

명세서

발명의 명칭: 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법 기술분야

- [1] 본 출원은 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 5'-이노신산(5'-inosine monophosphate; 이하 IMP), 5'-크산틸산(5'-xanthosine monophosphate; 이하 XMP), 5'-구아닌산(5'-guanosine monophosphate; 이하 GMP), 5'-아데닐산(5'-adenylic acid; 이하 AMP) 등의 퓨린 뉴클레오티드는 핵산 생합성 대사계의 중간 물질이다. 이들은 체내에서 생리적으로 중요한 역할을 수행하며, 식품, 의약품 등에서도 널리 이용되고 있다. 이 가운데 소고기 맛을 내는 IMP와 송이 버섯 맛을 내는 GMP는 식품 조미 첨가제로 널리 이용되고 있으며, 두 물질과 모노소듐 글루탐산(MSG)이 혼합될 경우 풍미가 더욱 강화되는 것으로 알려져 세 물질을 합친 복합 중합 조미료가 많이 사용되고 있다.

[4]

- [5] 한편, 상기의 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 방법으로는 (1) 효모세포로부터 추출한 리보핵산(RNA)을 효소적으로 분해하는 방법, (2) 이를 생산하는 미생물을 배양하고 배양액 내의 퓨린 뉴클레오티드를 직접 회수하는 발효 제조 방법, (3) 발효에 의해 생산된 뉴클레오사이드를 화학적으로 인산화 하는 방법, (4) 발효에 의해 생산된 뉴클레오사이드를 효소적으로 인산화 하는 방법 등이 있다(대한민국 특허 등록 번호 제10-1049023호, 일본 등록특허공보 제4363042호, 대한민국 특허 등록 번호 제10-1210704호, Agri. Biol. Chem., 36(9),1511-1522). 이 중에서도, (1)의 방법은 원료 수급 및 경제성에 문제가 있으며, (2)의 방법이 경제적으로도 환경적으로도 유리하여 널리 사용되고 있다. 한편, 퓨린 뉴클레오티드 중 하나인 GMP생산의 경우 세포막 투과성의 문제로 인하여 수율이 낮다는 단점이 있어 미생물 발효를 통해 생산된 XMP를 효소적으로 전환하여 GMP를 생산하는 방법도 활용되고 있다.

[6]

- [7] 그러나, 미생물을 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 발효 생산 동안, 미생물은 온도, pH, 삼투압, 영양 결핍, 산화적 요인으로 인한 스트레스를 겪게 된다. 이 가운데 특히 산화적 스트레스는 발효 생산 중에 생성되는 피해갈 수 없는 요소인 활성 산소(reactive oxygen species; ROS)가 주된 원인이 되며, 이로 인한 미생물의 비정상적 생장이 야기될 수 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 미생물의 발효 과정 중 야기될 수 있는 산화적 스트레스를 극복하여 퓨린 뉴클레오티드의 생산성을 높이고자 예의 노력 연구한 결과, 특정 단백질을 불활성화시킨 미생물의 경우 미생물의 성장이 유지될 뿐만 아니라 퓨린 뉴클레오티드의 생산성이 향상됨을 확인하여 본 출원을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질이 불활성화된, 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원의 또 하나의 목적은 상기 미생물을 이용한 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 또 하나의 목적은 본 출원의 단백질을 코리네박테리움 속 미생물에서 불활성화시키는 단계를 포함하는, 코리네박테리움 속에서의 퓨린 뉴클레오티드 생산 증가 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 또 하나의 목적은 퓨린 뉴클레오티드를 생산하기 위한 상기 미생물의 용도를 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

- [16] 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물은 퓨린 뉴클레오티드를 높은 효율로 생산할 수 있다. 또한, 제조된 퓨린 뉴클레오티드는 동물 사료 또는 동물 사료 첨가제뿐만 아니라 인간의 식품 또는 식품 첨가제, 조미료, 의약품 등 다양한 제품에 응용될 수 있다.

[17]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 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.

[19]

- [20] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질이 불활성화된, 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공한다.

[21]

하나의 구체 예로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질이 불활성화된, 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 스테셔니스를 제공한다.

- [22]
- [23] 본 출원에서 용어, "퓨린 뉴클레오티드"(purine nucleotide)는 퓨린 뉴클레오시드를 가지며, 상기 뉴클레오시드의 당부분에 인산이 에스테르 결합한 화합물을 총칭한다.
- [24] 구체적으로, 상기 퓨린 뉴클레오티드는 IMP(5'-inosine monophosphate), XMP(5'-xanthosine monophosphate), GMP(5'-xanthosine monophosphate) 및 AMP(5'-adenosine monophosphate) 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 퓨린 뉴클레오티드일 수 있으나, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질이 불활성화되어 생산성이 증가될 수 있는 퓨린 뉴클레오티드는 제한 없이 포함된다.
- [25]
- [26] 본 출원에서 용어, "서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질"은 WhiB-패밀리 그룹의 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 의미하며, 구체적으로 WhiB 전사 조절인자(transcriptional regulator WhiB)일 수 있다. 상기 단백질은 산소 및 질소 산화물-민감성 클러스터(4Fe-4S)를 형성하는 4개의 보존된 시스테인 잔기를 포함하고 있으며, 방선균의 다양한 생물학적 특성을 나타내는데 중요한 기능을 한다고 알려져 있다. 현재까지 알려진 기능으로는 병의 발생(pathogenesis), 항생제 내성, 세포 성장과 같은 전반적인 세포 기능에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 이들의 세부적인 기능과 기작 연구가 잘 진행되지 않은 상태이다.
- [27]
- [28] 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 필수적으로 구성되는 단백질, 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [29] 또한, 본 출원의 단백질은 서열번호 1로 기재한 아미노산 서열로 구성된 단백질일 수 있으나, 상기 단백질과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한없이 포함하며, 당업자는 공지의 데이터베이스인 NCBI의 GenBank 등에서 서열 정보를 얻을 수 있다. 또한, 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질은, 서열번호 1 및 상기 서열번호 1과 적어도 60%, 70%, 80%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 생물학적 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위에 포함됨은 자명하다.
- [30] 더불어, 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는

