



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월26일
(11) 등록번호 10-2183209
(24) 등록일자 2020년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) C07K 14/34 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
C07K 14/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0111509
(22) 출원일자 2019년09월09일
심사청구일자 2019년09월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020000048340 A
KR1020080082880 A
CN104845995 B
NCBI Genbank accession no. WP_097344017.1
(2019.06.20.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
씨제이제일제당 주식회사
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동)
(72) 발명자
서창일
인천광역시 부평구 수변로 334 301동 2003호 (삼산동, 신성아파트)
김효진
경기도 수원시 영통구 대학3로 28 103동 604호 (이의동, 광고시티아이)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체 및 이를 이용한 L-쓰레오닌 생산 방법

(57) 요약

본 출원은 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체, 이를 포함하는 미생물, 및 이를 이용한 L-쓰레오닌 생산 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12P 13/08 (2013.01)

C12Y 101/01003 (2013.01)

C12Y 207/02004 (2013.01)

C12Y 604/01001 (2013.01)

(72) 발명자

이지선

인천광역시 남동구 경인로 732 (간석동)

최솔

경기도 성남시 분당구 하오개로407번길 7(운중동)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 53번째 위치에 상응하는 아미노산의 쓰레오닌으로의 치환; 또는 62번째 위치에 상응하는 아미노산의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 98% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지며, L-쓰레오닌 배출 활성을 가지는, L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다른 아미노산은 세린, 아르기닌, 알라닌, 아스파르트산, 리신, 프롤린, 시스테인, 글리신, 쓰레오닌, 이소류신, 티로신, 발린, 히스티딘, 페닐알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산 또는 트립토판으로부터 선택되는 것인, 단백질의 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질의 변이체는 서열번호 93 내지 112 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 단백질의 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 6

서열번호 1의 53번째 위치에 상응하는 아미노산의 쓰레오닌으로의 치환, 또는 62번째 위치에 상응하는 아미노산의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 98% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 갖는, L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하여, L-쓰레오닌을 생산하는 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.) 또는 에스케리키아 속(*Escherichia* sp.) 미생물인, L-쓰레오닌을 생산하는 미생물.

청구항 8

서열번호 1의 53번째 위치에 상응하는 아미노산의 쓰레오닌으로의 치환, 또는 62번째 위치에 상응하는 아미노산의 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 98% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 갖는, L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체; 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-쓰

레오닌 생산 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방법은 배양된 배지 또는 미생물에서 L-쓰레오닌을 회수하는 단계를 포함하는 것인, L-쓰레오닌 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0003] L-쓰레오닌(L-Threonine, L-Thr)은 필수 아미노산의 하나로 사료 첨가제 등으로 널리 사용되어 왔으며, 또한 수액제 등의 의약품 원료 및 건강식품소재 등으로 널리 사용되어 왔다.

[0004] 현재에는 미생물을 이용한 직접 발효법이 L-쓰레오닌 생산에 주로 이용되고 있다. L-쓰레오닌 생산에 사용되는 미생물들은 초기에 화학적 또는 물리적 돌연변이를 통한 유사체 내성을 나타내는 선별 균주들이 주로 사용되어 왔으나, 1990년대 유전자 재조합 기술의 급격한 발전과 분자수준의 조절 기작들이 규명됨에 따라 유전자 조작 기법을 이용한 재조합 균주들이 주로 사용되고 있다.

[0005] 한편, 특정 아미노산 배출 유전자의 발현은 미생물에서 해당 아미노산의 생산성 향상을 야기하여 왔다. 코리네 박테리움 속 미생물의 L-리신 배출 유전자 (lysE)의 발현 강화는 리신의 생산성을 향상시켰다(W09723597A2). 또한, 대장균에서 기능이 공지되지 않은 유전자들인 yahN 유전자, yeaS 유전자, yfiK 유전자 그리고 yggA 유전자를 강화시킴으로써 L-글루타민산, L-리신, L-쓰레오닌, L-알라닌, L-히스티딘, L-프롤린, L-아르기닌, L-발린 및 L-이소류신의 생산성이 향상되었다는 내용이 특허(EP1016710B1)에 개시되어 있다.

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 rhtC에 의해 코딩되는 L-쓰레오닌 배출 단백질(RhtC)의 배출능 향상을 위해서 변이형 rhtC를 선별하고 이를 통해서 L-쓰레오닌 생산량이 획기적으로 향상됨을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 53번째 또는 62번째 위치에 상응하는 위치에서 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지며, L-쓰레오닌 배출 활성을 가지는, L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 출원의 다른 하나의 목적은 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0010] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체, 상기 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 포함하는 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 출원의 또 다른 목적은 상기 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, L-쓰레오닌 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설

명 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.

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 제공하는 것이다.
- [0017] 구체적으로, 본 출원은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 53번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 및/또는 ii) 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 단백질의 변이체를 제공한다. 상기 아미노산 치환은 i) 53번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 세린, 아르기닌, 알라닌, 아스파르트산, 리신, 프롤린, 시스테인, 글리신, 쓰레오닌, 이소류신, 티로신, 발린, 히스티딘, 페닐알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산 또는 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되는 것을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 출원에서 용어, "쓰레오닌(Threonine, Thr)"은 체내에서 합성되지 않고 식품으로만 공급가능한 필수 아미노산의 하나로, 장상피 보호 물질인 뮤신(mucine)을 구성하며, 부족하면 성장정지, 체중감소를 일으킬 수 있다. 쓰레오닌은 사료 첨가제, 수액제 등의 의약품 원료 및 건강식품소재 등으로 널리 사용된다. 다른 아미노산과 마찬가지로 쓰레오닌 또한 D형과 L형의 입체이성질체가 존재하며, 자연에서 유래하는 쓰레오닌은 대부분 L형 입체이성질체인 L-쓰레오닌(L-Threonine, L-Thr)으로 존재한다. 본 발명에서 쓰레오닌(Threonine, Thr)은 L-쓰레오닌(L-Threonine, L-Thr)과 혼용하여 사용될 수 있다.
- [0020] 본 출원에서 용어, "L-쓰레오닌 배출 단백질(L-threonine exporter, L-threonine efflux protein)"은 L-쓰레오닌을 세포 밖으로 배출하도록 매개하는 단백질로, 5개의 막전이 도메인(transmembrane domains)을 가지는 내막 단백질로 알려져 있다. 실험적 토폴로지(experimental topology) 분석에서는 이의 C-말단이 세포질에 존재함을 시사한다(Daley DO et al., Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome, Science. 2005 May 27; 308(5726):1321-3.). 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질은 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 단백질, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질과 혼용하여 사용될 수 있다. 본 출원에서, 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질은 RhtC 단백질 또는 RhtC과 혼용하여 사용될 수 있다.
- [0021] 본 출원에서 상기 서열번호 1는 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 구체적으로, 상기 서열번호 1는 rhtC 유전자에 의해 코딩되는 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질 서열이다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있다. 일 예로, 대장균 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 동일한 활성을 갖는 단백질의 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 또한, 본 출원에서의 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질은 비록 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이라고 정의하였으나, 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 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질에 해당됨은 당업자에게 자명하다. 구체적인 예를 들어, 본 출원의 L- 쓰레오닌 배출 활성을 갖는 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] 즉, 본 출원에서 '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드', '특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'는, 서열번호 1에 상응하는 서열이거나, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 서열인 경우라면 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드'에 속할 수 있음은 자명하다.
- [0024] 본 출원에서 용어, "변이체(variant)"는 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환(conservative substitution) 및/또는 변형(modification)에 있어서 상기 열거된 서열 (the recited sequence)과 상이하나, 상기 단백질의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 단백질을 지칭한다. 변이체는 수 개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)과 상이하다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 단백질의

아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산을 변형하고, 상기 변형된 단백질의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 본래 단백질(native protein)에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다. 또한, 일부 변이체는 N-말단 리더 서열 또는 막전이 도메인(transmembrane domain)과 같은 하나 이상의 부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 다른 변이체는 성숙 단백질(mature protein)의 N- 및/또는 C-말단으로부터 일부분이 제거된 변이체를 포함할 수 있다. 상기 용어 "변이체"는 변이형, 변형, 변이된 단백질, 변이형 폴리펩티드, 변이 등의 용어(영문 표현으로는 modification, modified protein, modified polypeptide, mutant, mutein, divergent, variant 등)가 사용될 수 있으며, 변이된 의미로 사용되는 용어라면 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 목적상, 상기 변이체는 천연의 야생형 또는 비변형 단백질 대비 변이된 단백질의 활성이 증가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 전하를 띠는 결사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 알지닌, 리신, 및 히스티딘을, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는 아미노산 중 비극성 아미노산(nonpolar amino acid)은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판 및 프롤린을 포함하고, 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함하고, 상기 비극성 아미노산 중 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다.

[0026] 또한, 변이체는 폴리펩티드의 특성과 2차 구조에 최소한의 영향을 갖는 아미노산들의 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 예를 들면 폴리펩티드는 번역-동시에(co-translationally) 또는 번역-후에(post-translationally) 단백질의 이전(transfer)에 관여하는 단백질 N-말단의 시그널(또는 리더) 서열과 켄주게이트 할 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드는 폴리펩티드를 확인, 정제, 또는 합성할 수 있도록 다른 서열 또는 링커와 켄주게이트 될 수 있다.

[0028] 상기 '다른 아미노산으로 치환'은 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산이면 제한되지 않는다. 즉, 서열번호 1의 아미노산 서열의 53번째 아미노산인 알라닌이 알라닌 이외의 다른 아미노산 잔기로, 또는 62번째 아미노산인 류신이 류신 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환된 것이라면 제한되지 않는다. 한편, 본 출원에서 '특정 아미노산이 치환되었다'고 표현하는 경우, 다른 아미노산으로 치환되었다고 별도로 표기하지 않더라도 치환 전의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 것임은 자명하다.

[0029] 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 53번째 또는 62번째 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 또는 상기 변이체는 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는, 치환 전 아미노산과 다른 아미노산으로 치환된, 변이체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 53번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체일 수 있다. 상기 다른 아미노산으로의 치환은 i) 53번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 세린, 아르기닌, 알라닌, 아스파르트산, 리신, 프롤린, 시스테인, 글리신, 쓰레오닌, 이소류신, 티로신, 발린, 히스티딘, 페닐알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산 또는 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 53번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 세린, 아르기닌, 알라닌, 아스파르트산, 리신, 프롤린, 시스테인, 글리신, 쓰레오닌, 이소류신, 티로신, 발린, 히스티딘, 페닐알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산 또는 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 변이체일 수 있다.

[0032] 본 출원에서 제공하는 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체는, 상기에서 설명한 L-쓰레오닌 배출능을 갖는 단백질 중 특이적 위치의 아미노산이 치환되어, L-쓰레오닌 배출능이 변이 전 단백질 대비 증가된 변이체를 의미할 수 있다.

