

명세서

발명의 명칭: 신규 5'-이노신산 디하이드로게나아제 및 이를 이용한 5'-이노신산 제조방법

기술분야

- [1] 본 출원은 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제, 이를 포함하는 미생물, 및 이를 이용한 5'-이노신산 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 핵산계 물질 중 하나인 5'-이노신산(5'-inosine monophosphate; 이하 IMP)은 핵산 생합성 대사계의 중간물질로서, 의약품 및 각종 의료적 이용 등 다방면에 이용되고 있으며, 5'-구아닐산(5'-guanine monophosphate; 이하 GMP)과 더불어 식품 조미 첨가제 또는 식품용으로 널리 이용되고 있는 물질이다. IMP는 자체로 소고기 맛을 내는 것으로 알려져 있으며, GMP와 같이 모노소듐 글루탐산(monosodium glutamic acid; 이하 MSG)의 풍미를 강화하는 것으로 알려져 정미성 핵산계 조미료로 각광을 받고 있다.

- [4] IMP를 제조하는 방법으로는, 효모 세포로부터 추출한 리보핵산을 효소적으로 분해하는 방법, 발효에 의해 생산된 이노신을 화학적으로 인산화하는 방법(Agri. Biol. Chem., 36, 1511(1972) 등) 및 IMP를 직접 생산하는 미생물을 배양하고 배양액 내의 IMP를 회수하는 방법 등이 있다. 이러한 방법 중에서 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법은 IMP를 직접 생산 가능한 미생물을 이용한 방법이다.

- [5] 한편, 자연상태에서 효소들은 산업적 활용에 있어서 요구되는 활성, 안정성, 광학 이성질체에 대한 기질 특이성 등에 있어 항상 최적의 특성을 나타내지 않으므로 아미노산 서열의 변이 등을 통해 목적하는 용도에 적합하게 효소를 개량하는 다양한 시도가 이루어져 왔다. 그 중, 효소의 합리적 디자인(rational design) 및 위치-지정 치환변이(site-directed mutagenesis) 방법이 효소 기능의 향상을 위해 적용된 예가 있으나, 많은 경우, 목적 효소의 구조에 대한 정보가 부족하거나 구조-기능의 상관관계가 명확하지 않아 효과적으로 적용될 수 없다는 단점을 가지고 있다. 이러한 경우, 효소 유전자의 무작위 변이를 통해 구축된 변이효소 라이브러리로부터 원하는 형질의 효소를 스크리닝하는 방향적 진화(directed evolution) 방법을 통해 효소의 개량을 시도하여 활성을 개선한다고 보고된 바 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 상기 미생물 발효를 통하여 직접 IMP를 생산하는 방법으로 고수율의 IMP를 생산하기 위해 발명자들은 광범위한 연구를 수행하였고, IMP 생산능에

관여하는 단백질의 변이체를 발굴함으로써 본 출원을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 출원의 하나의 목적은 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제 및 상기 벡터를 포함하는 5'-이노신산을 생산하는 미생물을 제공하는 것이다.

[13] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 미생물 또는 배지에서 5'-이노신산을 회수하는 단계를 포함하는 5'-이노신산 제조방법을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 출원의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 이용하여, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 배양하는 경우, 고수율의 5'-이노신산 생산이 가능하다.

[16]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 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.

[18]

[19] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 2의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩티드를 갖는 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 제공하는 것이다. 구체적으로, 본 출원은 서열번호 2의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩티드를 갖는 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 제공하며, 상기 아미노산 치환은 N-말단으로부터 377번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환 및 499번째 아미노산이 이소류신으로 치환된 균으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함한다. 본 출원의 또 하나의 양태는, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 499번째 아미노산이 이소류신으로 치환, 또는 이들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 갖는, 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 갖는 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를

제공하는 것이다. 구체적으로, 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 2의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 아미노산 치환은 377번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환 및 499번째 아미노산이 이소류신으로 치환된 균으로부터 선택되는 적어도 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다.

[20]

[21] 본 출원에서 용어, "5'-이노신산 디하이드로게나아제"는 5'-이노신산(5'-inosine monophosphate; IMP)을 생산하는데 관여하는 단백질을 의미한다. 본 출원의 목적상 상기 용어는 이노신-5'-모노포스페이트 디하이드로게나아제 (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase), IMP 디하이드로게나아제 (IMP dehydrogenase), 이노신산 디하이드로게나아제 (Inosinic acid dehydrogenase), IMPDH 등과 혼용되어 사용될 수 있다.

[22]

본 출원에서 상기 서열번호 2는 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 구체적으로, 상기 서열번호 2는 *guaB* 유전자에 의해 코딩되는 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 갖는 단백질 서열이다. 상기 서열번호 2의 아미노산은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한없이 포함될 수 있다. 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노산은 서열번호 2 및 상기 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 범주 중 100% 동일성을 갖는 서열은 제외되거나, 100% 미만의 동일성을 갖는 서열일 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 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다.

