



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월04일
 (11) 등록번호 10-2198072
 (24) 등록일자 2020년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/00 (2006.01) *C12N 15/77* (2006.01)
C12P 13/14 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 9/93 (2013.01)
C12N 15/77 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2020-0027322
 (22) 출원일자 2020년03월04일
 심사청구일자 2020년03월04일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2003164297 A
 JP2002300887 A
 JP2004187684 A
 KR1020130105380 A

(73) 특허권자
씨제이제일제당 주식회사
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 (72) 발명자
최수진
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
이임상
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 **글루타민 신데타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용한 L-글루타민 생산 방법**

(57) 요약

본 출원은 활성이 강화된 글루타민 신데타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용하여 L-글루타민을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 신규한 변이형 폴리펩티드를 이용할 경우 야생형 글루타민 신데타아제 활성을 가진 균주 대비 성장속도의 지연 없이 L-글루타민의 생산량을 증가시킬 수 있어 L-글루타민 대량 생산에 널리 활용될 수 있다.

- (52) CPC특허분류
 - C12P 13/14* (2013.01)
 - C12Y 603/01002* (2013.01)

이광우
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)

- (72) 발명자
 - 김희영**
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
 - 김병수**
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
-

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 산성아미노산 또는 극성 아미노산으로 치환; 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 염기성 아미노산으로 치환; 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 비극성 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴(Asparagine), 글루탐산(Glutamic acid) 또는 세린(Serine)으로 치환된, 변이형 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 히스티딘(Histidine)으로 치환된, 변이형 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린(Valine)으로 치환된, 변이형 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 99% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 변이형 폴리펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제7항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 변이형 폴리펩티드; 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움속(*Corynebacterium sp.*) 미생물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인, 미생물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 변이형 폴리펩티드; 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, L-글루타민을 상기의 배지 또는 미생물로부터 회수 또는 분리하는 단계를 추가로 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움속 미생물인, L-글루타민을 생산하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 코리네박테리움속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인, L-글루타민을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 활성이 강화된 글루타민 신테타아제 변이형 폴리펩티드 및 이를 이용하여 L-글루타민을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] L-글루타민은 소화기질환치료, 간기능강화제, 뇌기능강화제, 면역증강제, 위궤양치료제, 알콜중독치료제, 화장품의 보습제, 그리고 운동 영양제, 환자 영양제등 의약품, 화장품, 건강식품 등에 널리 쓰이는 아미노산이다.

[0004] L-글루타민 생산을 위해서는 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)과 대장균 (*Escherichia coli*)이 대표적인 미생물로 이용되고 있다. L-글루타민 생합성 경로를 살펴보면 해당과정 (Glycolysis)과 TCA 회로 (Tricarboxylic acid cycle)를 통해 생성되는 알파-케토글루탐산 (α -keto glutamic acid)을 전구체로 하여, 글루탐산 탈수소 효소 (Glutamate dehydrogenase)에 의해 L-글루탐산 (L-glutamate)이 생성되고, 글루타민 신테타아제 (Glutamine synthetase)의 반응을 통해 최종적으로 L-글루타민이 생성된다.

[0005] L-글루타민을 고농도로 생산하기 위해서는 글루타민 신테타아제의 발현을 최적화하고, 활성을 강화하는 것이 때

우 중요하다. 글루타민 신테타아제의 활성화를 위해 2가의 금속이온이 필요하며, 글리신, 알라닌, 트립토판, 히스티딘, 글루코사민-6인산, 시티딘-3인산 등에 의해 활성이 저해된다. 또한 405번째 아미노산의 아데닐화를 통해 활성이 저해된다. 선행 연구에 의하면, 405번째 아미노산을 타이로신에서 페닐알라닌으로 치환하여 아데닐화에 의한 저해를 해제하는 연구가 보고된바 있다 (EP 1229121 B1). 그러나, 여전히 고효율로 L-글루타민을 생산할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 L-글루타민 생산능이 증가된 미생물을 개발하기 위해 노력한 결과, L-글루타민의 생산을 증가시키는 글루타민 신테타아제 변이형 폴리펩티드를 확보함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 제공한다.

[0009] 본 출원은 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0010] 본 출원은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0011] 본 출원은 상기 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물을 제공한다.

[0012] 본 출원은 상기 변이형 폴리펩티드; 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-글루타민을 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0014] 이하, 본 출원을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 출원에 개시한 일 실시 양태의 설명 및 실시예는 공통된 사항에 대하여 다른 실시 양태의 설명 및 실시예에서도 적용될 수 있다. 또한, 본 출원의 상세한 설명에 개시된 다양한 요소들의 모든 조합은 본 출원의 권리범위에 속하는 것은 물론이다. 그뿐만 아니라, 하기 기술된 구체적인 설명에 의하여 본 발명출원의 권리범위가 제한되는 것이 아니다.

[0015] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[0017] 본 출원의 하나의 양태는 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase)의 아미노산 서열에서 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 변이체를 제공할 수 있다.

[0018] 구체적으로 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 제공할 수 있다.

[0019] 본 출원에서 용어 "변이체" 또는 "변이형 폴리펩티드" 또는 "변이형 단백질(효소)"는 혼용되어 사용될 수 있다.

[0020] 본 출원에서 용어 "글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase)"는 미생물에 있어 ATP 존재시, 글루탐산과 암모니아를 글루타민으로 전환하는 효소를 의미한다. 그 예로, glnA 유전자에 의해 코딩 될 수 있으나, 이제 제한되지 않는다. 본 출원의 목적상 글루탐산과 암모니아를 글루타민으로 전환하는 활성을 갖는 단백질이라면 유래에 상관없이 포함될 수 있으며, 임의의 유기체(식물 및 미생물 등)로부터 유래하는 효소를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 글루타민 신테타아제는 코리네박테리움 속 미생물 유래 효소 또는 그 변이체일 수 있으며, 예를 들어 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 브레비박테리움 락토퍼멘텀 (*Brevibacterium lactofermentum*), 브레비박테리움 플라범 (*Brevibacterium flavum*), 코리네박테리움 썬모아미노게네스 (*Corynebacterium thermoaminogenes*), 코리네박테리움 에피션스 (*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*) 유래 효소 또는 그 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 구체적으로, 상기 글루타민 신테타아제는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상, 100% 미만의 상동성

또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로, 본 출원의 글루타민 신테타아제는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 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, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0023] 본 출원에서 용어, "글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드" 또는 "글루타민 신테타아제 변이체"는 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열 일부가 다른 아미노산으로 치환되어 변화된 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 폴리펩티드를 의미한다. 구체적으로 상기 변이형 폴리펩티드는 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 다양한 서열의 폴리펩티드상에서 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드일 수 있다.