[0034] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 53번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 변이체는 서열번호 93 내지 112 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수

있고, 구체적으로는 서열번호 93 내지 112 중 어느 하나의 아미노산 서열로 필수적으로 구성되는(consisting essentially of) 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 93 내지 112 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0035] 상기 변이체는 서열번호 1의 53번째 또는 62번째 위치에 상응하는 위치에서 다른 아미노산으로의 치환을 포함하고, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지며, L-쓰레오닌 배출 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 변이체는 서열번호 93 내지 112 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열에서, 53번째 또는 62번째 아미노산 중 선택된 하나 이상의 아미노산은 고정되고, 이와 80% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 출원의 변이체는 서열번호 93 내지 112 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 53번째 또는 62번째 아미노산 위치 이외에, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0038] 본 출원에서 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0039] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [0040] 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 공지된 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.
- [0041] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 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.
- [0042] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.

- [0044] 본 출원에서 용어, "L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체"는 L-쓰레오닌 생산능을 가지는 변이형 폴리펩티드, L-쓰레오닌 생산 변이형 폴리펩티드, L-쓰레오닌을 생산하는 변이형 폴리펩티드, L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드, L-쓰레오닌 배출 활성 변이체, L-쓰레오닌 배출 변이체, 변이형 RhtC, RhtC 변이체, 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 등과 혼용되어 사용될 수 있다. 또한 상기 단백질은 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 53번째 및/또는 62번째 위치에서 변이를 포함할 수 있으며, 서열번호 1에 아미노산이 부가, 결실된 아미노산 서열이라고 해도 서열번호 1의 N-말단으로부터 53번 및/또는 62번 아미노산에 상응하는 위치의 아미노산이 치환된 변이체면 본 출원의 범위에 포함된다. 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 53번째 또는 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 야생형 미생물 유래 변이 전 L-쓰레오닌 배출 단백질에 비하여 강화된 활성을 갖는 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질일 수 있다. 이와 같은 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체는 상기에서 설명한 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산에서 서열번호 1의 53번째 또는 62번째에 상응하는 위치의 아미노산이 변이된 것을 의미한다.
- [0046] 상기 53번째 또는 62번째 아미노산 변이는 i) 53번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 세린, 아르기닌, 알라닌, 아스파르트산, 리신, 프롤린, 시스테인, 글리신, 쓰레오닌, 이소류신, 티로신, 발린, 히스티딘, 페닐알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산 또는 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환되는 것일 수 있다.
- [0047] 구체적으로, 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 53번째 아미노산이 쓰레오닌으로 치환, 또는 ii) 62번째 아미노산이 세린, 아르기닌, 알라닌, 아스파르트산, 리신, 프롤린, 시스테인, 글리신, 쓰레오닌, 이소류신, 티로신, 발린, 히스티딘, 페닐알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루탐산 또는 트립토판으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 야생형 미생물 유래 변이 전 L-쓰레오닌 배출 단백질에 비하여 강화된 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0048] 본 출원의 목적상 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 포함하는 미생물의 경우, L-쓰레오닌 생산량이 증가하는 것을 특징으로 한다. 이는 야생형 미생물이 L-쓰레오닌을 생산하지 못하거나, L-쓰레오닌을 생산하더라도 극미량을 생산할 수 있는 것에 반해, 본 출원의 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 통해 L-쓰레오닌 생산량을 증가시킬 수 있다는 것에 의의가 있다.
- [0050] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0051] 상기 L-쓰레오닌, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질 및 이의 변이체에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0052] 본 출원에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다.
- [0053] 본 출원의 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 본 출원의 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 변이형 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 본 출원에서 L-쓰레오닌 배출 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 *rhtC* 유전자이며, 상기 유전자는 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*) 유래일 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 구체적으로, 본 출원의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리펩티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 53번째 또는 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

- [0055] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1의 아미노산 서열에서 53번째 또는 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 L-쓰레오닌 배출 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드 화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60 °C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68 °C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [0056] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [0057] 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.
- [0058] 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).
- [0060] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0061] 상기 L-쓰레오닌, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질 및 이의 변이체에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0062] 본 출원에서 사용된 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리펩티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0063] 본 출원에서 사용되는 벡터는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.
- [0064] 일례로 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 염색체 내로 삽입할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 폴리펩티드의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [0066] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 본 출원은 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 포함하거나, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여, L-쓰레오닌을 생산하는 미생물을 제공하는 것이다.

- [0067] 본 출원에서 용어 "변이형 폴리펩티드를 포함하는 미생물", " 또는 "L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 포함하는 미생물"이란, 자연적으로 약한 L-쓰레오닌 생산능을 가지고 있는 미생물 또는 L-쓰레오닌 생산능이 없는 모균주에 L-쓰레오닌 생산능이 부여된 미생물을 의미한다. 구체적으로 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 변이를 포함하는 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 발현하는 미생물로서, 상기 아미노산 변이는 N-말단으로부터 53번째 또는 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로의 치환을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 미생물은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 53번째 또는 62번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는, 변이형 폴리펩티드를 발현하는 미생물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 상기 L-쓰레오닌, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질 및 이의 변이체에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0069] 본 출원에서 용어, 단백질이 "발현되도록/되는"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 상기 목적 단백질이 미생물 내 존재하는 단백질인 경우 내재적 또는 변형 전에 비하여 그 활성이 강화된 상태를 의미한다. 본 출원의 목적상 "목적 단백질"은 전술한 L-쓰레오닌 배출능을 갖는 단백질의 변이체일 수 있다.
- [0070] 구체적으로, "단백질의 도입"은, 미생물이 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성을 나타나게 되는 것 또는 해당 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미생물 내 염색체로 도입되거나, 특정 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 미생물 내로 도입되어 이의 활성이 나타나는 것일 수 있다. 또한, "활성의 강화"는 미생물이 가진 특정 단백질의 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 활성이 향상된 것을 의미한다. 상기 "내재적 활성"은 자연적, 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 미생물의 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주가 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 말한다.
- [0071] 구체적으로, 본 출원의 활성 강화는 상기 단백질 변이체를 코딩하는 유전자의 세포 내 카피수 증가, 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법, 상기 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질 변이체를 암호화하는 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법, 염색체상의 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 자연형 단백질을 코딩하는 유전자를 상기 단백질 변이체를 암호화하는 유전자로 대체하는 방법, 상기 단백질 변이체의 활성이 강화되도록 상기 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법, 및 미생물에 단백질 변이체를 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 상기에서 유전자의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 숙주세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입되는 것일 수 있다. 또는, 상기 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포의 염색체 내에 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있다.
- [0073] 다음으로, 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현 조절서열을 변형하는 것은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현 조절서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현 조절서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 프로모터가 연결될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 공지된 강력한 프로모터의 예에는 cj1 내지 cj7 프로모터(대한민국 등록특허 제10-0620092호), lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지 PR 프로모터, PL 프로모터, tet 프로모터, gapA 프로모터, SPL7 프로모터, SPL13(sm3) 프로모터(대한민국 등록특허 제 10-1783170호), O2 프로모터(대한민국 등록특허 제10-1632642), tkt 프로모터 및 yccA 프로모터 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 아울러, 염색체상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서

열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현 조절서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.

- [0076] 이와 같은 단백질 활성의 도입 및 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도가 야생형이나 비변형 미생물 균주에서의 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 일반적으로 최소 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% 또는 500%, 최대 1000% 또는 2000%까지 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 출원에서 용어 "비변형 미생물"은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 균주 자체이거나, 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 포함하지 않는 미생물, 또는 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 미생물을 의미한다.
- [0079] 본 출원에서 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 포함하거나, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환에 의해 제조되는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이라면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터 (promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0081] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [0083] 본 출원에서 용어, "L-쓰레오닌을 생산하는 미생물"은 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 L-쓰레오닌 생산을 위하여 유전적 변이가 일어나거나 활성을 강화시킨 미생물일 수 있다. 본 출원의 목적상 상기 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물은 상기 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 포함하여, 배지 중의 탄소원으로부터 목적하는 L-쓰레오닌을 야생형이나 비변형 미생물과 비교하여 과량으로 생산할 수 있는 미생물을 의미할 수 있다. 본 출원에서 용어 "L-쓰레오닌을 생산하는 미생물"은 "L-쓰레오닌 생산능을 갖는 미생물" 또는 "L-쓰레오닌 생산 미생물"과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0084] 상기 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물은 재조합 미생물일 수 있다. 상기 재조합 미생물은 전술한 바와 같다.
- [0085] 상기 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물은 L-쓰레오닌을 생산할 수 있다면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 엔테로박터(*Enterbacter*) 속, 어위니아(*Erwinia*) 속, 세라티아(*Serratia*) 속, 프로비덴시아(*Providencia*) 속 및 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속에 속하는 미생물 일 수 있고, 보다 구체적으로, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 또는 에스케리키아(*Escherichia*) 속에 속하는 미생물일 수 있다.
- [0086] 보다 더욱 구체적으로는, 에스케리키아속(*Escherichia*) 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있으며, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데세르티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 칼루나(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 스테셔니스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 할로톨

레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 테스트디노리스(*Corynebacterium testudinoris*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*) 등일 수 있고, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있으나, L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질이 도입 또는 강화되어 L-쓰레오닌 생산량이 증가될 수 있는 코리네박테리움 속 또는 에스케리키아 속에 속하는 미생물은 제한 없이 포함될 수 있다.

[0087] 본 출원에서 상기 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질 또는 상기 단백질 변이체가 발현되도록 변형된 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물의 모균주는 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물은 L-쓰레오닌의 생산량을 증가시키기 위해, L-쓰레오닌의 생합성 경로를 강화시키거나, L-쓰레오닌에 대한 피드백 저해를 해제시키거나, L-쓰레오닌의 생합성 경로를 약화시키는 유전자를 불활성화시키거나, L-쓰레오닌 오페론의 활성을 증가시키거나, 및/또는 L-쓰레오닌 유사체에 대한 내성을 부여한 미생물일 수 있다.

[0088] 구체적으로, 상기 L-쓰레오닌의 생합성 경로를 강화시키기 위해, 예를 들면, 쓰레오닌 합성효소를 코딩하는 thrC, 포스포에놀 피루베이트 카복실라아제를 코딩하는 ppc 유전자, 포도당 유입에 관여하는 galP 유전자, 리신-민감성 아스파르트키나아제 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 발현이 미생물 내에서 강화 또는 증가될 수 있다.

[0089] 상기 L-쓰레오닌에 대한 피드백 저해를 해제시키기 위해, 예를 들면, lysC 유전자, hom 유전자 또는 아스파르트키나아제 및 호모세린 탈수소효소 1의 이중 기능성을 가지는(Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1) thrA 유전자 등에 유전자 변이가 미생물 내 도입될 수 있다.

[0090] 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 발현이 미생물 내에서 약화 또는 불활성화 될 수 있다.

[0091] 상기 L-쓰레오닌 오페론의 활성을 증가시키기 위해, 아스파르트키나아제(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 오페론 발현을 증가시킬 수 있다.

[0092] 또한, 상기 미생물은 L-쓰레오닌 유사체인 α -아미노- β -히드록시 발레르산 또는 D,L-쓰레오닌 히드록사메이트 등에 대한 내성을 갖는 것일 수 있다.

