

명세서

발명의 명칭: 신규한 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 변이체 및 이를 이용한 O-숙시닐 호모세린의 제조방법

기술분야

- [1] 본 출원은 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 변이체, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 변이체를 포함하는 미생물 및 상기 미생물을 이용한 O-숙시닐 호모세린의 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] O-숙시닐 호모세린은 생체 내 필수 아미노산의 한 종류인 메치오닌의 전구체로 작용한다. 메치오닌은 사료 및 식품 첨가제뿐만 아니라 수액제, 의약품의 합성 원료로 사용된다.
- [4] 메치오닌은 화학 합성과 생물학적 합성을 통해 생산된다. 한편, 발효를 통해 생산한 L-메치오닌 전구체로부터 효소전환 반응에 의하여 L-메치오닌을 생산하는 이단계 공법(국제 공개출원 WO/2008/013432)도 공지되었다.
- [5] 상기의 이단계 공법에서는 메치오닌 전구체로 O-숙시닐 호모세린 (O-succinyl homoserine)과 O-아세틸 호모세린 (O-acetyl homoserine)이 사용되며, 메치오닌의 경제적인 대량 생산을 위하여 O-숙시닐 호모세린을 고수율로 생산하는 것이 매우 중요하다.
- [6] *metA* 유전자는 호모세린(Homoserine)에 숙시닐코에이(Succinyl-coA)의 숙시닐 부위(Succinyl group)를 결합시켜 O-숙시닐 호모세린(O-succinyl homoserine)을 만드는 효소인 호모세린 O-숙시닐트랜스퍼라제(homoserine O-succinyltransferase, MetA)를 코딩하는 유전자로서, O-숙시닐 호모세린 생산 균주의 개발에 있어서 가장 중요한 유전자 중 하나이다.
- [7] 메치오닌 생합성 경로에서 시스타치오닌 감마 신타아제(cystathionine gamma synthase)를 코딩하는 *metB* 유전자 결손을 통해 O-숙시닐호모세린이 축적되는 균주를 제작할 수 있다. 하지만, O-숙시닐 호모세린 생산 균주는 L-메치오닌 요구성을 나타낸다. 이런 이유로 배지에 첨가된 메치오닌에 의해서 호모세린 O-숙시닐트랜스퍼라제가 피드백저해(feedback inhibition)를 받아 활성이 억제되고 최종적으로는 고농도의 O-숙시닐 호모세린을 얻을 수 없게 된다.
- [8] 따라서, 종래의 많은 특허들은 피드백 조절 체계로부터 *metA*의 피드백 저해를 해제하는 연구에 집중되었다. 하지만, *metA*에 의해서 코딩되는 호모세린 O-숙시닐트랜스퍼라제는 야생형 단백질 자체로도 안정성이 낮고, 피드백해제를 위해서 변이가 도입되면 불안정성이 더 커지는 문제점을 안고 있다. 높은 생산능을 가지는 O-숙시닐 호모세린 생산 균주의 개발을 위해서는 *metA* 유전자의 피드백 저해가 제거되고 효소 안정성이 확보될 필요가 있다.

- [9] 자연계에 존재하는 대부분의 미생물은 메치오닌을 생합성하기 위해서 O-숙시닐호모세린 또는 O-아세틸 호모세린을 중간체로 이용하는데 일반적으로 MetA는 O-숙시닐 호모세린을, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제(homoserine O-acetyltransferase, MetX)는 O-아세틸 호모세린을 생성시킨다. 그리고, MetX는 MetA와는 달리 피드백저해를 받지 않으며 효소 안정성도 높다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 O-숙시닐 호모세린의 생산을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, O-숙시닐 호모세린을 합성하는 활성을 가지는 단백질을 발굴함으로써 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열 내 313번째 위치에서 알지닌으로의 치환, 및 176번째 위치에서 글루타민 이외의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하는, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 가지는 폴리펩티드를 제공하는 것이다.
- [14] 본 출원의 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [15] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움(*corynebacterium*)속 미생물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양된 미생물 또는 배지에서 O-숙시닐 호모세린을 분리 또는 회수하는 단계를 포함하는, O-숙시닐 호모세린 생산방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 O-숙시닐 호모세린과 황화물을 반응시키는 단계를 포함하는, L-메치오닌 생산방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 출원에 따른 변이된 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 단백질은 천연형에 비하여 O-숙시닐 호모세린 전환 활성이 증대시키는 바, 기존의 화학합성 경로의 대안으로 보다 효율적인 O-숙시닐 호모세린의 대량 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[20]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21]

- [22] 이하에서는, 본 출원을 더욱 상세히 설명한다.
- [23]
- [24] 한편, 본 출원에서 개시되는 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 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [25] 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.
- [26]
- [27] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는, 신규한 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 가지는 폴리펩티드를 제공하는 것이다. 상기 신규한 변이형 폴리펩티드는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 유래의 아미노산 서열, 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열에서 313번째 아미노산이 알지닌으로 치환되고, 176번째 아미노산이 글루타민 이외의 다른 아미노산으로 치환된, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 가지는 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열 내 313번째 위치에서 알지닌으로의 치환, 및 176번째 위치에서 글루타민 이외의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 갖는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 상기 176번째 아미노산이 아스파라긴, 트립토판, 히스티딘 또는 글리신으로 치환된, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [28] 이와 같은 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제의 활성을 갖는 폴리펩티드에 비해 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성이 강화된 특징을 갖는다.
- [29]
- [30] 본 출원에서 용어, "O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성"은 호모세린(Homoserine)을 O-숙시닐 호모세린(O-succinyl homoserine)으로 전환하는 활성을 의미한다. 상기 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제는 숙시닐 CoA와 L-호모세린을 기질로 하여 CoA와 O-숙시닐 호모세린으로 전환할 수 있는 효소를 통칭한다.
- [31] [반응식]
- [32] 숙시닐 CoA + L-호모 세린 $\rightleftharpoons$ CoA + O-숙시닐 호모세린
- [33]
- [34] 본 출원에서 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제는, O-아세틸