[0025] 본 출원의 'N번 위치'는 N번 위치 및 N번 위치에 상응(Corresponding)하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 구체적으로 대상단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 대상 단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 98%이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열일 수 있으며 서열번호 1의 아미노산 서열에서 401번째, 402번째 또는 404번째 위치는 서열번호 1의 아미노산 서열에 80% 이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열에서 상기 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산 위치를 포함할 수 있다.

[0026] 상기 N번 위치에 상응하는 아미노산 위치 또는 대상단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 위치는 EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, 문헌[Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277])에서 구현되는 바와 같이 Needleman-Wunsch 알고리즘(문헌[Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453]), 구체적으로 버전 5.0.0 또는 그 이후를 사용하여 결정될 수 있다. 사용되는 파라미터는 10의 갭 오픈 페널티, 0.5의 갭 연장 페널티 및 EBLOSUM62(BLOSUM62의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스일 수 있다.

[0027] 상기 N번 위치에 상응하는 아미노산 위치 또는 대상단백질과 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드의 상응하는 아미노산 위치의 아미노산 잔기의 확인은 비제한적으로 그들 각각의 디폴트 파라미터를 사용하는 MUSCLE(multiple sequence comparison by log-expectation; 버전 3.5 또는 그 이후; 문헌[Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797]), MAFFT(버전 6.857 또는 그 이후; 문헌[Katoh and Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066]; 문헌[Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518]; 문헌[Katoh and Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374]; 문헌[Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64]; 문헌[Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900]) 및 ClustalW를 사용하는 EMBOSS EMMA(1.83 또는 그 이후; 문헌[Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680])를 포함하는 몇몇 컴퓨터 프로그램을 사용한 다중 폴리펩티드 서열의 정렬에 의해 결정될 수 있다.

[0028] 그 밖의 폴리펩티드가 종래의 서열 기반의 비교로 그들의 관계를 검출하지 못하게 되는 경우(문헌[Lindahl and Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615]), 그 밖의 쌍 별 서열 비교 알고리즘이 사용될 수 있다. 서열 기반의 검색에서 보다 높은 민감도는 데이터베이스를 검색하기 위한 폴리펩티드 패밀리(프로파일)의 확률론적 표시를 이용하는 검색 프로그램을 사용하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, PSI-BLAST 프로그램은 반복적인 데이터베이스 검색 과정을 통하여 프로파일을 산출하고 원거리 상동체를 검출할 수 있다(문헌[Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402]). 폴리펩티드에 대한 패밀리 또는 슈퍼패밀리가 단백질 구조 데이터베이스에서 1개 이상의 표시를 가진다면 훨씬 더 큰 민감성이 달성될 수 있다. GenTHREADER(문헌[Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815]; 문헌[McGuffin and Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881])와 같은 프로그램은 질의 서열(query sequence)에 대한 구조적 폴딩을 예측하는 신경망에 대한 입력으로서 다양한 공급원(PSI-BLAST, 2차 구조 예측, 구조정렬 프로파일 및 용매화 포텐셜)으로부터의 정보를 이용한다. 유사하게는 문헌[Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919]의 방법은 알려지지 않은 구조의 서열과 SCOP 데이터베이스에 존재 하는 슈퍼패밀리 모델을 정렬하기 위해 사용될 수 있다. 이들 정렬은 폴리펩티드에 대한 상동성, 유사성, 또는 동일성 모델을 생성하기 위해 차례로 사용될 수 있고, 이러한 모델은 그 목적을 위해 개발된 다양한 툴을 사용하여 정확성에 대해 평가될 수 있다.

[0030] 상기 '다른 아미노산'은 각 위치에 해당되는 아미노산을 제외한 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌, 발린, 류신, 메티오닌, 이소류신, 쓰레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 프롤린, 세린, 트립토판, 페닐알라닌, 히스티딘, 시스테인, 티로신, 라이신, 아스파르트산, 및 글루탐산으

로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0031] '아미노산'은 결사슬의 성질에 따라 산성, 염기성, 극성(친수성), 비극성(소수성)의 네 가지 종류로 구분된다.
- [0032] 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 각 위치의 아미노산이 비극성 아미노산인 글리신(G), 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 및 프롤린(P); 극성 아미노산인 세린(S), 쓰레오닌(T), 시스테인(C), 티로신(Y), 아스파르트산(D), 및 글루타민(Q); 산성 아미노산인 아스파라긴(N), 및 글루탐산(E); 염기성 아미노산인 라이신(K), 아르기닌(R), 및 히스티딘(H)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산으로 치환된 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 구체적으로, 401번째 위치에 상응하는 아미노산은 산성아미노산 또는 극성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 402번째 위치에 상응하는 아미노산은 염기성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 404번째 위치에 상응하는 아미노산은 비극성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 보다 구체적으로, 401번째 위치에 상응하는 아미노산은 아스파라긴, 글루탐산 또는 세린으로 치환된 것일 수 있으며, 402번째 위치에 상응하는 아미노산은 히스티딘으로 치환된 것일 수 있으며, 404번째 위치에 상응하는 아미노산은 발린으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 출원에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 서열일 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 상기 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2를 포함할 수 있으며, 상기 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 글루탐산으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 3을 포함할 수 있고, 상기 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 세린으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 4를 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 히스티딘으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 5를 포함할 수 있으며, 상기 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환된 변이형 폴리펩티드는 서열번호 6을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 출원의 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 것일 수 있으며 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 401번째, 402번째 또는 404번째 위치의 아미노산 서열 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0040] 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질'이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 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 단백질과 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.
- [0042] 상기 변이형 폴리펩티드는 특정 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것 이외의 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 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0043] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이형은 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 보존적 치환은 생성된 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않는다.
- [0044] 또한, 전술한 특정 위치의 아미노산 이외의 하나 이상의 아미노산이 변이된 변이형은 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 전이 (transfer)에 관여하는 단백

질 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.