[0093] 그러나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 유전자 발현 조절 방법으로 L-쓰레오닌 생산능을 강화할 수 있다.

[0094] 본 출원에서, 용어 "강화/증가"는 내재적 활성에 비하여 활성이 증가되는 것을 모두 포함하는 개념이다.

[0095] 이러한 유전자 활성의 강화 또는 증가는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 유전자의 세포 내 카피수 증가; 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 유전자 발현 조절 서열을 활성이 강력한 서열로 교체하는 방법; 유전자의 활성이 강화되도록 해당 유전자에 변이를 추가적으로 도입시키는 방법; 및 미생물에 외래 유전자를 도입하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 이루어질 수 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 상기 예에 의해 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0096] 본 출원에서 용어, "불활성화"는 내재적 활성에 비하여 활성이 약화되거나 또는 활성이 없는 것을 모두 포함하는 개념이다.

[0097] 이러한 유전자 활성의 불활성화는, 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용으로 달성될 수 있다. 상기 방법의 예로, 상기 유전자의 활성이 제거된 경우를 포함하여 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 해당 단백질의 활성이 감소되도록 돌연변이된 유전자로, 염색체상의 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 대체하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 발현 조절 서열에 변이를 도입하는 방법; 상기 단백질

을 코딩하는 유전자의 발현 조절 서열을 활성이 약하거나 없는 서열로 교체하는 방법(예컨대, 상기 유전자의 프로모터를 내재적 프로모터보다 약한 프로모터로 교체하는 방법); 상기 단백질을 코딩하는 염색체상의 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키는 방법; 상기 염색체상의 유전자의 전사체에 상보적으로 결합하여 상기 mRNA로부터 단백질로의 번역을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(예컨대, 안티센스 RNA)를 도입하는 방법; 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 SD 서열 앞단에 SD 서열과 상보적인 서열을 인위적으로 부가하여 2차 구조물을 형성시켜 리보솜(ribosome)의 부착이 불가능하게 만드는 법 및 해당 서열의 ORF(open reading frame)의 3' 말단에 역전사되도록 프로모터를 부가하는 RTE(Reverse transcription engineering) 방법 등이 있으며, 이들의 조합으로도 달성할 수 있으나, 상기 예에 의해 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [0099] 본 출원의 또 하나의 양태로서, 상기 L-쓰레오닌을 생산하는 미생물을 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 L-쓰레오닌 생산 방법을 제공한다.
- [0100] 상기 L-쓰레오닌, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 L-쓰레오닌 배출 활성을 갖는 단백질, 이의 변이체, 단백질의 발현, 및 미생물에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0101] 본 출원에서 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 출원의 배양과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 본 출원에서 용어, "배지"는 상기 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다. 구체적으로, 본 출원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 본 출원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.
- [0103] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0104] 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.
- [0105] 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.
- [0106] 본 출원에서, 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 배지의 온도는 20 °C 내지 50 °C, 구체적으로는 30 °C 내지 37 °C 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 유용 물질의 원하는 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 100 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0108] 상기 배양에 의하여 생산된 L-쓰레오닌은 배지 중으로 배출되거나 미처 배출되지 못하고 세포 내에 잔류할 수

있다.

- [0109] 상기 L-쓰레오닌 생산 방법은 배양된 미생물 또는 배지에서 L-쓰레오닌을 회수(recover)하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0110] 본 출원의 상기 배양 단계에서 생산된 L-쓰레오닌을 회수하는 방법은 배양방법에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 L-쓰레오닌을 수집(collect)하는 것일 수 있다. 예를 들어, 원심 분리, 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 결정화 및 HPLC 등이 사용될 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배지 또는 미생물로부터 목적하는 L-쓰레오닌을 회수 할 수 있다.
- [0111] 또한, 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 상기의 회수되는 L-쓰레오닌은 정제된 형태 또는 L-쓰레오닌을 함유한 미생물 발효액일 수 있다 (Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A. J. Nair., 2008).

발명의 효과

- [0113] 본 출원의 L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이체를 이용하여, L-쓰레오닌을 생산하는 미생물을 배양하는 경우, 기존 비변형 단백질을 갖는 미생물에 비해 고수율의 L-쓰레오닌 생산이 가능하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0115] 이하 본 출원을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

[0117] 실시예 1 : L-쓰레오닌 배출 단백질의 변이 라이브러리 및 플라스미드 제작

- [0118] 에러유발 PCR(error-prone PCR)에 사용할 주형(template) 제작하기 위해서 대장균(*Escherichia coli*) W3110 게놈 DNA로부터 서열번호 43과 서열번호 44로 PCR을 수행하여 염기서열 단편을 확보하였다.

[0120] 서열번호 43 (rhtC F)

[0121] GTCGACTCTAGAGGATCCCCGCTGATTCGTGCGCATGTTG

[0122] 서열번호 44 (rhtC R)

[0123] TGAATTCGAGCTCGGTACCCCTACCGCGAAATAATCAAAT

- [0125] 그리고 SmaI 제한효소로 절단된 pCL1920(Nucleic Acids Rersearch, 18, (1990) 4631)과 상기에 획득한 DNA 단편으로 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 pCL1920-Pn_rhtC를 획득하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50 ℃에 1시간 보존함으로써 수행하였다.

- [0126] L-쓰레오닌 배출 단백질을 코딩하는 야생형 rhtC에 임의 돌연변이(random mutagenesis) 유발시스템을 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 주형으로 상기에 언급한 pCL1920-Pn_rhtC를 사용하여 진행하였다. 에러유발 PCR 수행을 위한 조성물의 조성은 하기 표 1과 같았다. 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. 프라이머로 서열번호 43 및 44를 사용하였다.

표 1

[0128] 에러유발 PCR 수행을 위한 조성물의 조성

case #	1 (μl)	2 (μl)
10X Titanium taq Buffer	5	5
MnSO ₄ (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
dH ₂ O	36	35
Total	50	50

[0130] 상기 표 1 조건으로 수행한 에러유발 PCR 산물에 DpnI을 처리하여 주형 플라스미드를 제거한 DNA와 SmaI 제한효소로 절단된 pCL1920으로 집슨 어셈블리 방법을 이용하여 재조합 변이 플라스미드 라이브러리를 획득하였다. 상기의 방법으로 획득한 변이 라이브러리(mutant library), pCL1920-Pn_rhtC와 pCL1920를 대장균(*Escherichia coli*) K12 세포에 형질전환시키고, 50 µg/L의 스펙티노마이신이 포함된 LB 평판배지에 플레이트하였다. 변이 라이브러리가 형질전환된 K12 에서 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 kb⁻¹, case #2 조건에서는 2.0 kb⁻¹이었다. case #1, #2 모두 돌연변이체 라이브러리(mutant library) 확보에 적합한 변이 발생 비율을 충족시킨다고 판단하여 위의 조건에서 제작된 라이브러리를 이용하여 유효변이 선별 작업을 수행하였다.

[0131] L-쓰레오닌(L-Threonine) 60g/L가 포함된 M9 최소배지(minimal media)를 96 딥-웰 플레이트(deep-well plate)에 300 µl씩 분주 후 앞서 형질전환 한 K12/pCL1920-Pn_rhtC, K12/pCL1920, K12/변이 라이브러리 콜로니들을 접종하였다. 그리고 1200 rpm/15 hr/37 °C에서 배양 후 600 nm과장으로 OD를 측정하였다. 야생형 대장균 K12균주가 일반적으로 M9 배지에서 L-쓰레오닌 MIC(Minimal Inhibition Concentration) 농도인 30 g/L 전후에서 성장 저해를 보이므로, 획기적으로 쓰레오닌 배출능이 개선된 균주라면 L-쓰레오닌 60 g/L 농도에서 성장할 수 있을 것으로 판단하였다. 대부분 변이 균주 라이브러리들은 딥웰 플레이트에서 컨트롤 균주(K12/pCL1920, K12/pCL1920-Pn_rhtC)와 같이 거의 성장이 관찰되지 않았으며, 이와 대조적으로 성장이 관찰된 4종의 균주를 선별하여 OD를 기록하였다.

표 2

선별된 4종 변이 균주

[0133]

균주명	OD
K12/pCL1920	0.15
K12/pCL1920-Pn_rhtC	0.16
K12/pCL1920-Pn_rhtC 변이 라이브러리 (3-1 C5)	1.41
K12/pCL1920-Pn_rhtC 변이 라이브러리 (3-2 D11)	2.60
K12/pCL1920-Pn_rhtC 변이 라이브러리 (3-4 E3)	2.46
K12/pCL1920-Pn_rhtC 변이 라이브러리 (3-4 G2)	2.57

[0135] 상기 선별된 4종 변이 균주에서 pCL1920-Pn_rhtC 변이형 플라스미드를 추출 후 변이 확인을 위해서 시퀀싱을 수행하였고 프로모터 지역이 아닌 코딩서열(CDS)에 변이가 발생하였음을 확인하였다. CDS의 변이는 아미노산 서열로 변환했을 때 53 또는 62번째 위치에 해당하는 것을 확인하였다. 그리고 상기 표 2에서 언급된 변이형 플라스미드를 위에서부터 pCL190-Pn_rhtC(m1), pCL190-Pn_rhtC(m2), pCL190-Pn_rhtC(m3), pCL190-Pn_rhtC(m4)로 명명하였다.

[0137] 코리네 균주에서의 변이형 rhtC의 활성을 비교 평가하고자 삼입용 플라스미드를 아래의 방법으로 제작하였다.

[0138] 상동재조합을 위해서 Ncg12533의 업스트림과 다운스트림 부위를 각각 서열번호 45 및 서열번호 46과 서열번호 51 및 서열번호 52로 증폭하였다. 그리고 gapA 프로모터를 변이형 rhtC의 프로모터로 활용하기 위해서 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 47과 서열번호 48의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그리고 표 2에서 선별된 변이형 rhtC의 단편을 확보하기 위해서 서열번호 49와 서열번호 50의 프라이머를 이용하여 각각의 rhtC, rhtC(m1), rhtC(m2), rhtC(m3), rhtC(m4) 단편을 획득하였다.

[0140] 서열번호 45 (Ncg12533 up F)

[0141] TCGAGCTCGGTACCCAGCAAGATCTAGTCATCAA

[0142] 서열번호 46 (Ncg12533 up R)

[0143] GTCGTTTTTAGGCTCCGCTGGAAAACATTTTGCA

[0144] 서열번호 47 (PgapA F)

[0145] AATGTTTTCCAGCGGAAGCCTAAAAACGACCGAGC

[0146] 서열번호 48 (PgapA R)

[0147] AAATAACATCAACATGTTGTGTCTCCTCTAAAGAT

[0148] 서열번호 49 (rhtC_m F)

[0149] TAGAGGAGACACAACATGTTGATGTTATTTCTCAC

[0150] 서열번호 50 (rhtC_m R)

[0151] TAAGCAGGTTGATTTTCACCGCGAAATAATCAAAT

[0152] 서열번호 51 (Ncg12533 dn F)

[0153] ATTATTTTCGCGGTGAAAATCAACCTGCTTAGGCGT

[0154] 서열번호 52 (Ncg12533 dn R)

[0155] CTCTAGAGGATCCCCTATAGCTACCATCTGGGTGG

[0157] 상기의 과정으로 수득된 PCR 단편들과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDZ는 김슨 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 야생형과 변이형 rhtC 재조합 플라스미드 5종을 획득하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50 °C에 1시간 보존함으로써 수행하였다. 제작된 플라스미드는 각각 pDZ-PgapA_rhtC, pDZ-PgapA_rhtC(m1), pDZ-PgapA_rhtC(m2), pDZ-PgapA_rhtC(m3), pDZ-PgapA_rhtC(m4)로 명명하였다.