호모세린트랜스퍼라제인 MetX 단백질의 아미노산 서열 중 일부를 다른 아미노산으로 변환하여 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제의 활성을 갖는 것을 의미한다. 상기 MetX 단백질은 코리네박테리움 속 유래 MetX일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 유래 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 갖는 MetX일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 MetX 단백질은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다.

[35]

[36] 본 출원에 있어서, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제를 확보하는 방법은 당해 분야에서 잘 알려진 다양한 방법이 적용 가능하다. 그 방법의 예로는 효소 발현에 통상적으로 널리 이용되는 코리네박테리움 속 미생물에서 효소를 고효율로 확보할 수 있도록 코돈 최적화가 포함된 유전자 합성 기술 그리고 미생물의 대량 유전체 정보를 기반으로 생물정보학적 방법에 의해 유용 효소자원의 스크리닝 방법을 통해 확보할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[37] 본 출원에서 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 변이체는, "변이된 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제" 또는 "변이형 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제"로 혼용될 수 있다. 한편, 이러한 변이체는 비자연적인 (non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[38]

[39] 본 출원의 변이된 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제는 구체적으로, 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 갖는 코리네박테리움속(*Corynebacterium* sp.) 유래 MetX의 N-말단으로부터 313번째 아미노산 잔기가 알지닌으로 치환되고, 176번째 아미노산이 글루타민 이외의 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로는 상기 176번째 글루타민 아미노산 잔기가 아스파라긴, 트립토판, 히스티딘 또는 글리신으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 변이된 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제는, 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열의 N-말단으로부터 313번째 및/또는 176번째 위치에 변이를 포함하는 폴리펩티드를 포함하고; 상기 313번째 위치의 변이는 알지닌으로의 아미노산 치환, 및/또는 176번째 위치의 변이는 아스파라긴, 트립토판, 히스티딘 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환을 포함하고; 상기 폴리펩티드는 서열번호 1과 적어도 85% 이상 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[40]

또한, 본 출원의 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 가지는 폴리펩티드는 서열번호 63, 서열번호 75, 서열번호 95 및 서열번호 97으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다. 구체적으로 이는 서열번호 1의 N 말단으로부터 313번째 아미노산이 알지닌(arginine)으로, 176번째 아미노산이

아스파라긴(asparagine), 트립토판(tryptophan), 히스티딘(histidine) 또는 글리신(glycine)으로 변이된 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 가지는 폴리펩티드에 대한 아미노산 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 변이를 포함하고 야생형보다 우수한 O-숙시닐 호모세린 전환 활성을 가지는 이상 상기 서열들과 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 제한없이 포함할 수 있다.

[41]

[42] 또한, 본 출원에서 MetX는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 MetX 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 본 출원의 상기 MetX 단백질은 서열번호 1 및 상기 서열번호 1과 적어도 80 % 이상, 85 % 이상, 구체적으로는 90 % 이상, 더욱 구체적으로는 95%이상, 보다 더욱 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 나타내는 단백질을 포함할 수 있다.

[43] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드 "변이형 (variant)"은 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 폴리펩티드의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드를 지칭한다. 변이형 폴리펩티드는 수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)와 상이하다. 이러한 변이형은 일반적으로 상기 폴리펩티드 서열 중 하나를 변형하고, 상기 변형된 폴리펩티드의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이형의 능력은 본래 단백질(native protein)에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 이러한 변이형은 일반적으로 상기 폴리펩티드 서열 중 하나를 변형하고, 변형된 폴리펩티드의 반응성을 평가하여 식별될 수 있다. 또한, 일부 변이형은 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이형을 포함할 수 있다. 다른 변이형은 성숙 단백질 (mature protein) 의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이형을 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이형"은 변이체, 변형, 변이된 단백질, 변이형 폴리펩티드, 변이, 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 변이형은 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제의 아미노산이 변이되어 그 활성이 야생형과 비교하여 효율적으로 증가될 수 있는 변이형을 포함한다.

[44] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이형은 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. 예를 들면, 양으로 하전된 (염기성) (Positively charged (basic)) 아미노산은 알라닌, 리신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) (negatively charged (acidic)) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다. 통상적으로, 보존성 치환은 생성된 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않는다.

- [45] 또한, 변이형은 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함하는 다른 변형을 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. 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 변이형 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 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [46] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 63, 서열번호 75, 서열번호 95 및 서열번호 97의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 단백질 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 80% 이상, 85% 이상, 구체적으로는 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 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[47]

[48] 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.

[49] 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.

[50] 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).

[51]

[52] 상동성(homology) 또는 동일성(identity)은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

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

[54] 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 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려될 수 있다.

