



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003674
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 8일 (08.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0050596 2009년 6월 8일 (08.06.2009) KR
10-2009-0130204 2009년 12월 23일 (23.12.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52, 305-333 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이승구 (LEE, Seung Goo) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 109 동 1002 호, 305-707 Daejeon (KR). 나유진

(RHA, Eugene) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 102 동 1005 호, 305-707 Daejeon (KR). 최수림 (CHOI, Su Lim) [KR/KR]; 대전광역시 서구 내동 신성아파트 3 동 202 호, 302-817 Daejeon (KR). 송재준 (SONG, Jae Jun) [KR/KR]; 대전광역시 서구 둔산 2 동 수정타운아파트 18 동 403 호, 302-120 Daejeon (KR). 최중현 (CHOI, Jong Hyun) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 지족동 894-2 가나파로스빌 2 차 605 호, 305-330 Daejeon (KR). 김희식 (KIM, Hee Sik) [KR/KR]; 경기도 화성시 반송동 나루마을신도브래뉴 아파트 620 동 702 호, 445-730 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 역삼빌딩 11 층 5T 국제특허법률사무소, 135-080 Seoul (KR).

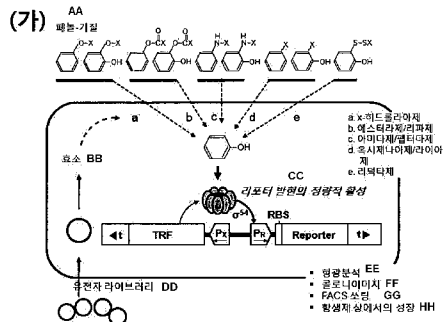
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

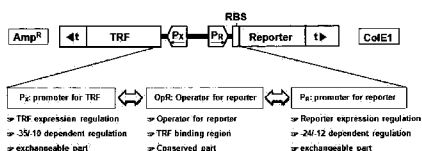
(54) Title: METHOD FOR SCREENING AND QUANTIFYING VARIOUS ENZYME ACTIVITIES USING A GENETIC ENZYME SCREENING SYSTEM

(54) 발명의 명칭: 재설계 유전자 회로를 이용한 다양한 효소 활성의 탐색 및 정량 방법

[Fig. 1]



(4) Genetic Enzyme Screening System



* TRF: transcriptional regulation factor (such as dmpK)
* RBS: ribosome binding site
* P: forward transcriptional terminator
* T: reverse transcriptional terminator

AA ... Phenol-substrate
BB ... Enzyme
CC ... Quantitative activity of reporter expression
DD ... Gene library
EE ... Fluorescence analysis
FF ... Colony image
GG ... FACS sorting
HH ... Growth on antibiotics
a. x-hydrolase
b. esterase/lipase
c. amidase/peptidase
d. oxygenase/lyase
e. reductase

(57) Abstract: The present invention relates to a method for sensing and quantifying a target enzyme activity and to a method for screening for a metagenomic library-derived target enzyme activity on the basis of the same. More particularly, the present invention relates to a method for producing a genetic enzyme screening system (GESS) for sensing phenol-based compounds and sensing and quantifying various enzyme activities using the system, and to a method for screening for a microactivity of the metagenome-derived target enzyme using the genetic enzyme screening system and ensuring a target enzyme gene. In addition, the method for screening and quantifying a target enzyme activity according to the present invention senses useful genes at an ultra high speed (million/day) at a single cell level, from an environment or various gene groups such as a metagenomic library, and quickly senses and quantifies various enzyme activities at a high sensitivity by using a sensitivity to phenol derivatives and expression regulation. Therefore, the method of the present invention is useful in protein engineering technology for improving enzymes. Particularly, the method of the present invention is capable of screening for enzyme activities in a quantitative manner, and thus can be applied to a molecular evolution technology.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2011 년 3 월 3 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2011 년 3 월 3 일 자 공지 참조

본 발명은 목적 효소 활성의 감지 및 정량 방법과 이를 기반으로 하는 메타게놈 라이브러리 유래 목적 효소 활성의 탐색 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로 GESS(genetic enzyme screening system)를 제작하고 이를 이용하여 다양한 효소의 활성을 감지 및 정량하는 방법과 재설계 유전자회로를 이용하여 메타게놈 유래 목적 효소의 미량 활성을 탐색하여, 목적효소 유전자를 확보하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 목적 효소 활성의 탐색 및 정량 방법을 이용하면, 환경이나 메타게놈 라이브러리를 비롯한 다양한 유전자 집단에서 유용 유전자를 단일세포 수준에서 초고속(million/day)으로 감지할 수 있고, 페놀 유도체에 대한 민감도와 발현조절을 이용하여 다양한 효소 활성을 고감도로 빠르게 감지 및 정량할 수 있어, 효소개량을 위한 단백질 공학기술에도 유용하게 사용할 수 있으며, 특히, 효소 활성을 정량적으로 탐색할 수 있어 분자진화기술에 적용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 재설계 유전자 회로를 이용한 다양한 효소 활성의 탐색 및 정량 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 재설계 유전자 회로를 이용한 다양한 효소 활성의 탐색 및 정량 방법과 이를 기반으로 하는 메타게놈 라이브러리 유래 효소활성의 고속탐색 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 폐놀계 화합물을 탐색하는 재설계 유전자회로를 이용하여 다양한 효소의 활성을 감지 및 정량하고 메타게놈 유래의 목적 효소활성을 고속으로 탐색하고 목적효소의 유전자를 확보하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 바이오촉매는 에너지, 산업원료의 청정생산기술 등 “지속가능한 경제개발”의 핵심소재로 인식되고 있으며, 새로운 화학반응, 특이성, 안정성을 갖는 효소의 탐색을 위한 노력이 다양하게 전개되고 있다. 그동안 항생제저항성 유전자, 생장 필수효소, 몇몇 산업용 효소(아밀라아제, 리파아제, 프로티아제) 등을 고체배지에서 고속으로 탐색하는 방법이 알려져 있으나, 대부분의 효소기능은 시간과 많은 비용을 요하는 개별적 활성분석기술에 의존하고 있는 형편이다.
- [4] 최근 미생물 유전체 혹은 메타게놈(metagenome)으로부터 새로운 유전자원을 확보하거나, 기존 유전자의 활성을 개량하여 유용성이 높은 바이오촉매로 발전시키기 위하여 방향성 분자진화기술(directed evolution)을 적용하는 연구가 바이오산업기술의 중요 전략으로 부각되고 있으며, 이에 따라 극미량의 효소활성을 고속으로 감지하는 새로운 고감도 탐지기술의 개발이 필요해지고 있다.
- [5] 미생물유전체, 환경DNA(메타게놈) 등 다양한 유전자원에서 새로운 효소유전자를 획득하는 방법으로는 먼저 DNA염기서열을 파악하여 PCR반응을 수행하고, 증폭된 유전자를 획득하는 시퀀스기반 탐색기술(sequence-based screening)이 있다. 이 방법은 유전체정보가 급증함에 따라서 활용성이 나날이 높아지고 있고, 원하는 유전자만 특이적으로 선별해 낼 수 있는 장점이 있지만, 목적 유전자의 염기서열에 대한 정확한 정보를 알고 있는 경우에만 사용이 가능하므로, 적용할 수 있는 대상이 유전자원의 일부로 국한되는 단점이 있다.
- [6] 이에 반하여 유전자 기능, 즉 효소활성에 기초하여 유전자를 선별하는 활성기반 감지기술(function-based screening)도 널리 이용 된다. 이 방법에 의한 효소활성의 탐색에는 토양, 하천, 공장폐수, 해수, 산림 등지의 환경시료에서 직접 미생물을 분리하는 방법이 주로 이용되어 왔으나, 실제 실험실에서 배양 가능한 미생물종은 자연계에 존재하는 미생물의 1% 미만으로 매우 적은 양에

불과하다. 최근에는 미생물을 배양하지 않고 환경시료에서 직접 DNA를 분리하여 메타게놈 라이브러리의 형태로 유전자원을 구축하는 전략이 활발히 시도되고 있다. 이에 따라 메타게놈 라이브러리에서 산업적으로 유용한 효소활성을 직접적으로 감지하려는 탐색기술의 개발에 대한 관심도 매우 높아지고 있다.

- [7] 한편 효소활성의 고속분석기술에는 1) 웰플레이트(wellplate)를 이용하는 자동화 다중분석기술 2) 고체배지에서 발색 혹은 투명환(halo)을 관찰하는 방법 3) 영양결핍 미생물을 이용하는 선택분리법이 주로 이용된다. 이들 방법은 효소의 실제적 활성화에 근거하기 때문에 목적기능의 유전자를 명확하게 선별해 내는 장점이 있으나, 개별 효소활성에 부합하는 하나하나의 감지기술이 필요하므로 기술의 범용성에서 제약이 따르게 된다. 더구나 숙주세포에서 외래 유전자의 전사나 해독, 발현이 낮거나 단백질 접힘, 분비 등의 문제가 있는 경우에는 효과가 더욱 감소하게 된다. 실제로 신규 미생물유전체, 메타게놈 등 유전적 다양성이 높고, 유전자특성이 알려지지 않은 유전자원으로부터 유래하는 신규효소의 경우, 재조합 미생물에서의 발현수준이 매우 낮으므로 위 고속분석법을 적용하기가 매우 어려워진다. 이에 따라 극미량 발현되는 효소의 활성조차도 고감도로 감지할 수 있는 새로운 고속탐색원리의 도출이 지속적으로 요구되어 왔다.
- [8] 이러한 맥락에서 이스트 3-하이브리드의 전사활성화 원리를 적용하여, 세포내 프로티아제 등 효소활성을 유전공학적인 기술로 감지하는 재설계 유전자 회로(genetic circuitry)에 대한 연구가 발표되어 주목을 받았다. 또한 미생물 대사경로를 재설계하여, 외래 효소작용의 산물이 세포에 영양원으로 이용되도록 하여 효소활성을 탐지하거나, 재조합 대장균에 다른 미생물유래의 전사조절 단백질을 도입하여 외래유전자의 효소활성을 재조합 대장균에서 감지하는 기술도 활발하게 연구되고 있다. 이에 더하여, 조절단백질의 기질특이성을 개량하기 위한 단백질공학기술의 개발노력도 활발하다. 예를 들어 2-hydroxybiphenyl(2-HBP)에 결합하는 조절단백질 HbpR을 개량하여 수산기(hydroxy-) 대신에 염소기(chloro-)를 갖는 2-chlorobiphenyl(2-CBP)를 특이적으로 인식하도록 기질특이성을 개량하는 연구도 있었다(Beggah *et al.*, (2008) *Microb. Biotechnol.* 1(1): 68-78).
- [9] 따라서 조절단백질을 이용하여 효소반응의 산물을 감지하면 새로운 효소를 탐색하는 새로운 혁신기술로 이용할 수 있으나, 이러한 기술들은 기질-산물 및 조절단백질의 특이성이 명시된 소수의 특이적 효소활성에 대한 탐색기술에 그치고 있으며 다양한 효소활성에 적용할 수 있는 보편적 시스템이 될 수 없는 제약이 따른다.
- [10] 또 다른 신규효소의 탐색기술로는 2005년에 Watanabe 연구 그룹이 보고한 SIGEX(substrate-induced gene expression screening)를 들 수 있다. 이 기술은 첨가된 기질에 의하여 전사활성이 유도되는 프로모터를 검색하는 원리이므로

직접적인 효소활성 검색이 아닌 간접적 유전자 감지기술이라는 차이가 있다. 즉 전사활성화와 관련되지 않은 효소기능은 이 방법에 의하여서는 감지되지 않는다. 이 기술에는 FACS를 분석에 이용할 수 있기 때문에 대량의 시료를 단시간에 처리할 수 있는 장점이 있지만, 20 ~ 30 kb의 큰 유전자를 포함하는 메타게놈 라이브러리에서는 적용하기 어렵고, 라이브러리의 유전자 방향에 따라 GFP활성반응이 나타나지 않을 수도 있다(Uchiyama *et al.*, (2005) *Nat. Biotech.* 23: 88-93).

- [11] 한편, 페놀계 화합물을 검출하는 기술에 관한 연구는 진행되고 있으나 (대한민국등록특허 10-0464068호), 이를 이용하여 다양한 효소 활성의 탐색에 적용하는 연구는 이제까지 없었다.
- [12] 본 발명자들은 다양한 여러 효소의 활성을 탐색할 수 있는 방법에 대해 연구한 결과, 많은 효소 반응에서 페놀을 유리할 수 있는 다양한 페놀 방출 화합물이 기질로 사용되고 있는 점에 착안하여, 페놀류를 감지하는 재설계 유전자회로를 제작하고, 이를 이용하여 발현이 유도된 형광, 항생제 저항성 등 리포터의 정량적 활성을 측정할 수 있음을 확인하고, 이를 이용한 유전자회로의 고속탐색(million/day)을 통하여 메타게놈 라이브러리에서 티로신페놀리아제, 알칼린 포스파타아제의 효소활성을 보유한 유전자를 회수 및 분리함으로써 본 기술의 유효성 및 범용성을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[13]

[14] 발명의 요약

- [15] 본 발명의 일 목적은, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로 제공하거나, 이러한 유전자 회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 감지하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법을 제공하는데 있다.

- [16] 본 발명의 다른 목적은, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자

및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하거나, 이러한 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량 방법을 제공하는데 있다.

- [17] 본 발명의 다른 목적은, (a) 자연환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계; (b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자, (ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하거나, 이러한 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (c) 상기 메타게놈 라이브러리와 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 도입하여 형질전환된 미생물 라이브러리를 제작하는 단계; (d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리에, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및 (f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계를 포함하는 메타게놈 라이브러리 유래 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 목적효소의 탐색 방법을 제공하는데 있다.

- [18] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이

결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 감지하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하는 미생물에 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 감지하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합

미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량 방법을 제공한다.

- [21] 본 발명은 또한, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하는 미생물에 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량 방법을 제공한다.

- [22] 본 발명은 또한, (a) 자연환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계; (b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자, (ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계; (c) 상기 메타게놈 라이브러리와 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 도입하여 형질전환된 미생물 라이브러리를 제작하는 단계; (d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리에, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및 (f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계를 포함하는 메타게놈 라이브러리 유래 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 목적효소의 탐색 방법을 제공한다.

- [23] 본 발명은 또한, (a) 환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계; (b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자, (ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (c) 상기 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물에 상기 메타게놈 라이브러리를 도입하여 재조합 미생물 라이브러리를 제조하는 단계; (d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리를, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및 (f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계를 포함하는 메타게놈 라이브러리 유래, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 목적효소의 탐색 방법을 제공한다.

[24]

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 (가)는 본 발명에 따른 재설계 유전자회로를 이용하여 다양한 형태의 효소활성을 감지하는 원리 (GESS : genetic enzyme screening system)를 나타낸 것이고, (나)는 본 발명에 따른 재설계 유전자회로에 따른 GESS vector(pGESS)를 개략적으로 나타낸 것이고, 그 중 유전자 발현 조절 부위를 확대하여 그 구조를 나타낸 그림이다 (TRF: 전사조절인자(transcriptional regulation factor)로써, 본 발명에 따른 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 의미하는 것; OpR: 상기 TRF인 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질 결합하여 하류의 리포터 유전자 발현을 유도하는 부위, Px: 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절단백질의 발현을 조절하는 프로모터; PR은 리포터의 발현을 조절하는 프로모터).
- [26] 도 2는 형광단백질 또는 항생제 저항 단백질 리포터를 사용하고 있는 유전자회로를 이용하여 메타게놈 라이브러리의 고속탐색에 이용하고 있는 모식도로, (가)는 형광단백질 리포터를 사용한 메타게놈 라이브러리의 고속탐색을 나타내는 그림이고, (나)는 항생제저항단백질 리포터를 사용한 메타게놈 라이브러리의 고속탐색을 나타내는 그림이다.
- [27] 도 3은 선별된 균주로부터 재설계 유전자회로를 제거하고 유용 유전자를 포함하고 있는 순수한 포스미드벡터 회수하는 방법에 관하여 설명하고 있는

그럼으로, (가)는 제한효소를 처리하여 회수하는 방법을 나타내는 그림이고, (나)는 재설계 유전자회로가 염색체에 도입된 미생물을 사용하는 방법을 나타내는 그림이고, (다)는 재설계 유전자회로에 자살유전자(suicide gene)를 도입시켜 제거(curing)과정을 거쳐 회수하는 방법을 나타내는 그림이다.

- [28] 도 4는 GESS(genetic enzyme screening system)를 이용하여 메타게놈 라이브러리에서 효소활성 유전자를 고속탐색하는 방법을 나타내고 있다.
- [29] 도 5는 형광단백질(EGFP)를 리포터로 사용하고 있는 pGESS-EGFP(I)의 구축과정을 나타내고 있다.
- [30] 도 6은 형광단백질(EGFP)를 리포터로 사용하고 있으며 T7 RBS와 전사종결인자를 유전자회로에 도입한 pGESS-EGFP(II)의 구축과정을 나타내고 있다.
- [31] 도 7은 항생제(클로람페니콜, 테트라사이클린, 카나마이신)내성 단백질을 리포터로 사용하고 있는 pGESS-Cm(II), pGESS-Tc(II), pGESS-Km(II)의 구축과정을 나타내고 있다.
- [32] 도 8은 pGESS-EGFP(II)의 *dmpR* 대신 mutant *dmpR*(E135K)로 치환된 pGESS-EGFP(III)의 구축과정을 나타내고 있다.
- [33] 도 9는 GESS 시스템에 최적인 숙주 대장균을 구축하기 다양한 대장균 균주(DH5a, EPI300, JM109(DE3), BL21, BL21(DE3))에서의 pGESS의 반응을 조사한 결과로서, (가)는 페놀이 포함된 고체배지에서 형광발현정도를 조사한 그림이고, (나)는 페놀이 포함된 액체배지에서 형광발현정도를 조사한 그림이다. (다)는 세포성장에 따른 페놀첨가시기의 영향을 조사한 그림이다.
- [34] 도 10은 pGESS-EGFP의 페놀에 대한 정량성을 검증한 결과로서 (가)는 고체배지에서 페놀농도의 증가에 의존적으로 형광세기가 증가되는 것을 확인한 그림이며, (나)는 액체배지에서 동일한 결과를 확인한 그림이다. (다)는 FACS를 이용하여 pGESS의 페놀 의존성을 확인한 그림이고, (라)는 항생제내성 단백질을 리포터로 사용하고 있는 pGESS의 페놀의존성을 콜로니 생성수에 의하여 확인한 그림이다.
- [35] 도 11은 pGESS의 다양한 페놀류에 대한 정량적 감지능을 실험한 결과로서, (가)는 형광단백질을 리포터로 사용했을 경우에 반응을 확인한 그림이고, (나)는 콜로람페니콜에 대한 내성 단백질을 리포터로 사용하고 있는 경우에 반응을 확인한 그림이다. (다)는 실험에 사용된 페놀류에 대한 정보를 나타낸 그림이다.
- [36] 도 12는 다양한 페놀류에 대하여 농도별 정량적 반응성을 확인한 결과로서, (가)는 형광단백질을 리포터로 사용했을 경우에 반응을 확인한 그림이고, (나)는 항생제내성 단백질을 리포터로 사용했을 경우에 반응을 확인한 그림이다.
- [37] 도 13은 pGESS를 이용하여 폐수의 페놀함량을 조사한 결과로서, (가)는 pGESS를 이용하여 폐수를 측정한 그림이고, (나)는 페놀에 대한 pGESS의 반응을 확인한 그림이다. (다)는 폐수의 GC/MASS의 분석 결과를 나타낸 그림이다.

- [38] 도 14는 pGESS를 이용하여 다양한 효소의 활성을 탐지한 결과로써, (가)는 대장균 유래의 β -galactosidase의 효소활성을 탐지한 그림이고, (나)는 *Citrobacter freundii* 유래의 tyrosine-phenol lyase의 효소활성을 탐지한 그림이고, (다)는 *Pseudomonas* sp. 유래의 methyl parathion hydrolase의 효소활성을 탐지한 그림이다.
- [39] 도 15는 다양한 리포터를 사용하여 tyrosine-phenol lyase의 활성을 탐지한 결과로서, (가)는 형광리포터를 사용하였을 경우 고체배지에서 TPL의 활성을 탐지한 그림이고, (나)는 형광리포터를 사용하였을 경우 액체배지에서 TPL의 활성을 탐지한 그림이다. (다)는 항생제(테트라사이클린) 내성 단백질을 사용하였을 경우 TPL의 활성을 탐지한 그림이다.
- [40] 도 16은 pGESS를 이용하여 효소의 활성차이를 정량적으로 측정한 결과로서, (가)는 *Citrobacter freundii*의 유래의 TPL과 *Symbiobacterium toebii* 유래의 TPL의 효소활성을 pGESS를 이용하여 측정한 그림이고, (나)는 동일 균주를 효소반응 진행후 HPLC를 이용하여 생성된 페놀을 측정한 그림이다.
- [41] 도 17은 pGESS의 페놀감지능을 향상시키기 위해 배지성분의 영향을 조사한 결과로서, (가)는 LB, M9배지에서의 성장속도의 차이를 보여주는 그림이고, (나)는 재설계 유전자회로의 반응성 차이를 보여주는 그림이다.
- [42] 도 18은 pGESS의 페놀감지능을 향상시키기 위해 M9배지의 탄소원의 영향을 조사한 결과로서, (가)는 글루코오즈, 글리세롤, 석시네이트, 아세테이트의 탄소원에 따른 성장속도의 차이를 보여주는 그림이고, (나)는 재설계 유전자회로의 반응성 차이를 보여주는 그림이다.
- [43] 도 19는 효소활성 측정시 세포생장단계-유전자회로 활성화단계의 분리화를 시도하여 효소활성 감지반응의 최적화를 시도한 결과로서, (가)는 LB배지를 사용하여 라이브러리를 배양시키고 각 성장단계에서 활성화단계로 이동해야 할 시점을 조사한 그림이고, (나)는 세포생장단계를 거친 후 유전자회로의 활성화가 최대가 될 때까지 소요되는 시간을 조사한 그림이다. (다)는 유전자회로 활성화단계의 분리화를 시도하여 페놀에 대한 감도가 향상된 것을 FACS로 확인한 그림이며, (라)는 페놀에 대한 유전자회로의 감도를 정량화 그래프로 나타낸 그림이다.
- [44] 도 20은 유전자회로의 개량을 통해서 페놀 민감도 및 인식특이성을 개선한 결과로서, (가)는 pGESS-EGFP(II) 및 pGESS-EGFP(III)의 페놀에 대한 민감도 향상을 확인한 그림이고, (나)는 pGESS-EGFP(III)의 페놀외에 2-니트로페놀, 4-니트로페놀에 대한 인식특이성 향상을 확인한 결과이다.
- [45] 도 21은 GESS 시스템을 이용하여 시트로박터 프레운디 유래 게놈라이브러리에서 티로신페놀리아제를 고속탐색한 결과로서, (가)는 티로신이 포함되어 있는 고체배지에서 라이브러리를 도말한 후 유전자회로의 반응(형광)이 나타나는 콜로니를 선별하고 있는 그림이고, (나)는 중합효소연쇄반응을 통하여 선별된 콜로니들 내에 티로신페놀리아제의

유전자가 포함되어 있는지 확인한 그림이다.

- [46] 도 22는 메타게놈유래 포스미드 라이브러리를 구축한 결과로서, (가)는 미생물 군집에서 유전자를 추출하여 메타게놈 라이브러리를 제작하는 방법을 나타내는 그림이고, (나)는 메타게놈 라이브러리에 제한효소처리를 하여 포스미드벡터에 삽입된 유전자의 크기를 확인한 그림이다.
- [47] 도 23은 GESS 시스템을 이용하여 메타게놈유래 라이브러리에서 알칼린 포스파타아제를 고속탐색하는 과정을 나타낸 그림이다.
- [48] 도 24는 신규 알칼린 포스파타아제의 아미노산서열을 기반으로 하여 blast 검색후 상동성이 높은 서열들을 디스턴스 트리(distance tree)로 나타낸 그림이다 (Pho [KRIBB] : 본 발명에 따라 탐색된 신규 알칼린 포스파타아제).
- [49] 도 25는 신규 알칼린 포스파타아제의 pH 및 온도별 특성을 조사한 결과로서, (가)는 활성이 가장 높은 최적 pH를 조사한 그림이고, (나)는 활성이 가장 높은 최적 온도를 조사한 그림이고, (다)는 열에 의한 효소의 불활성화 정도를 조사한 그림이다.

[50]

[51] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[52] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[53] 본 발명은 재설계 유전자회로를 이용하여 다양한 효소 활성을 고감도로 고속탐색하는 기술(GESS : genetic enzyme screening system)에 관한 것이다.

[54] 페놀은 석유, 석탄, 리그닌 등 다양한 탄화수소 자원에 다양하게 포함되어 있을 뿐만 아니라, 인공적으로 합성된 화합물에도 광범위하게 포함되어 있다. 따라서 반응기질 혹은 산물로서 페놀잔기를 포함하는 효소반응도 매우 다양한데, 예를 들어 광범위한 종류의 효소관련 정보를 제공하는 브렌다 데이터베이스(www.brenda-enzymes.info)에 등록된 40,000종의 효소반응에서 페놀화합물을 유리하는 효소 종은 검색결과 2,000종 (전체 리스트의 약 5%)에 달하였다. 본 발명은, 페놀기를 결합시킨 다양한 화합물을 합성기질로 이용하여 효소반응을 수행하고, 유리된 페놀을 유전공학적으로 감지하는 기술에 대한 것이므로, 매우 다양한 효소반응에 일반적으로 적용할 수 있는 범용적인 효소탐색기술이라는 점에서 특징이 있다. 특히, 니트로페놀화합물(o/p-nitrophenol)은 다른 유기물과 결합한 상태에서는 무색이지만, 기질로부터 유리된 니트로페놀은 노랑으로 발색하게 되므로, 다양한 가수분해효소의 활성을 신속하게 측정하기 위한 다양한 합성기질이 개발되어 있다. 예를 들면 Sigma-Aldrich에서만 해도 약 500종의 니트로페닐화합물이 시판되고 있다. 그러나 이 물질은 자체흡광도가 낮고 세포벽을 통하여 쉽게 확산되므로, 여러 세포의 반응물이 서로 섞이게 되어

- 세포별 혹은 콜로니별 활성특징을 감지하는 방법으로는 적당하지 않다.
- [55] 페놀물질은 또한, 대장균 세포내에서 쉽게 분해되지 않으므로, 효소반응에 의하여 생성된 미량의 반응산물일지라도 고감도감지가 가능하다. 이러한 성질은 분해되지 않는 물질인 IPTG(isopropylthiogalactoside)를 락토오스 프로모터의 발현유도물질로 사용하는 경우에, 소량의 IPTG로도 강한 유도효과를 나타내게 되는 것과도 일맥상통한다. 최근에는 리포터 단백질의 세포 내 안정성을 조절하여 프로모터의 민감도 및 정량범위를 조절하는 연구결과도 보고된 바 있다(Neuenschwander *et al.*, (2007) *Nat. Biotech.* 25(10): 1145-1147). 페놀은 유도체에 따라서는 세포독성을 나타내기도 하지만, 많은 경우 약 100 ppm까지도 대장균 성장에 큰 영향을 미치지 않았다.
- [56] 이렇듯, 페놀의 경우는, 대장균 세포내에서 쉽게 분해되지 않으므로 효소반응에 의해 생성된 미량의 반응산물이라도 고감도 감지가 가능하며, 효소반응에서 페놀을 유리할 수 있는 다양한 페놀 방출 화합물을 기질로 사용할 수 있다는 점을 본 발명자들은 착안하여, 페놀류를 감지하는 재설계 유전자회로를 디자인하고 이를 도입한 재조합 미생물에 목적에 맞는 페놀기 함유기질을 첨가하여 효소 유전자의 기능에 따라 생성되는 페놀을 감지하여 발현이 유도된 형광, 항생제 저항성 등 리포터의 정량적 활성을 측정함으로써 효소활성을 감지 및 정량하는 방법을 완성한 것이다.
- [57] 본 발명은, 일 관점에서, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법에 관한 것이다.
- [58] 여기서, 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로가 도입된 재조합 미생물을 제조하는 단계는, 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하고 있는 미생물을 제공하여, 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 도입함으로써 제조할 수 있다.
- [59] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계

화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하는 미생물에 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법에 관한 것이다.

