



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0131654
(43) 공개일자 2023년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) C12N 15/77 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
C12N 15/77 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0028809
(22) 출원일자 2022년03월07일
심사청구일자 2022년03월07일

(71) 출원인
씨제이제일제당 (주)
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
(72) 발명자
최우성
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
장재원
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 및 이를 이용한 L-쓰레오닌 생산 방법

(57) 요약

본 출원은 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 및 이를 이용한 L-쓰레오닌 생산 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C12P 13/08 (2013.01)

(72) 발명자
백미나
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)

정기용
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다른 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산인 것인, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 다른 아미노산은 세린인 것인, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;를 포함하는 미생물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 야생형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움 속 미생물과 비교하여 L-쓰레오닌 생산능이 증가된, 미생물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것인, 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰인 것인, 미생물.

청구항 9

서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-쓰레오닌 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 및 이를 이용한 L-쓰레오닌 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물은 L-아미노산 생산에 많이 이용되고 있는 그람 양성 미생물이다. L-아미노산, 특히 L-쓰레오닌은 필수 아미노산의 하나로, 동물사료, 사람의 의약품 및 화장품 산업에 사용되고 있으며 코리네박테리움 균주를 이용한 발효에 의해 생성되고 있다.

[0004] 코리네박테리움 균주를 이용한 L-아미노산의 제조방법을 개선하기 위하여 많은 시도가 행해지고 있다. 그 중에서 재조합 DNA 기술을 이용하여 특정유전자를 파괴시키거나 감쇠 발현시킴으로써 L-아미노산을 생산하는 코리네박테리움 균주를 개량하려는 연구가 있었다. 또한, 각각의 L-아미노산 생합성에 관련된 유전자를 증폭시켜 L-아미노산 생성에 미치는 효과를 연구하고 L-아미노산 생산 코리네박테리움 균주를 개량하려는 연구가 많이 있어왔다. 또한, 다른 박테리아 유래의 외래 유전자를 도입하는 경우도 있다. 그러나, 상기한 종래 방법에 의하더라도 여전히 L-쓰레오닌의 생산능이 향상된 균주는 여전히 요구되고 있다.

[0005] 한편, 특정 아미노산 배출 유전자의 발현은 미생물에서 해당 아미노산의 생산성 향상을 야기하여 왔다. 코리네박테리움 속 미생물의 L-리신 배출 유전자(*lysE*)의 발현 강화는 리신의 생산성을 향상시켰다(WO1997-023597). 또한, 대장균에서 기능이 규명되어있지 않은 유전자들인 *yeaS* 유전자, *yahN* 유전자, *yfiK* 유전자 그리고 *yggA* 유전자를 강화시킴으로써, L-리신, L-알라닌, L-글루타민산, L-쓰레오닌, L-히스티딘, L-발린, L-아르기닌, L-프롤린 및 L-이소류신 생산성이 향상되었다는 내용이 특허(EP1016710B1)에 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 제공한다.

[0008] 본 출원은 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0009] 본 출원은 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;를 포함하는 미생물을 제공한다.

[0010] 본 출원은 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질; 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-쓰레오닌 생산 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 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. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 출원이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 출원의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0014] 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 제공한다.

- [0016] 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째에 상응하는 위치의 아미노산이 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 또는 상기 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 전하를 띠지 않는 곁사슬(uncharged amino acid)을 갖는 아미노산 중 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 아미노산인, 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 구체적으로, 상기 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 아르기닌, 라이신, 히스티딘, 아스파르트산, 아스파라긴, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 글루탐산 및 글루타민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0018] 보다 구체적으로, 상기 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있고, 그 예로 세린으로 치환된 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0019] 보다 더욱 구체적으로, 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다.
- [0020] 본 출원의 변이 도입의 대상이 되는 단백질은 L-쓰레오닌 배출 활성을 가지는 단백질일 수 있다. 구체적으로 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하며 쓰레오닌 배출 활성을 갖는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 출원의 변이 도입의 대상이 되는 단백질에 해당될 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 변이 도입의 대상이 되는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 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 자명하다.
- [0022] 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 133번 위치에 상응하는 아미노산이 글리신 이외의 아미노산, 일예로, 세린이고, 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0023] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.
- [0024] 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. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [0025] 예를 들면, 전하를 띠는 곁사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘을, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 전하를 띠지 않는 곁사슬(uncharged side chain)을 갖는 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함하는 것으로 분류할 수 있다.

- [0027] 본 출원에서 용어, "변이형 단백질" 또는 "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환 (conservative substitution) 및/또는 변형(modification)되어 상기 변이체의 변이 전 아미노산 서열과 상이하 나 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 변이체는 일반적으로 상 기 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 폴리펩티드의 특성을 평가하 여 동정(identify)될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 변이 전 폴리펩티드에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같 은 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 "변이형 단백질"은 변이형, 변형, 변이형 폴리펩티드, 변이된 단백질, 변이 및 변이체 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified polypeptide, modified protein, mutant, mutein, divergent 등)가 혼용되어 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 목적상 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 133 번째 위치에 상응하는 아미노산이 세린으로 치환된 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 변이체의 N-말단에는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이동(translocation)에 관여하는 시그널(또는 리더) 서열이 컨주게이트 될 수 있다. 또한 상기 변이체는 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 컨주게이트 될 수 있다.
- [0030] 본 출원에서 용어, '상동성 (homology)' 또는 '동일성 (identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0031] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격 한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또 는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [0032] 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 동 일성을 결정할 수 있다.
- [0033] 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 서 열 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 그 리고 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) 치 환 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.