- [0046] 또한 상기 변이형 폴리펩티드는 위에서 설명한 서열번호 1의 변이 및/또는 상기 서열번호 1의 변이와 변이 위치의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 즉, 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 서열과 적어도 80% 이상 100% 미만의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 본 출원의 상기 변이형 폴리펩티드는 서열번호 2 내지 6의 어느 하나의 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1의 변이는 전술한 바와 같으며, 이의 상동성 또는 동일성은 전술한 변이 외의 위치에서 상동성 또는 동일성을 가지는 것일 수 있다.
- [0048] 본 출원의 목적상 상기 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드는 활성이 야생형에 비하여 강화된 것일 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 야생형에 비하여 글루타민 신테타아제 활성이 증가 및 강화된 것일 수 있다.
- [0049] 본 출원에서, 용어 "강화/증가"는 내재적 활성에 비하여 활성이 증가되는 것을 모두 포함하는 개념이다.
- [0050] 일 예로, 본 출원의 변이형 폴리펩티드는 야생형에 비하여 글루타민 생산능 이 증가된 것을 확인하여 글루타민 신테타아제 활성이 강화됨을 확인 할 수 있었다(표 1 내지 3).
- [0052] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공할 수 있다.
- [0053] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열, 글루타민 신테타아제 및 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0054] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이형 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [0055] 본 출원의 폴리뉴클레오티드에는, 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로 본 출원의 폴리뉴클레오티드에는 서열번호 1의 아미노산 서열의 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제(Glutamine synthetase) 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어 서열번호 2 내지 6의 아미노산 서열중 어느 하나를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드, 더욱 구체적으로 80% 이상, 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다.
- [0056] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 상기 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0057] 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, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 썬던 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 조건일 수 있다.
- [0058] 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 기술하는

데 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.

- [0059] 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.
- [0060] 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).
- [0061] 본 출원에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [0062] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0063] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드화할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [0064] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444]에서와 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.
- [0065] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)를 나타낸다.
- [0067] 본 출원에서 사용된 용어, "백터"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 결합부위 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 백터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0068] 본 출원에서 사용되는 백터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 백터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 백터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코

스미드, 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.

- [0069] 본 출원에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 또한, 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다.
- [0070] 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 변이형 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [0072] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이형 폴리펩티드; 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 미생물을 제공할 수 있다.
- [0074] 상기 미생물은 상기 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드 또는 L-글루타민을 생산하는 미생물일 수 있다.
- [0075] 본 출원에서 용어, "미생물"은 야생형 미생물이나, 자연적 또는 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0076] 구체적으로, 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 자연적으로 L-글루타민 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 L-글루타민의 생산능이 없는 모균주에 L-글루타민의 생산능이 부여된 미생물을 의미할 수 있다.
- [0077] 본 출원에서 사용되는 용어, "글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물"은, 본 출원의 변이형 폴리펩티드가 발현되도록 재조합 된 미생물을 의미할 수 있다.
- [0078] 예를 들어 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 상기 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 벡터로 형질전환되어 상기 변이형 폴리펩티드를 발현할 수 있는 숙주세포 또는 미생물을 의미한다.
- [0080] 본 출원에서 용어"글루타민"은 아미노산의 일종으로, 소화기질환치료, 간기능강화제, 뇌기능강화제, 면역증강제, 위궤양치료제, 알콜중독치료제, 화장품의 보습제, 그리고 운동 영양제, 환자 영양제등 의약품, 화장품, 건강식품 등에 널리 쓰이는 아미노산이다. 상기 글루타민은 ATP 존재 하에 글루타민 신테타아제에 의하여 글루탐산 및 암모니아로부터 전환되어 제조될 수 있다. 즉, 본 출원에서는 상기 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 포함함으로써, 글루타민 신테타아제의 활성이 강화되어 이를 포함하는 미생물의 글루타민 생산능을 증가시킬 수 있다.
- [0081] 구체적으로, 본 출원에서 상기 글루타민은 L-글루타민일 수 있으며, 본 출원에서 용어 "글루타민"과 "L-글루타민"은 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0082] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드나 이를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질 또는 폴리펩티드가 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치할 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 복

제가 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.

- [0083] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [0085] 본 출원의 목적상 구체적으로 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 401번째, 402번째 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 활성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있다. 구체적으로 서열번호 1의 N-말단으로부터 401번째 위치에 상응하는 아미노산이 아스파라긴, 글루탐산 또는 세린으로 치환되거나, 402번째 위치에 상응하는 아미노산이 히스티딘으로 치환되거나, 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 발린으로 치환되어, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있으며, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 N-말단으로부터 401번째 위치의 아미노산이 아스파라긴, 글루탐산 또는 세린으로 치환되거나, 402번째 위치의 아미노산이 히스티딘으로 치환되거나, 404번째 위치의 아미노산이 발린으로 치환되어, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어 상기 미생물은 상기 401번째, 402번째 또는 405번째 위치에서 변이를 포함하면서 서열번호 1의 서열과 80% 이상, 100% 미만의 동일성 또는 상동성을 가지는 변이형 폴리펩티드를 발현하거나, 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 서열의 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있다. 상기 미생물은 상기 변이 위치에 아미노산이 치환된 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 포함함으로써, 글루타민 신테타아제의 활성이 강화되어 생장에 방해 없이 글루타민의 생산량을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0087] 본 출원에서 상기 변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물은 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 엔테로박터(Enterobacter) 속, 에스케리키아(Escherichia) 속, 어위니아(Erwinia) 속, 세라티아(Serratia) 속, 슈도모나스(Pseudomonas) 속, 프로비덴시아(Providencia) 속, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 및 브레비박테리움(Brevibacterium) 속에 속하는 미생물 일 수 있다. 보다 구체적으로는 코리네박테리움(Corynebacterium) 속에 속하는 미생물일 수 있다.
- [0088] 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) 등이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구체예로는, 본 출원에서 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum)일 수 있다.
- [0089] 본 출원의 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드 또는 벡터 도입 이외에도 다양한 공지의 방법에 의해 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 발현할 수 있는 미생물을 모두 포함할 수 있다.
- [0091] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-글루타민을 생산하는 방법을 제공 할 수 있다.
- [0092] 또한, 상기 방법은 L-글루타민을 상기의 배지 또는 미생물로부터 회수 또는 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0093] 상기 "미생물" 및 "L-글루타민"은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0095] 본 출원에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.
- [0096] 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, 염기성 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 아미노산은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [0097] 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.

