ScaI* 제한효소로 절단된 pDZΔN2131 벡터를 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZΔN2131-PgapA-Dva로 명명하였다.

[116]

[117] **실시예 2-3. 재조합 코리네박테리움 속 균주 제작**

- [118] 상기 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보들의 L-히스티딘 배출능을 확인하기 위하여, 상기 제작된 NCgl2131 결손 벡터(pDZΔN2131), 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 도입 벡터 6종(pDZΔN2131-PgapA-Haq, pDZΔN2131-PgapA-Cpi, pDZΔN2131-PgapA-Kcr, pDZΔN2131-PgapA-Cst, pDZΔN2131-PgapA-Lsa, pDZΔN2131-PgapA-Dva)을 각각 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주에 도입하였다. 보다 구체적으로, 상기 벡터들을 각각 ATCC13032 균주에 전기천공법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상의 NCgl2131 유전자가 결손 되거나 L-히스티딘 배출유전자 후보로 치환되어

있는 7종의 재조합 균주를 제작하였으며, 이들을 각각 ATCC13032ΔN2131 (N2131 유전자 결손), ATCC13032ΔN2131::Haq (N2131 유전자가 *haq*로 치환), ATCC13032ΔN2131::Cpi (N2131 유전자가 *cpi*로 치환), ATCC13032ΔN2131::Kcr (N2131 유전자가 *kcr*로 치환), ATCC13032ΔN2131::Cst (N2131 유전자가 *cst*로 치환), ATCC13032ΔN2131::Lsa (N2131 유전자가 *lsa*로 치환), 및 ATCC13032ΔN2131::Dva (N2131 유전자가 *dva*로 치환)로 명명하였다.

[119]

[120] 실시예 3. 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 도입 코리네박테리움 속 균주들의 MIC 측정

[121] 상기 실시예 2에서 제작된 7종의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 (ATCC13032ΔN2131, ATCC13032ΔN2131::Haq, ATCC13032ΔN2131::Cpi, ATCC13032ΔN2131::Kcr, ATCC13032ΔN2131::Cst, ATCC13032ΔN2131::Lsa, 및 ATCC13032ΔN2131::Dva)들의 L-히스티딘 배출능 활성의 보유여부 확인을 위하여, L-히스티딘을 이용한 최소저지농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 실험을 수행하였다. 7종의 균주들을 최소 액체 배지에 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 1×10^3 과 1×10^4 개의 세포로 희석하여 L-히스티딘이 첨가된 최소 고체 배지에서 스포팅 (spotting) 배양하였다. 상기 사용된 최소 고체 배지 조성은 다음과 같다:

[122] 최소 배지 (pH 7.2)

[123] 포도당 10 g, KH₂PO₄ 1 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ 7H₂O 0.4 g, 요소 2 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, NaCl 0.5 g, 니코틴아미드 5 μg, 칼슘-판토텐산 0.1 μg, 비오틴 0.2 μg, 티아민 HCl 3 μg, Trace elements solution* 1ml (증류수 1 리터 기준), Agar 20 g

[124] *Trace elements solution

[125] Na₂B₄O₇ 10H₂O 0.09 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₇ 4H₂O 0.04 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.01 g, CuSO₄ 5H₂O 0.27 g, MnCl₂ 4H₂O 0.01 g, FeCl₃ 6H₂O 1 g, CaCl₂ 0.01 g (증류수 1 리터 기준)

[126] 최소저지농도 실험을 위해, 1 g/L의 L-히스티딘을 최소 고체 배지에 첨가하였고, 48시간 후 세포의 성장을 관찰하여, 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다:

[127]

[128] [표2]

L-히스티딘이 포함된 최소배지에서 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 도입 코리네박테리움 속 균주들의 성장 정도

균주	L-히스티딘 미포함 최소 배지	L-히스티딘 1 g/L 포함 최소배지
ATCC13032ΔN2131	++++	+
ATCC13032ΔN2131::H aq	++++	+

ATCC13032ΔN2131::C pi	++++	+
ATCC13032ΔN2131::K cr	++++	+
ATCC13032ΔN2131::C st	++++	+
ATCC13032ΔN2131::L sa	++++	+
ATCC13032ΔN2131::D va	++	+++

- [129] (표 2에서, + 개수는 균주들의 상대적 성장 정도를 나타내는 것으로, 각각 다음을 나타냄: + : single colony는 형성되지 못하나 heavy(single colony로 성장되지 못하고 뭉쳐서 자라는 형태)는 형성됨; ++ : heavy 형성되고 single colony 5개 미만 형성됨;
- [130] +++ : heavy 형성되고 single colony 50개 미만 형성됨;
- [131] ++++ : heavy가 single colony 구분되지 않게 형성됨)
- [132]
- [133] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, ATCC13032ΔN2131::Dva 균주를 제외한 모든 균주가 L-히스티딘 미포함 최소배지에서 원활히 성장하였다. 그러나 L-히스티딘이 1g/L 포함된 최소배지에서는 대부분의 L-히스티딘 배출 후보 유전자들이 도입된 균주들의 성장이 미미했으며, *Dermabacter vaginalis* 유래 유전자가 도입된 ATCC13032ΔN2131::Dva 균주만 ATCC13032ΔN2131 대비 월등한 성장을 보였다. 이는, 도입된 *Dermabacter vaginalis* 유래 단백질이 최소저지농도 이상의 L-히스티딘 포함 배지에서도 L-히스티딘 배출능을 가질 수 있음을 보여준다.
- [134] 이로부터 *Dermabacter vaginalis* 유래 단백질 Dva를 코리네박테리움 균주에 최소저지농도 이상의 L-히스티딘에 대한 내성을 부여하며 L-히스티딘 특이 배출능을 갖는 단백질로 선택하였다.
- [135]
- [136] 실시예 4. 코리네박테리움 유래 L-히스티딘 생산 균주(KCCM 80179) 기반 *Dermabacter vaginalis* 유래 유전자(*dva*) 도입 균주 제작 및 L-히스티딘 생산능 평가
- [137]
- [138] *Dermabacter vaginalis* 유래 단백질 Dva의 L-히스티딘 배출능을 확인하기 위하여, *Dermabacter vaginalis* 유래 유전자 *dva*를 L-히스티딘 생산균주 KCCM 80179(대한민국 공개특허 제10-2019-0065984호) 균주에 도입하였다.

