(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0123465
(43) 공개일자 2021년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) *C07K 14/33* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 7/26* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
C07K 14/33 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0040576
(22) 출원일자 2020년04월02일
심사청구일자 2020년12월09일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이진원
서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호
서교연
충청북도 청주시 서원구 사운로 93 (두산위브더제니스) A-1703
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

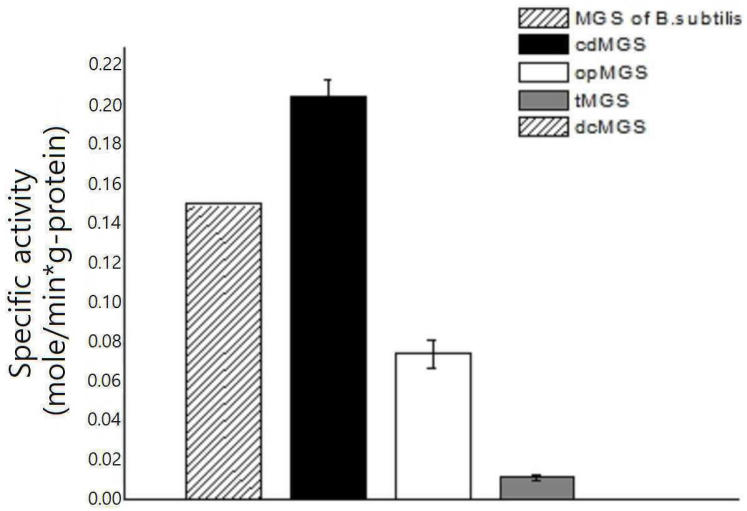
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 및 이를 이용한 메틸글라이옥살의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 폴리펩타이드인 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물 및 상기 메틸글라이옥살 합성효소를 이용한 메틸글라이옥살의 제조 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12P 7/26 (2013.01)
C12Y 402/03003 (2013.01)

(72) 발명자
연영주
서울특별시 동작구 국사봉2마길 21, 401호
조숙형
경기도 고양시 덕양구 백양로 126, 은빛마을11단지 아파트 1108동 901호
김현수
서울특별시 강남구 학동로 609 12동 907호 (청담동,삼익아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3D3A1A01064929
과제번호	1711081810
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명	C1 가스 전환 기술 공통시험 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메틸글라이옥살 합성효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 메틸글라이옥살 합성효소.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 스트렙-태그는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 메틸글라이옥살 합성효소.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 스트렙-태그는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 N-말단, C-말단 또는 양 말단에 결합된 것인, 메틸글라이옥살 합성효소.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 메틸글라이옥살 합성효소는 pH 5 내지 7에서 0.139 U/mg 이상의 비활성을 갖는 것인, 메틸글라이옥살 합성효소.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메틸글라이옥살 합성효소는 20 내지 65 ℃에서 0.063 U/mg 이상의 비활성을 갖는 것인, 메틸글라이옥살 합성효소.

청구항 7

스트렙-태그를 코딩하는 염기서열 및 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5`-말단, 3`-말단 또는 양 말단에 결합된 것인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

스트렙-태그를 코딩하는 염기서열 및 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 것인, 재조합 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 재조합 벡터.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5`-말단, 3`-말단 또는 양 말단에 결합된 것인, 재조합 벡터.

청구항 15

스트렙-태그를 코딩하는 염기서열 및 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 형질전환 미생물.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5`-말단, 3`-말단 또는 양 말단에 결합된 것인, 형질전환 미생물.

청구항 19

다음의 단계를 포함하는 메틸글라이옥살의 제조 방법:

스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소에 기질을 첨가하여 메틸글라이옥살을 합성하는 효소 반응 단계.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 기질은 디히드록시아세톤 인산인 것인, 메틸글라이옥살의 제조 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 효소 반응 단계는 pH 5 내지 7의 조건에서 수행되는 것인, 메틸글라이옥살의 제조 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 효소 반응 단계는 20 내지 65 ℃의 온도 조건에서 수행되는 것인, 메틸글라이옥살의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리펩타이드인 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물 및 상기 메틸글라이옥살 합성효소를 이용한 메틸글라이옥

살의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 1,2-프로판디올 (propanediol; PDO) 은 동결방지, 폴리에스테르 레진 (polyester resin), 약제 (pharmaceuticals), 화장품 (cosmetics), 세제 (detergent) 등 다양한 분야의 구성 요소 (building block)로 이용되는 물질이다. 이러한 높은 활용가능성으로 인해 미국에서만 1조 lb/yr 이상 판매되며, 전세계적으로 수요는 3조 lb/yr 이상으로 추정된다.

[0003] 한편, 대부분의 1,2-프로판디올은 석유 화학 공정을 통해서 생산된다. 수증기 분해 (Steam cracking) 생산물인 프로필렌 (propylene)이 프로필렌 옥사이드 (propylene oxide)로 전환되고 가수분해를 거쳐 최종적으로 1,2-프로필렌글라이콜을 생산하기까지 유해한 중간 물질과 부산물이 생산된다. 이러한 공정을 보다 지속가능하고 친환경적인 바이오 공정으로 대체하기 위해 다양한 미생물을 이용한 1,2-프로판디올의 생산 시도가 이루어졌다.

[0004] 1,2-프로판디올은 디히드록시 아세톤 포스페이트가 메틸글라이옥살로 전환되고, 추가로 메틸글라이옥살 리덕타제에 의해 환원되어야 생산할 수 있다. 여기서 메틸글라이옥살은 1,2-프로판디올의 생산에 중요한 기질이다.

[0005] 메틸글라이옥살 (Methylglyoxal)은 화학식 $CH_3C(O)CHO$를 갖는 유기화합물이며, 피루브산 (Pyruvate)의 환원 유도체이다. 메틸글라이옥살은 메틸글라이옥살 합성효소를 사용하여 탄수화물의 분해에 의하여 산업적으로 생산된다. 유기체에서 메틸글라이옥살은 몇 가지 대사 경로의 부산물로 형성되는데, 주로, 글리세랄 알데히드-3-포스페이트 (Glyceraldehyde-3-phosphate) 및 디히드록시 아세톤 포스페이트 (Dehydroxy acetone phosphate)를 기질로 하는 해당 분해의 부산물로 발생한다.

[0006] 메틸글라이옥살 합성효소 (Methylglyoxsal synthase, MGS)는 디히드록시 아세톤 포스페이트 (Dehydroxy Acetone Phosphate, DHAP)를 메틸글라이옥살 및 인산염으로 분해하는 화학반응을 촉매하는 효소이다. 메틸글라이옥살 합성효소는 포스포에놀피루브산 (Phosphoenol pyruvate), 3-포스포글리세르산 (3-Phospho glycerate), 피로인산 (Pyrophosphate), 인산 (Phosphate)에 의해 활성이 저해된다.

