

명세서

발명의 명칭: 내막 단백질의 변이체 및 이를 이용한 목적 산물 생산 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 내막 단백질인 YjeH의 변이체 및 이를 이용한 목적 산물 생산 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] O-아세틸 호모세린(O-acetyl homoserine)은 생체 내 필수 아미노산의 한 종류인 메티오닌의 전구체로 작용한다. 호모세린(homoserine) 역시 메티오닌 및 트레오닌의 전구체로, 포스포호모세린을 거쳐서 트레오닌이 되고, 또한 아세틸호모세린을 거쳐 메티오닌으로 변환되는 것으로 알려져 있다.
- [4] 메티오닌은 사료 및 식품 첨가제뿐만 아니라 수액제, 의약품의 합성 원료로 사용되며, 화학 합성과 생물학적 합성을 통해 생산된다. 발효를 통해 생산한 L-메티오닌 전구체로부터 효소전환 반응에 의하여 L-메티오닌을 생산하는 이단계 공법(국제 공개출원 WO2008/013432)이 공지되어 있다.
- [5] 상기의 이단계 공법에서는 메티오닌 전구체로 O-숙시닐 호모세린 (O-succinyl homoserine) 또는 O-아세틸 호모세린이 사용되며, 메티오닌의 경제적인 대량 생산을 위하여 O-아세틸 호모세린을 고수율로 생산하는 것이 매우 중요하다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생산을 증가시키기 위해 예의 노력한 결과, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 활성이 향상된 내막 단백질의 변이체를 발굴함으로써 본 출원을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체를 제공한다.
- [10] 본 출원은 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [11] 본 출원은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [12] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이

류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 제공한다.

- [13] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 목적 산물 생산 방법을 제공한다.
- [14] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 배지에서 배양하여 O-아세틸 호모세린을 생산하는 단계; 및 상기 O-아세틸 호모세린과 황화물을 반응시켜 O-아세틸 호모세린을 메티오닌으로 전환하는 단계;를 포함하는, 메티오닌 생산 방법을 제공한다.
- [15] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 배지에서 배양하여 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 생산하는 단계; 및 상기 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 글루포시네이트로 전환하는 단계;를 포함하는, 글루포시네이트 생산 방법을 제공한다.
- [16] 본 출원은 상기 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는, 호모세린 생산용 조성물을 제공한다.
- [17] 본 출원은 상기 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는, O-아세틸 호모세린 생산용 조성물을 제공한다.
- [18] 본 출원은 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산을 위한, 상기 내막 단백질 YjeH 변이체의 용도를 제공한다.
- [19] 본 출원은 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산을 위한, 상기 미생물의 용도를 제공한다.

[20]

발명의 효과

[21]

본 출원의 내막 단백질 YjeH의 변이체를 이용하여, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산능을 갖는 미생물을 배양하는 경우, 기존 비변형 단백질에 비해 고수율의 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산이 가능하다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23]

도 1은 pDCM2 플라스미드의 모식도이다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[25]

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.

[26]

[27]

상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체를 제공하는 것이다.

[28]

상기 내막 단백질 YjeH의 변이체는 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능, 즉, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 활성을 갖는 것일 수 있다.

[29]

본 출원에서 용어, "호모세린(homoserine)"은 결사슬에 수산기를 갖는 α -아미노산 중 하나이다. 상기 호모세린은 미생물이나 식물에서 트레오닌 및 메티오닌 생합성의 중간체로, 아스파르트산-4-세미알데히드에서 생성되고, $C_4H_9NO_3$ 의 화학식을 갖는 것으로 알려져 있다. 상기 호모세린은 아세틸-coA 존재 하에서 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제에 의해 O-아세틸 호모세린으로 변환될 수 있다.

[30]

본 출원에서 용어, "O-아세틸 호모세린(O-acetyl homoserine)"은 미생물의 메티오닌 생합성 경로상의 특이적 중간체 물질로, L-호모세린의 아세틸 유도체를 의미한다. 상기 O-아세틸 호모세린은 호모세린과 아세틸-CoA가 호모세린 아세틸 트랜스퍼라제에 의하여 반응이 촉매되어 생성되고, $C_6H_{11}NO_4$ 의 화학식을 갖는 것으로 알려져 있다. 상기 O-아세틸 호모세린은 O-아세틸-L-호모세린으로도 명명될 수 있다.

[31]

[32]

구체적으로, 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의

아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 iii) 92번째 및 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 단백질의 변이체일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 상기 아미노산 치환은 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, 또는 ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 상기 단백질의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, iii) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환되고, 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환된, 내막 단백질 YjeH의 변이체일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[33]

[34] 본 출원에서 용어, "내막 단백질(inner membrane protein)"은 수송 단백질(transporter)의 아미노산-폴리아민-유기체(Amino Acid-Polyamine-Organocation, APC) 수퍼패밀리 내 아미노산 배출 단백질(Amino Acid Efflux, AAE)의 하나로, O-아세틸 호모세린 및/또는 호모세린을 세포 밖으로 배출하도록 매개하는 단백질이다. 12 개의 막 횡단 α 나선(transmembrane α helices)을 포함할 것으로 예측되며, 그 중 10 개는 APC 수퍼패밀리의 특징인 거꾸로 된 반복 접이(inverted repeat fold)를 형성할 수 있다. 상기 내막 단백질은 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질과 혼용하여 사용될 수 있다. 본 출원에서, 상기 내막 단백질은 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 단백질, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능을 갖는 단백질, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 활성을 갖는 단백질, YjeH 단백질 또는 YjeH와 혼용하여 사용될 수 있다.

[35]

본 출원에서 상기 서열번호 1는 내막 단백질 YjeH의 아미노산 서열을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 서열번호 1는 yjeH 유전자에 의해 코딩되는 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 활성을 갖는 내막 단백질의 아미노산 서열일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 또한, 본 출원에서의 내막 단백질은 비록 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 단백질이라고 정의하였으나, 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 또는 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 출원의 내막 단백질에 해당되는 당업자에게 자명할 수 있다. 구체적인 예를 들어, 본 출원의 내막 단백질은 서열번호 1의 아미노산

서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 99.7% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 단백질일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 변이 대상이 되는 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명할 수 있다.

- [36] 즉, 본 출원에서 "특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드", "특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드"라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명할 수 있다. 예를 들어, "서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질" 또는 "서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드"는, 이와 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 "서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질" 또는 "서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드"에 속할 수 있음은 자명할 수 있다.

[37]

- [38] 본 출원에서 용어, "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 단백질을 지칭할 수 있다. 변이체는 수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)과 상이할 수 있다. 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 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질 (mature protein) 의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이된 단백질, 변이형 폴리펩티드, 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.

- [39] 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. 예를 들면, 전하를 띠는 결사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 알라닌, 리신, 및 히스티딘을, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는 아미노산 중 비극성 아미노산(nonpolar amino acid)은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린을 포함하고, 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함하고, 상기 비극성 아미노산 중 방향족 아미노산은 페닐알라닌 및 트립토판을 포함할 수 있다.

- [40] 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.
- [41]
- [42] 상기 "다른 아미노산으로 치환"은 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산이면 제한되지 않는다.
- [43] 본 출원에서 "다른 아미노산으로 치환"은 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것이면 제한되지 않는다. 구체적으로 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민 중 치환 전 아미노산과 다른 어느 하나의 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [44] 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열의 92번째에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌이 아스파라긴으로, 또는 351번째에 상응하는 위치의 아미노산인 페닐알라닌이 류신으로 치환된 것일 수 있다. 한편, 본 출원에서 "특정 아미노산이 치환되었다"고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명할 수 있다.
- [45] 또한, 상기 치환된 아미노산 잔기에는 천연 아미노산뿐만 아니라 비천연 아미노산 역시 포함될 수 있다. 상기 비천연 아미노산은 예를 들어, D-아미노산, 호모(Homo)-아미노산, 베타-호모(Beta-homo)-아미노산, N-메틸 아미노산, 알파-메틸 아미노산, 비통상 아미노산 (예컨대, 시트룰린 또는 나프틸알라닌 등) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 한편, 본 출원에서 "특정 아미노산이

치환되었다"고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명하다.