[55] 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 ET AL.], (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [56] 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 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.
- [57]
- [58] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [59] 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 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [60] 본 출원에서 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 변이형 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 유전자이며, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 유래일 수 있다. 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의 변이체 또한 본 출원에 포함되며, 그 예로 서열번호 64, 서열번호 76, 서열번호 96 또는 서열번호 98로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 또한, 변이형 폴리뉴클레오티드 역시 유전 암호의 축퇴성(genetic code degeneracy)에 기인하여 동일 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열 및 이의

변이체 또한 본 출원에 포함된다.

[62]

[63] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 본 출원은 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포 및 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다. 구체적으로 상기 도입은 형질전환에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[64]

구체적으로 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 야생형 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 폴리펩티드를 포함하는 미생물에 비하여 숙주세포의 성장을 저해함이 없이 O-숙시닐 호모세린의 생산능이 향상되므로, 이들 미생물로부터 O-숙시닐 호모세린을 고수율로 수득할 수 있다.

[65]

[66] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.

[67]

본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[68]

본 출원에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 또한, 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성

또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[69]

[70] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 형질전환 하는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , 또는 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 침전, 염화칼슘 (CaCl_2) 침전, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[72]

[73] 본 출원에서 사용되는 용어 "O-숙시닐 호모세린을 생산하는 미생물"이란, 자연적으로 O-숙시닐 호모세린 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 O-숙시닐 호모세린 생산능이 없는 모균주에 O-숙시닐 호모세린의 생산능이 부여된 미생물을 의미한다.

- [74] 상기 O-숙시닐 호모세린을 생산하는 미생물은, 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어 변이형 폴리펩티드를 발현할 수 있는 세포 또는 미생물로서, 본 출원의 목적상 상기 숙주세포 또는 미생물은 MetX 변이형 폴리펩티드를 포함하여 O-숙시닐 호모세린을 생산할 수 있는 미생물이라면 모두 가능하다. 구체적 예로, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 엔테로박테리아(*Enterobacteria*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속 또는 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 등의 미생물 군주가 포함될 수 있으며, 구체적으로 코리네박테리움 속 미생물일 수 있고, 보다 구체적인 예로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [75] 본 출원에서 용어 "O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 (the genus *Corynebacterium*) 미생물"이란, 천연형 또는 변이를 통하여 O-숙시닐 호모세린 생산능을 가지고 있는 코리네박테리움 속 미생물을 의미한다. 코리네박테리움 속 미생물의 배양물이 O-숙시닐 호모세린을 가지고 있는 것은 이미 알려져 있었다. 다만, O-숙시닐 호모세린의 생산능이 현저히 낮으며 생산 기작에 작용하는 유전자나 기작 원리가 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서, 본 출원에서 O-숙시닐 호모세린 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물이란 천연형 미생물 자체 또는 외부 O-숙시닐 호모세린 생산 기작과 관련된 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성을 강화시키거나 불활성시켜 향상된 O-숙시닐 호모세린 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물을 의미한다.
- [76] 본 출원에서 "코리네박테리움 속 미생물"은 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰, 코리네박테리움 암모니아게네스, 브레비박테리움 락토펙테럼 (*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범 (*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 써모아미노게네스 (*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 에피션스 (*Corynebacterium efficiens*) 등이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로는, 본 출원에서 코리네박테리움 속 미생물은 고농도의 O-숙시닐 호모세린에 노출되더라도 세포 성장과 생존에 영향을 적게 받는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.
- [77]
- [78] 상기 미생물은, 시스타치오닌 신타아제(cystathionine synthase), O-아세틸 호모세린 (티올)-라이아제, 및 호모세린 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 단백질 활성이 불활성화될 수 있다. 즉, 상기에서 선택된 1개 단백질 활성, 2개 단백질 활성 또는 3개 모두의 활성이 불활성이 될 수 있다.
- [79] 본 출원에서 용어, 단백질 활성의 "불활성화"는 내재적 활성에 비하여 활성이

약화되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다.

- [80] 이러한 단백질 활성의 불활성화는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 단백질의 활성이 제거된 경우를 포함하여 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 효소의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열을 활성이 약하거나 없는 서열로 교체하는 방법(예컨대, 상기 유전자의 프로모터를 내재적 프로모터보다 약한 프로모터로 교체하는 방법); 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 염색체상의 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하여 상기 mRNA로부터 단백질로의 번역을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 안티센스 RNA)를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 SD 서열 앞단에 SD 서열과 상보적인 서열을 인위적으로 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하게 만드는 방법 및 해당 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 역전사되도록 프로모터를 부가하는 RTE(Reverse transcription engineering) 방법 등이 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 상기 예에 의해 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [81] 구체적으로, 단백질을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전체를 결실하는 방법은, 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내 내재적 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 일부 핵산 서열이 결실된 폴리뉴클레오타이드 또는 마커 유전자로 교체함으로써 수행될 수 있다. 이의 일례로 상동재조합에 의하여 유전자를 결실시키는 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기에서 "일부"란 폴리뉴클레오타이드의 종류에 따라서 상이하고, 당업자가 적절히 결정할 수 있으나, 구체적으로는 1 내지 300개, 보다 구체적으로는 1 내지 100개, 보다 더 구체적으로는 1 내지 50개일 수 있다. 그러나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [82] 또한, 발현 조절서열을 변형하는 방법은 상기 발현 조절서열의 활성을 더욱 불활성화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 약한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함으로써 수행할 수 있다. 상기 발현 조절서열에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [83] 아울러, 염색체상의 유전자 서열을 변형하는 방법은 상기 단백질의 활성을 더욱 불활성화하도록 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. 구체적으로, 상기 미생물은 시스타치오닌 감마-신타제를 코딩하는 *metB* 유전자, O-숙시닐 호모세린의 분해경로인 O-아세틸 호모세린 (티올)-라이아제를 코딩하는 *metY* 유전자, 및 호모세린 키나아제를 코딩하는 유전자 *thrB*로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 유전자가 추가로 결손 또는 약화될 수 있다.

