

명세서

발명의 명칭: 신규 카르노신 합성 효소 및 이를 이용한 카르노신 생산 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드; 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 미생물, 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 카르노신 생산용 조성물; 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 및 미생물 중 어느 하나 이상을 이용한 카르노신 생산 방법; 및 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드 및 미생물의 카르노신 생산 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 카르노신은 근육과 뇌 조직에 높은 농도로 존재하며, 생리활성 펩타이드로서 항산화 효과 및 근피로 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [4] 카르노신 생산은 효소전환을 통해 이루어질 수 있으나(US 4359416 A) 다량의 기질 및 ATP가 필요하기 때문에 원가적인 측면에서 공업적으로 대량 제조가 쉽지 않은 문제점이 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 출원에서 해결하고자 하는 과제는 본 출원은 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드; 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 미생물, 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 카르노신 생산용 조성물; 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 및 미생물 중 어느 하나 이상을 이용한 카르노신 생산 방법; 및 상기 카

르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드 및 미생물의 카르노신 생산 용도를 제공하는 것이다.

[7]

과제 해결 수단

[8] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

[9] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[13] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 제공하는 것이다.

[14] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드; 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 이의 배양물; 상기 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 카르노신 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 단계를 포함하는 카르노신 생산 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 상기 변이체 폴리펩티드, 및 상기 미생물의 카르노신 생산 용도를 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 출원의 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 미생물, 조성물, 및/또는 방법을 이용하여 효율적인 카르노신 생산이 가능하다.

[19]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[21] 또한, 당해 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 통하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[22] 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표기되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[23]

[24] 본 출원의 일 양태는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 제공한다.

[25] 본 출원에서 용어 "카르노신 합성효소(carnosine synthase)"는 베타 알라닌 및 L-히스티딘을 기질로 하여 카르노신을 생성하는 반응을 촉매할 수 있는 효소를 의미하며, 리가아제 패밀리에 속하는 것이므로 L-리가아제(L-ligase) 및 LAL과 혼용될 수 있다. 카르노신 합성효소의 구체적인 예로, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 효소를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[26] 본 출원에서 용어 "카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드"는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다.

[27] 일 구현 예로, 본 출원에서 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 카르노신 합성효소 활성을 갖는 한, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 이와 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있고 상기와 같은 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 상기 서열번호 2가 카르노신 합성효소의 활성을 갖는지 여부는 알려진 바 없으나, 서열번호 2의 아미노산 서열 자체는 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank 또는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에서 얻을 수 있다. 일 예로, 상기 카르노신 합성효소 활성을 갖는

폴리펩티드는 스트렙토코커스 속 또는 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [28] 또한, 본 출원에서 카르노신 합성효소의 일 예로 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 정의하였으나, 상기와 같은 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 예를 들어, 상기 서열번호 2의 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 상기 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [29] 또한, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 카르노신 합성효소 단백질은 서열번호 11의 서열 또는 서열번호 11의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 11의 서열 또는 서열번호 11의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [30]
- [31] 본 출원의 다른 일 양태는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된, 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 제공한다.
- [32] 본 출원에서 용어 "카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드"는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산 중 어느 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된, 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 의미한다. 본 출원에서 상기 "카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드"는 "변이체 폴리펩티드"와 혼용될 수 있다.
- [33]
- [34] 일 구현 예로, 본 출원에서 변이 대상이 되는 기준(reference) 카르노신 합성효소는 전술한 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드와 같다.
- [35]
- [36] 본 출원에서 용어 "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열

(the recited sequence)와 상이하나, 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다.

- [37] 상기 변이체는 일반적으로 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 폴리펩티드 또는 단백질의 특성을 평가하여 동정(identify)될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 변이 전 단백질에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이형 폴리펩티드, 변이된 단백질, 변이 및 변이체 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified polypeptide, modified protein, mutant, mutein, divergent 등)가 혼용되어 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다.
- [38] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 통상적으로, 보존적 치환은 생성된 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다. 또한, 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다.
- [39] 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파테이트를 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다. 또한, 아미노산은 전하를 띠는(electrically charged) 결사슬을 갖는 아미노산과 전하를 띠지 않는(uncharged) 결사슬을 갖는 아미노산으로 분류할 수 있으며, 전하를 띠는 결사슬을 갖는 아미노산은 아스르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌, 히스티딘을 포함하고, 전하를 띠지 않는 결사슬을 갖는 아미노산은 다시 비극성(nonpolar) 아미노산 또는 극성 아미노산(polar)으로 분류할 수 있으며, 비극성 아미노산은 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 극성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함하는 것으로 분류할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [40] 또한, 상기 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및 상기 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백

질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널 (또는 리더) 서열과 컨쥬게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨쥬게이트 될 수 있다.

[41]

[42] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 것일 수 있다.

[43] 본 출원에서, '다른 아미노산으로 치환'은 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 한편, 본 출원에서 '특정 아미노산이 치환되었다'고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명하다.

[44] 본 출원의 "N번 위치"는 N번 위치 및 N번 위치와 상응(corresponding)하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 아미노산 서열에 개시된 성숙 폴리펩티드(mature polypeptide)에서 임의의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 특정 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열일 수 있다.

[45] 본 출원에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참조(reference) 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.

[46] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 2와 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 2의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 쿼리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 아미노산의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.

[47] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘(Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needleman 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 적절히 사용할 수 있다.