[139] 이를 위하여, 실시예 2에서 제작된 벡터 pDZΔN2131, 및 pDZΔN2131-PgapA-Dva를 각각 KCCM80179 균주에 전기천공법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상의 NCgl2131 유전자가 결손 되거나 L-히스티딘 배출 유전자 후보 (*dva*)로 치환되어 있는 균주 2종을 제작하였으며, 이를 각각 KCCM 80179ΔN2131 (NCgl2131 유전자가 결손) 및 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva (NCgl2131 유전자가 *dva*로 치환)으로 명명하였다.

[140] 상기 제작된 KCCM 80179ΔN2131 및 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva 균주의 L-히스티딘 생산능을 확인하기 위하여, 다음과 같은 방법으로 배양하였다: KCCM 80179ΔN2131 및 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva 균주를 활성화 배지에서 16시간 동안 배양한 후, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30 °C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 30 °C에서 48시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 배양에 사용된 배지 조성은 다음과 같다:

[141] <활성화 배지>

[142] 육즙 1%(w/v), 폴리펩톤 1%(w/v), 소듐클로라이드 0.5%(w/v), 효모엑기스 1%(w/v), 한천 2%(w/v), pH 7.2

[143] <종 배지>

[144] 포도당 5%(w/v), 박토펙톤 1%(w/v), 소듐클로라이드 0.25%(w/v), 효모엑기스 1%(w/v), 요소 0.4%(w/v), pH 7.2

[145] <생산 배지>

[146] 포도당 10%(w/v), 황산암모늄 2%(w/v), 제1인산칼륨 0.1%(w/v), 황산마그네슘 7수염 0.05%(w/v), CSL(옥수수 침지액) 2.0%(w/v), 비오틴 200 μg/L, 탄산칼슘, pH 7.2,

[147] 배양 종료 후, HPLC에 의해 L-히스티딘 생산량 (배지 내 히스티딘 함량)을 측정하여, 그 결과를 다음의 표 3에 나타내었다:

[148]

[149] [표3]

KCCM 80179 유래 *Dermabacter vaginalis* 유래 유전자 도입 균주의 L-히스티딘 생산량

	Cell OD ₆₀₀	사용한 포도당 (g/L)	히스티딘 생산량 (g/L)
KCCM 80179	51.4	100	14.1
KCCM 80179ΔN2131	51.6	100	13.9
KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva	42.6	100	17.1

[150] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, NCgl2131 결손 균주는 모균주인 KCCM 80179 균주와 동등 정도의 L-히스티딘 생산능을 가지는 반면, *Dermabacter vaginalis* 유래 유전자가 도입된 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva 균주는 NCgl2131 결손 균주 및 모균주인 KCCM 80179 균주 대비 L-히스티딘 생산능이 각각 23% 및 21% 이상 증가됨을 확인하였다. 상기 실시예 3 및 4의 결과를 통해, *Dermabacter vaginalis* 유래 유전자 도입을 통해 최소저해농도 이상의 L-히스티딘 농도에 대한 내성이 증가될 뿐만 아니라, L-히스티딘 생산능도 크게 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 *Dermabacter vaginalis* 유래 단백질이 L-히스티딘을 특이적으로 배출할 수 있는 L-히스티딘 배출 단백질을 입증한다.

[151]

[152] 실시예 5. *Dermabacter vaginalis* 유래 L-히스티딘 배출자 유사 단백질 추가 확보

[153] 상기 실시예 3과 4에서 *Dermabacter vaginalis* 유래 단백질의 L-히스티딘 배출능을 확인하였으므로, 상기 단백질과 아미노산 서열 상동성이 높은 유사 단백질을 추가로 확보하기 위하여, DvaFE 중 DvaF의 서열(서열번호 12)을 query로 이용하여 BLAST 탐색을 수행하였다 (표 4 참조).