- [84] 본 출원에서 사용되는 상기 용어 "결손(deletion)"은 목적 유전자의 개시코돈에 해당하는 염기서열로부터 종결코돈까지의 염기서열 영역 혹은 그 조절부위 염기서열 중 일부 혹은 전부를 염색체 내부에서 제거한 형태를 의미한다.
- [85] 본원에서 사용되는 상기 용어 "약화(weakening)"는 미생물 군주에서 상응하는 DNA에 의해 코딩되는 하나 이상의 효소에 대한 세포 내 활성을 제거하거나 감소시키는 것을 의미하는데, 예를 들어, 유전자의 프로모터(promoter) 부위 및 5'-UTR 부위의 염기서열을 변형시킴으로써 단백질의 발현을 약화시키거나 해당 유전자의 ORF 부위에 돌연변이를 도입함으로써 단백질의 활성을 약화시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 미생물은 시스타치오닌 감마-신타제를 코딩하는 *metB* 유전자, O-숙시닐 호모세린의 분해경로인 O-아세틸 호모세린 (티올)-라이아제를 코딩하는 *metY* 유전자, 및 호모세린 키나아제를 코딩하는 유전자 *thrB*로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 유전자가 추가로 결손 또는 약화될 수 있다.
- [86]
- [87] 또한, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 아스파토키나아제 (aspartokinase) 활성이 비변이 미생물에 비하여 추가로 강화된, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다.
- [88] 본 출원에서 용어, 단백질의 활성의 "강화"는 상기 단백질의 활성이 도입되거나, 또는 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 활성의 "도입"은, 자연적 혹은 인위적으로 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 폴리펩타이드의 활성이 나타나게 되는 것을 의미한다.
- [89] 본 출원에서 용어, 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 "증가"한다는 것은, 미생물이 가진 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미한다. 상기 "내재적 활성"은, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다. 변형 전 활성으로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [90] 구체적으로, 본 출원에서 활성 증가는,
- [91] 1) 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,
- [92] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,
- [93] 3) 상기 단백질의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형,
- [94] 4) 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 상기

- 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 도입, 또는
- [95] 5) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [96]
- [97] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터에 본원의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터에 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 숙주세포 내에 도입됨으로써 상기 숙주세포의 염색체 내 상기 폴리뉴클레오티드의 카피수를 증가하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [98] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 가지는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [99]
- [100] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있는데, 상기 강력한 프로모터의 예로는 CJ7 프로모터(대한민국 등록특허 제0620092호 및 WO2006/065095), lysCP1 프로모터(WO2009/096689), EF-Tu 프로모터, groEL 프로모터, aceA 혹은 aceB 프로모터 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [101] 또한, 4) 외래 폴리뉴클레오티드 서열의 도입은, 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 도입된 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된

형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.

[102]

[103] 마지막으로, 5) 상기 1) 내지 4)의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법은, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 및 상기 단백질의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.

[104]

[105] 본 출원에서, 상기 유전자 또는 폴리뉴클레오티드들의 서열은 미국생물공학정보센터(NCBI)와 같은 데이터베이스로부터 얻을 수 있다.

[106]

[107] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 본 출원은 기술된 미생물을 배양하는 단계 및 배양된 미생물 또는 배양 배지로부터 O-숙시닐 호모세린을 회수하는 단계를 포함하는, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 방법을 제공한다.

[108] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 본 출원은 기술된 미생물을 배양하는 단계 및 배양된 미생물 또는 O-숙시닐 호모세린과 황화물을 반응시키는 단계를 포함하는, L-메치오닌 생산방법을 제공한다.

[109] 구체적으로 상기 황화물과 반응시키는 단계는 공지된 어느 방법을 이용하여서 O-숙시닐 호모세린으로부터 L-메치오닌을 생성하는 것을 의미한다. 일 예로 황화물인 메틸머캅탄을 O-숙시닐 호모세린과 반응시켜, L-메치오닌을 생산할 수 있고, 황화물인 시스테인을 반응시켜 시스타치오닌을 생성한 후, 단계적 반응에 의해서 메치오닌을 생산할 수 있다. 또한, 각 반응의 속도 및 수율 향상을 위해서 촉매나 효소를 첨가하거나, 효소를 포함하는 미생물 내에서 반응시킬 수 있다.

[110] 상기 'O-숙시닐 호모세린'은, 본 출원의 기술된 미생물이 생산한 O-숙시닐 호모세린을 함유한 발효액이거나, 정제된 형태일 수 있다. 또한 상기의 '황화물'은 예를 들어 메틸머캅탄일 수 있고, 상기 메틸머캅탄은 액상의 소듐메틸머캅탄(sodium methyl mercaptan, $\text{CH}_3\text{S-Na}$) 형태, 가스 또는 액화 상태의 메틸머캅탄(CH_3SH) 뿐만 아니라 국제 공개특허 제WO2010/098629호에 언급된 형태로 디메칠설파이드(DMS, Dimethylsulfide)를 포함한 메틸머캅탄 등 황 원자를 제공할 수 있는 형태를 포함하고 있는 메틸머캅탄 유도체 모두를 의미할 수 있다.