[48]

[49] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 서열번호 2의 아미노산 서열과 60% 이상 및 100% 미

만의 서열 상동성, 구체적으로는 80% 이상 및 100% 미만의 서열 상동성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [50] 전술한 구현 예 중 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 상기 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열에서, 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기와 같은 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 변이체 폴리펩티드에 상응하는 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 본 출원의 변이체 폴리펩티드 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [51]
- [52] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산이 글루탐산으로 치환되고, 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 라이신으로 치환된 것일 수 있다.
- [53] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산인 아스파라긴이 글루탐산으로 치환되고, 378번째 위치에 상응하는 아미노산인 히스티딘이 라이신으로 치환된 것일 수 있다.
- [54] 전술한 구현 예 중 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 상기 서열번호 2의 아미노산 서열에서 108번째 위치에 상응하는 아미노산이 글루탐산으로 치환되고, 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 라이신으로 치환되어 고정되고, 서열번호 2와 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [55] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 8과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다.
- [56] 또한, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 상기 108번째 및 378번째 위치의 아미노산 이외의 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 변이체 폴리펩티드와 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 치

환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

- [57] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드는 변이 전 폴리펩티드에 비해 카르노신 합성효소의 활성이 강화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [58]
- [59] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [60] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [61] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [62] 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드에 상응하는 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [63] 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및 변이체 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy) 또는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 발현하고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 변이체도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [64] 일 구현 예로, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 서열과 상동성 또는 동일성이 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 염기 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 핵산 서열로 이루어지거나 필수적으로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [65] 일 예로, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11 또는 이의 축퇴성 서열(degenerated sequence)일 수 있다.
- [66] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 서열과 상동성 또는 동일성이 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 염기 서열에서, 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산을 코딩하는 코돈이 다른 아미노산(예를 들어, 글루탐산 또는 라이신)을 코딩하는 코돈으로 치환된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 일 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11의 서열과 상동성 또는 동일성이 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 염기 서열에서, 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산을 코딩하는 코돈은 글루탐산을 코딩하는 코돈 및/또는 378번째 위치에 상응하는 아미노산을 코딩하는 코돈은 라이신을 코딩하는 코돈일 수 있다.
- [68] 다른 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 17 또는 이의 축퇴성 서열(degenerated sequence)일 수 있다.
- [69] 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 17, 또는 이와 상동성 또는 동일성이 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상, 및 100% 미만인 핵산 서열을 가지거나 포함하거나, 상기 핵산 서열로 이루어지거나 필수적으로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [70]
- [71] 또한, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 본 출원의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [72] 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상

동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

- [73] 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, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열 뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [74] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [75] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [76] 본 출원에서 용어, "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [77] 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 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [78] 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 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387(1984)), BLASTP,

BLASTN, FASTA(Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [79] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math(1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al.(1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 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, 본 출원에서 사용된 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)을 나타낸다.
- [80]
- [81] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [82] 상기 폴리뉴클레오티드는 다른 양태에서 설명한 바와 같다.
- [83] 상기 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 미생물에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [84] 본 출원에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 포함하는 DNA 제조물을 포함할 수 있다. 상기 발현조절영역은 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 미생물 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.
- [85] 본 출원에서 사용되는 벡터는 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 있

다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHIII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pDZ계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ(대한민국 등록특허 제 10-0924065호 및 국제 공개특허 제 2008-033001호), pDZTn (한국 등록특허 제 10-1126041호), pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

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

[87] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 미생물 혹은 미생물 내에 도입하여 미생물 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 미생물 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 미생물의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 미생물 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로도 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 미생물에 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 미생물에 도입되어 미생물에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[88] 본 출원의 벡터를 형질전환 시키는 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), 폴리에틸렌글리

콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [89] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [90]
- [91] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 제공한다.
- [92] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 제공한다.
- [93] 상기 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 벡터는 다른 양태에서 설명한 바와 같다.
- [94] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"은 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 카르노신의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다. 본 출원에서 "균주" 및 "미생물"은 동일한 의미로서 제한 없이 혼용되어 사용될 수 있다.
- [95] 본 출원의 미생물은 내재적으로 카르노신 생산능이 없는 미생물이 카르노신 생산능을 가지도록, 또는 카르노신 생산능을 가지는 미생물의 카르노신 생산능이 더 강화되도록 아스파르트산을 베타알라닌으로 전환하는데 필요한 아스파르트산 1- 디카복실라제(aspartate 1-decarboxylase) 단백질을 코딩하는 *panD* 유전자가 미생물 내로 도입되어 이들 단백질 활성을 나타내거나 또는 활성이 강화된 미생물일 수 있다. 상기 아스파르트산 1-디카복실라제 단백질은 이와 동일 또는 유사한 활성을 나타내는 단백질이라면 이에 제한되지 않는다. 일 구체 예로, 상기 아스파르트산 1-디카복실라제 단백질은 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지거나 포함하는 것일 수 있으나, 상기 아미노산 서열과 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지면서 상기 아스파르트산 1-디카복실라제에 상응하는 활성을 나타내는 아미노산 서열로 이루어지거나 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 상동성 또는 동일성을 가지면서 상기 아스파르트산 1-디카복실라제에 상응하는 활성을 나타낸다면 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 단백질도 상기 아스파르트산 1-디카복실라제에 포함됨은 자명하다. 또한 일 구체 예로, 상기 아스파르트산 1-디카복실라제 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 18의 서열로 이루어지거나 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴

클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 미생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 18의 염기서열 또는 서열번호 18의 서열과 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[96]

[97] 일 구현 예로, 본 출원의 미생물은 엔테로박터(*Enterbacter*) 속, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 프로비덴시아(*Providencia*) 속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 또는 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속에 속하는 미생물 일 수 있다. 보다 구체적으로는 코리네박테리움 속 미생물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[98] 전술한 구현 예의 구현 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루나(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있다. 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[99]

[100] 본 출원 미생물의 일 구현 예로, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물은 AroP(Aromatic amino acid transport protein) 단백질의 활성이 추가로 강화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[101] 전술한 구현 예의 일 구현 예로, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물에서 AroP 단백질의 활성이 추가로 강화됨으로써 카르노신의 생산능이 증가되는 것일 수 있다.