[154]

[155] [표4]

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple align							
	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
☒ branched-chain amino acid transporter AzlC [Dermabacter vaginalis]	498	498	99%	3e-178	100%	WP_065248528.1	
☒ putative branched-chain amino acid transporter [Mycobacteroides abscessus subsp. abscessus]	491	491	99%	2e-175	98%	SHX01653.1	
☒ branched-chain amino acid transporter AzlC [Dermabacter hominis]	486	486	99%	3e-173	97%	WP_034371095.1	
☒ MULTISPECIES_ azaleucine resistance protein AzlC [Dermabacter]	481	481	99%	3e-171	97%	WP_016663406.1	
☒ branched-chain amino acid transporter AzlC [Dermabacter sp. HMSQ08H10]	479	479	99%	2e-170	96%	WP_070457478.1	
☒ branched-chain amino acid transporter AzlC [Helicobacter massiliensis]	427	427	99%	9e-150	95%	WP_055090792.1	
☒ branched-chain amino acid ABC transporter permease [Corynebacterium sp. J010B-136]	276	276	88%	2e-90	59%	WP_105325072.1	
☒ branched-chain amino acid ABC transporter permease [Flaviflexus massiliensis]	274	274	90%	2e-89	60%	WP_054952717.1	
☒ branched-chain amino acid transporter AzlC [Tersicoccus sp. Bi-70]	270	270	88%	4e-88	59%	QMH32375.1	
☒ MULTISPECIES_ branched-chain amino acid ABC transporter permease [Microbacteriaceae]	266	266	90%	2e-86	60%	WP_087056262.1	
☒ Branched-chain amino acid transport protein [Frigonbacterium sp. JB110]	266	266	90%	2e-86	60%	SJM66929.1	
☒ branched-chain amino acid ABC transporter permease [Citricoccus muralis]	261	261	87%	1e-84	59%	WP_115932417.1	

[156] 상기 BLAST 탐색 결과를 바탕으로 60% 이상의 서열 상동성을 나타내고 *Dermabacter* 속에 속하지 않는 L-히스티딘 배출자 후보 1종을 추가로 선정하여, 다음의 표 5에 나타내었다:

[157]

[158] [표5]

L-히스티딘 배출자 추가 후보 리스트

No.	균 주	Protein Ref Seq.	gDNA Ref Seq.	생물 안전도	단백질 서열	유전자 서열
7	<i>Helcobacillus massiliensis</i>	WP_055090792.1 (HmaF)	NZ_CYUG01000017.1	2	서열번호 43	서열번호 45
		WP_055090293.1 (HmaE)			서열번호 44	서열번호 46
		HmaFE			서열번호 43 및 44	서열번호 47(HmaF E 오페론)

[159] 실시예 6. 추가 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보 도입 벡터 제작

[160] 상기 실시예 5에서 추가 선정된 L-히스티딘 배출 유전자 후보 2종을 코리네 박테리움 속 균주에 도입하기 위한 벡터를 제작하였다. 실시예 2와 동일하게 NCgl2131 유전자를 결손 site로, PgapA를 프로모터로 사용하였다.

[161] *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질(이하, HmaFE, 서열번호 43, 44)을 코딩하는 오페론(이하, hma, 서열번호 47)의 염기서열 정보를 미국보건원 진뱅크(NIH GenBank)로부터 획득하였다. haq DNA를 획득하기 위하여 Bionics 사(社)의 진합성 서비스를 이용하여 DNA를 합성하였다. 합성된 DNA를 증폭하기 위하여 서열번호 48와 서열번호 49의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행. 그 결과 1081bp의 hma (서열번호 47)를 포함한 1113bp의 hma 단편을 획득하였다. hma와 연결 가능한 PgapA 단편을 획득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 서열번호 26과 서열번호 50의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행. 그 결과 409bp의 PgapA(서열번호 17)를 포함한 441bp의 PgapA 단편을 획득하였다. 획득된 hma 단편과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZAN2131 벡터를 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여, 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pDZAN2131-PgapA-Hma로 명명하였다.

[162]

[163] 실시예 7. L-히스티딘 생산 균주(KCCM 80179) 기반 *Helcobacillus massiliensis* 유래 유전자 도입(hma) 균주 제작 및 L-히스티딘 생산능 평가

- [164] *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질 Hma의 L-히스티딘 배출능을 확인하기 위하여 L-히스티딘 생산균주 KCCM 80179 균주에 도입하였다.
- [165] 이를 위해 실시예 6에서 제작된 벡터 pDZΔN2131-PgapA-Hma를 KCCM80179 균주에 전기천공법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상의 NCgl2131 유전자가 L-히스티딘 배출유전자 후보로 치환되어 있는 균주를 제작하였으며, 이를 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma (NCgl2131 유전자가 hma로 치환)으로 명명하였다.
- [166] 상기 제작된 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma 균주의 L-히스티딘 생산능을 확인하기 위하여, 상기 균주를 실시예 4에서 수행한 방법으로 배양하고 L-히스티딘 생산량을 측정하였다. 대조군으로 실시예 4에서 제작된 KCCM 80179ΔN2131 균주와 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva 균주에 대하여 동일한 방법으로 배양 및 L-히스티딘 생산량(배지 내 히스티딘 함량) 측정을 수행하였다. 상기 얻어진 결과를 표 6에 나타내었다.

[167]

[168] [표6]

KCCM 80179 유래 *Helcobacillus massiliensis* 유래 유전자 도입 균주의 L-히스티딘 생산량

	OD	사용한 포도당 (g/L)	히스티딘 생산량 (g/L)
KCCM 80179	50.3	100	14.0
KCCM 80179ΔN2131	51.5	100	13.9
KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Dva	40.8	100	17.3
KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma	43.1	100	16.6

- [169] 표 6에 나타난 바와 같이, KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma 균주는 NCgl2131 결손 균주(KCCM 80179ΔN2131) 및 모균주인 KCCM 80179 균주 대비 L-히스티딘 생산량이 각각 19%, 19% 증가하였다. 이러한 결과는 *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질도 L-히스티딘을 특이적으로 배출할 수 있는 L-히스티딘 배출자로 선별될 수 있음을 보여준다.