[111] 상기 L-메치오닌을 생산하는 방법은 당업계에 공지된 최적화된 배양 조건 및 효소 활성 조건에서 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적인 배양 방법 및 배지는 상기 설명한 바와 같다.

[112]

[113] 또한, 상기 L-메치오닌 생산방법은 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 O-숙시닐 호모세린을 분리 또는 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[114] 본 출원의 "O-숙시닐 호모세린"은 O-숙시닐 호모세린 그 자체 형태뿐 아니라, 이의 염 형태도 모두 포함함은 당업자에게 자명하다.

[115] 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 이때, 배양조건은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물 (예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물 (예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH (예컨대, pH 5 내지 9, 구체적으로는 pH 6 내지 8, 가장 구체적으로는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있다. 배양온도는 20 내지 45 °C, 구체적으로는 25 내지 40 °C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다. 상기 배양에 의하여 생산된 O-숙시닐 호모세린은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[116] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물 (예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방 (예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산 (예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알코올 (예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산 (예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물 (예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물 (예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인 공급원으로 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 배지에는 기타 금속염 (예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

[117] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 O-숙시닐 호모세린 또는 L-메치오닌을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 아미노산을 수집(collect)할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 O-숙시닐 호모세린 또는 L-메치오닌을 회수 할 수 있다.

[118]

발명의 실시를 위한 형태

[119]

[120] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[121]

[122] 실시예 1: O-아세틸 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 갖는 metX 플라스미드 제작

[123]

[124] O-아세틸 호모세린 트랜스퍼라제 (MetX)를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 WT(Wild type) 유래의 보고된 서열에 근거하여 프로모터 부위(개시코돈 상단 약 300bp)로부터 터미네이터 부위(종결코돈 하단 약 100bp)까지 증폭하기 위한 프라이머(서열번호 5 및 6)의 양 말단에 BamHI 제한 효소 부위를 삽입하여 고안하였다.

[125] [표1]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
5	Primer 1	GGATCCCCTCGTTGTTCACCCAGCAACC
6	Primer 2	GGATCCCAGTCACAACCTACTTATGTTAG

[126]

[127] PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 metX 유전자의 코딩 부위 1546 bp의 DNA 단편을 획득하였다. pECCG117 (대한민국 등록특허 제10-0057684호) 벡터와 metX DNA 단편을 제한 효소 BamHI으로 처리하고, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pECCG117-metX WT라 명명하였다.

[128]

[129] 실시예 2: O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 갖는 변이형 metX 플라스미드 제작

[130]

[131] 신규한 metX 변이 위치를 선별하였으며, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 176번째 아미노산과 313번째 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하였다.

[132] 더욱 구체적으로는, Q176N 및 L313R 변이를 제작하였다. 실시예 1에서 제작된 pECCG117-metX WT 플라스미드를 주형으로 O-아세틸 호모세린 트랜스퍼라제 176번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 313번째 아미노산이 알지닌으로 치환되는 변이벡터를 만들기 위해 176번째 변이부여 프라이머 한쌍(서열번호 7 및 8)과 313번째 변이부여 프라이머 한쌍(서열번호 9 및 10)을

고안하였다.

[133] [표2]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
7	Primer 3	ACGCGCCAGCGCCTGGAACATCGGCATTCAATCCG
8	Primer 4	CGGATTGAATGCCGATGTTCCAGGCGCTGGCGCGT
9	Primer 5	GTAGATACCGATATTCGGTACCCCTACCACCAG
10	Primer 6	CTGGTGGTAGGGGTACCGAATATCGGTATCTAC

[134]

[135] 상기 각각의 프라이머와 함께 위치-특이적 돌연변이 키트(site-directed mutagenesis kit, stratagene, 미국)을 이용하여 *metX* 변이 유전자를 제조하였다. 기존 야생형 플라스미드 WT을 기반으로 한, L313R 변이형 플라스미드는 WT_L313R로, Q176N 및 L313R 변이형 플라스미드는 WT_Q176N_L313R로 명명하였다.

[136]

[137] 실시예 3: O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 갖는 변이형 *metX*의 기질 특이성 및 활성 비교 실험

[138]

[139] O-숙시닐 호모세린을 과량 생산하는 변이형 *metX*의 활성을 비교하기 위해 호모세린을 축적하고, 생산된 O-숙시닐 호모세린의 이용성이 결손된 균주를 제작하였다. O-숙시닐 호모세린 분해 경로인 시스타치오닌 감마-신타제를 코딩하는 *metB* 유전자, O-숙시닐 호모세린의 분해경로인 O-아세틸 호모세린(티올)-라이아제를 코딩하는 *metY* 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 먼저 *metB* 유전자를 결손하기 위하여 WT 유래의 *metB* 유전자의 염기서열 정보를 기반으로 *metB* 유전자의 5' 상단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 11 및 12)과 3' 하단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 13 및 14)을 고안하였다. 서열번호 11 및 14의 프라이머는 각 말단에 XbaI 제한 효소 부위(밑줄로 표시)를 삽입하였다.