[102] 본 출원 미생물의 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이

상을 포함하는, 미생물은 AroP 단백질의 활성이 추가로 강화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [103] 전술한 구현 예의 일 구현 예로, 본 출원의 변이체 폴리펩티드; 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물에서 AroP 단백질의 활성이 추가로 강화됨으로써 카르노신의 생산능이 증가되는 것일 수 있다.
- [104] 본 출원에서 용어 "AroP 단백질"은 방향족 아미노산 수송 단백질을 의미하고, "AroP"와 혼용될 수 있다. 상기 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함할 수 있다. 또한, 상기 AroP는 *aroP* 유전자에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [105] 일 구현 예로, 본 출원의 AroP 단백질은 서열번호 19의 아미노산 서열 또는 이와 60% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 아미노산 서열은 서열번호 19 또는 이와 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 상기 서열번호 19는 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank 또는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 상기 강화 대상이 되는 AroP 단백질은 코리네박테리움 속 또는 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [106] 또한, 본 출원에서 AroP 단백질의 일 예로 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 정의하였으나, 상기와 같은 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 AroP 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 예를 들어, 상기 서열번호 19의 아미노산 서열 앞뒤에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재적 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 상기 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [107] 또한, 상기 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 AroP 단백질은 서열번호 20의 서열 또는 이와 상동성 또는 동일성이 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 상기 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [108]
- [109] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드 또는 단백질 활성의 "강화"는, 폴리펩티드 또는 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활

성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 상기 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다.

- [110] 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드 또는 단백질의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 폴리펩티드 또는 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.
- [111] 상기 강화는 외래의 폴리펩티드 또는 단백질을 도입하거나, 외래 및/또는 내재적 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 강화 및/또는 농도(발현량)를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 정도, 발현량 또는 해당 단백질로부터 배출되는 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.
- [112] 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩티드 또는 단백질의 활성을 변형 전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. *Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology*. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. *Molecular Cloning* 2012 등).
- [113] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드 또는 단백질의 활성 강화는
- [114] 1) 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [115] 2) 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;
- [116] 3) 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [117] 4) 폴리펩티드 또는 단백질 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열의 변형;
- [118] 5) 폴리펩티드 또는 단백질 활성이 강화되도록 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 단백질의 활성이 강화되도록 변형된 단백질을 코딩하도록 상기 단백질 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [119] 6) 폴리펩티드 또는 단백질의 활성을 나타내는 외래 단백질 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [120] 7) 폴리펩티드 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;

- [121] 8) 폴리펩티드 또는 단백질의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [122] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [123] 상기에서 유전자의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입되는 것일 수 있다. 또는, 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포의 염색체 내에 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [124] 다음으로, 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현 조절서열을 변형하는 것은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현 조절서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현 조절서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [125] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 프로모터가 연결될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 공지된 강력한 프로모터의 예에는 CJ1 내지 CJ7 프로모터(각각 cj1 내지 cj7과 혼용 가능; 미국등록특허 US 7662943 B2), pyk 프로모터, lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(미국등록특허 US 10584338 B2), O2 프로모터(미국등록특허 US 10273491 B2), tkt 프로모터, 및 yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [126] 아울러, 염색체상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [127]
- [128] 일 구현 예로, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드는 카르노신 합성효소의 활성을 갖는 비변형 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2)의 활성이 강화되도록 이의 아미노산 서열을 변형시킴으로써, 변이체 폴리펩티드의 카르노신 합성효소 활성이 강화된 것일 수 있다. 본 출원에서 상기 카르노신

합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및 변이체 폴리펩티드는 추가로 강화(예를 들어, 이의 유전자 발현조절영역 서열 교체)될 수 있다.

- [129] 다른 구현 예로, 본 출원의 AroP 단백질의 활성은 상기 AroP 단백질을 코딩하는 염색체 상의 유전자 발현조절영역 중 하나인 프로모터를 이의 활성이 강력한 서열(예를 들어, *aroP*의 발현조절영역 내의 야생형 프로모터를 *pyk* 또는 *CJ7* 프로모터로 교체)로 교체된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [130]
- [131] 일 구현 예로, 본 출원의 미생물은 카르노신을 생산하는 것일 수 있다.
- [132] 본 출원에서 용어 "카르노신"은 베타 알라닌과 L-히스티딘으로 이루어진 다이펩타이드를 의미한다.
- [133] 본 출원에서 용어, "카르노신을 생산하는 미생물"은 카르노신을 생물체 내에서 생산할 수 있는 원핵 또는 진핵 미생물로서, 카르노신 생산능이 없는 모균주에 카르노신 생산능이 부여된 미생물, 또는 내재적으로 카르노신 생산능을 갖는 미생물을 모두 포함할 수 있다. 카르노신 생산능은 종 개량에 의해 부여되거나 증진될 수 있다.
- [134] 일 예로, 본 출원의 미생물은 자연적으로 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드, 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드, 및/또는 카르노신 생산능을 가지고 있는 미생물; 또는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드 및/또는 카르노신 생산능이 없는 모균주에 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(또는 이를 포함하는 벡터), 본 출원의 변이체 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(또는 이를 포함하는 벡터)가 도입되거나 및/또는 카르노신 생산능이 부여된 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 출원의 미생물은 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 염색체 상의 유전자가 돌연변이되어 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 미생물, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드 서열을 포함하는 미생물, 및 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 도입시켜 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 변이체 폴리펩티드를 포함하게 된 미생물을 모두 포함할 수 있다.
- [135] 다른 예로, 본 출원의 미생물은 자연적으로 활성이 강화된 AroP 단백질을 가지고 있는 미생물; 야생형 AroP를 가지고 있는 미생물; 또는 AroP 단백질이 없는 모균주에서 AroP가 강화된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 출원의 미생물은 *aroP* 유전자의 조절영역이 변이되어 AroP가 강화된 미생물 및 *aroP* 유전자를 포함하는 벡터를 도입시켜 본 출원의 AroP가 강화된 미생물을 모두 포함할 수 있다.
- [136] 본 출원에서 용어, "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 야생형 균주 또는 천연형 균주

자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 비변형 미생물은 본 명세서에 기재된 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드 및 변이체 폴리펩티드가 도입되지 않거나 도입되기 전의 균주를 의미할 수 있다. 상기 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.