[23]

[24] 본 출원에서 용어, "변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제"는 IMP 생산능을 가지는 변이형 폴리펩티드, IMP 생산 변이형 폴리펩티드, 5'-이노신산 생산능을 가지는 변이형 폴리펩티드, 5'-이노신산 생산 변이형 폴리펩티드, 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드, 5'-이노신산 디하이드로게나아제 변이체 등과 혼용되어 사용될 수 있다. 또한 상기 단백질은 코리네박테리움 속 유래일 수 있으며, 구체적으로는 코리네박테리움 스테이셔니스 유래인 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[25]

상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 2의 아미노산 서열 내 N-말단으로부터 377번째 위치 및/또는 499번째 위치에서 변이를 포함한다.

상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이며, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 야생형 미생물 유래 비변이 5'-이노신산 디하이드로게나아제에 비하여 약화된 활성을 갖는 것일 수 있다. 이와 같은 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 위에서 설명한 서열번호 2 및/또는 상기 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산에서 N-말단으로부터 377번째 위치 및/또는 499번째 위치의 아미노산이 변이된 것을 의미한다

- [26] 구체적으로, 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 쓰레오닌(Threonine)으로 치환, 499번째 아미노산이 이소류신(Isoleucine)으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 쓰레오닌(Threonine)으로 치환되고 499번째 아미노산이 이소류신(Isoleucine)으로 치환된 것이며, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비하여 약화된 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[27]

- [28] 본 출원의 목적상 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 포함하는 미생물의 경우, IMP 생산량이 증가하는 것을 특징으로 한다. 이는 야생형 코리네박테리움속 균주가 IMP를 생산하지 못하거나, IMP를 생산하더라도 아주 극미량을 생산할 수 있는 것에 반해, 본 출원의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 통해 IMP 생산량을 증가시킬 수 있다는 것에 의의가 있다.

[29]

- [30] 구체적으로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 내 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는, 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는, 서열번호 6, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 쓰레오닌(Threonine)으로 치환, 499번째 아미노산이 이소류신(Isoleucine)으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 쓰레오닌(Threonine)으로 치환되고 499번째 아미노산이 이소류신(Isoleucine)으로 치환된 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는, 서열번호 6, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 6, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 6, 7, 8의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 본 출원의 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제는 서열번호 6, 7, 8 및 상기 서열번호 6, 7, 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 377번째 또는 499번째 위치의 아미노산 서열 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

- [31] 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 5'-이노신산 디하이드로게나아제와 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.
- [32] 상기 “보존적 치환(conservative substitution)”은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 알라닌, 리신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판을 포함한다.
- [33] 따라서, 본 출원에서 “변이형 (variant)”은 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드'에 추가적으로 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 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. 또한, 상기 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 컨주게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨주게이트 될 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.

- [34]
- [35] 상동성(homology) 및 동일성(identity)은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [36] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [37] 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. 하이브리드하는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [38] 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.
- [39] 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.

- [40] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 6, 7 및 8으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 서열번호 3, 4 및 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열로 구성된 것일 수 있다. 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브 (Probe), 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건(Stringent condition) 하에 하이브리드화(Hybridization)하여, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 쓰레오닌(Threonine)으로 치환되거나 499번째 아미노산이 이소류신(Isoleucine)으로 치환된, 아미노산 서열을 포함하는, 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [41]
- [42] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다.
- [43] 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 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [44] 본 출원의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 본 출원의 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 본 출원에서 5'-이노신산 디하이드로게나아제의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 *guaB* 유전자이며, 구체적으로 코리네박테리움 스테이셔니스 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [45] 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. 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 6, 7, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는, 상기 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 3, 4, 및 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [46] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제의 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"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(homology) 또는 동일성(identity)이 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, 1 X SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1 X SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1 X SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [47] 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.
- [48] 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.

- [49] 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).
- [50]
- [51] 본 출원에서 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 *guaB* 유전자이며, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대해 설명은 앞서 설명한 바와 같다.
- [52] 본 출원에서 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또한 앞서 설명한 바와 같다.
- [53]
- [54] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 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 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.
- [55] 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 있다.
- [56] 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, 상동 재조합(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. 본 출원의 또 하나의 양태로서, 본 출원은 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 포함하거나, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여, 5'-이노신산을 생산하는 미생물을 제공하는 것이다. 구체적으로 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제 및/또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환에 의해 제조되는 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[57] 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.

[58] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[59]

[60] 본 출원에서 사용되는 용어 "변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물" 또는 "변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 포함하는 미생물"이란, 자연적으로 약한 IMP 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 IMP의 생산능이 없는 모균주에 IMP의 생산능이 부여된 미생물을 의미한다. 구체적으로 상기 미생물은 서열번호 2의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩티드를 갖는 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 발현하는 미생물로서, 상기 아미노산 치환은 N-말단으로부터 377번째 아미노산이