[170]

[171] 실시예 8: 인공돌연변이법을 이용한 Hma 변이 라이브러리 제작

- [172] L-히스티딘 배출능이 증가된 변이형 Hma를 획득하기 위하여 1차 crossover용 변이 단백질 발현 벡터 라이브러리를 제작하였다. 이를 위하여 상기 제작된 pDZ ΔN2131-PgapA-Hma를 주형으로 하여 서열번호 48와 서열번호 49의 프라이머 쌍을 이용한 Error-prone PCR법으로 염기치환변이가 무작위적으로 도입된 hma 오페론들을 획득하였다. Error-prone PCR은 GenemorphII Random Mutagenesis Kit(Stratagene)을 사용하여 증폭된 유전자 단편 내에 변이가 1kb당 0 내지 3.5개

가 도입되는 조건으로 PCR 수행하였으며, PCR 조건은 변성 96°C, 30초; 어닐링 53°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 30회 반복하였다. hma와 연결 가능한 PgapA 단편을 수득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 26과 서열번호 50의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltra™ 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하여 PgapA 단편을 수득하였다. 상기 수득된 돌연변이 hma 오페론들과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZΔN2131 벡터를 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝하였고, DH5α에 형질전환하여 카나마이신 (25mg/L)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환된 콜로니 20종을 선별한 후 플라스미드를 획득하여 염기서열을 분석한 결과 평균 2 mutations/kb 빈도로 서로 다른 위치에 변이가 도입된 것을 확인하였다. 약 10,000개의 형질전환된 대장균 콜로니를 취하여 플라스미드를 추출하였고, 이를 pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt) 라이브러리로 명명하였다.

[173]

[174] 실시예 9: Hma 인공돌연변이 라이브러리 도입 및 L-히스티딘 생산능 증가 균주 선별

[175] 상기 제작된 ATCC13032ΔN2131 균주를 모균주로 하여 상기 제작된 pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt) 라이브러리를 상동염색체 제조함에 의해 형질전환하고 카나마이신(25mg/L)이 포함된 복합평판배지에 도말하여 약 7000개의 콜로니를 확보하였으며, 각 콜로니를 ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1 부터 ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-7000까지로 명명하였다.

[176] <복합평판배지 (pH 7.0)>

[177] 포도당 10g, Peptone 10g, Beef extract 5g, Yeast extract 5g, Brain Heart Infusion 18.5g, NaCl 2.5g, Urea 2g, Sorbitol 91g, Agar 20g(중류수 1 리터 기준)

[178]

[179] 확보된 7000개의 콜로니를 상기 실시예 3에서 수행한 L-히스티딘에 대한 최소 저지농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 실험을 수행하였다. 효율적인 스크리닝을 위하여 3g의 L-히스티딘을 포함하는 액체 최소배지를 기반으로 수행하였다. colony를 바로 액체 최소배지 300ul에 접종하여 96-딥 웰 플레이트에서 32°C, 1000rpm으로 약 18시간 동안 배양한 후 OD600 값을 측정하여 성장이 우수한 colony를 선별하였다. 대조군으로는 상기 제작된 ATCC13032ΔN2131 균주와 ATCC13032ΔN2131::Hma 균주를 사용하였으며 1차 실험을 통하여 251개를 선별하고, 재반복 실험을 통해서 36개의 colony를 선별하였으며, 사용된 배지 성분은 하기와 같다.

[180] 액체 최소 배지 (pH 7.2)

[181] 포도당 10g, KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, 요소 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, NaCl 0.5 g, 니코틴아미드 5 μg , 칼슘-판토텐산 0.1 μg , 비오틴 0.2 μg , 티아민 HCl 3 μg , Trace elements solution* 1ml (증류수 1 리터 기준)

[182] *Trace elements solution

[183] $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.09 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.27 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g, CaCl_2 0.01 g (증류수 1 리터 기준)

[184] 최소저지농도 실험을 위해, 3 g/L의 L-히스티딘을 배지에 첨가하여 18hr 배양함

[185]

[186] 상기 선별된 36개의 colony를 실시예 3에서 수행한 방법으로 고체 배지 기반 스크리닝을 수행하여 L-히스티딘 배출능이 증가된 6종의 colony를 최종 스크리닝 하였으며, 그 결과를 하기의 표 7에 나타내었다:

[187]

[188] [표7]

L-히스티딘이 포함된 최소배지에서 변이 도입 균주들의 성장 정도

균주	L-히스티딘 미포함 최소배지	L-히스티딘 1 g/L 포함 최소배지
ATCC13032ΔN2131	++++	+
ATCC13032ΔN2131::Hma	++++	+++
ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1216	++++	++++
ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-2305	++++	++++
ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-3411	++++	++++
ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-4426	++++	++++
ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714	++++	++++
ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718	++++	++++

[189] (표 7에서, + 개수는 균주들의 상대적 성장 정도를 나타내는 것으로, 각각 다음을 나타냄: + : single colony는 형성되지 못하나 heavy(single colony로 성장되지 못하고 뭉쳐서 자라는 형태)는 형성됨; ++ : heavy 형성되고 single colony 5개 미만 형성됨;