[60] 상기 (a) 단계에서, 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로는 미생물에 플라스미드를 이용하여 세포질에 함유되거나, 염색체 DNA에 삽입되어 있을 수 있다.

[61] 본 발명은, 다른 관점에서, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량 방법에 관한 것이다.

[62] 본 발명은, 또 다른 관점에서, (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의

발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 폐놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계; (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 상기 폐놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하는 미생물에 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계; (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 폐놀계 화합물을 유리할 수 있는 폐놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및 (e) 효소반응에 의해 유리된 폐놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량 방법에 관한 것이다.

- [63] 또한, 본 발명은 메타게놈 라이브러리 유래 효소활성의 탐색방법에 관한 것으로, 구체적으로, 메타게놈 라이브러리 유래, 효소반응에 의해 폐놀계 화합물을 유리할 수 있는 목적효소의 탐색 방법에 관한 것이다.
- [64] 본 발명에서 “메타게놈(metagenome)”은 Handelsman 등에 의해 “특정 자연환경에 존재하는 모든 미생물의 유전체 집합”으로 정의되고 있다(Handelsman *et al.*, (1998) *Chem. Biol.* 5: R245-R249). 그러나, 최근에는 환경시료로부터 추출한 유전체 또는 유전자를 포함하는 클론을 총칭하는 용어이며, 이러한 메타게놈과 관련된 일련의 연구를 메타게노믹스라고 부르기도 한다. 관련 연구로는, Venter 등(Venter *et al.*, (2004) *Science* 304: 66-74)은 미국 에너지성(DOE)의 지원을 통해 생태계 시퀀싱(ecosystem sequencing)이라는 새로운 개념의 연구를 시작하여 버뮤다 해역으로부터 채취한 해수시료로부터 제작한 메타게놈 라이브러리에 샷건 시퀀싱(whole-genome shotgun sequencing)을 적용하여 약 10억개의 염기서열을 결정하였다. 염기서열 분석을 통해 채취한 해수시료에는 이전에 알려지지 않은 148개의 phylotype 세균을 포함하여 최소 1800종의 미생물 게놈(genomic species)이 복합되어 있었고 120만개 이상의 새로운 유전자가 발견되었다. 메타게놈 연구는 난배양성 또는 배양 불가능 미생물을 활용하기 위한 목적에 잘 부합하는 것으로 배양에 의한 순수분리가 불가능하다면 특정 환경내의 모든 DNA를 추출함으로써 분자생물학적으로 접근하고자 하는 방법이라 할 수 있다.
- [65] 이러한 환경 유래 메타게놈 라이브러리는 토양 유래, 또는 해수 유래 등의 다양한 환경 유래의 유전자 집단으로, 공지된 여하한 방법에 의해 제작될 수 있다.
- [66] 본 발명에서, 메타게놈 라이브러리는 자연 또는 특정 지역(온천, 농장, 퇴비, 유류오염토양)에 있는 미생물 군집을 채취하고 유전체를 직접 추출하여 벡터에 도입시킴으로써 이루어진다. 벡터는 사용자의 목적에 따라 플라스미드, 포스미드(fosmid), 코스미드(cosmid), BAC(bacterial artificial chromosome), YAC(yeast artificial chromosome) 등이 사용될 수 있다. 플라스미드의 경우

발현정도 및 벡터구성을 사용자의 의도대로 구성이 가능하므로 발현을 최적화시킬 수 있는 장점이 있으나, 작은 크기(~ 10 kb)의 유전자가 도입되므로 오페론단위의 유전자 회수는 불가한 단점이 있다. 37 ~ 52 kb 크기의 유전자의 도입은 포스미드(fosmid), 코스미드(cosmid)등을 사용할 수 있다. 특히, 포스미드벡터는 형질전환 효율이 높아 자주 사용되고 있다. BAC은 큰 크기(150 ~ 350 kb)의 유전자도입이 가능하여 인간게놈프로젝트 및 쥐와 비의 게놈분석에 이용되고 있다.

- [67] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계; (b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자, (ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계; (c) 상기 메타게놈 라이브러리와 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 도입하여 형질전환된 미생물 라이브러리를 제작하는 단계; (d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리를 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및 (f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계를 포함하는 메타게놈 라이브러리 유래 목적효소의 탐색 방법에 관한 것이다.

- [68] 여기서, 상기 메타게놈 라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로가 도입된 재조합 미생물 라이브러리를 제조하는 단계는, 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하고 있는 미생물들을 제공하여, 상기 메타게놈 라이브러리를 도입함으로써 제조할 수 있다.

- [69] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계; (b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자, (ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계; (c) 상기 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물에 상기 메타게놈 라이브러리를

도입하여 재조합 미생물 라이브러리를 제조하는 단계; (d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리를 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및 (f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계를 포함하는 메타게놈 라이브러리 유래 목적효소의 탐색 방법에 관한 것이다.

[70] 상기 (a)단계에서, 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로는 미생물에 플라스미드를 이용하여 세포질에 함유되거나, 염색체 DNA에 삽입되어 있을 수 있다.

[71] 본 발명의 방법에 따라 페놀류를 감지하는 유전자회로를 제작하고, 환경 유래 메타게놈 라이브러리를 구축하여 이를 적합한 미생물에 순차적 또는 동시적으로 형질전환시킨 다음, 페놀 방출 화합물을 기질로서 처리하여 세포내 도입된 효소 유전자의 기능 및 활성에 따라 생성되는 페놀을 감지하여 발현이 유도된 형광, 항생제 저항성 등 리포터의 정량적 활성을 측정함으로써 원하는 활성을 보유한 효소를 탐색 및 회수할 수 있다.

[72] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 유전자와 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 상호작동가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[73] 본 발명에 있어서, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위는 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자가 발현될 수 있도록 리포터유전자의 프로모터를 활성화하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[74] 본 발명에 있어서, 상기 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자와 상기 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터는 상호작동가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[75] 도 1은 (가)는 본 발명에 따른 재설계 유전자회로(GESS : genetic enzyme screening system)를 이용하여 효소활성을 감지하는 원리를 나타낸 것이고, (나)는 본 발명에 따른 재설계 유전자회로의 GESS 벡터를 간략하게 나타낸 것이고, 그 중에서 유전자 발현 조절 부위를 확대하여 그 구조를 나타낸 그림이다. 여기서, TRF는 전사조절인자(transcriptional regulation factor)로써, 본 발명에서 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 부위(예컨대, *dmpR*: gene encoding the positive regulator of the phenol catabolic pathway)를 의미하는 것이고, 상기 유전자 발현 조절 부위는 크게 3가지 부분으로 나눌 수 있다- P_x : 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절단백질의 발현을 조절하는 프로모터, *OpR*(Operator for reporter)로 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위, 및 P_R : 리포터의 발현을 조절하는 프로모터. 그

외에도, 추가적으로, 본 발명에 따른 재설계 유전자회로는, RBS(ribosome binding site), 정방향 전사종결인자(forward transcriptional terminator)(t▶), 역방향 전사종결인자(reverse transcriptional terminator)(t◀) 등을 포함할 수 있다.

- [76] 상기 도 1의 (가) 및 (나)에 일 예시로서 나타난 바와 같이, 본 발명에서 "재설계 유전자회로(Redesigned genetic circuit)"는 (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위, 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 유전자 구조물을 의미한다.
- [77] 본 발명에서, 상기 "탐색하고자 하는 효소"는 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소일 것이다. 또한, 상기 효소는 에컨대, 알파-글루코시다제, 베타-글루코시다제, 셀룰라제, 글리코실세라미다제, 프소파타제, 피타제, 에스터라제, 리파제, 유레타나제, 아미다제, 펩티다제, 프로테이나제, 옥시도리덕타제, 페놀-리아제, 디할로게나제, 이소머라제, 모노옥시지나제 또는 디옥시지나제 등이다.
- [78] 본 발명에서, "페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질"은 페놀계 화합물 분해효소의 발현을 조절하는 단백질로, 페놀을 감지함으로써 페놀계 화합물 분해효소의 발현을 조절하는 프로모터를 작동시키고, 이러한 프로모터와 연결되어 있는 리포터의 발현을 유도하는 단백질이다.
- [79] 상기 "페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질"에 관하여, 페놀, 자일렌, 톨루엔, 벤젠 등 방향족 유기 화합물의 분해활성을 나타내는 유전자는 *Pseudomonas* 속과 *Acinetobacter* 속에서 주로 발견되고 있으며, 이들 유전자는 다유전자가 함께 발현되는 다기능오페론으로 구성되어 있으며 σ^{54} 의존성 전사조절에 의하여 발현된다. 대표적인 전사 활성화인자로는 XylR, DmpR, MopR, PhhR, PhlR, TbuT 등이 알려져 있고, 이 중 *Pseudomonas putida*에서 톨루엔과 자일렌 분해 대사에 관여하는 XylR(Ramos & Marques, (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 341-372.)와 페놀 분해대사에 관여하는 DmpR이 가장 잘 알려져 있다(Shingler *et al.*, (1993) *J. Bacteriol.* 175: 1596-1604). 특히 자연환경에 오염된 톨루엔이나 자일렌, 혹은 페놀을 검출하기 위하여 XylR이나 DmpR을 이용하는 연구는 미생물 바이오센서라는 개념으로 많이 연구되고 왔다(Ramirez *et al.*, (2004) USP Pat. No.(US 6,803,224 B2); Wise *et al.*, (2004) USP Pat. No. (US 6,773,918 B2)). 이러한 NtrC family 발현조절인자는 페놀, 자일렌 같은 활성화인자를 인식하는 도메인(A 도메인)과 ATPase 활성을 가지고 있는 도메인(C도메인), 그리고 DNA에 결합하는 기능을 하는 도메인(D 도메인)들의 조합으로 구성된다. 따라서 페놀 분자가 없을 때에는 A 도메인이 전사를 저해하지만, 페놀분자가 결합하여 A

도메인을 억제하면 C와 D 도메인에 의한 전사활성화 기능이 나타나게 된다. 최근에는 A 도메인의 특이성을 이용하여 새로운 물질의 감지에 이용하는 연구 및 유전공학적 방법을 통하여 특이성을 개량연구도 알려지고 있다(Pavel et al., (1994) *J. Bacteriol.* 176(4): 7550-7557).

- [80] 따라서, 본 발명에서 바람직하게 사용되는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질은 *P. putida* 유래 페놀분해 오페론의 조절 단백질인 *dmpR*, 또는 이의 변이체일 수 있다. *dmpR*은 페놀, 자일렌, 톨루엔, 벤젠 등 방향족 유기 화합물의 분해활성을 나타내는 *dmp* 오페론 유전자의 σ^{54} 의존성 전사활성조절부분이다. *P. putida* 유래 *dmp* 오페론은 15개의 유전자로 구성되어 있으며, 이 중에서 *dmpKLMNOP*는 phenol hydroxylation에 필요한 효소들을 코드하고, *dmpQBCDEFGHI*는 catechol 중간물질을 분해하는 meta 분해경로의 효소들을 코드한다. *dmpKLMNOP* 오페론의 발현은 σ^{54} 의존성 전사조절인자인 *dmpR*이 *dmpK* 상위의 *dmp* 오퍼레이터에 결합하여 활성화되며, *dmpR* 자체에 대한 전사조절인자는 σ^{70} 의존성으로 알려져 있다(Lee et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271(29): 17281-17286). 또한, 상기 *dmpR*의 변이체는, 예컨대, *dmpR* 아미노산 서열의 135번째 E가 K로 변이된 E135K, 이 외에도, E172K, D135N, D135N/E172K, F65L, L184I, F42Y, R109C, L113V, D116N, F122L, K6E/F42S, Q10R/K117M, Q10R, D116G/K117R, D116V 변이체 등이 페놀류에 대한 친화도가 크므로, 이들 위치 또는 주변부에서의 단일, 또는 다중 변이를 포함한 다양한 변이체들, 이 외에도 다양한 *dmpR*의 변이체들도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.
- [81] 본 발명에서, "유전자 발현 조절 부위"란, 도 1의 (나)에 나타난 바와 같이, 재설계 유전자 회로 전체를 조절하는 파트로써, (i) 상기 전사 조절 인자인 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, (ii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위, 및 (iii) 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된다. 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질은 페놀 분자가 없을 때에는 A 도메인이 전사를 저해하지만, 페놀분자가 결합하여 A 도메인을 억제하면, C와 D 도메인에 의한 전사활성화 기능이 나타나게 되어, 도 1의 (나)에서 OpR(Operator for Reporter) 부위에 결합하며, 이것은 σ^{54} 의존성으로 그 활성이 조절된다.
- [82] 본 발명에서, "프로모터"는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터 또는, 리포터 단백질의 발현을 조절하는 프로모터를 의미하며, 예를 들어 *Pseudomonas*의 *dmpR* 또는 *dmp* 오페론의 프로모터나 일반 단백질 발현용 프로모터가 사용될 수 있으며, 외래 단백질의 고발현용으로 *trc*, T7, *lac*, *ara* 프로모터를 비롯한 고발현 프로모터가 사용될 수 있고, 특히, inducer가 필요없는 항시 고발현백터인 P_{hcc} 가 사용될 수 있다.
- [83] 본 발명에서, 상기 리포터 단백질의 발현을 조절하는 프로모터로는 *E. coli*의 σ^{54} -의존성 프로모터(promoter)가 사용될 수 있다. 더불어서 pGESS의 숙주에 따라

- Pseudomonas putida*, *yeast* 등에도 적용하는 것은 당분야의 전문가에게 자명하다.
- [84] 본 발명에 있어서, 상기 재설계 유전자회로는, 상기 프로모터 뿐만 아니라, 바람직하게는, 리포터 단백질의 발현을 용이하게 해주는 RBS(Ribosome Binding Site) 및/또는 전사종결인자를 포함할 수 있다. 즉, 상기 조절 단백질의 발현을 조절하는 부위로써, 상기 프로모터 이외에도 RBS 및/또는 전사종결인자를 포함할 수 있는 것이다.
- [85] 일반적으로 단백질의 발현은 mRNA에서 개시코돈인 AUG(메티오닌) 혹은 GUG(발린)에서 시작하는데, 리보솜이 단백질 내부의 잔기에 위치한 AUG 혹은 GUG와 단백질 개시코돈으로서의 AUG와 GUG의 구분은 DNA의 퓨린 염기가 풍부한 RBS(또는 샤인-달가노 연속부분; Shine-Dalgarno(SD) sequence)에 의하여 결정되며 이 RBS는 종마다 서열이 차이가 나는 것으로 알려져 있다(Stryer, L., (1995) *Biochemistry*, (4th ed.) W. H. Freeman, Chapter 34, Protein Synthesis). 본 발명에서 구축한 재설계 유전자회로는 *Pseudomonas*의 전사조절인자를 사용하고 있는데 유전자회로의 숙주인 대장균과는 생존 형태가 많이 다를 뿐만 아니라 σ^{54} 의존성 유전자 발현의 경우에는 σ^{54} 결합부위나 σ^{54} 인자 자체가 대장균과 많이 다르기 때문에 *Pseudomonas*의 RBS 또는 숙주인 대장균에서 리포터 단백질의 발현을 용이하게 하기 위하여 대장균용 RBS 또는 모든 균주에 통합적으로 사용가능한 RBS를 사용할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예로써 박테리오파지 T7 유래의 T7 RBS 또한 사용가능할 것이다.
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 전사종결인자는, 바람직하게는, *rrnBT1T2* 또는 *tL3*일 수 있고, 이것 이외에도, 당업계에서 통상적으로 사용되는 여하한 전사종결인자를 사용하여 본 발명을 구성할 수 있다.
- [87] 본 발명에서 리포터는 형광단백질 및 항생제 저항성 유전자로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 형광단백질로는 바람직하게 GFP, GFP_{uv}, 또는 RFP를 사용할 수 있고, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한 본 발명에 사용할 수 있는 형광단백질은 이러한 예에 한정되지 않는다. 또한, 상기 항생제 저항성 유전자는 카나마이신, 클로람페니콜, 테트라사이클린 등 항생제에 저항성인 유전자 등 통상의 항생제 저항성 유전자를 사용할 수 있다.
- [88] 본 발명의 일 구체예로서, 리포터는 형광단백질과 항생제 저항성 유전자 둘 모두로 구성된 이중리포터(dual reporter), 둘 이상의 리포터로 구성된 다중 리포터일 수 있다. 본 발명에 따르면 메타게놈 라이브러리와 페놀 감지 재설계 유전자회로를 적합한 미생물 숙주내로 순차적 형질전환(stepwise transformation)시키는 데, 공지된 여하한 방법을 이용할 수 있다. 형질전환의 효율을 높이기 위해서, 바람직하게 전기천공법(electroporation)을 사용할 수 있다.
- [89] 본 발명에 있어서, 상기 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자는 클론 또는 유전자 라이브러리의 형태로, 분자생물학 연구분야에서 적용가능한 단일 유전자, 게놈라이브러리, 메타게놈 또는 메타게놈 라이브러리 형태로 제공될 수 있다. 또한, 상기 단일 유전자는 벡터 또는 미생물에 포함된 형태로 제공될 수

있다.

- [90] 본 발명에 있어서, 상기 재설계 유전자회로는 벡터 또는 미생물의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 바람직하게 대장균, 효모, 또는 식물세포, 동물세포 등 일 수 있다. 또한, 이러한 세포 또는 세포로부터 얻은 무세포 추출물을 사용할 수 있다.
- [91] 본 발명에 따르면, 상기 유전자회로로 형질전환된 미생물을 효소반응에 의해 페놀류를 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로부터 선택된 하나 이상의 기질로 처리한다. 바람직하게는, 효소반응을 최적화하기 위하여 세포생장-재설계 유전자회로의 활성화 단계가 분리되도록 기질 첨가시기를 조절할 수 있다. 예를 들어, 기질 처리 단계는 영양배지에서 성장된 건강한 미생물을 회수하는 단계 및 회수된 미생물을 최소배지에서 기질로 처리하는 단계로 이루어질 수 있다.
- [92] 상기 영양 배지 또는 최소배지는 기술분야에 일반적으로 사용될 수 있는 다양한 배지가 적용가능할 것이다.
- [93] 바람직하게는, 형질전환된 미생물의 세포 성장(OD_{600})이 약 1.5 ~ 4 사이일 때 기질을 처리하여 효소 활성화반응을 최적화할 수 있고, 더욱 바람직하게는 활성화반응을 14 ~ 16시간 진행시켜 효소반응을 최적화할 수 있다.
- [94] 페놀류 인지 전사조절 단백질은 σ^{54} 의존성으로서 영양성분이 제한된 환경에서 잘 작동하는 특징을 지닌다(Sze *et al.*, (1996) *J. Bacteriol.* 178: 3727-3735). 액체배양의 경우 LB배지에서는 생장이 좋으나 유전자회로의 반응성이 낮고 반대로 M9배지는 반응성은 높으나 성장속도가 느려 고속탐색에는 부적당한 면이 있었다. 또한, 기질을 배양초기에 첨가시키면 성장함에 따라 효소반응이 진행되어 세포간의 성장차이로 인한 효소활성 비교에서의 오차를 지니게 된다. 본 발명의 실시예에서는 이를 극복하고자 영양성분이 풍부한 LB배지를 사용하여 37°C에서 진탕배양을 시킨 후 세포농도(OD_{600})가 약 1.5 ~ 4 사이가 될 때 세포를 회수하는 단계(제 1단계: 성장단계), 회수된 세포를 기질이 첨가된 M9배지를 사용하여 30°C에서 14 ~ 16시간 효소반응을 진행시키는 단계(제 2단계: 재설계 유전자회로 활성화 단계)로 분리해서 기질 첨가를 조절하여 효소반응을 최적화시킨다.
- [95] 본 발명에 따르면, "페놀 방출 화합물"은 세포내 효소활성 감지에 사용될 수 있는 기질로써, 효소반응에 의해 페놀을 방출할 수 있는 화합물이며, 효소 반응에 의해서 페놀, 2-클로로페놀, 2-요오드페놀, 2-플로로페놀, *o*-크레졸, 2-에틸페놀, *m*-크레졸, 2-니트로페놀, 카테콜, 2-메톡시페놀, 2-아미노페놀, 2,3-디클로로페놀, 3-클로로페놀, 2,3-디메틸페놀, 3-니트로페놀, 4-클로로페놀, *p*-크레졸, 2,5-디클로로페놀, 2,5-디메틸페놀 등과 같은 페놀계 화합물을 방출할 수 있는 화합물이다. 이를, "페놀-태그 기질(phenol-tag substrate)"이라고도 한다.
- [96] 효소 반응에 의해 페놀류를 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물, 즉 페놀-태그 기질은 페놀 히드록실기(hydroxy, -OH)가 수식된 에스테르(ester, -OOC-), 에테르(ether, -OC-), 글리코사이드(glycoside, -O-Glc),

인산에스테르(phospho-ester, $-O-PO_3$), ortho-, meta-, para-위치에 알킬($-CH_3$), 히드록실($-OH$), 카르복실($-COOH$), 아미노($-NH_2$), 티올($-SH$), 아마이드(amide, $-NH-CO-$ 또는 $-CO-NH-$), 설파이드(sulfide, $-S-SH$), 할로젠기($-Cl$, $-Br$, $-F$)가 도입된 페놀 유도체 또는 벤젠고리 화합물 등이다.

[97] 구체적으로, 본 발명에 따른 페놀-태그 기질로는 페놀기와 공유결합으로 연결된 다양한 페놀유도체가 사용될 수 있다. 예를 들어 페놀의 히드록실기(hydroxy, $-OH$)를 수식하여 제조한 에스테르 결합물(ester, $-OOC-$), 에테르 결합물(ether, $-OC-$), 글리코사이드 결합물(glycoside, $-O-Glc$), 인산에스테르 결합물(phospho-ester, $-O-PO_3$)을 기질로 이용하는 경우, 에스테라아제(esterase), 리파아제(lipase), 글리코시다아제(glycosidase), 포스파타아제(phosphatase), 피타아제(phytase) 활성을 감지하는 목적으로 이용할 수 있다.

[98] 또한, 페놀-태그 기질은 ortho-, meta-, para-의 한 위치에 새로운 메틸기($-CH_3$), 히드록실기($-OH$), 카르복시질($-COOH$), 아미노기($-NH_2$), 황화수소($-SH$)를 도입하여 제조된 물질일 수 있다. 이 위치에 아마이드결합(amide, $-NH-CO-$ 또는 $-CO-NH-$), 설파이드결합(sulfide, $-S-SH$)을 갖는 물질을 기질로 사용하면 아마이드기를 통하여 연결된 페놀화합물은 아마이다아제(amidase), 펩티다아제(peptidase) 활성을 감지할 목적에 이용할 수 있으며, 설파이드기를 통하여 연결된 페놀화합물을 이용하면 세포내 산화환원수준을 감지할 목적으로 이용할 수 있다. 또한, 페놀-태그 기질로 새로운 탄소결합이 연결된 페놀화합물 즉, $Ph-C(R)$ 이 이용되는 경우, 탄소결합을 분해하여 페놀을 유리하는 페놀리아제(phenol-lyase) 활성을 감지할 수도 있다. 페놀-태그 기질로는 벤젠고리 물질이 이용될 수도 있으며, 이 경우 방향족화합물의 산화에 관여하는 모노옥시젠나아제(monooxygenase), 디옥시젠나아제(dioxygenase) 등의 산화효소 활성을 감지할 수 있다. 염소(Cl), 브롬(Br), 플루오르(F) 등 할로젠에 결합한 페놀화합물도 기질로 이용될 수 있다. 이 경우 위 할로젠화 페놀화합물에 작용하여 탈할로젠화(dehalogenation)하거나 할로젠의 위치를 바꾸는 이성질화(isomerization)하는 효소 활성이 본 발명에 따라 감지될 수 있다.

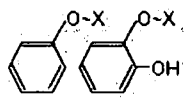
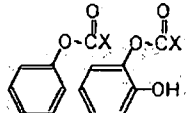
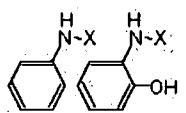
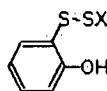
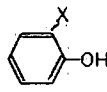
[99] 앞서 언급한 다양한 페놀화합물에서 공유결합을 다른 유기분자로 옮기는 전이효소(transferase)나, 새로운 공유결합을 생성하는 합성효소(ligase)의 활성도 같은 원리에 의하여, 본 발명에 의하여 감지될 수 있다.

[100] 따라서, 본 발명에서 제시한 다양한 페놀-태그 기질을 이용하면, 세포내에 존재하는 특정 가수분해효소(hydrolase), 산화환원효소(oxido-reductase), 이성화효소(isomerase), 분해효소(lyase), 전이효소(transferase) 등을 감지할 수 있다. 본 발명에서 세포내 효소활성 감지에 이용되는 기질은 페놀-태그 화합물로서, 페놀, o/p-nitrophenol, o/p-chlorophenol 등을 포함하는 다양한 합성기질을 말한다. 이러한 페놀-태그 화합물에 적절한 효소가 작용하면 위 페놀물질이 원래의 페놀-태그 화합물로부터 유리되게 된다. 예를 들어

phenyl- β -glucoside에 대장균의 β -galactosidase (lacZ)가 작용하면 페놀성분이 효소활성에 따라 유리된다. 표 1은 페놀-태그 기질의 특징과 관련 효소반응의 예를 제시하였다.

[101]

[102] 표 1

Phenol-Substrates	X-Groups	Target Enzymes
	α β -glycosides phosphate, phosphorothioate	α β -glucosidase, cellulase, glycosylceramidase phosphatase, phytase
	alkyl, amine	esterase, lipase, urethanase
	alkyl, amino acids	amidase, peptidase, proteinase
	alkyl, amino acids	oxidoreductases
	amino acids, pyruvate halogen (Cl, Br, F)	phenol-lyase dehalogenase, isomerase
	alkyl, B(OH) ₂	mono-, di-oxygenases

[103]

[104] 즉, 페놀을 감지하는 재설계 유전자회로를 함유한 재조합 미생물에 임의의 효소 유전자를 도입하고, 페놀-태그 기질을 처리하면 세포내 효소유전자의 기능 및 활성도에 따라서 페놀화합물의 농도가 변화하게 된다. 따라서, 페놀화합물의 발현유도 기능에 의한 형광, 항생제저항성 등 리포터의 정량적 증가를 형광분석기, 항생제저항성 등 다양한 측정기술을 이용하여 탐색하면 세포내외의 효소활성을 고감도로 감지할 수 있는 새로운 측정방법을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에서 리포터로 사용되는 형광단백질, 항생제저항성 단백질은 고도의 민감성 측정방법을 적용할 수 있을 뿐만 아니라, 세포막을 통과하지 않고 특정세포 내부에 한정되므로 그 세포 내에서 발현되는 외래 유전자의 특성을 개별적으로 발휘하게 된다. 따라서, 하나하나의 세포(single cell)가 독립적인 반응조 및 분석기의 역할을 수행하게 되므로 효소반응에 의해 유리된 페놀류를 감지하여 발현이 유도된 리포터의 활성을 측정하는 수단으로 수백-수천만 개의 대량시료를 형광유세포분석기(FACS), 미세콜로니 형광이미지분석,

형광스펙트럼분석, 항생제 선택배지를 이용한 대량탐색 등을 이용하여 측정할 수 있다.