폴리펩티드로서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질과 동일한 활성을 가지는 폴리펩티드도 제한 없이 포함될 수 있다.

- [31] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩타이드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩타이드' 또는 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드'라고 기재되어 있더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단 그리고/또는 C-말단에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.
- [32] 상기 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 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 알라닌, 라이신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다.
- [33] 본 출원에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 폴리뉴클레오티드에서 기본 구성 단위인 뉴클레오티드는 천연 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함할 수 있다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990) 참조).
- [34] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 상기 폴리뉴클레오티드는, 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 단백질과 60%, 70%, 80%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 상동성 또는 동일성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [36] 구체적으로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.. 그러나, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질에 상응하는 활성을 가지는

단백질을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면, 이에 제한되지 않고 본 출원의 범주에 포함되는 것은 자명하다.

- [37] 또한, 코돈의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성을 가지는 단백질을 암호화하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, 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)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1×SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다. 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [38] 구체적으로, 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.
- [39] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [40]
- [41] 본 출원에서 용어 "상동성" 또는 "동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수

있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다.

- [42] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [43] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 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.
- [44] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드의 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 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한

무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.

[45]

[46] 본 출원에서, 상기 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 불활성화된 것일 수 있다.

[47]

이때, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 불활성화는 WhiB-패밀리 단백질의 불활성화, WhiB 전사 조절인자의 불활성화 또는 상기 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 불활성화와 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.

[48]

[49] 본 출원에서 용어 "서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 불활성화된"은 상기 단백질의 발현이 모균주 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 비변형된 균주에 비하여 전혀 발현이 되지 않거나 또는 발현이 되더라도 그 활성이 없거나 감소된 것을 의미한다. 또한 WhiB-패밀리 그룹의 유전자에 의해 암호화되는 단백질(WhcEDBA)의 활성이 모균주 또는 비변형 균주에 비하여 활성이 없거나 감소된 것을 의미한다. 이때, 상기 감소는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 변이, 결손 등으로 단백질의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 단백질의 활성에 비해 감소한 경우와, 이를 암호화하는 유전자의 발현 저해 또는 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 단백질의 활성 정도가 천연형 균주 또는 변형전의 균주에 비하여 낮은 경우, 이들의 조합 역시 포함하는 개념이다.

[50]

본 출원에서는, 상기 단백질의 불활성화가 퓨린 뉴클레오티드의 생산성과 관련있음을 최초로 규명하였다.

[51]

[52] 본 출원에 있어서, 상기 불활성화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 1) 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 2) 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절 서열의 변형, 3) 상기 단백질의 활성이 제거 또는 약화되도록 단백질을 암호화하는 상기 유전자 서열의 변형, 4) 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입; 5) 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열을 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착을 불가능하게 만드는 방법; 6) 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터를 부가하는 방법(Reverse transcription engineering, RTE) 등이 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [53]
- [54] 구체적으로, 상기 단백질을 암호화하는 상기 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은, 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 일부 뉴클레오티드 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체를 결실하는 방법의 일례로 상동 재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 결실시키는 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [55] 또한, 상기 유전자의 일부 또는 전체를 결손시키는 방법은 자외선과 같은 빛 또는 화학물질을 이용하여 돌연변이를 유발하고, 얻어진 돌연변이체로부터 목적 유전자가 결손된 균주를 선별하여 수행될 수 있다. 상기 유전자 결손 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함된다. 상기 DNA 재조합 기술에는 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 이루어질 수 있다. 또한, 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터에는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 또한, 상기 발현 조절 서열을 변형하는 방법은 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 발현 조절 서열의 활성을 더욱 약화하도록 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함으로써 수행할 수 있다. 상기 발현 조절서열에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 암호화하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [57] 또한, 상기 유전자 서열을 변형하는 방법은 상기 효소의 활성을 더욱 약화하도록 유전자 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 유전자 서열 또는 활성이 없도록 개량된 유전자 서열로 교체함으로써 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [58]
- [59] 본 출원에서 용어 "퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 미생물" 또는 "퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지는 미생물"은 자연적으로 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 없는 모균주에 퓨린 뉴클레오티드의 생산능이 부여된 미생물을 의미한다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질, WhiB-패밀리 단백질 또는 WhiB 전사 조절인자가 불활성화되어 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 갖는 미생물일 수 있다.

