

명세서

발명의 명칭: 신규 프로모터 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 프로모터 및 이를 이용한 목적 물질의 생산 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 프로모터 활성을 가지는 신규 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터 및 코리네박테리움 속 미생물, 상기 미생물을 이용한 목적 물질의 생산 방법 및 프로모터의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 미생물에서 목적 물질(예를 들어, 아미노산)을 생산하는 공정은 친환경적이고 안전한 생산 방법으로 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 그 중 코리네박테리움 속 미생물에서 목적 물질을 다량으로 생산하기 위한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 코리네박테리움(*Corynebacterium* sp.) 속 미생물, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)은 L-아미노산 및 기타 유용물질 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성 미생물이다. 상기 L-아미노산 및 기타 유용물질을 생산하기 위하여, 고효율 생산 미생물 및 발효공정기술 개발을 위한 다양한 연구들이 수행되고 있다.
- [4] 코리네박테리움속 미생물에서 생산되는 대표적인 물질인 L-라이신은 동물사료, 사람의 의약품 및 화장품 산업에 사용되고 있으며 코리네박테리움 균주를 이용한 발효에 의해 생성되고 있다. L-라이신 생합성 관련 유전자가 강화된 미생물 및 이를 이용한 L-라이신 생산 방법 등이 알려져 있다(KR 10-0924065B1).
- [5] 또한, L-쓰레오닌은 필수 아미노산의 일종으로 사료 및 식품 첨가제로 널리 사용되며 의약용으로 수액제, 의약품의 합성 원료로도 사용된다. L-쓰레오닌은 식물성 단백질에 적게 들어 있어 채식 위주의 식습관을 가진 동물들에게서 부족되기 쉽기 때문에, 특히, 동물 사료용 첨가제로서 유용하게 사용되고 있다. L-쓰레오닌은 주로 인공변이법 또는 유전자 재조합 방법에 의해 개발된 대장균 또는 코리네박테리움 미생물 등을 이용한 발효법으로 생산된다. 대표적으로, 대장균 유래의 쓰레오닌 오페론을 쓰레오닌 생산 균주인 브레비박테리움 플라븀(*Brevibacterium flavum*)에 도입하여 L-쓰레오닌을 생산하는, 유전자 재조합 균주를 이용하는 방법(TURBA E, et al, Agric. Biol. Chem. 53:2269~2271, 1989) 등이 알려져 있다.
- [6] O-아세틸 호모세린은 메치오닌 생산의 전구체로 사용되는 물질로 메치오닌 생합성 경로상에 있는 중간체이다(WO2008/013432). O-아세틸-L-호모세린은 호모세린 O-아세틸 트랜스퍼라아제(O-acetyl transferase)에 의해 L-호모세린 및 아세틸-CoA를 기질로 하여 합성된다.

- [7] 이소류신은 체내에서 합성되지 않는 필수 아미노산의 일종으로서 성장 촉진, 신경 기능 증진, 간 기능 강화 및 근육 강화 등의 효과를 갖는 것을 알려져 있고, 통상적으로 미생물을 이용한 발효 방법에 의해 생산된다.
- [8] 아직까지도 다양한 미생물, 즉, 에스케리아 속 미생물, 코리네박테리움 속 미생물, 또는 바실러스 속 미생물 등에서도 높은 발현 효율을 나타내는 시스템이 필요한 바, 범용적 프로모터의 개발 필요성이 여전히 대두되고 있는 실정이다. 또한, 특정한 목적 물질에 제한되지 않는 범용적인 프로모터를 개발할 경우, 다양한 물질 생산에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 출원은 신규 합성 프로모터를 개발하여 공지된 프로모터에 비하여 정방향으로 존재 시 하위의 유전자에 대해 높은 발현 활성을 갖고, 이로 인해 다양한 목적 물질을 생산할 수 있음을 확인 하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 출원의 하나의 목적은 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 발현 카세트를 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드; 또는 상기 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드의, 프로모터로서의 용도를 제공한다.

[17]

발명의 효과

- [18] 본 출원의 신규한 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 목적 물질을 생산하는 미생물에 도입되어, 목적 물질의 생산량을 증가시킬 수 있다. 향상된 생산 수율로 인해, 산업적인 면에서 생산의 편의성과 함께 제조원가 절감 등의 효과를 기대할 수 있다.

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

[22]

[23] 본 출원의 하나의 양태는 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[24] 구체적으로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[25] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 가닥이다.

[26] 본 출원에서 용어, "프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드"는 발현시키고자 하는 유전자, 즉 목적 유전자의 발현을 위해 RNA 폴리머라제 또는 인핸서 등이 결합하는 부위를 포함하는 목적 유전자의 전사가 일어나는 부위 근처에 존재하는 DNA 영역을 의미한다.

[27] 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 범용적 강화 프로모터로 이용될 수 있다. 일 예로, 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh) 활성을 갖는 폴리펩티드의 발현을 강화시킬 수 있는 프로모터로 사용될 수 있다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 물질, 구체적으로, 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린 또는 이소류신의 생산, 또는 생산량을 증가시키는 데 관여하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[28] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 또는 7 이상의 뉴클레오티드 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[29] 본 출원에서, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열은 글루탐산 탈수소효소의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드의 한 예로 들 수 있다. 또한, 프로모터 활성을 갖는 한, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 특정 뉴클레오티드가 치환된 폴리뉴클레오티드 역시 글루탐산 탈수소효소의 프로모터 활성을 갖는

폴리뉴클레오티드일 수 있다. 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열은 변이 위치를 표시하기 위한 대표적인 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으며, 프로모터 활성을 가지는 이에 상응하는 다른 폴리뉴클레오티드 서열 역시 변이를 도입할 수 있는 서열에 포함된다. 예를 들어 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh) 혹은 이에 상응하는 활성을 갖는 폴리펩티드의 프로모터 역할을 할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 본 출원의 변이를 도입할 수 있는 서열의 범위에 제한 없이 포함될 수 있다.

- [30] 상기 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI Genbank에서 그 서열을 확인할 수 있으며, 상기 글루탐산 탈수소효소의 프로모터 역할을 할 수 있는 서열로 상기 서열번호 1에 상응하는 서열은 코리네박테리움 (*Corynebacterium* sp.) 유래일 수 있고, 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 서열일 수 있으나, 상기 폴리뉴클레오티드와 동등 또는 그 이상의 활성을 갖는 서열은 본 출원의 프로모터에 제한 없이 포함될 수 있다.
- [31] 본 출원에서 제공하는, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 기존의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에서, 특이적 위치의 뉴클레오티드가 치환되어 프로모터 활성이 강화된 것일 수 있다.
- [32] 일 구현예로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 것일 수 있다. 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 본원에서 "변이형 프로모터"와 혼용 될 수 있다.
- [33] 일 구현예로, 상기 변이형 프로모터는 서열번호 1의 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드의 다른 뉴클레오티드로의 치환을 포함하는, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다. 구체적으로, 상기 변이형 프로모터는 상기 위치에서 어느 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상, 넷 이상, 또는 다섯 위치 모두 또는 이들의 상응하는 위치에서 다른 뉴클레오티드로 치환된 것일 수 있다. 또한, 66번 및/또는 261번 위치에서 뉴클레오티드가 추가적으로 치환된 것일 수 있다.
- [34] 상기 '다른 뉴클레오티드'는 치환 전의 뉴클레오티드와 다른 것이면, 제한되지 않는다. 서열번호 1의 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)을 예로 들면, "서열번호 1에서 27번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되었다"고 기재하는 경우, 아데닌을 제외한 시토신(C), 티민(T), 구아닌(G)으로 치환되는 것을 의미한다. 또한 달리 표시하지 않더라도 본 출원에서 어떤 뉴클레오티드가 "치환되었다"고 기재하는 경우, 치환 전의 뉴클레오티드와 다른 뉴클레오티드로 치환되는 것을 의미한다.