[0007] 현재, 슈도모나스 사카로필라 (*Pseudomonas saccharophila*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 클로스트리디움 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*), 써무스 종 GH5 균주 (Thermus sp. GH5 균주), 대장균 (*E. coli*), 고초균 (*Bacillus subtilis*) 등에서 메틸글라이옥살 합성효소의 특성에 관한 연구가 일부 이루어졌으나, 매우 제한적이다. 특히, 비활성 (specific Activity)에 대한 연구는 고초균 (*Bacillus subtilis*)과 대장균 (*E. coli*)을 제외하면 보고된 바를 찾기 힘들다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 다양한 유래의 메틸글라이옥살 합성효소의 비활성 비교를 통하여, 메틸글라이옥살의 생산에 있어 최적의 메틸글라이옥살 합성 효소를 찾고자 연구한 결과, 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 메틸글라이옥살 합성 활성이 다른 균주 유래의 합성효소에 비하여 현저히 우수한 것을 확인하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 폴리펩타이드인 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 이용한 메틸글라이옥살의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 폴리펩타이드인 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물 및 상기 메틸글라이옥살 합성효소를 이용한 메틸글라이옥살의 제조 방법에 관한 것이다.

[0015] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0016] 본 발명자들은 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5'-말단 또는 3'-말단에 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 부착하고, T7 프로모터와 함께 pET duet-1 벡터에 도입하여, 폴리펩타이드인 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 정제하였다.

[0017] 본 발명의 일 예는 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에 있어서 메틸글라이옥살 합성효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에 있어서 스트렙-태그는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에 있어서 스트렙-태그는 메틸글라이옥살 합성효소의 N-말단, C-말단 또는 양 말단에 결합된 것일 수 있으며, 예를 들어, N-말단에 결합된 것일 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서 스트렙-태그를 포함하는 메틸글라이옥살 합성효소는 pH 4 내지 7, pH 5 내지 7, pH 6 내지 7에서 합성 활성을 나타내는 것일 수 있으며, 예를 들어, pH 6 내지 7에서 최대의 활성을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 있어서 스트렙-태그를 포함하는 메틸글라이옥살 합성효소는 20 내지 60 ℃, 30 내지 60 ℃, 36 내지 60 ℃, 20 내지 50 ℃, 30 내지 50 ℃, 36 내지 50 ℃, 20 내지 40 ℃, 30 내지 40 ℃, 36 내지 40 ℃에서 합성 활성을 나타내는 것일 수 있으며, 예를 들어, 36 내지 40 ℃에서 최대의 활성을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서 용어 "비활성 (specific activity)"은 단백질의 단위중량당 효소활성을 나타낸 것을 의미하고, 일반적으로 활성의 단위는 비 (U/mg 또는 mole/min*g-protein)로 표현한다.

[0024] 본 발명의 다른 일 예는 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5'-말단, 3'-말단 또는 양 말단에 결합된 것일 수 있으며, 예를 들어, 5'-말단에 결합된 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 일 예는 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 있어서 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4λ

B, λ-Charon, λ△z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 발현을 위한 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현을 위한 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pLλ 프로모터, CMV 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 또 다른 일 예는 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열 및 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에 있어서 형질전환 미생물은 상기 재조합 벡터를 적절한 미생물에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서 미생물은 상기 재조합 벡터를 안정적이면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서, 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서 미생물은 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포, 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으며, 예를 들어 원핵세포로는, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO (Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서 운반 방법은 예를 들어, 미생물이 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 미생물이 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀 매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 있어서 형질전환 미생물을 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 특정 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 일 예는 다음의 단계를 포함하는, 메틸글라이옥살의 제조 방법에 관한 것이다:

[0040] 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소에 기질을 첨가하여 메틸글라이옥살을 합성하는 효소 반응 단계.

[0041] 본 발명에 있어서 상기 기질은 디히드록시아세톤 인산일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에 있어서 상기 효소 반응 단계는 pH 4 내지 7, pH 5 내지 7, pH 6 내지 7에서 진행되는 것일 수 있으며, 예를 들어, pH 6 내지 7에서 진행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에 있어서 상기 효소 반응 단계는 20 내지 60 ℃, 30 내지 60 ℃, 36 내지 60 ℃, 20 내지 50 ℃, 30 내지 50 ℃, 36 내지 50 ℃, 20 내지 40 ℃, 30 내지 40 ℃, 36 내지 40 ℃에서 진행되는 것일 수 있으며, 예를 들어, 36 내지 40 ℃에서 진행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 있어서 프라이머 세트는 정방향 프라이머, 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 의미한다. 정방향 프라이머 또는 역방향 프라이머는 각각 제한자리 및/또는 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는

것일 수 있고, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 중 적어도 어느 하나의 프라이머는 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0045] 본 발명에 있어서 프라이머는 중합효소에 의한 뉴클레오티드의 중합반응에서, 개시점으로 작용할 수 있는 단일 가닥의 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건 (즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소의 존재) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일 가닥의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예를 들면, 온도와 프라이머의 용도에 따라 달라질 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서 프라이머는 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 상보성을 가지면 충분하다.

[0047] 본 발명에 있어서 제한자리는 제한 효소 (restriction enzyme) 또는 제한 내부핵산가수분해 효소 (restriction endonuclease)에 의하여 염기서열의 특정한 부분이 인식되어 그 부분이나 그 주변이 절단되는 4 내지 9개의 특수한 염기서열 부분을 의미한다. 예를 들어, EcoRI은 제한자리로 6개의 염기서열인 GAATTC를 인식하고 절단하고, HaeIII는 4개의 염기서열인 GGCC를 인식하고 절단하고, KpnI은 6개의 염기서열인 GGTACC를 인식하고 절단하고, NdeI은 6개의 염기서열인 CATATG를 인식하고 절단할 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명은 폴리펩타이드인 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 미생물 및 상기 메틸글라이옥살 합성효소를 이용한 메틸글라이옥살의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소는, 30 ℃에서 가장 높은 비활성 (specific activity)을 갖는 고초균 (*Bacillus subtilis*) 유래 메틸글라이옥살 합성효소와 비교하여, 약 1.37배 높은 비활성을 가진다. 따라서, 본 발명의 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 이용하면 효율적으로 메틸글라이옥살을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주에서 유래한 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열 및 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는 뉴클레오타이드를 pET duet-1 벡터에 도입한 것을 보여주는 개열지도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환된 대장균 BL21 균주의 배양수준을 측정한 검량곡선이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 클로스트리디움 디피실리 630 균주에서 유래한 메틸글라이옥살 합성효소를 정제한 SDS-PAGE의 사진이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 클로스트리디움 디피실리 630 균주에서 유래한 메틸글라이옥살을 정량하기 위한 검량곡선이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 고초균 (*Bacillus subtilis*), 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주, 오세아니써무스 프로펀더스 (*Oceanithermus profundus*) DSM 14977, 써무스 속 (Thermus sp.) GH5, 데이노코쿠스 코린시스 (*Deinococcus koreensis*) 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 효소 활성을 비교한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 고초균 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 클로스트리디움 디피실리 630 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 오세아니써무스 프로펀더스 DSM 14977 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 써무스 종 GH5 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소, 데이노코쿠스 코린시스 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 N-말단 또는 C-말단에 스트렙-태그를 부착한 경우, 각각의 비활성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 클로스트리디움 디피실리 630 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 pH에 따른 비활성을 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 클로스트리디움 디피실리 630 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 온도에 따른 비활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1. 시약의 준비**