- [60] 본 출원에서 "코리네박테리움 속 미생물"은 모든 코리네박테리움 속 미생물을 포함할 수 있다. 구체적으로, 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 포캐(*Corynebacterium phocae*), 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*), 코리네박테리움 휴미레듀센스(*Corynebacterium humireducens*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 마리넘(*Corynebacterium marinum*) 또는 코리네박테리움 프레벌겐스(*Corynebacterium freiburgense*), 코리네박테리움 시스티디스(*Corynebacterium cystitidis*), 코리네박테리움 듀럼(*Corynebacterium durum*), 코리네박테리움 필로섬(*Corynebacterium pilosum*) 또는 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*)일 수 있고, 더욱 구체적으로 코리네박테리움 스테셔니스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 한편, 코리네박테리움 속 미생물이 퓨린 뉴클레오티드를 생산할 수 있음은 이미 알려져 있었으나, 이의 생산능이 현저히 낮으며 생산 기작에 작용하는 유전자나 기작 원리가 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서, 본 출원의 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 속 미생물은 천연형 미생물 자체, 퓨린 뉴클레오티드 생산 기작과 관련된 유전자의 활성을 강화시키거나 불활성시켜 향상된 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물, 또는 외부유전자의 활성을 도입 또는 강화시켜 향상된 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물을 의미한다. 구체적으로, 상기 코리네박테리움속 미생물은 퓨린 뉴클레오티드의 생합성 경로가 강화된 코리네박테리움 스테셔니스일 수 있고, 상기 강화는 생합성 경로에 관여된 단백질의 활성이 강화된 것일 수 있다. 또는 상기 코리네박테리움속 미생물은 퓨린 뉴클레오티드 또는 이의 전구체의 분해 경로에 관여된 단백질의 활성이 불활성화 된 코리네박테리움 스테셔니스일 수 있다.
- [62] 이때, 상기 퓨린 뉴클레오티드 생합성 경로에 관여된 단백질의 예는, 퓨린 뉴클레오티드가 IMP일 경우, 아미도포스포리보실트랜스퍼라제(amidophosphoribosyltransferase; PurF), 포스포리보실아민-글리신 리가제(phosphoribosylamine-glycine ligase; PurD), 포스포리보실글리신아미드 포르밀트랜스퍼라제(phosphoribosylglycinamide formyltransferase; PurN), 포스포리보실포르밀글리신아미딘 신타제(phosphoribosylformylglycinamidine synthase; PurL), AIR 신테타제(AIR synthetase; FGAM 사이클라제), 포스포리보실아미노이미다졸 카복실라제(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase), 포스포리보실아미노이미다졸석시노카복실아미드 신타제(phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase),

- 아데닐로석시네이트 리아제(adenylosuccinate lyase; ADSL),
포스포리보실아미노이미다졸카복사미드
포르밀트랜스퍼라제(phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase)
및 이노신 모노포스페이트 신타제(inosine monophosphate synthase)로 이루어진
군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 포함할 수 있다.
- [63] 또한, 퓨린 뉴클레오티드가 XMP일 경우, 상기 활성이 강화된 단백질의 예는
상기 단백질들로 이루어진 군에 추가로 IMP 디히드로게나제(IMP dehydrogenase)
를 포함할 수 있다.
- [64] 또한, 퓨린 뉴클레오티드가 GMP일 경우, 상기 활성이 강화된 단백질의 예는
상기 단백질들로 이루어진 군에 추가로 IMP 디히드로게나제(IMP dehydrogenase)
또는/및 GMP 신타제(GMP synthase)를 포함할 수 있다.
- [65] 또한, 퓨린 뉴클레오티드가 AMP일 경우, 상기 활성이 강화된 단백질의 예는
상기 단백질들로 이루어진 군에 추가로 아데닐로석시네이트
신타제(adenylosuccinate synthase; purA)를 포함할 수 있다.
- [66] 가장 구체적으로, 퓨린 뉴클레오티드 생합성 경로에 관여된 단백질은
아미도포스포리보실트랜스퍼라제(PurF)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67]
- [68] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원에 따른 상기 미생물을 배지에서
배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드 생산방법을 제공한다.
- [69] 상기 생산방법은 퓨린 뉴클레오티드를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수
있다,
- [70] 상기 미생물 및 퓨린 뉴클레오티드는 앞서 설명한 바와 같다.
- [71]
- [72] 본 출원에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서
생육시키는 것을 의미한다. 본 출원에서 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는
방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.
구체적으로, 상기 배양은 배치 공정, 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed
batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있으나, 이에
제한되는 것은 아니다.
- [73] 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식
배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 본원의
미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에
사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나,
구체적으로는 본원의 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. . 코리네박테리움 균주에 대한 배양
배지는 공지되어 있다(예를 들면, Manual of Methods for General Bacteriology by
the American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981). 배지 중에서

- 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [74] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [75] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨을 함유하는 염이 포함될 수 있다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.
- [76] 상기 미생물의 배양 중 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있다. 배양물의 온도는 보통 20°C 내지 45°C, 구체적으로는 25°C 내지 40°C일 수 있다. 배양 시간은 원하는 L-아미노산의 생성량이 얻어질 때까지 계속할 수 있으나, 구체적으로는, 10 내지 160시간일 수 있다.
- [77] 상기 배양에 의하여 생산된 퓨린 뉴클레오티드는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [78]
- [79] 본 출원의 생산 방법은 상기 배양 단계 이후에 상기 미생물 또는 배지로부터 퓨린 뉴클레오티드를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [80] 상기 퓨린 뉴클레오티드의 회수는 당업계에서 알려진 통상적인 방법에 의하여 회수될 수 있다. 이러한 회수방법에는, 원심분리, 여과, 이온교환 크로마토그래피 및 결정화 등의 방법이 이용될 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양된 미생물 또는 배지로부터 목적하는 퓨린 뉴클레오티드를 회수할 수 있다.
- [81] 상기 회수 단계는 분리 공정 및/또는 정제 공정을 추가로 포함할 수 있다.
- [82]

- [83] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는, 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 불활성화된, 코리네박테리움 속 미생물의 퓨린 뉴클레오티드 생산 증가를 위한 용도를 제공한다.
- [84] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는, 본 출원의 서열번호 1을 포함하는 단백질을 코리네박테리움 속 미생물에서 불활성화시키는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드 생산 증가 방법을 제공한다.
- [85] 상기 용어, "퓨린 뉴클레오티드", "서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질", "불활성화" 및 "코리네박테리움 속 미생물"은 전술한 바와 같다.