- [0034] 본 출원의 일 예로, 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질은 L-쓰레오닌 배출 단백질 활성을 갖는 야생형 폴리펩티드에 비해 L-쓰레오닌 생산능이 증가되도록 하는 활성을 가질 수 있다.
- [0035] 본 출원에서 용어, "L-쓰레오닌 배출 단백질(L-Threonine efflux protein)"은 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 막 단백질을 의미하며, RhtC와 혼용될 수 있다. 상기 RhtC의 아미노산 서열은 공지의 데이터베이스인 NCBI의 Genebank 등에서 얻을 수 있다.
- [0036] 일 예로, 본 출원의 RhtC는 미생물 유래일 수 있으며, 구체적으로 원핵 미생물 유래일 수 있고, 보다 구체적으로 대장균(*Escherichia coli*) 등으로부터 유래할 수 있으나, 다양한 유래의 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질일 수 있다. 본 출원에서 변이 대상이 되는 RhtC의 변형전 아미노산 서열에서 서열번호 1의 133번째에 상응하는 변형전 아미노산은 글리신(G)일 수 있다.
- [0038] 본 출원에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 폴리펩티드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 폴리펩티드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다. 본 출원에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참조 (reference) 단백질에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.
- [0039] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 1과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어, 본 출원에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 쿼리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 아미노산의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.
- [0040] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needleman 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 적절히 사용할 수 있다.
- [0042] 본 출원의 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0043] 본 출원의 *rhtC* 유전자는 RhtC 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 것으로 공지된 유전자를 모두 포함할 수 있다.
- [0044] 구체적으로, 본 출원의 *rhtC* 유전자는 대장균 유래의 *rhtC* 유전자일 수 있다. 일예로, 본 출원의 *rhtC* 유전자는 대장균 유래의 WP_000928824.1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0045] 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 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [0046] 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 133번째 위치에 상응하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하거나 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에서 397 내지 399번째 위치에 상응하는 코돈이 다른 아미노산을 코딩하는 코돈으로 치환된 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 보다 구체적인 본 출원의 일 예로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다.
- [0047] 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열을 가지거나 포함하게

나, 또는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 상동성 또는 동일성을 갖는 서열에서, 서열번호 1의 133번째 위치에 상응하는 아미노산을 코딩하는 코돈은 글리신 이외의 아미노산, 일례로, 세린을 코딩하는 코돈 중 하나일 수 있다.

[0048] 또한, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(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, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0049] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[0050] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55°C의 Tm 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 Tm 값은 60°C, 63°C 또는 65°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[0051] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변하는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).

[0053] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다. 상기 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 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 포함하는 DNA 제조물을 포함할 수 있다. 상기 발현조절영역은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오피레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.

[0055] 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 pDZ계, pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pDC, pDCM2, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[0056] 일례로 세포 내 염색체 삽입 벡터를 통해 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 여

부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 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.

[0057] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 혹은 미생물 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드가 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 목적 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로도 도입될 수 있다. 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 제한되지 않는다.

[0058] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0060] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 제공하는 것이다.

[0061] 본 출원의 균주는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.

[0062] 본 출원에서 용어, "미생물(또는, 균주)"는 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 폴리펩티드, 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.

[0063] 본 출원의 균주는 자연적으로 L-쓰레오닌 생산능을 가지고 있는 균주 또는 L-쓰레오닌 생산능이 없는 균주에 L-쓰레오닌 생산능이 부여된 미생물일 수 있다. 일례로, 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입되어 L-쓰레오닌 배출능이 향상된 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 출원의 균주는 본 출원의 변이체를 포함하지 않는 모균주 또는 야생형 코리네박테리움 속 균주에 비하여 L-쓰레오닌 생산능이 증가된 미생물일 수 있다. 상기 미생물은 본 출원의 변이체 도입으로 L-쓰레오닌 배출능이 증가하여 L-쓰레오닌 생산능이 향상된 것일 수 있다.

[0065] 그 예로, 상기 L-쓰레오닌 생산능의 증가 여부를 비교하는 대상 균주인, L-쓰레오닌 배출 단백질 비변형 미생물은 L-쓰레오닌 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 CA09-0903 균주(기탁번호 KCCM12502P, 대한민국 등록특허 제10-2126951호), 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881-THR(기탁번호 KCCM11222P, US 10590446 B2)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 일 예로, 상기 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주 또는 비변형 미생물의 L-쓰레오닌 생산능에 비하여 약 1% 이상, 구체적으로는 약 1% 이상, 약 2.5% 이상, 약 5% 이상, 약 7.5% 이상, 약 10% 이상, 약 12.5% 이상, 약 15% 이상, 약 17.5% 이상, 약 20% 이상, 약 22.5% 이상, 약 25% 이상, 약 27.5% 이상, 약 30% 이상, 약 32.5% 이상 또는 약 33% 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하 또는 약 15% 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 변이 전 모균주, 비변형 미생물 또는 L-쓰레오닌 배출 단백질 비변형 미생물의 생산능에 비해 +값의 증가량을 갖는 한, 이에 제한되지 않는다. 다른 예에서, 상기 L-쓰레오닌 생산능이 증가된 재조합 균주는 변이 전 모균주, 비변형 미생물 또는 L-쓰레오닌 배출 단백질 비변형 미생물에 비하여, L-쓰레오닌 생산능이 약 1.01

배 이상, 약 1.025배 이상, 약 1.05배 이상, 약 1.075배 이상, 약 1.10배 이상, 약 1.125배 이상, 약 1.15배 이상, 약 1.175배 이상, 약 1.20배 이상, 약 1.225배 이상, 약 1.25배 이상, 약 1.275배 이상, 약 1.30배 이상, 약 1.325배 이상 또는 약 1.33배 이상 (상한값은 특별한 제한은 없으며, 예컨대, 약 10배 이하, 약 5배 이하, 약 3배 이하, 또는 약 2배 이하일 수 있음) 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 본 출원에서 용어, "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 야생형 균주 또는 천연형 균주 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 균주를 의미할 수 있다. 또한, 본 출원의 용어 "L-쓰레오닌 배출 단백질 비변형 미생물"은 본 명세서에 기재된 L-쓰레오닌 배출 단백질 변이체가 도입되지 않거나 도입되기 전의 균주를 의미할 수 있다. 본 출원의 L-쓰레오닌 배출 단백질 비변형 미생물은 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변형 외 다른 단백질 또는 다른 유전자의 변형을 포함하는 균주를 제외하는 것은 아니다.

[0068] 본 출원에서 용어 "비변형 미생물"은 "변형 전 균주", "변형 전 미생물", "비변이 균주", "비변형 균주", "비변이 미생물" 또는 "기준 미생물"과 혼용될 수 있다.

[0069] 본 출원의 미생물은 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물; 또는 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함되도록 유전적으로 변형된 미생물(예컨대, 재조합 미생물)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "내재적 활성화"는 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주, 야생형 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성화"와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0070] 본 출원의 또 다른 일 예로, 본 출원의 미생물은 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루나(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 싱귤라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있다.

[0072] 다른 하나의 예로, 본 출원의 재조합 미생물은, L-쓰레오닌 생합성 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 강화되거나, L-쓰레오닌 분해 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 약화되어 L-쓰레오닌 생산능이 강화된 미생물일 수 있다.