[0053] 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 유래 메틸글라이옥살 합성효소 유전자 (cdMGS)는 Bioneer (한국)에서 상업적으로 합성하였다 (Genbank ID: AJP10844.1) (서열번호 2 참조). 제한효소 (QuickCutTM NdeI, QuickCutTM KpnI)는 Takare (일본)에서 구매하였다. *E. coli* DH5a와 *E. coli* BL21 (DE3)은 RBC (대만)에서 구입하였다. 발현을 위한 벡터로 사용된 pET duet-1는 Novagen (미국)에서 구매하였다.

표 1

[0054]

서열번호	명명	서열	비고
1	cdMGS amino acid sequence	MNIALVAHDQMKNTMVGFCIGYESILKKYGLYATGTTGKRIMDETELNINRLASGPLGGDQQI GSLIVTQEIDLVIFLRDPLTSQAHETDIQALIRLCDVYHVPIATNLASAEIFIKALDRGELSW REVRKSKSQRI	137aa
2	cdMGS nucleotide sequence	ATGAATATAGCATTAGTAGCACATGACCAAATGAAAAACACTATGGTCGGATTTTGTATAGGT TATGAATCAATTTTAAAAAAGTATGGACTATATGCAACTGGAACTACAGGAAAAAGAATAATG GATGAAACTGAATTAAATATAAATAGATTAGCATCTGGTCCTTTAGGTGGAGACCAACAAATA GGTTCTTTAATAGTAACACAAGAAATAGATTTAGTTATTTTTTTAAGAGACCCATTGACATCT CAGGCTCATGAAACAGATATACAAGCGTTAATAAGACTTTGTGATGTTTATCATGTTCCAATA GCTACAAATCTAGCTTCAGCAGAAATATTTATAAAAGCTCTTGATAGAGGAGAACTATCATGG AGAGAAGTTAGAAAAAGCAAAAGTCAACGTATTTAA	414bp

[0056] **실시예 2. 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열 및 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 증폭**

[0057] 메틸글라이옥살 합성효소의 정제를 위하여, 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 3차 구조에 미치는 영향이 적은 폴리펩티드인 스트렙-태그를 메틸글라이옥살 합성효소의 N-말단에 추가한 재조합 단백질의 과발현을 고안하였다.

[0058] 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열을 포함하는 정방향 프라이머를 제작하였다 (서열번호 4). 그 다음, 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5`-말단에 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열이 부착된 폴리뉴클레오타이드를 증폭하였다 (서열번호 6). 서열번호 4 및 6에 포함된 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열은 밑줄로 표시하여 나타내었다.

표 2

[0059]

서열번호	명명	서열목록 (5`- -> 3`-)	비고
3	Strep-tag nucleotide Sequence	TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAA	24bp
4	Primer Forward	ATAAGAAGGAGATATA**CATATG**ACAGTCCTGAAAAGGAGCATCACCGATGTGGAGCCACCCGCA GTTCGAAAAAATGAATATAGCATTAGTAGCACAT	98bp
5	Primer Reverse	TTTCTTTACCAGACTCGAG**GGTACC**TTAAATACGTTGACTTTTGCTTTT	49bp
6	Strep-tag cdMGS nucleotide Sequence	ATGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAATGAATATAGCATTAGTAGCACATGACCAAATGAAAA ACACTATGGTCGGATTTTGTATAGGTTATGAATCAATTTTAAAAAAGTATGGACTATATGCAAC TGGAACTACAGGAAAAAGAATAATGGATGAAACTGAATTAAATATAAATAGATTAGCATCTGGT CCTTTAGGTGGAGACCAACAAATAGGTTCTTTAATAGTAACACAAGAAATAGATTTAGTTATTT TTTTAAGAGACCCATTGACATCTCAGGCTCATGAAACAGATATACAAGCGTTAATAAGACTTTG TGATGTTTATCATGTTCCAATAGCTACAAATCTAGCTTCAGCAGAAATATTTATAAAAGCTCTT GATAGAGGAGAACTATCATGGAGAGAAGTTAGAAAAAGCAAAAGTCAACGTATTTAA	441bp

[0061] **실시예 3. 메틸글라이옥살 합성효소 발현을 위한 벡터의 제조**

[0062] 강력한 T7 프로모터를 포함하는 pET duet-1 벡터를 제한효소 KpnI과 NdeI을 사용하여 절단하였다. 제한자리 중 KpnI과 NdeI의 두 자리가 절단된 pET duet-1 벡터와 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열의 5`-말단에 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열이 부착된 폴리뉴클레오타이드를 인퓨젼 (In-fusion, Takara, 일본)을 이용하여 결합하였다. 이후, 42 ℃에서 2분 동안 열충격을 가하여 *E. coli* DH5a 균주로 형질전환하였다.

[0063] 그 다음, 37 ℃ 조건으로 LB 배지를 첨가하여 1시간 동안 안정화한 후 20 ug/ml의 농도로 암피실린이 첨가된 LB 배지에 도말하였다. *E. coli* DH5a 균주를 37 ℃ 조건의 인큐베이터에서 16시간 배양 후, 얻은 *E. coli* DH5a 균주의 콜로니를 3 ml의 암피실린 (20 ug/ml)이 첨가된 LB 배지에서 전배양하여 재조합 벡터의 추출을 진행하였다. 이후, 염기서열 분석을 통하여 추출한 재조합 벡터를 선별하였다.

[0064] 도 1은 실시예 3에 따라 제작된 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열 및 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터의 개열지도이다.