- [105] 본 발명에 있어서, "환경 시료"는 토양 또는 해수 유래 등의 환경으로부터 유래한 시료를 의미한다.
- [106] 본 발명에 있어서, 상기 메타게놈 라이브러리는 플라스미드, 포스미드, 코스미드, BAC 및 YAC로 구성된 군으로부터 선택된 벡터에 토양으로부터 얻은 DNA를 도입하여 제작될 수 있다.
- [107] 본 발명에 있어서, 형광단백질을 리포터로 사용하는 경우에는, 기질 처리를 하여 효소반응을 진행시킨 다음 형광유세포분석기(FACS)를 사용하여 형광을 보유한 균주를 고속 탐색한다. 이 장비는 대량의 라이브러리 균주를 고속($\sim 10^6$ cells/min)으로 분석 및 회수가 가능하여 본 발명의 목적에 매우 적합하다. 회수된 균주는 고체상태의 기질 플레이트($\sim 10^3$ cells/90mm petri dish)에 도말되고, 다시 형광현미경을 통하여 효소활성을 지니는 균주를 최종 선택하게 된다(도 2 (가)).
- [108] 항생제 내성 단백질을 리포터로 사용하는 경우에는, 항생제가 포함되어있는 액체배지에 배양하여 효소활성 보유 균주만이 성장할 수 있도록 성장을 제한한다. 최종에는 효소활성이 있는 균주만이 배양액내 개체수가 많아지는 농화배양(enrichment)이 이루어지게 된다. 배양된 균주는 항생제가 포함되어있는 고체상태의 기질 플레이트($\sim 10^3$ cells/90mm petri dish)에 다시 도말되고 생존하는 콜로니의 관찰을 통하여 효소활성을 보유한 균주를 최종 선택하게 된다(도 2 (나)).
- [109] 이중리포터를 사용하는 경우에는 상기 리포터방식을 혼합하여 사용할 수 있으며, 고속탐색시 발생할 수 있는 거짓양성클론(false positive clone)을 제거할 수 있는 장점을 지닌다.
- [110] 본 발명에 있어서, 선별된 균주로부터 재설계 유전자회로(pGESS-GFP)를 제외하고 목적 유전자를 포함하고 있는 순수한 포스미드 유전자를 회수하는 방법으로, 하기 세 가지 방법을 이용할 수 있다.
- [111] 첫째, 제한효소를 처리하여 포스미드 유전자와 섞일 수 있는 재설계 유전자회로 함유 DNA를 제거하고 회수하는 방법이다. 즉, *Not I*, *EcoRI* 등의 제한효소를 처리하여 2~3개의 단편으로 절단한 다음에 전기영동으로 겔에서 포스미드벡터 부위의 유전자를 회수할 수 있다(도 3 (가)).
- [112] 둘째, 재설계 유전자회로가 처음부터 염색체시스템으로 도입된 미생물균주를 구축하여 이용하는 방법이다. 이 방법은 재설계 유전자회로를 제거하는 과정없이 메타게놈 유전자가 도입된 포스미드 유전자만 회수할 수 있고 플라스미드 기반의 상동성문제를 피할 수 있기 때문에 더욱 안정적인 고속탐색기술을 구축할 수 있는 장점이 있다(도 3 (나)).
- [113] 셋째, 재설계 유전자회로에 자살유전자(suicide gene)를 도입시키는 방법이다. 이 방법은 유전자 회수시 자살유전자가 도입되어 있는 재설계 유전자회로가 부차적인 제거(curing)과정을 통하여 상실되도록 함으로써 포스미드 유전자만

회수할 수 있다(도 3 (다)).

[114] 본 발명에 따르면 유용 유전자의 확인 및 동정은 공지된 여하한 방법인 서열분석(sequencing)에 통하여 이루어질 수 있다. DNA 및 아미노산의 서열을 분석한 후 데이터뱅크(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 염기상동성 분석을 통하여 회수된 유전자의 정보를 얻을 수 있다.

[115] 본 발명에 있어서, 재설계 유전자회로를 이용한 메타게놈 라이브러리 유래 목적효소의 탐색은, 구체적으로, 도 4에 나타난 과정으로 이루어질 수 있다.

[116]

[117] 실시예

[118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[119]

[120] 실시예 1 : 페놀 감지 발현 조절 인자 dmpR 기반의 재설계 유전자회로 구축

[121]

[122] 재설계 유전자회로는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질 부위, 프로모터를 포함하는 유전자 발현 조절 부위, 형광단백질 및 항생제 저항성 유전자로부터 선택된 하나 이상의 리포터 부위로 구성된다.

[123] 페놀을 감지하게 되는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질 부위는 *Pseudomonas putida* 유래 페놀분해 dmp 오페론의 조절단백질인 dmpR을, 조절 단백질의 발현을 조절하는 부위는 *P. putida* 유래의 RBS를, 리포터 단백질로는 형광단백질(fluorescence protein, FP)을 이용하여, 플라스미드 pUC19 기반 재설계 유전자회로(pGESS-FP)를 구성하였다.

[124] 본 발명에서는 EGFP(enhanced green fluorescence protein)유전자를 리포터로 한 페놀류 감지 재설계 유전자회로를 제작하기 위하여, pMGFP 플라스미드(Ha *et al.*, (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22): 7408-7414)를 *EcoR* I과 *Hind* III 제한 효소를 처리하여 720 bp의 EGFP 조각을 확보한 다음 pUC19 벡터에 도입하여 pUGFP를 구성하였다.

[125] 본 발명에서는 정방향 및 역방향 프라이머(서열번호 1 및 서열번호 2)를 이용하여 *Pseudomonas putida* KCTC 1452에서 PCR 증폭하여, *EcoR* I 제한효소 링커를 포함한 dmpR유전자(1,692 bp), dmp operator-promoter 영역, 그리고 dmpK유전자 일부(42 bp)와 클로닝 과정 중 삽입된 제한효소 서열 12 bp로 구성된 2,157 bp의 DNA조각(서열번호 21)을 제조하였다. dmpK유전자는 dmpR과 반대방향으로 405 bp 떨어진 위치(1,693 ~ 2,097 bp)에 있고, 리포터 유전자는 dmpK의 N-말단 42 bp뒤에 연결되도록 구성하였다.

[126]

[127] 서열번호 1: 5'-CCGGAATTCGAGCTGATCGAAAGTCGG-3'

- [128] 서열번호 2: 5'-CCGGAATTCCTAGCCTTCGATGCCGAT-3'
- [129]
- [130] dmpK의 N-말단조각을 남겨둔 것은 형광단백질, 다양한 항생제저항성 유전자 등이 리포터로 사용되어도 dmp operator-promoter 영역의 전사촉진(transcription enhancer) 기능을 안정적으로 유지하기 위한 것이었다. 이 PCR 산물은 pUGFP의 EcoR I부위에 클로닝하여 pGESS-EGFP(I)(5,510 bp)를 제작하였다(도 5).
- [131] 또한, *Pseudomonas*의 RBS를 가지고 있는 pGESS-EGFP(I)외에 추가적으로 숙주인 대장균에서 리포터 단백질의 발현율을 향상시키기 위하여 대장균용 RBS(T7 RBS)(Simons *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 1624-1628)와 전사종결인자를 채택한 pGESS-EGFP(II)를 함께 구축하였다. 리포터 앞 대장균용 T7 RBS를 도입시키는 방법은 다음과 같다. 14 bp의 T7 RBS를 상동 서열로 하는 서열번호 3와 4의 프라이머로 GFP 유전자를 PCR 증폭한 다음, *BsrG* I 제한 효소로 절단한 pGESS-EGFP(I)의 DNA와 함께 pKD-Cm 벡터를 함유하고 있는 대장균 DH5 α 에 도입하여 상동성 재조합 방법으로 dmpK 유전자 대신 T7 RBS를 도입하였다.
- [132]
- [133] 서열번호 3:
5'-GCACAGCTGTTGCACTTTGTCCTGCGCAATCCGCCAACCTGGAGAAGGA
GATATACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'
- [134] 서열번호 4:
5'-GATTTAATCTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGA
AGCTTACTTGTACAGCTTGTCC-3'
- [135]
- [136] 상동성 재조합은 숙주세포를 준비하고, 선형화된 유전자를 도입하는 과정으로 진행되었다(Zhang *et al.*, (2000) *Nat. Biotech.* 18: 1314-1317; Zhang *et al.*, (1998) *Nat. Genet.* 20: 123-128; 이승구 등, (2005) 대한민국특허출원10-2005-0116672). 레드-리컴비나아제(λ -red recombinase)를 코딩하는 pKD46-Cm 벡터를 함유하고 있는 대장균 DH5 α 의 단일 콜로니를 25 μ g/ml 클로람페니콜이 첨가되어 있는 LB 액체배지 3 ml에 접종하여 30°C에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 25 μ g/ml 클로람페니콜과 50 mM 아라비노스가 첨가되어 있는 100 ml의 LB 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 균체성장(OD₆₀₀/ml)이 0.5 ~ 0.6이 될 때까지 30°C에서 진탕 배양하였다. 배양이 끝난 후, 전기충격 방법용 유전자 도입 세포(competent cell)를 준비하고(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Joseph Sambrook, David W. Russell) 유전자 도입 세포에 *BsrG* I 제한효소로 절단한 pGESS-EGFP(I) 10 ng과 T7 RBS가 도입된 GFP의 PCR 산물 100 ng 씩을 섞어서 전기충격 (18 kV/cm, 25 μ F)을 가한 후, SOC 배지 1 ml를 첨가하여 25°C에서 20시간 동안 상동성 재조합을 유도하였다. 앰피실린이 50 μ g/ml이 첨가된 LB 고체배지에 도말한 후 37°C에서 밤새 배양하여 pGESS-EGFP(II)를 선별하였다.

참고적으로 pKD46-Cm 벡터는 온도민감성 복제시발점(temperature sensitive origin of replication)을 포함하고 있어 37°C에서는 제거되고 pGESS-EGFP(II) 유전자만 도입되어 있는 세포를 얻게 된다.

- [137] pHCEIIB(바이오리더스, 한국)로부터 425 bp의 *rrnBT1T2* 전사종결인자를 서열번호 5과 6의 프라이머로 PCR 반응하여 증폭하고, pGESS-EGFP(I)으로부터 *dmpR*과 *dmp operator-promoter* 영역, T7 RBS 그리고 GFP 리포터 단백질 부분의 2,831 bp의 PCR 산물을 서열 7와 8의 프라이머로 증폭하여 두 개의 DNA 단편을 준비하였다. 두 개의 DNA 단편을 주형으로 삼고 서열번호 5과 8의 프라이머로 overlap PCR 반응을 진행하여 두 개의 DNA 단편이 연결된 DNA 단편을 제조하였다.
- [138] 이를 상동성 재조합 방법으로 원래 pGESS-EGFP(I)에 치환하였다. 다음으로 벡터를 *EcoR* I으로 절단한 후 pKD46 벡터로부터 서열번호 9과 10의 프라이머로 PCR 증폭한 tL3 전사종결인자를 *dmpR*의 C-말단에 라이게이션시키고 전기천공법으로 대장균에 도입시켜 최종적으로 6,171 bp의 pGESS-EGFP(II)를 구성하였다(도 6).
- [139]
- [140] 서열번호 5:
5'-ATGGACAAGCTGTACAAGTAAGCTTCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGA-3',
- [141] 서열번호 6:
5'-AGCGGATAACAATTTACACAGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAA GAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGG -3'
- [142] 서열번호 7:
5'-TCTCTCATCCGCCAAAACAGGAATTCCTAGCCTTCGATGCCGATTT-3'
- [143] 서열번호 8:
5'-TCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGAAGCTTACTTGTACAGCTTGTCCAT-3'
- [144] 서열번호 9: 5'-CCCGAATTCTTCTTCGTCTGTTTCTACTG-3'
- [145] 서열번호 10: 5'-CCCGAATTCAATGGCGATGACGCATCCTCA-3'
- [146]
- [147] 또한 본 발명에서는 육안 관찰에 유리한 GFP_{UV} 유전자를 본 시스템의 리포터로 사용하기 위하여 pGESS-EGFP(I)의 EGFP 대신에 GFP_{UV}로 치환된 pGESS-GFP_{UV} (I)를 제조하였다. 정방향 및 역방향 프라이머(서열번호 11 및 서열번호 12)로 PCR반응하여 pGFP_{UV}(Clontech, 미국) 유래의 717 bp의 GFP_{UV} 유전자를 증폭하고 pGESS-EGFP(I)에 상동성 재조합에 의해 GFP_{UV} 유전자를 도입함으로써 진행되었다.
- [148]
- [149] 서열번호 11:
5'-CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG

CTTATTTGTAGAGCTCATCCA-3'

[150] 서열번호 12:

5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCT
CATGAGTAAAGGAGAAGAACT-3'

[151]

[152] 재설계 유전자회로의 리포터 단백질로 형광단백질 뿐만 아니라 경우에 따라서는 클로람페니콜(chloramphenicol), 테트라사이클린(tetracycline), 카나마이신(kanamycin) 같은 항생제 저항성 유전자를 활용하는 것이 유용한 경우가 많다. 즉 항생제 저항성 유전자를 리포터로 사용하는 경우에는 이미지분석 시설이 전혀 필요하지 않으며, 한 개의 고체 배지 상에서 $10^6 \sim 10^7$ 개 이상의 콜로니를 신속하게 분석할 수도 있다.

[153] 항생제 저항성 유전자를 리포터로 한 폐놀감지 유전자회로를 구축하기 위하여, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 카나마이신 저항성 유전자를 각각 서열 번호 13과 14, 15과 16, 17과 18의 프라이머로 PCR증폭하여 각각 660 bp, 813 bp, 1,191 bp의 DNA단편을 제조하고, pGESS-EGFP(II)의 리포터 부위를 항생제 저항성 유전자로 대체하는 상동성재조합에 의한 유전자 조작을 수행하였다(도 7).

[154]

[155] 서열번호 13:

5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCT
CATGGAGAAAAAATCACTGG-3'

[156] 서열번호 14:

5'-CGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG
CTTACGCCCCGCCCTGCCACT-3'

[157] 서열번호 15:

5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCT
CATGAAATCTAACAATGCGCT-3'

[158] 서열번호 16:

5'-CGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG
CTCAGGTCGAGGTGGCCCGGC-3'

[159] 서열번호 17:

5'-ACCTGGAGATGGCCGTGACCAATACCCCCACACCGACTTTCGATCAGCT
CATGAGCCATATTCAACGGGA-3'

[160] 서열번호 18:

5'-CGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAG
CTTAGAAAACTCATCGAGCA-3'

[161]

[162] p-니트로페놀은 α -glycosidase, β -glycosidase, lipase, phosphatase 등 다양한 효소의 활성을 간편 분석하기 위한 기질로 널리 이용되고 있어서, 본 폐놀센서

유전자회로를 이용한 효소활성 감지에도 매우 유용한 페놀-태그 기질로 채택될 수 있다. 본 발명에서는 pGESS의 p-니트로페놀에 대한 감지능을 향상시키기 위하여 dmpR의 135번 아미노산인 글루탐산(E)을 리신(K)으로 치환한 돌연변이 dmpR을 함유하는 pGESS-EGFP(III)을 제작하였다.

- [163] 실험방법은 다음과 같다. 제작 방법은 135번 아미노산이 글루탐산에서 리신으로 치환될 수 있도록 DNA 염기서열을 바꾼 후, 양쪽으로 20 bp씩을 연장시킨 총 40 bp의 서열을 PCR 프라이머(서열번호 19 및 서열번호 20)를 사용하여 점 돌연변이(point mutation)를 유발하였다. 두 개의 PCR 프라이머와 pGESS-EGFP(II) 플라스미드를 주형 DNA로 하여 역 PCR(inverse PCR) 반응을 수행하였다. 역 PCR 반응은 KOD DNA 중합효소(Novagen, 미국)를 사용하였으며 PCR반응은 94°C에서 3분간 전 불활성화한 다음, 94°C에서 30초간 불활성화, 55°C에서 30초간 프라이머 결합, 72°C에서 60초간 DNA 합성 반응의 절차를 25회 반복하여 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 DNA 연결반응을 추가로 수행하여 6,171 bp의 PCR 산물을 회수하였다. 제조된 1차 PCR 산물에 Proteinase K를 처리하여 킬럼(Qiagen, 독일)으로 정제한 후, Dpn I(Roche, 독일) 제한효소를 처리하여 주형DNA로 사용한 플라스미드를 제거하였다. 제한 효소 반응이 끝난 시료를 아가로젤에 전기영동하여 목적 밴드만 내려내어 킬럼(Qiagen, 독일)으로 정제한 후, 대장균 DH5α(ElectroMax™-DH5α-ETM, Invitrogen, 미국)에 형질전환 시킴으로써 6,171 bp의 pGESS-EGFP(III)를 제작하였다.

[164]

[165] 서열번호 19:

5'-GATCGACTCCTTCGAGGTGAAAATCTGCCAGACCGACCTG-3'

[166] 서열번호 20:

5'-CAGGTCGGTCTGGCAGATTTTCACCTCGAAGGAGTCGATC-3'

[167]

[168] 실시예 2 : 재설계 유전자회로의 최적의 숙주 대장균 선별

[169]

- [170] 본 발명에서 pGESS가 의도대로 작동하기 위해서는 *Pseudomonas*의 dmpR이 적절한 수준에서 외래발현(heterologous expression)되고, 대장균의 σ^{54} 의존성 전사조절인자와 원활하게 상호작용 해야 한다(Sze *et al.*, (1996) *J. Bacteriol.* 178(13): 3727-3735). 따라서 pGESS의 신호특성은 숙주 미생물의 생물학적 특성 및 생육조건에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서는 페놀감지 유전자회로의 안정적 구현을 위하여 i) 미생물 숙주의 차이 ii) 페놀첨가에 의한 발현 유도시점에 의하여 어떤 영향을 받는지를 조사하고 최적화를 수행하고자 하였다.

- [171] 먼저 본 실험에서는 재설계 유전자회로를 함유하고 있는 대장균(DH5α, EPI300, JM109(DE3), BL21, BL21(DE3))별 페놀에 대한 감도를 조사하여 회로에

적합한 균주를 선별하고자 하였다. 실험방법은 우선 100 μ M 페놀과 50 μ g/ml의 앰피실린이 들어있는 LB 고체배지를 준비하였고 pGESS-EGFP(I)을 함유하고 있는 대장균 DH5 α , EPI300, JM109(DE3), BL21, BL21(DE3)와 대조균으로 pGESS-Cm(II)을 함유하고 있는 EPI300 균주를 같이 30°C에서 36시간 동안 배양하였다. 도 9의 (가)는 고체배지에서의 각 균주별 유전자회로 반응결과이다. 실험결과, 다른 균주보다도 B타입균주인 BL21, BL21(DE3)가 유전자회로에 대한 반응성이 높은 것으로 확인되었다. 이어서 액체배양에서도 대장균별 페놀에 대한 감도를 조사하였다. 50 μ g/ml의 앰피실린이 들어있는 LB액체배지에 전배양된 균주 배양액을 1%(v/v) 첨가한 후, 37°C에서 8시간동안 진탕 배양하였다. 배양액에 100 μ M 페놀을 첨가한 후 20시간동안 30°C에서 진탕시킴으로써 형광발현을 유도하였다. 형광분석은 다음과 같은 방법으로 진행되었다. 배양세포액 1.5 ml를 원심 분리한 후 PBS 완충 용액으로 1회 세척하였고, 0.5 ml의 cellLytic B 용액(Sigma, 미국), 0.2 mg/ml lysozyme(Sigma, 미국), 2 unit DNase I(Roche, 독일)을 첨가하여 37°C에서 1시간 정치시켜 세포를 파쇄 하였다. 파쇄한 세포를 원심 분리하여 얻은 상층액을 형광광도계(Varian, 호주)로 510 nm 파장에서 형광값을 측정하였다(도 9 (나)). 실험결과 액체배양에서도 고체배양에서와 동일한 결과를 확인하였다.

- [172] 다음은 페놀 첨가 시기, 세포성장 상태에 따른 GESS 유전자회로의 페놀 반응성을 조사하였다. pGESS-EGFP(I) 함유 재조합 대장균 DH5 α 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 50 μ g/ml의 앰피실린이 함유된 LB 액체배지 100 ml에 상기 전배양액을 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 14시간동안 진탕 배양하면서, 2시간 간격으로 5 ml씩 배양액을 추출하였다. 추출한 배양액의 일부는 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 성장을 확인하고, 나머지 배양액에 페놀을 100 μ M이 되게 첨가하여 30°C에서 20시간 반응시킨 후 형광 발현 정도를 분석하였다. 형광량은 세포를 파쇄후 상층액을 취해 형광광도계를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 9의 (다)에서 보는 것과 같이, 형광세기는 세포 성장 단계에 따라 크게는 10배 이상 차이가 나는 것을 확인할 수 있었고, 특히 정지기(stationary phase)에서 페놀을 첨가한 경우가 유전자회로의 발현량이 가장 높았으며, 이것은 σ^{54} 의 발현특성과도 일치하는 것을 확인하였다.

[173]

- [174] 실시예 3: 재설계 유전자 회로의 시스템 검증 및 페놀류 화합물에 대한 정량적 신호 분석

[175]

- [176] 1) 재설계 유전자회로의 페놀에 대한 정량적 형광 신호 분석

- [177] 상기 실시예 1에서 구축한 재설계 유전자회로의 페놀에 대한 정량적 감지기능을 확인하기 위하여 pGESS-EGFP(I)을 함유하는 재조합 대장균 BL21 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 LB 액체 배지에 접종하여

37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 10⁶배 희석한 다음 희석액 100 μ l씩을 50 μ g/ml의 앰피실린과 1 ~ 1000 μ M 페놀이 첨가된 LB 고체 배지에 도말하여 30°C에서 36시간동안 배양한 후 형광현미경으로 콜로니 내 형광 발현을 관찰하였다. 형광현미경은 AZ100M(Nikon, 일본)을 사용하였으며 이미지는 CCD 카메라(DS-Qi1Mc, Nikon)와 fluorescence filter set(GFP-HQ, Nikon)(Ex 455 - 485 nm, DM 495, BA 500 - 545)를 이용하여 이미지를 얻었고 얻어진 이미지는 NIS-Elements software를 이용하여 처리하였다.

[178] 그 결과, 도 10의 (가)에서 보는 바와 같이 페놀을 첨가하지 않은 시료에서는 형광이 감지되지 않지만, 형광이 1 μ M이상 첨가되면 형광을 띄는 콜로니를 관찰할 수 있었으며, 페놀의 농도가 증가 할수록 형광 강도도 증가함을 확인하였다.

[179] 이와 같은 유도 물질인 페놀의 농도에 대한 재설계 유전자회로의 감도의존성을 형광광도계로도 검증하였다. 이를 위하여 pGESS-EGFP(I) 함유 재조합 대장균의 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 위 배양액을 50 μ g/ml의 앰피실린과 다양한 농도(0.1 ~ 1000 μ M)의 페놀이 첨가된 LB 액체배지에 1%(v/v) 되게 접종하여 30°C에서 20시간동안 진탕 배양하였다. 형광량은 세포를 파쇄후 상등액을 취해 형광광도계를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 10의 (나)에서 보는 것과 같이, 10 μ M 이상의 페놀이 존재하는 경우에서 명료한 형광신호가 관찰되었고, 1000 μ M까지는 페놀농도에 비례하여 형광강도가 증가하는 것으로 확인되었다. 이 결과는 본 발명의 페놀감지 유전자회로가 1 ~ 1000 μ M 페놀농도 범위에서 정량적으로 활성화 되는 것을 보여주는 것이다.

[180] 또한 재설계 유전자회로의 페놀에 대한 정량적 분석을 FACS로 분석하였다. pGESS-EGFP(II)을 함유하는 재조합 대장균 DH5a의 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 위 배양액을 50 μ g/ml의 앰피실린이 들어있는 LB액체배지에 1%(v/v) 접종한 후 6시간동안 37°C에서 진탕배양하고 시험관에 2 ml씩 분주하였다. 각 시험관에 0 ~ 5000 μ M의 페놀을 첨가하고 30°C에서 18시간 진탕배양시킴으로써 형광발현을 유도하였다. 각 농도별 페놀에 의하여 유도된 세포내 형광량은 FACS Calibur system(Becton Dickinson, 미국)으로 분석하였다. Detector로는 FSC, SSC, FL1-H(excitation = 488 nm, emission = 530/30 nm) detector를 감지하도록 세팅하였고, 10,000개의 표본세포를 관찰한 데이터를 CellQuest Pro(Becton Dickinson, 미국)로 분석하였다. 그 결과, 형광현미경과 형광광도계로 분석한 것과 마찬가지로 페놀 유무에 따라 형광정도가 확연히 구분될 뿐만 아니라, 페놀의 농도가 증가 할수록 형광강도도 증가함을 확인하였다(도 10 (다)). 이와 같이 FACS를 이용하여 신호감지가 가능한 것은 여타의 분석기법 보다 큰 의미를 갖는데 이것은 FACS의 고속분석 및 소팅(sorting)기능을 이용하여 분자진화연구 혹은 메타게놈 라이브러리의 고속분석이 가능하기 때문이다.

[181] 다음으로는 항생제 저항성 유전자를 리포터로 하는 유전자회로(pGESS-Cm(II),

pGESS-Tc(II), pGESS-Km(II))를 이용하여 정량적 항생제 저항성 분석을 하였다. 클로람페니콜, 테트라사이클린 및 카나마이신 저항성 유전자를 리포터로 한 유전자 회로를 함유하고 있는 대장균 JM109(DE3)의 단일 콜로니를 50 µg/ml의 앰피실린이 함유된 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 상기 전배양액을 10⁶배 희석한 다음, 희석액 100 µl씩을 각 선택 배지에 도말하여 37°C에서 3일간 배양하였다. 고체배지위 생성된 콜로니들의 개수를 세어서 저항성 실험을 수행하였다. 각 선택 배지에는 50 µg/ml 앰피실린과 각각의 선택적 항생제(클로람페니콜, 테트라사이클린, 카나마이신)를 농도 0, 10, 20, 30 µg/ml가 되게 첨가하여 만들었다. 또한 전사활성화인자, 즉 페놀을 1 ~ 1000 µM 을 첨가하였다.

- [182] 그 결과, 클로람페니콜 저항성 유전자를 리포터로 한 pGESS-Cm(II)은 페놀 농도에 따라 클로람페니콜에 대한 저항성이 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 페놀의 농도가 10 µM인 경우 클로람페니콜 20 µg/ml까지 저항성을 보였으며, 참고적으로 페놀의 농도가 100 µM과 1 mM 로 증가하게 되면 클로람페니콜에 대한 저항성도 각각 40 µg/ml과 50 µg/ml까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 테트라사이클린 저항성 유전자를 리포터로 한 경우(pGESS-Tc(II))에도 클로람페니콜의 경우와 유사한 정량성을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 본 발명의 페놀센서 유전자회로가 효소활성의 정량적 분석에 효과적으로 이용될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 카나마이신 저항성 유전자를 리포터로 사용한 경우(pGESS-Km(II))에는 낮은 농도의 페놀에는 콜로니의 형성이 감지되지 않아 미세농도의 페놀을 감지할 수 있는 리포터로 사용하기에는 클로람페니콜 저항성 유전자 또는 테트라사이클린 저항성 유전자를 리포터로 한 경우가 좀 더 바람직한 것으로 확인되었다(도 10 (라)).

[183]

- [184] 2) 재설계 유전자회로의 다양한 페놀류에 대한 신호 분석

- [185] 재설계 유전자회로를 이용하여 페놀 이외의 페놀 유도체들, 즉 o-니트로페놀, m-니트로페놀, p-니트로페놀, o-클로로페놀, m-클로로페놀, p-클로로페놀, 살리실산, 2-아미노페놀, 2-메톡시페놀, o-크레졸, m-크레졸, p-크레졸, 카테콜, 리소시놀(레조르시놀), 2-플로로페놀, 2-요오드페놀, 2,4-디메틸페놀, 2,5-디메틸페놀, 3,4-디메틸페놀, 2,3-디메틸페놀, 3,5-디메틸페놀, 2,4-디클로로페놀, 2,5-디클로로페놀, 2,3-디클로로페놀, 2,6-디클로로페놀, 3,4-디클로로페놀, 3,5-디클로로페놀, 2,4-디니트로페놀, 3-메틸카테콜, 2-에틸페놀, 3-에틸페놀, 벤젠에 대한 감지 여부와 민감도를 조사하였다. pGESS-EGFP(I)을 함유한 대장균 DH5α의 단일 콜로니를 50 µg/ml의 앰피실린을 첨가한 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 50 µg/ml의 앰피실린이 첨가된 LB액체 배지에 1%(v/v) 되게 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀이 3이 될 때까지 약 8시간 배양한 다음 배양액에 상기의 페놀 유도체들을 각각 100 µM이 되게 첨가하여 30°C에서 18시간 진탕 배양 하였다.