[0073] 구체적으로, 본 출원의 미생물은 상기 L-쓰레오닌의 생합성 경로를 강화시키기 위해, 예를 들면, 쓰레오닌 합성 효소를 코딩하는 *thrC*, 포스포에놀 피루베이트 카복실라아제를 코딩하는 *ppc* 유전자, 포도당 유입에 관여하는 *galP* 유전자, 리신-민감성 아스파르토키나아제 3(lysine-sensitive aspartokinase 3)를 코딩하는 *lysC* 유전자, 호모세린 탈수소효소(homoserine dehydrogenase)를 코딩하는 *hom* 유전자 또는 옥살로아세테이트(Oxaloacetate) pool 증가를 유도하는 *pyc* 유전자 등의 발현은 미생물 내에서 강화 또는 증가될 수 있다.

[0074] 상기 L-쓰레오닌에 대한 피드백 저해를 해제시키기 위해, 예를 들면, *lysC* 유전자, *hom* 유전자 또는 아스파르토키나아제 및 호모세린 탈수소효소 1의 이중 기능성을 가지는(Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1) *thrA* 유전자 등에 유전자 변이를 도입할 수 있다.

[0075] 상기 L-쓰레오닌의 생합성 경로를 약화시키는 유전자를 불활성화시키기 위해, 예를 들면, L- 쓰레오닌 생합성 중간체인 옥살로아세테이트(OAA)를 포스포에놀 피루베이트(PEP)로 전환하는데 관여하는 *pckA* 유전자, *lysC* 유전자를 억제하는 *tyrR* 유전자, 포도당 유입에 관여하는 *galP* 유전자의 발현을 억제하는 *galR* 유전자 또는 DNA-결합 전사 이중 조절자(DNA-binding transcriptional dual regulator)인 *mcbR* 유전자 등의 발현은 미생물 내에서 약화 또는 불활성화 될 수 있다.

[0076] 상기 L-쓰레오닌 오페론의 활성을 증가시키기 위해, 아스파르토키나아제(aspartokinase), 호모세린디히드로게나아제(homoserine dehydrogenase), 호모세린 키나아제(homoserine kinase) 및 쓰레오닌 신타아제(threonine synthase)를 코딩하는 유전자로 구성된 쓰레오닌 오페론(일본 공개특허 제2005-227977호)을 포함하는 플라스미드 또는 대장균 유래의 쓰레오닌 오페론 등을 미생물에 도입하여(TURBA E, et al, Agric. Biol. Chem.

53:2269~2271, 1989), 미생물 내에서 쓰레오닌 오피론 발현을 증가시킬 수 있다.

- [0077] 또한, L-쓰레오닌 유사체인 α -아미노- β -히드록시 발레르산 또는 D,L-쓰레오닌 히드록사메이트 등에 대하여 내성을 부여할 수 있다.
- [0078] 또한, L-쓰레오닌과 공통된 전구체를 가지는 L-라이신의 생합성 경로에 작용하는 유전자인 *dapA*(디하이드로피콜린산 신테이즈: dihydrodipicolinate synthase), *lysA*(디아미노피멜산 디카복실레이즈: Diaminopimelate decarboxylase), *ddh*(디아미노피멜산 디하이드로게나아제: diaminopimelate dehydrogenase) 유전자를 약화시킬 수 있다.
- [0079] 그러나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 유전자 발현 조절 방법으로 L-쓰레오닌 생산능을 강화할 수 있다.
- [0081] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드(그 예로, 각 효소의 명칭으로 특정된 단백질을 포함한다.)의 활성의 "약화"는 내재적 활성에 비하여 활성이 감소되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다. 상기 약화는 불활성화(inactivation), 결핍(deficiency), 하향조절(down-regulation), 감소(decrease), 저하(reduce), 감쇠(attenuation) 등의 용어와 혼용될 수 있다.
- [0082] 상기 약화는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변이 등으로 폴리펩티드 자체의 활성이 본래 미생물이 가지고 있는 폴리펩티드의 활성에 비해 감소 또는 제거된 경우, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 유전자의 발현 저해 또는 폴리펩티드로의 번역(translation) 저해 등으로 세포 내에서 전체적인 폴리펩티드 활성 정도 및/또는 농도(발현량)가 천연형 균주에 비하여 낮은 경우, 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 전혀 이루어지지 않은 경우, 및/또는 폴리뉴클레오티드의 발현이 되더라도 폴리펩티드의 활성이 없는 경우 역시 포함할 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "불활성화, 결핍, 감소, 하향조절, 저하, 감쇠"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성에 비하여 낮아진 것을 의미한다.
- [0083] 이러한 폴리펩티드의 활성의 약화는, 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 수행될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다(예컨대, Nakashima N et al., Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2773-2793, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등).
- [0085] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 활성의 약화는
- [0086] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전체 또는 일부의 결손;
- [0087] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현이 감소하도록 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형;
- [0088] 3) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 서열의 변형(예컨대, 아미노산 서열 상의 1 이상의 아미노산의 삭제/치환/부가);
- [0089] 4) 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 제거 또는 약화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 핵산염기 서열 상의 1 이상의 핵산염기의 삭제/치환/부가);
- [0090] 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [0091] 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입;
- [0092] 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가;
- [0093] 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE); 또는
- [0094] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 예컨대,

- [0096] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자 일부 또는 전체의 결손은, 염색체 내 내재적 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 전체의 제거, 일부 뉴클레오티드가 결실된 폴리뉴클레오티드로의 교체 또는 마커 유전자로 교체될 수 있다.
- [0097] 또한, 상기 2) 발현조절영역(또는 발현조절서열)의 변형은, 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절영역(또는 발현조절서열) 상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖는 서열로의 교체될 수 있다. 상기 발현조절영역에는 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0098] 상기 3) 및 4)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은 폴리펩티드의 활성을 약화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 약한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 없도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 서열 내 변이를 도입하여 종결 코돈을 형성시킴으로써, 유전자의 발현을 저해하거나 약화시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 상기 5) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 낮은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0100] 상기 6) 폴리펩티드를 코딩하는 상기 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)의 도입은 예를 들어 문헌 [Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986]을 참고할 수 있다.
- [0101] 상기 7) 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능한 2차 구조물을 형성시키기 위하여 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 사인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열 앞단에 사인-달가르노 서열과 상보적인 서열의 부가는 mRNA 번역을 불가능하게 하거나 속도를 저하시키는 것일 수 있다.
- [0102] 또한, 상기 8) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 반대 방향으로 전사되는 프로모터의 부가(Reverse transcription engineering, RTE)는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 전사체에 상보적인 안티센스 뉴클레오티드를 만들어 활성을 약화하는 것일 수 있다.
- [0104] 본 출원에서 용어, 폴리펩티드의 활성의 "강화"는, 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 여기서 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다. 폴리펩티드의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 폴리펩티드의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.
- [0105] 상기 강화는 외래의 폴리펩티드를 도입하거나, 내재적인 폴리펩티드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량)를 통해 달성할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 활성의 강화 여부는 해당 폴리펩티드의 활성 정도, 발현량 또는 해당 폴리펩티드로부터 배출되는 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.
- [0106] 상기 폴리펩티드의 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 폴리펩티드의 활성을 변형전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당 업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등).
- [0107] 구체적으로, 본 출원의 폴리펩티드의 활성의 강화는
- [0108] 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가;
- [0109] 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역을 활성이 강력한 서열로 교체;