- [35] 한편, 당업자라면 당업계에 알려진 서열 얼라인먼트를 통해 임의의 폴리뉴클레오티드 서열에서 본 출원의 서열번호 1의 27번, 28번, 31번, 32번, 36번, 66번, 261번 뉴클레오티드에 상응하는 위치의 뉴클레오티드를 파악할 수 있으며, 본 출원에서 별도로 기재하지 않더라도 "특정 서열번호에서 특이적 위치의 뉴클레오티드"를 기재하는 경우, 임의의 폴리뉴클레오티드 서열에서 그와 "상응하는 위치의 뉴클레오티드"까지 포함하는 의미임은 자명하다. 따라서 프로모터 활성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열 내에서 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열의 27번, 28번, 31번, 32번, 36번, 66번, 및 261번에 상응하는 위치의 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 폴리뉴클레오티드 서열 역시 본 출원의 범위에 포함된다.
- [36] 일 구현예로, 본 출원에서 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번, 36번, 66번, 및 261번 뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것일 수 있다.
- [37] 구체적으로, 본 출원에서 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되거나, 27번, 28번, 31번, 32번, 36번, 66번 및 261번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되거나, 27번, 28번, 31번, 32번, 36번, 및 66번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [38] 일 예로, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드의 27번, 28번, 31번, 32번, 36번, 66번, 및 261번에 상응하는 위치 중 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 또는 7개 뉴클레오티드를 다른 뉴클레오티드로 치환할 경우, 비치환된(비변형된) 프로모터 서열보다 더 높은 활성을 갖는 프로모터를 제공할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것일 수 있다. 또한, 추가적으로, 66번 및 261번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되거나, 66번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다.
- [39] 구체적인 예로, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 28번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 31번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 32번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 36번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 시토신(C)으로 치환된 것이거나; 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 28번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 31번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 32번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로,

36번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 시토신(C)으로, 66번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 261번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 구아닌(G)으로 치환된 것이거나; 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 28번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 31번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 32번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 36번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 시토신(C)으로, 66번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로 치환된 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

- [40] 보다 구체적인 예로, 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2, 3 또는 4의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성되는 것일 수 있다.
- [41] 또한 전술한 구현예에 제한되지 않고, 프로모터 활성을 크게 감소시키지 않는 범위에서 폴리뉴클레오티드 서열에 다양한 변형도 포함할 수 있다.
- [42] 본 출원에서 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 2, 3, 또는 4와 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다. 상동성 또는 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열은 상기 범주 중 100% 동일성을 갖는 서열은 제외되거나, 100% 미만의 동일성을 갖는 서열일 수 있다.
- [43] 한편 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 뉴클레오티드 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드', '특정 서열번호로 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드' 라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열로 구성된 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다.
- [44] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열 내부나 말단에 무의미한 서열이 부가되거나 혹은 해당 서열번호의 뉴클레오티드 서열 내부나 말단의 일부 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [45] 상동성(homology) 및 동일성(identity)은 두 개의 주어진 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [46] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [47] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드의 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 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서

코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

- [48] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 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.
- [49] 폴리뉴클레오티드의 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) 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, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.
- [50] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들어 전술한 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하고 동일한 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"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, 상동성(homology) 또는 동일성(identity)이 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 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

- [51] 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 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [52] 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°C 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [53] 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).
- [54] 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드는, 프로모터로서 이용될 수 있다.
- [55] 상기 프로모터는 mRNA로의 전사 개시부위의 5' 부위에 위치할 수 있다.
- [56] 상기 프로모터는 종래의 프로모터에 비하여 증가된 프로모터 활성을 가질 수 있다. 즉, 숙주 세포에서 목적 유전자의 발현뿐만 아니라 목적 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 본 출원의 목적상, 생산하고자 하는 산물에 따라 발현 강화를 위한 목적 유전자가 변경될 수 있고, 상기 프로모터는 목적 유전자의 강화를 위한 범용적 프로모터로서 사용될 수 있다.
- [57] 상기 "목적 유전자"는, 본 출원의 목적상 본 출원의 프로모터 서열에 의해 발현을 조절하고자 하는 유전자를 의미한다. 상기 목적 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 "목적 단백질"로 표현할 수 있고, 상기 "목적 단백질"을 코딩하는 유전자는 "목적 유전자"로 표현할 수 있다.
- [58] 또한, 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의

축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

- [59] 일 구현예로, 상기 목적 단백질은, 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh) 활성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 즉, 상기 프로모터의 목적 유전자는 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [60] 본 출원에서 "글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh)"는, "글루타메이트 디하이드로게나제" 등으로도 칭해질 수 있으며, 상기 글루탐산 탈수소효소는 글루타메이트의 2-옥소글루타레이트로의 대사에 관여하며 이의 활성 조절을 통해 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 이소류신 등의 유용 물질 생산성 향상 효과를 얻을 수 있다.
- [61] 글루탐산 탈수소효소를 코딩하는 유전자의 예로는, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 gdh 유전자(NCgl1999) 등이 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당업자는 공지의 데이터 베이스(GenBank 등)에서 글루탐산 탈수소효소를 코딩하는 유전자 정보를 쉽게 얻을 수 있다.
- [62] 또한 상기 글루탐산 탈수소효소를 구성하는 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있다.
- [63] 또한, 본 출원의 "글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드"는 상기 글루탐산 탈수소효소의 야생형, 비변이형 혹은 자연형뿐만 아니라, 이와 동일한 활성을 갖거나, 이보다 활성이 강화된 변이체 또한 포함한다.
- [64] 본 출원에서, "변이형 폴리펩티드"는 "변이체(variant)"와 동일한 의미로, 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 단백질을 지칭한다.
- [65] 변이체는 수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)과 상이하다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 단백질의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 단백질의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 본래 단백질(native protein)에 비하여 증가될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다.
- [66] 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이된 단백질, 변이 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent, variant 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에