[190] +++ : heavy 형성되고 single colony 50개 미만 형성됨;

[191] ++++ : heavy가 single colony 구분되지 않게 형성됨)

[192]

[193] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, NCgl2131 결손 균주(ATCC13032ΔN2131)는 L-히스티딘 1 g/L 포함 최소배지에서 원활하게 성장하지 못하였으나, *Helcobacillus massiliensis* 유래 유전자가 도입된 ATCC13032ΔN2131::Hma 균주는 원활하게 성장하였고 고체 배지 기반 스크리닝을 수행하여 L-히

스티딘 배출능이 증가된 6종의 균주(ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1216, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-2305, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-3411, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-4426, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714, 및 ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주)는 히스티딘 1 g/L 포함 최소배지에서 보다 높은 성장 정도를 확인하였다.

[194]

[195] 실시예 10. 코리넨박테리움 유래 L-히스티딘 생산 균주(KCCM 80179) 기반 선별 라이브러리 도입균주 제작 및 L-히스티딘 생산능 평가

[196] 실시예 9에서 선별된 colony 6종이 포함하고 있는 변이형 hma를 L-히스티딘 생산균주에 도입하기 위한 벡터를 제작하였다. 이를 위하여 ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1216, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-2305, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-3411, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-4426, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714, ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 48와 서열번호 49의 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 수행하여 변이형 hma종을 획득하였다. PCR 조건은 변성 96°C, 30초; 어닐링 53°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 30회 반복하였다. 변이형 hma과 연결 가능한 PgapA 단편을 획득하기 위하여, ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 26과 서열번호 50의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하여 PgapA 단편을 획득하였다. 상기 획득된 돌연변이 hma 6종 단편과 PgapA 단편, 그리고 ScaI 제한효소로 절단된 pDZΔN2131 벡터를 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 유래 라이브러리 colony에 따라 pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1216, pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-2315, pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-3411, pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-4426, pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714, pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718으로 명명하였다.

[197] 이후 제작된 벡터를 KCCM 80179 균주에 전기천공법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 변이 hma 6종이 각각 도입된 균주 6종을 제작하였으며, 이를 각각 KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1216, KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-2315, KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-3411, KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-4426, KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714, KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718으로 명명하였다.

[198] 상기 제작된 균주 6 종의 L-히스티딘 생산능을 확인하기 위하여, 상기 실시예 7에서 제작된 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma 균주를 대조균으로 사용하여 실시예 4와 같은 방법으로 측정하였으며, 그 결과를 표 8에 나타내었다:

[199]

[200] [표8]

KCCM 80179 유래 변이 hma 도입 균주 6종의 L-히스티딘 생산량

	Cell OD ₆₀₀	사용한 포도당 (g/L)	히스티딘 생산량 (g/L)
KCCM 80179	51.0	100	13.9
KCCM 80179ΔN2131	51.1	100	14.0
KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma	43.5	100	16.5
KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-1216	50.1	100	15.1
KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-2315	45.8	100	16.2
KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-3411	40.1	100	16.4
KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-4426	44.0	100	16.2
KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714	41.5	100	17.1
KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718	40.7	100	18.5

[201] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, NCgl2131 결손 균주(KCCM 80179ΔN2131)는 모균주인 KCCM 80179 균주와 동등 정도의 L-히스티딘 생산능을 가지는 반면, *Helcobacillus massiliensis* 유래 유전자가 도입된 ATCC13032ΔN2131::Hma 균주는 NCgl2131 결손 균주 및 모균주인 KCCM 80179 균주 대비 L-히스티딘 생산능이 증가하였다. 변이 hma 6종이 각각 도입된 6종의 균주는 NCgl2131 결손 균주 및 모균주인 KCCM 80179 균주 대비 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma 균주와 동등하거나 그 이상의 수준으로 L-히스티딘 생산능이 증가하였으며, 특히 KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-5714 및 KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주는 L-히스티딘 생산능이 야생형 hma가 도입된 KCCM 80179ΔN2131-PgapA-Hma 대비 각각 3.6%, 12.1% 증가함을 확인하였다.

[202]

[203] 실시예 11. L-히스티딘 생산능 증가 변이형 Hma 유전자 변이 확인

- [204] 상기 실시예 10에서 L-히스티딘 생산능 증가 효과가 확인된 KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주의 Hma에 도입된 변이를 확인하기 위하여 Hma 변이체의 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 결정하기 위해 KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주의 gDNA를 주형으로 서열번호 18 및 서열번호 21의 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. 염기서열 분석을 통하여 변이형 hma 오페론의 염기서열 및 HmaF 또는 HmaE의 단백질 서열을 확인하고 서열번호 43 또는 서열번호 44의 아미노산 서열과 비교하였으며, 이를 통해 확인된 변이형 HmaFE의 아미노산 서열의 변이 정보를 표 9에 나타내었다.