- [46] 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 92번째 또는 351번째에 상응하는 위치의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 또는 상기 변이체는 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는, 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된, 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [47] 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 iii) 92번째 및 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 단백질의 변이체일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 상기 아미노산 치환은 i) 92번째 아미노산이 아스파라긴으로 치환, 또는 ii) 351번째 아미노산이 류신으로 치환되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 상기 단백질의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째 아미노산이 류신으로 치환, iii) 92번째 아미노산이 아스파라긴으로 치환되고, 351번째 아미노산이 류신으로 치환된, 내막 단백질 YjeH의 변이체일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [48] 본 출원에서 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 단백질 또는 펩타이드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 단백질 또는 펩타이드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 레퍼런스 단백질에서의 유사한 위치를 지칭한다.
- [49] 본 출원에서, 본 출원에 사용되는 단백질 내의 아미노산 잔기 위치에 특정 넘버링이 사용될 수 있다. 예를 들면, 비교하고자 하는 대상 단백질과 본 출원의 단백질의 폴리펩티드 서열을 정렬함으로써, 본 출원의 단백질의 아미노산 잔기 위치에 상응하는 위치에 대해 재넘버링 하는 것이 가능하다.
- [50] 본 출원에서 제공하는 내막 단백질 YjeH의 변이체는, 상기에서 설명한 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능을 갖는 내막 단백질에서 특이적 위치의 아미노산이 치환되어, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능이 변이 전 단백질 대비 증가된 변이체를 의미할 수 있다.
- [51]
- [52] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하는, 내막 단백질 YjeH의 변이체는 서열번호 35 내지 36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로는 서열번호 35 내지 36 중 어느 하나의 아미노산

서열로 필수적으로 구성되는(consisting essentially of) 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 35 내지 36 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [53] 또한, 상기 변이체는 서열번호 35 내지 36 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열에서, 92번째 또는 351번째 아미노산 중 선택된 하나 이상의 아미노산은 고정되고, 이와 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 출원의 변이체는 서열번호 35 내지 36 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 92번째 또는 351번째 아미노산 위치 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명할 수 있다.
- [54]
- [55] 본 출원에서 용어 "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [56] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 값 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 고려될 수 있다.
- [57] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST,

또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [58] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [59] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(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)으로 결정될 수 있다.
- [60]
- [61] 본 출원에서 용어, "내막 단백질의 변이체" 또는 "내막 단백질 YjeH의 변이체"는 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능을 갖는 것일 수 있고, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산능을 가지는 변이형 폴리펩티드, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산 변이형 폴리펩티드, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산능을 갖는 변이형 폴리펩티드, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 활성 변이체, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출 변이체, 변이형 호모세린 배출 단백질, 변이형 O-아세틸 호모세린 배출 단백질, 변이형 YjeH, 변이 YjeH, YjeH 변이체 또는 YjeH 변이형 등과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [62] 또한, 상기 단백질은 에스케리치아 속(*Escherichia sp.*), 어위니아 속(*Erwinia sp.*), 세라티아 속(*Serratia sp.*), 프로비덴시아 속(*Providencia sp.*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium sp.*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 랩토스피라 속(*Leptospira sp.*), 살모넬라 속(*Salmonella sp.*), 브레비박테리움 속(*Brevibacterium sp.*), 하이포모나스 속(*Hypomononas sp.*), 크로모박테리움 속(*Chromobacterium sp.*)

및 노카디아 속(*Norcardia sp.*), 또는 곰팡이류(*fungi*) 또는 효모류(*yeast*)에 속하는 미생물 균주로부터 유래하는 것일 수 있으며, 구체적으로는, 에스케리치아 속, 코리네박테리움 속, 랩토스피라 속의 미생물 균주와 효모로부터 유래하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는, 에스케리치아 속의 미생물 균주 유래일 수 있고, 이의 구체적인 예로 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [63] 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 92번째 및/또는 351번째 위치에서 변이를 포함할 수 있으며, 서열번호 1에 아미노산이 부가, 결실된 아미노산 서열이라고 해도 서열번호 1의 N-말단으로부터 92번째 및/또는 351번째 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 치환된 변이체면 본 출원의 범위에 포함될 수 있다. 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 92번째 및/또는 351번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 서열을 포함하며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 상기 변이를 포함하지 않는 내막 단백질에 비하여, 강화된 활성을 갖는 변이형 내막 단백질일 수 있다. 이와 같은 내막 단백질 YjeH의 변이체는 상기 서열번호 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 99.7% 이상 및 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가질 수 있다.
- [64] 상기 92번째 또는 351번째 아미노산 변이는 92번째 아미노산이 아스파라긴으로 치환되거나, 351번째 아미노산이 류신으로 치환되는 것일 수 있다.
- [65] 구체적으로, 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 야생형 미생물 유래 변이 전 내막 단백질에 비하여 강화된 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [66]
- [67] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [68] 상기 내막 단백질 YjeH 및 이의 변이체에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [69] 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 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미할 수 있다.
- [70] 상기 폴리뉴클레오티드는, 본 출원의 내막 단백질 YjeH의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 본 출원에서 내막 단백질 YjeH의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 *yjeH* 유전자이며, 상기 유전자는 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*) 유래일 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

- [71] 구체적으로, 본 출원의 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. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 92번째 또는 351번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 내막 단백질 YjeH의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다.
- [72] 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 서열에서 92번째 또는 351번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 내막 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미할 수 있다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 40% 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 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.
- [73] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구할 수 있다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적일 수 있다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [74] 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.
- [75] 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).
- [76]

- [77] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [78] 상기 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체 및 폴리뉴클레오티드에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [79] 본 출원의 벡터는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 발현조절영역(또는 발현조절서열)에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물일 수 있다. 상기 발현조절서열은 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 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.
- [80] 본 출원에서 용어, "발현"은 폴리펩티드의 생성에 관여하는 임의의 단계, 예를 들어 전사, 전사 후 변형, 번역, 번역 후 변형, 및 분비 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 본 출원에서 용어, "발현 벡터"는 코딩 서열 및 이의 발현을 위해 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는 선형 혹은 환형 핵산 분자를 의미한다.
- [82] 본 출원에서 용어, "작동가능하게 연결된"은 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 지시하도록 조절 서열이 적절한 위치에 배치되는 구성을 의미한다. 따라서 "작동가능하게 연결된"은, 프로모터, 종결자, 신호 서열 또는 인핸서 영역과 같이 알려진 혹은 원하는 활성을 가진 기능적 도메인의 조절 영역이 타겟(유전자 또는 폴리펩티드)의 발현, 분비 또는 기능을 상기의 알려진 혹은 원하는 활성에 따라 조절할 수 있도록 그 타겟에 부착되거나 연결된 것을 포함한다.
- [83] 본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 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 pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원에서 사용한 벡터는 코리넨박테리움 염색체 내 유전자의 삽입 및 교체를 위해 제작된 pDCM2(도 1, 서열번호 37)일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것이 아니며, 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.
- [84] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에

한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[85]

[86] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 제공한다.

[87] 상기 서열번호 1, 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 대해서는 전술한 바와 같다.

[88] 본 출원에서 용어 "내막 단백질 YjeH의 변이체를 포함하는 미생물"이란, 자연적으로 약한 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능을 가지고 있는 미생물에 내막 단백질 YjeH의 변이체가 도입되어 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출능이 증가된 미생물을 의미한다. 구체적으로 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 변이를 포함하는 내막 단백질 YjeH의 변이체를 발현하는 미생물로서, 상기 아미노산 변이는 N-말단으로부터 92번째 또는 351번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되는 것을 포함할 수 있다.

[89] 본 출원의 목적상, 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물의 경우, 야생형 또는 비변형 미생물에 비하여 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 세포 외 배출량이 증가함으로써, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생산능이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이는 야생형 또는 비변형 미생물이 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 배출하지 못하거나, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 배출하더라도 극미량을 생산할 수 있는 것에 반해, 본 출원의 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 도입함으로써 미생물의 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 배출량을 증가시킴으로써, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생산능을 증가시킬 수 있다는 것에 의의가 있을 수 있다.

- [90] 본 출원에서 용어 "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 균주 자체이거나, 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체를 포함하지 않는 미생물을 의미한다. 상기 비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변이 미생물", "비변형 균주"또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.
- [91]
- [92] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질이 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. 본 출원의 목적상, 상기 "목적 단백질"은 전술한 내막 단백질 YjeH의 변이체일 수 있다.
- [93] 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 것을 의미한다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다. 또한, "활성의 강화"는 미생물이 가진 특정 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 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다.
- [94] 구체적으로, 본 출원의 활성 강화는 상기 단백질 변이체를 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가, 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자의 발현조절서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자 발현조절서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법, 염색체상의 자연형 내막 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자로 대체하는 방법, 상기 단백질 변이체의 활성이 강화되도록 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법 및 미생물에 단백질 변이체를 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [95] 상기에서 유전자의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입되는 것일 수 있다. 또는, 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포의 염색체 내로 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은

당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.

- [96] 다음으로, 폴리뉴클레오타이드의 발현이 증가하도록 발현조절서열을 변형하는 것은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [97] 상기 폴리뉴클레오타이드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 프로모터가 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 공지된 강력한 프로모터의 예에는 CJ1 내지 CJ7 프로모터(US 7662943 B2), lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(US 10584338 B2), O2 프로모터(US 10273491 B2), tkt 프로모터 및 yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [98] 아울러, 염색체상의 폴리뉴클레오타이드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오타이드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [99] 이와 같은 단백질의 도입 및 활성의 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 비변형 미생물 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도보다 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100]
- [101] 본 출원에서 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체를 포함하는 미생물은 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질전환되어 제조된 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [102] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로도 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 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 제한되지 않는다.