[0159] **실시예 2 : L-쓰레오닌 생산 균주 제작**

[0161] **2-1 : 변이형 리신-민감성 아스파르트키나아제 3(LysC) 형질전환**

[0162] 리신-민감성 아스파르트키나아제 3(lysine-sensitive aspartokinase 3)인 lysC 유전자의 발현 강화와 L-리신(L-Lysine) 및 L-쓰레오닌(L-Threonine)에 대한 피드백 저해 해제를 위한 변이(L377K) 형질(한국 공개특허 제 10-2019-0003019호)을 도입하고자 하였다. 구체적으로, 염색체상의 상동재조합(Homologous recombination)이 발생하는 lysC 프로모터의 업스트림(Upstream) 지역과 lysC의 377번 변이 다운스트림(Downstream) 지역을 수득하였고, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 의 genomic DNA를 주형으로 하여 서열번호 3과 서열번호 4의 프라이머를 이용하여 lysC 프로모터 업스트림(Upstream) 지역을, 서열번호 9와 서열번호 10의 프라이머를 이용하여 lysC의 377번 변이 다운스트림(Downstream) 지역의 유전자 단편을 PCR로 수득하였다.

[0164] 서열번호 3 (lysC promoter Up 1)

[0165] TCGAGCTCGGTACCCGACAGGACAAGCACTGGTTG

[0166] 서열번호 4 (lysC promoter Up 2)

[0167] AGTAGCGCTGGGATGTTTCTCTTTGTGCACCTTTC

[0168] 서열번호 9 (lysC Down 1)

[0169] GAACATCGAAAAGATTTCCACCTCTGAGAT

[0170] 서열번호 10 (lysC Down 2)

[0171] CTCTAGAGGATCCCCGTTACCTCAGAGACGATTA

[0173] 그리고 pECCG117-Pcj7-GFP(한국 등록특허 제10-0620092호) 플라스미드를 주형으로 하여 서열번호 5와 서열번호 6의 프라이머를 이용하여 Pcj7 프로모터 단편을 PCR로 수득하였다.

- [0175] 서열번호 5 (Pcj7 1)
- [0176] GAAAGGTGCACAAAGAGAAACATCCCAGCGCTACT
- [0177] 서열번호 6 (Pcj7 2)
- [0178] TACGACCAGGGCCATGAGTGTTCCTTTCGTTGGG
- [0180] 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 7와 서열번호 8의 프라이머를 이용하여 lysC L377K 변이 업스트림 지역의 유전자 단편을 PCR로 수득하였다.
- [0182] 서열번호 7 (lysC 1)
- [0183] CGAAAGGAAACACTCATGGCCCTGGTCGTACAGAA
- [0184] 서열번호 8 (lysC 2)
- [0185] GGTGGAATCTTTTCGATGTTACGTTGAC
- [0187] 상기의 PCR 반응은 증합효소 SolgTM Pfu-X DNA 폴리머라제를 사용하였고 조건은 95 °C에서 5분간 변성 후, 95 °C에서 30초 변성, 60 °C에서 30초 어닐링, 72 °C에서 60초 증합을 30회 반복한 후, 72 °C에서 5분간 증합반응을 수행하였다.
- [0188] 상기의 과정으로 수득된 PCR 4중 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDZ(한국 등록특허 제 10-1126041호)는 김슨 어셈블리(DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDZ-Pcj7_lysC L377K로 명명하였다. 클로닝은 김슨 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50 °C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [0189] 제작된 pDZ-Pcj7_lysC L377K 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032 균주에 전기천공법(Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545)으로 형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 야생형 lysC 유전자가 변이형 Pcj7_lysC L377K 유전자로 교체된 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 11과 서열번호 12의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.
- [0191] 서열번호 11 (confirm lysC1)
- [0192] ACATCCACCCATTACTGCA
- [0193] 서열번호 12 (confirm lysC 2)
- [0194] TCTTCATCGGTTTCGAAGGT
- [0196] 수득한 형질전환 균주를 Cgl-TH-1로 명명하였다.
- [0198] **2-2 : 변이형 호모세린 탈수소효소(Hom) 형질전환**
- [0199] DNA-결합 전사 이중 조절자(DNA-binding transcriptional dual regulator)인 mcbR 조절을 해제하고 호모세린 탈수소효소(homoserine dehydrogenase)인 hom의 발현량을 증가시키기 위해서 hom 프로모터(promoter)를 Pcj7 프로모터로 교체하였다. 추가적으로 hom의 L-쓰레오닌에 대한 피드백 저해 해제를 위한 변이(G378E, R398Q)를 Cgl-TH-1에 적용하여 L-쓰레오닌 생산을 증가시키고자 하였다. 상기의 변이형 hom 형질전환을 위해서 pDZ-Pcj7_hom(G378E, R398Q)를 제작하였다. Pcj7 프로모터를 hom 프로모터와 교체하기 위해 상동재조합(Homologous recombination)이 발생하는 hom 프로모터 업스트림(Upstream) 지역을 수득하였다. 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 14과 서열번호 55의 프라이머를 이용하여 hom 프로모터 업스트림 지역의 단편을 PCR로 수득하였다.
- [0201] 서열번호 14 (up F)
- [0202] TCGAGCTCGGTACCCGTCTCCGTATGCAGTGAGC
- [0203] 서열번호 55 (up R)
- [0204] GGATGTTTCTTTGGAGCTTCGCTCAATCAT

- [0206] pECCG117-Pcj7-GFP(한국 등록특허 제10-0620092호) 플라스미드를 주형으로 하여 서열번호 13과 서열번호 56의 프라이머를 이용하여 Pcj7 프로모터 단편을 PCR로 수득하였다.
- [0208] 서열번호 13 (cj7 F)
- [0209] GAAGCTCCAAGAAACATCCCAGCGCTACT
- [0210] 서열번호 56 (cj7 R)
- [0211] AGATGCTGAGGTCATGATTGTTCTCTATAATCGC
- [0213] 그리고 hom 변이(G378E, R398Q)를 적용하기 위해서 hom 아미노산 1~378번째 코딩서열의 상단과 G378E/R398Q 변이를 포함한 서열 및 R398Q의 하단 서열을 아래의 방법으로 획득하였다.
- [0214] 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 17과 서열번호 18의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고 hom 아미노산 1~378번째 코딩서열의 단편을 획득하였다. 같은 방법으로 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 15와 서열번호 20의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고 hom G378E/R398Q 변이를 포함한 서열 단편을 획득하였다. 그리고 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 19와 서열번호 21의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고 상동재조합(Homologous recombination)이 발생하는 hom R398Q의 하단 서열 단편을 획득하였다.
- [0216] 서열번호 17 (hom F)
- [0217] TATAGGAGAACAATCATGACCTCAGCATCTGCCCC
- [0218] 서열번호 18 (G378E R)
- [0219] GCCAAAACCTCCACGCGATCTT
- [0220] 서열번호 15 (G378E F)
- [0221] AAGATCGCGTGGAGGTTTGGC
- [0222] 서열번호 20 (R398Q R)
- [0223] GCGCTCTTCTGTTGATTGTACGC
- [0224] 서열번호 19 (R398Q F)
- [0225] GCGTACAATCCAACAGGAAGAGCGC
- [0226] 서열번호 21 (hom R)
- [0227] CTCTAGAGGATCCCCGACTGCGGAATGTTGTGTG
- [0229] 상기의 과정으로 수득된 PCR 5종 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDZ는 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDZ-Pcj7_hom(G378E, R398Q)로 명명하였다. 클로닝은 깊은 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50 °C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [0230] 제작된 pDZ-Pcj7_hom(G378E, R398Q) 벡터를 Cg1-TH-1 균주에 전기천공법으로 형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 야생형 hom 유전자가 변이형 Pcj7_hom(G378E, R398Q) 유전자로 교체된 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 22와 서열번호 23의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.
- [0232] 서열번호 22 (hom conf F)
- [0233] TGGGTAGGTCGAGTTGTAA
- [0234] 서열번호 23 (hom conf R)
- [0235] CAGCGAGTCGCACGAATAT
- [0237] 수득한 형질전환 균주를 Cg1-TH-2로 명명하였다.

- [0239] **2-3 : 피루브산카복실화효소(Pyc) 발현 강화를 위한 변이 적용**
- [0240] 옥살로아세테이트(Oxaloacetate) pool 증가를 통해 L-쓰레오닌 생성을 강화할 목적으로 피루브산카복실화효소 (pyruvate carboxylase)인 pyc 유전자의 발현을 증가시키고자 하였다. pyc 발현강화를 위해 pyc 유전자의 프로모터를 Pcj7 프로모터로 교체하였다. pECCG117-Pcj7-GFP(한국 등록특허 제10-0620092호) 플라스미드를 주형으로 하여 서열번호 24과 서열번호 16의 프라이머를 이용하여 Pcj7 프로모터 단편을 PCR로 수득하였다.
- [0242] 서열번호 24 (CJ7 F)
- [0243] CAACCTTTGCAAGGTGAAAAAGAAACATCCCAGCGCTACT
- [0244] 서열번호 16 (CJ7 R)
- [0245] TGTGTGAGTCGACATGAGTGTTCCTTTCGTTGGG
- [0247] 상기의 Pcj7 프로모터를 pyc 프로모터와 교체하기 위한 상동재조합(Homologous recombination)이 발생하는 pyc 프로모터 업스트림(Upstream) 지역을 수득하였다. 구체적으로, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 하여 서열번호 25와 서열번호 26의 프라이머를 이용하여 pyc 프로모터 업스트림(Upstream) 지역의 단편을 PCR로 수득하였다.
- [0249] 서열번호 25 (upstream F)
- [0250] TCGAGCTCGGTACCCTGACAGTTGCTGATCTGGCT
- [0251] 서열번호 26 (upstream R)
- [0252] AGTAGCGCTGGGATGTTTCTTTTTCACCTTGCAAAGGTTG
- [0254] Pcj7 프로모터 하단 상동 지역(homologous region)으로 활용할 pyc 코딩서열의 N-말단(N-term)을 수득하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 의 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 27과 서열번호 28의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고 pyc 프로모터 하단 단편을 획득하였다.
- [0256] 서열번호 27 (pyc F)
- [0257] GGAATAATTACTCTAATGTCGACTCACACATCTTC
- [0258] 서열번호 28 (pyc R)
- [0259] CTCTAGAGGATCCCCGGCATTTCAGACAGGAAGC
- [0261] 상기의 과정으로 수득된 PCR 3종 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDZ는 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDZ-Pcj7_pyc로 명명하였다. 클로닝은 깊은 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50 °C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [0262] 제작된 pDZ-Pcj7_pyc 벡터를 Cgl-TH-2 균주에 전기천공법으로 형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 야생형 pyc 프로모터가 변이형 Pcj7_pyc 유전자로 교체된 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 29와 서열번호 30의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.
- [0264] 서열번호 29 (pyc conf F)
- [0265] ACGCACTCGGTGAAGGCGTG
- [0266] 서열번호 30 (pyc conf R)
- [0267] CGCTTCAGCTTACGAGATG
- [0269] 수득한 형질전환 균주를 Cgl-TH-3로 명명하였다.
- [0271] **2-4 : 변이형 L-쓰레오닌 오페론, Ncg10179 결손 및 아스파르트키나아제와 호모세린 탈수소효소 1의 이중 기능성을 가지는 단백질(ThrA(S352P)BC) 1copy 삽입**
- [0272] L-쓰레오닌 생합성을 강화하기 위해서 대장균 유래 L-쓰레오닌 오페론을 적용하고자 하였다. 특히 아스파르트키나아제 및 호모세린 탈수소효소 1의 이중 기능성을 가지는(Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1) thrA 유전자는 L-쓰레오닌에 대한 피드백 저해를 해제하기 위해서 thrA(S352P)(J Bacteriol.