[0066] **실시예 4. 메틸글라이옥살 합성효소 발현 벡터를 포함하는 대장균 BL 21 균주의 형질 전환 및 선별**

[0067] 스트렙-태그를 코딩하는 염기서열 및 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소를 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 *E. coli* BL21 균주 (RBC, 대만)를 형질전환하였다. 20 ug/ml의 비율로 암피실린이 첨가된 LB 배지에 도말하였다. 37 ℃로 설정한 인큐베이터에서 16시간 동안 배양 후 얻은 콜로니에 정방향 프라이머 (서열번호 4) 및 역방향 프라이머 (서열번호 5)를 이용하여 콜로니 PCR을 진행하였다. 콜로니 PCR 반응액을 전기영동하여 결과를 확인한 후, 형질전환체를 선별하였다.

[0069] **실시예 5. 스트렙-태그가 부착된 메틸글라이옥살 합성효소의 과발현 및 정제**

[0070] 암피실린 100 ug/ml이 첨가된 LB 배지에서 37 ℃로 O.D (600nm) 0.5에 도달할 때까지 형질전환된 *E. coli* BL21를 배양하여, 그 결과를 도 2 및 표 3에 나타내었다.

표 3

[0071]

BSA (ug/ul)	흡광도 (595nm)
1.430	0.492
0.715	0.249
0.358	0.147
0.179	0.068
0.089	0.042
0.045	0.016

[0072] 도 2 및 표 3에서 확인할 수 있듯이, R^3 값은 0.9976이었고 단백질 정량을 위한 표준 검량곡선으로 사용하였다. 그 이후, 80 uM IPTG로 20 ℃, 200 rpm으로 19시간 동안 유도하였다. 배양된 세포를 4000 X g에서 10분 동안 원심 분리한 다음, 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 세포 파쇄를 위한 용액 (50 mM 소듐포스페이트 버퍼, 300 mM 염화나트륨, pH 8, 10 mM 이미다졸)에 부유시킨 다음, 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 총 단백질 추출물을 스트렙-택틴® 레진 (Strep-tactin® resin)에 여과하여 스트렙-태그가 부착된 메틸글라이옥살 합성효소를 정제하였다. 단백질의 순도는 4-12% 트리스 겔 (Bio-Rad, 미국)을 이용한 SDS-PAGE로 측정하였다. 효소의 농도는 Bradford 분석법 (Bradford, 1976)을 이용하여 측정하여 도 3에 나타내었다.

[0073] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소가 대부분 가용할 수 있도록(soluble) 발현되었고 높은 순도로 정제되었다.

[0074] N-말단에 스트렙-태그가 포함된 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 아미노산 서열은 서열번호 7에 나타내었고, 스트렙-태그의 아미노산 서열은 서열번호 8에 나타내었다 (표 4 참조). 서열번호 7에서 스트렙-태그에 해당하는 아미노산 서열은 밑줄로 나타내었다.

표 4

[0075]

서열번호	명명	서열	비고
7	Strep-tag cdMGS amino acid sequence	WSHPQFEKMNIALVAHDQMKNTMVGFCIGYESILKKYGLYATGTTGKRIMDETELNINRLASG PLGGDQQIGSLIVTQEIDLVIFLRDPLTSQAHETDIQALIRLCDVYHVPIATNLASAEIFIKA LDRGELSWREVRKSKSQRI	145aa
8	Strep-tag amino acid sequence	WSHPQFEK	8aa

[0077] **실시예 6. 다양한 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 비활성 (specific activity) 측정**

[0078] **6-1. 메틸글라이옥살 전환속도 측정**

[0079] 효소의 in vitro 활성을 분석하기 위해, 30 ℃에서 전구체인 디히드록시아세톤 인산과 함께 효소 반응을 진행한 후 반응액에 발색단을 가지고 있는 2,4-디니트로페닐히드라진 (Dinitrophenylhydrazine)을 첨가하여 효소 반응으로 제조된 메틸글라이옥살을 유도체화 후 검출하였다.

[0080] 555nm UV 분광광도계를 사용하여 일정시간 동안 메틸글라이옥살의 생산량을 측정하였다. 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소가 디히드록시아세톤 인산을 메틸글라이옥살로 전환하는 속도를 측정하여, 그 결과를 도 4 및 표 5에 나타내었다.

표 5

[0081]

메틸글라이옥살 농도 (mM)	흡광도 (555nm)
1.500	1.956
0.750	0.935
0.375	0.515
0.188	0.322
0.000	0.050

[0082] 도 4 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, R^3 값이 0.9977인 것을 바탕으로 메틸글라이옥살의 생산량을 정량하였다.

[0084] **6-2. 비활성 측정**

[0085] 정제된 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 (*Clostridium difficile*) 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 0.1 ug을 첨가한 40 mM 이미다졸 완충용액 (pH 7.5) 0.44 ml 에 30 mM 디히드록시아세톤 인산 50 ul를 기질로 하여, 30 ℃에서 10분 동안 메틸글라이옥살 합성효소 반응을 진행하였다. 그 비활성 (specific activity)을 측정하여, 그 결과를 도 5 및 표 6에 나타내었다.

표 6

[0086]

다양한 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소	비활성 (mole/min*g-protein)
Bacillus subtilis	0.150
Clostridium difficile (cdMGS)	0.205
Oceanithermus profundus DSM 14977 (opMGS)	0.074
Thermus sp. GH5 (tMGS)	0.015
Deinococcus koreensis (dcMGS)	0

[0087] 도 5 및 표 6에서 확인할 수 있듯이, 데이노코쿠스 코린시스 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (dcMGS)를 제외하고, 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS), 오세아니써무스 프로펀더스 DSM 14977 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (opMGS), 써무스 속 GH5 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (tMGS)는 각각 기질에 대해 비활성을 나타내었다.스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)는 문헌값으로 30 ℃에서 가장 높은 비활성을 갖는 고초균 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (MGS of *Bacillus subtilis*)와 비교하여 약 1.37배 높은 비활성을 갖는 것으로 측정되었다.

[0089] **실시예 7. 스트렙-태그의 부착 위치에 따른 다양한 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 활성 비교**

[0090] 스트렙-태그가 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS), 오세아니써무스 프로펀더스 DSM 14977 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (opMGS), 써무스 속 GH5 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (tMGS), 데이노코쿠스 코린시스 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (dcMGS)의 N-말단 또는 C-말단에 부착되는 경우의 비활성을 각각 비교하였다.

[0091] 정제된 다양한 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 0.5 ug을 첨가한 40 mM 이미다졸 완충용액 (pH 7.5)에서 3 mM 디히드록시아세톤 인산을 기질로 하여 비활성 (specific activity)을 측정하였고 그 결과를 도 6 및 표 7에 나타내었다.