배양액 각 100 μl 씩을 추출하여 FACS를 이용하여 개별 세포의 형광분포도를 조사하였다. 각 시료는 모두 3회씩 반복 실험하여 그 평균을 계산하였다. 그 결과, 도 11의 (가)에서 보는 바와 같이, 실험에 사용한 31개 페놀 유도체들 중, o-클로로페놀, o-니트로페놀, 2-아미노페놀, 2-메톡시페놀, 카테콜, o-크레졸, m-크레졸, 2-에틸페놀, 2-플로로페놀, 2-요오드페놀 등 10개 물질에는 강하게 반응하였고, m-클로로페놀, p-클로로페놀, m-니트로페놀, 2,5-디메틸페놀, 2,3-디메틸페놀, 2,5-디클로로페놀, 2,3-디클로로페놀, p-크레졸은 반응성이 약했으며, p-니트로페놀에는 반응을 하지 않는 등 페놀의 파라 위치에 치환기가 붙은 물질에 대해서는 반응성이 약하거나 반응을 하지 않았다.

[186] 클로람페니콜 저항성 유전자를 리포터를 이용하는 경우에서도 기질종류에 따른 감지여부를 조사하였다. 먼저 pGESS-Cm(II)을 함유한 대장균 EPI300의 단일 콜로니를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 함유된 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 함유된 LB 액체 배지에 1%(v/v) 되게 접종한 후 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 클로람페니콜과 페놀 유도체 100 μM 를 첨가하여 37°C에서 8시간 진탕 배양한 다음, OD₆₀₀를 측정하여 각 페놀 유도체들에 대한 감지여부를 조사하였다. 이 때 대조군으로는 클로람페니콜을 첨가하지 않고 100 μM 의 페놀을 첨가한 것을 사용하였다.

[187] 사용된 페놀유도체는 역시 o-클로로페놀, m-클로로페놀, o-니트로페놀, m-니트로페놀, 카테콜, 2-메톡시페놀, o-크레졸, m-크레졸, 2-플로로페놀, 2-요오드페놀, 2,3-디메틸페놀, 2-에틸페놀에는 형광단백질을 사용한 경우처럼 강하게 반응하지만, p-크레졸, p-클로로페놀, p-니트로페놀 등 페놀의 파라 위치에 치환기가 붙은 물질에 대해서는 반응이 아주 약하거나 반응을 하지 않았다(도 11 (나)).

[188] 실험결과, 페놀유도체의 부가기(side chain)의 종류 및 부가위치에 따라서 형광단백질의 발현수준, 즉 페놀센서 유전자회로의 활성화 정도가 다른 것을 보여주었다(도 11 (다)).

[189]

[190] 3) 재설계 유전자회로의 다양한 페놀류에 대한 정량적 신호 분석

[191] 재설계 유전자회로의 페놀류 화합물에 대한 신호를 정량적으로 분석하였다. pGESS-EGFP(I)을 함유한 대장균 DH5 α 의 단일 콜로니를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 첨가된 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 상기 배양액을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 첨가된 LB액체 배지에 1%(v/v) 되게 접종하고, 유도물질로 페놀, o-클로로페놀, m-클로로페놀, o-니트로페놀, 카테콜, 리소시놀을 0.1 ~ 1000 μM 을 각각 첨가한 다음 30°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 형광량은 세포파쇄후 상등액을 취해 형광광도계(Varian, 호주)로 분석하여 510 nm에서 GFP의 형광값을 측정하였다. 그 결과, o-클로로페놀에 대하여서는 0.1 μM 의 농도에서도 형광이 감지되었고, 페놀과 m-클로로페놀은 1 μM 의 농도에서부터 형광이 감지되기 시작했으며, 카테콜, o-니트로페놀,

리소시놀(레조르시놀)은 각각 10 μ M, 10 μ M, 100 μ M의 농도에서부터 형광이 감지되는 것을 확인하였다(도 12 (가)). 위의 결과는 치환기의 종류나 위치에 따라 형광 감도가 다르게 나타나며, 다양한 페놀기질을 이용하는 경우 필요에 따라 적절한 측정범위를 나타내는 것을 선택적으로 이용할 수 있음을 보여주고 있다.

- [192] 재조합 유전자회로의 페놀류 유도체들에 대한 정량성 분석을 항생제 저항성 정도로 분석하였다. 이를 위하여 pGESS-Cm(II)을 함유하는 대장균 DH5 α 의 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린을 넣은 LB액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양 하였다. 배양한 세포를 앰피실린과 클로람페니콜이 각각 50 μ g/ml과 20 μ g/ml이 되게 첨가하고, 페놀, o-클로로페놀, o-크레졸, 2-아미노페놀, 살리실산, o-니트로페놀, 2-메톡시페놀, 카테콜을 0 ~ 1000 μ M 첨가한 LB 액체 배지에 접종한 후 37°C에서 18시간 동안 계속 배양하여 세포의 성장 여부를 관찰하였다. 그 결과, 클로람페니콜 저항성 유전자를 리포터로 한 경우에도 GFP 리포터의 경우와 유사하게 치환기의 종류나 위치에 따라 세포의 성장이 다르게 관찰되었다(도 12 (나)).

[193]

- [194] 4) 재설계 유전자회로의 페놀페수 이용 정량적 신호 분석

- [195] 페놀감지 유전자회로 pGESS-EGFP(I)의 정량성 신호 분석을 확인하기 위하여 다양한 페놀물질을 함유하는 페수에서 페놀계 화합물의 농도 분석을 시도하였다. 50 μ g/ml의 앰피실린을 첨가한 M9 액체 배지에 pGESS-EGFP(I)를 함유하는 대장균 DH5 α 의 단일콜로니를 접종하여 37°C에서 밤새 배양한 다음, 상기 배양액을 50 μ g/ml의 앰피실린이 첨가된 LB액체 배지에 1%(v/v) 되게 접종하고 배양액에 코크스 페수(상하이, 중국)를 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵배로 희석되도록 첨가한 후, 30°C에서 24시간 반응시켰다. 형광량은 세포파쇄후 상등액을 취해 형광광도계(Varian, 호주)로 분석하여 510 nm 파장에서 GFP의 형광값을 측정하였다(도 13 (가)). 대조군(CON)으로 코크스 페수 대신에 페놀을 0.1 ~ 1000 μ M을 첨가하여 동일한 방법으로 실험하였다(도 13 (나)).

- [196] 그 결과, 첨가한 페수액의 농도가 증가함에 따라 형광강도가 비례적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 대조군인 페놀을 첨가한 경우와 비교 했을 때, 코크스 페수에는 페놀계 화합물이 약 10 mM(약 940 ppm) 정도로 포함되어 있는 것으로 추정할 수 있었다. 이러한 결과는 페수를 GC/MS 분석의 결과와 일치하는 것으로, GC/MS 분석에서 페수에는 페놀, 2-메틸페놀, 3-메틸페놀, 2-니트로페놀, 3,5-디메틸페놀, 2,4-디메틸페놀이 각각 667.4ppm, 31.9ppm, 165.8ppm, 8.7ppm, 19.9ppm, 5.6ppm이 포함되어 있었다(도 13 (다)). 따라서 본 발명의 페놀감지 유전자회로를 이용하여 페놀물질의 농도에 비례하는 정량적 형광신호의 발생이 가능한 것으로 확인되었다.

[197]

- [198] 실시예 4: 재설계 유전자회로를 이용하여 외래 유전자의 세포내 효소활성의

감지

[199]

[200] 1) 재설계 유전자회로를 이용한 효소활성 감지

[201] GESS 유전자회로를 이용하여 대장균 유래 β -galactosidase, *C. freundii* 유래 tyrosine-phenol lyase(TPL), *Pseudomonas* sp. 유래 methyl parathion hydrolase(MPH) 활성을 감지하는 기술을 예시하였다.[202] 앞서 발명의 구성에서 기술한 바와 같이 페놀의 히드록실기에 글루코사이드를 연결한 페닐-글루코오스(phenyl- α/β -glycoside)를 기질로 사용하면 다양한 α/β -glycosidase 효소활성을 감지할 수 있다. 본 발명에서 pGESS-GFPUV(I) 유전자회로와 대장균 lacZ 유전자(β -galactosidase 활성)를 함유하는 pCC1FOS™ 벡터를 포함하고 있는 대장균 EPI300(Epicentre, 미국)의 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린과 25 μ g/ml의 클로람페니콜을 첨가한 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 동일한 조성의 LB 액체배지 10 ml에 상기 전배양액을 1%(v/v) 접종하고, 페놀-태그 기질인 0.1 mM phenyl- β -glycoside를 첨가하여 30°C에서 20시간 반응시킨 후 형광 발현 정도를 형광광도계로 확인하였다. 그 결과, β -galactosidase 활성을 보유하는 세포에서는 GFP의 형광이 관찰 되었으나, 도입하지 않은 세포에서는 형광이 관찰 되지 않아서 본 발명의 pGESS 유전자회로를 이용한 β -galactosidase 효소활성의 감지가 가능함을 확인하였다(도 14 (가)).[203] 본 발명의 GESS 유전자회로는 페놀이 탄소결합으로 연결된 기질들, 즉 Ph-C-(R)에서 페놀을 유리시키는 반응(phenol-lyase)의 감지방식으로도 이용될 수 있다. 본 발명에서는 페놀 잔기를 포함하는 티로신을 분해하여 페놀, 피루브산, 암모니아를 생성하는 효소인 TPL 활성을 감지하여 GESS의 유효성을 검증하고자 하였다. 즉 *C. freundii*의 TPL 유전자를 pEC11a(즉, pET11a(+))의 ori를 ACYC ori로 대체한 것)에 클로닝하여 pEC-TPL를 제조한 후, pGESS-EGFP(I)을 함유하고 있는 대장균 DH5 α 에 도입하였다.[204] 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린과 25 μ g/ml의 클로람페니콜을 첨가한 LB 액체 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 동일한 조성의 LB 액체배지에 1 mM IPTG(isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside)와 1 mM 티로신, 10 μ M PLP를 첨가하고 상기 전배양액을 1%(v/v) 접종하여, 30°C에서 20시간 반응시킨 후 형광 발현 정도를 형광광도계로 확인하였다. 그 결과 TPL활성에 의하여 세포파쇄액의 형광활성이 크게 증가되어 나타나서 본 발명의 활성감지기술이 phenol-lyase의 분석에도 유용한 것을 확인하였다(도 14 (나)).[205] 또한 본 GESS 기술은 광범위 살충제로 이용되는 유기인(organophosphate)을 분해하는 MPH 활성도 감지할 수 있음을 확인하였는데, MPH 유전자를 전기천공법으로 pGESS-EGFP(III)를 함유하고 있는 대장균 DH5 α 에 도입하고, 앞서 TPL의 경우와 동일한 방법으로 밤새 전배양 한 다음, MPH의 기질이 되는 페놀-태그 화합물인 메틸 파라티온을 각각 0.1 mM씩 배양액에 가하고 각 기질이

분해되어 생성된 p-니트로페놀을 재조합 유전자 회로가 감지하는지를 조사하였다. 형광량은 세포파쇄후 상등액을 취해 형광광도계(Varian, 호주)로 분석하여 510 nm에서 GFP의 방출 파장이 검출되는지 확인하였다. 그 결과, 메틸파라치온을 분해하지 못하는 대조군에서는 형광이 감지되지 않았으나, MPH(Methyl parathion hydrolase)가 존재하는 경우 형광이 강하게 감지되었다(도 14 (다)).

[206]

[207] 2) 재설계 유전자회로를 이용한 효소 활성 감지를 위한 형광 이미징, 유세포분석기, 및 항생제 내성 분석

[208] GESS를 이용하여 효소 활성 감지를 콜로니의 형광 이미지로 관찰하였다. TPL 유전자와 pGESS-EGFP(I)을 함유하는 재조합 대장균의 단일 콜로니를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린을 첨가한 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 위 전배양액을 10⁶배 희석하여 100 μl 를 취하여 1 mM 티로신, 10 μM PLP 그리고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 들어있는 LB 고체배지에 스트리킹하여 30°C에서 36시간 동안 배양 한 후 콜로니의 형광 이미지를 형광현미경(Nikon, 일본)으로 관찰하였으며 대조군으로는 TPL 유전자는 함유하지 않고 pGESS-EGFP(I)만 함유하고 있는 대장균 DH5 α 의 콜로니를 같은 방법으로 실험하여 관찰하였다. 그 결과 TPL 유전자가 없는 경우에는 형광이 관찰되지 않지만, TPL 유전자가 있는 경우에는 pGESS-EGFP(I) 함유 대장균의 콜로니 이미징이 관찰되었다(도 15 (가)).

[209] 이와 유사한 결과가 액체 상태의 시료를 형광유세포분석기(FACS)로 효소 활성을 분석한 경우에서도 볼 수 있었다. TPL 유전자와 pGESS-EGFP(I)을 함유하는 재조합 대장균과 대조군으로 TPL 유전자가 없지만 pGESS-EGFP(I)을 함유하는 재조합 대장균의 활성비교를 하였다. 각 콜로니를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린을 첨가한 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 위 전배양액을 1 mM 티로신, 10 μM PLP (pyridoxal-5'-phosphate)와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 들어있는 LB 액체배지에 1%(v/v) 되게 접종하여 30°C에서 20시간 진탕 배양하였다. 배양된 세포내 형광측정은 FACS Aria system (Becton Dickinson, 미국)으로 분석하였다. 그 결과, TPL 미보유 세포 시료에서의 형광 분포 양상보다 TPL을 보유하고 있는 시료에서의 형광 분포 양상이 형광강도가 증가된 오른쪽으로 이동하였음을 관찰할 수 있었다(도 15 (나)).

[210] GESS를 이용하여 효소 활성 감지를 항생제 저항성으로 관찰하였다. TPL 유전자와 pGESS-Tc(II)를 함유하는 재조합 대장균의 단일 콜로니를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린을 첨가한 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 배양액을 10⁶배 희석하여 100 μl 를 취하여 1 mM 티로신, 10 μM PLP, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 앰피실린, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 테트라사이클린이 들어있는 LB 고체배지에 도말하여 30°C에서 36시간 동안 배양 한 후 콜로니의 증식 양상을 관찰하였으며 대조군으로는 동일 전배양액을 테트라사이클린이 없는 고체배지에 도말하여

관찰하였다. 그 결과, 테트라사이클린이 없을 때에는 GESS의 선택성이 없어 콜로니가 배지 전체에 증식하지만, 테트라사이클린이 존재하는 경우에는 효소가 기질을 분해하여 페놀을 생성하는 콜로니들만 생존이 가능하므로, 효소 활성 측정 시 GESS의 선택적 감지능을 확인할 수 있었다(도 15 (다)).

[211] 위 실험으로 GESS시스템은 고체배지 혹은 액체배지를 통하여 탐색이 가능하며 형광단백질뿐만 아니라 항생제 저항성 단백질을 리포터로 사용하여 고속으로 효소활성이 가능함을 보여주었다.

[212]

[213] 3) 재설계 유전자회로(GESS)의 정량성 검증

[214] 효소활성이 다른 경우에 GESS를 이용하여 정량적으로 탐색이 가능한지에 대하여 조사하였다. 효소는 *Citrobacter freundii* 유래 tyrosine-phenol lyase(TPL(C))와 *Symbiobacterium toebii* 유래 tyrosine-phenol lyase(TPL(S))를 사용하였고 효소가 들어있지 않는 대장균을 대조군으로 사용하였다. pGESS를 이용한 효소활성 측정값과 HPLC를 이용하여 분석된 페놀 생성값을 비교함으로써 유의성을 판단하였다.

[215] 실험방법은 다음과 같다. psHCE 벡터(즉, pSTV28(Takara, 일본)에 *Cla* I과 *Tth*111 I을 처리후 pHCEIIB(Takara, 일본) 유래의 HCE 프로모터와 종결인자를 삽입한 것)에 도입되어 있는 TPL(C), TPL(S)와 대조군 psHCE 벡터를 pGESS-EGFP(II)가 들어있는 대장균 DH5 α 에 형질전환시킴으로써 효소활성보유 균주를 준비하였다. 각 콜로니를 50 μ g/ml의 앰피실린과 12.5 μ g/ml의 클로람페니콜이 첨가된 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양하였다. 배양액을 1 mM 티로신, 10 μ M PLP (pyridoxal-5'-phosphate), 50 μ g/ml의 앰피실린과 12.5 μ g/ml의 클로람페니콜이 들어있는 M9 액체배지에 1%(v/v) 되게 접종하여 37°C에서 12시간 진탕 배양하였다. 균주 성장은 UV/VIS 분광기(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, 스웨덴)를 사용하여 흡광도(OD₆₀₀)를 측정함으로써 예측하였고 형광세기는 형광플레이트리더기(Multi-label reader, PerkinElmer, 미국)를 사용하였다.

[216] 효소활성측정은 위와 동일하게 씨드세포를 준비한 후, 50 μ g/ml의 앰피실린과 12.5 μ g/ml의 클로람페니콜이 첨가된 LB 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 배양액에서 세포를 원심분리(5000 rpm, 10분)를 통하여 회수하고 50 mM Tris-HCl버퍼(pH 7.5)를 사용하여 1회 세척하였다. 세포는 초음파분쇄기(방법: 3초 파쇄, 3초 정지, 3분 동안, 20% 세기, Vibra cell, Sonics, 미국)를 이용하여 완전히 파쇄하였다. 효소반응은 100 mM potassium phosphate(pH 8.0)에서 1 mM 티로신, 100 μ M PLP과 세포파쇄액(1 mg/ml)로 첨가하여 37 °C에서 12시간동안 진행하였다. 효소활성측정은 HPLC(SCL-10A vp, Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 컬럼은 C18 reverse column(C/N. 18R03, Chemco Pak, Japan), 버퍼는 50:50 Acetonitrile-Water를 사용하였다.

[217] 도 16의 (가)는 pGESS로 분석된 TPL(C), TPL(S), psHCE의 활성을 나타내

그림이다. TPL(C)의 활성이 TPL(S)보다 약 2.5배 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 다음으로는 효소반응후, HPLC를 이용하여 분석된 페놀의 생성량을 비교하였다(도 16 (나)). pGESS의 결과와 마찬가지로 TPL(C)의 활성이 TPL(S)보다 약 2.5배 활성이 높은 것은 확인하였다. 두 개의 결과는 pGESS를 이용하여 다양한 효소활성을 지니는 효소들에 대하여 정량적으로 분석이 가능함을 보여주고 있다.

[218]

[219] 실시예 5: 페놀 감지능을 높이기 위한 배지 및 영양성분(탄소원) 최적화

[220]

[221] 본 발명에 따른 재설계 유전자회로에 있어서, 전사조절 단백질인 본 발명에서의 페놀계 화합물 분해효소 조절단백질은 σ^{54} 의존성으로서 배지성분 혹은 균주의 영양상태는 재설계 유전자회로의 페놀 감지능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Sze *et al.*, (1996) *J. Bacteriol.* 178: 3727-3735). 페놀 감지능을 최적화시키기 위하여 배지의 영양상태에 따른 감지능을 조사하고 영양성분(탄소원)에 따른 감지능을 조사하여 최적의 배지를 선별하였다.

[222] 첫째로, 액체배지의 영양상태에 따른 세포성장과 및 형광세기(감지능)를 조사하였다. 균주로는 상기 실시예 1에서 제작된 pGESS-EGFP(II)로 형질전환된 대장균 DH5 α 를 사용하였고 배지로는 LB(1리터당 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g), M9(1리터당 Na₂HPO₄·7H₂O 12.8 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.4%(w/v) Glucose, 0.01%(w/v) thiamine)배지를 사용하였다. 각 배지에는 0.1 mM 페놀을 첨가하여 상기 재설계 유전자회로(pGESS-EGFP)의 형광발현을 유도하였다. 접종균주의 상태를 건강하게 만들기 위해, 균주를 하루 전날 LB배지에 콜로니 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양시킨 후, 배양 당일 LB배지에 배양액 3%(v/v)를 접종하고 2시간정도(OD₆₀₀/ml = 0.3 ~ 0.4) 배양시켜 균주의 상태를 대수기(exponential phase)초기상태로 준비하였다. 준비된 균주배양액 1%(v/v)를 0.1 mM 페놀이 들어있는 LB배지 혹은 M9배지에 접종하여 30°C에서 진탕 배양시켰다. 각 배지에는 선별마커로서 50 μ g/ml 앰피실린이 첨가되었다. 배양 진행중 일정시간 간격으로 배양액을 샘플링하여 세포성장 및 형광세기를 조사하였다. 균주 성장은 UV/VIS 분광기(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, 스웨덴)를 사용하여 흡광도(OD₆₀₀)를 측정함으로써 예측하였고 형광세기는 형광플레이트리더기(Multi-label reader, PerkinElmer, 미국)를 사용하였다. 그 결과, 균주성장은 복합배지인 LB배지가 좋았으나(도 17 (가)), 본 발명에 따른 형광세기(감지능)는 M9배지에서 좋은 것으로 관찰되었다(도 17 (나)).

[223] 둘째로, M9배지에서의 영양성분(탄소원)에 따른 세포성장 및 형광세기(감지능)를 조사하였다. 균주로는 pGESS-EGFP(II)로 형질전환된 대장균 DH5 α 를 사용하였고 기본배지로는 M9(Na₂HPO₄·7H₂O 12.8 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.01%(w/v) thiamine)배지를

사용하였다. 탄소원으로는 글루코오스(glucose), 글라이세롤(glycerol), 석시네이트(Na-succinate), 아세테이트(Na-acetate)가 M9배지에 동일 농도(0.4%(w/v))로 각각 첨가되었다. 각 배지에는 0.1 mM 페놀을 첨가하여 유전자회로의 형광발현을 유도하였다. 균주를 하루전날 LB배지에 콜로니 접종하여 37°C에서 밤새 진탕배양시킨 후, 배양 당일 LB배지에 배양액 3%(v/v)를 접종하고 2시간정도($OD_{600}/ml = 0.3 \sim 0.4$) 배양시켜 균주의 상태를 대수기(exponential phase)초기상태로 준비하였다. 균주배양액 1%(v/v)를 0.1 mM 페놀이 들어있는 LB배지 혹은 M9배지에 접종하여 30°C에서 진탕배양시켰다. 각 배지에는 선별마커로서 50 $\mu g/ml$ 앰피실린이 첨가되었다. 배양 진행중 일정시간 간격으로 배양액을 샘플링하여 세포성장 및 형광세기를 조사하였다. 균주 성장은 UV/VIS 분광기를 사용하여 흡광도(OD_{600})를 측정함으로써 예측하였고 형광세기는 형광플레이트리더기를 사용하였다. 그 결과, 균체성장(OD_{600})은 글루코오스가 첨가된 배지에서 가장 빨랐고, 글라이세롤이 첨가된 배지에서의 성장이 제일 높았다(도 18 (가)). 형광세기(감지능)는 아세테이트가 첨가된 배지에서 성장속도가 느린 대신 재설계 유전자회로의 반응성(형광세기)이 가장 높았다(도 18 (나)).

[224]

[225] 실시예 6: 페놀 감지능을 높이기 위한 2단계(생장-분석단계 분리) 활성 분석

[226]

[227] 본 발명에서는 페놀성분에 대한 유전자회로의 감지능을 향상시키기 위하여 실시예 5에서 선정된 최적배지 및 탄소원에서 유전자회로 반응을 진행하고 균주생장과 유전자회로 활성화(분석) 단계를 분리함으로써 감지시스템의 최적화를 시도하였다. 즉, 성장시에는 LB배지를 사용하여 균체의 상태를 건강하게 만들고, 이를 회수하여 아세테이트를 탄소원으로 제공한 M9배지에서 유전자회로의 활성분석을 진행하였다.

[228] 첫째로, LB배지에서 균체배양 중 어느 성장단계에서 균체를 회수할 것인지에 대해서 조사하였다. 균주로는 페놀유리 효소반응을 진행시키기 위하여 티로신(L-tyrosine)을 분해시키는 효소인 티로신페놀리아제(phenol-tyrosine lyase)의 유전자가 도입되어 있는 대장균 DH5 α 균주와 대조균으로서 티로신페놀리아제의 유전자가 없는 대장균 DH5 α 균주를 사용하였다. 또한, 두 균주에는 유전자회로(pGESS-EGFP(II))가 동일하게 도입되어 있다. 구체적으로, 상기 균주들의 제작과정은 *C. freundii*의 TPL 유전자(GenBank: X66978.1)를 psHCE에 클로닝하여 psHCE-TPL를 제조한 후, 실시예 1에서 제작된 pGESS-EGFP(II)가 도입된 대장균 DH5 α 에 도입하였다.

[229] 상기 균주는 하루 전날 LB배지에 콜로니 접종하여 37°C에서 밤새 진탕배양시킨 후, 배양액 1%(v/v)를 LB배지에 다시 접종하여 37°C에서 진탕배양시키고 각 시간대별로 회수하여 유전자회로 활성화를 진행하였다. 유전자회로 활성화는 회수한 균체를 M9배지로 한번 씻어내고 기질인 1 mM

티로신과 10 μM PLP(pyridoxal 5'-phosphate)가 들어있는 M9(아세테이트)배지에 부유화시켜 30°C에서 16시간 동안 진탕시키면서 진행하였다. 각 배지에는 선별마커로서 50 $\mu\text{g/ml}$ 앰피실린과 25 $\mu\text{g/ml}$ 콜로람페니콜이 첨가되었다. 세포농도는 UV/VIS 분광기를 사용하였고 형광의 세기는 형광플레이트리더기를 사용하였다. 확인 결과, 세포의 성장($\text{OD}_{600/\text{ml}}$)이 약 1.5 ~ 4 사이일 때 회수하는 것이 안정적으로 효소반응을 진행하는 것으로 관찰되었다(도 19 (가)).

[230] 둘째로, M9 배지에서는 효소반응 활성화 단계를 얼마 동안 지속해야하는 지에 대해서 조사하였다. 조사방법으로는 상기 동일한 균주들을 사용하였고 LB배지에서 세포성장($\text{OD}_{600/\text{ml}}$)이 약 3 정도일 때(6시간 배양) 회수하여 상기한 방법으로 세척과 효소반응을 진행하였다. 유전자회로 활성화 단계 중 시간대 별로 샘플링하여 세포의 농도 및 형광의 발현정도를 측정하였다. 세포농도는 UV/VIS 분광기를 사용하였고 형광의 세기는 형광플레이트리더기를 사용하였다. 조사 결과, 효소반응이 충분히 진행되는 시간은 14 ~ 16시간임을 알 수가 있었다(도 19 (나)).

[231] 셋째로, 2단계(성장-분석단계 분리) 활성화 분석을 통하여 폐놀에 대한 감지능이 얼마나 향상되었는지를 확인하였다. 조사방법으로는 유전자회로가 도입되어 있는 콜로니를 하루전날 LB배지에 콜로니 접종하여 37°C에서 밤새 진탕배양시킨 후, 배양액 1%를 LB배지에 다시 접종하여 37°C에서 진탕배양시키고 세포성장($\text{OD}_{600/\text{ml}}$)이 약 2.5 정도일 때에 배양세포를 회수하여 유전자회로 활성화를 진행하였다. 유전자회로 활성화는 회수한 균체를 M9배지로 한번 씻어낸 후 다양한 농도의 폐놀이 들어있는 M9(아세테이트)배지에 부유화시켜 30°C에서 16시간 동안 진탕시키면서 진행하였다. 각 배지에는 선별마커로서 50 $\mu\text{g/ml}$ 앰피실린이 첨가되었다. 각 농도별 폐놀에 의하여 유도된 세포내 형광량은 FACS Aria system (Becton Dickinson, 미국)으로 분석하였다. Detector로는 FSC, SSC, FL1-H (excitation = 488 nm, emission = 530/30 nm) detector를 감지하도록 세팅하였고, 50,000개의 표본세포를 관찰한 데이터를 FACSDiVa (Becton Dickinson, 미국)로 분석하였다(도 19 (다)).