[103]

[104] 상기 호모세린 생산능을 갖는 미생물은 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 생산할 수 있다면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 엔테로박터(*Enterbacter*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 프로비덴시아(*Providencia*) 속 및 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속에 속하는 미생물 일 수 있고, 보다 구체적으로, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물일 수 있다.

[105] 보다 구체적으로는, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루네(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스켄스(*Corynebacterium flavescens*) 등일 수 있으며, 코리네박테리움 속에 속하는 미생물은 제한 없이 포함될 수 있다.

[106] 본 출원에서 상기 미생물의 모균주는 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생산량을 증가시키기 위해 추가적으로 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생합성 경로를 약화시키는 유전자를 불활성화시키거나, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생합성 경로를 강화시킨 미생물일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[107] 구체적으로, 상기 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생합성 경로를 약화시키는 유전자를 불활성화시키기 위해, 예를 들면, O-아세틸 호모세린 분해경로의 시스타치오닌 감마 신타제(cystathionine gamma-synthase)를 코딩하는 metB 유전자(서열번호 17) 또는 O-아세틸 호모세린 분해경로의 O-아세틸 호모세린 티올 리아제(O-acetylhomoserine (thiol)-lyase)를 코딩하는 metY 유전자(서열번호 22) 등의 발현은 미생물 내에서 약화 또는 불활성화될 수 있다.

[108] 상기 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린의 생합성 경로를 강화시키기 위해,

예를 들면, 아스파르트키나아제를 코딩하는 *lysC* 유전자(서열번호 27) 등에 유전자 변이를 도입하거나, O-아세틸 호모세린 트랜스퍼라제를 코딩하는 *metX* 유전자(서열번호 32)의 발현을 증폭시킬 수 있다.

- [109] 그러나, 상기에 제한되지 않고 당업계에서 공지된 유전자 발현 조절 방법으로 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산능을 강화할 수 있다.
- [110] 본 출원에서, 용어 "강화/증가"는 내재적 활성에 비하여 활성이 증가되는 것을 모두 포함하는 개념이다.
- [111] 이러한 유전자 활성의 강화 또는 증가는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 유전자의 세포 내 카피수 증가; 유전자의 발현조절서열에 변이를 도입하는 방법; 유전자 발현조절서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법; 유전자의 활성이 강화되도록 해당 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법; 및 미생물에 외래 유전자를 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [112] 본 출원에서 용어, "불활성화"는 내재적 활성에 비하여 활성이 약화되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다.
- [113] 이러한 유전자 활성의 불활성화는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 유전자의 활성이 제거된 경우를 포함하여 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 해당 단백질의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현조절서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현조절서열을 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 올리고뉴클레오티드(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, 이에 제한되지 않는다.
- [114]
- [115] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을

- 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 목적 산물 생산 방법을 제공한다.
- [116] 상기 서열번호 1, 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 이를 포함하는 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [117] 상기 목적 산물은 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [118] 본 출원에서 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [119] 본 출원에서 용어, "배지"는 상기 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [120] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [121] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [122] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [123] 본 출원에서, 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [124] 배지의 온도는 20°C 내지 50°C, 구체적으로는 30°C 내지 37°C일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 유용 물질의 원하는 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 100 시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [125] 상기 배양에 의하여 생산된 목적 산물은 배지 중으로 배출되거나 미처 배출되지 못하고 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [126] 상기 방법은 배양된 배지 또는 미생물로부터 목적 산물을 회수하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [127] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 목적 산물을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 산물을 수집(collect)하는 것일 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 산물을 회수할 수 있다. 상기 배양액은 발효액으로도 명명될 수 있다.
- [128] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 목적 산물은 정제된 형태, 혹은 목적 산물을 함유한 미생물 발효액일 수 있다(Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).
- [129]
- [130] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는,

- 미생물을 배지에서 배양하여 O-아세틸 호모세린을 생산하는 단계; 및 상기 O-아세틸 호모세린과 황화물을 반응시켜 O-아세틸 호모세린을 메티오닌으로 전환하는 단계;를 포함하는, 메티오닌 생산 방법을 제공한다.
- [131] 상기 서열번호 1, 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 이를 포함하는 미생물, 및 O-아세틸 호모세린에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [132] 본 출원에 있어서, O-아세틸 호모세린은 메티오닌 전구체로써, 황화물과의 반응에 의해 메티오닌으로 전환될 수 있다.
- [133] 상기 황화물과 반응시키는 단계는 공지된 어느 방법을 이용하여 O-아세틸 호모세린으로부터 L-메티오닌을 생성하는 것을 의미한다. 예를 들면, 황화물인 메틸 메르캡탄을 O-아세틸 호모세린과 반응시켜, L-메티오닌을 생산할 수 있다. 또한, 상기 반응의 속도 및 수율 향상을 위해서 촉매나 효소를 첨가하거나, 효소를 포함하는 미생물 내에서 반응시킬 수 있다.
- [134] 상기 "황화물"은 예를 들어 메틸 메르캡탄일 수 있고, 상기 메틸 메르캡탄은 액상의 소듐메틸 메르캡탄(sodium methyl mercaptan, $\text{CH}_3\text{S-Na}$, Na-메틸 메르캡탄) 형태, 가스 또는 액화 상태의 메틸 메르캡탄(CH_3SH) 뿐만 아니라 국제 공개특허 WO2010/098629에 언급된 형태로 디메칠설파이드(DMS, Dimethylsulfide)를 포함한 메틸 메르캡탄 등 황 원자를 제공할 수 있는 형태를 포함하고 있는 메틸 메르캡탄 유도체 모두를 의미할 수 있다.
- [135] 상기 메티오닌 전환 반응에 사용되는 효소는 공지되어 있는 시스타티오닌- γ -신타아제 또는 O-아세틸 호모세린 설프히드릴라아제 또는 O-숙시닐 호모세린 설프히드릴라아제가 사용될 수 있다.
- [136] 본 출원의 메티오닌 전환 반응 공정은 하기 반응식으로 나타낼 수 있다:
- [137] O-아세틸-L-호모세린 + $\text{CH}_3\text{SH} \leftrightarrow$ L-메티오닌 + 아세테이트
- [138] 상기 반응에서, 메틸 메르캡탄의 $\text{CH}_3\text{S-}$ 잔기가 O-아세틸 호모세린의 아세테이트 잔기와 치환되어 L-메티오닌을 생성할 수 있다.
- [139] 상기 반응은 20°C 내지 45°C 의 온도에서 반응 매질의 pH 가 6 내지 7로 유지되는 조건으로 수행될 수 있으며, 조효소로써 피리독살-5'-포스페이트가 첨가될 수 있다.
- [140] 상기 메틸 메르캡탄의 존재 하에 L-메티오닌 전구체를 L-메티오닌으로 전환하는 반응은 효소 반응이며, 예를 들어, WO2008/013432에 개시되어 있을 수 있다. WO2008/013432는 메틸 메르캡탄의 존재 하에 L-메티오닌 전구체를 L-메티오닌으로 전환하는 적합한 활성을 갖는, 사용될 수 있는 메티오닌 전환 효소의 성질 및 제조에 대한 세부사항을 제공한다. 그러한 적당한 메티오닌 전환 효소는, 예를 들어, 생명공학적인 방법에 따른 유전자 발현을 사용하여 제조될 수 있다.
- [141] 비제한적 예로서, 상기 메티오닌 전환 활성을 갖는 효소를 코딩하는 유전자의 서열은 NCBI(미국), 및 DNA 데이터 뱅크(KEGG)(일본)의 데이터베이스로부터

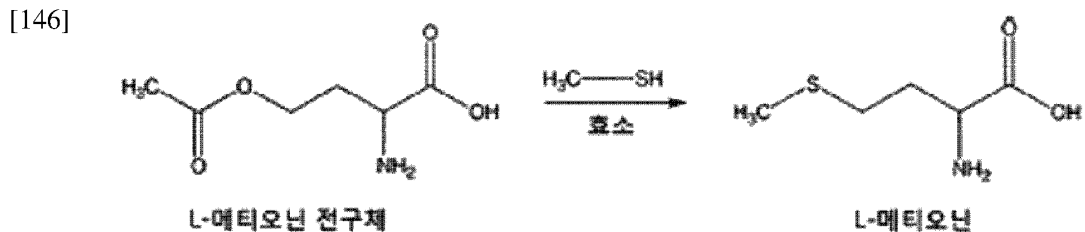
수득될 수 있다. 생물학적 전환 반응을 위해, 수득된 유전자 서열로부터 유전자가 클로닝된 후, 발현 벡터 내로 도입될 수 있다. 구체적으로, 상기 유전자는 재조합 균주 내에서 대장균(*E. coli*)용 발현 벡터인 pCL-CJI 벡터(CJ, 대한민국)로부터 활성 형태로 발현되고, 발현된 단백질을 초음파처리되어 세포가 용해된 효소 용액으로부터 수득될 수 있다. 메티오닌 전환 효소를 발현하는 균주 및 발현된 메티오닌 전환 효소는 둘다 메티오닌 전환 반응에 직접 사용될 수 있다.