1993 Feb;175(4):959-65) 변이를 적용하였다. 그리고 SPL7 프로모터(대한민국 등록특허 제 10-1783170호)를 사용하여 L-쓰레오닌 오페론을 발현을 증가시키고자 하였다.

- [0273] 그리고 상기의 SPL7_thrA(S352P)BC를 Ncg10179 위치에 삽입하기 위해 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032의 게놈 DNA를 주형으로 Ncg10179 상단과 하단 상동 지역(homologous region) 단편을 각각 서열번호 31 및 서열번호 32와 서열번호 37 및 서열번호 38로 염기서열을 증폭하였다. 그리고 합성한 SPL7 프로모터를 주형으로 서열번호 33과 서열번호 34로 SPL7을 증폭하였다.
- [0274] thrA(S352P) 아미노산 352번째 코디서열 상단은 서열번호 35과 서열번호 36으로, thrA(S352P) 아미노산 352번째 하단 및 thrBC는 서열번호 39와 서열번호 40으로 염기서열을 증폭하였다.
- [0276] 서열번호 31 (Ncg10179 UP F)
- [0277] TCGAGCTCGGTACCCTTTTGAGTAATTGGTAATAC
- [0278] 서열번호 32 (Ncg10179 UP R)
- [0279] TGAAGCGCCGGTACCCGCTTAAACGGGCGATTAT
- [0280] 서열번호 37 (Ncg10179 DOWN F)
- [0281] ATGAATCATCAGTAATTAATGGCCCTCGATTGGC
- [0282] 서열번호 38 (Ncg10179 DOWN R)
- [0283] TCTAGAGGATCCCCTGGAATAATCAGACTCTGGA
- [0284] 서열번호 33 (SPL7 F)
- [0285] ATCGCCCGTTTAAGCGGGTACCGGCGCTTCATGT
- [0286] 서열번호 34 (SPL7 R)
- [0287] CTCAACACTCGCATGATATCTGTTTTGATCTCCT
- [0288] 서열번호 35 (S352P UP F)
- [0289] ATCAAAACAGATATCATGCGAGTGTGAAGTTCGG
- [0290] 서열번호 36 (S352P UP R)
- [0291] TACTGTATTCGGAAGATGGTTGCGTAATCAGACCAC
- [0292] 서열번호 39 (S352P DOWN F)
- [0293] GTGGTGCTGATTACGCAACCATCTCCGAATACAGTA
- [0294] 서열번호 40 (S352P DOWN R)
- [0295] AAATCGAGGGCCATTAATTACTGATGATTCATCATC
- [0297] 상기의 과정으로 수득된 PCR 5종 단편과 SmaI 제한효소로 절단된 염색체 형질전환용 벡터 pDZ는 깊은 어셈블리 방법을 이용하여 클로닝함으로써 재조합 플라스미드를 획득하였으며, pDZ-SPL7_thrA(S352P)BC로 명명하였다. 클로닝은 깊은 어셈블리 시약과 각 유전자 단편들을 계산된 몰수로 혼합 후 50 °C에 1시간 보존함으로써 수행하였다.
- [0298] 제작된 pDZ-SPL7_thrA(S352P)BC벡터를 Cg1-TH-3 균주에 전기천공법으로 형질전환형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 SPL7_thrA(S352P)BC 오페론을 삽입한 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 41과 서열번호 42의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.
- [0300] 서열번호 41 (thr conf F)
- [0301] GATTCACATCACCAATGTC
- [0302] 서열번호 42 (thr conf R)

- [0303] GACACCATCGCAGCCCGAC
- [0305] 수득한 형질전환 균주를 Cg1-TH-4로 명명하였다.
- [0307] 상기 균주, Cg1-TH-4는 CJ09-5010로 명명하고, 2019년 5월 31일자로 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국 미생물보존센터(KCCM)에 국제기탁하여 KCCM12537P로 기탁번호를 부여받았다.
- [0309] **2-5 : 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질(RhtC) 도입 코리네박테리움 균주의 L-쓰레오닌 생산**
- [0310] 실시예 1에서 제작된 pDZ-PgapA_rhtC, pDZ-PgapA_rhtC(m1), pDZ-PgapA_rhtC(m2), pDZ-PgapA_rhtC(m3), pDZ-PgapA_rhtC(m4) 벡터를 Cg1-TH-4 균주에 각각 전기천공법으로 형질전환형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 야생형 rhtC와 변이형 rhtC 유전자 4종이 삽입된 각각의 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 53과 서열번호 54의 프라이머를 이용한 PCR과 계놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.
- [0312] 서열번호 53 (HR outside F)
- [0313] AAGGAATATCCCGGAGAACC
- [0314] 서열번호 54 (HR outside R)
- [0315] TTGCGTTTAAAAAGCCCTCG
- [0317] 수득한 형질전환 균주를 각각 Cg1-TH-5, Cg1-TH-5(m1), Cg1-TH-5(m2), Cg1-TH-5(m3), Cg1-TH-5(m4)로 명명하였다.
- [0319] 추가적으로 코리네박테리움 균주에서 변이형 rhtC 도입의 효과를 확인하기 위해서, 제작된 Cg1-TH-5, Cg1-TH-5(m1), Cg1-TH-5(m2), Cg1-TH-5(m3), Cg1-TH-5(m4) 균주들의 L-쓰레오닌 생산량을 비교하고자 아래와 같은 방법으로 배양하였다. 종배지(포도당 20g, 펩톤 10 g, 효모추출물 5 g, 요소 1.5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄ 7H₂O 0.5 g, 바이오틴 100 µg, 티아민 HCl 1000 µg, 칼슘-판토텐산 2000 µg, 니코틴아미드 2000 µg, pH 7.0 (증류수 1 리터 기준)) 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 각 균주들을 접종하고, 30 °C에서 20 시간 동안, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 그런 다음, 생산배지(포도당 70g, (NH₄)₂SO₄ 15 g, MgSO₄ 7H₂O 1.2 g, KH₂PO₄ 1 g, 효모추출물 5 g, 바이오틴 900 µg, 티아민 염산염 4500 µg, 칼슘-판토텐산 4500 µg, CaCO₃ 30 g, pH 7.0 (증류수 1리터 기준)) 25 ml을 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종배양액을 접종하고 30 °C에서 24시간 동안, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 배양 종료 후 HPLC에 의해 L-쓰레오닌의 생산량을 측정하고 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0321] 변이형 rhtC 도입 코리네박테리움 균주의 L-쓰레오닌 생산량

균주명	L-쓰레오닌 생산량 (g/L)	L-쓰레오닌 수율 (*100 g/g, %)
Cg1-TH-4	11.1	15.9
Cg1-TH-5	14.0	20.0
Cg1-TH-5(m1)	17.9	25.6
Cg1-TH-5(m2)	24.0	34.3
Cg1-TH-5(m3)	21.8	31.1
Cg1-TH-5(m4)	17.9	25.6

[0323] 표 3과 같이, 실시예 2-4의 방법으로 제작된 Cg1-TH-4은 11.1 g/L 의 L-쓰레오닌 생산 결과를 보였고 여기에 PgapA_rhtC 야생형 형질이 삽입된 Cg1-TH-5는 14.0 g/L 의 L-쓰레오닌을 생산하였다. 그리고 PgapA_rhtC(m) 변이형 형질이 삽입된 Cg1-TH-5(m1), Cg1-TH-5(m2), Cg1-TH-5(m3), Cg1-TH-5(m4)는 각각 17.9 g/L, 24.0 g/L, 21.8 g/L, 17.9 g/L 의 L-쓰레오닌을 생산하였다.

[0324] L-쓰레오닌 발효 수율로는 Cg1-TH-4 대비 Cg1-TH-5가 4.1%p 상승을 보인 반면 변이형이 적용된 Cg1-TH-5(m1), Cg1-TH-5(m2), Cg1-TH-5(m3), Cg1-TH-5(m4) 균주는 각각 Cg1-TH-4 대비 9.7%p, 18.4%p, 15.3%p, 9.7%p 상승을 보였다. 특히 Cg1-TH-5(m2), Cg1-TH-5(m3)는 Cg1-TH-5의 수율 상승 대비 약 4배의 큰 수율 상승 효과를

보였다. Cg1-TH-5(m2)에 적용된 변이형 RhtC는 서열번호 94의 아미노산 서열을 갖고 있으며 구체적으로 아미노산 62번 위치의 류신(Leu)이 세린(Ser)로 변형된 변이(L62S)를 포함하고 있었다. 그리고 Cg1-TH-5(m3)에 적용된 변이형 RhtC는 서열번호 93의 아미노산 서열을 갖고 있으며 구체적으로 아미노산 53번 위치의 알라닌(Ala)이 쓰레오닌(Thr)로 변형된 변이(A53T)를 포함하고 있었다.

[0325] 상기 두 균주, Cg1-TH-5(m2)와 Cg1-TH-5(m3)는 각각 CA09-5012와 CA09-5036로 명명하였으며, 2019년 5월 31일자로 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 국제기탁하여 KCCM12538P와 KCCM12539P로 기탁번호를 부여받았다.