- [0110] 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열의 변형;
- [0111] 4) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형;
- [0112] 5) 폴리펩티드 활성이 강화되도록 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 활성이 강화되도록 변형된 폴리펩티드를 코딩하도록 상기 폴리펩티드 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형);
- [0113] 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입;
- [0114] 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화;
- [0115] 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식; 또는
- [0116] 9) 상기 1) 내지 8) 중 선택된 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0117] 보다 구체적으로,
- [0118] 상기 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포 내 카피수 증가는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터의 숙주세포 내로의 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 또는, 해당 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내의 염색체 내에 1 카피 또는 2 카피 이상 도입에 의해 달성되는 것일 수 있다. 상기 염색체 내에 도입은 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 전술한 바와 같다.
- [0119] 상기 2) 폴리펩티드를 코딩하는 염색체상의 유전자 발현조절영역(또는 발현조절서열)을 활성이 강력한 서열로 교체는, 예를 들면, 상기 발현조절영역의 활성을 더욱 강화하도록 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 가지는 서열로의 교체일 수 있다. 상기 발현조절영역은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 그리고 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다. 일 예로, 본래의 프로모터를 강력한 프로모터로 교체시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0120] 공지된 강력한 프로모터의 예에는 CJ1 내지 CJ7 프로모터(미국등록특허 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(미국등록특허 US 10584338 B2), O2 프로모터(미국등록특허 US 10273491 B2), tkt 프로모터, yccA 프로모터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0121] 상기 3) 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 전사체의 개시코돈 또는 5'-UTR 지역을 코딩하는 염기서열 변형은, 예를 들면, 내재적 개시코돈에 비해 폴리펩티드 발현율이 더 높은 다른 개시코돈을 코딩하는 염기 서열로 치환하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0122] 상기 4) 및 5)의 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 폴리펩티드의 활성을 강화하도록 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이 발생, 또는 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 활성이 증가하도록 개량된 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열로의 교체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 교체는 구체적으로 상동재조합에 의하여 폴리뉴클레오티드를 염색체내로 삽입함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 사용되는 벡터는 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커 (selection marker)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0123] 상기 6) 폴리펩티드의 활성을 나타내는 외래 폴리뉴클레오티드의 도입은, 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 폴리펩티드를 코딩하는 외래 폴리뉴클레오티드의 숙주세포 내 도입일 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩티드와 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한이 없다. 상기 도입에 이용되는 방법은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 폴리펩티드가 생성되어 그 활성이 증가될 수 있다.
- [0124] 상기 7) 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화는, 내재 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 전사 또는 번역이 증가하도록 코돈 최적화한 것이거나, 또는 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화한 것일 수 있다.

- [0125] 상기 8) 폴리펩티드의 삼차구조를 분석하여 노출 부위를 선택하여 변형하거나 화학적으로 수식하는 것은, 예를 들어 분석하고자 하는 폴리펩티드의 서열정보를 기지 단백질들의 서열정보가 저장된 데이터베이스와 비교함으로써 서열의 유사성 정도에 따라 주형 단백질 후보를 결정하고 이를 토대로 구조를 확인하여, 변형하거나 화학적으로 수식할 노출 부위를 선택하여 변형 또는 수식하는 것일 수 있다.
- [0126] 이와 같은 폴리펩티드 활성의 강화는, 상응하는 폴리펩티드의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 폴리펩티드의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 폴리펩티드로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0128] 본 출원의 미생물에서 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체의 변형은 (a) 미생물 내 염색체 삽입용 벡터를 이용한 상동 재조합 또는 유전자가위 (engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9)을 이용한 유전체 교정 및/또는 (b) 자외선 및 방사선 등과 같은 빛 및/또는 화학물질 처리에 의해 유도될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 일부 또는 전체의 변형 방법에는 DNA 재조합 기술에 의한 방법이 포함될 수 있다. 예를 들면, 목적 유전자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터를 상기 미생물에 주입하여 상동 재조합(homologous recombination)이 일어나게 함으로써 유전자 일부 또는 전체의 결손이 이루어질 수 있다. 상기 주입되는 뉴클레오티드 서열 또는 벡터는 우성 선별 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0130] 본 출원의 미생물에서, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질, 폴리뉴클레오티드 및 L-쓰레오닌 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [0132] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-쓰레오닌 생산 방법을 제공한다.
- [0133] 본 출원의 L-쓰레오닌 생산 방법은 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 또는 본 출원의 벡터를 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0134] 본 출원에서, 용어 "배양"은 본 출원의 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 미생물에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및/또는 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0135] 본 출원에서 용어, "배지"는 본 출원의 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.
- [0136] 구체적으로, 코리네박테리움 속 미생물에 대한 배양 배지는 문헌["Manual of Methods for General Bacteriology" by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)]에서 찾아 볼 수 있다.
- [0137] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 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, 쌀겨물, 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 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0138] 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 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0139] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기 화합물로는 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 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0140] 또한, 본 출원의 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 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 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0141] 본 출원의 배양에서 배양온도는 20 내지 45℃, 구체적으로는 25 내지 40℃를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0142] 본 출원의 배양에 의하여 생산된 L-쓰레오닌은 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [0144] 본 출원의 L-쓰레오닌 생산 방법은, 본 출원의 미생물을 준비하는 단계, 상기 미생물을 배양하기 위한 배지를 준비하는 단계, 또는 이들의 조합(순서에 무관, in any order)을, 예를 들어, 상기 배양하는 단계 이전에, 추가로 포함할 수 있다.
- [0145] 본 출원의 L-쓰레오닌 생산 방법은, 상기 배양에 따른 배지(배양이 수행된 배지) 또는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로부터 L-쓰레오닌을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 회수하는 단계는 상기 배양하는 단계 이후에 추가로 포함될 수 있다.
- [0146] 상기 회수는 본 출원의 미생물의 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 목적하는 L-쓰레오닌을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 또는 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 L-쓰레오닌을 회수할 수 있다.
- [0147] 또한, 본 출원의 L-쓰레오닌 생산 방법은, 추가적으로 정제 단계를 포함할 수 있다. 상기 정제는 당해 기술분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 수행할 수 있다. 일 예에서, 본 출원의 L-쓰레오닌 생산 방법이 회수 단계와 정제 단계를 모두 포함하는 경우, 상기 회수 단계와 정제 단계는 순서에 상관없이 연속적 또는 비연속적으로 수행되거나, 동시에 또는 하나의 단계로 통합되어 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0148] 본 출원의 방법에서, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 균주 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.
- [0150] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티이드, 상기 폴리뉴클레오티이드를 포함하는 벡터 또는 본 출원의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물; 이를 배양한 배지; 또는 이들 중 2 이상의 조합을 포함하는 L-쓰레오닌 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0151] 본 출원의 조성물은 L-아미노산 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 부형제는, 예를 들어 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0153] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 본 출원의 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티이드