표 7

[0092]

다양한 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소	비활성 (mole/min*g-protein)	
	N-말단	C-말단
Bacillus subtilis	0	0
Clostridium difficile (cdMGS)	0.094793	0.053063
Oceanithermus profundus DSM 14977 (opMGS)	0	0.017314
Thermus sp. GH5 (tMGS)	0.015586	-
Deinococcus koreensis (dcMGS)	0	0
Escherichia coli	0.006283	0.047787

[0093] 도 6 및 표 7에서 확인할 수 있듯이, 스트렙-태그의 위치에 따라 다양한 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소의 비활성이 다르게 측정되었다. 특히, 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)는 C-말단에 스트렙-태그를 부착한 경우에 비하여, N-말단에 스트렙-태그를 부착한 경우의 비활성 (specific activity)은 약 80% 향상됨을 확인하였다.

[0095] **실시예 8. 효소의 pH에 따른 비활성 분석**

[0096] 정제된 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)의 pH 조건에 따른, 비활성을 측정하였다. pH 4 내지 pH 6은 40 mM 숙신산/수산화나트륨 완충용액으로, pH 7은 이미다졸/염산 완충용액으로, pH 8은 트리스(히드록시메틸)아미노메테인 완충용액으로, pH 9는 글라이신/수산화나트륨 완충용액으로 조절하였다. 상기 완충용액으로 pH가 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)의 비활성에 미치는 영향을 조사하여, 그 결과를 도 7 및 표 8에 나타내었다.

표 8

[0097]

pH	비활성 (mole/min*g-protein)
4.000	0.049
5.000	0.139
6.000	0.145
7.000	0.178
8.000	0.024
9.000	0.000

[0098] 도 7 및 표 8에서 확인할 수 있듯이, 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)는 pH 6 내지 7에서 최대 활성을 나타내었다.

[0100] **실시예 9. 효소의 온도에 따른 비활성 분석**

[0101] 반응 용액의 온도는 10 ℃부터 90 ℃까지 나누어, 온도가 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)의 비활성에 미치는 영향을 조사하여, 그 결과를 도 8 및 표 9에 나타내었다.

표 9

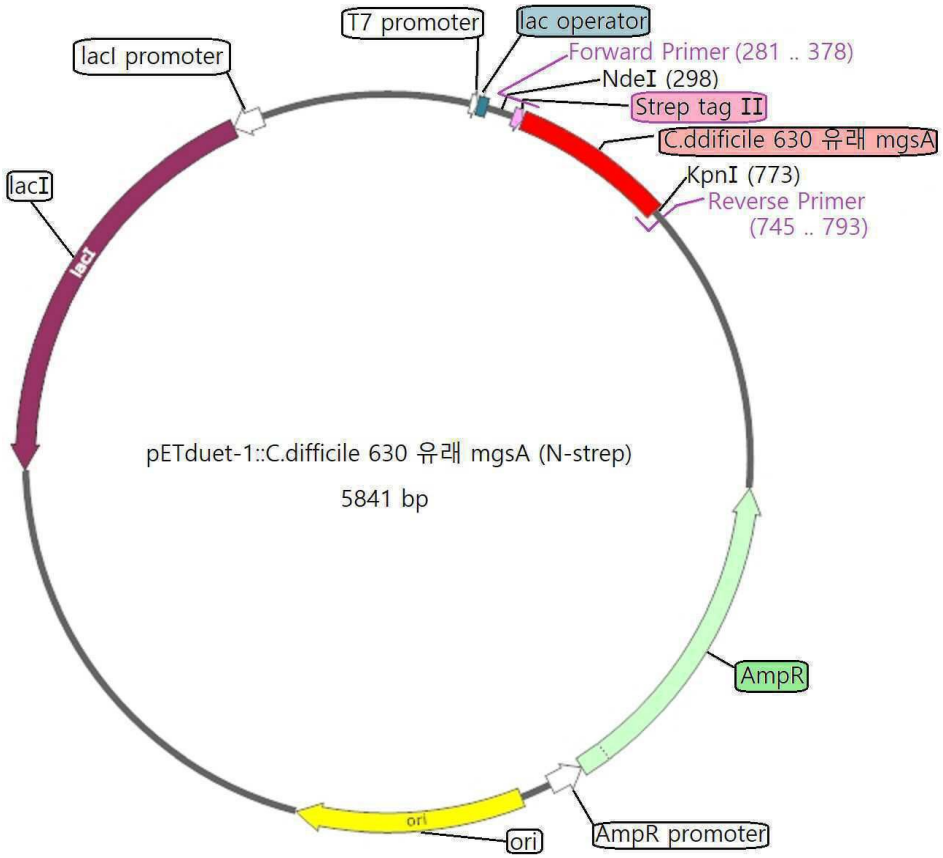
[0102]

온도	비활성 (mole/min*g-protein)
10	0.000
20	0.063
30	0.205
36	0.226
40	0.245
50	0.209
60	0.119
65	0.068
70	0.024
75	0.008
80	0.000
90	0.000

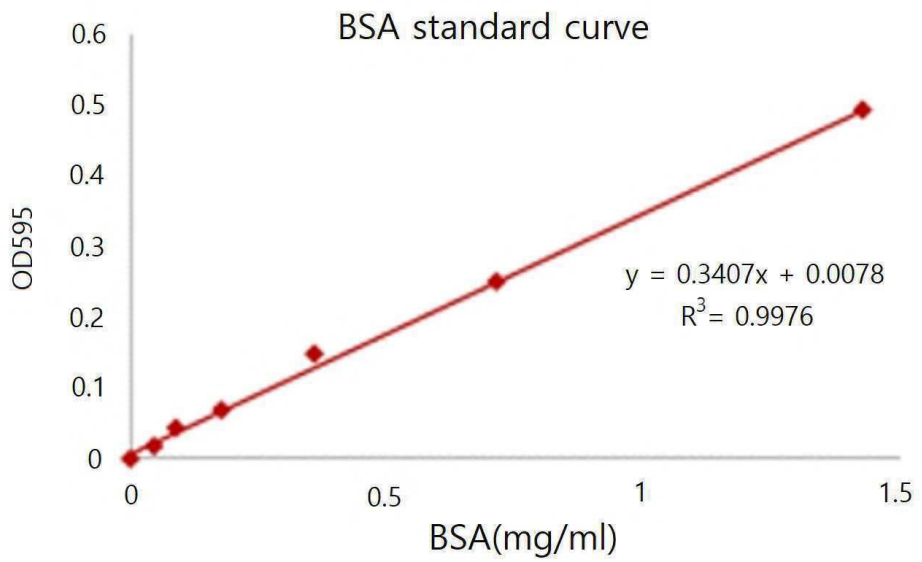
[0103] 도 8 및 표 9에서 확인할 수 있듯이, 스트렙-태그를 포함하는 클로스트리디움 디피실리 630 균주 유래 메틸글라이옥살 합성효소 (cdMGS)는 36 내지 40 ℃에서 최대 활성을 나타내었다.