쓰레오닌으로 치환 및 499번째 아미노산이 이소류신으로 치환된 균으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 미생물은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 377번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고 499번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되어, 5'-이노신산 디하이드로게나아제 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [61] 상기 미생물은, 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 발현할 수 있는 세포 또는 미생물로서, 본 출원의 목적상 상기 숙주세포 또는 미생물은 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 포함하여 5'-이노신산을 생산할 수 있는 미생물이라면 모두 가능하다.
- [62] 본 출원에서 상기 5'-이노신산을 생산하는 미생물은 5'-이노신산을 생산하는 미생물, 5'-이노신산 생산능을 갖는 미생물과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [63]
- [64] 본 출원에서 용어, "5'-이노신산을 생산하는 미생물"은 야생형 미생물이나 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 불활성화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 5'-이노신산 생산을 위하여 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화시킨 미생물일 수 있다. 본 출원의 목적상 상기 5'-이노신산을 생산하는 미생물은 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 포함하여, 목적하는 5'-이노신산의 생산능이 증가된 것을 특징으로 하며, 구체적으로 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다. 구체적으로, 본 출원에서 5'-이노신산을 생산하는 미생물 또는 5'-이노신산 생산능을 갖는 미생물은, 5'-이노신산 생합성 경로 내 유전자 일부가 강화 또는 약화되거나, 5'-이노신산 분해 경로 내 유전자 일부가 강화 또는 약화된 미생물일 수 있다. 예를 들면, 상기 미생물은, 포스포리보실피로포스페이트 아미도트랜스퍼라아제 (phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase)를 코딩하는 *purF*의 발현이 강화되거나, 아데닐로석시네이트 신세타아제 (adenylosuccinate synthetase)를 코딩하는 *purA*의 발현이 약화된 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [65] 본 출원에서 용어 "5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 (the genus *Corynebacterium*) 미생물"이란, 천연형 또는 변이를 통하여 5'-이노신산 생산능을 가지고 있는 코리네박테리움 속 미생물을 의미한다. 구체적으로, 본 출원에서 5'-이노신산 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물이란 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 유전자 *guaB*의 활성을 강화시키거나 약화시켜

향상된 5'-이노신산 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물 일 수 있다. 보다 구체적으로 본 출원에서 5'-이노신산 생산능을 가지는 코리네박테리움 속 미생물은 본 출원의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되어, 향상된 5'-이노신산 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물일 수 있다. 상기 '향상된 5'-이노신산 생산능을 가지게 된 코리네박테리움 속 미생물'은 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물보다 5'-이노신산 생산능이 향상된 미생물을 의미한다. 상기 '비변형 미생물'은 천연형 균주 자체이거나, 상기 5'-이노신산을 생산하는 단백질 변이체를 포함하지 않는 미생물, 또는 상기 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 미생물을 의미한다.

- [66] 본 출원에서 "코리네박테리움 속 미생물"은 구체적으로는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 락토퍼멘텀(*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범(*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 써모아미노게네스(*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 에피션스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*) 등이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [67]
- [68] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 상기 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 미생물 또는 배지에서 5'-이노신산을 회수하는 단계를 포함하는 5'-이노신산 제조방법을 제공한다.
- [69] 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 5'-이노신산은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [70] 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.

- [71] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 5'-이노신산을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 5'-이노신산을 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 5'-이노신산을 회수할 수 있다.
- [72] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 5'-이노신산은 정제된 형태 또는 5'-이노신산을 함유한 미생물 발효액일 수 있다(Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

[73]

발명의 실시를 위한 형태

- [74] 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.

[75]

[76] 실시예 1: 야생형 기반 IMP 생산주 제작

[77]

- [78] 코리네박테리움 속 야생형의 균주는 IMP를 생산하지 못하거나, IMP를 생산하더라도 아주 극미량을 생산할 수 있다. 따라서, 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) ATCC6872를 기반으로 IMP 생산주를 제작하였다. 보다 구체적으로는, 퓨린 생합성 효소의 첫 번째인 포스포리보실피로포스페이트 아미도트랜스퍼라아제를 코딩하는 PurF의 활성을 강화시키고, 5'-이노신산의 분해경로에 있는 아데닐로석시네이트 신세타아제를 코딩하는 PurA의 활성을 약화시킨 IMP 생산 균주를 제조하였다.

[79]

[80] 실시예 1-1: *purF* 강화 균주 제작

[81]

[82] *purF*의 개시코돈이 변경된 균주를 제작하기 위해 우선 *purF*가 포함된 삽입용 벡터를 제작하였다. 삽입용 벡터에 *purF* 유전자를 클로닝하기 위해 구체적으로 PCR은 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 염색체를 주형으로 서열번호 9 과 10, 서열번호 11와 12 프라이머를 이용하여 수행되었으며, 94°C에서 30초의 변성(denaturation), 55°C에서 30초의 어닐링(annealing), 및 72°C에서 2분의 연장(extension) 과정이 30회 반복 수행되었다. 상기 PCR 반응으로 획득한 두개의 DNA 절편을 주형으로 서열번호 9 과 12 프라이머를 이용하여 94°C에서 30초의 변성(denaturation), 55°C에서 30초의 어닐링(annealing), 및 72°C에서 2분의 연장(extension) 과정이 30회 반복 조건으로 PCR을 수행하여, DNA 단편을 획득하였다. 얻어진 DNA 단편을 제한효소 XbaI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 (pDZ (대한민국 등록특허 제10-0924065호 및 국제 공개특허 제2008-033001호)) 벡터에 클로닝하였다. 상기 방법으로 제작된 벡터를 pDZ-*purF*-g1a라 명명하였다.