- [142] 상기 유전자로부터 발현된 메티오닌 전환 효소 또는 이를 발현하는 미생물 균주가 직접, 일부 또는 전부, L-메티오닌 전구체가 축적된 발효 상청액 또는 발효 브로쓰와 혼합되어 반응이 개시될 수 있다. 즉, O-아세틸 호모세린이 축적된 발효액에 메티오닌 전환 효소 또는 이를 발현하는 미생물 균주가 첨가되고, 이에 또한 메틸 메르캡탄이 첨가되어 반응이 개시될 수 있다.

- [143] 구체적으로, 발효액에 축적된 O-아세틸 호모세린은 시스타티오닌- γ -신타아제 또는 O-아세틸 호모세린 설프히드릴라아제 또는 O-숙시닐 호모세린 설프히드릴라아제에 의해 L-메티오닌으로 전환될 수 있다.

- [144] 상기 메티오닌 전환 반응은 DTNB[5,5-디티오비스(2-니트로-벤조산, Sigma, 미국)]을 사용하여 확인될 수 있고, 반응 산물은 HPLC로 분석될 수 있다. 메티오닌 전환 반응 과정에서, 아세트산과 같은 부산물이, 별도의 생산 공정 없이, 메틸 메르캡탄과 O-아세틸 호모세린의 반응에 의해 부가적으로 수득될 수 있다.

- [145] L-메티오닌 전구체와 메틸 메르캡탄의 효소 반응은 하기 반응식으로 나타낼 수 있다:



- [147]

- [148] 상기 메티오닌을 생산하는 방법은 당업계에 공지된 최적화된 배양 조건 및 효소 활성 조건에서 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적인 배양 방법 및 배지는 전술한 바와 같다.

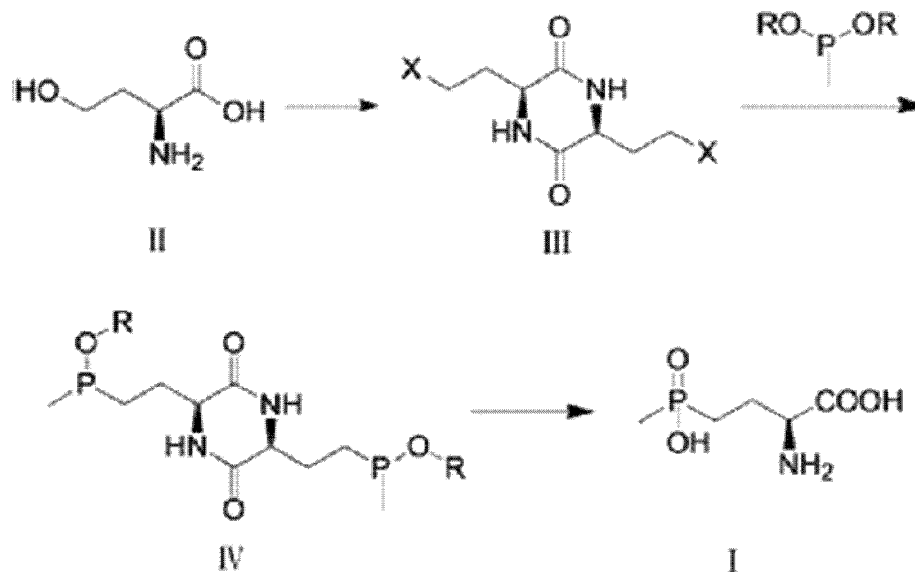
- [149]

- [150] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기

폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물을 배지에서 배양하여 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 생산하는 단계; 및 상기 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 글루포시네이트로 전환하는 단계;를 포함하는, 글루포시네이트 생산 방법을 제공한다.

- [151] 상기 서열번호 1, 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 이를 포함하는 미생물, 및 호모세린에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [152] 본 출원에서 용어, "글루포시네이트(glufosinate)"는 여러 종의 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 토양 박테리아에 의해 생성되는 자연적으로 발생하는 광범위한 제초제를 의미하며, 포스피노트리신(phosphinothricin)으로도 알려져 있다.
- [153] 본 출원에 있어서, O-아세틸 호모세린 또는 호모세린은 할로젠화 반응을 포함하는 복수의 단계를 통해 글루포시네이트로 전환될 수 있다.
- [154] 상기 글루포시네이트 전환 반응은 예를 들어, CN 108516991 A에 개시되어 있을 수 있다. 구체적으로, 상기 글루포시네이트 전환 반응은 (1) 호모세린(화학식 II)을 산성 촉매(acidic catalyst)의 존재 하에서 유기 용매(organic solvent)를 이용하여 공비 탈수(azeotropic dehydration)를 수행하는 단계; 상기 공비 탈수된 호모세린에 할로젠화제(halogenating agent)를 첨가하고 할로젠화 반응을 수행하여 L-3,6-비스(2-할로에틸)-2,5-디온 피페라진[L-3,6-bis(2-haloethyl)-2,5-dione piperazin(화학식 III)]을 수득하는 단계; (2) 상기 L-3,6-비스(2-할로에틸)-2,5-디온 피페라진에 메틸포스핀산 디에스테르(methylphosphinic acid diester 또는 methyl phosphite diester)를 첨가하고 촉매 존재 하에서 고비등 용매(high boiling solvent)를 이용하여 아보브 반응(Abbov reaction)을 수행하여 화학식 IV의 화합물을 수득하는 단계; (3) 상기 화학식 IV의 화합물을 산에 용해하고 가열하여 가수 분해 반응을 행한 후, 반응 종료 후 용매를 제거하고 알코올을 첨가하여 용해한 후, 알킬렌 옥사이드(alkylene oxide)를 첨가하여 전환 반응시켜 글루포시네이트(화학식 I)를 수득하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [155] 호모세린을 전구체로 한 글루포시네이트 전환 반응은 하기 반응식으로 나타낼 수 있다:

[156]



[157]

[158] 상기 글루타미네이트 생산 방법은 본 출원에 따라 생물학적 발효에 의해 제조된 호모세린을 전구체로 사용하여 수행할 수 있으며, 전술한 바와 같이, 공비 탈수, 할로젠화 등으로 메틸포스포늄(methylphosphonium)과 반응시켜 L-3,6-비스(2-할로에틸)-2,5-디온 피페라진을 제조한 후, 이를 아보브 반응시킨 다음, 가수 분해 반응을 수행하여 글루타미네이트를 생산하는 것일 수 있다.

[159]

[160] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는, 호모세린 생산용 조성물을 제공한다.

[161]

[162] 본 출원의 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는, O-아세틸 호모세린 생산용 조성물을 제공한다.

- [163] 상기 서열번호 1, 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 이를 포함하는 미생물, 호모세린, 및 O-아세틸 호모세린에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [164] 상기 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산용 조성물은 본 출원의 내막 단백질 YjeH의 변이체에 의해 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린을 생산할 수 있는 조성물을 의미할 수 있다. 상기 조성물은 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체 또는 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체를 작동시킬 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다. 상기 내막 단백질 YjeH의 변이체는 도입된 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있도록 벡터 내에 포함된 형태일 수 있다.
- [165] 상기 조성물은 동결보호제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 동결보호제 또는 부형제는 비자연적으로 발생한(non-naturally occurring) 물질 또는 자연적으로 발생한 물질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또 하나의 구체 예로, 상기 동결보호제 또는 부형제는 상기 미생물이 자연적으로 접촉하지 않는 물질, 또는 상기 미생물과 자연적으로 동시에 포함되지 않는 물질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [166]
- [167] 본 출원의 다른 하나의 양태는 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산을 위한, 내막 단백질 YjeH 변이체의 용도를 제공한다.
- [168]
- [169] 본 출원의 다른 하나의 양태는 O-아세틸 호모세린 또는 호모세린 생산을 위한, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 92번째에 상응하는 위치의 아미노산이 아스파라긴으로 치환, ii) 351번째에 상응하는 위치의 아미노산이 류신으로 치환, 또는 iii) i) 및 ii)의 아미노산 치환을 포함하고, 서열번호 1에 대하여 적어도 95% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는, 내막 단백질 YjeH의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는, 미생물의 용도를 제공한다.
- [170] 상기 호모세린, O-아세틸 호모세린, 내막 단백질 YjeH, 이의 변이체, 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 이를 포함하는 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.

[171]

발명의 실시를 위한 형태

- [172] 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 아니며, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

[173]

[174] **실시예 1: 플라스미드의 제작**

[175] 코리네박테리움 염색체 내 유전자의 삽입 및 교체를 위한 플라스미드(pDCM2, 도 1, 서열번호 37)를 디자인하였고, 바이닉스(주)의 유전자 합성(Gene-synthesis) 서비스를 이용하여 플라스미드를 합성하였다. 일반적으로 알려진 sacB 시스템 관련 논문[Gene, 145 (1994) 69-73]을 참고로 하여 클로닝에 활용하기 용이한 제한효소(restriction enzyme)를 포함하도록 플라스미드를 설계하였다. 이렇게 합성된 pDCM2 플라스미드는 다음과 같은 특성을 갖는다.