[205]

[206] [표9]

KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주 HmaF, HmaE 변이

균주	HmaF (서열번호 43)	HmaE (서열번호 44)
KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718	I72L, I124V	변이 X

- [207] 시퀀스 확인 결과, KCCM80179ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주에 도입된 변이형 HmaFE는 HmaF에 I72L(서열번호 43의 72번째 이소류신(Ile, I)이 류신(Leu, L)으로 변이), I124V(서열번호 43의 124번째 이소류신(Ile, I)이 발린(Val, V)으로 변이) 변이가 도입되어 L-히스티딘 배출능이 증가된 변이형 배출자임을 확인하였다.
- [208] 상기 결과를 통해, *Helcobacillus massiliensis* 유래 변이형 배출자 도입을 통해 야생형 대비 최소저해농도 이상의 L-히스티딘 농도에 대한 내성이 증가될 뿐만 아니라, L-히스티딘 생산능도 크게 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 선별된 *Helcobacillus massiliensis* 유래 변이 단백질이 L-히스티딘을 특이적으로 배출할 수 있는 변이형 L-히스티딘 배출 단백질을 입증한다.

[209]

- [210] 실시예 12. L-히스티딘 생산 균주(CA14-737) 기반 *Helcobacillus massiliensis* 유래 변이 유전자 도입 균주 제작 및 L-히스티딘 생산능 평가

[211]

- [212] 상기 *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질 Hma 변이체의 L-히스티딘 배출능을 다시 한번 확인하기 위하여, 야생형의 코리넨박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래로 L-히스티딘에 의한 피드백 제한 해소 HisG 폴리펩티드 변이 도입, L-히스티딘 생합성 유전자가 강화된 L-히스티딘 생산균주 CA14-737(KCCM 12411P, 대한민국 공개특허 제10-2019-0065984호) 균주에 도입하였다.

- [213] 이를 위해 실시예 2와 10에서 제작된 벡터 3종(pDZΔN2131, pDZΔN2131-PgapA-Hma, pDZΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718)을 각각 CA14-737 균주에 전기천

공법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상의 NCgl2131 유전자가 결손되거나 L-히스티딘 배출유전자로 치환되어 있는 균주 3종을 제작하였으며, 이를 각각 CA14-737ΔN2131, CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma, CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718으로 명명하였다.

[214] 상기 제작된 CA14-737ΔN2131, CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma, CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주의 L-히스티딘 생산능을 확인하기 위하여, 실시예 4에서 수행한 방법으로 배양하고 L-히스티딘 생산량(배지 내 히스티딘 함량)을 측정하여, 그 결과를 다음의 표 10에 나타내었다:

[215]

[216] [표10]

CA14-737 유래 *Helcobacillus massiliensis* 유래 야생형 유전자 및 변이체 도입 균주의 L-히스티딘 생산량

	OD	사용한 포도당 (g/L)	히스티딘 생산량 (g/L)
CA14-737	90.3	100	4.1
CA14-737ΔN2131	90.5	100	4.0
CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma	71.1	100	6.3
CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718	61.5	100	7.3

[217] 표 10에 나타난 바와 같이, *Helcobacillus massiliensis* 유래 유전자가 도입된 CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma 균주는 NCgl2131 결손 균주(CA14-737ΔN2131) 및 모균주인 CA14-737 균주 대비 L-히스티딘 생산량이 54% 증가하였고, 변이형 hma가 도입된 CA14-737ΔN2131-PgapA-Hma(mt)-6718 균주는 78% 증가하였다. 이를 통해 *Helcobacillus massiliensis* 유래 야생형 및 변이형 단백질 모두 L-히스티딘을 특이적으로 배출할 수 있으며, 선별된 변이형 단백질의 경우 야생형 단백질보다 더 높은 배출능을 갖는 L-히스티딘 배출자임을 다시 한번 확인하였다.

[218]

[219] 실시예 13. *Helcobacillus massiliensis* 유래 야생형 유전자 및 변이체 대장균 발현용 벡터 제작

[220] 상기 *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질 Hma 및 변이체의 L-히스티딘 배출능을 다양한 균주에 확인하기 위하여 대장균에서 야생형 Hma 및 Hma 변이체를 각각 발현시킬 수 있는 벡터를 제작하였다. 각각의 유전자는 대장균 발현 벡터인 pCC1BAC(이하, pBAC, Epicenter corp.)에 클로닝 되었으며, 외래 L-히스티딘 배출 유전자 후보들이 대장균 균주 MG1655 유래 yccA 유전자의 프로모터(이하, PyccA, 서열번호 51) 하에서 발현되도록 설계하였다.