[0327] **실시예 3 : 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 도입 대장균 균주의 L-쓰레오닌 생산**

[0329] 상기 실시예 1에서 제작한 pCL1920-Pn_rhtC와 선별한 변이형 플라스미드 4종 및 공벡터 pCL1920을 각각 L-쓰레오닌 생산능이 있는 대장균 균주인 TF4076(KFCC10718, 대한민국 특허출원 제90-22965호)에 형질전환하여 TF4076/pCL1920, TF4076/pCL1920-Pn_rhtC, TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m1), TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m2), TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m3), TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m4) 균주를 제작하였다. 제작된 균주들의 L-쓰레오닌 생산량 비교를 위해서 플라스크 평가를 수행하였다. 플라스크 테스트는 각각의 균주를 50 µg/ml 의 스펙티노마이신이 첨가된 LB 플레이트에서 스트리킹(streaking)하고 33 °C 배양기에 16시간 동안 배양한 후, 단일 콜로니(colony)를 LB 배지 2 ml에 접종한 후 200 rpm/33 °C 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 그리고 250 ml 플라스크에 하기 표 4에 따른 조성으로 이루어지는 L-쓰레오닌 생산 플라스크 배지 25 ml을 넣고, 앞서 배양한 배양액을 500 µl씩 투입하였다. 이후, 플라스크를 200 rpm/33 °C 배양기에서 48시간 동안 배양한 후, HPLC를 이용하여 각각의 균주에서 얻어진 L-쓰레오닌 양을 비교하고, 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 4

L-쓰레오닌 생산 플라스크 배지 조성

[0331]

조성	함량(리터당)
포도당	70 g
Ammonium sulfate	25 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄	5 mg
탄산칼슘	30 g
효모엑기스	2 g
메치오닌	0.15 g
pH	6.8

표 5

변이형 rhtC 도입 대장균 균주의 L-쓰레오닌 생산량

[0333]

균주명	L-쓰레오닌 생산량	L-쓰레오닌 수율
	(g/L)	(*100 g/g, %)
TF4076	25.7	36.7
TF4076/pCL1920	25.9	37.0
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC	29.9	42.6
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m1)	33.4	47.7
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m2)	40.4	57.7
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m3)	38.8	55.4
TF4076/pCL1920-Pn_rhtC(m4)	33.8	48.3

[0335] 표 5와 같이 L-쓰레오닌 생산능이 있는 대장균 균주에 변이형 rhtC 플라스미드가 도입되면 L-쓰레오닌 수율이 크게 상승하는 결과를 얻었다. 특히 pCL1920-Pn_rhtC(m2), pCL1920-Pn_rhtC(m3)가 적용된 경우 L-쓰레오닌 수

율이 크게 상승하는 결과를 보였다.

[0337] **실시예 4 : L-쓰레오닌 배출 단백질의 62번 아미노산인 류신의 포화 돌연변이 생성(Saturated mutagenesis)**

[0339] 표 3 및 표 5에서 언급된 것처럼 rhtC(L62S)의 변이형이 야생형 대비 높은 수율 상승 효과를 나타내어, RhtC의 62번 아미노산인 류신을 다른 아미노산으로 변이시켜 62번 위치의 L-쓰레오닌 배출 개선 유효성에 대해서 검증하고자 하였다. 류신을 류신 이외 19종의 다른 아미노산으로 변이하기 위해서 실시예 1에서 제작된 pDZ-PgapA_rhtC를 주형으로 부위 특이적 돌연변이 생성(Site-Directed Mutagenesis)을 아래의 방법으로 수행하였다.

표 6

[0341] 부위 특이적 돌연변이 생성을 위한 PCR 반응 조성물의 조성

조성	합량 (μ l)
10X pfu-X Buffer	5
10mM dNTP Mix	1
pfu-X Polymerase	1
Mutagenic forward primer(5pmol)	2
Mutagenic reverse primer(5pmol)	2
pDZ-PgapA_rhtC(template DNA, 200 ng/ μ l)	1
dH ₂ O	38
Total	50

표 7

[0343] 부위 특이적 돌연변이 생성을 위한 PCR 조건

사이클 횟수	온도	시간
1회	95℃	5 min
18회	95℃	30 sec
	60℃	1 min
	68℃	10 min

[0345] RhtC 62번 류신(L)을 다른 아미노산으로 교체하기 위해서 표 6과 같은 PCR 조성물을 제조하고 표 7의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 수행 시 표 8의 돌연변이 생성 프라이머(mutagenic primer) 세트를 이용하였다. PCR이 종료되고 DpnI 제한효소 1 μ l를 첨가 후 37℃로 1시간 처리하였다. DpnI 처리된 DNA 3 μ l DH5a 컴피던트 셀(competent cell)에 형질전환하여 pDZ-PgapA_rhtC 변이형 플라스미드를 확보하였고 시퀀싱을 통해서 표 8에 표기한 각각의 변이로 교체되었음을 확인하였다.

표 8

[0347] 변이형 rhtC 플라스미드 제작을 위한 돌연변이 생성 프라이머 세트

변이형 rhtC 플라스미드	서열번호 #	염기서열
pDZ-PgapA_rhtC L62R	서열번호 57	GCGCTGCTTGGCCTGCATCGTATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 58	GGCCATTTTTTCGATAATACGATGCAGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62A	서열번호 59	GCGCTGCTTGGCCTGCATGCGATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 60	GGCCATTTTTTCGATAATCGATGCAGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62D	서열번호 61	GCGCTGCTTGGCCTGCATGACATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 62	GGCCATTTTTTCGATAATGTCATGCAGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62K	서열번호 63	GCGCTGCTTGGCCTGCATAAAATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 64	GGCCATTTTTTCGATAATTTTATGCAGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62P	서열번호 65	GCGCTGCTTGGCCTGCATCCGATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 66	GGCCATTTTTTCGATAATCGGATGCAGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62C	서열번호 67	GCGCTGCTTGGCCTGCATTGATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 68	GGCCATTTTTTCGATAATGCAATGCAGGCCAAGCAGCGC
pDZ-PgapA_rhtC L62G	서열번호 69	GCGCTGCTTGGCCTGCATGGCATTATCGAAAAATGGCC

pDZ-PgapA_rhtC L62T	서열번호 70	GGCCATTTTTTCGATAATGCCATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 71	GCGCTGCTTGGCCTGCATACGATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62I	서열번호 72	GGCCATTTTTTCGATAATCGTATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 73	GCGCTGCTTGGCCTGCATATTATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62Y	서열번호 74	GGCCATTTTTTCGATAATAATATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 75	GCGCTGCTTGGCCTGCATTATATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62V	서열번호 76	GGCCATTTTTTCGATAATATAATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 77	GCGCTGCTTGGCCTGCATGTGATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62H	서열번호 78	GGCCATTTTTTCGATAATCACATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 79	GCGCTGCTTGGCCTGCATCATATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62F	서열번호 80	GGCCATTTTTTCGATAATATGATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 81	GCGCTGCTTGGCCTGCATTTCATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62M	서열번호 82	GGCCATTTTTTCGATAATGAAATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 83	GCGCTGCTTGGCCTGCATATGATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62Q	서열번호 84	GGCCATTTTTTCGATAATCATATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 85	GCGCTGCTTGGCCTGCATCAGATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62N	서열번호 86	GGCCATTTTTTCGATAATCTGATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 87	GCGCTGCTTGGCCTGCATAACATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62E	서열번호 88	GGCCATTTTTTCGATAATGTTATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 89	GCGCTGCTTGGCCTGCATGAAATTATCGAAAAATGGCC
pDZ-PgapA_rhtC L62W	서열번호 90	GGCCATTTTTTCGATAATTCATGCAGGCCAAGCAGCGC
	서열번호 91	GCGCTGCTTGGCCTGCATTGGATTATCGAAAAATGGCC
	서열번호 92	GGCCATTTTTTCGATAATCCAATGCAGGCCAAGCAGCGC

[0349] 상기 표 8과 같이 제작된 pDZ-PgapA_rhtC L62R, pDZ-PgapA_rhtC L62A, pDZ-PgapA_rhtC L62D, pDZ-PgapA_rhtC L62K, pDZ-PgapA_rhtC L62P, pDZ-PgapA_rhtC L62C, pDZ-PgapA_rhtC L62G, pDZ-PgapA_rhtC L62T, pDZ-PgapA_rhtC L62I, pDZ-PgapA_rhtC L62Y, pDZ-PgapA_rhtC L62V, pDZ-PgapA_rhtC L62H, pDZ-PgapA_rhtC L62F, pDZ-PgapA_rhtC L62M, pDZ-PgapA_rhtC L62Q, pDZ-PgapA_rhtC L62N, pDZ-PgapA_rhtC L62E, pDZ-PgapA_rhtC L62W 벡터를 실시예 2-5의 방법으로 Cg1-TH-4 균주에 각각 전기천공법으로 형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 변이형 rhtC 유전자가 삽입된 19종의 균주를 획득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동재조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 53과 서열번호 54의 프라이머를 이용한 PCR과 계놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.

[0351] 서열번호 53 (HR outside F)

[0352] AAGGAATATCCGGAGAACC

[0353] 서열번호 54 (HR outside R)

[0354] TTGCGTTTAAAAAGCCCTCG

[0356] 획득한 형질전환 균주를 각각 Cg1-TH-5(L62R), Cg1-TH-5(L62A), Cg1-TH-5(L62D), Cg1-TH-5(L62K), Cg1-TH-5(L62P), Cg1-TH-5(L62C), Cg1-TH-5(L62G), Cg1-TH-5(L62T), Cg1-TH-5(L62I), Cg1-TH-5(L62Y), Cg1-TH-5(L62V), Cg1-TH-5(L62H), Cg1-TH-5(L62F), Cg1-TH-5(L62M), Cg1-TH-5(L62Q), Cg1-TH-5(L62N), Cg1-TH-5(L62E), Cg1-TH-5(L62W)로 명명하였다.

[0358] 상기의 방법으로 제작된 18종의 균주와 기 제작된 Cg1-TH-4, Cg1-TH-5, Cg1-TH-5(m2) 균주를 실시예 2-5의 L-쓰레오닌 생산 플라스크 배지와 배양방법으로 배양하였고 배양 종료 후 HPLC에 의해 L-쓰레오닌의 생산량을 측정하여 표 9에 나타내었다.