[176] 1) 대장균에서만 작용하는 복제 기점(replication origin)을 가지고 있어 대장균 내에서는 자가 복제(self-replication)가 가능하나 코리네박테리움에서는 자가 복제가 불가능한 특성을 갖는다.

[177] 2) 선별 마커로 카나마이신 내성 유전자를 갖는다.

[178] 3) 2차 양성 선별(positive-selection) 마커로 레반 수크라제(Levan sucrose) 유전자(sacB)를 갖는다.

[179] 4) 최종 제작된 균주에는 pDCM2 플라스미드로부터 유래한 어떠한 유전자 정보도 남지 않는다.

[180]

[181] **실시예 2: 변이형 외래 막단백질(YjeH) 도입 균주 제작 및 O-아세틸 호모세린 및 호모세린 생산능 평가**

[182]

[183] **2-1. 외래 막단백질(YjeH) 및 변이형 YjeH 도입 균주 제작**

[184] 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032에 도입되는, 외래 막단백질이 O-아세틸 호모세린 배출 단백질인 YjeH의 유효성을 판단하기 위하여, 대장균 유래의 YjeH를 코딩하는 yjeH 유전자(서열번호 2)를 포함하는 염색체 도입 벡터를 제작하였다.

[185] 구체적으로, 유전자전위효소(transposase) 결손 벡터를 제작하기 위해, 유전자전위효소를 코딩하는 유전자(서열번호 3, 유전자번호 NCgl2335) 위치를 중심으로 5' 상단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한 쌍(서열번호 4 및 5)과 3' 하단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 6 및 7)을 고안하였다. 서열번호 5 및 6의 프라이머는 서로 교차되도록 고안하였으며 이 부위에 제한효소 SmaI 서열이 위치하도록 하였다. 프라이머 서열은 하기 표 1과 같았다.

[186]

[187] [표1]

서열번호	서열명	서열
서열번호 4	Tn_5 F	tgaattcgagctcggtacccCACCGACGCGCATCTGCCT
서열번호 5	Tn_5 R	GGTGTGGTGACTTTTCAGCAGTTCCCGGGGGGGA GGAGGCATGTGGTGTTG
서열번호 6	Tn_3 F	CAACACCACATGCCTCCTCCCCCGGGAAGTGC TGAAAGTCACCACACC
서열번호 7	Tn_3 R	gtcgactctagaggatccccCTCCCAAACCATGAGGAATG G

[188]

[189] ATCC13032 야생형(WT)의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 4 및 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 NCgl2335 유전자의 결손 부위를 중심으로 5' 상단 부위의 851 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 847 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[190] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 4 및 서열번호 7의 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, 유전자전위효소를 코딩하는 유전자(서열번호 3, 유전자번호 NCgl2335)를 결손할 수 있는 부위를 포함하는 1648 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[191] 수득한 PCR 산물을 SmaI 제한효소 처리한 pDCM2 벡터와 인퓨전 HD 클로닝 키트(In-Fusion® HD Cloning Kit, Clontech)를 사용하여 퓨전 클로닝하였다. 클로닝된 벡터를 대장균 DH5α에 형질전환하고 형질전환된 대장균을 카나마이신(kanamycin) 25mg/ℓ이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. PCR을 통해 상기 목적한 유전자가 삽입된 플라스미드로 형질전환된 콜로니를 선별한 후 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고, 최종적으로 NCgl2335 결손 카세트가 클로닝된 pDCM2-ΔNCgl2335 재조합 벡터를 제작하였다.

[192] O-아세틸 호모세린 배출 단백질의 유효성을 판단하기 위하여 대장균 유래의 YjeH를 코딩하는 유전자(서열번호 2)를 포함하는 염색체 도입 벡터를 제작하였다. 이를 위해 CJ7 프로모터 (서열번호 8, US 7662943 B2)를 이용하여 yjeH 유전자를 발현하는 벡터를 제작하였다. CJ7 프로모터 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 9 및 10)과 대장균의 yjeH 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한쌍(서열번호 11 및 12)을 고안하였다. 프라이머 서열은 하기 표 2와

같았다.

[193]

[194] [표2]

서열번호	서열명	서열
서열번호 9	CJ7_yjeH F	ACACCACATGCCTCCTCcccAGAAACATCCC AGCGCTAC
서열번호 10	CJ7_yjeH R	AGTTCTTGTTTGAGTCCACTCATAGTGTTC CTTTCGTTGGGT
서열번호 11	yjeH F	ACCCAACGAAAGGAAACACTATGAGTGGA CTCAAACAAGAACTG
서열번호 12	yjeH R	GACTTTCAGCAGTTcccgggTTATGTGGTTATG CCATTTTCCGG

[195]

[196] pECCG117-PCJ7-gfp(US 7662943 B2)을 주형으로 하여 서열번호 9 및 서열번호 10, 야생형 대장균의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 CJ7 프로모터 부위의 360 bp DNA 단편과 대장균의 yjeH 유전자 부위의 1297 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[197] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 9 및 서열번호 12의 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, CJ7 프로모터와 yjeH 유전자가 도입된 부위를 포함하는 1614 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[198] 상기 PCR을 통하여 획득한 유전자 결손 DNA 단편에 제한효소 SmaI 처리된 pDCM2-ΔNCgl2335 벡터에 인퓨전 HD 클로닝 키트(In-Fusion® HD Cloning Kit, Clontech)를 통하여 클로닝하였고 최종적으로 pDCM2-ΔNCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT) 재조합 벡터를 제작하였다.

[199] 구체적으로는 pDCM2-ΔNCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT) 플라스미드를 주형으로 하고 서열번호 13 및 14의 프라이머를 이용하여, YjeH 아미노산 서열의 92번째 아미노산인 페닐알라닌(Phe)을 아스파라긴(Asn)으로 치환하였다(F92N). 제작된 변이 YjeH(F92N)를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 pDCM2-ΔNCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N)로 명명하였다.

[200] 또한, pDCM2-ΔNCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT) 플라스미드를 주형으로 하고 서열번호 15 및 16의 프라이머를 이용하여, YjeH 아미노산 서열의 351번째

아미노산인 페닐알라닌을 류신으로 치환하였다(F351L). 제작된 변이 YjeH(F351L)를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)로 명명하였다. 프라이머 서열은 하기 표 3과 같았다.

[201]

[202] [표3]

서열번호	서열명	서열
서열번호 13	F92N F	CGGCTGGCTGAATTTATCGGTCA
서열번호 14	F92N R	TGACCGATAAATTCAGCCAGCCG
서열번호 15	F351L F	CAATGGCATCCTTATTATGATT
서열번호 16	F351L R	AAATCATAATAAGGATGCCATTG

[203]

[204] 제작된 pDCM2- Δ NCgl2335, pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N), pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)를 ATCC13032 균주에 전기펄스법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 NCgl2335 유전자가 결손된 ATCC13032 Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)을 획득하였다. 불활성화된 NCgl2335 유전자와 신규 도입된 대장균 yjeH 유전자의 삽입 여부는 서열번호 4와 7의 프라이머를 이용한 PCR 후 NCgl2335 유전자가 불활성화되지 않은 ATCC13032와 비교하여 최종 확인하였다.

[205]

[206] **2-2. O-아세틸 호모세린 생산능 평가**

[207] 실시예 2-1에서 제작된 ATCC13032 Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N), ATCC13032 Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)와 야생형 균주인 ATCC13032의 O-아세틸 호모세린(O-AH; O-Acetyl Homoserine) 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 O-아세틸 호모세린을 분석하였다.

[208] 하기의 배지 25 mL을 함유하는 250 mL 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 33도에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 O-아세틸 호모세린 농도를 분석하였으며, 분석된 농도는 표 4와 같았다.

[209]

[210] O-아세틸 호모세린 생산배지 (pH 7.2)[211] 포도당 30 g, KH₂PO₄ 2 g, 요소(Urea) 3 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, 펩톤(Peptide) 2.5 g,

CSL(Corn steep liquor, Sigma) 5 g(10 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCO_3 20 g (중류수 1 리터 기준)

[212]

[213] [표4]

균주명	O-아세틸 호모세린(g/L)
ATCC13032	0.3
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}$	0.3
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,WT})$	0.7
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,F92N})$	1.2
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,F351L})$	1.0

[214]

[215] 그 결과, 상기 표 4와 같이 대조균 균주인 ATCC13032를 배양 시

O-아세틸-L-호모세린이 0.3g/L로 축적되며 유전자전위효소인 NCgl2335 유전자를 결손하여도 O-아세틸-L-호모세린 생산에는 영향이 없는 것을 확인하였다. 특히, 야생형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 0.7g/L 수준으로 O-아세틸-L-호모세린이 축적되었음을 확인하였고 변이형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 각각 1.2, 1.0 g/L 수준으로 축적되었음을 확인하였다.