- [137] 일 예로, 상기 카르노신 생산능이 증가된 미생물은 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 카르노신 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로 30% 이상 증가된 것일 수 있으나, 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 상기 카르노신 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물에 비하여, 카르노신 생산능이 약 1.01배 이상, 구체적으로 약 1.30배 이상 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 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.
- [138] 다른 예로, 본 출원의 카르노신 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인 비변형 미생물은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주인 ATCC13032 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [139] 일 구현 예로, 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물은 서열번호 1 및 3 내지 7 중 어느 하나의 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이들의 조합을 포함하는 미생물에 비해 카르노신 생산능이 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 서열번호 10 및 12 내지 16의 폴리뉴클레오티드는 각각 상기 서열번호 1 및 3 내지 7의 폴리펩티드를 코딩하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 1 및 3 내지 7의 폴리펩티드는 각각 서열번호 10 및 12 내지 16의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [140] 일 구현 예로, 본 출원의 변이형 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물은 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이들의 조합을 포함하는 미생물에 비해 카르노신 생산능이 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [141] 일 구현 예로, 본 출원에서 AroP 단백질의 활성이 추가로 강화된 미생물은 AroP 단백질의 활성이 강화되지 않은 미생물에 비해 카르노신 생산능이 증가된 것일 수 있다.
- [142]
- [143] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 카르노신 활성을 갖는 폴리펩티드; 본 출원의 카르노신 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드,

및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 이의 배양물; 변이체 폴리펩티드; 상기 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물; 및 상기 미생물의 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 카르노신 생산용 조성물을 제공한다.

- [144] 상기 카르노신 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 미생물, 및 카르노신은 다른 양태에서 설명한 바와 같다.
- [145] 본 출원의 조성물은 카르노신 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [146]
- [147] 하나의 구체예로, 본 출원의 조성물에 존재하는 각 구성요소는 미생물학적으로 유효한 양, 또는 생산용 조성물에서 적절하게 존재할 수 있는 양으로 포함할 수 있다.
- [148] 본 출원에서 상기 배양물은 배양물의 건조물, 회석물, 농축물, 배양 여액, 발효물 등 배양물을 포함한 것이라면 어느 것이든 포함될 수 있다.
- [149]
- [150] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 카르노신 생산 방법을 제공한다.
- [151] 상기 미생물 및 카르노신은 다른 양태에서 설명한 바와 같다.
- [152] 본 출원에서, 용어 "배양"은 본 출원의 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [153] 본 출원에서 용어, "배지"는 본 출원의 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다. 예를 들어, 코리네박테리움 속 균주에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아 볼 수 있다.
- [154] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알

코울, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산; 글리세롤, 프로판디올 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [155] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [156] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [157] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [158] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45°C 구체적으로는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [159] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 카르노신은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [160]
- [161] 하나의 구체예에서, 본 출원의 카르노신 생산방법은, 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 균주를 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.

- [162] 하나의 구체예에서, 본 출원의 카르노신 생산방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 본 출원의 미생물로부터 카르노신을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [163] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 L-카르노신을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 카르노신을 회수할 수 있다.
- [164] 또한, 본 출원의 카르노신 생산방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 카르노신 생산방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [165]
- [166] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드; 변이체 폴리펩티드; 및 본 출원의 미생물의 카르노신 생산 용도를 제공한다.
- [167] 상기 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 변이체 폴리펩티드, 미생물, 및 카르노신은 다른 양태에서 설명한 바와 같다.
- [168]

발명의 실시를 위한 형태

- [169] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 바람직한 실시양태에 불과한 것이며 따라서, 본 출원의 권리범위를 이에 한정하는 것으로 의도되지는 않는다. 한편, 본 명세서에 기재되지 않은 기술적인 사항들은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 기술 분야에서 숙련된 통상의 기술자이면 충분히 이해하고 용이하게 실시할 수 있다.
- [170]
- [171] **실시예 1. 신규 카르노신 합성 효소 탐색 및 선별**
- [172] 바실러스 유래 카르노신 합성효소의 아미노산 서열을 query 서열로 하고, NCBI 와 Kegg database를 기반으로 PSI-BLAST 탐색하였다. 그 결과, 카르노신을 합성할 수 있는 효소로 고려되는 20종의 후보 유전자들과 상기 유전자를 보유한 생물

을 선정하였다. 그 중 query 서열과의 유사성을 고려하여 아래 표 1과 같이 7종의 미생물 및 이들 유래의 효소를 선정하였다.

[173]

[174] [표1]

순서	미생물	단백질 등록 번호
1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	CAB15798.1
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CVN04298.1
3	<i>Alkalihalobacillus halodurans</i>	MBV7318856.1
4	<i>Priestia megaterium</i>	WP_116516826.1
5	<i>Pseudomonas syringae</i>	BAJ15424.1
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	AAZ37741.1
7	<i>Bacillus pumilus</i>	GM828960.1

[175]

[176] 실시예 2. 다양한 카르노신 합성 효소가 도입된 발현 벡터 제작

[177] 상기 실시예 1에서 선정한 7종(바실러스 서브틸리스, 스트렙토코커스 뉴모니아, 알칼리할로바실러스 할로두란스, 프리스티아 메가테리움, 슈도모나스 시링가에, 슈도모나스 시링가에 pv. 파세올리콜라, 및 바실러스 푸밀러스) 유래의 카르노신 합성 효소는 각각 서열번호 1 내지 서열번호 7의 아미노산 서열을 가진다. 상기 효소들을 코딩하는 유전자 및 주변 염기서열에 대한 정보는 미국 국립보건원 진뱅크 (NIH GenBank)로부터 확보하였다 (순서대로 각각 등록번호 CAB15798.1, CVN04298.1, MBV7318856.1, WP_116516826.1, BAJ15424.1, AAZ37741.1, 및 GM828960.1).