[83] [표1]

서열 번호	프라이머명	서열(5'-3')
9	pDZ- <i>purF</i> (g1a)-1	GCTCTAGACCACTCTAAGACGCGGCCACC
10	pDZ- <i>purF</i> (g1a)-2	AAGTAGTGTTTACCATGACGCTGATTCTACTAAG TTT
11	pDZ- <i>purF</i> (g1a)-3	AGTAGAATCAGCGTCATGGTGAACACTACTTTCC CCAG
12	pDZ- <i>purF</i> (g1a)-4	GCTCTAGACTGTGCGCCACGATATCCAG

[84]

[85] 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) ATCC6872에 재조합 벡터 pDZ-*purF*-g1a를 전기천공법(electroporation)으로 형질전환 한 후, 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가 삽입된 균주는 카나마이신(kanamycin) 25mg/ℓ를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 선정된 균주로 시퀀싱을 진행하여 최종적으로 변이가 도입된 균주를 선별하였고 이는 ATCC6872::*purF*(g1a) 균주로 명명하였다.

[86]

[87] 실시예 1-2: *purA* 약화 균주 제작

[88]

[89] *purA*의 개시코돈이 변경된 균주를 제작하기 위해 우선 *purA*가 포함된

삽입용백터를 제작하였다. 삽입용 백터에 *purA* 유전자를 클로닝하기 위해 구체적으로 PCR은 코리네박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 염색체를 주형으로 서열번호 13과 14, 서열번호 15와 16의 프라이머를 이용하여 수행되었으며, 상기 PCR 산물은 실시예 1-1에서와 같이 클로닝을 진행하였고, 제작된 백터를 pDZ-purA-a1t라 명명하였다.

[90] [표2]

서열 번호	프라이머명	서열(5'-3')
13	pDZ-purA(a1t)-1	GCTCTAGAGGCCACGATGCCCCGGAGCATC
14	pDZ-purA(a1t)-2	TAACGATAGCTGCCAAGGTTATTCACCTCCTAGATT
15	pDZ-purA(a1t)-3	AGGAAGTGAATAACCTTGGCAGCTATCGTTATCGTCG
16	pDZ-purA(a1t)-4	GCTCTAGAGGTCACGAATGGGTAGGTGCC

[91]

[92] 실시예 1-1에서 제작된 ATCC6872::purF(g1a) 균주에 재조합 백터 pDZ-purA-a1t를 전기천공법(electroporation)으로 형질전환 한 후, 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 백터가 삽입된 균주는 카나마이신(kanamycin) 25mg/ℓ를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차를 거쳐 선정된 균주로 시퀀싱을 진행하여 최종적으로 변이가 도입된 균주를 선별하였다.

[93] 최종적으로 선별된, 야생형 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*) ATCC6872를 기반의 상기 IMP 생산균주를 CJI2331라 명명하였다.

[94]

[95] 실시예 1-3: CJI2331의 발효역가 실험

[96]

[97] 종배지 2ml를 지름 18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJI2331를 각각 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 29ml를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2ml을 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 170rpm, 온도 30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[98] 배양 종료 후 HPLC (SHIMAZDU LC20A)를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 3와 같다. 하기와 같은 결과는 *purF* 강화 및 *purA* 약화시킨 균주가 IMP 생산능을 갖는 것을 시사하는 것이다.

[99] [표3]

균주명	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2331	1.05

[100]

[101] - 종배지: 포도당 1%, 펩톤 1%, 육즙 1%, 효모엑기스 1%, 염화나트륨 0.25%, 아테닌 100mg/l, 구아닌 100mg/l, pH 7.5

[102] - 발효배지: 글루타민산 나트륨 0.1%, 암모늄클로라이드 1%, 황산마그네슘 1.2%, 염화칼슘 0.01%, 황산철 20mg/l, 황산망간 20mg/l, 황산아연 20mg/l, 황산구리 5mg/l, L-시스테인 23mg/l, 알라닌 24mg/l, 니코틴산 8mg/l, 비오틴 45 μ g/l, 티아민염산 5mg/l, 아테닌 30mg/l, 인산(85%) 1.9%, 포도당 2.55%, 과당 1.45% 되게 첨가하여 사용하였다.

[103]

[104] 실시예 2: 5'-이노신산 디하이드로게나아제 약화 변이체 제조

[105]

[106] IMP 생산능을 향상시키는 5'-이노신산 디하이드로게나아제 변이를 발굴하고자, 이를 코딩하는 유전자인 *guaB*의 변이 라이브러리를 제작하였다.

[107]

[108] 실시예 2-1: *guaB*를 포함하는 벡터 제작

[109]

[110] *guaB* 변이 라이브러리를 제작하기 위해 우선 *guaB*를 포함하는 재조합 벡터를 제작하였다. PCR은 코리넨박테리움 스테이셔니스 ATCC6872의 염색체를 주형으로 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머를 이용하여 수행되었으며, 상기 증폭산물을 TOPO Cloning Kit (Invitrogen)를 이용하여 대장균 벡터 pCR2.1에 클로닝하여 pCR-*guaB*를 얻었다.