[232] 그 결과, 2단계 활성분석에 의하여 최소 1 μM 의 폐놀을 감지할 수 있었으며, 정량적으로 분석할 수 있는 범위는 1 ~ 10 μM 으로, 이것은 이전보다 약 10배 정도 증가되었으며 반응값은 약 5배정도 증가된 결과이다(도 19 (라)).

[233]

[234] 실시예 7: 재설계 유전자 회로 (GESS)의 민감도 및 인식 특이성 개량

[235]

[236] 상기 실시예들에서 언급하였다시피, 폐놀성분에 대한 유전자회로의 감지능을 향상시키고자 최적배지 및 탄소원을 선정하였고 균주생장과 유전자회로 활성화(분석) 단계를 분리하는 2단계 방법을 개발함으로써 유전자회로 반응조건의 최적화를 수행하였다. 다음으로는 유전자회로의 민감도 및 인식특이성을 개선하기 위하여 재설계 유전자회로의 개량을 수행하였다. 즉,

para nitrophenol에 대한 친화성이 증가된 변이단백질 dmpR(E135K)를 채용하는 유전자회로(pGESS-EGFP(III))를 새로이 개발(실시예 1)하고 최적화된 반응조건에 적용하였다.

- [237] 상기 pGESS-EGFP(II) 혹은 pGESS-EGFP(III) 유전자회로가 도입되어 있는 콜로니를 하루전날 LB배지에 콜로니 접종하여 37°C에서 밤새 진탕배양시킨 후, 배양액 1%를 LB배지에 다시 접종하여 37°C에서 진탕배양시키고 세포성장(OD_{600} /ml)이 약 2.5 정도일 때에 배양세포를 회수하여 유전자회로 활성화를 진행하였다. 유전자회로 활성화는 회수한 균체를 M9배지로 한번 씻어낸 후 다양한 농도의 페놀이 들어있는 M9(아세테이트)배지에 부유화시켜 30°C에서 16시간 동안 진탕시키면서 진행하였다. 각 배지에는 선별마커로서 50 μ g/ml 앰피실린이 첨가되었다. 균주 성장은 UV/VIS 분광기(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, 스웨덴)를 사용하여 흡광도(OD_{600})를 측정함으로써 예측하였고 형광세기는 형광플레이트리더기(Multi-label reader, PerkinElmer, 미국)를 사용하였다. 실험결과 mutant dmpR을 채용하였을 때 페놀을 정량적으로 감지할 수 있는 농도는 약 0.1 ~ 10 μ M이었으며 wild dmpR에 비해 약 10배정도 민감도가 증가하였으며 정량범위도 약 10배정도 증가하였다(도 20 (가)).
- [238] 다음으로는 2-nitrophenol과 4-nitrophenol에 대한 감지능 측정을 수행하였다. 실험방법은 위와 동일하게 수행되었으며 페놀외에 다양한 농도의 2-nitrophenol과 4-nitrophenol이 첨가되어 유전자회로와 반응하였다. 실험결과 민감도는 페놀이 가장 좋았으며 4-nitrophenol, 2-nitrophenol의 순으로 좋았으며 세 페놀류 모두 0.1 ~ 10 μ M의 페놀을 정량적으로 감지가 가능하였다(도 20 (나)).
- [239]
- [240] 실시예 8: 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*) 유래 게놈라이브러리에서 티로신페놀리아제(tyrosine phenol-lyase) 유전자의 고속탐색
- [241]
- [242] 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*)는 그람음성균 박테리아로서 염색체내에 티로신을 분해시키는 효소인 티로신페놀리아제(tyrosine phenol-lyase) 유전자가 존재하고 있음은 이미 보고된 바 있다(Klick *et al.*, (1988) *Biochemistry* 27(19): 7333-7338; Demidkina *et al.*, (1988) *FEBS Lett.* 232(2): 381-382; Chen *et al.*, (1993) *Biochemistry* 32(43): 11591-11599). 시트로박터 프레운디 유래 티로신페놀리아제는 TyrR에 의하여 유도되는 유도발현 단백질로서 비활성(specific activity)이 약 1.9로서 매우 활성이 낮으며(Chen *et al.*, (1995) *Eur. J. Biochem.* 229(2): 540-549; Lee *et al.*, (2006) *FEBS J.* 273: 5564-5573), 낮은 카피수의 포스미드백터를 기반으로 하는 라이브러리에서 티로신페놀리아제를 탐색하기 위해서는 고감도의 탐색 시스템이 요구된다.
- [243] 본 실시예에서는, 시트로박터 프레운디 유래 게놈라이브러리에서 본 발명에 따른 GESS 시스템 재설계 유전자회로를 이용하여 저활성의 티로신페놀리아제를 고속으로 탐색함으로써, 본 발명에 따른 방법의 민감성 및

효율성을 검증하고자 하였다.

- [244] 시트로박터 프레운디 유래 게놈라이브러리는 (주)솔젠트에 의뢰하여 제작되었으며, 게놈라이브러리의 다양성은 약 6.5×10^3 정도였다. 전체 염색체 크기를 약 5 Mb 정도라고 가정하였을 때 포스미드벡터에 도입되는 염색체단편의 크기가 약 30 kb이므로 제작된 라이브러리는 시트로박터 프레운디의 전체 염색체를 다 포함하고 있는 것으로 판단되었다.
- [245] 대장균 EPI300 균주(Epicentre, 미국)에 상기 실시예 1에서 제작된 재설계 유전자회로(pGESS-GFPUV(I))와 상기 제작된 게놈라이브러리를 전기천공법(electroporation)으로 순차적으로 형질전환시켜 고속탐색이 가능한 라이브러리로 제작하였다. 제작된 라이브러리는 저장버퍼로 회수한 다음, 약 10^{10} cells/ml의 농도로 농축시키고 1.5 ml 튜브에 0.5 ml씩 분주하여 극저온냉장고(deep freezer)에 보관하였다.
- [246] 극저온냉장고에 저장되어 있는 메타게놈 라이브러리를 3 ml의 LB배지에 1%(v/v)(약 10^8 cells)을 접종하고 37°C에서 12시간 배양하여 건강한 상태의 라이브러리를 준비하였다. 고속탐색은 기질인 1 mM 티로신과 10 μ M PLP(pyridoxal 5'-phosphate)가 들어있는 LB 고체배지를 사용하였다. 또한 배지에는 포스미드벡터내에 도입된 내부 유전자의 발현율을 높이기 위하여 1x Copy-control 용액과 선별마커로서 50 μ g/ml 앰피실린과 12.5 μ g/ml 콜로람페니콜이 첨가되었다. 고체배지 플레이트에 약 2 ~ 300개의 콜로니(총 1000개 콜로니)가 생성되도록 배양액을 적당히 희석하여 도말하고 30°C에서 48시간 배양하여 세포내 효소반응 및 형광발현이 나타나도록 유도하였다. 형광콜로니는 이미지분석기(Gel Doc 2000 gel documentation system, Bio Rad, 미국)를 이용하여 관찰하였고 이미지 분석은 이미지전용프로그램(Quantity One, Bio Rad, 미국)를 사용하였다(도 21 (가)).
- [247] 탐색 결과, 약 천개의 콜로니 중 형광보유클론으로 추정되는 7개의 콜로니가 선택되었고 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 유전자를 확인한 결과 2개의 콜로니 내에 티로신페놀리아제의 유전자가 도입되어 있음을 확인하였다(도 21 (나)).
- [248] 시트로박터 프레운디의 전체 염색체가 5 Mb라고 가정하였을 때, 포스미드벡터에는 약 30 kb의 유전자가 도입되므로 티로신페놀리아제가 탐색될 확률은 0.6%(6/1000 clones)로 추정되었다. 실제 GESS시스템을 이용하여 탐색된 확률은 0.2%(2/1000 clones)으로서, 추정된 수치와 비슷한 결과를 보여주었다.
- [249] 따라서, 본 발명에 따른 GESS 시스템을 이용함으로써, 포스미드벡터에 클로닝된 단일카피의 티로신페놀리아제에 대해서도 고감도 탐색이 가능하였으며, 추정된 확률과 비교하였을 때도 활성클론 히트확률이 낮지 않아 본 발명에 따른 GESS 기술이 메타게놈 유래 유용 유전자의 탐색에 효율적으로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[250]

- [251] 실시예 9: 유류오염토양 유래 메타게놈 라이브러리 제작
- [252]
- [253] 메타게놈 라이브러리의 구성을 위하여, 유류오염토양 유래의 미생물 군집(기탁번호 KCTC 11077BP)을 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 입수하여 이로부터 전체 게놈 DNA를 분리한 후, 물리적 방법을 이용하여 게놈 DNA를 적당한 크기로 절단하였다. 절단된 게놈 DNA 절편들의 크기를 0.4% 아가로스젤을 이용하여 확인한 결과, 다양한 크기로 게놈 DNA가 절단되었음을 확인하였다. 다양한 크기로 절단된 게놈 DNA를 말단-리페어 효소반응액(end-repair enzyme mix)을 이용하여 Blunt-end로 만든 후, 전기영동을 하여 약 30 kb 정도 크기의 말단-리페어된 DNA를 젤로부터 회수하여 메타게놈라이브러리를 구성하기 위한 DNA 절편으로 사용하였다. 약 30 kb 정도의 DNA 절편을 pCC1FOS 벡터(Epicentre, 미국)와 접합시킨 후, 패키징추출액(packaging extract)을 이용하여 포스미드클론을 패키징(packaging)하였다. 포스미드클론을 패키징한 파아지(phage)를 대장균 EPI300(Epicentre, 미국)과 섞은 후, 37°C에서 45분간 정치시킴으로써 파아지의 감염(infection)을 유도하였다. 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 클로람페니콜(chloramphenicol)이 첨가된 LB배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agar 1.5 g)에 도말한 후, 37°C에서 30 ~ 40시간 충분히 배양하고 균체의 수를 측정하여 전체 라이브러리의 크기를 계산하였다. 얻어진 메타게놈라이브러리의 다양성은 약 8×10^4 정도였다(도 22 (가)).
- [254] 위와 같은 방법으로 확보한 메타게놈라이브러리의 전체 크기는 약 400 Mb 정도로서 미생물의 평균 유전체 크기를 각 4 Mb 정도라고 가정할 때 약 100종 이상의 게놈정보를 가지고 있는 메타게놈라이브러리인 것으로 판단되었다.
- [255] 전체 메타게놈라이브러리를 확인하기 위하여, 5개의 단일 균체를 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 클로람페니콜과 1× Copy-control 용액(Epicentre, 미국)이 첨가된 LB액체배지(1리터당 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g)에서 5시간 동안 진탕배양한 후, DNA를 분리하여 *Bam*HI와 *Eco*R I으로 완전히 절단하여 포스미드벡터 내에 첨가된 DNA절편을 확인하였다. DNA절편의 크기를 모두 합하고 포스미드벡터 크기를 제한 결과, 포스미드벡터에 첨가된 DNA 절편의 크기는 약 27 ~ 35 kb 정도였으며 평균 크기는 약 30 kb 였다(도 22 (나)).
- [256]
- [257] 실시예 10: 환경 유래 메타게놈에서 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase)의 고속탐색
- [258]
- [259] 상기 실시예 9에서 제작된 메타게놈라이브러리에 상기 실시예 1에서 제작된 pGESS-GFP_{UV}(I)를 전기천공법(electroporation)을 사용하여 도입하여, GESS 시스템을 이용한 포스파타아제(phosphatase)의 고속탐색을 시도하였다(도 23).
- [260] pGESS-GFP_{UV}(I)를 도입한 메타게놈라이브러리는 저장버퍼(1리터당 1× TY배지(tryptone 8 g, yeast extract 5 g, NaCl 2.5 g), 15%(v/v) glycerol, 2%(v/v)

glucose)로 약 10^{10} cells/ml의 농도로 농축시키고 1.5 ml 튜브에 0.5 ml씩 분주하여 극저온냉장고(deep freezer)에 보관하였다.

- [261] 극저온냉장고에 저장되어 있는 pGESS-GFPUV(I)를 도입한 메타게놈라이브러리를 10 ml의 LB배지에 1%(v/v)(약 10^8 cells)을 접종하고 37°C에서 12시간 배양하여 건강한 상태의 라이브러리를 준비하였다. 2 ml LB배지에 균체배양액 1%(v/v) 접종하고, 37°C에서 세포농도(OD_{600}/ml)가 2.5 ~ 3 정도될 때(약 5 ~ 6시간)까지 배양한 다음 원심분리(4000 rpm, 10분)를 통하여 라이브러리를 회수하였다. 라이브러리의 세척은 M9배지(1리터당 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 12.8 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g, 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.4%(w/v) Glucose, 0.01%(w/v) thiamine)를 사용하였으며, 원심분리(4000 rpm, 10분)와 부유화과정을 통해 세척을 진행하였다. 그 다음, 기질없이도 형광발색이 나타나는 거짓양성클론(false positives clone)를 제거하기 위하여, 페닐포스파이트(phenyl phosphate)가 첨가되지 않은 M9배지로 부유화시키고, 30°C에서 16시간 동안 진탕하였다. 각 배지에는 1× Copy-control 용액과 선별마커로서 50 $\mu g/ml$ 앰피실린과 12.5 $\mu g/ml$ 콜로람페니콜이 첨가되었다. 진탕후 형광유세포분석기(FACSSaria, BD, 미국, 407 nm violet laser, BP Filter 530/30)를 통하여 거짓양성클론(형광클론)을 피하여 형광이 나오지 않은 10^6 cells을 회수하였고, 이를 다시 LB 배지에 접종하여 37°C에서 12시간 이상 배양하였다.
- [262] 다음은 기질인 페닐포스파이트에 의하여 형광이 나타나는 후보군을 탐색하기 위한 실험을 진행하였다. 2 ml LB배지에 회수한 균체배양액 1%(v/v) 접종하고, 37°C에서 세포농도(OD_{600}/ml)가 2.5 ~ 3 정도될 때(약 5 ~ 6시간)까지 배양한 다음, 원심분리(4000 rpm, 10분)를 통하여 라이브러리를 회수하였다. 라이브러리의 세척은 M9배지를 사용하였으며 원심분리(4000 rpm, 10분)와 부유화과정을 통해 세척을 진행하였다.
- [263] 그 다음, 1 mM 페닐포스파이트가 첨가된 M9 배지로 부유화시키고 30°C에서 16시간 진탕시킴으로써 세포내 효소반응을 진행하였다. 각 배지에는 1× Copy-control 용액과 선별마커로서 50 $\mu g/ml$ 앰피실린과 12.5 $\mu g/ml$ 콜로람페니콜이 첨가되었다. 효소반응후 형광유세포분석기를 통하여 형광라이브러리의 형광패턴을 분석하고, 형광이 강하게 나오는 200개의 균체들을 회수하였다.
- [264] 그 다음은, 회수한 균체들 중에서 기질이 첨가된 고체배지에 도말하여 형광이 강하게 나오는 콜로니를 선별하였다. 형광유세포분석기를 사용하여 회수된 균체들을 1 mM 페닐포스파이트가 들어있는 LB 고체배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양하여 충분히 형광발현을 유도하였다. 포스미드벡터에 도입된 메타게놈 라이브러리의 발현율을 높이기 위하여, 배지에는 1× Copy-control 용액과 선별마커로서 50 $\mu g/ml$ 앰피실린과 12.5 $\mu g/ml$ 콜로람페니콜이 첨가되었다. 형광콜로니는 이미지분석기(Gel Doc 2000 gel documentation system,

Bio Rad, 미국)를 이용하여 관찰하였고 이미지 분석은 이미지전용프로그램(Quantity One, Bio Rad, 미국)를 사용하였다. 배양결과, 47개의 콜로니가 생성되었으며 그 중에서 형광이 강하게 발현되는 것으로 추정되는 6개의 콜로니를 선별하였다.

- [265] 분리된 클론의 효소활성을 검증하기 위하여, 발색기질인 5-브롬-4-클로로-3-인돌리 포스파이트(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)를 사용하였다. 이 기질은 분자생물학 연구에 자주 쓰이는 X-gal과 동일한 발색인자를 가지고 있는 물질로서 인분해효소의 활성을 발색으로써 인지할 수 있다. 20 $\mu\text{g/ml}$ BCIP가 첨가된 LB고체배지에 선별된 균주들을 스트리킹(streaking)하고, 30°C에서 하룻동안 배양시켰다. 발색여부를 조사한 결과, 발색이 나타나는 하나의 클론을 선별하였다.
- [266] 선별된 클론을 LB배지에 다시 배양하고 상기 동일한 효소반응 작업을 진행하여 형광스펙트럼을 조사하였다. 형광분석을 위해서 효소반응이 진행된 균체를 원심분리(4000 rpm, 10분)를 통해 회수한 다음, PBS버퍼로 한번 세척하고, CellLytic B(Sigma, 미국), 20 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme(Sigma, 미국), DNAase I(Roche, 스위스) 첨가를 통해 세포벽의 용해를 진행하였다. 원심분리(15000 rpm, 15분)를 통해 찌꺼기들을 가라앉히고 상등액만을 추출하여 형광분광기(Fluorometer, varian, 호주)를 통하여 형광스펙트럼(excitation 385 nm)을 분석하였다. 분석결과 510 nm에서 형광이 나오는 것을 확인하였으며, 유전자회로만 있는 대조군에 비해서 형광이 강하게 나오고 있음을 확인하였다.
- [267]
- [268] 실시예 11: 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase) 활성 유전자의 회수 및 분리
- [269]
- [270] 실시예 10에서 선별된 알칼린 포스파타아제 유전자를 포함하는 포스미드클론에서 DNA를 추출하여 *Not* I 제한효소를 절단한 후 펄스-필드 젤 전기영동(pulse-field gel electrophoresis, PFGE) 분석을 하였다. 그 결과, 포스미드벡터 안에 약 37 ~ 40 kb의 유전자가 삽입되어 있음을 확인하였다.
- [271] 50 $\mu\text{g/ml}$ 앰피실린을 포함하는 LB배지에 접종하여 pGESS-GFPUV(I)가 없는 것을 확인한 후, 재선별된 알칼린 포스파타아제의 유전자를 포함하고 있는 대장균 EPI300을 1× Copy-control 용액이 첨가된 100 ml의 LB액체배지에 접종하여 37°C에서 5시간 배양하여 회수한 후 미디프랩키트(midi-prep kit, Qiagen, 미국)로 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 *Not* I 제한효소로 절단하여 PFGE를 한 다음, 포스미드벡터를 제외한 37 ~ 40 kb의 내부유전자를 분리 정제하였다. 다음으로, DNA 절단기(Hydroshear, Gene Machines, 미국)를 이용하여 절단된 DNA의 크기가 약 3 ~ 7 kb 정도 되는 분획을 회수하여 인산화반응을 수행하였다. 벡터로는 pSTV28(Takara, 일본) 플라스미드를 사용하였고, *Bam*H I으로 절단한 벡터와 상기 인산화한 내부유전자를 접합시킨

다음 대장균 DH10B(Takara, 일본)에 전기천공법으로 삽입하여 샷건 라이브러리를 제작하였다. 전체 라이브러리의 다양성은 약 4×10^4 로 포스미드벡터에 도입된 내부유전자의 크기가 약 40 kb인 것을 고려할 때, 라이브러리 내에는 선별된 포스미드클론의 내부유전자의 전체를 포함하고 있는 것으로 판단되었다. 이 샷건 라이브러리를 pGESS-GFP_{UV}(I)를 함유하고 있는 대장균 DH5 α 에 도입하고, 상기 재조합유전자회로(pGESS-GFP_{UV}(I))를 이용한 탐색법 및 발색기질(BCIP)법을 병용하여 알칼린 포스파타아제 활성을 지니는 클론 6종을 최종적으로 선별하였다.

[272]

[273] 실시예 12: 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase)의 염기서열 및 상동성 비교

[274]

[275] 알칼린 포스파타아제 활성을 보이는 6개의 클론을 대상으로 염기서열분석을 수행하였다. 분석결과 각 클론의 내부유전자 크기는 약 2.2 ~ 5.4 kb로, 6개중 2개 클론은 동일한 것이었고, 약 3 kb의 클론들은 가장 큰 5,428 bp의 내부유전자를 가지는 클론에 모두 포함되고 있었다. 가장 큰 클론의 염기서열을 분석한 결과(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), *Sphingopyxis alaskensis* RB2256의 genome 중 nucleotide pyrophosphatase를 포함한 약 5 kb 서열들과 높은 상동성을 보였으며 nucleotide pyrophosphatase와는 약 79%의 상동성(identities = 1455/1835 (79%))을 보였다. 이를 근거하여 인분해효소의 크기를 추정해 보면, 1,824 bp(서열번호 2)와 607개의 아미노산(서열번호 1)으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 본 발명에서는 상기 단백질을 알칼린 포스파타아제 Pho로 명명하였다. 또한, 아미노산 서열을 기반으로 하여 blast 검색후 디스턴스 트리(distance tree)에 의해 상동성을 분석한 결과, 주로 포스포디에스테라아제(phosphodiesterase)와 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 높은 상동성을 나타내고 있었다(도 24).

[276]

참고로, *Sphingopyxis alaskensis* RB2256은 알라스카스 심해에 분포하는 저온성 미생물(4 ~ 10°C)로서 북해와 북태평양에서 대량으로 존재하고 있으며 바다 뿐만 아니라 육지에서도 광범위하게 발견되는 미생물인 것으로 알려져 있다. 영양분이 결핍되어 있는 심해에서 성장하기 위해서는 미세농도의 영양분을 효율적으로 흡수할 수 있어야 한다. 이를 위해서 *Sphingopyxis alaskensis*는 부피당 표면적이 넓은 미세사이즈의 몸집(0.1 μm^3 이하)을 가지고 있으며, 미세영양분에 대해 친화성이 높고 다양한 영양분을 이용할 수 있는 시스템을 가지고 있어 세포생물학에서 주목을 받고 있는 균주이다.

[277]

[278] 실시예 13: 신규 알칼린 포스파타아제의 효소특성 분석

[279]

[280] 선별된 알칼린 포스파타아제의 최적 pH 및 온도, 열안정성, 기질 특이성, 금속이온에 대한 영향을 조사하였다. 효소반응은 다음과 같이 진행하였다.

효소반응액으로 50 mM 디에탄올아민(diethanolamine, DEA(pH 9.0))버퍼, 0.5 mM 파라니트로페닐포스파이트(para-nitrophenylphosphate, pNPP) 및 상기 효소액을 혼합하여 사용하였으며 37°C에서 5분 동안 효소반응을 진행하였다. 동량의 1M NaOH를 첨가하여 효소반응을 정지하였고 효소반응에 의해 생산되는 니트로페놀의 발생량을 측정하였다. 측정은 형광플레이트 리더기(Victor5, Perkin-Elmer, 미국)를 이용하여 405 nm의 흡광도의 증가를 확인하였다. 1 unit은 37°C에서 분당 1 μmol 의 파라니트로페놀(para-nitrophenol)을 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

[281] (1) pH 및 온도에 대한 특성 조사

[282] 신규 알칼린 포스파타아제의 최적 pH를 조사하기 위하여, pH 7.0 ~ 10.5 사이에서의 활성을 비교하였다. pH 7.0 ~ 8.5는 50 mM Tris-HCl버퍼를 사용하였으며 pH 7.5 ~ 10.5는 50 mM DEA버퍼를 사용하였다. 실험결과 pH 9.0에서 활성이 가장 높은 것으로 나타났다(도 25 (가)).

[283] 또한, 효소의 온도에 따른 활성을 비교한 결과, 35°C에서 최적의 활성을 보여주었으며(도 25 (나)), 효소의 열에 대한 불활성화를 조사하기 위해 각 온도에서 15분간 방치한 후 잔존 효소활성을 측정한 결과 온도가 증가함에 따라 활성도 급격하게 감소하였으며 65°C에서는 약 3%이하의 활성만이 잔존하였다. 반면 *E. coli* 유래의 알칼린 포스파타아제(BAP)는 열 안정성이 높아 80°C이하에서는 불활성화되지 않고 활성을 유지하는 것으로 나타났다(도 25 (다)).

[284]

산업상 이용가능성

[285] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 효소 활성의 탐색 방법을 이용하면, 환경이나 메타게놈 라이브러리를 비롯한 다양한 유전자 집단에서 유용 유전자를 감지할 수 있고, 페놀 유도체에 대한 민감도와 발현조절을 이용하여 다양한 효소 활성을 고감도로 빠르게 감지 및 정량할 수 있어, 효소개량을 위한 단백질 공학기술에도 유용하게 사용할 수 있으며, 특히, 효소 활성을 정량적으로 탐색할 수 있어 분자진화기술에 적용할 수 있다.

[286]

[287] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[288]

서열목록 Free Text

[289] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1]

다음 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법:

- (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계;
- (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계;
- (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계;
- (d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및
- (e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 감지하는 단계.

[청구항 2]

다음 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 탐색 방법:

- (a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계;
- (b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계;
- (c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하는 미생물에 도입하여 재조합

미생물을 제조하는 단계;

(d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및

(e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 감지하는 단계.

[청구항 3]

다음 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량방법:

(a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계;

(b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론 또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계;

(c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리와 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 각각 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계;

(d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및

(e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계.

[청구항 4]

다음 단계를 포함하는 재설계 유전자 회로를 이용한 목적효소 활성의 정량방법:

(a) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계;

(b) 탐색하고자 하는 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 클론

또는 유전자라이브러리를 제공하는 단계;

(c) 상기 클론 또는 유전자라이브러리를 상기 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 함유하는 미생물에 도입하여 재조합 미생물을 제조하는 단계;

(d) 상기 재조합 미생물들을 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계; 및

(e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 정량하는 단계.

[청구항 5]

다음 단계를 포함하는, 메타게놈 라이브러리 유래, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 목적효소의 탐색방법:

(a) 환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계;

(b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자,

(ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는

프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터

유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현

조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 제공하는 단계;

(c) 상기 메타게놈 라이브러리와 재설계 유전자회로를 숙주 미생물에 도입하여 형질전환된 미생물 라이브러리를 제작하는 단계;

(d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리를 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계;

(e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및

(f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계.

[청구항 6]

다음 단계를 포함하는, 메타게놈 라이브러리 유래, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 목적효소의 탐색방법:

(a) 환경 유래 메타게놈 라이브러리를 제공하는 단계;

(b) (i) 페놀계 화합물을 인지하는 조절단백질을 코딩하는 유전자,

(ii) 형광단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로

구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자, 및 (iii) 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위 및 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터로 구성된 유전자 발현 조절부위를 포함하는 페놀계 화합물 감지용 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물을 제공하는 단계;

(c) 상기 재설계 유전자회로를 염색체 DNA 또는 세포질에 함유하는 미생물에 상기 메타게놈 라이브러리를 도입하여 재조합 미생물 라이브러리를 제조하는 단계;

(d) 상기 형질전환된 미생물 라이브러리를 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계;

(e) 효소반응에 의해 유리된 페놀계 화합물을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 측정하여, 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 활성을 보유한 미생물을 고속 탐색하는 단계; 및

(f) 상기 탐색된 미생물로부터 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소의 유전자를 회수한 다음, 서열분석에 의해 동정하는 단계.