[178] 이후, 확보된 서열들에 근거하여 유전자 합성을 통해 얻은 것들을 주형으로 PCR을 수행함으로써, 벡터 제작을 위한 유전자 단편들을 얻었다.

[179] 이 때, 중합효소는 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였으며, PCR 증폭 조건으로 95°C에서 3분간 변성 후, 95°C 20초 변성; 56°C 40초 어닐링; 및 72°C 2분 중합을 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다.

[180] 바실러스 서브틸리스 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열번호 21 및 22의 프라이머를 제작하고, 상기와 같은 중합효소 및 PCR 증폭 조건으로 PCR을 수행한 결과 1,419bp의 유전자 단편을 수득하였다.

[181] 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열번호 23 및 24의 프라이머를 제작하고, 동일하게 PCR을 수행한 결과 1,422bp의 유전자 단편을 수득하였다.

[182] 알칼리할로바실러스 할로두란스 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열번호 25 및 26의 프라이머를 제작하고, PCR을 수행한 결과 1,419bp의 유전자 단편을 수득하였다.

- [183] 프리스티아 메가테리움 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열 번호 27 및 28의 프라이머를 제작하고, 동일하게 PCR을 수행한 결과 1,422bp의 유전자 단편을 획득하였다.
- [184] 슈도모나스 시링가에 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열번호 29 및 30의 프라이머를 제작하고, 동일하게 PCR을 수행한 결과 1,260bp의 유전자 단편을 획득하였다.
- [185] 슈도모나스 시링가에 pv. 파세올리콜라 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열번호 31 및 32의 프라이머를 제작하고, 동일하게 PCR을 수행한 결과 1,245bp의 유전자 단편을 획득하였다.
- [186] 바실러스 푸밀러스 유래의 유전자를 증폭하기 위해 하기 표 2와 같은 서열번호 33 및 34의 프라이머를 제작하고, 동일하게 PCR을 수행한 결과 1,434bp의 유전자 단편을 획득하였다.

[187]

[188] [표2]

서열번호	명칭	서열
21	BsLAL_F	GAGGAGATCAAAACAATGGAGCGTAAAACGGT GCTG
22	BsLAL_R	CGGTGGCGGCCGCTCTAGATCACACCGGGAGGA CATATTTC
23	SpLAL_F	GAGGAGATCAAAACAATGAGCAAGAAGACTGT TCTTG
24	SpLAL_R	CGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTAGCCCTTCAC AAGCTCGT
25	AhLAL_F	GAGGAGATCAAAACAATGGAACGTAAGACTGT ACTGG
26	AhLAL_R	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTAGACCGGCAGA ACGTACT
27	PmLAL_F	GAGGAGATCAAAACAATGAAGCGTAAGACTGTT CTGG
28	PmLAL_R	CGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTACGTAGTCAC AGGCACGC
29	PsLAL_F	GAGGAGATCAAAACAATGACGCAGGCAAAAGA GAATA
30	PsLAL_R	CGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTACTGGACGGA AAAGAGCC

31	PspLAL_F	GAGATCAAAACAATGAAAAAGATTATTCTCATT GAAACC
32	PspLAL_R	CGGTGGCGGCCGCTCTAGATTAAAGAGGTTCTG ACGAATCG
33	BpLAL_F	GAGGAGATCAAAACAATGGTCCTTAGCCTGTCTG AAAAAG
34	BpLAL_R	CGGTGGCGGCCGCTCTAGATCAACCTTTCACCA ACTCATCCATAAG
35	Po2_F	CCTGCAGCCCCGGGGGATCCCAATAATCGTGAAT TTTGGCAGC
36	Po2_R	GGCGGCCGCTCTAGATGTTTTGATCTCCTCCAAT AATCTATG

[189]

[190] 또한, 프로모터를 확보하기 위하여, o2 프로모터(US 10273491 B2)를 주형으로 하고 상기 표 2와 같은 서열번호 35 및 36의 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하였다.

[191] 상기 증폭된 o2 프로모터 부위와 7종 미생물 유래의 유전자 단편들, 그리고 XbaI 제한효소로 절단된 벡터 pCES208 ("Construction of heat-inducible expression vector of *Corynebacterium glutamicum* and *C. ammoniagenes*: fusion of lambda operator with promoters isolated from *C. ammoniagenes*." *Journal of microbiology and biotechnology* 18.4 (2008): 639-647.)를 인-퓨전 클로닝 키트(In-fusion Cloning Kit)를 이용하여 연결함으로써 각각의 유전자 발현 벡터를 획득하였다.

[192] 이에, 바실러스 서브틸리스 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-BsLAL", 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-SpLAL", 알칼리할로바실러스 할로두란스 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-AhLAL" 프리스티아 메가테리움 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-PmLAL" 슈도모나스 시링가에 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-PsLAL", 슈도모나스 시링가에 pv. 파세올리콜라 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-PspLAL" 및 바실러스 푸밀리스 유래의 유전자가 포함된 벡터를 "pCES208-Po2-BpLAL"로 명명하였다.

[193]

[194] 실시예 3. 베타 알라닌과 L-히스티딘을 생산하는 코리네박테리움 속 균주 제작

[195] 상기 효소들의 카르노신 합성 활성을 평가하기 위해 베타 알라닌과 L-히스티딘을 생산하는 코리네박테리움 속 균주를 제작하고자 하였다. 이에, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주 내에서 생산된 아스파르트산을 베타알라닌으로 전환하는데

필요한 유전자인 *panD*를 상기 균주 게놈 DNA에 삽입하기 위한 벡터를 제작하였다.

[196] *panD* 유전자를 증폭시키기 위해, 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하여 하기 표 3과 같은 서열번호 37 및 서열번호 38의 프라이머를 제작하였고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR을 수행한 결과 411bp의 유전자 단편을 수득하였다.