표 9

[0360] 62번 아미노산 변이형 RhtC 도입 균주의 L-쓰레오닌 생산량

균주명	rhtC 형태	L-쓰레오닌 생산량(g/L)	L-쓰레오닌 수율(g/g, %)	야생형 rhtC대비 수율향상(Δ, %p)
Cg1-TH-4	-	11.3	16.1	-
Cg1-TH-5	rhtC 야생형	14.0	20.0	-
Cg1-TH-5(m2)	rhtC L62S	24.0	34.3	14.3

Cgl-TH-5(L62R)	rhtC L62R	24.9	35.6	15.6
Cgl-TH-5(L62A)	rhtC L62A	23.5	33.5	13.5
Cgl-TH-5(L62D)	rhtC L62D	17.5	24.9	4.9
Cgl-TH-5(L62K)	rhtC L62K	24.0	34.3	14.3
Cgl-TH-5(L62P)	rhtC L62P	23.3	33.2	13.2
Cgl-TH-5(L62C)	rhtC L62C	15.8	22.6	2.6
Cgl-TH-5(L62G)	rhtC L62G	19.8	28.3	8.3
Cgl-TH-5(L62T)	rhtC L62T	25.8	36.9	16.9
Cgl-TH-5(L62I)	rhtC L62I	17.5	24.9	4.9
Cgl-TH-5(L62Y)	rhtC L62Y	16.4	23.4	3.4
Cgl-TH-5(L62V)	rhtC L62V	22.5	32.2	12.2
Cgl-TH-5(L62H)	rhtC L62H	23.8	34.0	14.0
Cgl-TH-5(L62F)	rhtC L62F	16.5	23.6	3.6
Cgl-TH-5(L62M)	rhtC L62M	19.1	27.3	7.3
Cgl-TH-5(L62Q)	rhtC L62Q	20.0	28.6	8.6
Cgl-TH-5(L62N)	rhtC L62N	21.8	31.2	11.2
Cgl-TH-5(L62E)	rhtC L62E	18.2	26.0	6.0
Cgl-TH-5(L62W)	rhtC L62W	20.7	29.6	9.6

[0362] 표 9와 같이, 야생형 rhtC 를 삽입한 Cgl-TH-5 대비 RhtC 단백질의 62번 아미노산의 변이를 적용한 19종 변이 모두 3.4~16.9 %p의 발효 수율 향상을 나타내었다.

[0364] **실시예 5 : 인공변이법을 통한 AHV 내성 균주 스크리닝**

[0366] 코리네박테리움 글루타미쿰 KFCC10881(대한민국 등록특허 제0159812호)을 모균주로 하여 L-쓰레오닌 유사체인 AHV(2-amino-3-hydroxy-valerate)에 대한 내성을 부여하였다.

[0367] NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)을 사용한 인공변이법으로 변이를 유도하였다. 실시예 2-5의 종배지에서 18시간 동안 배양한 KFCC10881 균주를 다시 종배지 4 ml에 접종한 후, OD660이 약 1.0이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50 mM 트리스-말레이트(Tris-malate) 완충용액(pH 6.5)으로 2회 세척하여 최종 4 ml의 동일한 완충용액으로 현탁하였다. 균체 현탁액에 최종농도 150 mg/l이 되도록 NTG 용액(0.05M 트리스-말레이트 완충용액(pH6.5)에서 2 mg/ml 농도)을 첨가하여 실온에서 20분 간 정치한 후, 원심분리를 통해 균체를 수거하였으며, NTG 제거를 위하여 동일한 완충용액으로 2회 세척하였다. 최종적으로 세척한 균체를 20% 글리세롤 용액 4 ml에 현탁 한 후, 사용 전까지 -70 °C에 보관하였다. NTG 처리 균주를 3g/l의 AHV를 포함하는 최소배지에 도말하였으며, 상기 과정을 통하여 155주의 AHV 내성을 갖는 변이형 KFCC10881 균주를 155주 수득하였다.

[0369] **실시예 6 : AHV 내성 KFCC10881 균주로부터 L-쓰레오닌 생산 균주 선별**

[0371] 실시예 5에서 수득한 155주의 AHV 내성 균주에 대하여 L-쓰레오닌 생산능 테스트를 진행하였다. 실시예 2-5의 종배지 25 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 155주의 균주를 접종한 후, 30 °C에서 20 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. L-쓰레오닌 생산 배지(포도당 30g, KH₂PO₄ 2g, 요소 3g, (NH₄)₂SO₄ 40g, 펩톤 2.5g, CSL(Sigma) 5g(10 ml), MgSO₄ 7H₂O 0.5g, 류신 400 mg, CaCO₃ 20g, pH 7.2 (증류수 1 리터 기준)) 24 ml를 함유하는 250 ml 코너-바플 플라스크에 1 ml의 종배양액을 접종하고 30 °C에서 48 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다.

[0372] 배양 종료 후 HPLC를 이용하여 생산된 여러 아미노산의 생산량을 측정하였다. 실험한 155주의 균주 중 L-쓰레오닌 생산능이 우수한 것으로 나타난 상위 22주에 대한 아미노산의 배양액 내 농도를 표 10에 나타내었다. 상기 과정을 통하여 확인된 22주의 후보를 각각 KFCC10881-1 내지 KFCC10881-22로 명명하였다.

표 10

AHV 내성 균주의 L-쓰레오닌 생산량

[0374]

균주명	OD	L-Threonine(g/L)	Homoserine(g/L)
KFCC10881	58.5	0.0	0.1
KFCC10881-1	60.1	2.0	1.5

KFCC10881-2	57.1	3.0	2.2
KFCC10881-3	47.3	2.8	2.3
KFCC10881-4	51.7	3.2	2.1
KFCC10881-5	58.4	3.1	2.2
KFCC10881-6	52.6	3.4	2.5
KFCC10881-7	14.2	0.4	0.2
KFCC10881-8	55.8	3.0	2.0
KFCC10881-9	44.3	3.2	2.8
KFCC10881-10	47.5	3.7	3.0
KFCC10881-11	57.0	2.7	1.8
KFCC10881-12	51.8	3.3	3.5
KFCC10881-13	49.8	3.0	2.3
KFCC10881-14	62.7	2.4	2.1
KFCC10881-15	62.4	2.9	2.7
KFCC10881-16	59.6	2.8	2.5
KFCC10881-17	24.1	0.1	0.2
KFCC10881-18	60.5	2.6	2.5
KFCC10881-19	60.0	3.0	1.9
KFCC10881-20	65.8	2.7	2.0
KFCC10881-21	17.3	0.3	0.3
KFCC10881-22	60.1	3.5	1.9

[0376] 표 10과 같이, AHV 내성을 갖는 22종의 균주가 대조균(KFCC10881)에서는 관찰되지 않던 L-쓰레오닌 생산 결과를 보였다.

[0377] 그리고, 상기 AHV 내성 균주들 중 KFCC10881-10이 가장 우수한 L-쓰레오닌 균주로 선별되었다.

[0379] **실시예 7: 변이형 L-쓰레오닌 배출 단백질 도입 KFCC10881-10 균주의 L-쓰레오닌 생산**

[0381] 실시예 1에서 제작된 pDZ-PgapA_rhtC, pDZ-PgapA_rhtC(m2), pDZ-PgapA_rhtC(m3) 와 실시예 4의 표 8과 같이 제작된 pDZ-PgapA_rhtC L62R, pDZ-PgapA_rhtC L62A, pDZ-PgapA_rhtC L62D, pDZ-PgapA_rhtC L62K, pDZ-PgapA_rhtC L62P, pDZ-PgapA_rhtC L62C, pDZ-PgapA_rhtC L62G, pDZ-PgapA_rhtC L62T, pDZ-PgapA_rhtC L62I, pDZ-PgapA_rhtC L62Y, pDZ-PgapA_rhtC L62V, pDZ-PgapA_rhtC L62H, pDZ-PgapA_rhtC L62F, pDZ-PgapA_rhtC L62M, pDZ-PgapA_rhtC L62Q, pDZ-PgapA_rhtC L62N, pDZ-PgapA_rhtC L62E, pDZ-PgapA_rhtC L62W 벡터를 KFCC10881-10 균주에 각각 전기천공법으로 형질전환 후, 2차 교차 과정을 거쳐 염색체 상에서 변이형 rhtC 유전자 삽입된 22종의 균주를 수득하였다. 해당 유전자가 삽입된 상동제조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 53과 서열번호 54의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.

[0383] 서열번호 53 (HR outside F)

[0384] AAGGAATATCCGGAGAACC

[0385] 서열번호 54 (HR outside R)

[0386] TTGCGTTTGAAAAGCCCTCG

[0388] 수득한 형질전환 균주를 각각 KFCC10881-10(rhtC WT), KFCC10881-10(rhtC L62S), KFCC10881-10(rhtC A53T), KFCC10881-10(rhtC L62R), KFCC10881-10(rhtC L62A), KFCC10881-10(rhtC L62D), KFCC10881-10(rhtC L62K), KFCC10881-10(rhtC L62P), KFCC10881-10(rhtC L62C), KFCC10881-10(rhtC L62G), KFCC10881-10(rhtC L62T), KFCC10881-10(rhtC L62I), KFCC10881-10(rhtC L62Y), KFCC10881-10(rhtC L62V), KFCC10881-10(rhtC L62H), KFCC10881-10(rhtC L62F), KFCC10881-10(rhtC L62M), KFCC10881-10(rhtC L62Q), KFCC10881-10(rhtC L62N), KFCC10881-10(rhtC L62E), KFCC10881-10(rhtC L62W)로 명명하였다.

[0389] 해당 rhtC 유전자가 삽입된 상동제조합 업스트림 지역과 다운스트림 지역의 외부 부위를 각각 증폭할 수 있는 서열번호 53과 서열번호 54의 프라이머를 이용한 PCR과 게놈 시퀀싱을 통해 해당 유전적 조작을 확인하였다.

[0390] 그리고 상기의 방법으로 제작된 균주 22종을 실시예 6의 L-쓰레오닌 생산 배지와 배양방법으로 배양하고 배양

종료 후 HPLC에 의해 L-쓰레오닌의 생산량을 측정하여 표 11에 나타내었다.

표 11

변이형 rhtC 도입 KFCC10881-10 균주의 L-쓰레오닌 생산량

균주명	L-쓰레오닌 생산량(g/L)	L-쓰레오닌 수율(g/g, %)	야생형 rhtC대비 수율 향상(Δ, %D)
KFCC10881-10	3.8	12.7	-
KFCC10881-10(rhtC WT)	5.5	18.3	-
KFCC10881-10(rhtC A53T)	9.0	30.0	11.7
KFCC10881-10(rhtC L62S)	10.1	33.5	15.2
KFCC10881-10(rhtC L62R)	10.0	33.2	14.9
KFCC10881-10(rhtC L62A)	9.8	32.5	14.2
KFCC10881-10(rhtC L62D)	6.6	22.1	3.8
KFCC10881-10(rhtC L62K)	10.2	34.1	15.8
KFCC10881-10(rhtC L62P)	10.0	33.2	14.9
KFCC10881-10(rhtC L62C)	5.9	19.8	1.5
KFCC10881-10(rhtC L62G)	7.8	26.1	7.8
KFCC10881-10(rhtC L62T)	10.2	34.0	15.7
KFCC10881-10(rhtC L62I)	6.3	20.9	2.6
KFCC10881-10(rhtC L62Y)	6.8	22.5	4.2
KFCC10881-10(rhtC L62V)	9.2	30.5	12.2
KFCC10881-10(rhtC L62H)	9.8	32.8	14.5
KFCC10881-10(rhtC L62F)	6.4	21.3	3.0
KFCC10881-10(rhtC L62M)	7.3	24.2	5.9
KFCC10881-10(rhtC L62Q)	7.9	26.3	8.0
KFCC10881-10(rhtC L62N)	8.9	29.5	11.2
KFCC10881-10(rhtC L62E)	7.4	24.5	6.2
KFCC10881-10(rhtC L62W)	8.5	28.2	9.9

[0394] 표 11과 같이 KFCC10881-10에 변이형 RhtC를 도입했을 경우 실시예 3과 실시예 4에서 나타났던 결과와 같이 야생형 RhtC 대비 높은 수준의 수율 상승을 관찰할 수 있었다.