[0098] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 아미노산을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 아미노산을 수집(collect)할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 아미노산을 회수 할 수 있다.

[0099] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 아미노산은 정제된 형태 또는 아미노산을 함유한 미생물 발효액일 수 있다 (Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

[0101] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 401번째 위치에 상응하는 아미노산, 402번째 위치에 상응하는 아미노산 또는 404번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 글루타민 신테타아제 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드가 발현되도록 미생물을 변형하는 것을 포함하는, L-글루타민 생산능을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0102] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 변이형 폴리펩티드 또는 이를 발현하는 미생물의 L-글루타민 생산능 증가 용도를 제공한다.

[0103] 상기 변이형 폴리펩티드, 다른 아미노산에 관해서는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0105] 본 출원의 글루타민 신테타아제 활성을 강화시킨 신규한 변이형 폴리펩티드를 이용할 경우 야생형 글루타민 신테타아제 활성을 가진 균주 대비 성장속도의 지연 없이 글루타민의 생산량을 증가시킬 수 있어 글루타민 대량 생산에 널리 활용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0109] 실시예 1. glnA 유전자 ORF 내 변이 도입용 벡터 라이브러리 제작

[0111] 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)의 글루타민 신테타아제를 코딩하는 glnA 유전자의 발현량 또는 이의 활성이 강화된 변이체를 발굴하기 위한 목적으로 아래의 방법으로 라이브러리를 제작하였다.

[0112] 먼저 glnA (1,434 bp) 유전자를 포함하는 DNA 단편 (1,434 bp)의 kb 당 0-4.5개의 변이를 도입하기 위한 목적으로 GenemorphII Random Mutagenesis Kit (Stratagene)을 사용하였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 (WT)의 염색체를 주형으로 하고 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 Error-prone PCR을 수행하였다. 구체적으로, WT 균주의 염색체 (500 ng), 프라이머 7 및 8 (각각 125 ng), Mutazyme II reaction buffer (1Y), dNTP mix (40 mM), Mutazyme II DNA polymerase (2.5U)을 포함하는 반응액은 94℃에서 2분간 변성 후, 94℃에서 1분 변성, 56℃에서 1분 어닐링, 72℃에서 2분 중합을 25회 반복한 후, 72℃에서 10분간 중합 반응을 수행하였다.

[0113] 증폭된 유전자 단편은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)을 이용하여 pCRII 벡터에 연결하였고, 대장균 DH5α에 형질전환하여 카나마이신 (25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 형질전환된 콜로니 20종을 선별한 후 플라스미드를 획득하였고, 염기서열을 분석한 결과 0.5 mutations/kb 빈도로 서로 다른 위치에 변이가 도입된 것을 확인하였다. 최종적으로 약 10,000 개의 형질전환 된 대장균 콜로니를 취하여 플라스미드를

추출하였고, 이를 pTOPO-glnA(mt) 라이브러리로 명명하였다.

[0115] 실시예 2: glnA 결손주 제작 및 glnA 변이주 스크리닝

[0117] 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에서 glnA 유전자가 결손된 균주를 제작하기 위하여 아래와 같이 glnA 유전자가 결손된 벡터 pDZ-ΔglnA를 제조하였다. 구체적으로, glnA 유전자의 5' 및 3' 말단에 위치한 DNA 단편들이 (각 1000bp) pDZ 벡터(대한민국특허 제2009-0094433호)에 연결된 형태로 제작되었다.

[0118] 서열번호 29의 glnA 유전자의 염기서열에 근거하여 5' 단편 및 3' 단편에 제한효소 SalI 인식 부위를 삽입한 프라이머 서열번호 10 및 11 와 이들로부터 각각 1000 bp 떨어진 위치에서 프라이머 서열번호 9 및 12 를 합성하였다.

[0119] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 염색체를 주형으로 5' 말단 유전자 단편은 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. 동일한 방법으로 glnA 유전자의 3' 말단에 위치한 유전자 단편은 서열번호 11 및 12를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. PCR 조건은 94℃에서 2분간 변성 후, 94℃에서 1분 변성, 56℃에서 1분 어닐링, 72℃에서 40초 중합을 30회 반복한 후, 72℃에서 10분간 중합반응을 수행하였다.

[0120] 한편 제한효소 SalI으로 처리한 후, 65℃에서 20분간 열처리한 pDZ 벡터와 상기 PCR을 통하여 증폭한 삽입 DNA 단편을 Infusion Cloning Kit를 사용하여 연결한 후 대장균 DH5α에 형질전환하고 카나마이신(25 mg/1)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 서열번호 13 및 14로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 PCR을 통해 목적한 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환된 콜로니를 선별한 후 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였고 이 플라스미드를 pDZ-ΔglnA라 명명하였다.

[0121] 상기 제작된 벡터 pDZ-ΔglnA를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 전기펄스법(Van der Rest et al., Appl. Microbial. Biotechnol. 52:541-545, 1999)으로 형질전환하여 상동염색체 재조합에 의해 glnA 유전자가 결손된 균주를 제작하였다. 이와 같이 glnA 유전자가 결손된 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032::ΔglnA라고 명명하였다.