[216] 따라서, 상기 결과로부터 본 출원의 야생형 및 변이형 yjeH 유전자가 ATCC13032에서 O-아세틸-L-호모세린을 배출하여 목적 아미노산의 생산량을 크게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[217] 상기 ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,F92N})$, ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,F351L})$ 균주는 각각 *Corynebacterium glutamicum* CM04-0651 및 *Corynebacterium glutamicum* CM04-0652으로 명명하고, 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2019년 12월 04일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12633P 및 KCCM12634P 를 부여받았다.

[218]

[219] **2-3. 호모세린 생산능 평가**

[220] 실시예 2-1에서 제작된 ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}$, ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,WT})$, ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,F92N})$, ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH}(\text{eco,F351L})$ 와 야생형 균주인 ATCC13032의 호모세린(Homoserine) 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 호모세린을 분석하였다.

[221] 하기의 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 33도에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 호모세린 농도를 분석하였으며, 분석된 농도는 표 5와 같았다.

[222]

[223] 호모세린 생산배지 (pH 7.2)

[224] 포도당 30 g, KH_2PO_4 2 g, 요소(Urea) 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, 펩톤(Peptide) 2.5 g, CSL(Corn steep liquor, Sigma) 5 g(10 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCO_3 20 g (증류수 1 리터 기준)

[225]

[226] [표5]

균주명	호모세린(g/L)
ATCC13032	0.0
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}$	0.0
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}::\text{PCJ7-yjeH}(\text{eco}, \text{WT})$	0.0
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}::\text{PCJ7-yjeH}(\text{eco}, \text{F92N})$	0.2
ATCC13032 $\Delta\text{NCgl2335}::\text{PCJ7-yjeH}(\text{eco}, \text{F351L})$	0.2

[227]

[228] 그 결과, 상기 표 5와 같이 대조균 균주인 ATCC13032를 배양 시 호모세린이 0.0g/L로 측정되지 않으며 유전자전위효소인 NCgl2335 유전자를 결손하여도 호모세린 생산에는 영향이 없는 것을 확인하였다. 특히, 야생형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우에도 0.0g/L 수준으로 호모세린이 측정되지 않는 것을 확인하였고 변이형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 각각 0.2, 0.2 g/L 수준으로 측정되었음을 확인하였다.

[229] 따라서, 상기 결과로부터 본 출원의 변이형 yjeH 유전자가 ATCC13032에서 호모세린을 배출하여 목적 아미노산의 생산량을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[230]

[231] 실시예 3: 향상된 O-아세틸 호모세린 생산능을 가지는 균주 제작 및 O-아세틸 호모세린 및 호모세린 생산능 평가

[232]

[233] **3-1. 시스타치오닌 감마 신타제(MetB) 불활성**

[234] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR을 통하여, O-아세틸 호모세린 분해경로의 시스타치오닌 감마 신타제(cystathionine gamma(γ)-synthase)를 코딩하는 metB 유전자를 확보하였다. 미국 국립 보건원의 유전자은행(NIH GenBank)에서 metB 유전자의 염기서열 정보(NCBI 등록번호 Ncg12360, 서열번호 17)를 확보하고, 이에 근거하여 metB 유전자의 N-말단 부분과 링커 부분을 포함하는 프라이머(서열번호 18 및 19), C-말단 부분과 링커 부분을 포함하는 프라이머(서열번호 20 및 21)를 합성하였다. 프라이머 서열은 하기 표 6과 같았다.

[235]

[236] [표6]

서열번호	서열명	서열
서열번호 18	metB_N_del F	TCTAGACGCCCGCATACTGGCTTC
서열번호 19	metB_N_del R	CCCATCCACTAAACTTAAACAGATGTGAT CGCCCCGGC
서열번호 20	metB_C_del F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGAAGAACC ACCCAGGCC
서열번호 21	metB_C_del R	GTCGACCAATCGTCCAGAGGGCG

[237]

[238] ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 상기 서열번호 18 및 19, 서열번호 20 및 21의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 96°C에서 30초 변성, 53°C에서 30초 어닐링 및 72°C에서 1분 중합을 30회 반복하여 수행하였다. 그 결과, metB 유전자의 N-말단 부분과 링커 부분을 포함한 558bp의 증폭된 유전자와 metB 유전자의 C-말단 부분과 링커 부분을 포함한 527bp의 증폭된 유전자를 각각 획득하였다.

[239] 상기에서 획득한, 증폭된 두 유전자를 주형으로 하여 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 96°C에서 60초 변성, 50°C에서 60초 어닐링 및 72°C에서 1분 중합을 10회 반복 후 서열번호 18 및 21를 첨가하고 중합반응을 20회 더 반복하였다. 그 결과 metB 유전자의 N-말단-링커-C-말단을 포함하는 1064bp의 불활성화 카세트를 획득하였다. 상기 PCR을 통하여 획득한 PCR 단편 말단에 포함된 제한효소 XbaI, SalI을 처리하고, 제한효소 XbaI, SalI가 처리된 pDCM2 벡터에 접합(ligation)하여 클로닝함으로써 최종적으로 metB 불활성화 카세트가 클로닝된 pDCM2-ΔmetB 재조합 벡터를 제작하였다.

[240] 제작된 pDCM2-ΔmetB 벡터를 ATCC13032에 전기펄스법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 metB 유전자가 불활성화된 ATCC13032 ΔmetB 을 수득하였다. 불활성화된 metB 유전자는 서열번호 18과 21의 프라이머를 이용한 PCR 후 metB 유전자가 불활성화되지 않은 ATCC13032와 비교하여 최종 확인하였다.

[241]

[242] **3-2. O-아세틸 호모세린 티올 리아제(MetY) 불활성**

[243] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR을 통하여, O-아세틸 호모세린 분해경로의 O-아세틸 호모세린 티올 리아제(O-acetylhomoserine (thiol)-lyase)를 코딩하는 metY 유전자를 확보하였다. 미국 국립 보건원의 유전자은행(NIH GenBank)에서 metY 유전자의 염기서열 정보(NCBI 등록번호 Ncgl0625, 서열번호 22)를 확보하고, 이에 근거하여 metY

유전자의 N-말단 부분과 링커 부분을 포함하는 프라이머(서열번호 23 및 24), C-말단 부분과 링커 부분을 포함하는 프라이머(서열번호 25 및 26)를 합성하였다. 프라이머 서열은 하기 표 7과 같았다.

[244]

[245] [표7]

서열번호	서열명	서열
서열번호 23	metY_N_del F	TCTAGACCATCCTGCACCATTAG
서열번호 24	metY_N_del R	CCCATCCACTAAACTTAAACACGCTCCTGC CAGGTTC
서열번호 25	metY_C_del F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTTGGTACG CAACCAAGG
서열번호 26	metY_C_del R	GTCGACGATTGCTCCGGCTTCGG

[246]

[247] ATCC13032의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 상기 서열번호 23 및 24, 서열번호 25 및 26의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 중합효소는 PfuUltraTM 고-신뢰 DNA 폴리머라제 (Stratagene)를 사용하였으며, PCR 조건은 96°C에서 30초 변성, 53°C에서 30초 어닐링 및 72°C에서 1분 중합을 30회 반복하였다. 그 결과, metY 유전자의 N-말단 부분과 링커 부분을 포함한 548bp의 증폭된 유전자와 metY 유전자의 C-말단 부분과 링커 부분을 포함한 550bp의 증폭된 유전자를 획득하였다. 상기에 획득한 증폭된 두 유전자를 주형으로 하여 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 96°C에서 60초 변성, 50°C에서 60초 어닐링 및 72°C에서 1분 중합을 10회 반복 후 서열번호 23 및 26를 첨가하고 중합반응을 20회 더 반복하였다. 그 결과 metY 유전자의 N-말단-링커-C-말단을 포함하는 1077bp의 불활성화 카세트를 획득하였다. 상기 PCR을 통하여 획득한 PCR 단편 말단에 포함된 제한효소 XbaI, SalI을 처리하고, 제한효소 XbaI, SalI가 처리된 pDCM2 벡터에 접합(ligation)하여 클로닝함으로써 최종적으로 metY 불활성화 카세트가 클로닝된 pDCM2-ΔmetY 재조합 벡터를 제작하였다.

[248] 제작된 pDCM2-ΔmetY 벡터를 ATCC13032 ΔmetB 균주에 전기펄스법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 metY 유전자가 불활성화된 ATCC13032 ΔmetB ΔmetY을 수득하였다. 불활성화된 metY 유전자는 서열번호 23과 26의 프라이머를 이용한 PCR 후 metY 유전자가 불활성화되지 않은 ATCC13032와 비교하여 최종 확인하였다.

