



2018년 7월 5일 (05.07.2018)

WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

C12N 9/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/015183

(22) 국제출원일:

2017년 12월 21일 (21.12.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0182664 2016년 12월 29일 (29.12.2016) KR

(71) 출원인: 충남대학교 산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 최유성 (CHOL, Yoo Seong); 34435 대전시 대덕구 대전로 1020번길 86, 1108호, Daejeon (KR). 도현수 (DO, Hyun Su); 31165 충청남도 천안시 서북구 불당1로 82, 607동 501호, Chungcheongnam-do (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

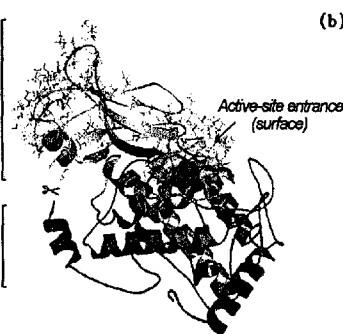
- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL RECOMBINANT TYROSINASE

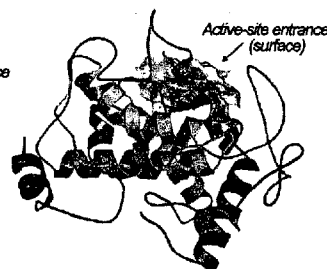
(54) 발명의 명칭: 신규 재조합 티로시나아제

[도 1]

(a)

C-terminal extension
(gray, 304-415)A helical region
(red, 294-303)

(b)



(57) Abstract: The present invention relates to a novel recombinant tyrosinase produced by newly redesigning a gene on the basis of a tyrosinase present in marine polar ammonia oxidation-related bacteria. Unlike conventionally known tyrosinases, the recombinant tyrosinase of the present invention can be very easily mass-produced from a transformant and, unlike conventional enzymes, can efficiently perform reactions over a wide pH range and at room temperature and low temperature. Therefore, the recombinant tyrosinase of the present invention can be variously utilized in the production of functional medicines and biomaterials, both of which contain phenolic compounds, and can be utilized in various industrial fields requiring catalytic reactions using tyrosinases, such as bioremediation processes of toxic phenolic compounds, which are harmful to the environment.

(57) 요약서: 본 발명은 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아에 존재하는 티로시나아제를 바탕으로 새롭게 유전자를 재설계하여 제조한 신규 재조합 티로시나아제에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 티로시나아제는 기존에 알려진 티로시나아제와 달리, 형질전환체로부터 매우 용이하게 대량생산이 가능하고, 넓은 pH 및 상온 및 저온에서도 기존 효소들과 달리 반응을 효율적으로 진행할 수 있다. 따라서 본 발명의 재조합 티로시나아제는 페놀성 화합물이 포함되어 있는 기능성 의약품 및 생체 재료의 생산에 다양하게 활용될 수 있으며, 환경에 유해한 독성을 띄는 페놀성 화합물의 환경 정화 공정 등 티로시나아제를 이용한 촉매 반응을 필요로 하는 다양한 산업 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.



명세서

발명의 명칭: 신규 재조합 티로시나아제

기술분야

- [1] 본 발명은 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아에 존재하는 티로시나아제를 바탕으로 새롭게 유전자를 재설계하여 제조한 신규 재조합 티로시나아제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 티로시나아제는, 리그닌의 분해에 관여하는 락카아제(laccase) 및 무척추동물의 호흡에 필요한 헤모시아닌(hemocyanin) 등과 비슷하게 분류되며, 활성 부위(active site)에 구리를 함유하고 있는 type-3 구리 효소(monophenol monooxygenase, EC. 1.14.18.1)로 알려져 있다. 티로시나아제는 멜라닌 생합성의 초기단계인 L-tyrosine(L-Tyr)을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)로 전환하고 L-DOPA를 도파퀴논(Dopaquinone)으로 변환하는 촉매로, 멜라닌의 생합성 초기 단계에 중요하게 관여하고 있다. 기본적으로 멜라닌은 세포를 자외선과 활성 산소 그리고 독성을 띄는 중금속으로부터 보호하는 역할을 한다. 티로시나아제에 기반한 멜라닌화 반응은 사과, 감자, 바나나와 같은 식물이 절단되어 공기 중에 노출되었을 때 절단면의 갈변 현상을 일으키는 등의 방식으로 상처 치료 및 1차 면역 반응에 관여한다. 동물의 경우, 피부, 털, 눈동자의 색깔에 영향을 주고 피부의 갈색 색소침착 또는 상처 부위의 경화에 관여하기도 한다. 또한, 티로시나아제는 다양한 형태의 모노페놀릭(monophenolic) 또는 다이페놀릭(diphenolic) 화합물을 반응 기질로 사용하여 퀴논(quinone)으로 전환하는데 사용할 수 있다. 따라서 티로시나아제는 멜라닌화를 위한 페놀릭 화합물의 산화 반응을 촉매할 뿐만 아니라, 페놀을 함유하는 폐수나 오염수의 정화, 린코마이신(lincomycin)과 같은 항생제의 생합성, 파킨슨 질환 치료제 등의 의료용 재료로 활용될 수 있는 L-DOPA의 생산, 페놀릭 화합물의 양을 측정하기 위한 바이오센서, 단백질 및 당의 가교(cross-linking) 등에 활용되고 있다.
- [3] 많은 생명체에서 멜라닌 생합성과 관련된 티로시나아제의 유전자 서열이 알려졌음에도 불구하고, 정제된 티로시나아제의 생화학적 특성에 대한 정보는 상대적으로 많이 알려져 있지 않다. 보통 티로시나아제 유전자를 갖고 있는 생명체의 유전체는 하나 이상의 티로시나아제 유전자를 갖고 있으며, 각각의 티로시나아제는 생화학적 특성이 다르다. 예를 들어 방선균으로부터 생산되는 대표적인 티로시나아제인 MelC2와 MelD2의 경우, MelC2는 세포 밖으로 분비되고 효소는 다양한 여러 기질에서 활성을 띄고 있는데 반하여, MelD2는 세포 안에서 발현되면서 그 기질특이성이 매우 높다. 대체적으로 티로시나아제는 모노머릭 단백질로 분자량이 약 20~60 kDa 정도되고, 약 7.5의