[111] [표4]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
17	pCR- <i>guaB</i> -F	ACTGCATTACACGGATATGTA
18	pCR- <i>guaB</i> -R	CCCTCGTGGCGTCCCCACAAAC

[112]

[113] 실시예 2-2: *guaB* 변이 라이브러리 제작

[114]

[115] 상기 실시예 2-1에서 제작된 벡터를 기반으로 *guaB* 변이 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리는 error-prone PCR kit (clontech Diversify® PCR Random Mutagenesis Kit)를 이용하여 제작하였다. 변이가 발생할 수 있는 조건에서,

서열번호 19 및 서열번호 20을 프라이머로 하여 PCR 반응을 수행하였다. 구체적으로는, 1000bp 당 0에서 3개의 변이가 발생하는 조건으로 94 °C에서 30초 pre-heating 후, 94 °C에서 30초, 68 °C에서 1분 30초의 과정을 25회 반복 수행하였다. 이 때 얻어진 PCR 산물을 megaprimer(500~125ng)로 하여 95 °C에서 50초, 60 °C에서 50초, 68 °C에서 12분의 과정을 25회 반복 수행한 후 DpnI 처리하여, 대장균 DH5α에 형질전환하여 카나마이신(25mg/L)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환 된 콜로니 20종을 선별한 후 플라스미드를 획득하여 폴리뉴클레오티드 서열을 분석한 결과 2mutations/kb 빈도로 서로 다른 위치에 변이가 도입된 것을 확인하였다. 약 20,000개의 형질전환 된 대장균 콜로니를 취하여 플라스미드를 추출하였고, 이를 pTOPO-guaB-library로 명명하였다.

[116] [표5]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
19	pTOPO-guaB-library-F	ATTGCATGGCTTGACGTTTGA
20	pTOPT-guaB-library-R	ATCAATGTGCCACTGCGTGCT

[117]

[118] 실시예 2-3: 제작한 라이브러리 평가 및 균주 선별

[119]

[120] 상기 실시예 2-2에서 제작된 pTOPO-guaB-library를 실시예 1에서 제작한 균주 CJI2331에 일렉트로포레이션법으로 형질 전환한 후, 카나마이신 25mg/L를 함유한 영양배지에 도말하여 변이 유전자가 삽입된 균주 10,000개의 콜로니를 확보 하였으며, 각 콜로니를 CJI2331_pTOPO_guaB(mt)1부터 CJI2331_pTOPO_guaB(mt)10000까지로 명명하였다.

[121]

[122] - 영양배지: 펩톤 1%, 육즙 1%, 염화나트륨 0.25%, 효모 엑기스 1%, 한천 2%, pH 7.2

[123]

[124] 확보된 10,000개의 콜로니를 각각 가압 살균한 종 배지 200μl에 접종하여 96 deep well plate에서 마이크로플레이트 진탕기(Microplate shaker (TAITEC))를 이용하여 30°C 온도, 1200rpm에서 24시간 진탕 배양하여 종 배양액으로 사용하였다. 가압 살균한 발효배지 290μl를 96 deep well plate에 분주한 후 종 배양액 20μl씩 접종하고, 상기 조건과 동일하게 72시간 진탕 배양하였다.

[125] 배양액에서 생산된 5'-이노신산의 생산량을 분석하기 위하여 배양 종료 후 배양 상층액 3μl를 증류수 197μl씩 분주된 96 well UV-plate에 옮겼다. 다음으로 마이크로플레이트 리더(Microplate reader)를 이용하여, 30초 동안 shaking하고, 25°C, 파장 270nm에서 스펙트로포토메타로 흡광도를 측정하고 CJI2331 균주의

흡광도와 비교해 10% 이상 증가된 흡광도를 보이는 변이 균주 50개의 콜로니를 선별하였다. 그외 콜로니들은 대조구 대비 유사 또는 감소한 흡광도를 나타내었다.

- [126] 선별된 50개의 균주는 상기와 같은 방법으로 흡광도 측정을 통한 5'-이노신산 생산량 확인을 반복 수행하였으며, CJ12331 균주 대비 5'-이노신산 생산능이 현저하게 향상된 CJ12331_pTOPO_guaB(mt)133, CJ12331_pTOPO_guaB(mt)1209, CJ12331_pTOPO_guaB(mt)8927 균주 3종을 선별하였다.

[127]

- [128] **실시예 2-4: 유전자 시퀀싱을 통한 변이 확인**

[129]

- [130] 상기 돌연변이 균주의 유전자 변이를 확인하기 위하여, 서열번호 21 와 22의 프라이머를 이용하여 CJ12331_pTOPO_guaB(mt)133, CJ12331_pTOPO_guaB(mt)1209, CJ12331_pTOPO_guaB(mt)8927 균주에서 PCR을 수행하고 시퀀싱을 진행하여, *guaB* 유전자를 야생형 균주 ATCC6872 및 CJ12331와 비교하였다.

- [131] 그 결과, 상기의 균주 3종 모두 각각 *guaB* 유전자의 다른 위치에 변이를 포함하고 있다는 것을 확인하였다.

- [132] 구체적으로, 서열번호 2로 표시되는 GuaB 아미노산 서열에서 CJ12331_pTOPO_guaB(mt)133 균주는 499번째 쓰레오닌이 이소류신으로 치환된 변이를, CJ12331_pTOPO_guaB(mt)1209 균주는 377번째 알라닌이 쓰레오닌으로 치환된 변이를, CJ12331_pTOPO_guaB(mt)8927 균주는 377번째 알라닌이 쓰레오닌으로 치환되고 499번째 쓰레오닌이 이소류신으로 치환된 변이를 포함하고 있음을 확인하였다. 따라서, 이하 실시예 3 및 4에서는, 상기 변이들이 각각 코리네박테리움 속 미생물의 IMP 생성량에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

[133]

- [134] **실시예 3: CJ12331에서의 IMP 생산능 확인**

[135]

- [136] ATCC6872 유래의 IMP 생산 균주인 CJ12331에 상기 실시예 2에서 확인된 변이를 도입하여 IMP 생산능을 확인하였다.