[86]

발명의 실시를 위한 형태

- [87] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[88]

- [89] 실시예 1: **WhiB-패밀리 단백질의 불활성화를 목적으로 하는 재조합 벡터의 제작**

[90]

- [91] 퓨린 뉴클레오티드 생산능을 증가시키기 위한 불활성화 대상 단백질로 WhiB-패밀리 단백질을 선정하였다.

[92]

- [93] 실시예 1-1: 코리네박테리움 스테셔니스 **WhiB-패밀리 단백질 선정**

[94]

- [95] 야생형 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*, ATCC 6872)의 게놈에서 탐색하였으며, 그 중 유효할 것으로 판단되는 유전자 1종을 선별하였으며, 미국 국립보건원의 유전자은행(NIH Genbank)에 보고된 염기서열에 근거하여 Transcriptional regulator WhiB임을 확인하였다.

[96]

- [97] 실시예 1-2: **WhiB-패밀리 단백질 불활성화를 위한 암호화 유전자 단편의 준비**

[98]

- [99] 코리네박테리움 스테셔니스의 야생형인 ATCC 6872 균주의 염색체 유전자를 G-spin 토탈 DNA 추출 키트(Intron사, Cat. No 17045)를 이용하여 추출하였다. 이후, 상기 염색체 유전자를 주형으로 하여 연쇄중합반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 실시하였다.

[100]

- 이후, WhiB-패밀리 단백질을 불활성화시키기 위하여, 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 결실시켜 내재적 활성을 완전히 제거하거나, 또는 상기 유전자를 약화시켜 암호화하고 있는 단백질의 발현양을 최소화시켰다.

[101]

- 구체적으로, 하기 실시예 1-2-1에 따라 제작한 벡터를 이용하여 상기 유전자의

내재적 활성을 제거하였고, 실시예 1-2-2에 따라 제작한 벡터를 이용하여 상기 균주의 내재적 개시 코돈인 ATG를 GTG 또는 TTG로 치환하였다. 상기 GTG 또는 TTG 코돈은 ATG 코돈보다 단백질 발현 효율이 더 낮은 것으로 알려져 있다.

[102]

[103] 실시예 1-2-1:WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실된 벡터 제작

[104]

[105] WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 결실을 목적으로 하는 벡터를 제작하기 위해서, ATCC 6872 균주를 주형으로 하고, 서열번호 3과 서열번호 4의 프라이머 쌍 및 서열번호 5와 서열번호 6의 프라이머 쌍을 이용하여 유전자 단편(deletion-A, deletion-B)을 각각 수득하였다. 이때, PCR의 조건으로는 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초 변성; 55°C에서 30초 어닐링; 및 72°C에서 120초 중합을 25회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.

[106] 그 결과, deletion-A는 1026bp, deletion-B는 1044bp의 크기를 갖는 폴리뉴클레오티드를 획득할 수 있었다. 상기 두 단편을 주형으로 서열번호 3과 서열번호 6을 이용하여 Overlapping PCR을 실시하여 2050bp의 PCR 결과물(이하, "결실 단편"이라 명명함)을 얻었다.

[107] 상기 얻어진 결실 단편을 제한효소 XbaI(New England Biolabs, Beverly, MA)으로 처리한 후, 동일한 제한효소로 처리된 pDZ벡터와 T4 리가아제(New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 라이게이션하였다. 상기 제작한 유전자를 대장균 DH5α에 형질전환시킨 후, 이를 카나마이신 함유 LB배지에서 선별하고, DNA-spin 플라스미드 DNA 전체 키트(iNtRON 사)를 사용하여 DNA를 획득하였다.

[108] 상기와 같은 방법으로 제작한, WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 결실을 목적으로 하는 벡터를 'pDZ-deletion'으로 명명하였다.

[109]

[110] 실시예 1-2-2:WhiB-패밀리 단백질의 발현이 약화된 벡터 제작

[111]

[112] WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 약화를 목적으로 하는 벡터를 제작하기 위해서, ATCC 6872 균주의 개시코돈인 ATG를 TTG 또는 GTG로 변형하였다.

[113] 먼저, 개시코돈이 TTG로 변형된 균주를 제작하기 위하여, ATCC 6872 균주를 주형으로 하고, 서열번호 7과 서열번호 8의 프라이머 쌍 및 서열번호 9와 서열번호 10의 프라이머 쌍을 이용해 TTG 또는 GTG로 변형된 유전자 단편(alt-A 및 alt-B)을 각각 얻었다. 그 결과, alt-A는 974bp, alt-B는 982bp의 크기를 갖는 폴리뉴클레오티드를 획득할 수 있었으며, 상기 두 단편을 주형으로 서열번호 7과 서열번호 10을 이용하여 Overlapping PCR을 실시하여 1955bp의 PCR 결과물(이하, 'alt 단편'이라 명명함)을 얻었다.