드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 또는 본 출원의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 미생물의 L-쓰레오닌 생산 용도를 제공한다.

[0155] 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 균주, 배지 및 L-쓰레오닌 등은 상기 다른 양태에서 기재한 바와 같다.

발명의 효과

[0157] 본 출원의 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 이용하여, L-쓰레오닌을 생산하는 미생물을 배양하는 경우, 기존 야생형 배출 단백질을 갖는 미생물에 비해 고수율의 L-쓰레오닌 생산이 가능하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0159] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 바람직한 실시양태에 불과한 것이며 따라서, 본 출원의 권리범위를 이에 한정하는 것으로 의도되지는 않는다. 한편, 본 명세서에 기재되지 않은 기술적인 사항들은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 기술 분야에서 숙련된 통상의 기술자이면 충분히 이해하고 용이하게 실시할 수 있다.

[0161] 실시예 1: L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이 라이브러리 및 플라스미드 제작

[0162] 에러유발 PCR(error-prone PCR)에 사용할 주형(template) 제작하기 위해, 먼저 대장균(*Escherichia coli*) W3110 균주의 게놈 DNA로부터 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 PrhtC 염기 서열 단편(서열번호 6)을 확보하였다.

[0163] 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

서열번호	서열명	서열(5' -> 3')
7	PrhtC F	TCGAGCTCGGTACCCGGGGAGCCATGAACATTGGGTGAGC
8	PrhtC R	GTCGACTCTAGAGGAggat ccACATTTGACTCGCGGGGGA

[0166] 그리고 SmaI 제한효소로 절단된 pCC1BAC(EPICENTRE)과 상기에서 획득한 DNA 단편을 겹스 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝하여 재조합 플라스미드 pCC1BAC-PrhtC를 획득하였다. 클로닝은 겹스 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50℃에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

[0167] L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 야생형 *rhtC*(*rhtC* WT) (서열번호 2)에 임의 돌연변이(random mutagenesis) 유발을 위해 에러유발 PCR을 수행하였으며, 에러유발 PCR 수행 시 다각화 PCR 임의 돌연변이 키트(diversify PCR random mutagenesis kit, Takara)를 사용하였다. 변이 발생 비율(mutation rate) 조건 선정을 위해 MnSO₄ 농도에 따라 아래와 같이 두 가지 조건으로 에러유발 PCR을 수행하였다. 변이를 도입할 DNA 주형으로는 대장균 W3110 균주의 게놈 DNA를 사용하였다. 에러유발 PCR 수행을 위한 반응물의 조성은 하기 표 2와 같았다. PCR 조건은 95℃에서 30초간 변성 후, 95℃에서 30초 변성, 55℃에서 30초 어닐링, 68℃에서 30초 중합을 25회 반복한 후, 68℃에서 60초간 중합반응을 수행하였다. PCR 수행시 프라이머로 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍을 사용하였다.

[0168] 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 2

case #	1 (μl)	2 (μl)
10X Titanium taq Buffer	5	5
MnSO4(8mM)	1	2
dGTP (2mM)	1	1
50 X dNTP Mix	1	1
Titanium Taq Polymerase	1	1
Forward primer(5pmol)	2	2
Reverse primer(5pmol)	2	2
Template DNA	1	1
dH2O	36	35
Total	50	50

표 3

서열번호	서열명	서열(5' -> 3')
9	rhtC F	TCCCCCGCGAGTCAAATGTgATGTTGATGTTATTTCTCACCGTC
10	rhtC R	GTCGACTCTAGAGGAggat cTCACCGCGAAATAATCAAATGAATG

[0173] 상기 표 2의 조건으로 에리유발 PCR을 수행하여 획득한 산물에 DpnI을 처리하고 BamHI 제한효소로 절단된 pCC1BAC-PrhtC에 김슨 어셈블리 방법으로 클로닝하여 재조합 변이 플라스미드 pCC1BAC-PrhtC_rhtC(mt) 라이브러리를 획득하였다. 상기의 방법으로 획득한 변이 라이브러리를 대장균 K12 균주에 형질전환하고, 50 μg/L의 스펙티노마이신이 포함된 LB 평판배지에 도말하였다.

[0174] 상기 변이 라이브러리가 형질전환된 대장균 K12(K12/pCC1BAC-PrhtC-rhtC(mt)) 균주 라이브러리에서 50개의 콜로니를 선별하여 변이 발생 비율(mutation rate) 및 다양한 위치에 변이 발생유무를 판단하기 위해 시퀀싱(sequencing)을 진행하였다. 시퀀싱 결과 case #1 조건의 변이 발생 비율은 1.2 kb당 하나, case #2 조건에서는 2.0 kb당 하나였다. case #1, #2 모두 돌연변이체 라이브러리 확보에 적합한 변이 발생 비율을 충족시킨다고 판단하여 위의 조건에서 제작된 라이브러리를 이용하여 유효변이 선별 작업을 수행하였다.