[197] 코리네박테리움 글루타미쿰 유래의 o2 프로모터를 확보하기 위하여, 코리네박테리움 글루타미쿰 게놈 DNA를 주형으로 하여 하기 표 3과 같은 서열번호 39 및 40의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[198]

[199] [표3]

서열번호	명칭	서열
37	panD_F	GGAGGAGATCAAAACAATGCTGCGCACCATCC TCG
38	panD_R	CGTAGCCTTGAATCCACTAAATGCTTCTCGA CGTCAAAAG
39	Po2panD_F	GGCTCCCGCGGTGAACAATAATCGTGAATTTT GGCAGC
40	Po2panD_R	GGATGGTGCGCAGCATTGTTTTGATCTCCTCCA ATAATC
41	check_Po2-panD_F	CCTGGGCTAGCGGTGTAG
42	check_Po2-panD_R	CTGCTCTTAAATCCGCGG

[200]

[201] 증폭된 o2 프로모터 부위와 *panD* 유전자 단편, 그리고 *SpeI* 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDZTn (한국 등록특허 제10-1126041호)을 김슨 어셈블리 (DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, 획득된 플라스미드는 pDZTn-Po2-panD로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합한 후 50°C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[202] 제작된 pDZTn-Po2-panD 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주에 전기천공법(Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 트랜스포존 유전자의 사

이에 1 카피의 Po2-panD 유전자가 삽입된 균주를 얻었다. 유전자가 삽입된 상동 재조합 상류 지역과 하류 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는, 상기 표 3과 같은 서열번호 41 및 42의 프라이머를 이용한 PCR 법과 계놈 시퀀싱을 통해 유전적 조작을 확인하였다.

[203] 이렇게 수득한 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 "ATCC13032::Po2-panD"로 명명하였다.

[204]

[205] 실시예 4. 다양한 카르노신 합성 효소가 도입된 코리네박테리움 속 균주 제작

[206] 상기 실시예 2에서 제작된 벡터들을 실시예 3에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::Po2-panD 균주에 전기천공법(Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질전환하여 각각의 유전자가 도입된 균주 7종을 얻었다.

[207] 이 때, pCES208-Po2-BsLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032::Po2-panD-BsLAL"로, pCES208-Po2-SpLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032:: Po2-panD-SpLAL"로, pCES208-Po2-AhLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032:: Po2-panD-AhLAL"로, pCES208-Po2-PmLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032:: Po2-panD-PmLAL"로, pCES208-Po2-PsLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032:: Po2-panD-PsLAL"로, pCES208-Po2-PspLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032:: Po2-panD-PspLAL"로, pCES208-Po2-BpLAL가 도입된 균주를 "ATCC13032:: Po2-panD-BpLAL"로 각각 명명하였다.

[208]

[209] 실시예 5. 다양한 카르노신 합성 효소가 도입된 코리네박테리움 속 균주의 카르노신 생산 확인

[210] 상기 실시예 4에서 제작된 7종의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주들의 카르노신 생산을 확인하기 위해 발효 역가 실험을 실시하였다. 각 균주들의 콜로니를 영양배지에서 계대 배양한 후, 발효배지에서 48시간 배양하였다. 이 때 사용한 배지 조성은 다음과 같다.

[211]

[212] <영양배지>

[213] 포도당 1%, 육즙 0.5%, 폴리펩톤 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모엑기스 0.5%, 한천 2%, 유레아 0.2%, pH 7.2

[214] <발효배지>

[215] 포도당 6%, 탄산칼슘 3%, 황산암모늄 2%, 사탕수수 당밀 1%, 효모엑기스 0.1%, 일인산칼륨 0.4%, 황산마그네슘 0.3%, 이소류신 0.026%, 니코틴아마이드 36 mg/L, 황산철 2.5 mg/L, 황산망간 1.175 mg/L, 바이오틴 0.05 mg/L

[216]

[217] 상기 조건에서 배양이 완료된 후, HPLC를 이용하여 각 배지 내 카르노신 농도를 측정하였다. 상기 7종의 균주들이 생산한 카르노신 농도는 하기 표 4에 나타내었다.

[218]

[219] [표4]

균주명	카르노신 (g/L)
ATCC13032::Po2-panD-BsLAL	0.9
ATCC13032::Po2-panD-SpLAL	1.5
ATCC13032::Po2-panD-AhLAL	0.9
ATCC13032::Po2-panD-PmLAL	0.3
ATCC13032::Po2-panD-PsLAL	0
ATCC13032::Po2-panD-PspLAL	0
ATCC13032::Po2-panD-BpLAL	1.1

[220]

[221] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 다양한 카르노신 합성 효소들 중 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 효소가 도입된 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL이 카르노신 1.5 g/L를 생산하였다. 이는 기존에 보고된 바실러스 서브틸리스 유래의 효소가 도입된 ATCC13032::Po2-panD-BsLAL이 생산한 카르노신 농도 대비 약 0.6 g/L (약 67%) 더 높음을 확인하였고, 바실러스 푸밀리스 유래의 효소가 도입된 ATCC13032::Po2-panD-BpLAL이 생산한 카르노신 농도 대비 0.4 g/L (약 36%) 더 높음을 확인하였다.

[222] 상기 결과로부터, 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 효소가 카르노신 합성 활성이 가장 높으며, 카르노신 합성효소의 유래에 따라 카르노신이 생산되지 않는 경우가 있다는 것을 확인하였다.

[223]

[224] 실시예 6. 변이형 스트렙토코커스 뉴모니아 유래 효소가 도입된 코리네박테리움 속 균주의 카르노신 생산

[225] 실시예 6-1. 변이형 스트렙토코커스 뉴모니아 유래 효소가 도입된 균주 제작

[226] 상기 실시예 5를 통해 선별된, 가장 높은 카르노신 합성 활성을 가진 스트렙토코커스 뉴모니아 유래 효소에 아미노산 변이 2종을 도입하였다. 구체적으로, 효소 서열의 108번째 아미노산인 아스파라긴을 글루탐산으로 치환하고 378번째 아미노산인 히스티딘을 라이신으로 치환하여 카르노신 합성 활성 향상을 검증하였다.