제한되지 않는다. 본 출원의 목적상, 상기 변이체는 천연의 야생형 또는 비변형 단백질 대비 변이된 단백질의 활성이 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [67] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다.
- [68] 또한, 변이체는 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) 단백질의 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.
- [69]
- [70] 본 출원의 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 "gdh 유전자"로 칭할 수 있다.
- [71] 상기 유전자는 코리네박테리움 속 미생물 유래, 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있다.
- [72] 본 출원에서 "gdh 유전자" 즉 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다.
- [73] 본 출원의 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드는 변이체 서열도 포함하며, 구체적으로는 글루탐산 탈수소효소의 강화된 활성을 나타내도록 변이된 단백질 변이체도 포함할 수 있다.
- [74]
- [75] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 발현용 조성물을 제공한다.
- [76] 상기 유전자 발현용 조성물은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 발현시킬 수 있는 유전자를 발현할 수 있는 조성물을 의미한다.
- [77] 그 예로, 상기 유전자 발현용 조성물은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 추가로 상기 폴리뉴클레오티드를 프로모터로 작동시킬 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다.
- [78] 본 출원의 유전자 발현용 조성물에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 도입된 숙주

세포에서 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있게 벡터내에 포함된 형태일 수 있다.

[79]

[80] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[81]

본 출원에서 용어 "발현 카세트"란, 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고 있어서, 프로모터 하류에 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 단위 카세트를 의미한다. 구체적으로, 상기 발현 카세트는 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다. 본 출원에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드와 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[82]

이와 같은 유전자 발현 카세트의 내부 또는 외부에는 상기 목적 유전자의 효율적인 발현을 도울 수 있는 다양한 인자가 추가로 포함될 수 있다. 상기 유전자 발현 카세트는 통상 상기 목적 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter) 외에 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다.

[83]

일 구현예로, 상기 목적 단백질은 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드 일 수 있다.

[84]

[85] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함한다.

[86]

일 구현예로, 상기 목적 단백질은 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드 일 수 있다.

[87]

본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다.

[88]

본 출원의 목적 상, 상기 조절 서열에는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 포함될 수 있다.

[89]

한편 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등의 구성을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게

복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

- [90] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 발현 가능한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용하여 숙주세포를 형질전환시킬 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다.
- [91] 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λLB3, λBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다.
- [92] 또한, 숙주세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 내재적 프로모터를 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 예를 들면, pECCG117, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pCES208, pXMJ19 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는, 공지된 기술의 벡터를 이용할 수 있다 (대한민국 등록특허 제10-09240675호).
- [93] 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다. 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 야생형 폴리뉴클레오티드를 변이된 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다.
- [94] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 목적 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것 일 수 있다.
- [95] 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 목적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함할 수 있다. 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다.

- [96] 상기 발현 카세트는 통상 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 또한, 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [97] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [98] 본 출원의 목적 상, 상기 프로모터는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 일 수 있다.
- [99] 본 출원의 벡터를 형질전환시키는 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 (CaPO₄) 침전, 염화칼슘 (CaCl₂) 침전, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 카세트; 또는 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물을 제공한다.
- [101] 본 출원에서 용어 "미생물"은 야생형 미생물이나, 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물을 모두 포함하는 개념이다. 구체적으로는, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 포함하는 미생물일 수 있다.
- [102] 상기 목적 단백질은 글루탐산 탈수소효소 (glutamate dehydrogenase, gdh) 활성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드, 목적 단백질, 글루탐산 탈수소효소 (glutamate dehydrogenase, gdh) 활성을 갖는 폴리펩티드, 벡터, 및 발현 카세트에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [103] 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물일 수 있고, 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.
- [104] 상기 미생물은 글루탐산 탈수소효소를 발현하는 미생물, 또는 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드를 발현하는 미생물, 또는 글루탐산 탈수소효소 활성을 갖는 폴리펩티드가 도입된 미생물 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [105] 본 출원에서, 상기 미생물은 본 출원의 프로모터 활성을 갖는

폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 폴리뉴클레오티드 및/또는 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결되고 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 또는, 상기 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 유전자 발현 조절 서열 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 발현 카세트를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자, 벡터, 및 발현 카세트는 형질전환에 의해 상기 미생물에 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 나아가, 상기 미생물은 상기 유전자가 발현될 수 있다면, 상기 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자가, 염색체 상에 위치하거나 염색체 외에 위치하는 것과는 무관하다.

- [106] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질, 예를 들어 글루탐산 탈수소효소 혹은 이의 변이체가 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 상기 목적 단백질이 미생물 내 존재하는 단백질인 경우 내재적 또는 변형 전에 비하여 그 활성이 강화된 상태를 의미할 수 있다.
- [107] 구체적으로, "단백질의 도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타나게 되는 것일 수 있다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 발현 카세트가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다.
- [108] 또한, "활성의 강화"는 미생물이 가진 특정 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것일 수 있다. "내재적 활성"은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 의미하는 것일 수 있다.
- [109] 본 출원의 목적 상, 상기 활성 강화는 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 목적 단백질의 발현 조절 서열로 사용하여 이루어지는 것일 수 있다. 상기 목적 단백질은 전술한 바와 같이 자연형 혹은 변이형일 수 있으므로, 상기 발현 조절 서열은 단백질 변이체를 암호화하는 유전자의 발현 조절 서열이거나, 염색체 상의 자연형 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열일 수 있다.
- [110] 그 밖에, 다른 활성 강화 방법 또한 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 목적 단백질의 발현 조절 서열로 사용하는 것 이외에도, 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가, 염색체 상의 자연형 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자로 대체하는 방법, 상기 단백질 변이체의 활성이 강화되도록 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법, 및 미생물에 단백질 변이체를 도입하는 방법으로 이루어진 균으로부터

선택되는 어느 하나 이상의 방법을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [111] 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 미생물에서 목적 단백질의 발현 조절로 사용함으로써, 목적 단백질의 활성이 강화될 수 있다.
- [112] 예를 들어, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 비변형 미생물 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 최소 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% 또는 500%, 최대 1000% 또는 2000%까지 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [113] 본 출원에서 용어 "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 균주 자체이거나, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 미생물, 또는 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 미생물도 포함한다.
- [114] 본 출원에서 "목적 물질을 생산하는 미생물"은 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 물질 생산을 위한 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화시킨 미생물일 수 있다. 본 출원의 목적상 상기 목적 물질을 생산하는 미생물은, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하여, 야생형이나 비변형 미생물과 비교하여 목적하는 목적하는 물질을 과량으로 생산할 수 있는 미생물을 의미할 수 있다.
- [115] 상기 "목적 물질을 생산하는 미생물"은 "목적 물질 생산 미생물", "목적 물질 생산능을 갖는 미생물", "목적 물질 생산 균주", "목적 물질 생산능을 갖는 균주" 등의 용어와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [116] 상기 목적 물질은 아미노산, 구체적으로 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 또는 이소류신일 수 있다. 보다 구체적인 예로, 상기 라이신은 L-라이신, 상기 쓰레오닌은 L-쓰레오닌, 상기 이소류신은 L-이소류신일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [117] 본 출원의 목적상, 상기 목적 물질을 생산하는 미생물은 목적 물질, 구체적으로, 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 또는 이소류신의 생산능이 향상된 것일 수 있다.
- [118] 한편, 상기 목적 물질 생산 미생물은 야생형 미생물일 수 있고, 또는 재조합 미생물일 수 있다. 상기 재조합 미생물은 전술한 바와 같다. 상기 미생물은 추가로 목적 물질 생산능 증가를 위한 생합성경로 강화, 피드백 저해 해제, 분해경로 혹은 생합성 경로를 약화시키는 유전자 불활성화 등의 변이를 포함하는 것일 수 있고, 이러한 변이는 인공적으로, 예를 들어 UV 조사에 의해 일어날 수 있으나, 자연적인 것을 배제하는 것은 아니다.
- [119] 구체적으로, 상기 목적 물질 생산 미생물은 상기 목적 물질을 생산할 수 있도록 변이된 것일 수 있다. 예를 들어, 목적 물질의 생산능이 없는 미생물을 목적