[0175] 또한, 대조군으로서 pCC1BAC-PrhtC-rhtC(WT) 백터를 제작하기 위하여 대장균 W3110 균주의 게놈 DNA로부터 서열 번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍을 이용한 통상의 방법으로 PCR을 수행하여 RhtC WT을 코딩하는 염기서열 단편(서열번호 2)을 획득하였다. PCR 조건은 95℃에서 30초간 변성 후, 95℃에서 30초 변성, 55℃에서 30초 어닐링, 68℃에서 30초 중합을 25회 반복한 후, 68℃에서 60초간 중합반응을 수행하였다. 획득한 산물에 DpnI을 처리하고 BamHI 제한효소로 절단된 pCC1BAC-PrhtC에 김슨 어셈블리 방법으로 클로닝하여 재조합 변이 플라스미드 pCC1BAC-PrhtC_rhtC(WT) 백터를 제작하였다.

[0177] **실시예 2: 라이브러리 스크리닝을 통한 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이 확인**

[0178] L-쓰레오닌 60g/L가 포함된 M9 최소배지(minimal media)를 96 딥-웰 플레이트(deep-well plate)에 300 μl씩 분주 후 상기 실시예 1에서 제작한 변이 라이브러리가 형질전환된 K12/pCC1BAC-PrhtC-rhtC(mt) 및 대조군으로 K12/pCC1BAC, K12/pCC1BAC-PrhtC-rhtC(WT) 콜로니들을 접종하였다. 그리고 1200 rpm/15 hr/37℃에서 배양 후 600 nm 파장으로 OD를 측정하여 L-쓰레오닌 60g/L가 포함된 M9 최소배지(minimal media)에서 야생형 대장균 K12 균주와 달리 성장 저해를 나타나지 않는 균주를 선별하였다.

[0179] 그 결과, 대부분 변이 균주들은 딥-웰 플레이트에서 대조군 균주(K12/pCC1BAC, K12/pCC1BAC-PrhtC_rhtC)와 같이 거의 성장이 관찰되지 않았으며, 1차적으로 약 4000주를 측정된 OD 기반으로 선별하였다. 그 중 상위 약 5% (150개)를 대상으로 2차 스크리닝을 진행하였으며, triplicate 하여 평균값이 높은 콜로니를 선별하였다. 편차가 심한 콜로니를 제외하고 대조군 균주와 대조적으로 성장이 관찰된 6종의 균주를 최종 선별하여 K12 pCC1BAC-

PrhtC_rhtC(m1 내지 m6)으로 명명하고 OD를 기록하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0180]

균주명	OD
K12/ pCC1BAC	0.14
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC	0.17
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m1)	1.21
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m2)	1.16
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m3)	1.25
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m4)	1.26
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m5)	1.49
K12/ pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m6)	1.31

[0182]

선별된 6종의 균주 K12/pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m1 내지 m6)에 포함된 *rhtC* 유전자 염기서열을 확인하기 위하여 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍을 이용하여 *rhtC* 유전자를 포함한 DNA 단편을 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 PCR을 수행하여 증폭시켰다.

[0183]

증폭된 유전자의 염기서열을 분석한 결과 K12/pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m1 내지 m6) 균주는 공통적으로 *rhtC* 유전자 ORF 개시코돈으로부터 하위 397-399bp 사이에 위치한 염기서열에 1-2 개의 변이가 도입된 것을 확인하였다. 즉, K12/pCC1BAC-PrhtC_rhtC(m1 내지 m6) 균주는 서열번호 2를 기준으로 397~399번째 염기서열이 기존 GGC에서 AGC 혹은 AGT로 변이가 일어나, 서열번호 1의 아미노산 서열의 N 말단에서부터 133번째 아미노산인 글리신(G)이 세린(S)으로 치환된 형태의 변이형 RhtC(G133S) 단백질을 코딩하는 서열을 포함하고 있음을 확인하였다.

[0185]

실시예 3: 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 위한 플라스미드 제작

[0186]

코리네박테리움 속 균주의 염색체 상에 상기 실시예 2에서 확인된 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질을 발현하기 위한 변이 유전자를 도입하기 위해 재조합 벡터를 아래와 같은 방법으로 제작하였다.

[0187]

먼저, Ncg11762 결손 벡터를 제작하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 균주의 게놈 DNA를 주형으로 Ncg11762 상단과 하단 상동 지역(homologous region) 단편을 각각 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍과 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍을 이용하여 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 PCR을 수행하여 염기서열을 증폭시켰다. 그 후 증폭된 산물을 제한효소 SmaI으로 처리한 후 65°C에서 20분간 열처리한 pDCM2 벡터(대한민국 등록 특허 번호 제2278000호)와 Infusion Cloning Kit를 사용하여 연결한 후 대장균 DH5 α에 형질전환하였다. 상기 형질전환된 균주를 카나마이신(25 mg/l)이 포함된 LB 고체배지에 도말하고 선별된 콜로니를 배양하여 플라스미드를 획득하고, 이를 pDCM2-ΔNcg11762로 명명하였다.

[0188]

여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 5와 같다.

표 5

[0189]

서열번호	서열명	서열(5' -> 3')
11	1762A F	TGAATTCGAGCTCGGTACCCGTGGCCAGTATTAATGGGCT
12	1762A R	GTCTCAAGCAGAGActcgagCACCTCAATGGGTCAGGCC
13	1762B F	ACCCATGAGGGTGctcgagTCTCTGCTTGAGACTTAAGC
14	1762B R	GTCGACTCTAGAGGATCCCCAGGCTCTCTATGGGCACCTC

[0191]

다음으로, Ncg11762 위치에 야생형 *rhtC*와 변이형 *rhtC* 유전자를 각각 삽입하기 위한 벡터를 제작하였다. 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍을 이용하여 대장균 W3110 균주의 게놈 DNA로부터 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 PCR을 수행하여 *rhtC*(WT) 단편을 획득하였으며, 상기 실시예 2에서 확인된 133번째의 글리신이 세린으로 치환된 변이형 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 *rhtC*의 단편을 주형으로 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍을 이용하여 변이형 *rhtC*(G133S) 단편을 각각 증폭시켜 획득하였다. 그 후 각 단편 및 pDCM2-Δ

Ncg11762 벡터를 제한효소 XhoI으로 처리하고 65°C에서 20분간 열처리한 후 Infusion Cloning Kit를 사용하여 연결하여 대장균 DH5 α 균주에 형질전환하였다. 상기 균주를 카나마이신(25 mg/1)이 포함된 LB 고체배지에 도말하고 선별된 콜로니를 배양하여 플라스미드를 획득하고, 각각 pDCM2-ΔNcg11762::PrhtC-rhtC(WT), pDCM2-ΔNcg11762::PrhtC-rhtC(G133S)로 명명하였다.