[249]

[250] **3-3. 변이형 아스파토키나아제(LysC) 도입**

[251] O-아세틸 호모세린 생성 극대화를 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 유래의 아스파토키나아제를 코딩하는 lysC 유전자(서열번호 27)에

lysC 유전자의 발현 강화와 L-리신(L-Lysine) 및 L-쓰레오닌(L-Threonine)에 대한 피드백 저해 해제를 위한 변이(L377K)(US 10662450 B2)를 도입하고, 상기 변이형 lysC 유전자를 포함하는 벡터를 제작하기 위하여, 변이 위치를 중심으로 5' 상단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한 쌍(서열번호 28 및 29)과 3' 하단 부위를 증폭하기 위한 프라이머 한 쌍(서열번호 30 및 31)을 고안하였다. 서열번호 28 및 31의 프라이머는 각 말단에 XbaI, SalI 제한 효소 부위를 삽입하였고, 서열번호 29 및 30의 프라이머는 서로 교차되도록 고안하였으며 이 부위에 뉴클레오티드 치환 변이가 위치하도록 하였다. 프라이머 서열은 하기 표 8과 같았다.

[252]

[253] [표8]

서열번호	서열명	서열
서열번호 28	lysC_L377K_5 F	TCCTCTAGAGCTGCGCAGTGTGAATACG
서열번호 29	lysC_L377K_5 R	AGGTGGAAATCTTTTCGATGTTC
서열번호 30	lysC_L377K_3 F	GAACATCGAAAAGATTTCACCT
서열번호 31	lysC_L377K_3 R	GACTCTAGAGTTCACCTCAGAGACGATT A

[254]

[255] ATCC13032의 염색체를 주형으로 하여 서열번호 28 및 서열번호 29, 서열번호 30 및 서열번호 31의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 30초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 lysC 유전자의 변이를 중심으로 5' 상단 부위의 512 bp DNA 단편과 3' 하단 부위의 522 bp의 DNA 단편을 수득하였다.

[256] 증폭된 두 가지의 DNA 절편을 주형으로 하여, 서열번호 28 및 서열번호 31의 프라이머로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 60초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과, 377번째 류신이 리신으로 치환된 아스파토키나아제 변이체를 코딩하는 변이 lysC(L377K) 유전자를 포함하는 1011 bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

[257] 상기 PCR을 통하여 획득한 lysC(L377K) PCR 단편 말단에 포함된 제한효소 XbaI, SalI을 처리하고, 제한효소 XbaI, SalI가 처리된 pDCM2 벡터에 접합(ligation)하여 클로닝함으로써 최종적으로 lysC(L377K) 치환 카세트가 클로닝된 pDCM2-lysC(L377K) 재조합 벡터를 제작하였다.

[258] 제작된 pDCM2-lysC(L377K) 벡터를 ATCC13032 Δ metB Δ metY 균주에

전기펄스법으로 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 *lysC* 유전자에 뉴클레오티드 변이가 도입된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 $\Delta metB \Delta metY lysC(L377K)$ 을 수득하였다. 뉴클레오티드 변이가 도입된 유전자는 서열번호 28 과 31의 프라이머를 이용한 PCR을 후 시퀀싱을 통해 야생형 *lysC* 유전자의 서열과 비교를 통하여 최종 확인하였다.

[259]

[260] **3-4. O-아세틸 호모세린 트랜스퍼라제(MetX) 도입 플라스미드 제작**

[261] O-아세틸 호모세린 트랜스퍼라제(MetX)를 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 미국 국립 보건원의 유전자은행(NIH GenBank)에서 *metX* 유전자의 염기서열 정보(NCBI 등록번호 NCgl0624, 서열번호 32)를 확보하고, 이에 근거하여 프로모터 부위(개시코돈 상단 약 300bp)로부터 터미네이터 부위(종결코돈 하단 약 100bp)까지 증폭하기 위한 프라이머(서열번호 33 및 34)의 양 말단에 BamHI 제한 효소 부위를 삽입하여 고안하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 90초 중합을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 *metX* 유전자의 코딩 부위 1546 bp의 DNA 단편을 수득하였다. pECCG117(KR 10-0057684 B1) 벡터와 *metX* DNA 단편을 제한 효소 BamHI으로 처리하고, DNA 접합 효소를 이용하여 연결한 후, 클로닝함으로써 플라스미드를 획득하였고 이를 pECCG117-*metX* WT라 명명하였다. 프라이머 서열은 하기 표 9와 같았다.

[262]

[263] [표9]

서열번호	서열명	서열
서열번호 33	<i>metX</i> F	GGATCCCCTCGTTGTTACCCAGCAACC
서열번호 34	<i>metX</i> R	GGATCCCAAAGTCACAACCTACTTATGTT AG

[264]

[265] **3-5. O-아세틸 호모세린 생산 균주 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가**

[266] 실시예 3-4에서 제작된 pECCG117-*metX* WT 벡터를 실시예 3-3에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 $\Delta metB \Delta metY lysC(L377K)$ 에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에 도말하여 각각의 형질전환주를 획득하였다.

[267] 상기에 제작된 균주들의 O-아세틸 호모세린 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 O-아세틸 호모세린을 분석하였다.

[268] 하기의 배지 25 mL을 함유하는 250 mL 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이(inoculation loop) 접종하고, 37°C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 O-아세틸 호모세린 농도를 분석하였으며, 분석된

농도는 표 10과 같았다.

[269]

[270] O-아세틸 호모세린 생산배지(pH 7.2)

[271] 포도당 30 g, KH_2PO_4 2 g, 요소 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, 펩톤 2.5 g, CSL(Sigma) 5 g(10 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 메티오닌 400 mg, CaCO_3 20 g (증류수 1 리터 기준)

[272]

[273] [표10]

Strains	O-AH (g/L)
ATCC13032 ΔmetB ΔmetY lysC(L377K)	0.7
ATCC13032 ΔmetB ΔmetY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT	1.3

[274]

[275] 그 결과, 상기 표 10과 같이 대조균 균주인 ATCC13032 ΔmetB ΔmetY lysC(L377K)를 배양시 O-아세틸-L-호모세린이 0.7 g/L 축적되며 ATCC13032 ΔmetB ΔmetY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT 균주를 배양하였을 경우 각각 1.3 g/L의 O-아세틸-L-호모세린이 축적되었음을 확인하였다.

[276] 따라서, 상기 결과로부터 ATCC13032 ΔmetB ΔmetY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT 균주에서 O-아세틸-L-호모세린을 생산을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[277]

[278] **3-6.호모세린 생산능 평가**

[279] 실시예 3-4에서 제작된 pECCG117-metX WT 벡터를 실시예 3-3에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 ΔmetB ΔmetY lysC(L377K)에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에 도말하여 각각의 형질전환주를 획득하였다.

[280] 상기에 제작된 균주들의 호모세린 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 호모세린을 분석하였다.

[281] 하기의 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이(inoculation loop) 접종하고, 37°C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 호모세린 농도를 분석하였으며, 분석된 농도는 표 11과 같았다.

[282]

[283] 호모세린 생산배지(pH 7.2)

[284] 포도당 30 g, KH_2PO_4 2 g, 요소 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, 펩톤 2.5 g, CSL(Sigma) 5 g(10 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 메티오닌 400 mg, CaCO_3 20 g (증류수 1 리터 기준)

[285]

[286] [표11]

Strains	Homoserine production(g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K)	0.2
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT	0.2

[287]

[288] 그 결과, 상기 표 11과 같이 대조균 균주인 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K)를 배양시 호모세린이 0.2 g/L 축적되며 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT 균주를 배양하였을 경우 0.2 g/L의 호모세린이 축적되었음을 확인하였다.

[289] 따라서, 상기 결과로부터 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT 균주에서 호모세린의 생산이 동등 수준임을 확인하였다.

[290]

[291] **실시예 4: 향상된 O-아세틸 호모세린 생산능을 가지는 변이형 외래 막단백질(YjeH) 도입 균주 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가**

[292]

[293] **4-1. 변이형 외래 막단백질(YjeH) 도입**

[294] 실시예 2-1에서 기제작된 벡터 pDCM2- Δ NCgl2335, pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N), pDCM2- Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)를 실시예 3-3에서 제작된 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) 균주에 형질전환하고, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 유전자전위효소인 NCgl2335 유전자가 결손된 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)을 수득하였다. 불활성화된 NCgl2335 유전자와 신규 도입된 대장균 yjeH 유전자의 삽입 여부는 서열번호 4와 7의 프라이머를 이용한 PCR을 수행한 후, NCgl2335 유전자가 불활성화 되지 않은 ATCC13032와 비교를 통하여 최종 확인하였다.

[295]

[296] **4-2. O-아세틸 호모세린 생산 균주 제작 및 O-아세틸 호모세린 생산능 평가**

[297] 실시예 3-4에서 제작된 pECCG117-metX WT 벡터를 실시예 4-1에서 제작된 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), ATCC13032 Δ metB

$\Delta metY$ lysC(L377K) $\Delta NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N)$, ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$ lysC(L377K) $\Delta NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)$ 에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에 도말하여 각각의 형질전환주를 획득하였다.

[298] 상기에 제작된 균주들의 O-아세틸 호모세린 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 O-아세틸 호모세린을 분석하였다.

[299] 실시예 3-5의 O-아세틸 호모세린 생산배지(pH 7.2) 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 33°C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 O-아세틸 호모세린 농도를 분석하였으며, 분석된 농도는 표 12와 같았다.