[0122] 또한, ATCC13032::ΔglnA 균주를 대상으로 pTOPO-glnA(mt) 라이브러리를 전기펄스법으로 형질전환하고 카나마이신(25mg/1)이 포함된 복합평판배지에 도말하여 약 100개의 콜로니를 확보하였다. 확보한 100주의 균주에 대하여 L-글루타민 생산능 테스트를 진행하였다. 글루타민 생산 배지 25 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 획득한 100주의 균주를 각각 접종한 후, 32℃에서 48 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 하기의 L-글루타민 생산 배지 24 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 중 배양액을 접종하고 30℃에서 48 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다.

[0123] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 및 ATCC13032::ΔglnA 균주를 대조구로 이용하였다. 배양 종료 후, 세포를 제거한 배지를 상등액 중에 존재하는 L-글루타민을 YSI 7100 Multiparameter Bioanalytical System (YSI Inc.)를 사용하여 측정하였다. ATCC13032::ΔglnA 균주 대비 L-글루타민이 생산능을 가질 뿐만 아니라, ATCC13032 보다 L-글루타민 농도가 높게 나오는 균주를 선별하고, 배양액 내 글루타민 농도를 표 1에 나타내었다. 선별된 종의 균주는 ATCC13032::glnA(mt)-1 내지 3로 명명하였다. 그 외 97종의 콜로니들은 대조구로 이용된 ATCC13032 보다 L-글루타민 농도가 낮았다.

표 1

[0124] ATCC13032 유래 ATCC13032::glnA(mt)의 L-글루타민 생산능 분석

	균주	L-글루타민 (g/L)
대조군	ATCC13032	0.89
	ATCC13032::ΔglnA	0.77
실험군	ATCC13032::glnA(mt)-1	1.25
	ATCC13032::glnA(mt)-2	0.99
	ATCC13032::glnA(mt)-3	1.05

[0126] 상기 표 1에서 볼 수 있듯이, ATCC13032::glnA(mt)-1의 경우 대조군보다 약40% 생산능 증가를 확인할 수 있었으며, ATCC13032::glnA(mt)-2의 경우 약 11% , ATCC13032::glnA(mt)-3의 경우 약 18% 생산능 증가를 확인할 수 있었다.

[0128] 실시예 3: glnA 변이주 3종 염기서열 확인

[0130] 3종의 선별 균주 ATCC13032::glnA(mt)-1 내지 3의 glnA 유전자 염기서열을 확인하기 위하여 실시예 1의 서열번호 7 및 8의 프라이머 세트를 이용하여 염색체 내 glnA 유전자를 포함한 DNA 단편을 PCR 증폭하였다. PCR 조건은 94℃에서 2분간 변성 후, 94℃에서 1분 변성, 56℃에서 1분 어닐링, 72℃에서 40초 중합을 30회 반복한 후, 72℃에서 10분간 중합반응을 수행하였다.

[0131] 증폭된 유전자의 염기서열을 분석한 결과 3종의 균주 중 차례로 ATCC13032::glnA(mt)-1은 서열번호 29의 1201~1203번째 염기서열이 기존 GAC에서 AAC로 바뀐, N 말단에서부터 401번째 아미노산인 아스파르트산이 아스파라긴으로 치환된 형태의 변이체, ATCC13032::glnA(mt)-2는 서열번호 29의 1204~1206번째 염기서열이 기존 AAG에서 CAC로 바뀐, N 말단에서부터 402번째 아미노산인 라이신이 히스티딘으로 치환된 변이체, 그리고 ATCC13032::glnA(mt)-3은 서열번호 29의 1210~1212번째 염기서열이 기존 CTC에서 GTC로 바뀐, N 말단에서부터 404번째 아미노산인 류신이 발린으로 치환된 변이체가 발견되는 균주임을 확인하였다. 상기 3종의 균주들 중 L-글루타민 생산량이 ATCC13032 대비 증가하면서 성장속도는 유사한 ATCC13032::glnA(mt)-1 균주를 가장 우수한 글루타민 신테타아제 활성 강화 균주로 선별하였다.

[0133] 실시예 4: glnA 유전자의 401번째 아미노산인 아스파르트산이 다른 아미노산으로 치환된 다양한 균주 제작

[0135] 실시예 3으로부터 401번째 아미노산이 효소 활성에 중요한 위치임을 확인한 바, 서열번호 1로 기재되는 단백질 서열의 401번째 아미노산의 위치에, 야생형이 가지는 아스파르트산을 제외한 타 아미노산으로의 치환을 시도하였다.

[0136] 실시예 3에서 확인한 변이인 D401N을 포함한 4종의 이중성 염기 치환변이들을 도입하기 위하여 각각의 재조합 벡터를 아래와 같은 방법으로 제작하였다.

[0137] 먼저, WT 균주로부터 추출한 게놈 DNA를 주형으로 glnA 유전자의 1201~1203번째 위치에서 앞뒤로 각각 약 600bp 떨어진 위치에 5' 단편 및 3' 단편에 제한효소 SalI 인식 부위를 삽입한 프라이머 서열번호 15 및 16을 합성하였다. 4종의 이중성 염기 치환변이들을 도입하기 위하여 glnA 유전자의 1201~1203번째 염기서열을 치환하기 위한 서열번호 17 내지 26의 프라이머를 합성하였다.

[0138] 추가적으로 기존에 알려진 glnA 의 아데닐화 해제 변이인 Y405F에 대하여 글루타민 생산능을 비교하기 위하여 서열번호 27 및 28의 프라이머를 합성하였다.