- [114] 또한, 개시코돈이 GTG로 변형된 균주를 제작하기 위하여, ATCC 6872 균주를 주형으로 하고, 서열번호 7과 서열번호 11의 프라이머 쌍 및 서열번호 12와 서열번호 10의 프라이머 쌍을 이용해 유전자 단편(alg-A 및 alg-B)을 각각 얻었다. 그 결과, alg-A는 974bp, alg-B는 982bp의 크기를 갖는 폴리뉴클레오티드를 획득할 수 있었다. 상기 두 단편을 주형으로 서열번호 7과 서열번호 10을 이용하여 Overlapping PCR을 실시하여 1955bp의 PCR 결과물(이하, "alg 단편"이라 명명함)을 얻었다.
- [115] 한편, 각 PCR의 조건은 모두 동일하며, 94°C에서 5분간 변성한 후; 94°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 120초 중합을 25회 반복한 후; 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다.
- [116] 상기 얻어진 유전자의 단편을 제한효소 XbaI(New England Biolabs, Beverly, MA) 처리한 후, 동일한 제한효소로 처리된 pDZ벡터와 T4 리가아제(New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 라이게이션하였다. 상기 제작한 유전자를 대장균 DH5α에 형질전환시킨 후, 이를 카나마이신 함유 LB배지에서 선별하고, DNA-spin 플라스미드 DNA 전체 키트(iNtRON 사)를 사용하여 DNA를 획득하였다.
- [117] 상기와 같은 방법으로 제작한, WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 약화를 목적으로 하는 벡터를 각각 'pDZ-alt' 또는 'pDZ-alg'으로 명명하였다.
- [118] 한편, 벡터제작을 위해 사용된 프라이머의 서열들은 하기 표 1에 나열하였다.
- [119]
- [120] [표1]

서열번호 3	TGCTCTAGA GATCTAGCACGCCTAAAGAGTCG
서열번호 4	GTAGGTGTCCGCCTGAGTTG
서열번호 5	CAACTCAGGCGGACACCTAC TCACTAACTGGGCTGATTATCTCG
서열번호 6	TGCTCTAGAGGTGCCCTTCATCATCAGGT
서열번호 7	CGC GGA TCC CAGCCATTAGGTAAGGTGCTTG
서열번호 8	AGAGGCGTATTCACGCTCTG
서열번호 9	CAGAGCGTGAATACGCCTC TTGAGATTATGTGTGGATAAGCAGAAG
서열번호 10	CGC GGA TCC CGAGGATACAAAGCCCACGA
서열번호 11	CGAGGCGTATTCACGCTCTG
서열번호 12	CAGAGCGTGAATACGCCTC GTGAGATTATGTGTGGATAAGCAGAAG

[121]

- [122] 실시예 2: 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 야생형 균주를 이용한, **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작 및 이의 퓨린 뉴클레오티드 생산능 평가
- [123]
- [124] 실시예 2-1: 퓨린 뉴클레오티드 중 **XMP**를 생산하는 야생형 유래 균주를 이용한, **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작
- [125]
- [126] 코리네박테리움 스태서니스 KCCM-10530 균주(대한민국 특허 등록번호 제10-0542568호)에 상기 실시예 1에 따라 제작한 벡터 2종(pDZ-alt 및 pDZ-alg)을 전기 천공법으로 각각 독립적으로 형질전환한 후, 카나마이신 25 mg/L를 함유한 선별 배지에서 성장한 콜로니를 1차로 선별하였다.
- [127] 이후, 상기 균주의 내재적 유전자와 상기 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드 간의 상동성을 이용한 2차 교차 과정을 통해, **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실되거나, 또는 개시 코돈이 약화된 형태(ATG→TTG, 또는 ATG→GTG)로 변형된 균주들을 얻었다.
- [128] 한편, **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실된 균주는 서열번호 13과 서열번호 6의 프라이머를 이용하여 선별하였다. 상기 프라이머로 PCR을 수행하는 경우, 야생형 균주는 1680bp 크기의 단편이 나오지만, 유전자가 결손된 균주의 경우 1414bp 크기의 단편이 검출된다.
- [129] 또한, **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 약화된 균주는 mismatch PCR에 기반하여 선별하였다. 서열번호 14와 서열번호 6을 이용하여 ATG→TTG 변이를 선별하였고, 서열번호 15와 서열번호 6을 이용하여 ATG→GTG 변이를 선별하였다. 상기 서열번호 14와 15는 각각 3' 말단에 야생형 균주의 염기 서열인 A 대신에 각각 T 또는 G를 포함하고 있어 변이가 있는 경우만 PCR 단편이 검출되도록 하였다. mismatch PCR로 1차 확인된 균주는 유전자 서열분석을 통해 최종 확인하였다.
- [130] 최종적으로, 상기의 방법으로 획득된 **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실된 균주는 'CN02-1545'로 명명하였고, 개시 코돈이 TTG 형태로 치환되어 상기 유전자가 약화된 균주는 'CJX-1546', 및 개시 코돈이 GTG 형태로 치환되어 상기 유전자가 약화된 균주는 'CJX-1547'로 명명하였다.
- [131] 한편, 균주 제작을 위해 사용한 프라이머의 서열들은 하기 표 2에 나열하였다.
- [132]
- [133] [표2]

서열번호 13	CATGTTGTTGCCCTCGGAATC
서열번호 14	CGTGAATACGCCTCT
서열번호 15	CGTGAATACGCCTCG

- [134] 한편, 상기 CN02-1545 균주는 2017년 11월 7일자로 부다페스트 조약 하의

기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 국제 기탁하여 KCCM12152P로 기탁번호를 부여받았다.