물질의 생산능을 갖도록 변이되거나, 생산능을 강화시킨 미생물일 수 있다. 하나의 예로, 야생형 미생물에 목적 물질을 생산할 수 있도록 생합성 경로에 관여하는 단백질 또는 그의 변이체가 도입된 미생물일 수 있다(KR 10-2011994, KR 10-1947959, KR 10-1996769).

- [120] 구체적인 예로, 본 출원의 목적 물질 생산 미생물은 아스파토키나제(aspartokinase, lysC), 호모세린 디하이드로게나제(homoserine dehydrogenase, hom), 파이루베이트 카르복실라제(pyruvate carboxylase, pyc), L-쓰레오닌 디하이드라타제(L-threonine dehydratase, ilvA) 또는 이들의 조합을 포함하는 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다. 상기 아스파토키나제, 호모세린 디하이드로게나제, 파이루베이트 카르복실라제, 또는 L-쓰레오닌 디하이드라타제는 야생형 단백질이거나, 활성이 약화 또는 강화되어 목적 물질 생산에 이롭도록 변이된 단백질 변이체일 수 있다.
- [121] 본 출원의 미생물은 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 미생물에 비해 최소 1%, 5%, 10%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 22%, 25%, 29%, 33%, 38%, 44%, 45%, 또는 48% 이상의 목적 물질 생산능을 갖는 것일 수 있다.
- [122] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 목적 물질 제조방법을 제공한다. 상기 미생물, 목적 물질에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [123] 본 출원에서 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 이용하여 목적 물질을 생산하는 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. 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 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).
- [124] 본 출원의 균주의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 코리네박테리움 속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용될 수 있으며, 구체적으로는 본 출원의 균주를 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [125] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루타메이트, 메티오닌, 라이신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은

천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있고, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있다.

- [126] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [127] 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 있다.
- [128] 그 외에 상기 배지에는 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 균주의 배양 배지에는 L-아미노산 등이 첨가될 수 있다. 구체적으로는 글리신(glycine), 글루타메이트(glutamate), 및/또는 시스테인(cysteine) 등이 첨가될 수 있고, 필요에 따라서는 라이신(lysine) 등의 L-아미노산 이 더 첨가될 수 있으나 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [129] 상기 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [130] 본 출원에서, 균주의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [131] 배양물의 온도는 25°C 내지 40°C일 수 있으며, 보다 구체적으로는 28°C 내지 37°C 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생산량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 1 시간 내지 160 시간, 10 시간 내지 100 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [132] 상기 목적 물질 제조방법은, 상기 배양 단계 이후, 추가적인 공정을 더 포함할 수 있다. 상기 추가 공정은 목적 물질 용도에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [133] 구체적으로, 상기 목적 물질 제조방법은 상기 배양 단계 이후 상기 미생물, 상기 배지, 상기 미생물의 건조물, 상기 미생물의 추출물, 상기 미생물의 배양물, 상기 배양물의 상등액, 상기 미생물의 과쇄물 중에서 선택된 하나 이상의 물질로부터 목적 물질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [134] 상기 방법은 상기 회수 단계 이전, 혹은 동시에 미생물(균주)를 용균시키는

단계를 추가로 포함할 수 있다. 균주의 용균은 본 출원이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법, 예를 들어, 용균용 완충용액, 소니케이티, 열 처리 및 후렌치 프레스 등에 의해 실시할 수 있다. 또한 상기 용균 단계는 세포벽 분해 효소, 핵산 분해 효소, 핵산 전이 효소, 단백질 분해 효소 등 효소반응을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [135] 본 출원에서 "미생물의 건조물"은 "균주 건조물" 등의 용어와 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 미생물의 건조물은 목적 물질을 축적한 균체를 건조시켜 제조할 수 있으며, 구체적으로 사료용 조성물, 식품용 조성물 등에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [136] 본 출원에서 미생물의 추출물은 "균주 추출물" 등의 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 균주 추출물은, 상기 균주의 균체에서 세포벽을 분리하고 남은 물질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 균체를 용균시켜 수득한 성분에서 세포벽을 제외한 나머지 성분을 의미할 수 있다. 상기 균주 추출물은 목적 물질을 포함하며, 목적 물질 외의 성분으로는 단백질, 탄수화물, 핵산, 섬유질 중 하나 이상의 성분이 포함되어 있을 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [137] 상기 회수 단계는 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 목적 물질인 목적 물질을 회수할 수 있다.
- [138] 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있다. 상기 정제 공정은 균주로부터 목적 물질만을 분리하여 순수 정제하는 것일 수 있다. 상기 정제 공정을 통해, 순수 정제된 목적 물질이 제조될 수 있다.
- [139] 필요에 따라, 상기 목적 물질 제조방법은, 상기 배양 단계 이후 수득된 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 목적 물질 중에서 선택된 물질과 부형제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [140] 상기 부형제는 목적하는 용도나 형태에 따라 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 예를 들어, 전분, 글루코오스, 셀룰로오스, 락토오스, 글리코젠, D-만니톨, 소르비톨, 락티톨, 말토덱스트린, 탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메틸셀룰로오스, 콜로이드성실리카겔, 하이드록시프로필스타치, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤, 아라비아 검 중에서 선택되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 전분, 글루코오스, 셀룰로오스, 락토오스, 텍스트린, 글리코젠, D-만니톨, 말토덱스트린 중에서 선택되는 하나 이상의 성분일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [141] 상기 부형제는, 예를 들어, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [142] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오타이드가 다른 뉴클레오타이드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오타이드의, 프로모터로서의 용도를 제공한다.

[143] 상기 폴리뉴클레오티드에 대해서는 전술한 바와 같다.

[144]

발명의 실시를 위한 형태

[145] 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.