[0139] 구체적으로, pDZ-glnA(D401N) 플라스미드는 glnA 유전자의 5' 및 3' 말단에 위치한 DNA 단편들이 (각 600bp) pDZ 벡터(대한민국특허 제2009-0094433호)에 연결된 형태로 제작되었다. WT균주의 염색체를 주형으로 5' 말단 유전자 단편은 서열번호 15 및 18로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. PCR 조건은 94℃에서 2분간 변성 후, 94℃에서 1분 변성, 56℃에서 1분 어닐링, 72℃에서 40초 중합을 30회 반복한 후, 72℃에서 10분간 중합반응을 수행하였다. 동일한 방법으로 glnA 유전자의 3' 말단에 위치한 유전자 단편은 서열번호 17 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 제작하였다. 증폭된 DNA 단편을 Quiagen사의 PCR Purification kit를 사용하여 정제한 후, 벡터 제작을 위한 삽입 DNA단편으로 사용하였다.

[0140] 한편 제한효소 SalI으로 처리한 후 65℃에서 20분간 열처리한 pDZ 벡터와 상기 PCR을 통하여 증폭한 삽입 DNA 단편을 Infusion Cloning Kit를 사용하여 연결한 후 대장균 DH5α에 형질전환하였다. 상기 균주를 카나마이신 (25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하였다. 서열번호 13 및 14로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 PCR을 통해 목적인 유전자가 삽입된 벡터로 형질전환된 콜로니를 선별한 후 통상적으로 알려진 플라스미드 추출법을 이용하여 플라스미드를 획득하였다. 상기 플라스미드는 pDZ-glnA(D401N)으로 명명하였다.

[0141] 동일한 방법으로 서열번호 15 및 20로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 19 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 pDZ-glnA(D401E)를 제작하였으며, 또한, 서열번호 15 및 24로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 23 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 pDZ-glnA(D401S)를 제작하였다. 뿐만 아니라, 서열번호 15 및 28로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 27 및 16로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 pDZ-glnA(Y405F)를 제작하였다.

[0142] glnA 변이 도입에 따른 글루타민 농도 및 성장속도를 보다 명확히 하기 위하여 각각 제작된 벡터를 글루타민을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 에 전기펄스법으로 형질전환하여 상동염색체 재조합에 의해 glnA 유전자에 이중성 염기치환변이들이 도입된 균주 4종, ATCC13032::glnA (D401N), ATCC13032::glnA (D401E), ATCC13032::glnA (D401S), ATCC13032::glnA (Y405F)를 제작하였다. 이 중 ATCC13032::glnA (D401N)

는 CA11-4021로 명명한 후 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean CultureCenter of Microorganisms, KCCM)에 2019년 12월 19일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12645P를 부여 받았다.

[0144] **실시예 5: glnA 변이주에 대한 글루타민 생산능 분석**

[0146] ATCC13032 균주를 대조군으로 사용하여 상기 실시예 4에서 제작된 균주 4종을 아래와 같은 방법으로 배양하여 당소모 속도, 글루타민 생산능을 측정하였다.

[0147] 먼저, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 32℃에서 48 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다. 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)를 이용하여 L-글루타민의 농도를 측정하였다. 글루타민 생산능, 및 당 소모속도 측정 결과는 하기 표 2와 같다.

[0149] 종 배지 (pH 7.0)

[0150] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 µg, 티아민 HCl 1000 µg, 칼슘-판토텐산 2000 µg, 니코틴아미드 2000 µg (증류수 1 리터 기준)

[0151] 글루타민 생산 배지 (pH 8.0)

[0152] 원당 60 g, (NH₄)₂SO₄ 45 g, 대두 단백질 0.48 g, CaCO₃ 50 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, KH₂PO₄ 1 g, 티아민염산염 0.2 mg, 바이오틴 0.3 mg, 니코틴아미드 60 mg, FeSO₄·7H₂O 10 mg 및 MnSO₄·H₂O 10 mg (증류수 1리터 기준)

표 2

[0154] ATCC13032 유래 ATCC13032::glnA(mt)의 L-글루타민 생산능 및 당소모 속도 분석

	균주	L-글루타민(g/L)	당 소모속도(g/hr)
대조군	ATCC13032::△glnA	0.77	4.69
	ATCC13032	0.89	4.72
	ATCC13032::glnA (D401N)	1.25	4.76
	ATCC13032::glnA (D401E)	1.19	5.16
	ATCC13032::glnA (D401S)	0.88	6.50
아데닐화 해제 변이	ATCC13032::glnA (Y405F)	1.20	4.45

[0155] 서열번호 1의 401번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드를 포함하는 균주의 경우, 치환된 아미노산이 아스파라긴(ATCC13032::glnA (D401N)), 글루탐산(ATCC13032::glnA (D401E))인 경우 글루타민의 생산능이 각각 약 40%, 33% 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 glnA의 아데닐화 해제 변이가 도입된 균주 ATCC13032::glnA (Y405F)와 비교했을 때 보다도 글루타민의 생산능이 향상되는 결과이었다.

[0157] **실시예 6: 글루타민 생산 균주 기반 glnA 변이주 제작**

[0159] 종래의 글루타민 생산 균주인 코리네박테리움 글루탐미쿰 KFCC-10680 (대한민국 등록특허 제10-0048440호) 균주를 대상으로 상기 실시예4와 동일한 방법으로 pDZ-glnA(D401N), pDZ-glnA(D401E), pDZ-glnA(Y405F)를 각각 전기펄스법으로 형질전환하였다. glnA 유전자에 이중성 염기치환변이들이 도입된 균주 3종은 KFCC-10680::glnA (D401N), KFCC-10680::glnA (D401E), KFCC-10680::glnA (Y405F)로 각각 명명하였다.

[0161] **실시예 7: 글루타민 생산 균주 기반 glnA 변이주에 대한 글루타민 생산능 분석**

[0162] KFCC-10680 균주를 대조군으로 사용하여 선별균주 3종을 아래와 같은 방법으로 배양하여 당소모 속도, 글루타민 생산능을 측정하였다.

[0163] 먼저, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30℃에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 32℃에서 48 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같다. 배양 종료 후 HPLC (Waters 2478)를 이용하여 L-글루타민의 농도를 측정하였다. 글루타민 생산능, 및 당 소모속도 측정 결과는 하기 표 3와 같다.