[137]

- [138] **실시예 3-1: 변이가 도입된 균주 제작**

[139]

- [140] 상기 실시예 2에서 확인된 변이를 도입하기 위하여, 타겟 변이를 포함하는 역방향의 올리고뉴클레오티드를 75-머(mer)의 길이로 각각 디자인하였다.

- [141] 구체적으로, 서열번호 23 또는 24의 올리고뉴클레오티드 30 μ g을 CJ12331균주에 전기펄스법(Appl. Microbiol. Biothecnol., 1999, 52: 541-545)으로 형질전환하고, 복합액체배지를 1 ml 첨가하여 30°C에서 30분 동안 160 rpm으로

진탕 배양하였다. 이후, 배양액을 얼음에서 10분간 인큐베이션(incubation)하고, 4°C에서 10분 동안 4000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 제거하여 균체를 확보하였다. 이후, 4°C의 10% 글리세롤 용액을 1 ml 첨가하고 혼합한 후, 4°C에서 10분 동안 4000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 제거하여 균체를 세척하였다. 이와 같이 균체를 1회 더 세척하고, 4°C의 10% 글리세롤 용액을 0.1 ml 첨가하여 다음 형질전환을 위한 균주를 준비하였다. 이후, 상기와 같은 전기펄스법으로 서열번호 23 또는 24의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 형질전환하는 과정을 10회 반복한 후, 복합평판배지에 도말하여 콜로니를 확보하였다(Nat. Protoc., 2014 Oct;9(10):2301-16).

[142] 상기 확보한 콜로니의 유전자 서열 분석을 수행한 결과, 균주에 상기의 타겟 변이가 도입된 것을 확인하였으며, *guaB* 유전자로 코딩되는 단백질 내 A377T 변이가 도입된 상기 균주를 CJI2331_guaB_m1, T499I 변이가 도입된 균주를 CJI2331_guaB_m2로 명명하였다.

[143] 또한 A377T와 T499I 변이를 모두 포함하는 변이 균주를 제작하기 위해 CJI2331_guaB_m1 균주에 서열번호 24의 올리고뉴클레오티드 30μg을 형질전환하고 상기의 동일한 방법으로 콜로니를 확보하였다(Nat. Protoc., 2014 Oct;9(10):2301-16). 확보한 콜로니의 유전자 서열 분석을 수행하여, *guaB* 유전자로 코딩되는 단백질 내 A337T 및 T499I 변이가 모두 도입된 균주를 선별하였고 이는 CJI2331_guaB_m1m2로 명명하였다.

[144] [표6]

서열 번호	프라이머 명	서열(5'-3')
23	mage A377T	ACAATCACGATGTCACCAGGAGCCTCCAGGGTGCCTGTG AACATCGAGCCCAGCATGACCGAGTCCGCGCCAGCA
24	mage T499I	TATTTTAAATCCTTAACGGTAGTTTCGGAGCTTCTACAATT TGCTGCAGGTGGTGC GG GTGCGACTCAGCCAAGCC

[145]

[146] 실시예 3-2: 변이가 도입된 균주의 IMP 생성능 확인

[147]

[148] 종배지 2ml를 지름 18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJI2331를 각각 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효배지 29ml를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2ml를 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 170rpm, 온도30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[149] 배양 종료 후 HPLC (SHIMAZDU LC20A)를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 7과 같다. 하기의 결과에서 보듯이,

대조균인 CJI2331 균주 대비 *guaB* 유전자로 코딩되는 단백질 내 A377T변이 또는 T499I 변이를 갖고 있는 CJI2331_*guaB*_m1 또는 CJI2331_*guaB*_m2 균주의 경우, IMP 농도가 각각 0.42g/L(40%), 0.21g/L(20%) 향상된 것을 확인하였다. 또한 A377T와 T499I 변이를 모두 포함하고 있는 CJI2331_*guaB*_m1m2 균주의 경우, IMP 농도가 0.58g/L(50%) 향상되어 두 변이를 함께 포함했었을 때 IMP 농도 향상에 가장 큰 효과가 있음을 확인하였다.