[146]

[147] 실시예 1. 신규 프로모터의 목적 유전자 발현 유도 활성 확인

[148] 실시예 1-1. 무작위 돌연변이법을 이용한 **gdh** 프로모터 변이 라이브러리

[149] 먼저, 미국 국립 보건원의 유전자은행(NIH GenBank)을 근거로 하여 야생형(wild type) 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 **gdh** 유전자(NCBI 등록번호 NCgl1999)의 프로모터 부위를 포함하는 염기서열(서열번호 1)을 확보하였다. 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 **gdh** 유전자의 프로모터를 주형으로 Diversify PCR Random Mutagenesis Kit(takara)를 이용하였고, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머를 이용하여 제조사의 매뉴얼대로 랜덤으로 돌연변이를 유발시켜 서열이 다른 **gdh** 프로모터 변이 PCR 산물(Pmgdh)을 수득하였다. 또한, GFP 유전자의 ORF(Open Reading Frame)는 pGFPuv 벡터(clontech, 미국)를 주형으로, 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, PCR은 94°C에서 5 분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 30 회 반복한 후, 72°C에서 7 분간 중합반응을 수행하여, GFP의 ORF를 포함하는 유전자 절편을 수득하였다.

[150] 상기 증폭 산물인 **gdh** 프로모터 변이 PCR 산물(Pmgdh) 및 GFP를 BamHI/SalI 제한효소로 절단하여 준비한 대장균-코리네박테리움 셔틀벡터(shuttle vector)인 pCES208(J.Microbiol. Biotechnol. 18:639-647, 2008)와 혼합하여, In-Fusion® HD 클로닝 키트(clontech)를 이용해 Pmgdh가 GFP와 연결되어 있는 재조합 벡터 라이브러리를 제작하였다. 각 벡터는 pCES_Pm1gdh_gfp 부터 pCES_Pm100gdh_gfp까지로 명명하였다.

[151] Pmgdh 라이브러리의 활성을 확인하기 위한 대조군으로는 야생형 **gdh** 유전자의 프로모터(서열번호 1)와 GFP가 연결되어 있는 재조합 벡터를 사용하였다. 야생형(wild type) 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032를 주형으로, 서열번호 5와 서열번호 6의 프라이머를 이용하여 야생형 **gdh** 유전자의 프로모터 유전자 절편을 수득하였다. 또한, GFP 유전자의 ORF(Open Reading Frame)는 pGFPuv 벡터(clontech, 미국)를 주형으로, 서열번호 7 및 8의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, PCR은 94°C에서 5 분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 30 회 반복한 후, 72°C에서 7 분간 중합반응을 수행하여, GFP의 ORF를 포함하는 유전자 절편을 수득하였다.

[152] 상기 증폭 산물인 **gdh** 야생형 프로모터 PCR 산물(Pgdh) 및 GFP를 BamHI/SalI

제한효소로 절단하여 준비한 대장균-코리네박테리움 셔틀벡터(shuttle vector)인 pCES208(J. Microbiol. Biotechnol. 18:639-647, 2008)와 혼합하여, In-Fusion® HD 클로닝 키트(clontech)를 이용해 Pgdh가 GFP와 연결되어 있는 재조합 벡터를 제작하였고, 이를 pCES_Pgdh_gfp라 명명하였다.

[153]

[154] 실시예 1-2. 형질전환 균주의 제작

[155] 벡터 pCES208 및 상기 실시예 1-1에서 제작된 재조합 벡터 pCES_Pmgdh_gfp 라이브리리(pCES_Pm1gdh_gfp 부터 pCES_Pm100gdh_gfp) 및 pCES_Pgdh_gfp를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 전기천공법(Appl. Microbiol. Biothcnol.(1999) 52:541-545)으로 형질전환한 후, 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환된 균주를 선별하여, 이를 각각 ATCC13032/pCES, ATCC13032/pCES_Pmgdh_gfp(ATCC13032/pCES_Pm1gdh_gfp 부터 ATCC13032/pCES_Pm100gdh_gfp) 및 ATCC13032/pCES_Pgdh_gfp로 명명하였다.

[156]

[157] 실시예 1-3. gdh 프로모터 변이 선별

[158] gdh 프로모터 변이체의 활성을 확인하기 위해, 상기 실시예 1-2에서 획득한 형질전환 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032/pCES, ATCC13032/pCES_Pgdh_gfp 및 ATCC13032/pCES_Pmgdh_gfp(ATCC13032/pCES_Pm1gdh_gfp 부터 ATCC13032/pCES_Pm100gdh_gfp)를 하기와 같은 방법으로 배양하고, GFP의 활성을 측정하였다.

[159] 구체적으로, 배지(포도당 20 g, 황산암모늄 5 g, 효모 추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 150 µg, 티아민 염산염 1.5 mg, 칼슘 판토텐산 3 mg, 니코틴아마이드 3 mg (중류수 1 L 기준), pH 7.2) 25 ml가 담긴 플라스크에 형질전환된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주들을 각각 접종하고 30°C에서 20 시간 동안 진탕 배양하였다. 원심분리(5,000 rpm, 15분)를 통하여 배양액으로부터 균체를 수거하여, 50mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 2회 세척한 후, 동 완충용액으로 현탁하였다. 현탁액 1.5ml 당 1.25g의 글래스 비드(glass bead)를 첨가한 후, 비드 비터 (bead beater)를 이용하여, 6분간 균체를 파쇄한 다음, 원심분리(15,000 rpm, 20분)를 통하여 상층액을 수거하여, 브레드포드 방법에 의한 단백질 농도를 정량하였다. 동일량의 균체 추출물에 대하여 Laure Gory 등의 방법 (FEMS Microbiology Letters 194, 127-133, 2001)을 이용하여 488nm에서 여기광을 조사하고, 511nm 발출광을 LS-50B spectrophotometer(Perkin-Elmer) 기기를 이용하여 측정함으로써, GFP 유전자의 발현 정도를 측정하였다. 대조군 ATCC13032/pCES_Pgdh_gfp 균주의 GFP 유전자 발현 정도와 비교하여, 가장 GFP 유전자 발현 정도가 높은 균주 상위 3종을 선별하였다(표 1).

[160]

[161] [표1]

균주	형광 감도
ATCC13032/pCES	0
ATCC13032/pCES_Pgdh_gfp	583
ATCC13032/pCES_Pm3gdh_gfp	1217
ATCC13032/pCES_Pm16gdh_gfp	1205
ATCC13032/pCES_Pm78gdh_gfp	1198

[162]

[163] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, Pm3gdh, Pm16gdh, Pm78gdh 프로모터는 코리네박테리움 글루타미쿰에서 프로모터 활성을 나타내며, 야생형 gdh 프로모터보다 높은 형광 감도를 나타내는 것을 확인하였다. 상기에서 선별된 4종 균주들의 gdh 프로모터에 도입된 변이를 확인하기 위하여, gdh 프로모터 변이체의 서열을 분석하였다. 서열을 결정하기 위해 서열 번호 9 및 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 서열 분석을 진행하였다. 야생형 gdh 프로모터 서열인 서열번호 1의 서열과 비교하였으며, 이를 통해 변이형 gdh 프로모터의 서열을 확인하였다. 선별된 균주의 gdh 프로모터 서열은 하기 표 2와 같다(표 2).