도면

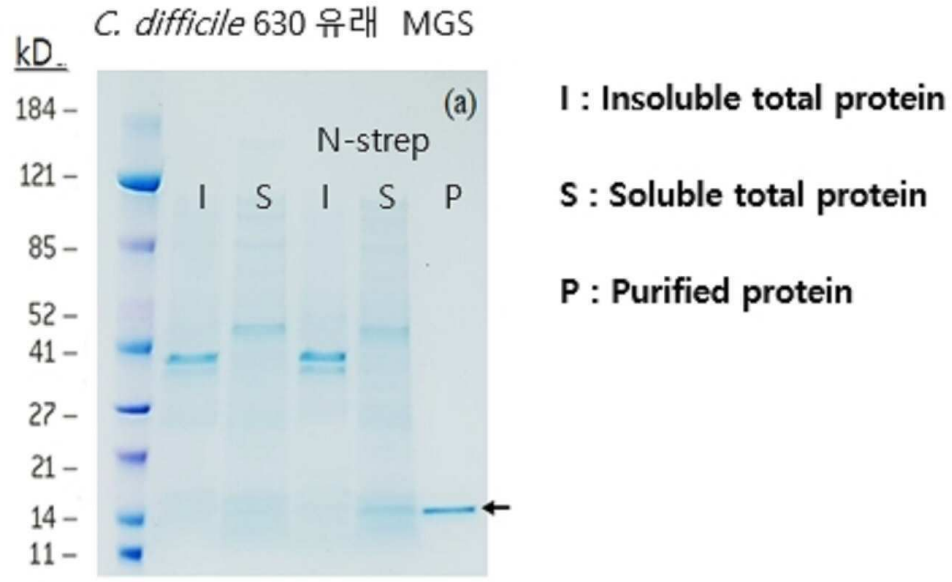
도면1


T7 promoter
lac operator
lacI promoter
Forward Primer (281 .. 378)
NdeI (298)
Strep tag II
C.ddificile 630 유래 mgsA
KpnI (773)
Reverse Primer
(745 .. 793)
lacI
pETduet-1::C.difficile 630 유래 mgsA (N-strep)
5841 bp
AmpR
ori
AmpR promoter

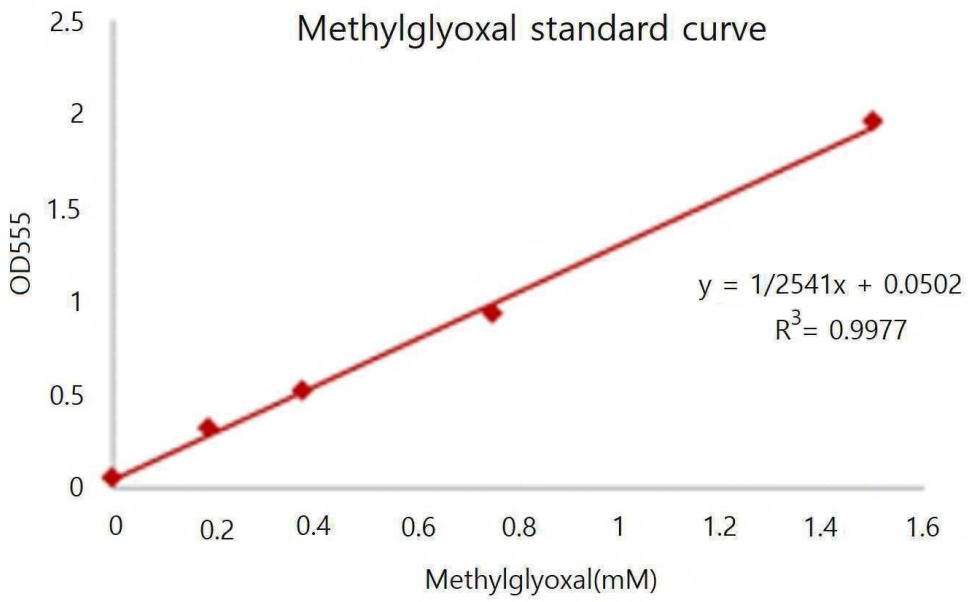
도면2


BSA standard curve
OD595
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
y = 0.3407x + 0.0078
R3= 0.9976
0
0.5
1
1.5
BSA(mg/ml)

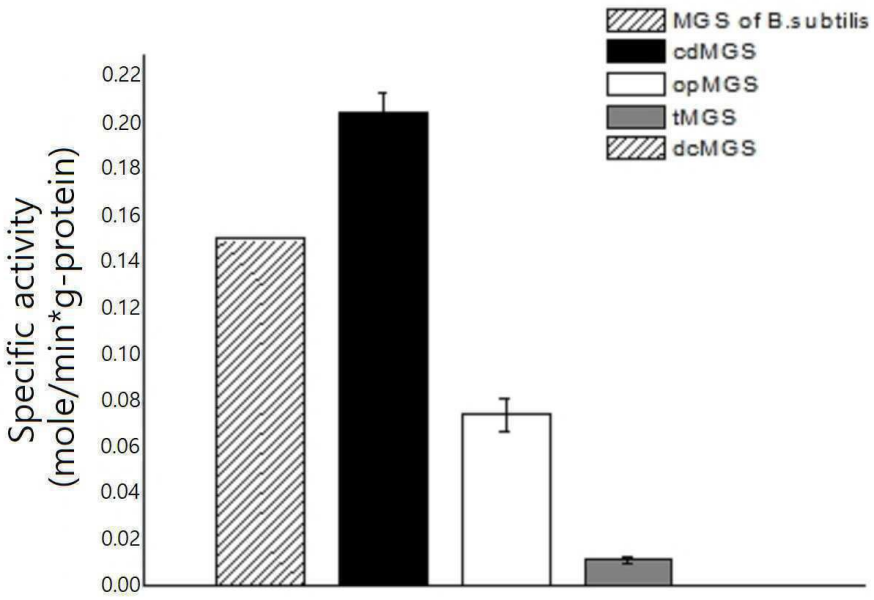
도면3


C. difficile 630 유래 MGS
kD
184
121
85
52
41
27
21
14
11
(a)
N-strep
I
S
I
S
P
I : Insoluble total protein
S : Soluble total protein
P : Purified protein