[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 유전자와 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 상호작동가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 부위는 상기 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질이 결합하여 하류의 리포터 유전자가 발현될 수 있도록 리포터유전자의 프로모터를 활성화하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질을 코딩하는 유전자와 상기 조절 단백질의 발현을 조절하는 프로모터는 상호작동가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탐색하고자 하는 효소는 효소반응에 의해 페놀계 화합물을 유리할 수 있는 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

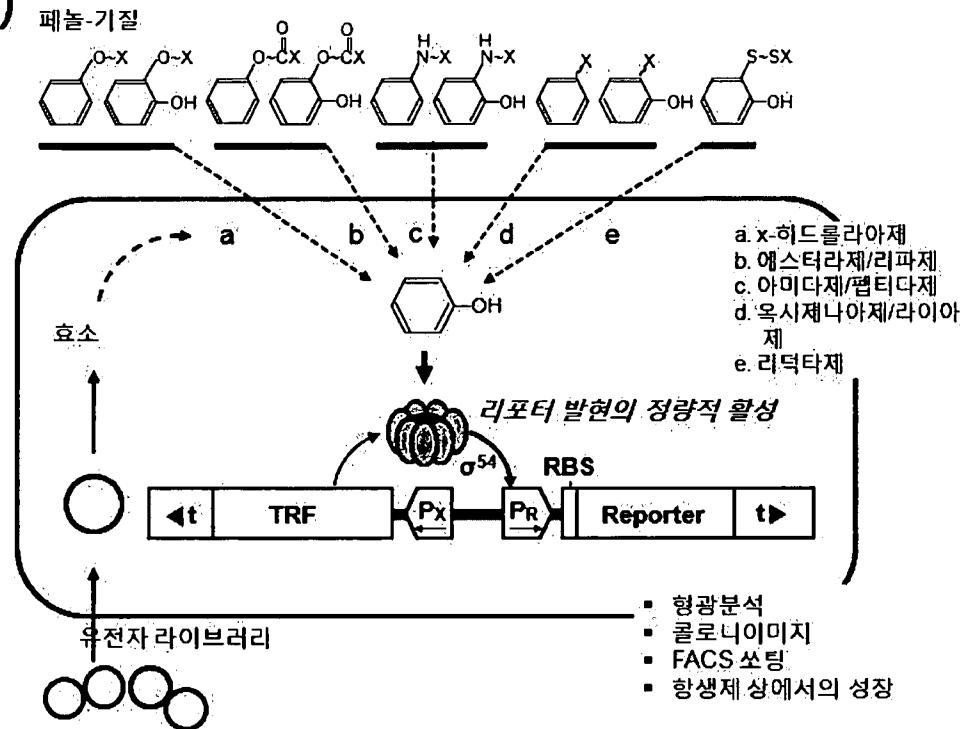
[청구항 11] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 효소는 알파-글루코시다제, 베타-글루코시다제, 셀룰라제, 글리코실세라미다제, 프소파타제, 피타제, 에스터라제, 리파제,

- 유레타나제, 아미다제, 펩티다제, 프로테이나제, 옥시도리덕타제, 페놀-리아제, 디할로게나제, 이소머라제, 모노옥시지나제 및 디옥시지나제로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 효소 반응에 의해 방출되는 페놀계 화합물은 페놀, o-클로로페놀, m-클로로페놀, p-클로로페놀, o-니트로페놀, m-니트로페놀, p-니트로페놀, 살리실산, 2-아미노페놀, 2-메톡시페놀, 카테콜, 리소시놀, 3-메틸카테콜, 2,4-디메틸페놀, 2,5-디메틸페놀, 3,4-디메틸페놀, 2,3-디메틸페놀, 3,5-디메틸페놀, 2,4-디클로로페놀, 2,5-디클로로페놀, 2,3-디클로로페놀, 2,6-디클로로페놀, 3,4-디클로로페놀, 3,5-디클로로페놀, 2,4-디니트로페놀, o-크레졸, m-크레졸, p-크레졸, 2-에틸페놀, 3-에틸페놀, 2-플로로페놀, 2-요오드페놀 및 벤젠으로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페놀 방출 화합물은 페놀 히드록실기가 수식된 에스테르; 글리코사이드; 인산에스테르; 오르쏘-, 메타- 또는 파라- 위치에 알킬기, 카르복실기, 아미노기, 티올기, 아마이드기, 설파이드기, 니트로기 또는 할로겐기가 도입된 페놀 유도체; 및 벤젠고리 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페놀계 화합물을 인지하는 페놀계 화합물 분해효소 조절 단백질은 DmpR 또는 이의 변이체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광단백질은 GFP, GFP_{uv}, 및 RFP로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항생제 저항성 유전자는 카나마이신 유전자, 클로람페니콜 유전자 및 테트라사이클린 유전자로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 단백질의 활성 측정은 미생물 콜로니 이미지 분석, 형광스펙트럼 분석, 형광유세포분석 (FACS) 및 항생제 내성 측정법으로 구성된 군에서 선택되는 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균, 슈도모나스, 효모, 식물세포 및 동물세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제1항 내지 제6항에 있어서, 상기 유전자회로는 대장균(*E. coli*)

-)에서 리포터 단백질의 발현효율을 높이기 위한 대장균용 RBS서열을 삽입하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 20] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 이중 리포터 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 21] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 메타게놈 라이브러리가 플라스미드, 포스미드, 코스미드, BAC 및 YAC로 구성된 군으로부터 선택된 벡터에 토양으로부터 얻은 DNA를 도입하여 제작된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 22] 제5항 또는 제6항에 있어서, 제한효소 처리에 의해 상기 효소 유전자를 회수하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 23] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 유전자회로는 자살 유전자 *sacB*를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 24] 제5항 또는 제6항에 있어서, 형질전환된 미생물의 세포 성장값($OD_{600/ml}$)이 1.5 ~ 4 일 때 기질인 페놀 방출 화합물을 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 25] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 페놀계 방출 화합물을 처리 후, 효소반응을 14 ~ 16시간 동안 진행시키는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 26] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 페놀 방출 화합물을 처리하는 단계는 (i) 영양배지에서 성장된 미생물을 회수하는 단계; 및 (ii) 상기 회수된 미생물을 최소배지에서 페놀 방출 화합물로 처리하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

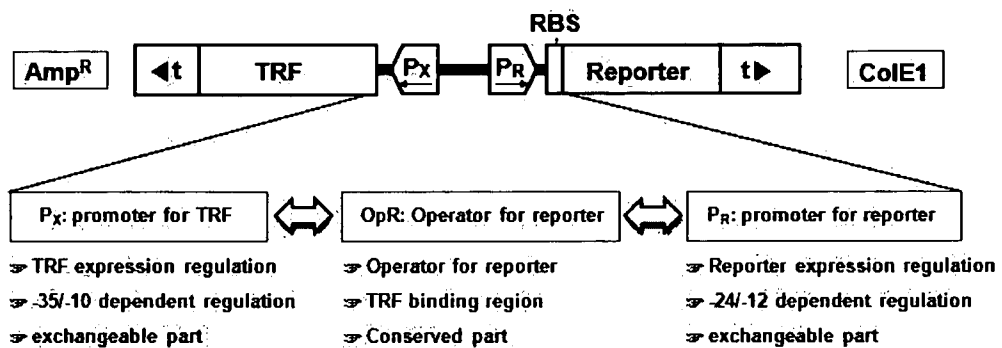
[Fig. 1]

(가)



(나)

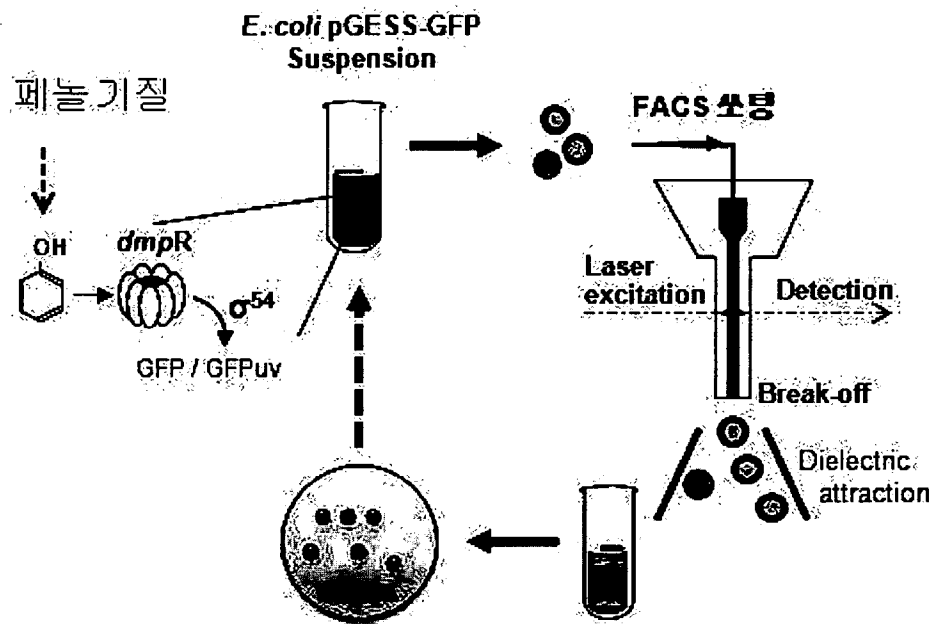
Genetic Enzyme Screening System



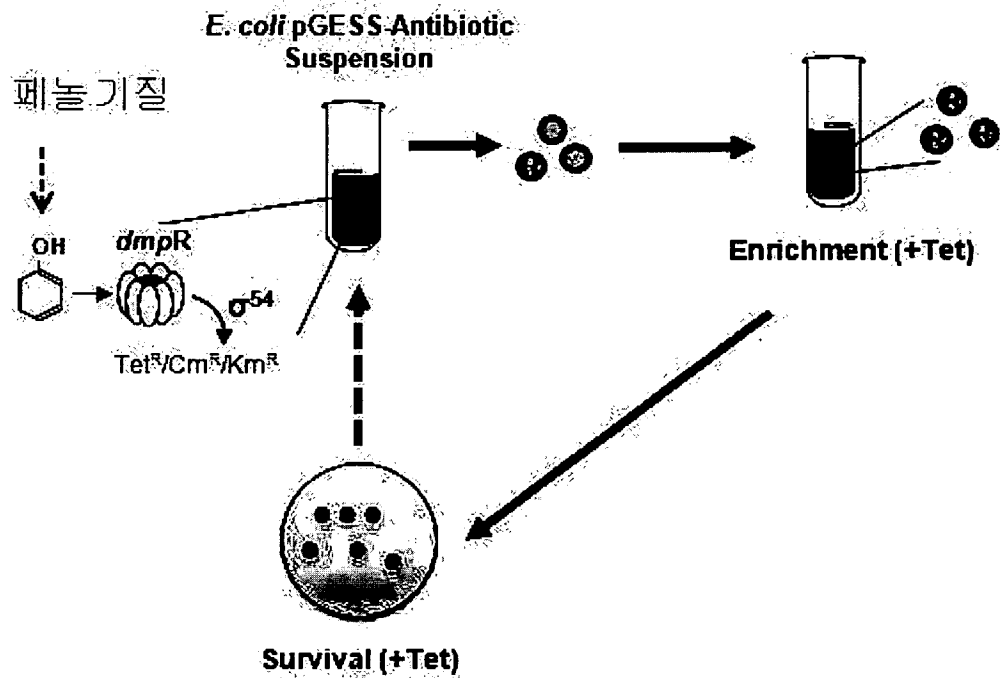
* TRF: transcriptional regulation factor (such as dmpR)
 * RBS: ribosome binding site
 * t: forward transcriptional terminator
 * t: reverse transcriptional terminator

[Fig. 2]

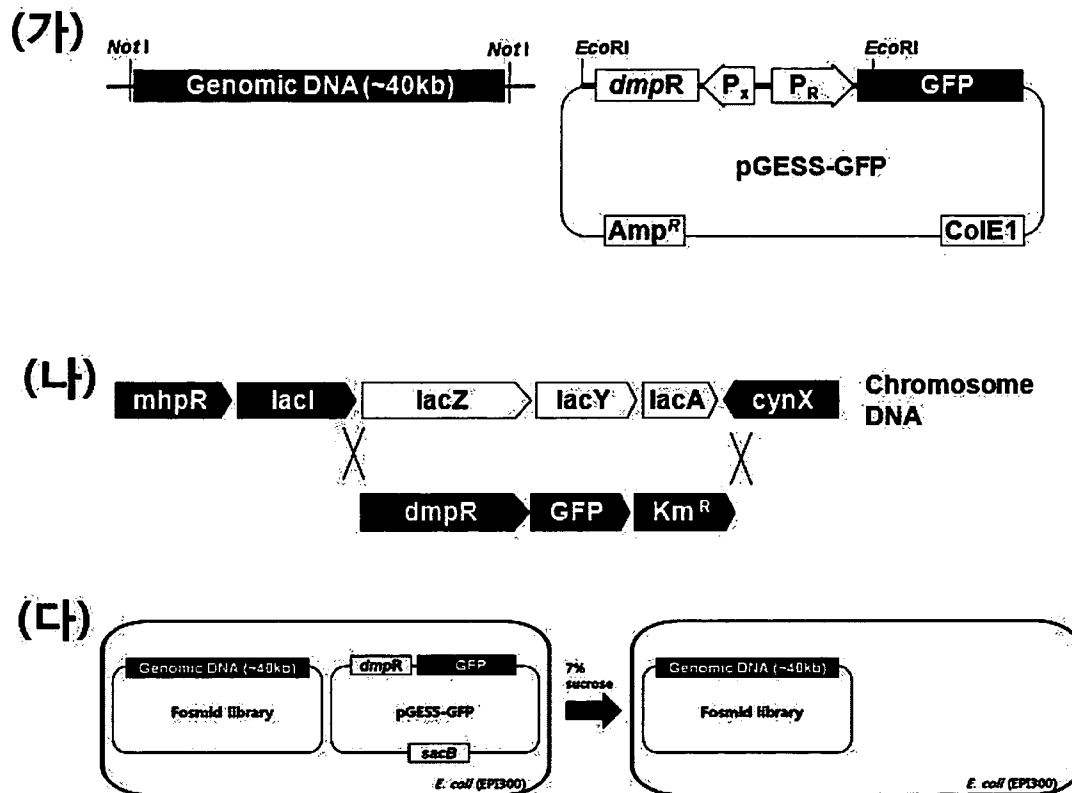
(가)



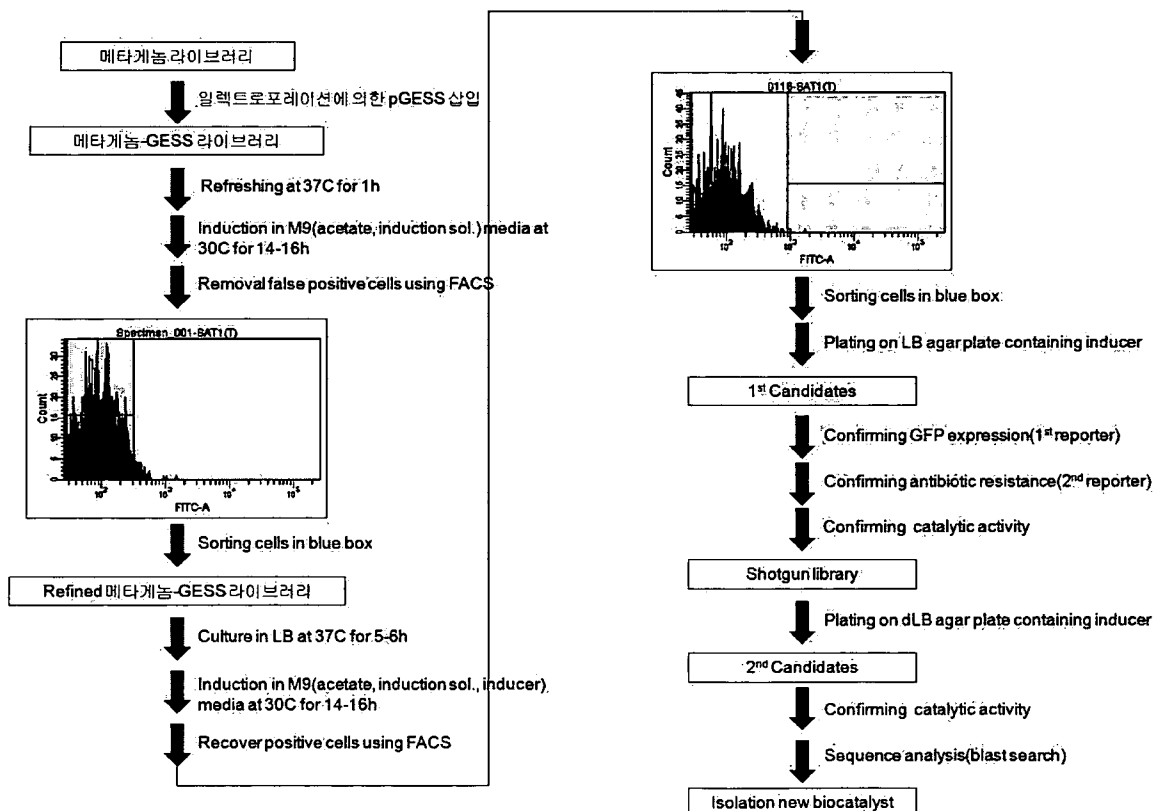
(나)



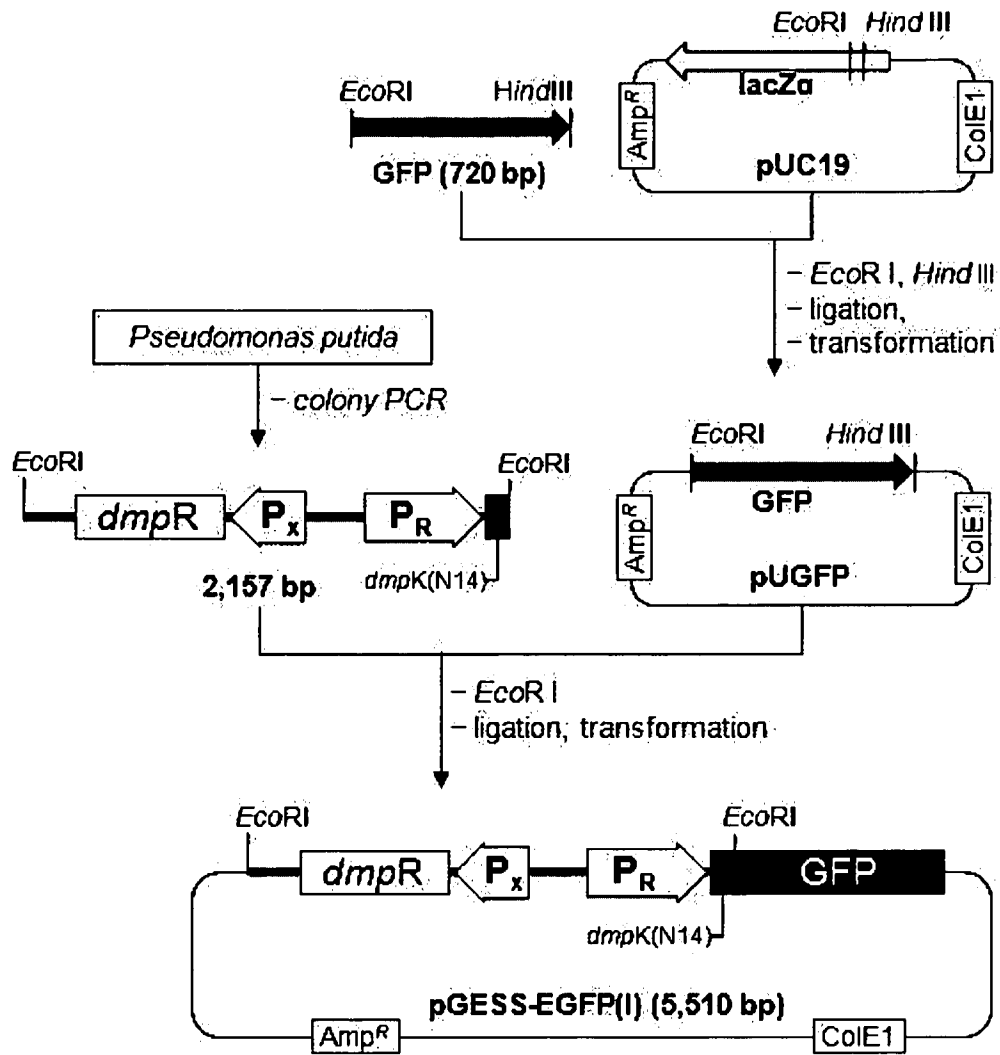
[Fig. 3]



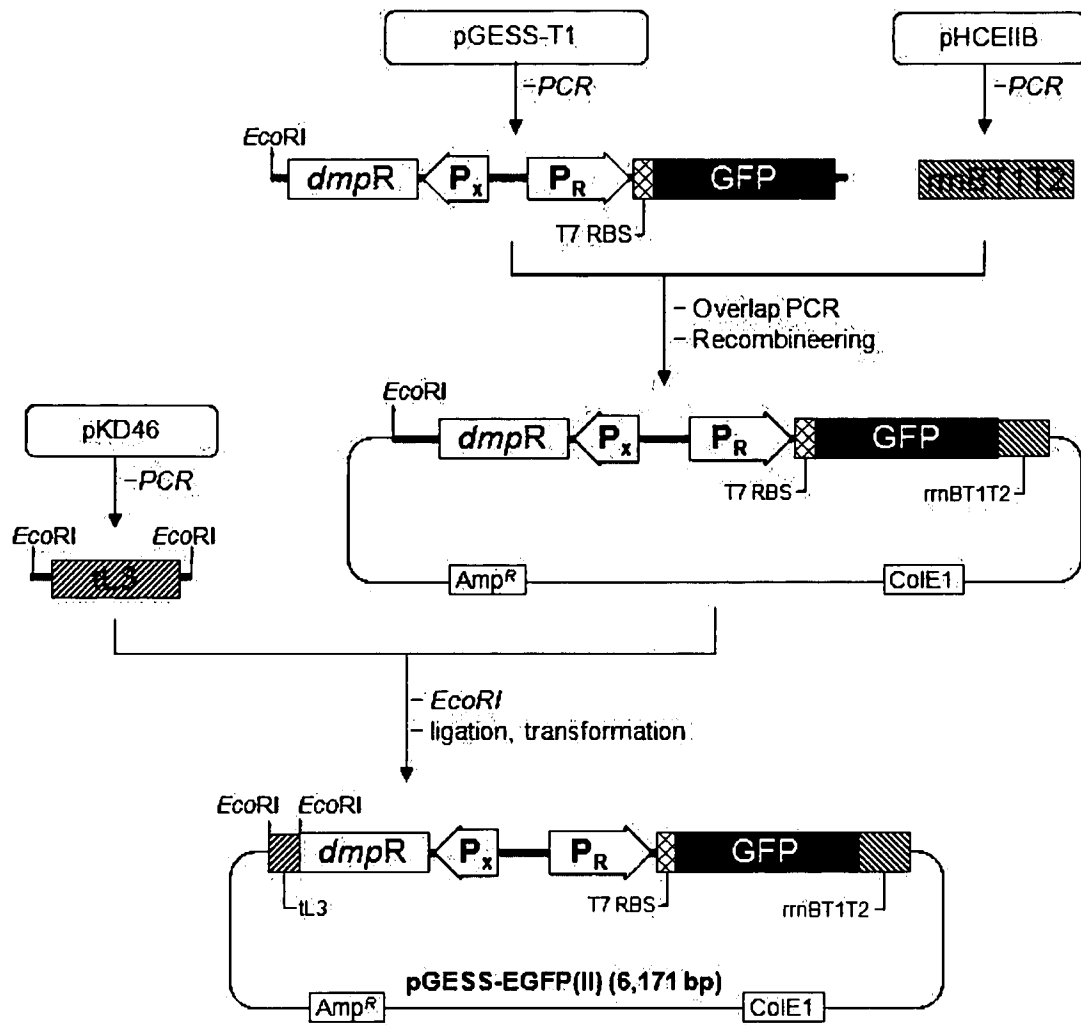
[Fig. 4]



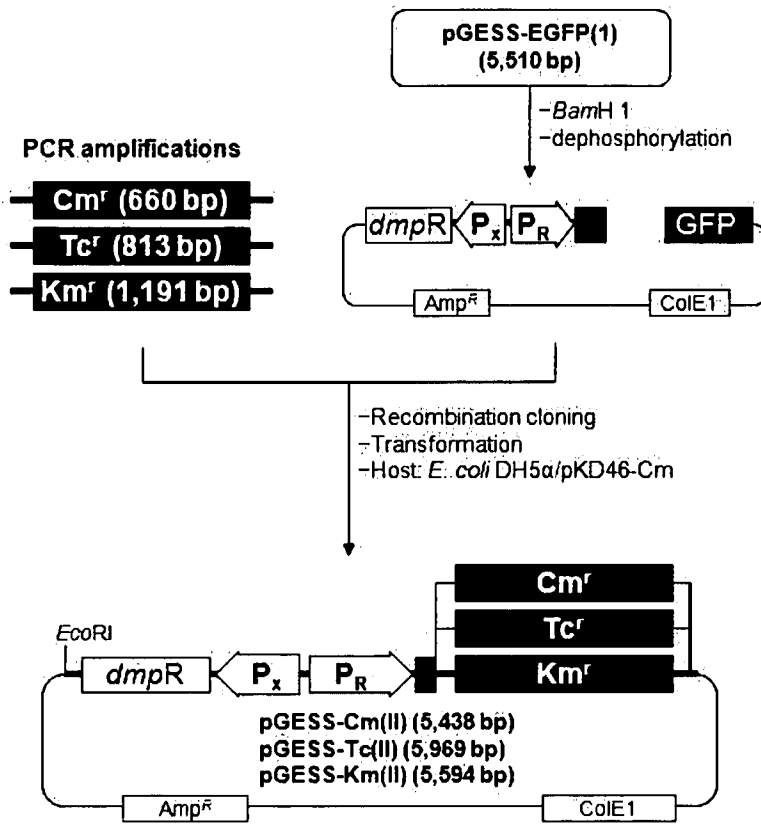
[Fig. 5]



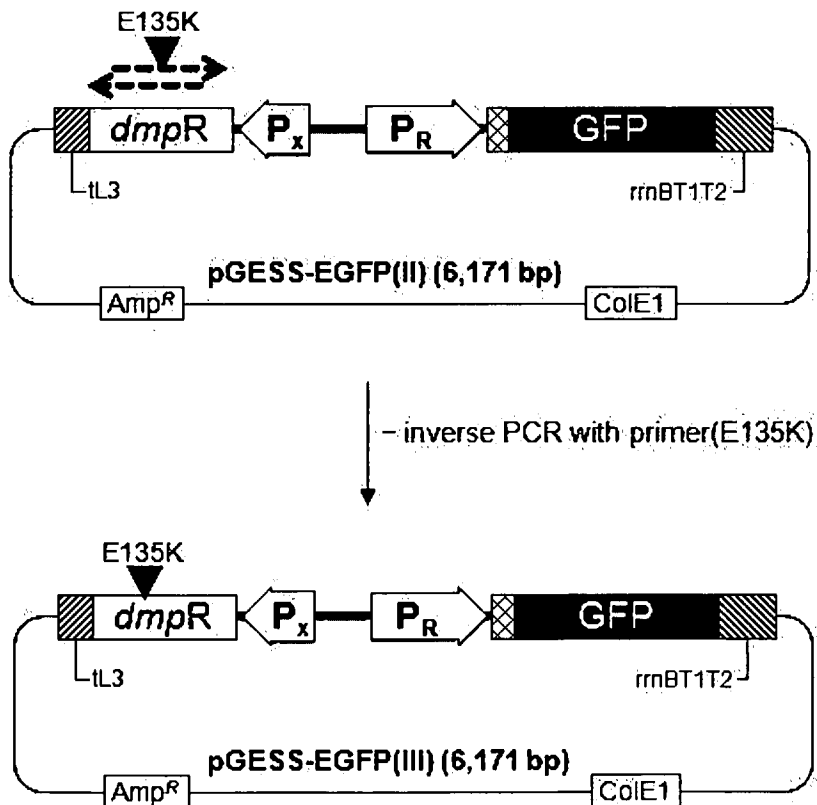
[Fig. 6]



[Fig. 7]