[140] [표3]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
11	Primer 7	<u>TCTAGAT</u> TGCGCTGATTATCTCACC
12	Primer 8	ACTGGTGGGTCATGGTTGCATATGAGATCAA CTCCTGTAA
13	Primer 9	TTACAGGAGTTGATCTCATATGCAACCATGA CCCACCAGT
14	Primer 10	<u>TCTAGAC</u> CTTGAAGTTCTTGACTG

[141]

[142] WT의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 11 및 서열번호 12, 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 *metB* 유전자의 5' 상단 부위의 450 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 467 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[143] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 11 및 서열번호 14의 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 3분 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, *metB* 유전자의 중앙부분이 결손되어 상단과 하단만 포함하는 917 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[144] pDZ 벡터와 917 bp의 DNA 단편을 제한효소 XbaI으로 처리한 뒤, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pDZ- $\Delta metB$ 라 명명하였다.

[145] pDZ- $\Delta metB$ 벡터를 WT 균주에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *metB* 유전자가 결손된 균주인 WT $\Delta metB$ 를 획득하였다.

[146]

[147] O-숙시닐 호모세린의 또 하나의 분해경로인 *metY* 유전자를 결손하기 위하여 WT유래 *metY* 유전자의 염기서열 정보를 기반으로 *metY* 유전자의 5' 상단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 15 및 16)과 3' 하단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 17 및 18)을 고안하였다. 서열번호 15 및 18의 프라이머는 각 말단에 XbaI 제한 효소 부위(밑줄로 표시)를 삽입하였다.

[148] [표4]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
15	Primer 11	<u>TCTAGA</u> AGTAGCGTTGCTGTACAC
16	Primer 12	ATCAATGGTCTCGATGCCCATATGGCATTG GAGGTCCTTAAG
17	Primer 13	CTTAAGGACCTCCAAATGCCATATGGGCATC GAGACCATTGAT
18	Primer 14	<u>TCTAGAT</u> TGGAACCGTTGCAACCAC

[149]

[150] WT의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 15 및 서열번호 16 서열번호 17, 및 서열번호 18의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 *metY* 유전자의 5' 상단 부위의 512 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 520 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[151] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 15 및 서열번호 18의 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 3분 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, *metY* 유전자의 중앙부분이 결손되어 상단과 하단만 포함하는 1032 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[152] pDZ 벡터와 1032 bp의 DNA 단편을 제한효소 XbaI으로 처리한 뒤, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pDZ- $\Delta metY$ 라 명명하였다.

[153] pDZ- $\Delta metY$ 벡터를 상기에 제작된 WT $\Delta metB$ 균주에 각기 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *metY* 유전자가 결손된 균주인 WT $\Delta metB\Delta metY$ 를 획득하였다.

[154]

[155] O-숙시닐 호모세린 생성 극대화를 위하여 WT 유래의 아스파토키나아제 (서열번호 19)를 코딩하는 *lysC* 유전자(서열번호 20)를 대상으로 변이 도입 벡터를 제작하기 위하여 변이 위치를 중심으로 5' 상단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 21 및 22)과 3' 하단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 23 및 24)을 고안하였다. 서열번호 21 및 24의 프라이머는 각 말단에 XbaI 제한 효소 부위(밑줄로 표시)를 삽입하였고, 서열번호 22 및 23의 프라이머는 서로 교차되도록 고안한 부위에 뉴클레오티드 치환 변이(밑줄로 표시)가 위치하도록 하였다.

[156] [표5]

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
21	Primer 15	tcctctagaGCTGCGCAGTGTTGAATACG
22	Primer 16	CACCGACATCACTTTCACCTGCC
23	Primer 17	GGCAGGTGAAGATGATGTCGGTG
24	Primer 18	gactctagaGTTTCACCTCAGAGACGATTA

[157]

[158] WT의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 21 및 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 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. 그 결과 *lysC* 유전자의 변이를 중심으로 5' 상단 부위의 509 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 520 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[159] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 21 및 서열번호 24의 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 어닐링, 72°C 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, 311번째 트레오닌이 이소류신으로 아스파토키나아제 변이체(서열번호 25)를 코딩하는 *lysC* 유전자의 변이(서열번호 26)를 포함하는 1011 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[160] 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 복제가 불가능한 pDZ 벡터(한국 등록특허 제0924065호)와 1011 bp의 DNA 단편을 제한효소 XbaI으로 처리한 뒤, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pDZ-*lysC*(T311I)라 명명하였다.

[161] pDZ-*lysC*(T311I) 벡터를 WT $\Delta metB\Delta metY$ 에 전기펄스법(Appl. Microbiol. Biothecnol.(1999) 52:541-545)으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에서 형질전환 균주를 획득하였다. 2차 재조합과정(cross-over)으로 염색체상에 삽입된 DNA 단편에 의하여 *lysC* 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 균주, WT $\Delta metB\Delta metY$, *lysC*(T311I)를 획득하였고, 이를 코리네박테리움 글루타미쿰 WT $\Delta metB\Delta metY$, *lysC*(T311I)이라 명명하였다.

[162]

[163] 상기의 실시예 1과 2에서 제작된 pECCG117-*metX* WT, pECCG117-*metX* WT_L313R, pECCG117-*metX* WT_Q176N_L313R 벡터를 상기에 제작된 WT $\Delta metB\Delta metY$ 에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에 도말하여 각각의 형질전환주를 획득하였다.