[0192] 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 6과 같다.

표 6

서열번호	서열명	서열(5' -> 3')
15	rhtC(m) F	GCCTGACCCATTGAGGGTGcGCCATGAACATTGGGTGAGC
16	rhtC(m) R	ATAACGCTTAAGTCTCAAGCAGAGActcgaTCACCGCGAAATAATCAAAT

[0195] **실시에 4: 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 도입 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM12502P 균주 제작 및 L-쓰레오닌 생산능 분석**

[0196] 상기 실시예 3에서 제작한 pDCM2-ΔNcg11762, pDCM2-ΔNcg11762::PrhtC_rhtC(WT), pDCM2-ΔNcg11762::PrhtC_rhtC(G133S) 벡터를 L-쓰레오닌 생산능이 부여된 코리네박테리움 글루타미쿰 CA09-0903 균주(기탁번호 KCCM12502P, 대한민국 등록특허 제10-2126951호)에 각각 전기천공법으로 형질전환한 후, 2차 교차과정을 거쳐 염색체 상에서 Ncg11762 결손 균주, Ncg11762 위치에 야생형 *rhtC* 또는 변이형 *rhtC* 유전자가 삽입된 각각의 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 17 내지 서열번호 23의 프라이머 쌍을 이용한 PCR과 계놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.

[0197] 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 7과 같다.

표 7

서열번호	서열명	서열(5' -> 3')
17	pDC F	CTATTACGCCAGCTGGCGAAAG
18	pDC R	ATGTTGTGTGGAATTGTGAG
19	seq 1	TTCTCTGTTCCTTTCTGAG
20	seq 2	TTCTGAGTAGCTGAGCTTCG
21	seq 3	CCAGATGCTACGTGGTGCAC
22	seq 4	TGGTCTGCTCGCTTCTCGAT
23	seq 5	TATCTTCGTAGAGCACTGCT

[0200] 수득한 Ncg11762 결손 균주, Ncg11762 위치에 야생형 *rhtC* 또는 변이형 *rhtC* 유전자가 삽입된 균주를 각각 12502P-del, 12502P-WT, 12502P-G133S로 명명하였다.

[0201] 제작된 3종의 변이주들을 대상으로 L-쓰레오닌 생산능을 분석하기 위해 하기의 배지를 이용한 플라스크 배양을 실시하였다. 대조군으로는 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM12502P 균주를 사용하였으며, 아래와 같은 방법으로 배양하여 L-쓰레오닌 생산량을 측정하였다.

[0202] 먼저, 종 배지 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30°C에서 20시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산 배지 24 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종 배양액을 접종하고 32°C에서 72 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같으며, 배양에 따른 L-쓰레오닌 생산 농도는 표 8에 나타내었다.

[0204] <종배지 (pH 7.0)>

[0205] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 0.1

mg, 티아민 HCl 1 mg, 칼슘-판토텐산 22 mg, 니코틴아미드 2 mg (증류수 1 리터 기준)

[0207] <생산배지 (pH 7.0)>

[0208] 포도당 63 g, (NH₄)₂SO₄ 28 g, 대두 단백질 20 g, 당밀 14 g, KH₂PO₄ 1.1 g, MgSO₄·7H₂O 1.2 g, 바이오틴 1.8 mg, 티아민 염산염 9 mg, 칼슘-판토텐산 9 mg, MnSO₄ 180 mg, FeSO₄ 200 mg, ZnSO₄ 1 mg, CuSO₄ 1 mg, CaCO₃ 30 g (증류수 1리터 기준)

표 8

균주명	L-쓰레오닌(g/L)			
	배치 1	배치 2	배치 3	평균
KCCM12502P	3.31	3.27	3.21	3.26
KCCM12502P-del	3.26	3.34	3.22	3.27
KCCM12502P-WT	3.41	3.45	3.39	3.42
KCCM12502P-G133S	4.32	4.36	4.41	4.36

[0212] 그 결과, 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 대조군 KCCM12502P는 3.26 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였고, KCCM12502P-del은 3.27 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였다. 그리고 변이형 rhtC(G133S)가 도입된 KCCM12502P-G133S는 4.36 g/L의 L-쓰레오닌을 생산하였다.

[0213] L-쓰레오닌 발효 수율은 KCCM12502P 대비 KCCM12502P-WT가 5% 상승률을 나타낸 반면 변이형 rhtC(G133S)가 도입된 KCCM12502P-G133S 균주는 33% 상승률을 나타내었다.

[0215] **실시예 5: 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 도입 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11222P 균주 제작 및 L-쓰레오닌 생산능 분석**

[0216] L-쓰레오닌을 생산하는 다른 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서도 변이형 RhtC 도입에 의해 L-쓰레오닌 생산이 증대되는지를 확인하기 위해, 상기 실시예 3에서 제작한 pDCM2-△Ncg11762, pDCM2-△Ncg11762::PrhtC_rhtC(WT), pDCM2-△Ncg11762::PrhtC_rhtC(G133S) 벡터를 L-쓰레오닌 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881-THR(기탁번호 KCCM11222P, US 10590446 B2)에 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 형질전환한 후 각각 11222P-del, 11222P-WT, 111222P-G133S로 명명하였다.

[0217] 제작된 3종의 변이주들을 대상으로 L-쓰레오닌 생산능을 분석하기 위해 하기의 배지를 이용한 플라스크 배양을 실시하였다. 대조군으로는 모균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM12502P 균주를 사용하였으며, 아래와 같은 방법으로 배양하여 L-쓰레오닌 생산량을 측정하였다.

[0218] 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 72 시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 상기 종 배지와 생산 배지의 조성은 각각 하기와 같으며, 배양에 따른 L-쓰레오닌 생산 농도는 표 9에 나타내었다.