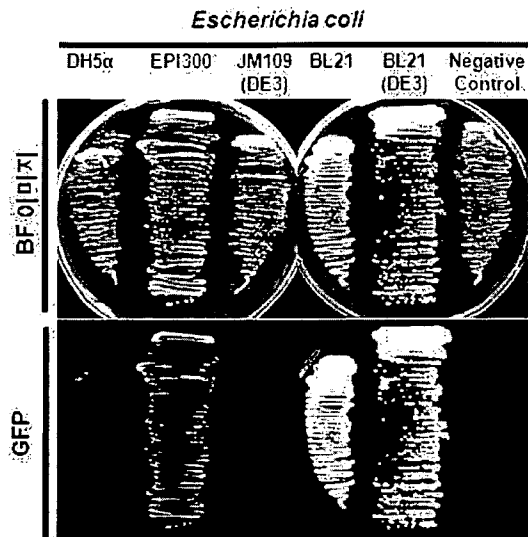


[Fig. 8]

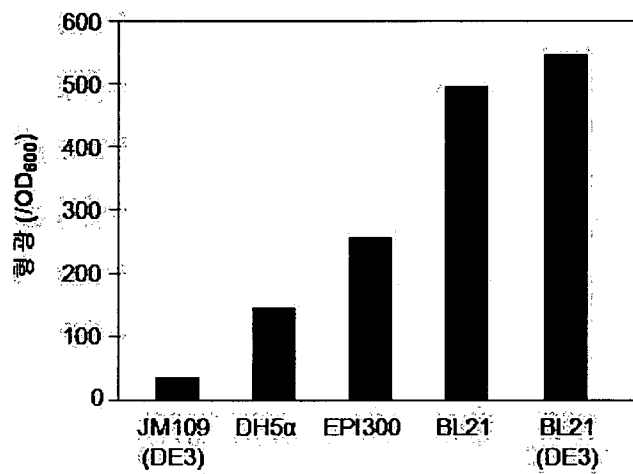


[Fig. 9]

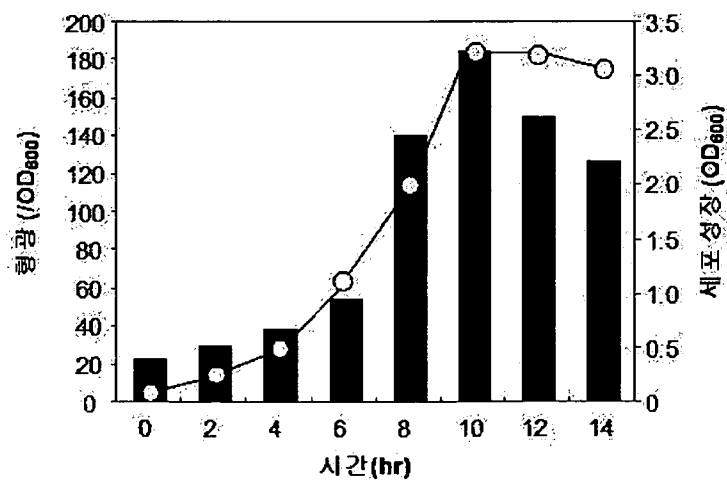
(가)



(나)

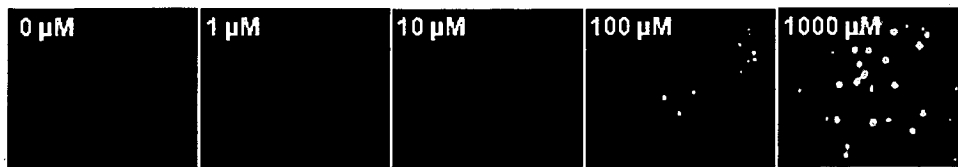


(다)

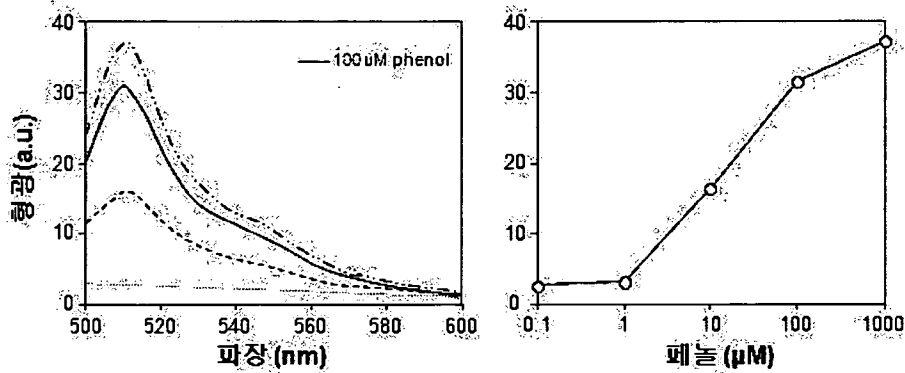


[Fig. 10]

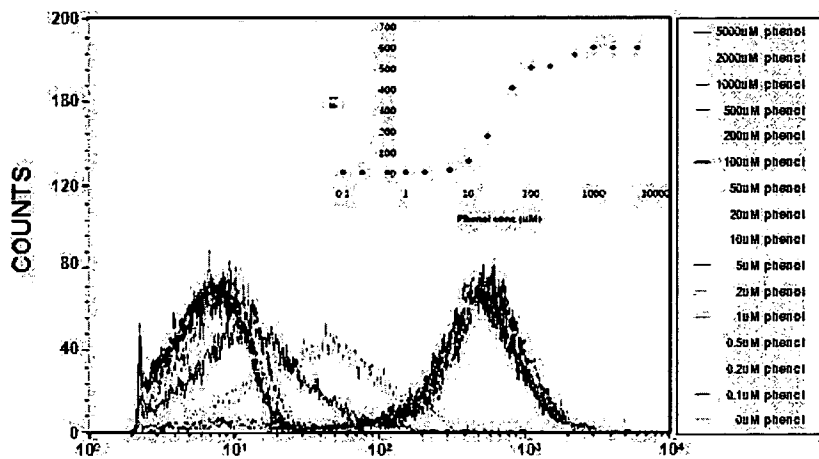
(가)



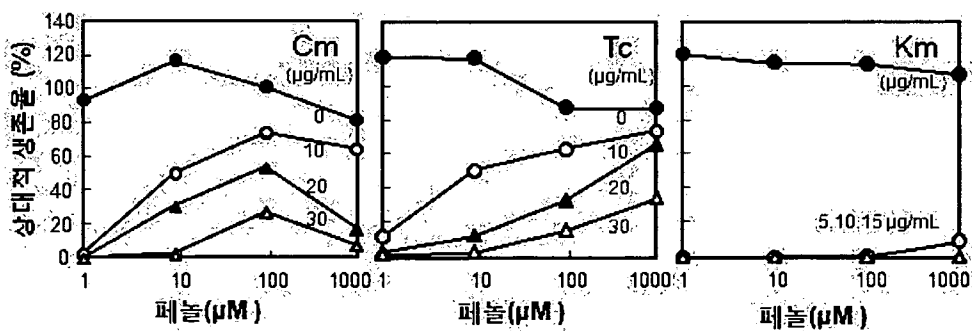
(나)



(다)

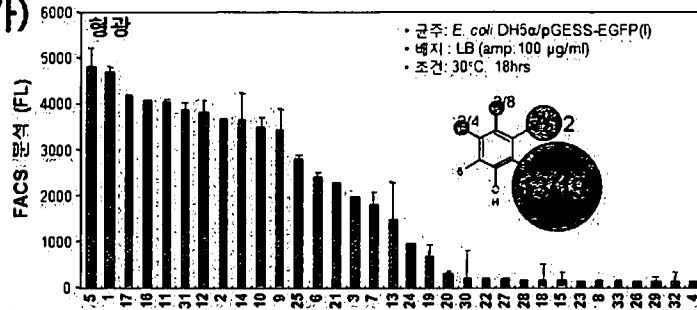


(라)

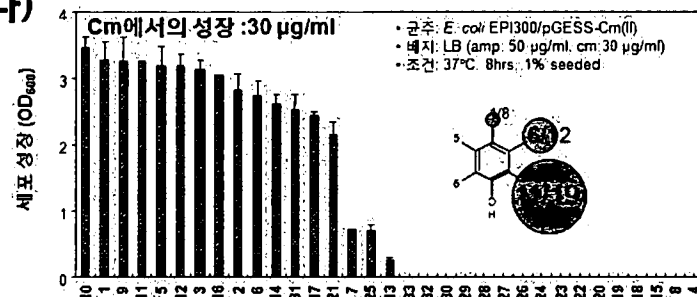


[Fig. 11]

(가)



(나)



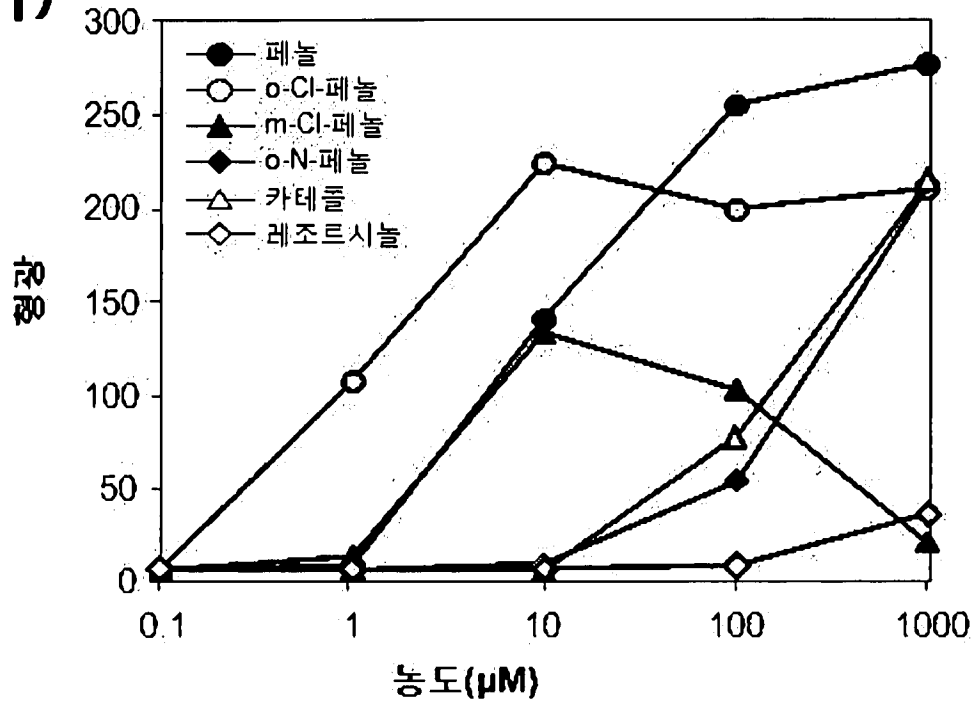
- | | | |
|------------|--------------|---------------|
| 1 페놀 | 12 m-크레졸 | 23 2,4-디클로로페놀 |
| 2 o-니트로페놀 | 13 p-크레졸 | 24 2,5-디클로로페놀 |
| 3 m-니트로페놀 | 14 카테콜 | 25 2,3-디클로로페놀 |
| 4 p-니트로페놀 | 15 레조르시놀 | 26 2,6-디클로로페놀 |
| 5 o-클로로페놀 | 16 2-플루오로페놀 | 27 3,4-디클로로페놀 |
| 6 m-클로로페놀 | 17 2-아이오도페놀 | 28 3,5-디클로로페놀 |
| 7 p-클로로페놀 | 18 2,4-디메틸페놀 | 29 2,4-디니트로페놀 |
| 8 살리실산 | 19 2,5-디메틸페놀 | 30 3-메틸카테콜 |
| 9 2-아미노페놀 | 20 3,4-디메틸페놀 | 31 2-에틸페놀 |
| 10 2-메톡시페놀 | 21 2,3-디메틸페놀 | 32 3-에틸페놀 |
| 11 o-크레졸 | 22 3,5-디메틸페놀 | 33 벤젠 |

(다)

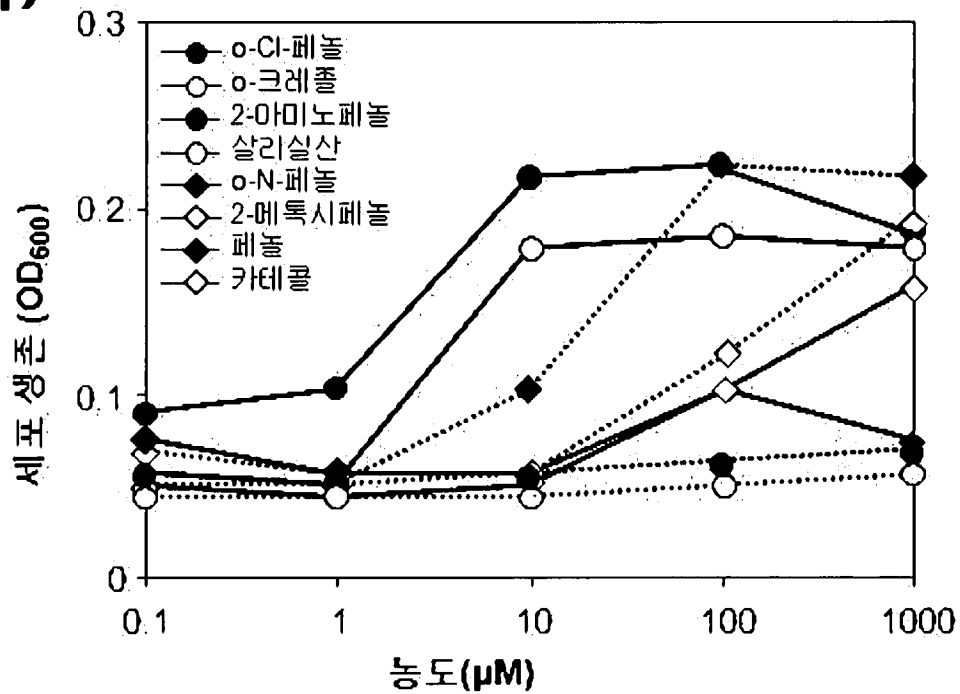
No		Aromatic side chains					
		1	2	3	4	5	6
1	페놀	OH					
2	o-니트로페놀	OH	NO ₂				
3	m-니트로페놀	OH		NO ₂			
4	p-니트로페놀	OH			NO ₂		
5	o-클로로페놀	OH	Cl				
6	m-클로로페놀	OH		Cl			
7	p-클로로페놀	OH			Cl		
8	살리실산	OH	COOH				
9	2-아미노페놀	OH	NH ₂				
10	2-메톡시페놀	OH	OCH ₃				
11	o-크레졸	OH	CH ₃				
12	m-크레졸	OH		CH ₃			
13	p-크레졸	OH			CH ₃		
14	카테콜	OH	OH				
15	레조르시놀	OH		OH			
16	2-플루오로페놀	OH	F				
17	2-아이오도페놀	OH	I				
18	2,4-디메틸페놀	OH	CH ₃		CH ₃		
19	2,5-디메틸페놀	OH	CH ₃			CH ₃	
20	3,4-디메틸페놀	OH		CH ₃	CH ₃		
21	2,3-디메틸페놀	OH	CH ₃	CH ₃			
22	3,5-디메틸페놀	OH		CH ₃		CH ₃	
23	2,4-디클로로페놀	OH	Cl		Cl		
24	2,5-디클로로페놀	OH	Cl			Cl	
25	2,3-디클로로페놀	OH	Cl	Cl			
26	2,6-디클로로페놀	OH	Cl				Cl
27	3,4-디클로로페놀	OH		Cl	Cl		
28	3,5-디클로로페놀	OH		Cl		Cl	
29	2,4-디니트로페놀	OH	NO ₂		NO ₂		
30	3-메틸카테콜	OH	OH	CH ₃			
31	2-에틸페놀	OH	CH ₂ CH ₃				
32	3-에틸페놀	OH		CH ₂ CH ₃			
33	벤젠						

[Fig. 12]

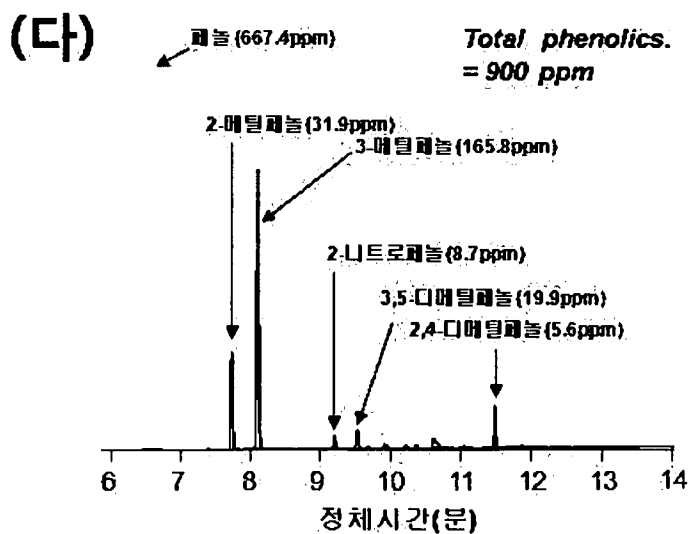
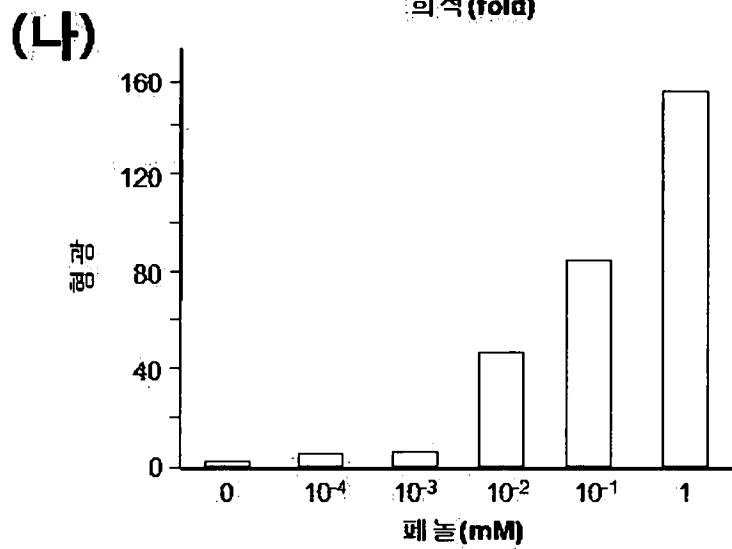
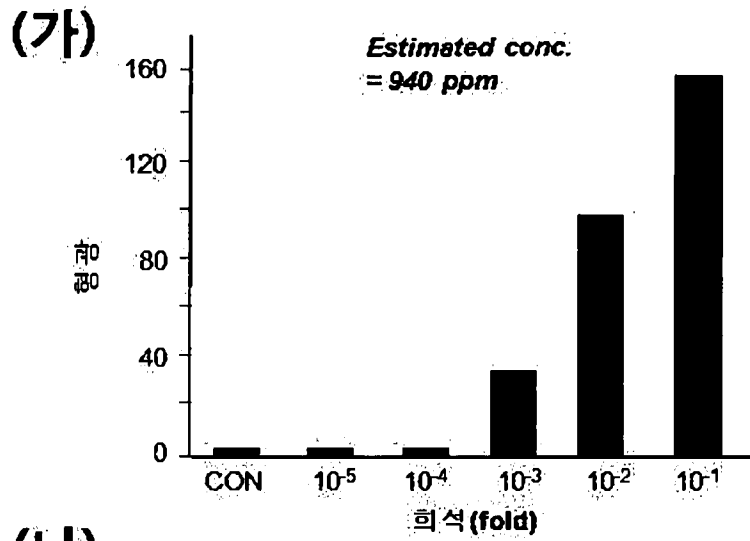
(가)



(나)

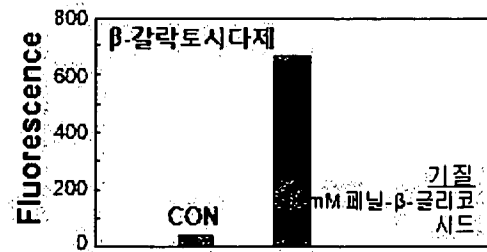
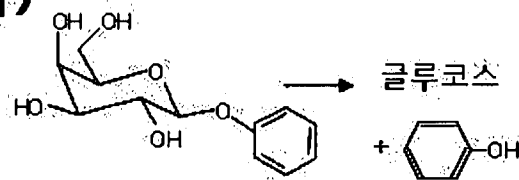


[Fig. 13]

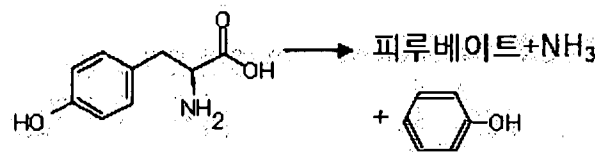


[Fig. 14]

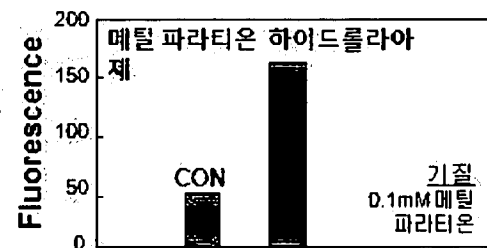
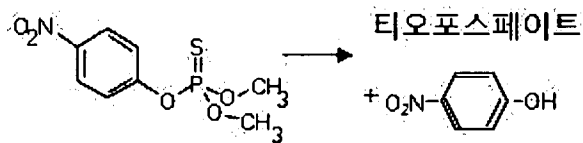
(가)



(나)

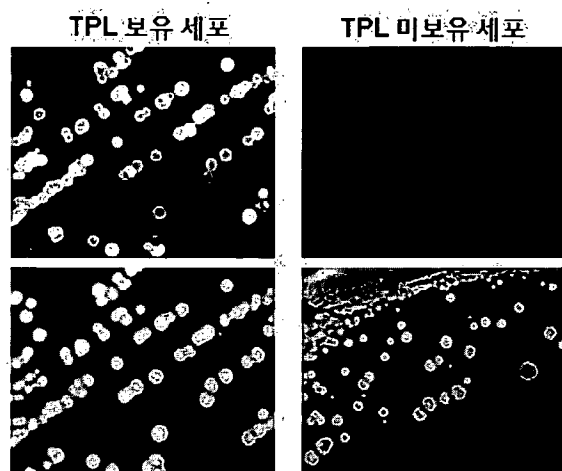


(다)

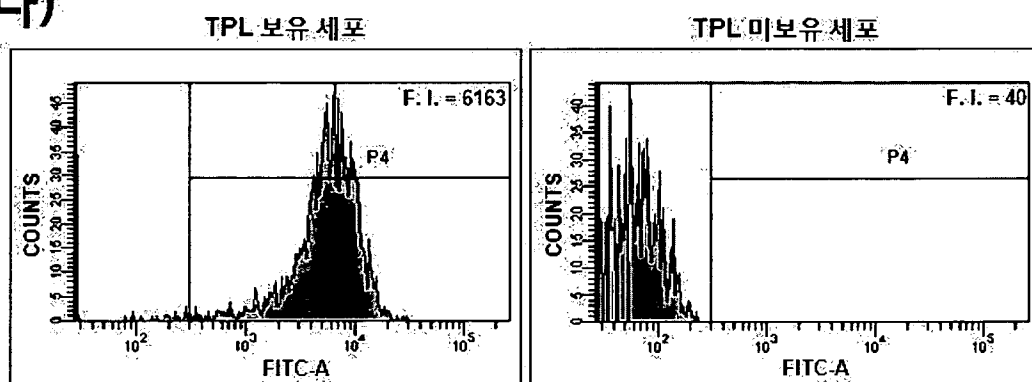


[Fig. 15]

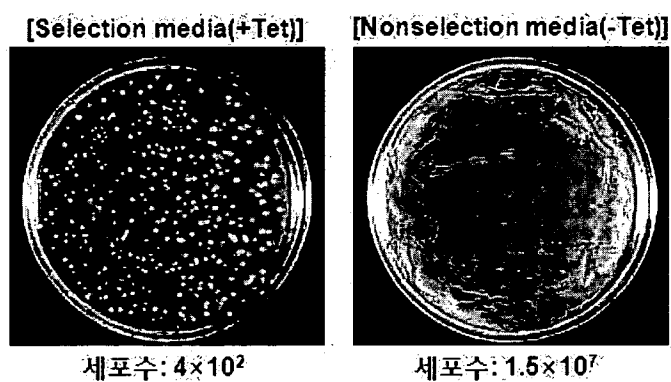
(가)



(나)

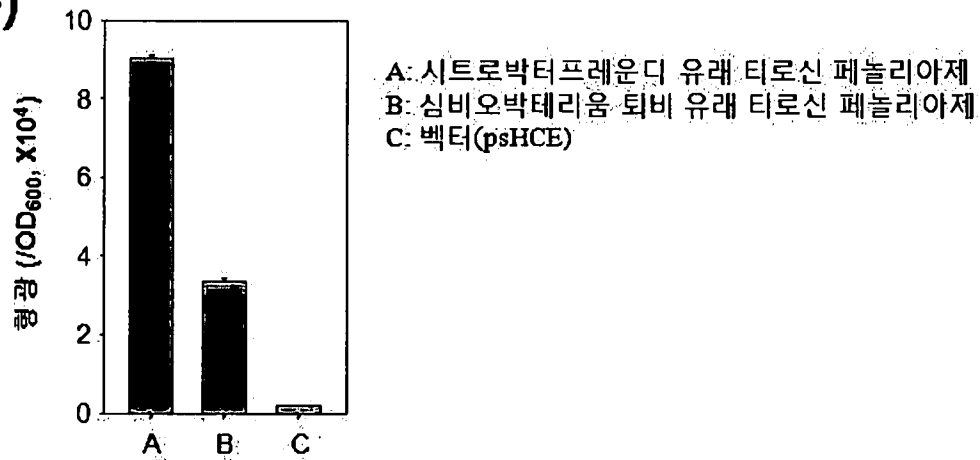


(다)

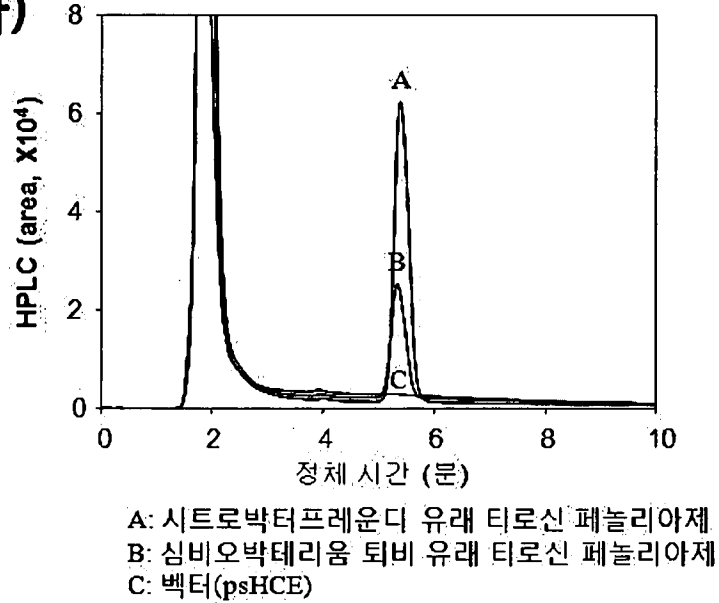
세포수: 4×10^2 세포수: 1.5×10^7

[Fig. 16]

(가)