[300]

[301] [표12]

Strains		O-AH (g/L)
ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$ lysC(L377K) /pECCG117-metX WT	-	1.3
	$\Delta NCgl2335$	1.3
	$\Delta NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT)$	2.1
	$\Delta NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N)$	2.7
	$\Delta NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)$)	2.3

[302]

[303] 그 결과, 상기 표 12와 같이 대조균 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$ lysC(L377K)를 배양시 O-아세틸-L-호모세린이 1.3 g/L 축적되며 유전자전위효소인 NCgl2335 유전자를 결손하여도 O-아세틸-L-호모세린 생산에는 영향이 없는 것을 확인하였다. 특히 야생형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 각각 2.1 g/L의 O-아세틸-L-호모세린이 축적되었음을 확인하였고 변이형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 각각 2.7, 2.3 g/L 수준으로 축적되었음을 확인하였다.

[304] 따라서, 상기 결과로부터 본 출원의 야생형 및 변이형 yjeH 유전자가 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에서 O-아세틸-L-호모세린을 배출하여 목적 아미노산의 생산량을 크게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[305]

[306] **4-3. 호모세린 생산능 평가**

[307] 실시예 3-4에서 제작된 pECCG117-metX WT 벡터를 실시예 4-1에서 제작된 ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$ lysC(L377K) $\Delta NCgl2335$, ATCC13032 $\Delta metB$ $\Delta metY$ lysC(L377K) $\Delta NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT)$, ATCC13032 $\Delta metB$

$\Delta\text{metY lysC(L377K)}$ $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N)}$, ATCC13032 ΔmetB $\Delta\text{metY lysC(L377K)}$ $\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)}$ 에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에 도말하여 각각의 형질전환주를 획득하였다.

[308] 상기에 제작된 균주들의 호모세린 생산능을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하여 배양액 중 호모세린을 분석하였다.

[309] 하기의 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 균주를 1백금이 접종하고, 33°C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. HPLC를 이용하여 호모세린 농도를 분석하였으며, 분석된 농도는 표 13과 같았다.

[310]

[311] 호모세린 생산배지(pH 7.2)

[312] 포도당 30 g, KH_2PO_4 2 g, 요소 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 g, 펩톤 2.5 g, CSL(Sigma) 5 g(10 ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 메티오닌 400 mg, CaCO_3 20 g (증류수 1 리터 기준)

[313]

[314] [표13]

Strains		Homoserine (g/L)
ATCC13032 ΔmetB $\Delta\text{metY lysC(L377K)}$ /pECCG117-metX WT	-	0.2
	$\Delta\text{NCgl2335}$	0.2
	$\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT)}$	0.2
	$\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N)}$)	1.2
	$\Delta\text{NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)}$	0.7

[315]

[316] 그 결과, 상기 표 13과 같이 대조균 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 ΔmetB $\Delta\text{metY lysC(L377K)}$ 를 배양시 호모세린이 0.2 g/L 축적되며 유전자전위효소인 NCgl2335 유전자를 결손하여도 호모세린 생산에는 영향이 없는 것을 확인하였다. 특히 야생형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 각각 0.2 g/L의 O-아세틸-L-호모세린이 축적되었음을 확인하였고 변이형 yjeH 유전자를 발현시켰을 경우 각각 1.2, 0.7 g/L 수준으로 축적되었음을 확인하였다.

[317] 따라서, 상기 결과로부터 본 출원의 야생형 및 변이형 yjeH 유전자가 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에서 호모세린을 배출하여 목적 아미노산의 생산량을 크게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[318]

[319] 실시예 5: 균주로부터 생산된 O-아세틸 호모세린에 대한 전환 반응을 이용한 메티오닌(MET) 생산

- [320] 실시예 3-4에서 제작된 pECCG117-metX WT 벡터를 실시예 4-1에서 제작된 ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335, ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N), ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L)에 전기펄스법으로 도입한 후 카나마이신(kanamycin) 25mg/L를 함유한 선별배지에 도말하여 각각의 형질전환주를 획득하였다.
- [321]
- [322] 또한, 이전에 출원된 특허 (WO2008/013432)에 개시된 방법에 따라, O-아세틸 호모세린을 메티오닌으로 전환시킬 효소로서 사용될 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 O-숙시닐 호모세린 설피드릴라아제를 코딩하는 metZ 유전자를 클로닝하였다. 각 균주의 크로모솜을 주형으로 하고, 슈도모나스 아에루기노사 및 슈도모나스 푸티다의 metZ 유전자를 프라이머를 이용하여 변성 단계는 94°C에서 30초, 어닐링 단계는 55°C에서 30초, 연장 단계는 72°C에서 2분 동안 실시하고, 이를 30 회 수행하는 PCR 반응을 수행하여 DNA 절편을 획득하였다. 획득한 DNA 절편을 NdeI/PacI로 절단하여, 동일하게 절단한 pCL-CJ1 벡터(한국, CJ사)의 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 벡터를 *E.coli* W3110 세포에 형질전환시키고, 50 μ g/L의 스펙티노마이신이 포함된 LB 평판배지에서 배양한 후 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 50 μ g/L의 스펙티노마이신이 포함된 LB 배지 3ml 에 접종하여 하루밤 동안 37°C에서 배양하였다. 배양된 세포는 다시 회수하여 0.1M 포타슘포스페이트 완충액(potassium phosphate, pH7.5)으로 세척하여 다시 200 μ l 의 포타슘포스페이트 완충액에 현탁하고, 30초 간격으로 5회 소니케이션하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포추출액을 12,000rpm에서 10 분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 Bio-Rad 단백질 정량액(미국 BIO-Rad 사)을 이용하여 단백질 총량을 정량하였다. 또한 SDS-PAGE법을 이용하여 단백질의 발현을 확인하였다. 회수된 세포 추출액의 상등액을 효소 전환 반응에 사용하였다.
- [323] 또한, 하이포모나스 넵튜니움(*Hyphomonas Neptunium*) 유래의 O-숙시닐 호모세린 설피드릴라아제를 코딩하는 metZ 유전자를 클로닝하였다. 크로모박테리움 비오라숨의 크로모솜을 주형으로 하고, 프라이머를 이용하여 상기와 동일한 PCR 반응을 수행하여 DNA 절편을 획득하였다. 획득한 DNA 절편을 NdeI/AvrII으로 절단하고, 동일하게 절단한 pCL-CJ1 벡터(한국, CJ사)의 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 벡터를 상기와 동일한 방법을 사용하여 세포추출액의 상등액을 회수하고, 효소 전환반응에 사용하였다.
- [324] 항생제 스펙티노마이신이 함유된 평판 LB 배지에, W3110을 슈도모나스 유래 metZ 발현 벡터로 형질전환 또는 하이포모나스 유래 metZ 발현 벡터로 형질전환시킨 균주를 각각 접종하여 30~40°C에서 하루밤 배양한 후 단일

콜로니를 스펙티노마이신이 포함된 40 ml LB 배지에 접종한 후 30~40°C에서 5 시간 배양하였다. 배양된 슈도모나스 유래 metZ 발현 균주 및 하이포모나스 유래 metZ 발현 균주를 1L 발효조에서 600~900rpm, 30~40°C, 15~30시간 배양하여 발효액을 수득하였다. 배양에 사용된 배지 조성은 하기와 같았다. 수득한 발효액을 초음파 전동을 이용하여 세포를 파쇄하여 효소액을 제작하였다.

[325]

[326] 2XYT 배지

[327] 효모 추출물 10 g, 트립토판 16 g, 글루코스 40 g 및 스펙티노마이신 50 g
(증류수 1리터 기준)

[328]

[329] 상기 O-아세틸 호모세린을 생산하는 형질전환주 배양액에 상기 슈도모나스 및 하이포모나스 유래의 O-숙시닐 호모세린 설피드릴라아제 효소액을 첨가하여 메티오닌 전환 반응을 수행하였다. 세포를 제거하지 않은 O-아세틸 호모세린 배양액 2.0L에 효소액 0.1L를 첨가한 후 15% Na-메틸 메르캅탄 0.3L을 첨가하여 반응을 개시하고, 2 시간 경과 후 발효액을 회수하여 세포를 제거한 후 HPLC를 통하여 생성된 메티오닌 농도를 확인하였다. 분석된 농도는 표 14와 같았다.

[330]

[331] [표14]

Strains		Met (g/L)
ATCC13032 Δ metB Δ metY lysC(L377K) /pECCG117-metX WT	-	1.2
	Δ NCgl2335	1.2
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,WT)	1.9
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F92N)	2.5
	Δ NCgl2335::PCJ7-yjeH(eco,F351L))	2.1

[332]

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

[334]

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> CM04-0651	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12633P
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 2019년 12월 4일에 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: 2019. 12. 04.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2020년 12월 7일

특허법인 한얼 인



[335]

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> CM04-0652	국제 기탁기관에 부여한 수탁번호: KCCM12634P
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 2019년 12월 4일에 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: 2019. 12. 04.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2020년 12월 7일

특허법인 한얼 인