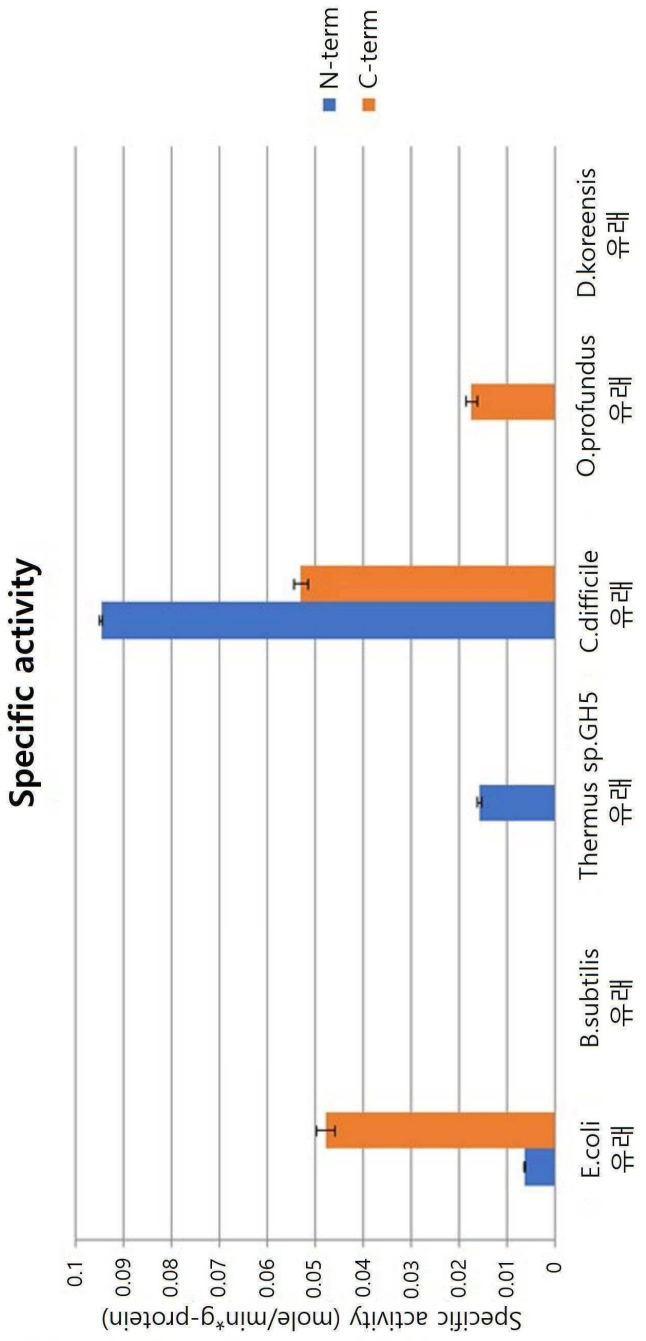
도면4


Methylglyoxal standard curve
OD555
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
Methylglyoxal(mM)
y = 1/2541x + 0.0502
R3= 0.9977

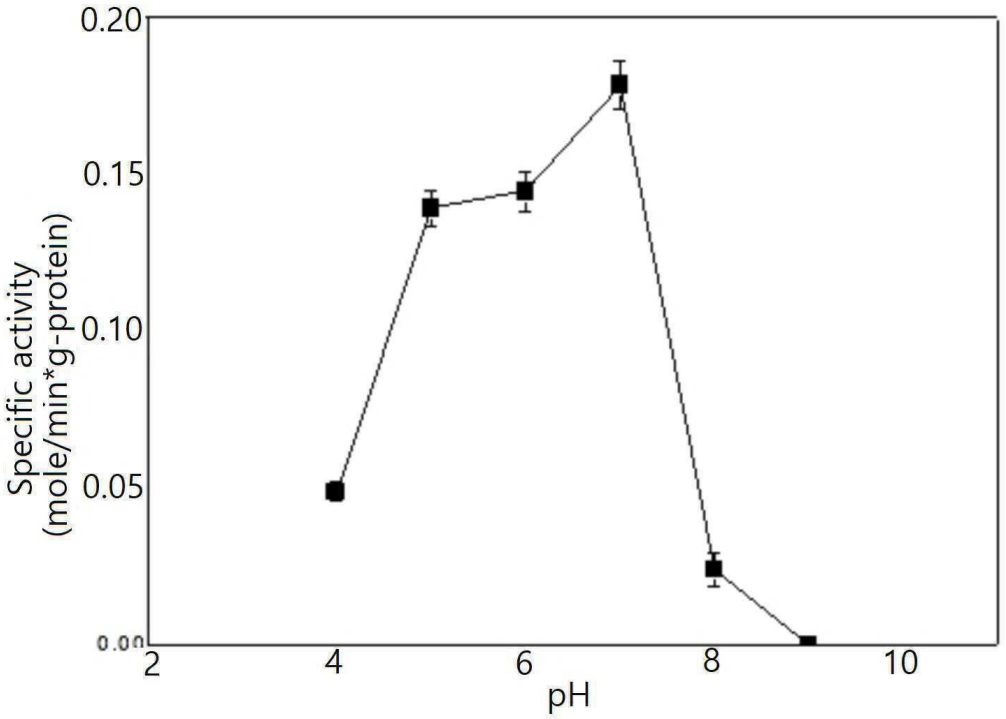
도면5


MGS of B.subtilis
cdMGS
opMGS
tMGS
dcMGS
Specific activity
(mole/min*g-protein)
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00