[164]

[165] [표2]

서열 번호	변이체	서열
2	Pm3gdh	ATTCTTTGTGGTCATATCTGTGCGACTGTGGTATACTTGA ACGTGAGCATTTACCAGCCTAAATGCCCCGAGTGAGTTA AGTCTCAAAGCAAGAAGTTGCTCTTTAGGGCATCCGTAG TTTAAAACTATTAACCGTTAGGTATGACAAGCCGTTGA TGTGAACGCAGTTTTTAAAAGTTTCAGGATCAGATTTTTTC ACAGGCATTTTGCTCCAGCAAACGCCTAGGATGTACATG GTGCCCTCAATGGGAACCACCAACATCACTAAATGGCCC AGGTACACACTTTAAAATCGTGCGCGCATGCAGCCGAGA TGGAACGAGGAAATC
3	Pm16gdh	ATTCTTTGTGGTCATATCTGTGCGACTGTGGTATACTTGA ACGTGAGCATTTACCAGCCTAAATGTCCGAGTGAGTTA AGTCTCAAAGCAAGAAGTTGCTCTTTAGGGCATCCGTAG TTTAAAACTATTAACCGTTAGGTATGACAAGCCGTTGA TGTGAACGCAGTTTTTAAAAGTTTCAGGATCAGATTTTTTC ACAGGCATTTTGCTCCAGCAAACGCCTAGGATGTACATG GTGCCCTCAATGGGAACCACCAACGTCCTAAATGGCCC AGGTACACACTTTAAAATCGTGCGCGCATGCAGCCGAGA TGGAACGAGGAAATC
4	Pm78gdh	ATTCTTTGTGGTCATATCTGTGCGACTGTGGTATACTTGA ACGTGAGCATTTACCAGCCTAAATGTCCGAGTGAGTTA AGTCTCAAAGCAAGAAGTTGCTCTTTAGGGCATCCGTAG TTTAAAACTATTAACCGTTAGGTATGACAAGCCGTTGA TGTGAACGCAGTTTTTAAAAGTTTCAGGATCAGATTTTTTC ACAGGCATTTTGCTCCAGCAAACGCCTAGGATGTACATG GTGCCCTCAATGGGAACCACCAACATCACTAAATGGCCC AGGTACACACTTTAAAATCGTGCGCGCATGCAGCCGAGA TGGAACGAGGAAATC

[166]

[167] 실시예 2. Pm3gdh, Pm16gdh, Pm78gdh 프로모터 변이 도입 벡터 제작

[168] 상기 Pm3gdh, Pm16gdh, Pm78gdh 프로모터 변이를 도입하기 위한 벡터를 제작하기 위하여, 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머를 이용하여 각각 pCES_Pm3gdh_gfp, pCES_Pm16gdh_gfp, pCES_Pm78gdh_gfp의 벡터를 주형으로 프로모터 변이에 해당하는 PCR 산물을 수득 하였다. 서열번호 11 및 서열번호

12, 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 세트를 이용하여 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주의 염색체를 주형으로 *gdh* 프로모터 업스트림(upstream) 영역과 *gdh*의 ORF 일부를 포함하는 유전자 절편을 수득하였다. PCR은 94 °C에서 5분간 변성 후, 94°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 1분 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합 반응을 수행하여, 각각의 PCR 산물을 수득하였다. 상기 세 증폭 산물을 미리 *Sma*I 제한효소로 절단하여 준비한 pDCM2 벡터(대한민국 공개번호 제10-2020-0136813호)와 혼합하여 In-Fusion® HD 클로닝 키트(clontech)를 이용해 재조합 벡터를 제작하였고, 이를 각각 pDCM2_Pm3*gdh_gdh*, pDCM2_Pm16*gdh_gdh*, pDCM2_Pm78*gdh_gdh*라 명명하였다.

[169]

[170] 실시예3. 목적산물 생산능 평가

[171] 3-1. 라이신 생산능 평가

[172] 3-1-1.*gdh* 프로모터 변이체가 도입된 L-라이신 생산 균주의 제작

[173] 실시예 2에서 제작된 pDCM2_Pm3*gdh_gdh*, pDCM2_Pm16*gdh_gdh*, pDCM2_Pm78*gdh_gdh* 벡터를 이용하여 *gdh* 프로모터 변이체가 형질전환된 균주를 제작하기 위하여, L-라이신 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P(Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40) 균주에 상기 벡터들을 형질전환시켜, 염색체 내로 *gdh* 프로모터 변이체 서열을 도입하였다. CJ3P 균주는 기 공지된 기술을 바탕으로 야생주에 3종의 변이(*pyc*(Pro458Ser), *hom*(Val59Ala), *lysC*(Thr311Ile))를 도입하여 L-라이신 생산능을 갖게된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주이다.

[174]

[175] 구체적으로, 상기 실시예 2에서 제작한 벡터들을 전기천공법으로 CJ3P 균주에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *gdh* 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P::Pm3*gdh_gdh*, CJ3P::Pm16*gdh_gdh*, CJ3P::Pm78*gdh_gdh*라 명명하였다.

[176]

[177] 3-1-2. *gdh* 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-라이신 생산능 평가

[178] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P 균주 및 실시예 3-1-1에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P::Pm3*gdh_gdh*, CJ3P::Pm16*gdh_gdh*, CJ3P::Pm78*gdh_gdh* 균주의 L-라이신 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

[179]

먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산

배지 24ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 32°C에서 48시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.

[180]

[181] <종 배지(pH 7.0)>

[182] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 1000 μ g, 칼슘-판토텐산 2000 μ g, 니코틴아미드 2000 μ g (증류수 1 리터 기준)

[183]

[184] <생산 배지(pH 7.0)>

[185] 포도당 45g, 대두 단백질 10g, 당밀 10g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, KH₂PO₄ 0.55 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 9mg, MnSO₄·5H₂O 9mg, 바이오틴 0.9mg, 티아민 염산염 4.5mg, CaCO₃ 30 g, 칼슘-판토텐산 4.5mg, 니코틴아미드 30mg, ZnSO₄ 0.45mg, CuSO₄ 0.45mg (증류수 1 리터 기준)

[186]

[187] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-라이신의 생산량을 측정하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 CJ3P, CJ3P::Pm3gdh_gdh, CJ3P::Pm16gdh_gdh 및 CJ3P::Pm78gdh_gdh 균주에 대한 배양액 중의 L-라이신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 3과 같다.

[188]

[189] [표3]

균주명	L-라이신 농도(g/L)	L-라이신 농도 증가율(%)
CJ3P	4.12	-
CJ3P::gdhPm3_gdh	4.96	20.39%
CJ3P::gdhPm16_gdh	4.84	17.48%
CJ3P::gdhPm78_gdh	4.79	16.26%

[190]

[191] 상기 표 3에 나타난 바와 같이 gdh 프로모터 변이체가 도입된 세 균주가 모균주인 CJ3P에 비해 L-라이신의 농도가 증가하는 것을 확인하였다. 상기 CJ3P::gdhPm3_gdh는 CM03-1660으로 명명하였으며, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2021년 4월 5일자로 기탁하여 수탁번호 KCCCM12970P를 부여받았다.