[135]

[136] 실시예 2-2: **WhiB-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 XMP 생산능 평가**

[137]

[138] 퓨린 뉴클레오티드 중 XMP를 생산하는 코리네박테리움 스태서니스 KCCM-10530 및 상기 실시예 2-1을 통해 제작된 CN02-1545, CJX-1546, 및 CJX-1547 균주의 XMP 생산능을 측정하기 위하여 아래와 같은 배양 방법을 이용하였다.

[139] 하기 종배지 5 ml을 지름 18 mm 시험관에 분주하고, 상법에 따라 가압 살균한 후 사용 균주를 접종하고 180 rpm으로 30°C에서 18시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 중 본배지와 별도 살균 배지를 각각 상법에 따라 가압 살균하여 미리 가압 살균한 500 ml 용량의 진탕용 삼각 플라스크에 29 ml과 10 ml씩 분주하고 종배양액 1 ml을 식균한 다음 72시간 배양하였다. 회전수는 200 rpm, 온도는 30°C로 조절하였다.

[140] 사용한 배지 조성은 다음과 같으며, 배양 완료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 XMP의 생산량을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. XMP 측정 농도는 '5'-크산틸산나트륨·7H₂O'로 표시하였다.

[141]

[142] **XMP 플라스크 종배지**

[143] 포도당 30g/L, 펩톤 15 g/L, 효모엑기스 15 g/L, 염화나트륨 2.5 g/L, 우레아 3 g/L, 아데닌 150 mg/L, 구아닌 150 mg/L, pH 7.2

[144]

[145] **XMP 플라스크 생산배지 (본배지)**

[146] 포도당 60 g/L, 황산마그네슘 10 g/L, 염화칼슘 10 mg/L, 황산철 20 mg/L, 황산망간 10 mg/L, 황산아연 10 mg/L, 황산구리 1 mg/L, 비오틴 100 ug/L, 티아민 5 mg/L, 아데닌 30 mg/L, 구아닌 30 mg/L, pH 7.2

[147]

[148] **XMP 플라스크 생산배지 (별도 살균 배지)**

[149] 인산 제1칼륨 10 g/L, 인산 제2칼륨 10 g/L, 우레아 7 g/L, 황산암모늄 5 g/L

[150]

[151] [표3]

균주번호	XMP(g/L)	생산성(g/L/hr)
KCCM10530	11.8	0.148
CN02-1545	13.1	0.191
CJX-1546	12.3	0.188
CJX-1547	12.5	0.198

[152] 이때, 상기 표 3에서, 생산성은 배양 후 48시간 시점에서 단위 시간 당 XMP 생산량을 나타낸다.

[153] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 모균주 KCCM10530 균주는 플라스크 배양 종료 후, 11.8 g/L의 XMP를 생산하였고, CN02-1545는 모균주 KCCM10530에 비하여 XMP 생산량이 1.3 g/L, CJX-1546은 0.5 g/L, CJX-1547은 0.7 g/L 증가되었음을 확인하였다. 이는, XMP 생산량이 모균주 대비 각각 11%, 4%, 6% 향상된 것임을 확인하였다.

[154] 또한, 모균주 KCCM10530 균주는 0.148g/L/hr의 생산성을 나타내었으나, CN02-1545는 0.191 g/L/hr, CJX-1546는 0.188 g/L/hr, 그리고 CJX-1547는 0.198 g/L/hr를 나타냄을 확인하였다. 이는, XMP 생산성이 모균주 대비 각각 29%, 27%, 그리고 34% 향상된 것임을 확인하였다.

[155] 이와 같은 결과는, 본 출원의 WhiB-패밀리 단백질을 불활성화시킬 경우 퓨린 뉴클레오티드의 생산이 증가됨을 시사하는 것이다.

[156]

[157] 실시예 3: 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화된 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 변이 균주를 이용한, WhiB-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작 및 이의 퓨린 뉴클레오티드 생산능 평가

[158]

[159] 실시예 3-1: 퓨린 뉴클레오티드 중 XMP를 생산하는 변이 균주를 이용한, WhiB-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작

[160]

[161] 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화되어 있는 XMP 생산 균주를 이용하여, WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 불활성화된 균주를 제작하였다. 구체적으로, 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화되어 있는 XMP 생산 균주는 KCCM-10530에 PurF가 강화되어 있는 균주로서, purF 유전자의 개시코돈 GTG가 ATG로 변경된 균주이다. 상기 퓨린 생합성 경로 유전자인 purF가 강화된 KCCM-10530균주는 CJX-1544 [KCCM-10530_purF(g1a)]로 명명하였다. 상기 CJX-1544 [KCCM-10530_purF(g1a)] 균주에 상기 실시예 1에서 제조한 재조합백터 pDZ-deletion 백터를 전기 천공법으로 형질전환한 후, 카나마이신 25 mg/L를 함유한 선별 배지에서 성장한 콜로니를 1차로 선별하였다.

[162] 이후, 상기 균주의 내재적 유전자와 상기 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드 간의 상동성을 이용한 2차 교차 과정을 통해, **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실된 균주를 얻었다. 한편, **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실된 균주는 실시예 2와 동일한 방법으로 서열번호 13과 서열번호 6을 이용하여 확인하였다.