- [221] *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질 Hma 및 변이형 유전자 단편을 확보하기 위하여 ATCC13032ΔN2131-PgapA-Hma 및 ATCC13032Δ N2131-PgapA-Hma(mt)-6718의 염색체 DNA를 주형으로 하여 서열번호 52와 서열번호 53의 프라이머 쌍을 이용한 각각 PCR을 수행하여 야생형 및 변이형 hma DNA 단편을 획득하였다. PCR 조건은 변성 96°C, 30초; 어닐링 53°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 2분을 30회 반복하였다. PyccA 단편을 수득하기 위하여, MG1655의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 54과 서열번호 55의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 중합효소로는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같이 하였다: 변성 95°C, 30초; 어닐링 55°C, 30초; 및 중합반응 72°C, 1분을 28회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하여 PyccA 단편을 수득하였다. 상기 수득된 야생형 및 돌연변이 hma 단편과 PyccA 단편, 그리고 EcoRI 제한효소로 절단된 pBAC 벡터를 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 이를 pBAC-PyccA-Hma, pBAC-PyccA-Hma(mt)-6718으로 명명하였다.
- [222]
- [223] 실시예 14. 대장균 유래 L-히스티딘 생산 균주 기반 *Helcobacillus massiliensis* 유래 Hma 야생형 유전자 및 변이체 도입 균주 제작 및 L-히스티딘 생산능 평가
- [224] 대장균 유래 L-히스티딘 생산 균주를 기반으로 *Helcobacillus massiliensis* 유래 단백질 Hma 변이체의 L-히스티딘 배출능을 확인하기 위하여, 실시예 13에서 제작된 벡터 2종과 pBAC 벡터를 기 보고된 유전자형(purR 결손, hisL 결손, hisGr; The directed modification of Escherichia coli MG1655 to obtain histidine-producing mutants; Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, Vol. 49, No. 2, pp. 130-135)을 갖는 CA14-9003e 균주 (MG1655+ hisGr hisL' Δ ΔpurR)에 도입한 균주 3종을 제작하였으며, 이를 각각 CA14-9003e/pBAC, CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma, CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma(mt)-6718으로 명명하였다.
- [225] 상기 제작된 CA14-9003e/pBAC, CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma, CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma(mt)-6718 균주의 L-히스티딘 생산능을 확인하기 위하여, 다음과 같은 방법으로 배양하였다. 균주들을 LB 고체 배지(클로람페니콜 25μg/ml 포함)에서 16시간 동안 배양한 후, LB 액체 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 37 °C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 대장균 생산 배지(Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, Vol. 49, No. 2, pp. 130-135) 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 37 °C에서 48시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 배양에 사용된 배지는 다음과 같다:
- [226] <대장균 생산배지>
- [227] 포도당 4%(w/v), 효모추출액 0.2%(w/v), 황산암모늄 1.6%(w/v), 제2인산칼륨3수염 0.06%(w/v), 황산철7수염 0.0005%(w/v), 황산마그네슘 5수염 0.0005%(w/v), 탄산칼슘, pH 7.2,

[228] 배양 종료 후 HPLC에 의해 L-히스티딘 생산량(배지 내 히스티딘 함량)을 측정하여 그 결과를 다음의 표 11에 나타내었다

[229]

[230] [표11]

CA14-9003e 유래 *Helcobacillus massiliensis* 유래 야생형 및 변이체 도입 균주의 L-히스티딘 생산량

	OD	사용한 포도당 (g/L)	히스티딘 생산량 (g/L)
CA14-9003e/pBAC	24.5	40	2.9
CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma	17.1	40	3.7
CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma(mt)-6718	14.5	40	4.8

[231] 표 11에 나타난 바와 같이, 변이형 Hma가 도입된 CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma(mt)-6718 균주는 야생형 Hma 도입주 CA14-9003e/pBAC-PyccA-Hma 균주 대비 L-히스티딘 생산능이 30% 증가됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, *Helcobacillus massiliensis* 유래 L-히스티딘 배출자 변이체를 코리네박테리움 속 균주 이외의 미생물에 도입시에도 세포 밖으로의 L-히스티딘 배출능이 크게 증가됨을 확인하였다.

[232]

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

청구범위

- [청구항 1] (1) 서열번호 43의 아미노산 서열의 72번째 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나,
(2) 서열번호 43의 아미노산 서열의 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나, 또는
(3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된,
변이형 L-히스티딘 배출 단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
(1) 서열번호 43의 아미노산 서열의 72번째 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산이 류신, 글리신, 프롤린, 알라닌, 발린 또는 메티오닌으로 치환되거나,
(2) 서열번호 43의 아미노산 서열의 124번째 잔기에 상응하는 아미노산이 발린, 글리신, 프롤린, 알라닌, 류신 또는 메티오닌으로 치환되거나, 또는,
(3) 상기 (1) 및 (2)가 모두 치환된, 단백질.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 56의 아미노산 서열과 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 것인, 단백질.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 미생물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 L-히스티딘 생산능을 갖는 것인, 미생물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 또는 에스케리키아 속인, 미생물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 또는 에스케리키아 콜라이인, 미생물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단백질,
상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는
상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 미생물을 포함하는, L-히스티딘 생산용 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-히스티딘 생산 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 배양하는 단계 이후에, 배양된 미생물 또는 배지로부터 L-히스티딘을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, L-히스티딘 생산 방법.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/195(2006.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12P 13/24(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/195(2006.01); C07K 14/245(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/70(2006.01);
C12N 15/77(2006.01); C12P 13/04(2006.01)

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: L-히스티딘(L-histidine), 배출(export), 단백질(protein), 아미노산 서열(amino acid sequence), 치환(substitution), 변이(mutation), 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide), 미생물(microorganism), 생산(production), 배양(culture), 매지(media), 회수(collection)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI. Genbank accession no. RUP86529.1 (31 December 2018). See entire document.	1-11
A	KR 10-2019-0065984 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 12 June 2019 (2019-06-12) See entire document.	1-11
A	KR 10-2022-0081824 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 16 June 2022 (2022-06-16) See entire document.	1-11
A	KR 10-2020-0130567 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 19 November 2020 (2020-11-19) See entire document.	1-11
A	KR 10-2006-0084446 A (AJINOMOTO CO., INC.) 24 July 2006 (2006-07-24) See entire document.	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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

20 September 2023

Date of mailing of the international search report

20 September 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008656

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1968317 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 11 April 2019 (2019-04-11) See entire document.	1-11
A	KR 10-2183209 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 26 November 2020 (2020-11-26) See entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008656