[192]

[193] 실시예 3-2. 쓰레오닌 생산능 평가

[194] 3-2-1. 쓰레오닌 생산 균주의 제작

[195] 실시예 2에서 제작된 pDCM2_Pm3gdh_gdh, pDCM2_Pm16gdh_gdh,

pDCM2_Pm78gdh_gdh 벡터를 이용하여 gdh 프로모터 변이체로 형질전환된 균주를 제작하기 위하여, 우선 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주를 기반으로 lysC(L377K) 변이체(대한민국 등록특허 제10-2011994호)와 hom(R398Q) 변이체(대한민국 등록특허 제10-1947959호)를 도입한 L-쓰레오닌 생산 균주를 제작하였다.

- [196] 구체적으로, L-쓰레오닌 생산 균주를 제작하기 위해 먼저, lysC(L377K)를 도입하기 위한 벡터를 제작하였다. 벡터를 제작하기 위해 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 17 및 18, 서열번호 19 및 20의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하여, 각각의 PCR 산물을 수득하였다. 상기 증폭 산물을 미리 SmaI 제한효소로 절단하여 준비한 pDCM2 벡터와 혼합하여 In-Fusion® HD 클로닝 키트를 이용해 재조합 벡터를 제작한 후, 이를 pDCM2_lysC(L377K)라 명명하였다.
- [197] 상기에서 제작한 pDCM2_lysC(L377K) 벡터를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 lysC 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주를 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 ATCC13032::lysC(L377K)라 명명하였다.
- [198] 또한 hom(R398Q)를 도입하는 벡터를 제작하기 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주의 염색체를 주형으로 서열번호 21 및 22의 프라이머, 서열번호 23 및 24의 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 상기 증폭 산물을 미리 SmaI 제한효소로 절단하여 준비한 pDCM2 벡터와 혼합하여 In-Fusion® HD 클로닝 키트를 이용해 재조합 벡터를 제작한 후, 이를 pDCM2_hom(R398Q)라 명명하였다.
- [199] 상기에서 제작한 pDCM2_hom(R398Q) 벡터를 상기에서 제작한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K) 균주에 전기천공법으로 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 hom 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주를 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)라 명명하였다.
- [200]

- [201] **3-2-2. gdh** 프로모터 변이체가 도입된 L-쓰레오닌 생산 균주의 제작
- [202] 상기 실시예 2에서 제작한 벡터들을 전기천공법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q) 균주에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 gdh 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm3gdh_gdh, ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm16gdh_gdh, ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm78gdh_gdh라 명명하였다.
- [203]
- [204] **3-2-3. gdh** 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-쓰레오닌 생산능 평가
- [205] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q), 실시예 3-2-2에서 제작된 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm3gdh_gdh, ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm16gdh_gdh 및 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm78gdh_gdh 균주의 L-쓰레오닌 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.
- [206] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 32°C에서 48시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.
- [207]
- [208] <종 배지(pH 7.0)>
- [209] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 바이오틴 100 μ g, 티아민 염산염 1000 μ g, 칼슘-판토텐산 2000 μ g, 니코틴아미드 2000 μ g (중류수 1 리터 기준)
- [210]
- [211] <생산 배지(pH 7.0)>
- [212] 포도당 45g, 대두 단백질 10g, 당밀 10g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, KH₂PO₄ 0.55 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 9mg, MnSO₄·5H₂O 9mg, 바이오틴 0.9mg, 티아민 염산염 4.5mg, CaCO₃ 30 g, 칼슘-판토텐산 4.5mg, 니코틴아미드 30mg, ZnSO₄ 0.45mg, CuSO₄ 0.45mg (중류수 1 리터 기준)
- [213]
- [214] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-쓰레오닌의 생산량을 측정하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q),

ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm3gdh_gdh, ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm16gdh_gdh 및 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm78gdh_gdh 균주에 대한 배양액 중의 L-쓰레오닌 농도 및 농도 증가율은 하기 표 4와 같다.

[215]

[216] [표4]

균주명	L-쓰레오닌 농도(g/L)	L-쓰레오닌 농도 증가율(%)
ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)	0.83	-
ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm3gdh_gdh	1.11	33.73%
ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm16gdh_gdh	0.95	14.46%
ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)::Pm78gdh_gdh	1.02	22.89%

[217]

[218] 상기 표 4에 나타난 바와 같이 gdh 프로모터 변이체가 도입된 세 균주가 모균주인 ATCC13032::lysC(L377K)_hom(R398Q)에 비해 L-쓰레오닌의 농도가 증가하는 것을 확인하였다.

[219]

[220] 실시예 3-3. O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[221] 3-3-1. gdh 프로모터 변이체가 도입된 O-아세틸 호모세린 생산 균주의 제작

[222] 상기 실시예 2에서 제작한 벡터들을 전기천공법으로 야생형 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 gdh 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::Pm3gdh_gdh, ATCC13032::Pm16gdh_gdh, ATCC13032::Pm78gdh_gdh라 명명하였다.

[223]

[224] 3-3-2. gdh 프로모터 변이체가 도입된 균주의 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[225] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032, 실시예 3-3-1에서 제작된 ATCC13032::Pm3gdh_gdh, ATCC13032::Pm16gdh_gdh 및 ATCC13032::Pm78gdh_gdh 균주의 O-아세틸 호모세린 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.

- [226] 하기의 배지 25ml을 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 33도에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다.
- [227]
- [228] <생산 배지(pH 7.2)>
- [229] 포도당 30g, KH₂PO₄ 2g, 요소 3g, (NH₄)₂SO₄ 40g, 펩톤 2.5g, CSL(Corn steep liquor, Sigma) 5g(10ml), MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCO₃ 20g (중류수 1 리터 기준)
- [230]
- [231] 배양 종료 후 HPLC로 O-아세틸 호모세린의 생산능을 측정하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032, ATCC13032::Pm3gdh_gdh, ATCC13032::Pm16gdh_gdh 및 ATCC13032::Pm78gdh_gdh 균주에 대한 배양액 중의 O-아세틸 호모세린 농도 및 농도 증가율은 하기 표 5와 같다.
- [232]
- [233] [표5]

균주명	O-아세틸 호모세린 농도(g/L)	O-아세틸 호모세린 농도 증가율(%)
ATCC13032	0.31	-
ATCC13032::Pm3gdh_gdh	0.45	45.16%
ATCC13032::Pm16gdh_gdh	0.39	25.80%
ATCC13032::Pm78gdh_gdh	0.43	38.70%

- [234]
- [235] 상기 표 5에 나타난 바와 같이 gdh 프로모터 변이체가 도입된 세 균주가 모균주인 야생형 균주 ATCC13032에 비해 O-아세틸 호모세린의 농도가 증가하는 것을 확인하였다.
- [236]
- [237] 실시예 3-4. L-이소류신 생산능 평가
- [238] 3-4-1. gdh 프로모터 변이체가 도입된 L-이소류신 생산 균주의 제작
- [239] 실시예 2에서 제작된 pDCM2_Pm3gdh_gdh, pDCM2_Pm16gdh_gdh, pDCM2_Pm78gdh_gdh 벡터를 이용하여 gdh 프로모터 변이체가 형질전환된 균주를 제작하기 위하여, 우선 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1(대한민국 등록특허 제10-1996769호) 균주에 상기 벡터들을 형질전환시켜, 염색체 내로 gdh 프로모터 변이체 서열을 도입하였다. 이후, 기 공지된 L-쓰레오닌 디하이드라타제(L-threonine dehydratase)를 코딩하는 ilvA 유전자의 323번째 아미노산인 발린이 알라닌으로 변이된 ilvA 유전자(V323A)(Appl. Enviro.