- [0165] 중 배지 (pH 7.0)
- [0166] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 μg, 티아민 HCl 1000 μg, 칼슘-판토텐산 2000 μg, 니코틴아미드 2000 μg (증류수 1 리터 기준)
- [0168] 글루타민 생산 배지 (pH 8.0)
- [0169] 원당 60 g, (NH₄)₂SO₄ 45 g, 대두 단백질 0.48 g, CaCO₃ 50 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, KH₂PO₄ 1 g, 티아민염산염 0.2 mg, 바이오틴 0.3 mg, 니코틴아미드 60 mg, FeSO₄·7H₂O 10 mg 및 MnSO₄·H₂O 10 mg (증류수 1리터 기준)

표 3

- [0171] KFCC-10680 유래 KFCC-10680::glnA(mt)의 L-글루타민 생산능 및 당소모 속도 분석

	균주	L-글루타민(g/L)	당 소모속도(g/hr)
대조군	KFCC-10680	13.8	2.36
	KFCC-10680::glnA (D401N)	16.7	2.38
	KFCC-10680::glnA (D401E)	15.1	2.58
아데닐화 해제 변이	KFCC-10680::glnA (Y405F)	14.1	2.21

- [0172] 서열번호 1의 401번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 폴리펩티드를 포함하는 균주의 경우, 치환된 아미노산이 아스파라긴(KFCC-10680::glnA (D401N)), 글루탐산(KFCC-10680::glnA (D401E))인 경우 글루타민의 생산능이 각각 약 21%, 9% 향상되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0173] 이는 glnA의 아데닐화 해제 변이가 도입된 균주 KFCC-10680::glnA (Y405F)와 비교했을 때 보다도 글루타민의 생산능이 향상되는 결과를 보임을 확인할 수 있었다.
- [0175] 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.

수탁번호

- [0177] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
- 수탁번호 : KCCM12645P
- 수탁일자 : 20191219

서열목록

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> A modified polypeptide of glutamine synthetase and a method for L-glutamine using the same
- <130> KPA191398-KR
- <160> 29
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 477

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Glutamine synthetase a.a.

<400> 1

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu

1 5 10 15

Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu

20 25 30

Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Glu

35 40 45

Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile

50 55 60

Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu

65 70 75 80

Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His

85 90 95

Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala

100 105 110

Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys

115 120 125

Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr

130 135 140

Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly

145 150 155 160

Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu

165 170 175

Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr

180 185 190

Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala

195 200 205

Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln

210 215 220

Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp
 225 230 235 240

Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly
 245 250 255

Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser
 260 265 270

Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe
 275 280 285

His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr
 290 295 300

Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn

305 310 315 320

Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro
 325 330 335

Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile
 340 345 350

Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala
 355 360 365

Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met
 370 375 380

Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val
 385 390 395 400

Asp Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro
 405 410 415

Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp
 420 425 430

Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu
 435 440 445

Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu

450 455 460

Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys

Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala
 195 200 205
 Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln
 210 215 220
 Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp
 225 230 235 240

 Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly
 245 250 255
 Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser
 260 265 270
 Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe
 275 280 285
 His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr
 290 295 300
 Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn

 305 310 315 320
 Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro
 325 330 335
 Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile
 340 345 350
 Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala
 355 360 365
 Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met
 370 375 380

 Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val
 385 390 395 400
 Asn Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro
 405 410 415
 Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp
 420 425 430
 Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu
 435 440 445

Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu

450 455 460

Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys

465 470 475

<210> 3

<211> 477

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Glutamine synthetase variant

a.a.

<400> 3

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu

1 5 10 15

Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu

20 25 30

Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Glu

35 40 45

Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile

50 55 60

Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu

65 70 75 80

Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His

85 90 95

Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala

100 105 110

Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys

115 120 125

Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr

130 135 140

Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly

145 150 155 160

Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu
 165 170 175
 Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr
 180 185 190
 Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala
 195 200 205
 Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln
 210 215 220
 Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp
 225 230 235 240

 Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly
 245 250 255
 Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser
 260 265 270
 Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe
 275 280 285
 His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr
 290 295 300
 Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn

 305 310 315 320
 Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro
 325 330 335
 Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile
 340 345 350
 Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala
 355 360 365
 Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met
 370 375 380

 Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val
 385 390 395 400
 Glu Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro

405 410 415
 Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp
 420 425 430
 Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu

450 455 460
 Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys
 465 470 475

<210> 4

<211> 477

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Glutamine synthetase variant

a. a.

<400> 4

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu
 1 5 10 15
 Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu

20 25 30
 Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Glu
 35 40 45
 Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile
 50 55 60
 Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His
 85 90 95

Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala
 100 105 110
 Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys
 115 120 125

Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr
 130 135 140
 Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly
 145 150 155 160
 Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu
 165 170 175
 Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr
 180 185 190
 Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala
 195 200 205
 Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln
 210 215 220
 Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp
 225 230 235 240
 Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly
 245 250 255
 Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser
 260 265 270
 Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe
 275 280 285
 His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr
 290 295 300
 Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn
 305 310 315 320
 Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro
 325 330 335
 Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile
 340 345 350
 Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala
 355 360 365
 Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met

370 375 380
 Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val
 385 390 395 400
 Ser Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro
 405 410 415
 Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp
 420 425 430
 Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu

 450 455 460
 Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys
 465 470 475
 <210> 5
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Glutamine synthetase variant
 a.a.
 <400> 5
 Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu
 1 5 10 15
 Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu

 20 25 30
 Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Glu
 35 40 45
 Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile
 50 55 60
 Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His

	85	90	95
Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala			
	100	105	110
Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys			
	115	120	125
Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr			
	130	135	140
Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly			
145	150	155	160
Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu			
	165	170	175
Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr			
	180	185	190
Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala			
	195	200	205
Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln			
	210	215	220
Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp			
225	230	235	240
Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly			
	245	250	255
Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser			
	260	265	270
Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe			
	275	280	285
His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr			
	290	295	300
Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn			
305	310	315	320
Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro			
	325	330	335

Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile
 340 345 350
 Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala
 355 360 365
 Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met
 370 375 380

Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val
 385 390 395 400
 Asp His Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro
 405 410 415
 Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp
 420 425 430
 Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu

450 455 460
 Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys
 465 470 475

<210> 6

<211> 477

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Glutamine synthetase variant

a. a.