[150] [표7]

균주명	IMP (g/L)
CJI2331	1.05
CJI2331_ <i>guaB</i> _m1	1.47
CJI2331_ <i>guaB</i> _m2	1.26
CJI2331_ <i>guaB</i> _m1m2	1.58

[151]

[152] 실시예 4: ATCC6872 유래의 IMP 생산 균주에서의 IMP 생산능 확인

[153]

[154] **실시예 4-1: ATCC6872 유래의 IMP 생산 균주 선별**

[155]

[156] ATCC6872 유래의 IMP 생산주를 제작하기 위해 ATCC6872를 인산염 완충액(pH 7.0) 또는 시트레이트 완충액(pH5.5)에 $10^7 \sim 10^8$ 세포/ml로 현탁시켰다. 여기에 UV 처리하여 실온 또는 32°C에서 20~40 분간 처리하여 돌연변이를 유발시켰다. 2회에 걸쳐 0.85% 식염수로 세척하고, 1.7% 한천을 함유한 최소배지에 내성을 부여하고자 하는 물질을 적정 농도로 함유한 배지에 희석하여 도말 한 후 콜로니를 얻었다. 각각의 콜로니를 영양배지에서 배양하고 종배지에서 24시간 배양하였다. 발효배지에서 3~4일간 배양한 결과, 배양액에 축적된 IMP 생산량이 가장 우수한 콜로니를 선별하였다. 고농도 IMP 생산주를 제작하기 위해 아데닌 요구성, 구아닌 누출형, 라이소자임 감수성, 3,4-디하이드로프로플린 내성, 스트렙토마이신 내성, 아제티딘 카복실산 내성, 티아프롤린 내성, 아자세린 내성, 설파구아니딘 내성, 노르발린 내성, 트리메토프림 내성을 부여하기 위해 상기 과정을 각각의 물질에 대해 순차적으로 수행하였으며, 상기 물질들에 대한 내성이 부여되고 IMP 생산능이 우수한 CJI2335을 최종 선별하였다. 하기의 표 8에 ATCC6872 대비 CJI2335의 내성정도를 비교하여 나타냈다.

[157] [표8]

특성	ATCC6872	CJI2335
아데닌 요구성	비요구성	요구성
구아닌 누출형	비요구성	누출형
라이소자임 감수성	80 ug/ml	8 ug/ml
3,4-디하이드로프로틴 내성	1000 ug/ml	3500 ug/ml
스트렙토마이신 내성	500 ug/ml	2000 ug/ml
아제티딘 카복실산 내성	5 mg/ml	30 mg/ml
티아프롤린 내성	10 ug/ml	100 ug/ml
아자세린 내성	25 ug/ml	100 ug/ml
설파구아니딘 내성	50 ug/ml	200 ug/ml
노르말린 내성	0.2 mg/ml	2 mg/ml
트리메조프림 내성	20 ug/ml	100 ug/ml

[158]

[159] - 최소배지: 포도당 2%, 황산나트륨 0.3%, 인산제1칼륨 0.1%, 인산제2칼륨 0.3%, 황산마그네슘 0.3%, 염화칼슘 10mg/l, 황산철 10mg/l, 황산아연 1mg/l, 염화망간 3.6mg/l, L-시스테인 20mg/l, 칼슘 판토테네이트 10mg/l, 티아민 염산염 5mg/l, 바이오틴 30ug/l, 아데닌 20mg/l, 구아닌 20mg/l, pH7.3되게 첨가하여 사용하였다.

[160]

[161] 실시예 4-2: CJI2335의 발효역가 실험

[162]

[163] 종배지 2ml를 지름18mm 시험관에 분주하고 가압 살균한 후, ATCC6872 및 CJI2335를 각각 접종하고 30°C 온도에서 24시간 진탕 배양하여 종 배양액으로 사용하였다. 발효배지 29ml를 250ml 진탕용 삼각플라스크에 분주하고 121°C 온도에서 15분간 가압 살균한 후, 종배양액 2ml를 접종하여 3일간 배양하였다. 배양 조건은 회전 수 170rpm, 온도30°C, pH 7.5로 조절하였다.

[164] 배양 종료 후 HPLC (SHIMAZDU LC20A)를 이용한 방법에 의해 IMP의 생산량을 측정하였으며, 배양 결과는 아래 표 9와 같다.

[165] [표9]

균주명	IMP (g/L)
ATCC6872	0
CJI2335	5.4

[166]

[167] 실시예 4-3: *guaB* 변이를 포함하는 삽입 벡터 제작

[168]

[169] 상기 실시예 3에서 선별된 변이를 균주내로 도입하기 위해 삽입용 벡터를 제작하고자 하였다. *guaB* 변이 도입용 벡터 제작 과정은 다음과 같다. 상기 실시예 2에서 선별된 CJI2331_pTOPO_*guaB*(mt)1209 균주의 *guaB*(A377T) 유전자 및 CJI2331_pTOPO_*guaB*(mt)133 균주의 *guaB*(T499I) 유전자를 주형으로 하고, 서열번호 25와 서열번호 26을 프라이머로 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 20회 반복한 후, 72°C에서 5분간 중합반응을 수행하였다. 그 결과 얻어진 유전자 단편을 각각 *Xba*I로 절단하였다. T4 리가아제를 이용하여 상기 유전자 단편을 *Xba*I 제한효소로 절단 시킨 선상의 pDZ 벡터에 클로닝하여 pDZ-*guaB*(A377T)와 pDZ-*guaB*(T499I)를 제작하였다.