- Microbiol., Dec. 1996, p.4345-4351)를 포함하는 벡터를 추가로 도입하여 L-이소류신 생산 균주를 제작하였다(대한민국 등록특허 제10-1996769호).
- [240] 구체적으로, 상기 실시예 2에서 제작한 벡터들을 전기천공법으로 CJP1 균주에 도입한 후 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 제조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *gdh* 프로모터 변이체가 도입된 균주를 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 통해 선별하였고, 상기 선별된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1::Pm3*gdh_gdh*, CJP1::Pm16*gdh_gdh*, CJP1::Pm78*gdh_gdh*라 명명하였다.
- [241] 상기 제작된 균주에 pECCG117-*ilvA*(V323A) 벡터(대한민국 등록특허 제10-1996769호)를 전기천공법으로 도입한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였고, 상기 선별된 균주를 각각 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1::Pm3*gdh_gdh*/pECCG117-*ilvA*(V323A), CJP1::Pm16*gdh_gdh*/pECCG117-*ilvA*(V323A) 및 CJP1::Pm78*gdh_gdh*/pECCG117-*ilvA*(V323A)라 명명하였다.
- [242]
- [243] **3-4-2. *gdh* 프로모터 변이체가 도입된 균주의 L-이소류신 생산능 평가**
- [244] 모균주로 이용한 코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1/pECCG117-*ilvA*(V323A), 실시예 3-4-1에서 제작된 CJP1::Pm3*gdh_gdh*/pECCG117-*ilvA*(V323A), CJP1::Pm16*gdh_gdh*/pECCG117-*ilvA*(V323A) 및 CJP1::Pm78*gdh_gdh*/pECCG117-*ilvA*(V323A) 균주의 L-이소류신 생산능을 평가하기 위해 하기와 같은 방법으로 균주를 배양한 후, 분석하였다.
- [245] 먼저, 종 배지 25ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안 200rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24ml를 함유하는 250ml 코너-바플 플라스크에 1ml의 종 배양액을 접종하고, 32°C에서 48시간 동안, 200rpm으로 진탕 배양하였다. 상기 종 배지 및 생산 배지의 조성은 하기와 같다.
- [246]
- [247] <종 배지(pH 7.0)>
- [248] 포도당 20g, 펩톤 10g, 효모추출물 5g, 요소 1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 바이오틴 100μg, 티아민 염산염 1000μg, 칼슘-판토텐산 2000μg, 니코틴아미드 2000μg (중류수 1 리터 기준)
- [249]
- [250] <생산 배지(pH 7.0)>
- [251] 포도당 45g, 대두 단백질 10g, 당밀 10g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, KH₂PO₄ 0.55 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 9mg, MnSO₄·5H₂O 9mg, 바이오틴 0.9mg, 티아민 염산염 4.5mg, CaCO₃ 30 g, 칼슘-판토텐산 4.5mg, 니코틴아미드 30mg, ZnSO₄ 0.45mg, CuSO₄ 0.45mg (중류수 1 리터 기준)

- [252] 배양 종료 후 HPLC를 이용해 L-이소류신의 생산량을 측정하였다.
코리네박테리움 글루타미쿰 CJP1/pECCG117-ilvA(V323A),
CJP1::Pm3gdh_gdh/pECCG117-ilvA(V323A),
CJP1::Pm16gdh_gdh/pECCG117-ilvA(V323A) 및
CJP1::Pm78gdh_gdh/pECCG117-ilvA(V323A) 균주에 대한 배양액 중의
L-이소류신 농도 및 농도 증가율은 하기 표 6과 같다.

[253]

[254] [표6]

균주명	L-이소류신 농도(g/L)	L-이소류신 농도 증가율(%)
CJP1/pECCG117-ilvA(V323A)	0.74	-
CJP1::Pm3gdh_gdh/pECCG117-ilvA(V323A)	1.10	48.65%
CJP1::Pm16gdh_gdh/pECCG117-ilvA(V323A)	0.96	29.73%
CJP1::Pm78gdh_gdh/pECCG117-ilvA(V323A)	1.07	44.59%

[255]

- [256] 상기 표 6에 나타난 바와 같이 gdh 프로모터 변이체가 도입된 세 균주가 모균주인 야생형 균주 CJP1/pECCG117-ilvA(V323A)에 비해 L-이소류신의 농도가 증가하는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 통해, 본 출원의 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 미생물이 산업에 유용한 L-라이신, L-쓰레오닌, O-아세틸 호모세린 및 L-이소류신의 생산성을 증가시키는 것을 확인하였다.

[257]

- [258] 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.

[259]

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 glutamicum</i> CM03-1660	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12970P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2021년 4월 5일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2021. 04. 05.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2021년 5월 12일

특허법인 한일 인



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 추가적으로 66번 및 261번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 추가적으로 66번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 28번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 31번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 32번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 36번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 시토신(C)으로 치환된 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 28번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 31번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 32번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 36번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 시토신(C)으로, 66번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 261번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 구아닌(G)으로 치환된 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3으로 표시되는 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 티민(T)으로, 28번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 31번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 구아닌(G)으로, 32번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로, 36번 뉴클레오티드인 아데닌(A)이 시토신(C)으로, 66번 뉴클레오티드인 시토신(C)이 티민(T)으로 치환된 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4로 표시되는 것인, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결되는,

- 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 카세트.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 목적 단백질은 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh)인, 발현 카세트.
- [청구항 13] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드; 또는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 목적 단백질은 글루탐산 탈수소효소(glutamate dehydrogenase, gdh)인, 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인, 미생물.
- [청구항 16] 제13항의 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기의 배지에서 목적 물질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 물질을 생산하는 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 목적 물질은 라이신, 쓰레오닌, O-아세틸 호모세린, 또는 이소류신인, 방법.
- [청구항 18] 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 27번, 28번, 31번, 32번 및 36번 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환된, 프로모터 활성을 갖는 폴리뉴클레오티드의, 프로모터로서의 용도.