<400> 6

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu
 1 5 10 15
 Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu
 20 25 30
 Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Ile Glu
 35 40 45
 Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile

50 55 60
 Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His
 85 90 95

 Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala
 100 105 110
 Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys
 115 120 125
 Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr
 130 135 140
 Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly
 145 150 155 160
 Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu

 165 170 175
 Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr
 180 185 190
 Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala
 195 200 205
 Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln
 210 215 220
 Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp
 225 230 235 240

 Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly
 245 250 255
 Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser
 260 265 270
 Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe
 275 280 285
 His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr
 290 295 300

Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn

305 310 315 320

Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro

325 330 335

Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile

340 345 350

Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala

355 360 365

Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met

370 375 380

Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val

385 390 395 400

Asp Lys Asp Val Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro

405 410 415

Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp

420 425 430

Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu

435 440 445

Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu

450 455 460

Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys

465 470 475

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gtggcgtttg aaaccccgga ag

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ttagcagtcg aagtacaatt cg 22

<210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 ggggatcctc tagagtcgac cttgattgat catgtcgagg 40

<210> 10
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 ctatcggcta gctaagtgaa ggtgactcct cattgacatg gg 42

<210> 11
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 cccatgtcaa ttaggagtcg ccttcactta gctagccgat ag 42

<210> 12
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gcttgcacgc ctgcaggtcg actctggcga ggtccatag 40

<210> 13

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 tgcaaggcga ttaagttggg taac 24
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 gaaacagcta tgaccatgat tacg 24

 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 cgatgacatg gttcgcaacc tcg 23
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 gagcaaacc tcacatctca 20
 <210> 17
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17

gcatcgagcc acacgctcca gtgaacaagg acctctacga actacc 46

<210> 18
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18

ggtagttcgt agaggtcctt gttcactgga gcgtgtggct cgatgc 46

<210> 19
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19

gcatcgagcc acacgctcca gtggaaaagg acctctacga actacc 46

<210> 20
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20

ggtagttcgt agaggtcctt ttccactgga gcgtgtggct cgatgc 46

<210> 21
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21

gcatcgagcc acacgctcca gtgcacaagg acctctacga actacc 46

<210> 22
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 22
 ggtagttcgt agaggtcctt gtgcactgga gcgtgtggct cgatgc 46
 <210> 23
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 gcatcgagcc acacgtcca gtgagcaagg acctctacga actacc 46
 <210> 24
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 ggtagttcgt agaggtcctt gctcactgga gcgtgtggct cgatgc 46
 <210> 25
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 gcatcgagcc acacgtcca gtggtcaagg acctctacga actacc 46
 <210> 26
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 ggtagttcgt agaggtcctt gaccactgga gcgtgtggct cgatgc 46
 <210> 27
 <211> 46

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 gcatcgagcc acacgctcca gtgaacaagg acctcttcga actacc 46
 <210> 28
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 ggtagttcga agaggtcctt gttcactgga gcgtgtggct cgatgc 46
 <210> 29
 <211> 1434
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Glutamine synthetase n.t
 <400> 29
 gggcggtttg aaaccccgga agaaattgtc aagtccatca aggatgaaaa cgtcgagttc 60
 gttgacgttc gattcaccca ccttcccggc accgagcagc acttcagcat cccagctgcc 120
 agcttcgatg cagatacaat cgaagaaggt ctgcattcg acggatcctc gatccgtggc 180
 ttcaccacga tcgacgaatc tgacatgaat ctctgcccag acctcggaac ggccaccctt 240
 gatccattcc gcaaggcaaa gacctgaac gttaagtctc tcgttcacga tcctttcacc 300
 cgcgaggcat tctcccgcga cccacgcaac gtggcacgca aggcagagca gtacctggca 360
 tccaccggca ttgcagacac ctgcaacttc ggcgccgagg ctgagttcta cctcttcgac 420
 tccgttcgct actccaccga gatgaactcc ggcttctacg aagtagatac cgaagaaggc 480
 tgggtgaacc gtggcaagga aaccaacctc gacggcacc caaacctggg cgcaaagaac 540
 cgcgtcaagg gtggctactt cccagtagca ccatacgacc aaaccgttga cgtgcgcat 600
 gacatggttc gcaacctcgc agcttccggc ttgctctttg agcgtttcca ccacgaagtc 660
 ggtggcggac agcaggaaat caactaccgc ttcaacacca tgctccacgc ggcagatgat 720
 atccagacct tcaagtacat catcaagaac accgctcgcc tccacggcaa ggctgcaacc 780
 ttcatgccta agccactggc tggcgacaac ggttccggca tgcacgctca ccagtcctc 840

tggaaggacg gcaagccact cttccacgat gagtccggct acgcaggcct gtccgacatc	900
gcccgtact acatcggcgg catcctgcac cacgcaggcg ctgttctggc gttaccaac	960
gcaaccctga actcctacca cegtctgggt ccaggcttcg aggctccaat caacctggtg	1020
tactcacagc gcaaccgttc cgctgctgic cgtatcccaa tcaccggatc caaccgaag	1080
gcaaagcgca tcgaattccg cgctccagac ccatcaggca accatacct gggtttgca	1140
gcgatgatga tggccggcct cgacggcatc aagaaccgca tcgagccaca cgctccagtg	1200
gacaaggacc tctacgaact accaccagag gaagctgcat ccattccaca ggcaccaacc	1260
tccttgaag catcctgaa ggcaactgcag gaagacaccg acttcctcac cgagtctgac	1320
gtcttcaccg aggatctcat cgaggcgtac atccagtaca agtacgaaa cgagatctcc	1380
ccagttcgcc tgcgccaac cccgcaggaa ttcgaattgt acttcgactg ctaa	1434