[170] [표10]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
25	pDZ- <i>guaB</i> -F	GCTCTAGAGACATGACTATCCAGGAAGTT
26	pDZ- <i>guaB</i> -R	GCTCTAGAATCAATGTGCCACTGCGTGCT

[171]

[172] 실시예 4-4: CJI2335 균주 내 변이체 도입 및 평가

[173]

[174] 상기 실시예 4-1에서 선별된 CJI2335 균주의 *guaB* 유전자의 염기서열을 확인하기 위해 CJI2335의 게놈 DNA를 PCR을 통하여 증폭하였다. 구체적으로, 먼저 상기 CJI2335의 염색체 DNA를 주형으로 서열번호 21과 22의 프라이머를 이용하여 94°C에서 1분, 58°C에서 30초, 72°C에서 2분간 Taq DNA 중합효소로 증합하는 조건을 28회 반복하는 PCR 방법을 통하여 약 2.1kb의 *guaB*를 증폭하였고, 이를 동일한 프라이머로 염기서열을 분석한 결과, 야생형 ATCC6872균주의 *guaB* 유전자와 동일한 서열로 확인되어, *guaB* 유전자에는 변이가 없음을 확인하였다.

[175] [표11]

서열번호	프라이머명	서열(5'-3')
21	<i>guaB</i> -seq-F	AATGAAAGATGCCGGATCATT
22	<i>guaB</i> -seq-R	TCAATGTGCCACTGCGTGCT

[176]

[177] 상기 실시예 4-3에서 제작한 pDZ-*guaB*(A377T), pDZ-*guaB*(T499I) 벡터를 CJI2335에 형질전환하고 상동성 서열의 재조합에 의해 염색체 상에 벡터가

삽입된 균주는 카나마이신(kanamycin) 25 mg/L를 함유한 배지에서 선별하였다. 선별된 1차 균주는 다시 2차 교차(cross-over)를 거쳐, 목표 유전자의 변이가 도입된 균주를 선정하였다. 최종 형질전환 된 균주의 유전자 변이 도입 여부는 서열번호 21과 서열번호 22의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 염기서열을 분석함으로써 균주 내 변이가 도입 되었음을 확인하였다. 구체적으로 *guaB* 유전자로 코딩되는 단백질 내 A377T 변이가 도입된 상기 균주를 CJI2335_ *guaB*_m1, T499I 변이가 도입된 균주를 CJI2335_ *guaB*_m2로 명명하였다. 또한 A377T와 T499I 변이를 모두 포함하는 변이 균주를 제작하기 위해 CJI2335_ *guaB*_m1 균주에 pDZ-*guaB*(T499I)백터를 형질전환 하고 상기와 동일한 방법으로 콜로니를 확보하였다. 확보한 콜로니의 유전자 서열 분석을 수행하여, *guaB* 유전자로 코딩되는 단백질 내 A337T 및 T499I변이를 모두 도입된 균주를 선별하였고 이는 CJI2335_ *guaB*_m1m2로 명명하였다.

- [178] 하기의 표 12에서 보듯이, 대조균인 CJI2335균주 대비 *guaB* 유전자로 코딩되는 단백질 내 A377T변이 또는 T499I 변이를 갖고 있는 CJI2335_ *guaB*_m1 또는 CJI2335_ *guaB*_m2 균주의 경우, IMP 농도가 각각 2.2g/L(40%), 1.0g/L(18.5%) 향상된 것을 확인하였다. 또한 A377T와 T499I 변이를 모두 포함하고 있는 CJI2331_ *guaB*_m1m2 균주의 경우, IMP 농도가 2.7g/L(50%) 향상되어 두 변이를 함께 포함했었을 때 IMP 농도 향상에 가장 큰 효과가 있음을 확인하였다.

- [179] [표12]

균주명	IMP (g/L)
CJI2335	5.4
CJI2335_ <i>guaB</i> _m1	7.6
CJI2335_ <i>guaB</i> _m2	6.4
CJI2335_ <i>guaB</i> _m1m2	8.1

- [180]

- [181] 상기와 같은 결과들은 IMP 생산능을 갖는 다양한 코리네박테리움 속 미생물에 본 출원의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 도입할 경우, 5'-이노신산의 생산능이 크게 향상됨을 뒷받침하는 것이다.

- [182]

- [183] 상기 CJI2335는 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 6월 22일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12278P를 부여받았다. 또한, 상기 제작된 CJI2335_ *guaB*_m1m2 균주는 CJI2347로 지칭되며, 이를 부다페스트조약 하의 수탁기관인 한국미생물보존센터에 2018년 6월 22일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM12279P를 부여받았다.

- [184]

- [185] 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.

[186]

[187]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

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

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJI2335	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12278P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용 시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 6월 22일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 06. 22.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 7월 10일

변리사 손민



[188]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

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

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Corynebacterium stationis</i> CJI2347	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12279P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용 시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 6월 22일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 06. 22.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 7월 10일

변리사 손민



[189]

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 2의 아미노산 서열에서 1) 337번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 2) 499번째 아미노산이 이소류신으로 치환, 또는 3) 337번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환되고 499번째 아미노산이 이소류신으로 치환된, 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제.
- [청구항 2] 제1항의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 4] 제1항의 변이형 5'-이노신산 디하이드로게나아제 또는 제3항의 벡터를 포함하고, 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움 속 미생물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*)인 5'-이노신산을 생산하는 코리네박테리움속 미생물.
- [청구항 6] 제4항의 코리네박테리움 속 미생물을 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 미생물 또는 배지에서 5'-이노신산을 회수하는 단계를 포함하는 5'-이노신산 제조방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 스테이셔니스(*Corynebacterium stationis*)인 5'-이노신산 제조방법.