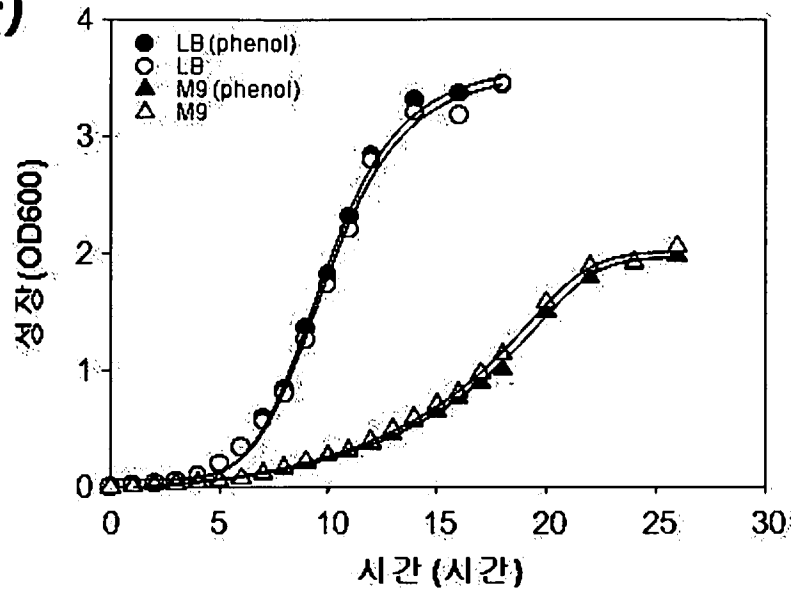


(나)

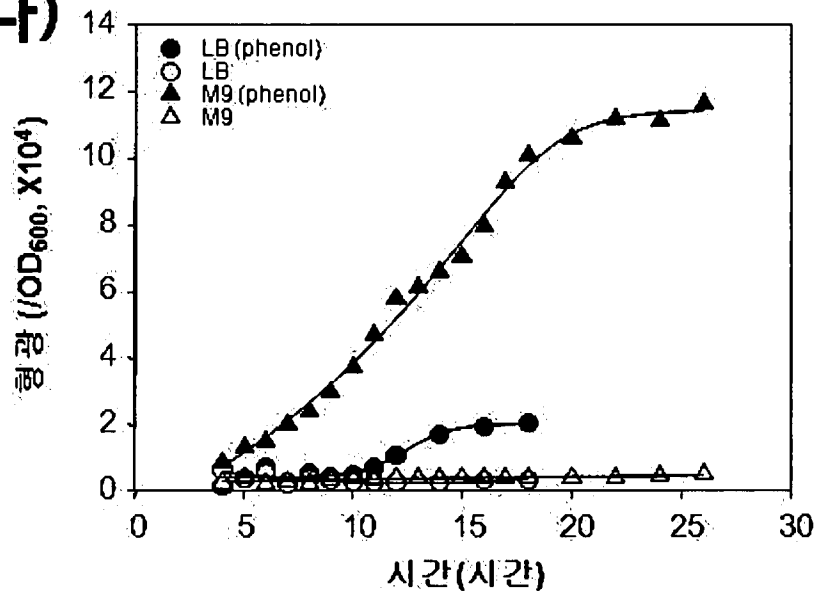


[Fig. 17]

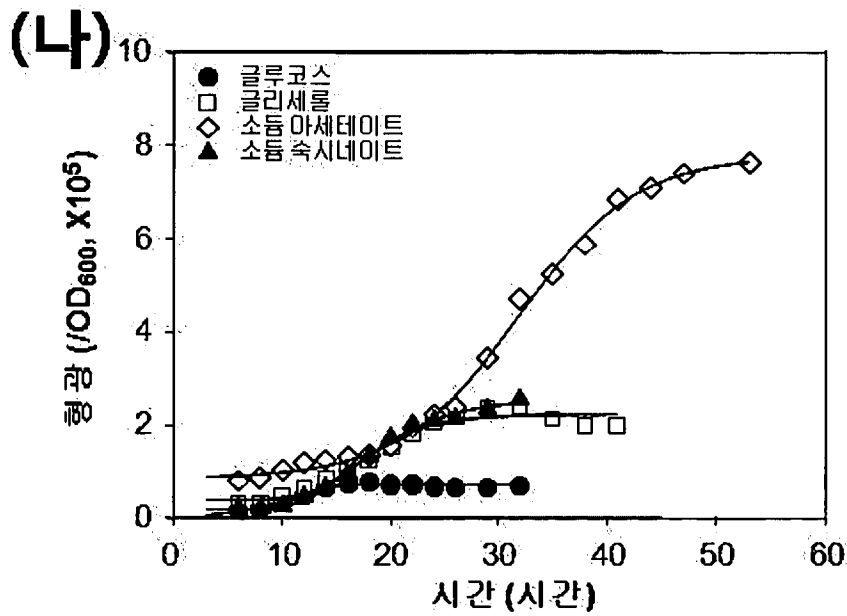
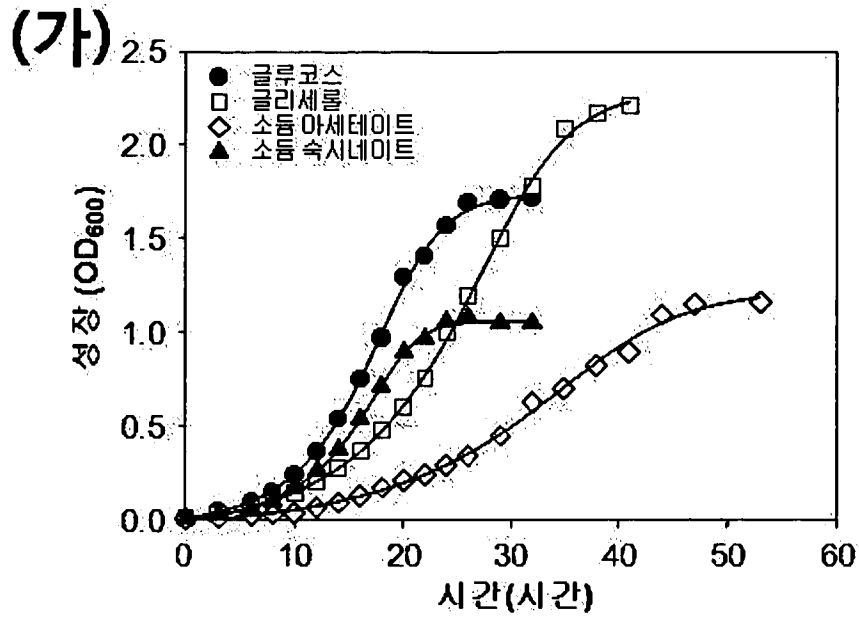
(가)



(나)

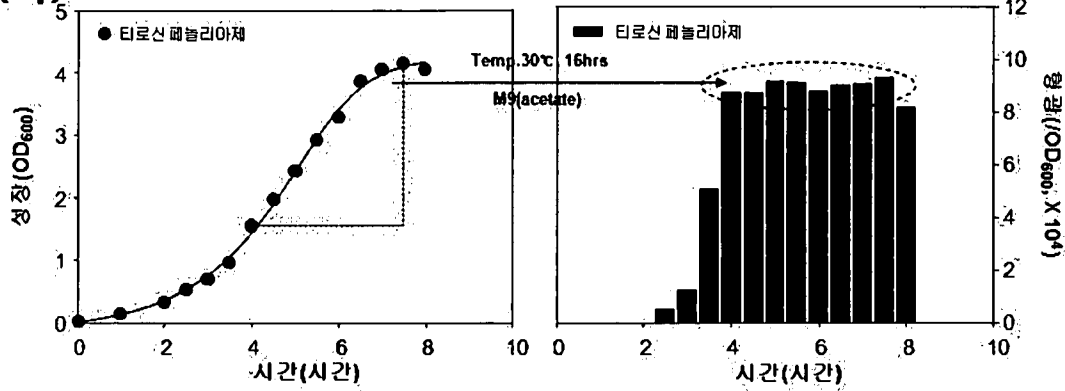


[Fig. 18]

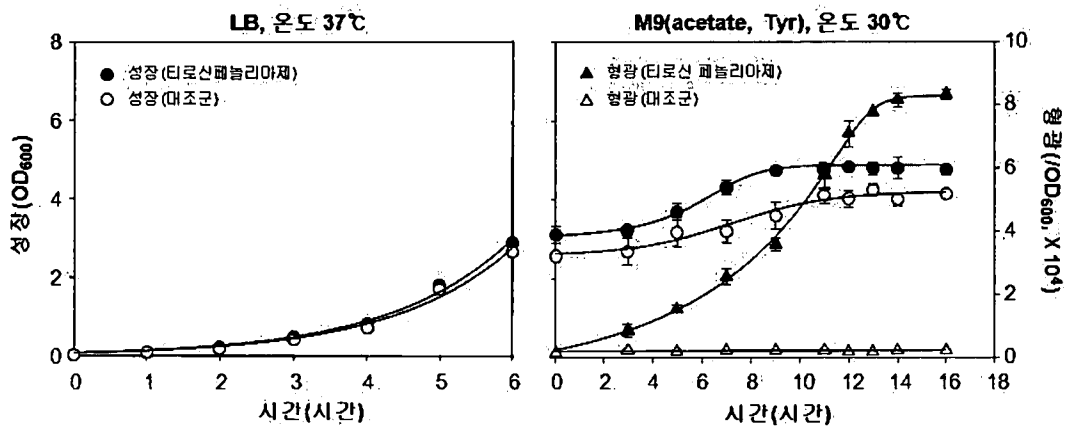


[Fig. 19]

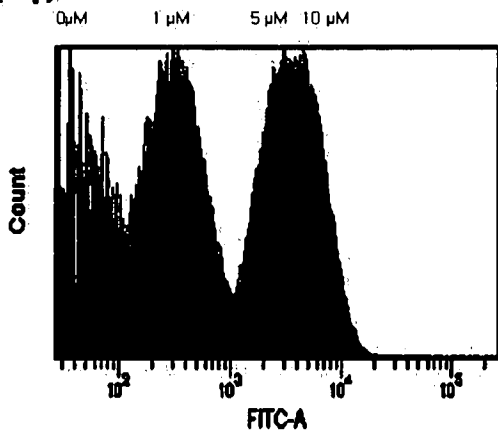
(가)



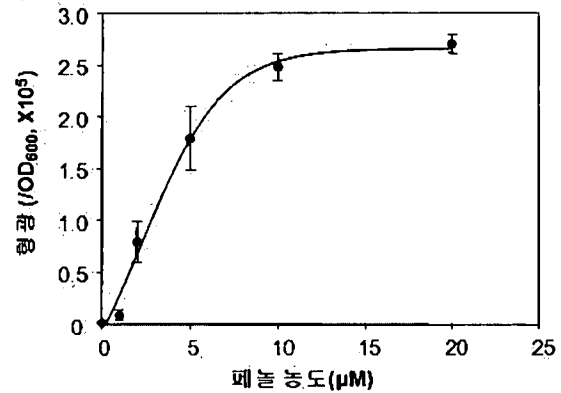
(나)



(다)

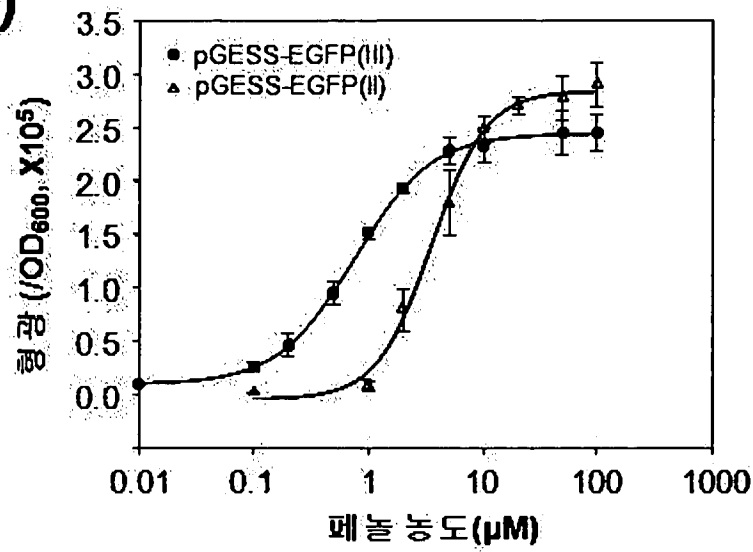


(라)

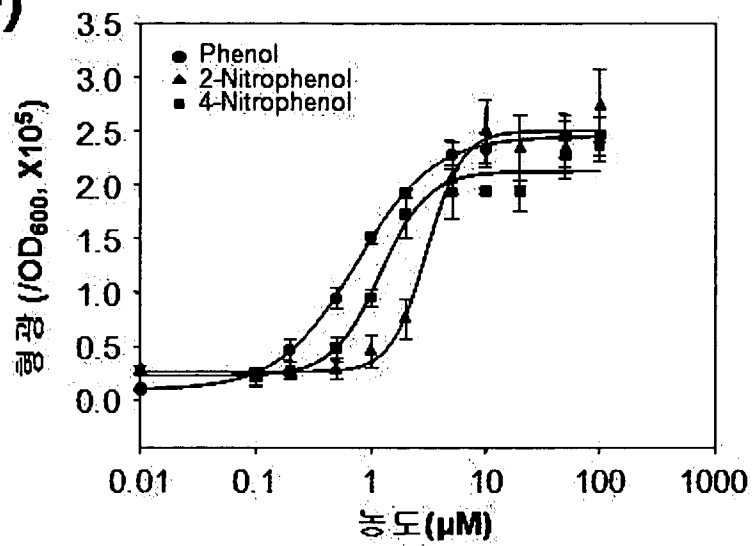


[Fig. 20]

(가)

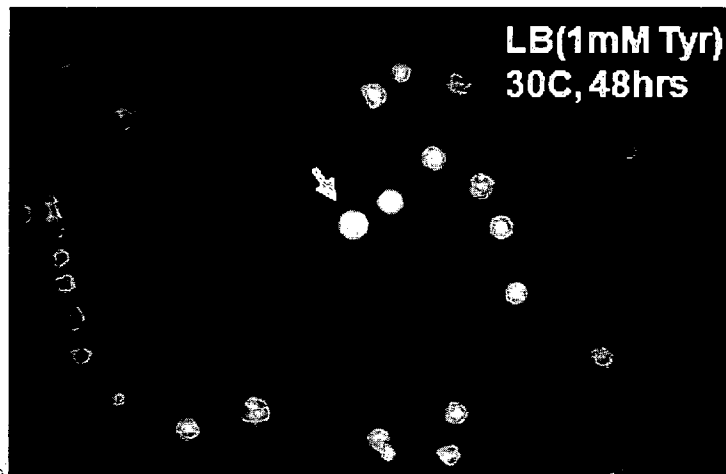


(나)

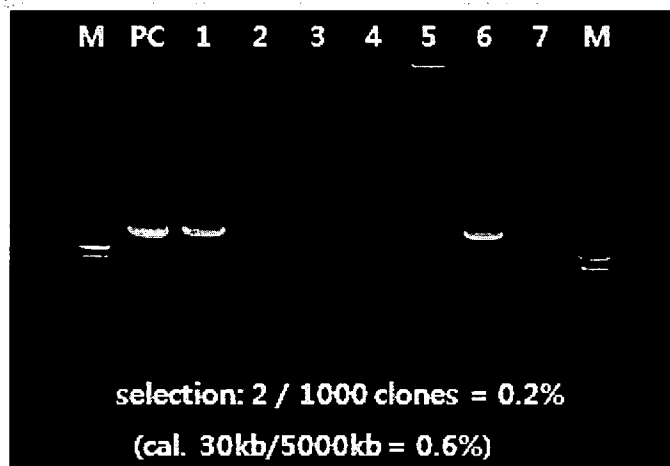


[Fig. 21]

(가)



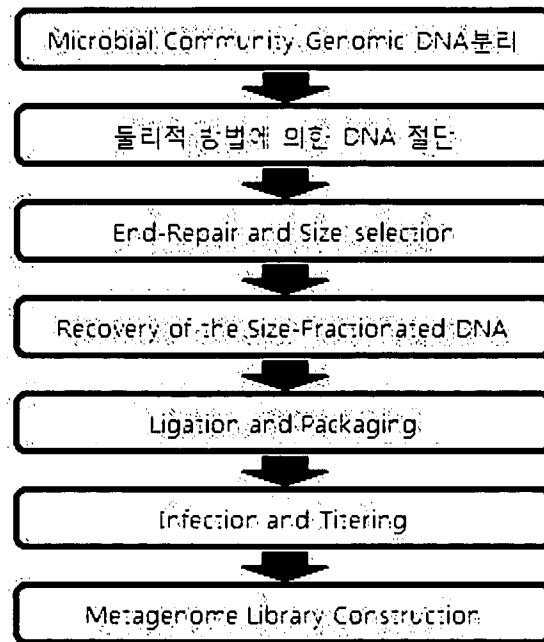
(나)



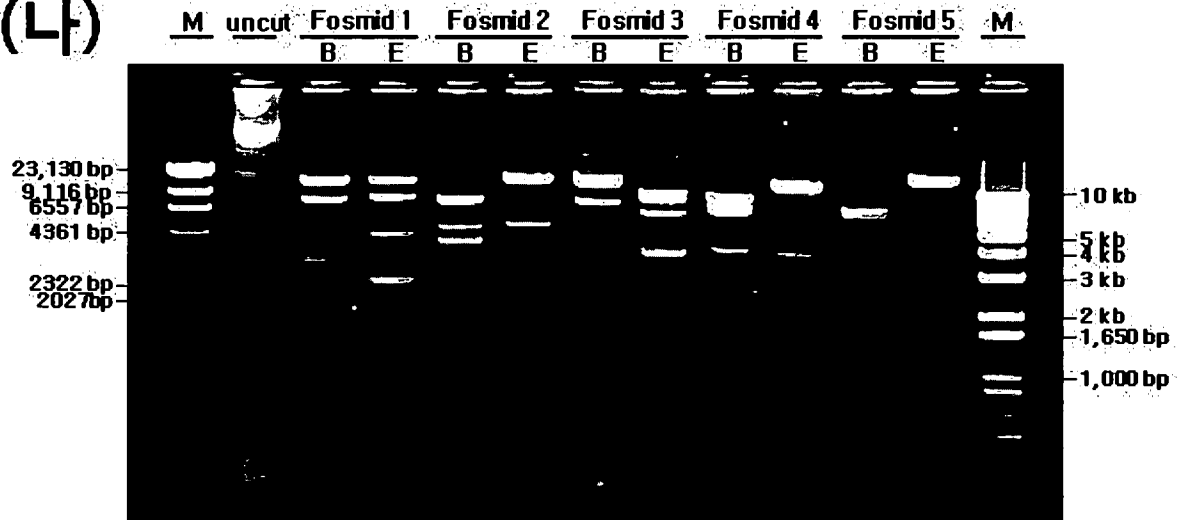
M: 1kb ladder
PC: TPLcf gene
1-7: candidates

[Fig. 22]

(가)

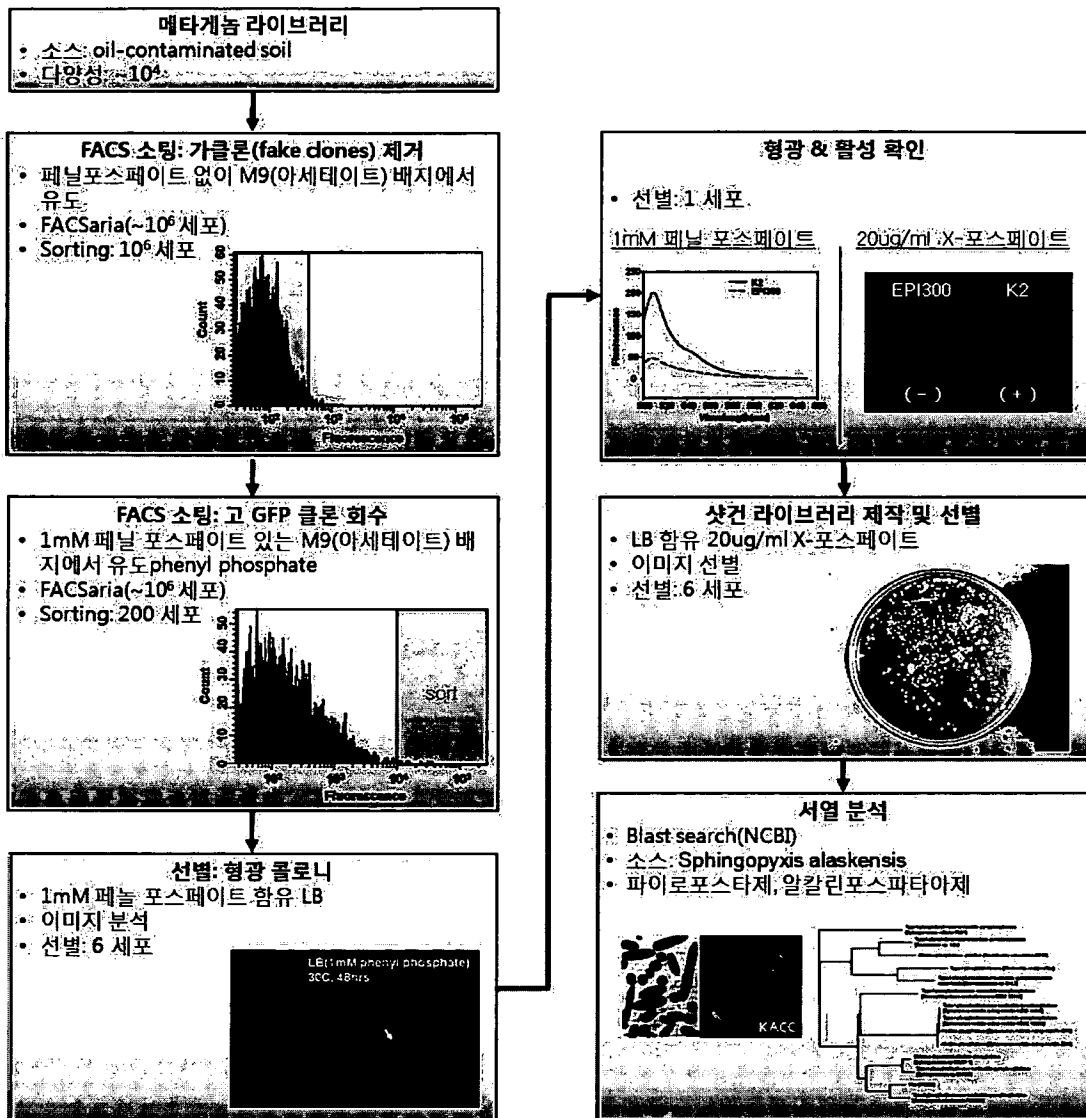


(나)

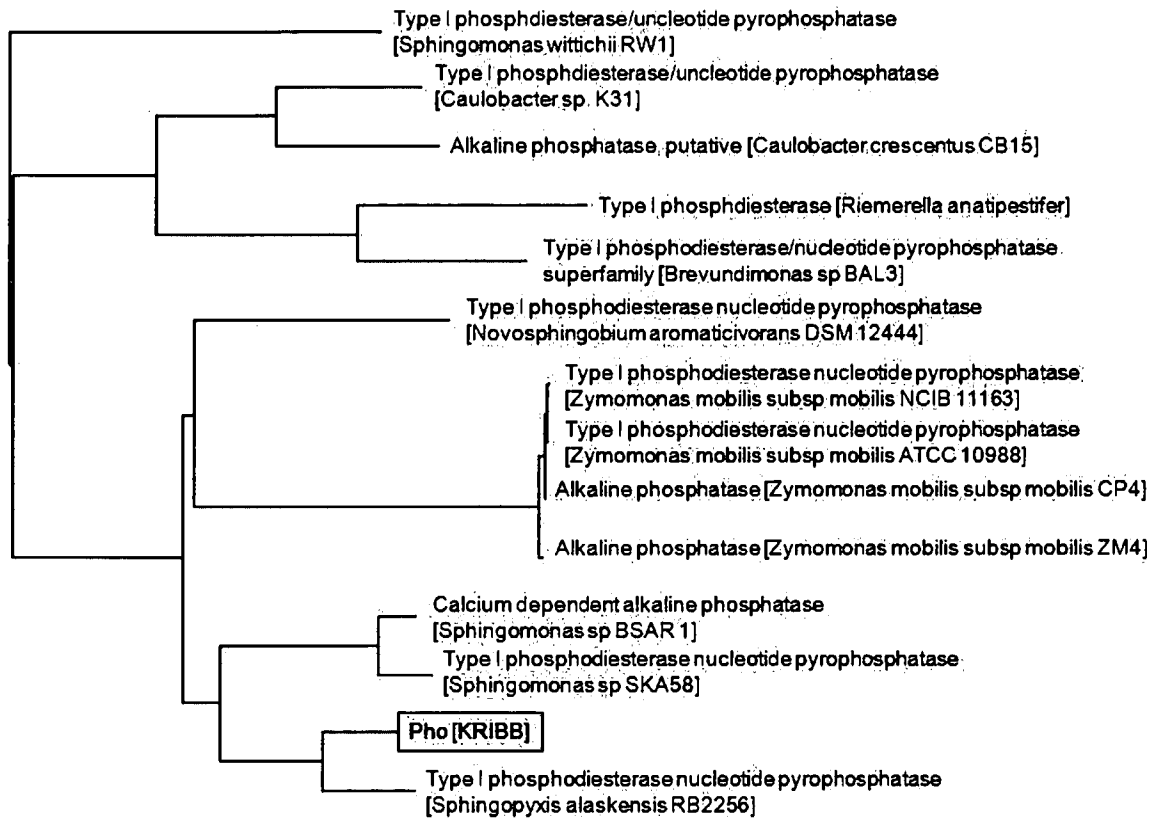


제한효소를 이용하여 절단한 포스미드의 전기영동 사진
(B: *Bam*HI, E: *Eco*RI)

[Fig. 23]

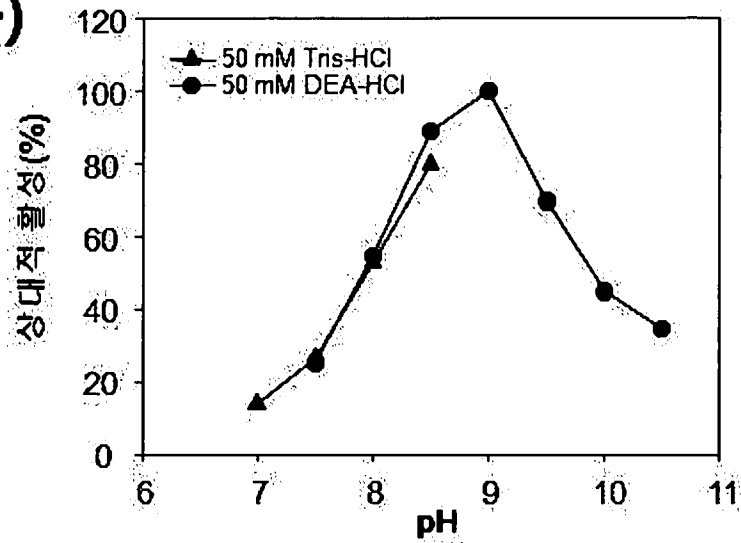


[Fig. 24]

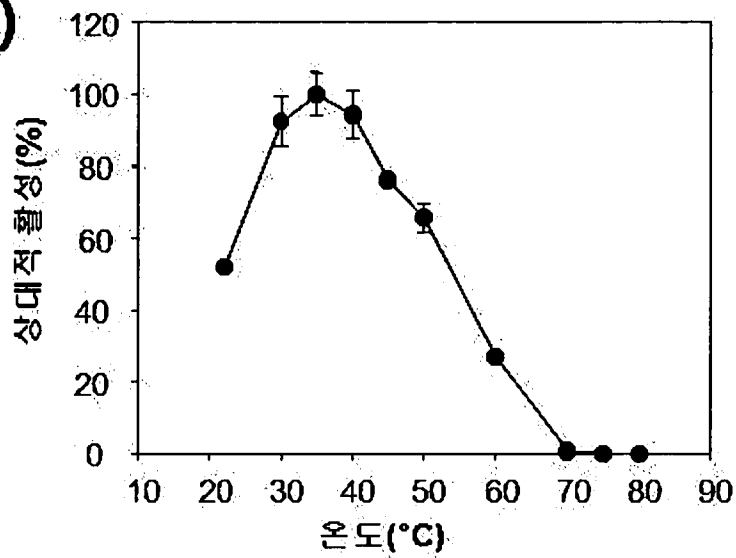


[Fig. 25]

(가)



(나)



(다)