[227] 이를 위해, 우선 서열번호 2의 108번째 아미노산인 아스파라긴을 글루탐산으로 치환하고자, 상기 실시예 2에서 제작한 pCES208-Po2-SpLAL를 주형으로 하기 표 5와 같은 서열번호 43 및 44의 프라이머(mutagenic primer) 세트를 제작하였다.

[228]

[229] [표5]

변이형 SpLAL 플라스미드	서열번호 #	염기서열
pCES208-Po2-SpLAL N108E	43	CGATTACGACGAACGAAGAACTGT TTATTGCCCCAA
	44	TTGGGGCAATAAACAGTTCTTCGT TCGTCGTAATCG
pCES208-Po2-SpLAL N108E/H378K	45	CCACACGTTTTATGTGGCAGATTGT AAACTTTATCCTCAACATTTTAAAG AAT
	46	ATTCTTTAAAATGTTGAGGATAAA GTTTACAATCTGCCACATAAAACG TGTGG

[230] 상기 프라이머 세트를 이용해서 하기 표 6과 같은 PCR 혼합물을 제조하고, 하기 표 7과 같은 사이클로 위치-특이적 돌연변이 PCR (Site-Direction Mutagenesis PCR)을 수행하였다.

[231]

[232] [표6]

Site-Direction Mutagenesis PCR 조성	단위 (ul)
10X pfu-X Buffer	5
10mM dNTP Mix	1
pfu-X Polymerase	1
Mutagenic forward primer(5pmol)	2
Mutagenic reverse primer(5pmol)	2
template DNA, 200ng/ul	1
dH2O	38
Total	50

[233] [표7]

사이클	온도	시간
1	95 °C	1 분
18	95 °C	50 초
	60 °C	50 초

	68 °C	9 분
1	68 °C	7 분

[234]

[235] PCR이 종료된 혼합물에 DpnI 제한효소 1 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 방치하였다. DpnI 처리된 DNA 3 μ l DH5a 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환(transformation)하여 pCES208-Po2-SpLAL N108E 플라스미드를 확보하였다.

[236] 추가로, 378번째 아미노산인 히스티딘을 라이신으로 치환하고자, 상기 제작된 pCES208-Po2-SpLAL N108E 플라스미드를 주형으로 상기 표 5와 같은 서열번호 45 및 46에서 표기한 각각의 프라이머(mutagenic primer) 세트를 이용해 위와 동일한 방법으로 pCES208-Po2-SpLAL N108E/H378 플라스미드를 확보하였다. 시퀀싱을 통해서 상기 표 5 플라스미드에 표기한 각각의 변이로 교체된 것을 확인하였고, 그 결과, 서열번호 8의 서열을 확보하였다.

[237] 상기 제작된 pCES208-Po2_SpLAL N108E/H378K 벡터를 실시예 3에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::Po2-panD 균주에 전기천공법으로 형질 전환한 후 변이형 SpLAL 유전자(N108E/H378K)가 삽입된 균주를 얻었다. 상기 균주를 "ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K"로 명명하였다.

[238]

[239] 실시예 6-2: 변이형 스트렙토코커스 뉴모니아 유래 효소가 도입된 코리네박테리움 속 균주의 카르노신 생산량 확인

[240] 실시예 6-1에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K 균주의 카르노신 생산량을 확인하고자 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 배양 후 HPLC를 이용해 카르노신의 생산량을 측정하였다.

[241]

[242] [표8]

균주명	카르노신 생산량 (g/L)
ATCC13032::Po2-panD-SpLAL	1.5
ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K	2.1

[243]

[244] 상기 표 8에 나타낸 바와 같이, 변이형 SpLAL 효소(N108E/H378K)가 도입된 미생물이 생산한 카르노신의 농도는 야생형 SpLAL 효소가 도입된 미생물이 생산한 카르노신 농도 대비 약 0.6 g/L (약 40%) 더 높음을 확인하였다.

[245] 상기 결과로부터, 상기 N108E/H378K 변이는 상기 효소를 갖는 미생물의 카르노신 생성능을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[246]

[247] 실시예 7. AroP가 강화된 코리네박테리움 속 균주의 카르노신 생산성 향상

[248] 실시예 7-1. AroP가 강화된 균주 제작

[249] 코리네박테리움 속 균주의 AroP 강화를 위해 pyk 프로모터와 cj7 프로모터(US 7662943 B2)를 도입용 벡터를 제작하였다.

[250] pyk 프로모터를 증폭시키기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하여 하기 표 9와 같은 서열번호 47 및 48의 프라이머를 제작하였고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR을 수행한 결과 500bp의 유전자 단편을 수득하였다. 호스트 게놈 DNA에 삽입하기 위해 필요한 유전자 단편을 얻고자 하기 표 9와 같은 서열번호 49 및 50과 서열번호 51 및 52를 제작하였고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 501bp 및 500bp의 유전자 단편을 수득하였다.

[251]

[252] [표9]

서열번호	명칭	서열
47	pyk_F	GGTTTACGGTTGATACGTATTTGCACTCTACGTAGCTGG
48	pyk_R	CTTCATTAGATTTAGCCATGCCCATAAGCCTAGTACGTC
49	Aarm_F	gagctcgggtaccggggatccGTTCCCCCTGGAGTCCG
50	Aarm_pyk_R	CTACGTAGAGTGCAAATACGTATCAACCGTAAACCCACATG
51	Barm_pyk_F	GTACTAGGCTTATGGGCATGGCTAAATCTAATGAAGGGC
52	Barm_R	cctgcaggtcgactctagaCCAATGATGAGGAAAGCGATG

[253]

[254] 증폭된 pyk 프로모터 부위와 상기 수득한 두가지 유전자 단편을 제한효소 BamHI 및 XbaI으로 절단된 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인-퓨전 클로닝 키트(In-fusion Cloning Kit)를 이용하여 연결함으로써 유전자 도입 벡터를 제작하였고, 이를 "pDZ-pyk(AroP)"로 명명하였다.