[163] 최종적으로, 상기의 방법으로 획득된 **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 결실된 균주는 'CJX-1553'으로 명명하였다.

[164]

[165] 실시예 3-2: **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 불활성화된 균주의 퓨린 뉴클레오티드 중 **XMP** 생산능 평가

[166]

[167] 퓨린 생합성 경로 유전자인 **purF**가 강화되어 있는 CJX-1544 및 상기 실시예 3-1을 통해 제작된 CJX-1553 균주의 **XMP** 생산능을 측정하기 위하여 상기 실시예 2-2와 같은 배양 방법을 이용하였다. 배양 완료 후 **HPLC**를 이용한 방법에 의해 **XMP**의 생산량을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[168]

[169] [표4]

균주번호	XMP(g/L)	생산성(g/L/hr)
CJX-1544	14.0	0.183
CJX-1553	15.5	0.212

[170] 이때, 상기 표 4에서, 생산성은 배양 후 48시간 시점에서 단위 시간 당 **XMP** 생산량을 나타낸다.

[171] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, CJX-1553 균주는 퓨린 생합성 경로 인자인 **purF**가 강화된 모균주 CJX-1544에 비하여 **XMP** 생산량이 1.5 g/L 증가되었음을 확인하였다. 이는, **XMP** 생산량이 모균주 CJX-1544 대비 10.7% 향상된 것임을 확인하였다.

[172] 또한, 모균주 CJX-1544 균주는 0.183 g/L/hr의 생산성을 나타내었고, CJX-1553은 0.212 g/L/hr를 나타내었음을 확인하였다. 이는, **XMP** 생산성이 모균주 CJX-1544 대비 16% 향상된 것임을 확인하였다.

[173]

[174] 실시예 4: 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 야생형 균주를 이용한, **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작 및 이의 퓨린 뉴클레오티드 생산능 평가

[175]

[176] 실시예 4-1: 퓨린 뉴클레오티드 중 **IMP**를 생산하는 야생형 유래 균주를 이용한, **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작

[177]

- [178] 코리네박테리움 스태서니스 KCCM-10610(대한민국 특허 등록번호 제10-0588577호)에 상기 실시예 1에 따라 제작한 벡터 2종(pDZ-a1t 및 pDZ-a1g)을 전기 천공법으로 각각 독립적으로 형질전환한 후, 카나마이신 25 mg/L를 함유한 선별 배지에서 생장한 콜로니를 1차로 선별하였다.
- [179] 이후, 상기 균주의 내재적 유전자와 상기 벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드 간의 상동성을 이용한 2차 교차 과정을 통해, WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 개시 코돈이 약화된 형태(ATG→TTG, 또는 ATG→GTG)로 변형된 균주들을 얻었다.
- [180] WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자가 약화된 균주는 mismatch PCR에 기반하여 선별하였다. 서열번호 14와 서열번호 6을 이용하여 ATG→TTG 변이를 선별하였고, 서열번호 15와 서열번호 6을 이용하여 ATG→GTG 변이를 선별하였다. 상기 서열번호 14와 15는 각각 3' 말단에 야생형 균주의 염기 서열인 A 대신에 각각 T 또는 G를 포함하고 있어 변이가 있는 경우만 PCR 단편이 검출되도록 하였다. mismatch PCR로 1차 확인된 균주는 유전자 서열분석을 통해 최종 확인하였다.
- [181] 최종적으로, 상기의 방법으로 획득된 WhiB-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 개시 코돈이 TTG 형태로 치환되어 상기 유전자가 약화된 균주는 'CJI-2078', 및 개시 코돈이 GTG 형태로 치환되어 상기 유전자가 약화된 균주는 'CJI-2077'로 명명하였다.
- [182]
- [183] 실시예 4-2: WhiB-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 퓨린 뉴클레오티드 중 IMP 생산능 평가
- [184]
- [185] 퓨린 뉴클레오티드 중 IMP 생산 균주인 코리네박테리움 스태서니스 KCCM-10610 및 실시예 4-1을 통해 제작된 CJI-2078 및 CJI-2077 균주의 IMP 생산능을 측정하기 위하여 하기와 같은 배양 방법을 이용하였다.
- [186] 가압살균한 시험관(지름 18mm)에 종배지 5 ml을 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 생산배지 29 ml를 250 ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고, 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2 ml을 접종하여 4 내지 5일간 배양하였다. 배양 조건은 회전수 170rpm, 온도 30°C, pH 7.5로 조절하였다.
- [187] 사용한 배지 조성은 다음과 같으며, 배양 완료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 5에 나타내었다.
- [188]
- [189] **IMP 종배지**
- [190] 포도당 10 g/L, 펩톤 10 g/L, 육즙 10 g/L, 효모엑기스 10 g/L, 염화나트륨 2.5 g/L, 아데닌 100 mg/L, 구아닌 100 mg/L, pH 7.2
- [191]

[192] **IMP 플라스크 생산배지**

[193] 글루타민산 나트륨 1 g/L, 암모늄클로라이드 10 g/L, 황산마그네슘 12 g/L, 염화칼슘 0.1 g/L, 황산철 20 mg/L, 황산망간 20 mg/L, 황산아연 20 mg/L, 황산구리 5 mg/L, L-시스테인 23 mg/L, 알라닌 24 mg/L, 니코틴산 8 mg/L, 비오틴 45 µg/L, 티아민염산 5 mg/L, 아테닌 30 mg/L, 인산(85%) 19 g/L, 포도당 26g/L, 과당 14 g/L 첨가

[194]

[195] [표5]

균주번호	IMP(g/L)
KCCM-10610	11.2
CJI-2078	11.7
CJI-2077	11.4

[196] 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, CJI-2078 균주는 모균주 KCCM-10610에 비하여 IMP 생산량이 0.5 g/L, CJI-2077은 0.2 g/L 증가되었음을 확인하였다. 이는, IMP 생산량이 모균주 대비 각각 4.5%, 1.8% 향상된 것임을 확인하였다.