[0396] 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

[0409] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
 수탁번호 : KCCM12537P
 수탁일자 : 20190531

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
 수탁번호 : KCCM12538P
 수탁일자 : 20190531

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12539P

수탁일자 : 20190531

서열목록

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> Variants of L-threonine efflux protein and methods for producing L-threonine using them
- <130> KPA190701-KR
- <160> 112
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 206
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> rhtC wild type
- <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

tcgagctcgg tacccgacag gacaagcact ggttg 35

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lysC promoter Up 2

<400> 4

agtagcgctg ggatgtttct cttgtgcac ctttc 35

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pcj7 1

<400> 5

gaaaggtgca caaagagaaa catcccagcg ctact 35

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pcj7 2

<400> 6

taggaccagg gccatgagtg tttcctttcg ttggg 35

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lysC 1

<400> 7

cgaaaggaaa cactcatggc cctggtcgta cagaa 35

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lysC 2
 <400> 8
 ggtggaatc ttttcgatgt tcacgttgac 30
 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lysC Down 1
 <400> 9
 gaacatcgaa aagatttcca cctctgagat 30
 <210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lysC Down 2
 <400> 10
 ctctagagga tccccgttca cctcagagac gatta 35

 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> confirm lysC 1
 <400> 11
 acattccacc cattactgca 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> confirm lysC 2
 <400> 12
 tcttcatcgg tttcgaaggt 20
 <210> 13
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> cj7 F
 <400> 13
 gaagctcaa agaaacatcc cagcgctact 30

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> up F
 <400> 14
 tcgagctcgg tacctgtct ccgtatgcag tgacc 35

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G378E F
 <400> 15
 aagatcgcgt ggaggttttg gc 22

<210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CJ7 R
 <400> 16
 tgtgtgagtc gacatgagtg tttcctttcg ttggg 35

<210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hom F
 <400> 17
 tataggagaa caatcatgac ctcagcatct gcccc 35

<210> 18

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G378E R
 <400> 18
 gccaaaacct ccacgcgatc tt 22
 <210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> R398Q F
 <400> 19
 gcgtacaatc caacaggaag agcgc 25

 <210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> R398Q F
 <400> 20
 gcgctcttcc tgttgattg tacgc 25
 <210> 21
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hom R
 <400> 21
 ctctagagga tccccgactg cggaatgttg ttgtg 35
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hom conf F
 <400> 22

tggtaggtc gaggtaggtc gagttgtaa 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hom conf R
 <400> 23
 cagcgcagtc gcacgaatat 20

<210> 24
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CJ7 F
 <400> 24
 caacctttgc aaggtgaaaa agaaacatcc cagcgcact 40

<210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> upstream F
 <400> 25
 tcgagctcgg tacctgaca gttgctgac tgct 35

<210> 26
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> upstream R
 <400> 26
 agtagcctg ggatgtttct tttcacctt gcaaaggttg 40

<210> 27
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> pyc F
 <400> 27
 ggaataatta ctctaagtc gactcacaca tcttc 35
 <210> 28
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pyc R
 <400> 28
 ctctagagga tccccgcat tttcagacag gaagc 35

 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pyc conf F
 <400> 29
 acgcactcgg tgaaggcgtg 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pyc conf R
 <400> 30
 cgcttcagct tcacgagatg 20
 <210> 31
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ncgl0179 UP F
 <400> 31
 tcgagctcgg tacccttttg agtaattggt aatac 35

 <210> 32
 <211> 34

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ncgl0179 UP R
 <400> 32
 tgaagcgccg gtacccgctt aaacgggcga ttat 34
 <210> 33
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SPL7 F
 <400> 33
 atcgcccgtt taagcgggta ccggcgcttc atgt 34
 <210> 34
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SPL7 R
 <400> 34
 cttcaacct cgcatgatat ctgttttgat ctctt 35

 <210> 35
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> S352P UP F
 <400> 35
 atcaaaacag atatcatgcg agtgttgaag ttcgg 35
 <210> 36
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> S352P UP R
 <400> 36
 tactgtattc ggaagatggt tgcgtaatca gcaccac 37
 <210> 37

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ncg10179 DOWN F
 <400> 37
 atgaatcadc agtaattaat ggccctcgat ttggc 35

<210> 38
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ncg10179 DOWN R
 <400> 38
 tctagaggat ccctggaat aatcagactc tgga 34

<210> 39
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> S352P DOWN F
 <400> 39
 gtggtgctga ttacgcaacc atcttccgaa tacagta 37

<210> 40
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> S352P DOWN R
 <400> 40
 aaatcgaggg ccattaatta ctgatgattc atcatc 36

<210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> thr conf F
 <400> 41

gattcacatc accaatgtc 19

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> thr conf R

<400> 42

gacaccatcg cagcccgac 19

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC F

<400> 43

gtcgactcta gaggatcccc gctgattcgt gcgcatgttg 40

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC R

<400> 44

tgaattcgag ctcggtaccc tcaccgcgaa ataatcaat 40

<210> 45

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ncgl2533 up F

<400> 45

tcgagctcgg taccccagca agatctagtc atcaa 35

<210> 46

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ncgl2533 up R

<400> 46
 gtcgttttta ggcttccgct ggaaaacatt ttgca 35

<210> 47
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PgapA F
 <400> 47
 aatgttttcc agcggaagcc taaaaacgac cgagc 35

<210> 48
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PgapA R
 <400> 48
 aaataacatc aacatgttgt gtctcctcta aagat 35

<210> 49
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC_m F
 <400> 49
 tagaggagac acaacatggt gatgttattt ctcac 35

<210> 50
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC_m R
 <400> 50
 taagcaggtt gattttcacc gcgaaataat caaat 35

<210> 51
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Ncgl2533 dn F
 <400> 51
 attatttcgc ggtgaaaatc aacctgctta ggcgt 35
 <210> 52
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ncgl2533 dn R
 <400> 52
 ctctagagga tcccctatag ctaccatctg ggtgg 35

 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HR outside F
 <400> 53
 aaggaatatc ccggagaacc 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HR outside R
 <400> 54
 ttgcgtttga aaagccctcg 20
 <210> 55
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> up R
 <400> 55
 ggatgtttct ttggagcttc gctcaatcat 30

 <210> 56

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cj7 R
 <400> 56
 agatgctgag gtcattgatt ttctcctata atcgc 35
 <210> 57
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62R F
 <400> 57
 gcgctgcttg gcctgcatcg tattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 58
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62R R
 <400> 58

 ggccattttt tcgataatac gatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 59
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62A F
 <400> 59
 gcgctgcttg gcctgcatgc gattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 60
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62A R
 <400> 60
 ggccattttt tcgataatcg catgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 61
 <211> 39

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62D F
 <400> 61
 gcgctgcttg gcctgcatga cattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 62
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62D R
 <400> 62
 ggccatTTTT tcgataatgt catgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 63
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62K F
 <400> 63
 gcgctgcttg gcctgcataa aattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 64
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62K R
 <400> 64
 ggccatTTTT tcgataatTT tatgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 65
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62P F

<400> 65
 gcgctgcttg gcctgcatcc gattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 66
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62P R

<400> 66
 ggccattttt tcgataatcg gatgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 67
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62C F

<400> 67
 gcgctgcttg gcctgcattg cattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 68
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62C R

<400> 68
 ggccattttt tcgataatgc aatgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 69
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62G F

<400> 69
 gcgctgcttg gcctgcatgg cattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 70
 <211> 39
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62G R
 <400> 70
 ggccattttt tcgataatgc catgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62T F
 <400>
 71
 gcgctgcttg gcctgcatac gattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 72
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62T R
 <400> 72
 ggccattttt tcgataatcg tatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 73
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62I F
 <400> 73
 gcgctgcttg gcctgcatat tattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 74
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62I R
 <400> 74
 ggccattttt tcgataataa tatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 75

<211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62Y F
 <400> 75
 gcgctgcttg gctgcatta tattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 76
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62Y R
 <400> 76

 ggccattttt tcgataatat aatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 77
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62V F
 <400> 77
 gcgctgcttg gctgcatgt gattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 78
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62V R
 <400> 78
 ggccattttt tcgataatca catgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 79
 <211> 39

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62H F
 <400> 79

gcgctgcttg gcctgcatca tattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 80
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62H R
 <400> 80
 ggccattttt tcgataatat gatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 81
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62F F
 <400> 81
 gcgctgcttg gcctgcattt cattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 82
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62F R
 <400> 82
 ggccattttt tcgataatga aatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 83
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62M F
 <400> 83
 gcgctgcttg gcctgcatat gattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 84
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62M R

<400> 84

ggccattttt tcgataatca tatgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 85

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62Q F

<400> 85

gcgctgcttg gcctgcatca gattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 86

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62Q R

<400> 86

ggccattttt tcgataatct gatgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 87

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62N F

<400> 87

gcgctgcttg gcctgcataa cattatcgaa aaaatggcc 39

<210> 88

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62N R

<400> 88

ggccattttt tcgataatgt tatgcaggcc aagcagcgc 39

<210> 89

<211> 39

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62E F
 <400>
 89
 gcgctgcttg gcctgcatga aattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 90
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62E R
 <400> 90
 ggccattttt tcgataatth catgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 91
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62W F
 <400> 91
 gcgctgcttg gcctgcattg gattatcgaa aaaatggcc 39
 <210> 92
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pDZ-PgapA_rhtC L62W R
 <400> 92
 ggccattttt tcgataatcc aatgcaggcc aagcagcgc 39
 <210> 93
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC A53T
 <400> 93
 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 Thr 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> 94
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62S
 <400> 94
 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 Ser 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> 95
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62R
 <400> 95
 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 Arg 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> 96
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62A
 <400> 96

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 Ala 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> 97

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> rhtC L62D

<400> 97
 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 Asp 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> 98
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62K

<400> 98
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 Lys 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> 99
<211> 206
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> rhtC L62P

<400> 99
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 Pro 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> 100
<211> 206
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> rhtC L62C

<400> 100
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 Cys 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> 101
<211> 206
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> rhtC L62G

<400> 101
 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 Gly 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> 102
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62T

<400> 102
 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 Thr 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> 103
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62I

<400> 103
 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 Ile 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> 104
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rhtC L62Y

<400> 104

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 Tyr 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> 105

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> rhtC L62V

<400> 105

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 Val 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> 106

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62H

<400> 106

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 His 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> 107

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62F

<400> 107

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 Phe 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> 108

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62M

<400> 108

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 Met 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> 109

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62Q

<400> 109

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 Gln 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> 110

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62N

<400> 110

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 Asn 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> 111

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62E

<400> 111

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 Glu 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> 112

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhtC L62W

<400> 112

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 Trp 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