[255] 또한, CJ7 프로모터를 증폭시키기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하여 하기 표 10과 같은 서열번호 53 및 54의 프라이머를 제작하였고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR을 수행한 결과 317bp의 유전자 단편을 수득하였다. 호스트 게놈 DNA에 삽입하기 위해 필요한 유전자 단편을 얻기 위해 상기 표 9 및 하기 표 10과 같은 서열번호 49 및 55와 서

열번호 56 및 52를 제작하였고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR을 수행한 결과 501bp 및 500bp의 유전자 단편을 수득하였다.

[256]

[257] [표10]

서열번호	명칭	서열
53	cj7_F	GGGTTTACGGTTGATACAGAAACATCCCAGCGCTACTAATAG
54	cj7_R	CTTCATTAGATTTAGCCATAGTGTTTCCTTTCGTGTTGGGTAC
55	Aarm_cj7_R	GTAGCGCTGGGATGTTTCTGTATCAACCGTAAACCCACATG
56	Barm_cj7_F	CCCAACGAAAGGAAACACTATGGCTAAATCTAATGAAGGGC

[258]

[259] 증폭된 CJ7 프로모터 부위와 상기 수득한 두 가지 유전자 단편을 제한효소 BamHI 및 XbaI 으로 절단된 pDZ 벡터(대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)에 인-퓨전 클로닝 키트(In-fusion Cloning Kit)를 이용하여 연결함으로써 유전자 도입 벡터를 제작하였고, 이를 "pDZ-cj7(AroP)"로 명명하였다.

[260] 상기 실시예 6-1에서 제작된 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K 균주에 제작된 pDZ-pyk(AroP) 벡터와 pDZ-cj7(AroP) 벡터 각각을 전기천공법(Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질 전환한 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 AroP 유전자 앞에 프로모터가 삽입된 균주를 얻었다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 상류 지역과 하류 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 57(check_AroP_F; CTCTGCGGTCCCGCGGAC)과 58(check_AroP_R; CGTGATCACCGATGAAGTTTG)의 프라이머를 이용한 PCR 법과 겔능 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.

[261] 이렇게 수득한 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 각각 "ATCC13032::Po2-panD-SpLAL (N108E/H378K)-PpykAroP" 및 "ATCC13032::Po2-panD-SpLAL(N108E/H378K)-Pcj7AroP"로 명명하였다.

[262]

[263] 실시예 7-2. AroP 가 강화된 균주의 카르노신 생산량 확인

[264] ATCC13032::Po2-panD-SpLAL (N108E/H378K)-PpykAroP 균주와 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL(N108E/H378K)-Pcj7AroP 균주의 카르노신 생산량

을 확인하고자 각각의 균주를 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 배양 후 HPLC를 이용해 카르노신의 생산량을 측정하였다.

[265]

[266] [표11]

균주명	카르노신 생산량 (g/L)
ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K	2.1
ATCC13032::Po2-panD-SpLAL (N108E/H378K)-PpykAroP	2.5
ATCC13032::Po2-panD-SpLAL(N108E/H378K)-Pcj7AroP	2.7

[267]

[268] 표 11에 나타낸 바와 같이, pyk 프로모터가 도입된 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL (N108E/H378K)-PpykAroP 가 생산한 카르노신의 농도는 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K 가 생산한 카르노신 농도 대비 약 0.4 g/L (약 19%) 더 높음을 확인하였고, cj7 프로모터가 도입된 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL(N108E/H378K)-Pcj7AroP가 생산한 카르노신의 농도는 ATCC13032::Po2-panD-SpLAL N108E/H378K 가 생산한 카르노신 농도 대비 약 0.6 g/L (약 29%) 더 높음을 확인하였다.

[269] 상기 결과로부터, AroP 강화가 미생물의 카르노신 생산능을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[270]

[271] 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 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [청구항 2] 제1항의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제1항의 카르노신 합성효소 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 미생물은 카르노신을 생산하는 것인, 미생물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 미생물은 AroP(Aromatic amino acid transport protein) 단백질의 활성이 추가로 강화된 것인, 미생물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 AroP 단백질은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 미생물.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것인, 미생물.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것인, 미생물.
- [청구항 9] 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산 및 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 카르노신 합성 효소 활성을 갖는 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산이 글루탐산으로 치환되고, 378번째 위치에 상응하는 아미노산이 라이신으로 치환된 것인, 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 2의 N-말단으로부터 108번째 위치에 상응하는 아미노산인 아스파라긴이 글루탐산으로 치환되고, 378번째 위치에 상응하는 아미노산인 히스티딘이 라이신으로 치환된 것인, 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 변이체 폴리펩티드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 변이체 폴리펩티드.
- [청구항 13] 제9항의 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 14] 제9항의 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 미생물은 카르노신을 생산하는 것인, 미생물.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 미생물은 AroP 단백질의 활성이 추가로 강화된 것인, 미생물.

- [청구항 17] 제1항의 카르노신 활성을 갖는 폴리펩티드; 제1항의 카르노신 활성을 갖는 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물; 이의 배양물; 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 폴리펩티드; 제9항의 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물; 및 이의 배양물 중 어느 하나 이상을 포함하는 카르노신 생산용 조성물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 미생물은 AroP 단백질의 활성이 추가로 강화된 것인, 조성물.
- [청구항 19] 제3항 내지 제8항 및 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 카르노신 생산 방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 방법은 상기 미생물, 이의 배양물, 및 배지 중 어느 하나 이상으로부터 카르노신을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 카르노신 생산 방법.
- [청구항 21] 제3항 내지 제8항 및 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 미생물의 카르노신 생산 용도.