[164] 상기에 제작된 균주들 O-아세틸 호모세린(O-AH; O-Acetyl Homoserin) 및 O-숙시닐 호모세린(O-SH; O-Succinyl Homoserine) 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 O-아세틸 호모세린 및 O-숙시닐 호모세린 농도를 분석하였다.

[165] 하기의 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 37 °C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 O-아세틸 호모세린 및 O-숙시닐 호모세린의 농도를 분석하였으며, 분석된 농도는 [표 6]과 같다.

[166]

[167] <배지 조성(pH 7.0)>

[168] 포도당 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, 대두 단백질 2.5 g, 옥수수 침지 고형분(Corn Steep Solids) 5 g, 요소 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 µg, 티아민 염산염 1000 µg, 칼슘-판토텐산 2000 µg, 니코틴아미드 3000 µg, CaCO₃ 30 g, L-methionine 0.3g (중류수 1리터 기준).

[169]

[170] [표6]

균주	O-아세틸 호모세린(g/L)			O-숙시닐 호모세린(g/L)		
	배치1	배치2	배치3	배치1	배치2	배치3
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT	2.0	2.2	2.1	0.01	0.03	0.01
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT_L313R	0.05	0.06	0.04	1.2	1.1	1.0
WT Δ metB Δ metY, lysC(T311I)/pECCG117-metX WT_Q176N_L313R	0.03	0.01	0.02	1.4	1.6	1.7

[171]

[172] 상기의 표 6을 참고하면, 대조균 metX WT 플라스미드 도입된 균주의 경우 O-아세틸 호모세린을 생성하는 것과 달리, metX 변이 플라스미드 도입된 균주의 경우 2개의 변이형 모두 O-숙시닐 호모세린을 생성하는 것을 확인하였다. 특히, metX WT_Q176N_L313R의 경우 O-숙시닐 호모세린이 크게 증가한 것을 확인하였다. 즉, 상기 변이가 도입된 균주는 트랜스퍼라제의 기질특이성이 바뀌어 O-숙시닐 호모세린을 생성하였다.

[173]

[174] 실시예 4: saturated mutagenesis를 통한 MetX 변이 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가

[175]

[176] O-숙시닐 호모세린 생산능이 높은 *metX*의 176번이 위치에 다른 아미노산이 치환된 변이형을 제작하기 위해 saturated mutagenesis를 이용하였다. 313번째 아미노산이 알지닌으로 치환되고, 176 번째 아미노산이 다른 아미노산이 치환된 18종을 제작하였으며, 실시예 1에서 제작된 플라스미드를 주형으로 사용하였다. 각각의 변이형, 치환된 아미노산, 및 각 변이형에 사용된 프라이머 서열번호는 다음 표 7에 나타내었다.

[177] [표7]

변이 플라스미드	치환 아미노산	프라이머 서열번호
313 변이	L313R	서열번호 9,10
L313R & 176 변이	Q176N,L313R	서열번호 7,8
	Q176F,L313R	서열번호 27,28
	Q176S,L313R	서열번호 29,30
	Q176Y,L313R	서열번호 31,32
	Q176C,L313R	서열번호 33,34
	Q176P,L313R	서열번호 35,36
	Q176H,L313R	서열번호 37,38
	Q176L,L313R	서열번호 39,40
	Q176I,L313R	서열번호 41,42
	Q176T,L313R	서열번호 43,44
	Q176R,L313R	서열번호 45,46
	Q176K,L313R	서열번호 47,48
	Q176V,L313R	서열번호 49,50
	Q176A,L313R	서열번호 51,52
	Q176D,L313R	서열번호 53,54
	Q176E,L313R	서열번호 55,56
	Q176G,L313R	서열번호 57,58
	Q176W,L313R	서열번호 59,60

[178]

[179] 구체적으로, 상기 표 2에서 제시한 프라이머를 이용하여 위치-특이적 돌연변이 키트(site-directed mutagenesis kit, Stratagene, 미국)을 실시하여 변이형 *metX* 유전자를 제조하였다. 제작된 변이 플라스미드를 $WT\Delta metB\Delta metY$, *lysC*(T311I)

균주에 도입하고 실시예 4와 동일한 방법으로 플라스크 평가를 진행하였다. 그 결과는 다음 표 8과 같다.

[180] [표8]

균주	변이위치	O-아세틸 호모세린(g/L)			O-숙시닐 호모세린(g/L)		
		배치 1	배치 2	배치 3	배치 1	배치 2	배치 3
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT		2.0	2.2	2.1	0.01	0.03	0.01
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_L313R서열번호 61	L313R	0.05	0.06	0.04	1.2	1.1	1.0
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176N_L313R서열번호 63	Q176N,L313R	0.03	0.01	0.02	1.4	1.6	1.7
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176F_L313R서열번호 65	Q176F,L313R	2.1	2.1	2.2	0.01	0.02	0.01
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176S_L313R서열번호 67	Q176S,L313R	2.0	2.0	2.2	0.02	0.03	0.02
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176Y_L313R서열번호 69	Q176Y,L313R	2.1	2.2	2.2	0.01	0.01	0.02
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176C_L313R서열번호 71	Q176C,L313R	2.0	2.1	1.9	0.04	0.01	0.03
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176P_L313R서열번호 73	Q176P,L313R	2.1	1.9	2.1	0.01	0.03	0.01

WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176H_L313R서열번호 75	Q176H,L313R	1.6	1.3	1.6	0.1	0.3	0.1
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176L_L313R서열번호 77	Q176L,L313R	2.2	2.1	1.9	0.01	0.02	0.05
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176I_L313R서열번호 79	Q176I,L313R	2.0	2.3	2.1	0.01	0.02	0.02
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176T_L313R서열번호 81	Q176T,L313R	2.2	1.7	2.1	0.01	0.04	0.01
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176R_L313R서열번호 83	Q176R,L313R	2.0	2.0	1.9	0.05	0.03	0.06
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176K_L313R서열번호 85	Q176K,L313R	2.2	2.2	2.1	0.01	0.00	0.01
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176V_L313R서열번호 87	Q176V,L313R	2.0	2.2	1.9	0.05	0.01	0.02
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176A_L313R서열번호 89	Q176A,L313R	2.1	1.9	1.9	0.01	0.03	0.03
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176D_L313R서열번호 91	Q176D,L313R	2.0	1.8	2.1	0.04	0.06	0.08

WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176E_L313R서열번호 93	Q176E,L313R	1.9	1.9	2.0	0.07	0.02	0.05
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176G_L313R서열번호 95	Q176G,L313R	1.4	1.2	1.4	0.2	0.4	0.1
WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC (T311I)/ pECCG117- <i>metX</i> WT_Q176W_L313R서열번호 97	Q176W,L313R	0.1	0.08	0.07	1.0	1.1	1.3

[181]

[182] 상기의 표3를 참고하면, 대부분의 변이체가 O-숙시닐 호모세린을 생성하지 못하였으나, *metX*의 변이체 (L313R, Q176N), (L313R, Q176W), (L313R, Q176H), 또는 (L313R, Q176G)에서 각각 야생형 보다 높은 수준으로 O-숙시닐 호모세린을 생성하는 것을 확인하였다. 즉, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 313번째 아미노산이 알지닌으로 치환되고, 176번째 아미노산이 아스파라긴, 트립토판, 히스티딘 또는 글리신으로 치환되는 경우, 숙시닐 코에이에 대한 기질특이성이 트랜스퍼라제에 부여되며, 결과적으로 O-숙시닐 호모세린을 생성할 수 있는 것을 확인하였다.

[183]

[184] 이상의 결과들은 본 출원의 변이체가 O-숙시닐 호모세린의 생산을 증가시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

[185]

또한, 상기 제작된 WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC(T311I)/pECCG117-*metX* WT_Q176N_L313R 균주 및 WT $\Delta metB\Delta metY$, lysC(T311I)/ pECCG117-*metX* WT_Q176W_L313R 균주는 각각 CA05-5136 및 CA05-5137로 지칭되며, 이를 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2017년 5월 11일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12024P 및 KCCM12025P 를 부여받았다.

[186]

[187] 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.

[188]

[189]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

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

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA05-5136	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12024P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2017년 5월 11일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
당청: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 석대문구 종재대 2가길 45 유원빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2017. 05. 11.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2017년 6월 30일

변리사 손민



[190]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

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

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA05-5137	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCCM12025P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2017년 5월 11일에 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. 05. 11.

상기 변역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2017년 6월 30일

변리사 손민



청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열 내 313번째 위치에서 알지닌으로의 치환, 및 176번째 위치에서 글루타민 이외의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하는, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 (O-succinyl homoserine transferase) 활성을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 176번째 아미노산은, 아스파라긴, 트립토판, 히스티딘 또는 글리신인, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 63, 서열번호 75, 서열번호 95 및 서열번호 97의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드.
- [청구항 4] 제1항의 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 64, 서열번호 76, 서열번호 96 및 서열번호 98의 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제1항의 O-숙시닐 호모세린 트랜스퍼라제 활성을 가지는 폴리펩티드 또는 이의 변이체 폴리펩티드가 포함되거나 과발현된, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움(*corynebacterium*)속 미생물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 아스파토키나아제 (aspartokinase) 활성이 비변이 미생물에 비하여 추가로 강화된, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*corynebacterium glutamicum*)인, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 시스타치오닌 신타아제(cystathionine synthase), O-아세틸 호모세린 (티올)-라이아제, 및 호모세린 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 활성이 불활성화된, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 아스파토키나아제 (aspartokinase) 활성이 비변이 미생물에 비하여 추가로 강화되고, 시스타치오닌 신타아제(cystathionine synthase), O-아세틸 호모세린 (티올)-라이아제, 및 호모세린 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 활성이 불활성화된, O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.

- [청구항 11] 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 배양단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 O-숙시닐 호모세린을 분리 또는 회수하는 단계를 포함하는, O-숙시닐 호모세린 생산방법.
- [청구항 12] (a) 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 O-숙시닐 호모세린을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 (b) 상기 O-숙시닐 호모세린과 황화물을 반응시키는 단계를 포함하는, L-메치오닌 생산방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 배양된 미생물 또는 배지에서 O-숙시닐 호모세린을 분리 또는 회수하는 단계를 추가로 포함하는, L-메치오닌 생산방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 O-숙시닐 호모세린과 황화물을 반응에 의해서 생성된 L-메치오닌을 분리 또는 회수하는 단계를 포함하는, L-메치오닌 생산방법.