[197]

[198] 실시예 5: 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화된 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 변이 균주를 이용한, **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작 및 이의 퓨린 뉴클레오티드 생산능 평가

[199]

[200] 실시예 5-1: 퓨린 뉴클레오티드 중 **IMP**를 생산하는 변이 균주를 이용한 **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 제작

[201]

[202] 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화되어 있는 **IMP** 생산 균주를 이용하여, **WhiB**-패밀리 단백질이 불활성화된 균주를 제작하였다. 구체적으로, 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화되어 있는 **IMP** 생산 균주는 KCCM-10610에 퓨린 생합성 경로 유전자인 **purF**가 강화되어 있는 균주로서, **purF** 유전자의 개시코돈 GTG가 ATG로 변경된 균주이다. 상기 퓨린 생합성 경로 유전자인 **purF**가 강화된 KCCM-10610균주는 CJI-1964[KCCM-10610_ purF(g1a)]로 명명 하였다. 상기 CJI-1964[KCCM-10610_ purF(g1a)] 균주에 상기 실시예 1에서 제조한 벡터 2종(pDZ-alt 및 pDZ-a1g)을 전기 천공법으로 형질전환한 후, 상기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 개시 코돈이 약화된 형태(ATG→TTG, 또는 ATG→GTG)로 변화된 균주들을 얻었다.

[203] 최종적으로, 상기의 방법으로 획득된 **WhiB**-패밀리 단백질을 암호화하는 유전자의 개시 코돈이 TTG 형태로 치환되어 상기 유전자가 약화된 균주는 'CJI-2081', 및 개시 코돈이 GTG 형태로 치환되어 상기 유전자가 약화된 균주는

'CJI-2080'로 명명하였다.

[204]

[205] 실시예 5-2: WhiB-패밀리 단백질이 불활성화된 균주의 퓨린 뉴클레오티드 중 IMP 생산능 평가

[206]

[207] 퓨린 생합성 경로 유전자가 강화되어 있는 CJI-1964 균주 및 상기 실시예 5-1을 통해 제작된 CJI-2081 및 CJI-2080 균주의 IMP 생산능을 측정하기 위하여 상기 실시예 4-2와 같은 배양 방법을 이용하였다. 배양 완료 후 HPLC를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

[208]

[209] [표6]

균주번호	IMP(g/L)
CJI-1964	11.4
CJI-2081	12.3
CJI-2080	12.1

[210] 상기 표 6에서 나타난 바와 같이, CJI-2081 균주는 모균주 CJI-1964에 비하여 IMP 생산량이 0.9 g/L, CJI-2080은 0.7 g/L 증가되었음을 확인하였다. 이는, IMP 생산량이 모균주 CJI-1964대비 각각 7.8%, 6.1% 향상된 것임을 확인하였다.

[211]

[212] 즉, WhiB-패밀리 단백질 전사 조절인자를 불활성화시키는 경우, 모균주 또는 비변형 미생물에 비해 퓨린 뉴클레오티드를 고수율로 생산할 수 있음을 확인하였다. 아울러, 이와 같은 결과는, WhiB-패밀리 단백질이 불활성화되는 경우, 모균주 또는 비변형 미생물에 비해 퓨린 뉴클레오티드를 고수율로 생산할 수 있음을 시사하는 것이다.

[213]

[214] 이상의 설명으로부터, 본원이 속하는 기술분야의 당업자는 본원이 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. 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[215]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CN02-1545	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12152P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용 시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2017년 11월 7일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2017. 11. 07.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 1월 25일

변리사 손민



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질이 불활성화된, 퓨린 뉴클레오티드를 생산하는 코리네박테리움 스테셔니스.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 퓨린 뉴클레오티드는 IMP(5'-inosine monophosphate), XMP(5'-xanthosine monophosphate), GMP(5'-guanosine monophosphate), 및 AMP(5'-adenylic acid) 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 퓨린 뉴클레오티드인, 코리네박테리움 스테셔니스.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 코리네박테리움 스테셔니스는 추가적으로 퓨린 뉴클레오티드의 생합성 경로가 강화된, 코리네박테리움 스테셔니스.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 퓨린 뉴클레오티드의 생합성 경로의 강화는 PurF(amidophosphoribosyltransferase)단백질의 활성이 강화된 것인, 코리네박테리움 스테셔니스.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 코리네박테리움 스테셔니스를 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 퓨린 뉴클레오티드는 IMP(5'-inosine monophosphate), XMP(5'-xanthosine monophosphate), GMP(5'-guanosine monophosphate), 및 AMP(5'-adenylic acid) 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 퓨린 뉴클레오티드인, 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 배양하는 단계 이후에 상기 배양된 코리네박테리움 스테셔니스 또는 배지로부터 퓨린 뉴클레오티드를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드의 생산방법.
- [청구항 8] 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 코리네박테리움 속 미생물에서 불활성화하는 단계를 포함하는, 퓨린 뉴클레오티드 생산 증가 방법.