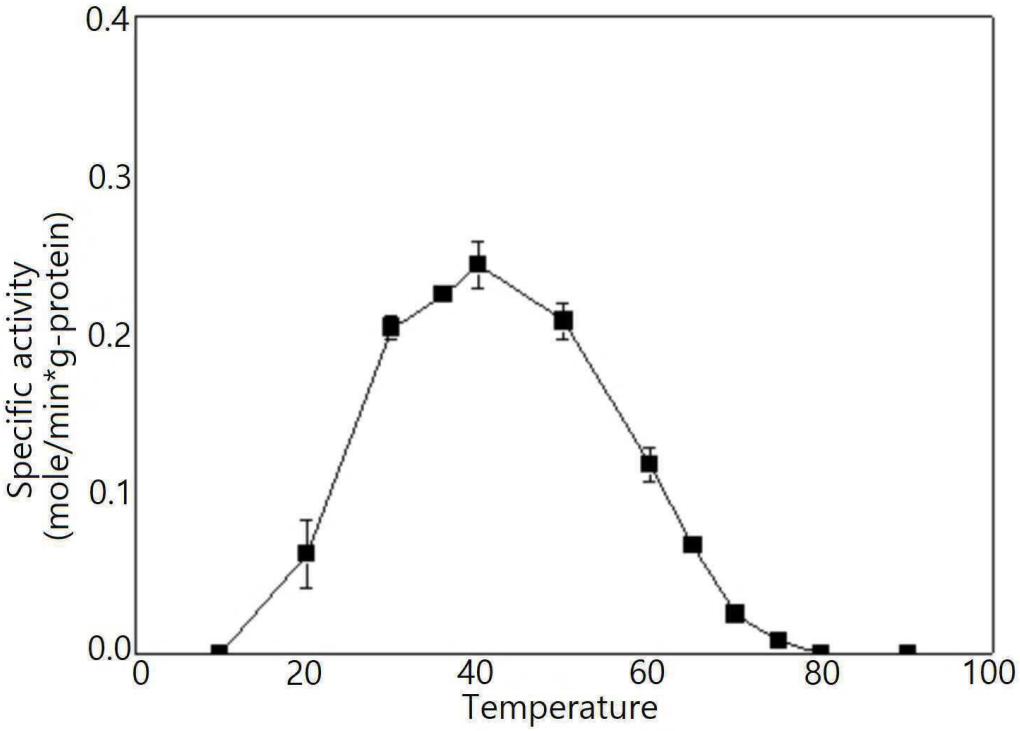
도면6


Specific activity
N-term
C-term
Specific activity (mole/min*g-protein)
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
0.08
0.09
0.1
E.coli 유래
B.subtilis 유래
Thermus sp.GH5 유래
C.difficile 유래
O.profundus 유래
D.koreensis 유래

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Methylglyoxal synthase from Clostridium difficile 630 strain attatched strep-tag, and method for producing methylglyoxal using

thereof

<130> PN200052

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Clostridium difficile 630 methylglyoxal synthase amino acid sequence

<400> 1

Met Asn Ile Ala Leu Val Ala His Asp Gln Met Lys Asn Thr Met Val

1 5 10 15

Gly Phe Cys Ile Gly Tyr Glu Ser Ile Leu Lys Lys Tyr Gly Leu Tyr

20 25 30

Ala Thr Gly Thr Thr Gly Lys Arg Ile Met Asp Glu Thr Glu Leu Asn

35 40 45

Ile Asn Arg Leu Ala Ser Gly Pro Leu Gly Gly Asp Gln Gln Ile Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Leu Thr Ser Gln Ala His Glu Thr Asp Ile Gln Ala Leu Ile Arg

85 90 95

Leu Cys Asp Val Tyr His Val Pro Ile Ala Thr Asn Leu Ala Ser Ala

100 105 110

Glu Ile Phe Ile Lys Ala Leu Asp Arg Gly Glu Leu Ser Trp Arg Glu

115 120 125

Val Arg Lys Ser Lys Ser Gln Arg Ile

130 135

<210> 2

<211> 414

<212> DNA

<213> Unknown

<220

><223> Clostridium difficile 630 methyglyoxal synthase nucleotide sequence

<400> 2

atgaatatag cattagtagc acatgaccaa atgaaaaaca ctatggtcgg attttgtata 60

ggttatgaat caattttaaa aaagtatgga ctatatgcaa ctggaactac aggaaaaaga 120

ataatggatg aaactgaatt aaatataaat agattagcat ctggtccttt aggtggagac 180

caacaaatag gttctttaat agtaacacaa gaaatagatt tagttatttt tttaagagac 240

ccattgacat ctcaggctca tgaaacagat atacaagcgt taataagact ttgtgatgtt 300

tatcatgttc caatagctac aaatctagct tcagcagaaa tatttataaa agctcttgat 360

agaggagaac tatcatggag agaagttaga aaaagcaaaa gtcaacgtat ttaa 414

<210> 3

<211> 441

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Strep-tag amino nucleotide sequence

<400> 3

atgtggagcc acccgcagtt cgaaaaaatg aatatagcat tagtagcaca tgaccaaatg 60

aaaaacacta tggtcggatt ttgtataggt tatgaatcaa ttttaaaaaa gtatggacta 120

tatgcaactg gaactacagg aaaaagaata atggatgaaa ctgaattaaa tataaataga 180

ttagcatctg gtcctttagg tggagaccaa caaataggtt ctttaatagt aacacaagaa 240

atagatttag ttatttttt aagagaccca ttgacatctc aggctcatga aacagatata 300

caagcgttaa taagactttg tgatgtttat catgttccaa tagctacaaa tctagcttca 360

gcagaaatat ttataaaagc tcttgataga ggagaactat catggagaga agttagaaaa 420

agcaaaagtc aacgtattta a 441

<210> 4

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer forward

<400> 4

ataagaagga gatatacata tgacagtcct gaaaaggagc atcaccgatg tggagccacc 60

cgcagttcga aaaaatgaat atagcattag tagcacat 98

<210> 5

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer reverse

<400> 5

tttctttacc agactcgagg gtaccttaaa tacgttgact tttgctttt 49

<210> 6

<211> 441

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Strep-tag Clostridium difficile 630 methylglyoxal synthase nucleotide sequence

<400> 6

atgtggagcc acccgcagtt cgaaaaaatg aatatagcat tagtagcaca tgaccaaatg 60

aaaaacacta tggtcggatt ttgtataggt tatgaatcaa ttttaaaaaa gtatggacta 120

tatgcaactg gaactacagg aaaaagaata atggatgaaa ctgaattaaa tataaataga 180

ttagcatctg gtcctttagg tggagaccaa caaataggtt ctttaatagt aacacaagaa 240

atagatttag ttatttttt aagagaccca ttgacatctc aggctcatga aacagatata 300

caagcgttaa taagactttg tgatgtttat catgttccaa tagctacaaa tctagcttca 360

gcagaaatat ttataaaagc tcttgataga ggagaactat catggagaga agttagaaaa 420

agcaaaagtc aacgtattta a 441

<210> 7

<211> 145

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Strep-tag Clostridium difficile 630 methylglyoxal synthase amino acid sequence

<400> 7

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Met Asn Ile Ala Leu Val Ala His

1 5 10 15

Asp Gln Met Lys Asn Thr Met Val Gly Phe Cys Ile Gly Tyr Glu Ser
20 25 30
Ile Leu Lys Lys Tyr Gly Leu Tyr Ala Thr Gly Thr Thr Gly Lys Arg
35 40 45
Ile Met Asp Glu Thr Glu Leu Asn Ile Asn Arg Leu Ala Ser Gly Pro

50 55 60
Leu Gly Gly Asp Gln Gln Ile Gly Ser Leu Ile Val Thr Gln Glu Ile
65 70 75 80
Asp Leu Val Ile Phe Leu Arg Asp Pro Leu Thr Ser Gln Ala His Glu
85 90 95
Thr Asp Ile Gln Ala Leu Ile Arg Leu Cys Asp Val Tyr His Val Pro
100 105 110
Ile Ala Thr Asn Leu Ala Ser Ala Glu Ile Phe Ile Lys Ala Leu Asp
115 120 125

Arg Gly Glu Leu Ser Trp Arg Glu Val Arg Lys Ser Lys Ser Gln Arg
130 135 140
Ile
145
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> Strep-tag amino acid sequence
<400> 8
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5