[0220] <종배지 (pH 7.0)>

[0221] 포도당 20 g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 바이오틴 0.1 mg, 티아민 HCl 1 mg, 칼슘-판토텐산 22 mg, 니코틴아미드 2 mg (증류수 1 리터 기준)

[0223] <생산배지 (pH 7.0)>

[0224] 포도당 63 g, (NH₄)₂SO₄ 28 g, 대두 단백질 20 g, 당밀 14 g, KH₂PO₄ 1.1 g, MgSO₄·7H₂O 1.2 g, 바이오틴 1.8 mg, 티아민 염산염 9 mg, 칼슘-판토텐산 9 mg, MnSO₄ 180 mg, FeSO₄ 200 mg, ZnSO₄ 1 mg, CuSO₄ 1 mg, CaCO₃ 30 g (증류수 1리터 기준)

표 9

균주명	L-쓰레오닌(g/L)			
	배치 1	배치 2	배치 3	평균
KCCM11222P	7.11	7.14	7.11	7.12
KCCM11222P-del	7.21	7.18	7.16	7.18
KCCM11222P-WT	7.34	7.38	7.42	7.38
KCCM11222P-G133S	8.94	8.89	9.01	8.95

[0228] 그 결과, 상기 표 9에 나타낸 바와 같이, L-쓰레오닌 생산 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 KCCM11222P에 변이형 rhtC(G133S)를 도입한 경우, L-쓰레오닌 생산능이 평균 25% 증가함을 확인하였다.

[0230] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

서열 목록

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Variants of L-threonine efflux protein and L-threonine production method using the same

<130> KPA211693-KR

<160> 23

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 206

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> rhtC(WT) AA

<400> 1

Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu

1 5 10 15

Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser

20 25 30

Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly

100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175

Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

<210> 2

<211> 621

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> rhtC(WT) NT

<400> 2

atggtgatgt tatttctcac cgtcgcatg gtgcacattg tggcgcttat gagccccggt 60
 cccgatttct tttttgtctc tcagaccgct gtcagtcggt cccgtaaaga agcgatgatg 120
 ggcgtgctgg gcattacctg cggcgtaatg gtttgggctg ggattgcgct gettggcctg 180
 catttgatta tcgaaaaaat ggcctggctg catacgtga ttatggtggg cgggtgcctg 240

tatctctgct ggatgggitta ccagatgcta cgtgggtgcac tgaaaaaaga ggcggtttct 300
 gcacctgcgc cacaggtcga gctggcgaaa agtgggca gtttctgaa aggtttactg 360
 accaatctcg ctaatccgaa agcgattatc tactttggct cgggtttctc attgtttgtc 420
 ggtgataacg ttggcactac cgcgcgctgg ggcatttttg cgctgatcat tgtcgaacg 480
 ctggcgtggt ttaccgtcgt tgccagcctg ttgacctgc cgcaaatgc cegtgttat 540
 caacgtctgg cgaagtggat tgatggtttt gccggggcgt tatttgccgg atttggcatt 600

catttgatta tttcgcggtg a 621

<210> 3
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC(G133S) AA
 <400> 3

Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala Val Ser
 20 25 30
 Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr Cys Gly
 35 40 45
 Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu Ile Ile
 50 55 60
 Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly Gly Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu Lys Lys
 85 90 95
 Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys Ser Gly
 100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Ser Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr

ggcgtgctgg gcattacctg cggcgtaatg gtttgggctg ggattgctg gcttggcctg 180
 catttgatta tcgaaaaaat ggcctggctg catacctga ttatggtggg cgggtgcctg 240

tatctctgct ggatgggtta ccagatgcta cgtgggtcac tgaaaaaaga ggcggtttct 300
 gcacctgcgc cacaggtcga gctggcgaaa agtgggca gtttctgaa aggtttactg 360
 accaatctcg ctaatccgaa agcgattatc tactttagtt cgggtttctc attgtttgtc 420
 ggtgataacg ttggcactac cgcgctgg ggcatTTTTG cgctgatcat tgcgaaacg 480
 ctggcgtggt ttaccgtcgt tgccagcctg tttgccctgc cgaaatgcg ccgtggttat 540
 caacgtctgg cgaagtggat tgatggtttt gccggggcgt tatttgccgg atttggcatt 600
 catttgatta tttcgcggtg a 621

<210> 6
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PrhtC

<400> 6
 gccatgaaca ttgggtgagc gtgatccgcc agctgattca cctcggcctg gtgacgaaa 60
 atattgcccga geattctgcc ctacaactga cagagggcgc gcgcccgggtg ctgcgcggcg 120
 aatcctcttt gcaacttgcc gtgcccgta tcgtggcctc caaacgaaa gcgatgcaga 180
 aatcgttcgg cggcaactat gatcgaaac tgttcgcaa attacgaaa ctgcgtaaat 240
 cgatagccga tgaagtaat gtcccgcctg acgtggtggt taacgacgca accttgattg 300
 agatggctga acagatgccg atcaccgcca gcgaaatgct cagcgttaac ggcgttggga 360

tgcgcaagct ggaacgcttt ggcaaaccgt ttatggcctg gattcgtgcg catgttgatg 420
 gcgatgacga agagtagtca gcagataaa aaagtgccag tatgaagact ccgtaaacgt 480
 ttccccgcg agtcaaatgt 500

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PrhtC F

<400> 7
 tcgagctcgg taccgggga gccatgaaca ttgggtgagc 40

<210> 8

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PrhtC R

 <400> 8
 gtcgactcta gaggaggatc cacatttgac tcgcggggga 40
 <210> 9
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC F
 <400> 9
 tccccgcga gtcaaatgtg atgttgatgt tatttctcac cgtc 44
 <210> 10
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC R
 <400> 10
 gtcgactcta gaggaggatc tcaccgcgaa ataatcaaat gaatg 45
 <210> 11
 <211> 40
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1762A F
 <400> 11
 tgaattcgag ctcggtaccc gtggccagta ttaatgggct 40
 <210> 12
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1762A R
 <400> 12

gtctcaagca gagactcgag caccctcaat gggtcaggcc 40

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1762B F

<400> 13

accattgag ggtgctcgag tctctgcttg agacttaagc 40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1762B R

<400> 14

gtcgactcta gaggatcccc aggctctcta tgggcacctc 40

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC(m) F

<400> 15

gcctgacca ttgagggtgc gccatgaaca ttgggtgagc 40

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC(m) R

<400> 16

ataacgctta agtctcaagc agagactcga tcaccgcgaa ataatcaaat 50

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pDC F
 <400> 17
 ctattacgcc agctggcgaa ag 22
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDC R
 <400> 18
 atgttgtgtg gaattgtgag 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> seq 1
 <400> 19
 ttctcttggt cctttctgag 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> seq 2
 <400> 20
 ttctgagtag ctgagcttcg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> seq 3
 <400> 21
 ccagatgcta cgtgggtgcac 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> seq 4

<400> 22

tggtctgctc gcttctcgat

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> seq 5

<400> 23

tatcttcgta gagcactgct

20