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/008656

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0065984	A	12 June 2019	CN	114502735	A	13 May 2022
				EP	3954776	A1	16 February 2022
				JP	2022-529831	A	24 June 2022
				US	2022-0205003	A1	30 June 2022
				WO	2020-218736	A1	29 October 2020
KR	10-2022-0081824	A	16 June 2022	CN	116547297	A	04 August 2023
				WO	2022-124671	A1	16 June 2022
KR	10-2020-0130567	A	19 November 2020	CN	114269931	A	01 April 2022
				EP	3926048	A1	22 December 2021
				JP	2022-529246	A	20 June 2022
				US	2022-0228179	A1	21 July 2022
				WO	2020-226341	A1	12 November 2020
KR	10-2006-0084446	A	24 July 2006	CN	101243177	A	13 August 2008
				CN	101243177	B	05 December 2012
				CN	103146593	A	12 June 2013
				CN	103146593	B	15 July 2015
				EP	1664318	A2	07 June 2006
				EP	1664318	B1	23 September 2009
				JP	2005-237379	A	08 September 2005
				JP	4665537	B2	06 April 2011
				US	2006-0019355	A1	26 January 2006
				US	7629142	B2	08 December 2009
				US	8383363	B1	26 February 2013
				WO	2005-073390	A2	11 August 2005
				WO	2005-073390	A3	24 April 2008
KR	10-1968317	B1	11 April 2019	CN	110418843	A	05 November 2019
				CN	110418843	B	20 April 2021
				EP	3561061	A1	30 October 2019
				EP	3561061	B1	09 June 2021
				JP	2021-509808	A	08 April 2021
				JP	7098731	B2	11 July 2022
				US	10995378	B2	04 May 2021
				US	2020-0063219	A1	27 February 2020
				WO	2019-164348	A1	29 August 2019
KR	10-2183209	B1	26 November 2020	CN	114729012	A	08 July 2022
				EP	3957646	A1	23 February 2022
				JP	2022-534078	A	27 July 2022
				JP	7295276	B2	20 June 2023
				US	2023-0012923	A1	19 January 2023
				WO	2021-049866	A1	18 March 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/195(2006.01)i; C12N 15/77(2006.01)i; C12P 13/24(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/195(2006.01); C07K 14/245(2006.01); C07K 14/34(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12P 13/04(2006.01) 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: L-히스티딘(L-histidine), 배출(export), 단백질(protein), 아미노산 서열(amino acid sequence), 치환(substitution), 변이(mutation), 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide), 미생물(microorganism), 생산(production), 배양(culture), 배지(media), 회수(collection)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, Genbank accession no. RUP86529.1 (2018.12.31) 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2019-0065984 A (씨제이제일제당(주)) 2019.06.12 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2022-0081824 A (씨제이제일제당(주)) 2022.06.16 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2020-0130567 A (씨제이제일제당(주)) 2020.11.19 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2006-0084446 A (아지노모토 가부시카가이사) 2006.07.24 전체 문헌	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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년09월20일 (20.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월20일 (20.09.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1968317 B1 (씨제이제일제당 주식회사) 2019.04.11 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2183209 B1 (씨제이제일제당 주식회사) 2020.11.26 전체 문헌	1-11

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0065984 A	2019/06/12	CN 114502735 A	2022/05/13
		EP 3954776 A1	2022/02/16
		JP 2022-529831 A	2022/06/24
		US 2022-0205003 A1	2022/06/30
		WO 2020-218736 A1	2020/10/29
KR 10-2022-0081824 A	2022/06/16	CN 116547297 A	2023/08/04
		WO 2022-124671 A1	2022/06/16
KR 10-2020-0130567 A	2020/11/19	CN 114269931 A	2022/04/01
		EP 3926048 A1	2021/12/22
		JP 2022-529246 A	2022/06/20
		US 2022-0228179 A1	2022/07/21
		WO 2020-226341 A1	2020/11/12
KR 10-2006-0084446 A	2006/07/24	CN 101243177 A	2008/08/13
		CN 101243177 B	2012/12/05
		CN 103146593 A	2013/06/12
		CN 103146593 B	2015/07/15
		EP 1664318 A2	2006/06/07
		EP 1664318 B1	2009/09/23
		JP 2005-237379 A	2005/09/08
		JP 4665537 B2	2011/04/06
		US 2006-0019355 A1	2006/01/26
		US 7629142 B2	2009/12/08
		US 8383363 B1	2013/02/26
		WO 2005-073390 A2	2005/08/11
		WO 2005-073390 A3	2008/04/24
KR 10-1968317 B1	2019/04/11	CN 110418843 A	2019/11/05
		CN 110418843 B	2021/04/20
		EP 3561061 A1	2019/10/30
		EP 3561061 B1	2021/06/09
		JP 2021-509808 A	2021/04/08
		JP 7098731 B2	2022/07/11
		US 10995378 B2	2021/05/04
		US 2020-0063219 A1	2020/02/27
		WO 2019-164348 A1	2019/08/29
KR 10-2183209 B1	2020/11/26	CN 114729012 A	2022/07/08
		EP 3957646 A1	2022/02/23
		JP 2022-534078 A	2022/07/27
		JP 7295276 B2	2023/06/20
		US 2023-0012923 A1	2023/01/19
		WO 2021-049866 A1	2021/03/18