최적 pH와 40°C에서 반응 최적 온도를 갖고 있다.

- [4] 최근 박테리아에 존재하는 티로시나아제는, 효소가 활성을 띄기 위해 caddie 단백질로 불리는 추가적인 단백질의 필요 여부와, 산소와 결합하는 하나의 모티프, 구리와 결합하는 두 개의 모티프 등의 도메인 구성에 따라, 5가지 유형으로 분류되고 있다.

- [5] 한편, 현재 상업적으로 활용되고 있는 티로시나아제는 Sigma 회사에서 판매하고 있는 버섯 유래의 *A. bisporus* 티로시나아제로 추출에 의해서 생산되고 있다. 아직까지 상업화되지는 않았지만, 박테리아 유래 다양한 종류의 티로시나아제 또한 마찬가지로 해당 유전자를 갖고 있는 균주로부터 직접 추출하여 얻어내거나 외래 균주에서 재조합 단백질로 생산되고 있다.

- [6] 이러한 측면에서 본 발명자들은 이전의 연구에서 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 신규 재조합 티로시나아제를 제공하였고, 상기 티로시나아제는 티로시나아제는 기존의 5가지의 티로시나아제 분류에 속하지 않는 신규 효소로서, 대장균에서 대량생산이 가능할 뿐만 아니라 기존 효소들과 달리 약산성 pH와 저온에서 높은 활성을 보여주었다 (국내특허출원 10-2015-0053189).

- [7] 하지만, 상기 효소는 수용성 단백질로 생산하기 위하여 샤페론(Chaperone) 단백질을 티로시나아제와 동시 발현하여야 하며, 0°C에서는 안정성이 잘 유지되나 상온(20°C)에서도 안정성이 다소 낮고, L-티로신과 같은 상대적으로 작은 물질을 기질로 한 반응의 전환율은 높으나 혼합접착단백질과 같은 고분자에 존재하는 L-티로신과 같은 기질의 반응을 효율적으로 수행하지 못하여, 수용성 단백질 발현을 위한 별도의 단백질을 필요로 하지 않으면서 동시에 상온에서도 안정성이 뛰어나고 활용가능성이 높은 재조합 티로시나아제에 대한 필요성이 높은 상태이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 기존의 한계점을 극복할 수 있는 티로시나아제에 대한 연구를 수행하던 중, 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 티로시나아제에서 일정 길이의 C-말단 아미노산 서열을 제거하였을 때, 활성과 안정성 측면에서 산업적 활용성이 더욱 뛰어난 신규 티로시나아제를 수득할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 따라서 본 발명의 목적은 활성과 안정성이 개선된 신규한 재조합 티로시나아제를 제공하는 것이다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 제공한다.

- [12] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 티로시나아제 기질 전환용 조성물을 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는, 천연고분자 또는 합성 고분자 내 모노페놀 또는 카테콜 기질 전환용 조성물을 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은 상기 재조합 티로시나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [15] 또한 본 발명은 상기 재조합 티로시나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [16] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [17] 또한 본 발명은 상기 형질전환체로부터 재조합 티로시나아제를 분리 및 정제하는 단계; 를 포함하는 재조합 티로시나아제의 생산 방법을 제공한다.
- [18] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 티로시나아제 기질에 처리하는 단계; 를 포함하는 티로시나아제 기질 전환 방법을 제공한다.
- [19] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 생체 소재를 제공한다.
- [20] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 생체 접착 소재 제조용 조성물을 제공한다.

[21]

발명의 효과

- [22] 본 발명의 재조합 티로시나아제는 기존에 알려진 티로시나아제와 달리, 형질전환체로부터 매우 용이하게 대량생산이 가능하고, 넓은 pH 및 상온 및 저온에서도 기존 효소들과 달리 반응을 효율적으로 진행할 수 있다. 따라서 본 발명의 재조합 티로시나아제는 페놀성 화합물이 포함되어 있는 기능성 의약품 및 생체 재료의 생산에 다양하게 활용될 수 있으며, 환경에 유해한 독성을 띄는 페놀성 화합물의 환경 정화 공정 등 티로시나아제를 이용한 촉매 반응을 필요로 하는 다양한 산업 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

[23]

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 I-TASSER server 를 이용한 티로시나아제의 구조분석 결과를 나타낸 도이다. 도 1의 (a)는 전체 티로시나아제-CNK (1-415) 의 구조를 나타내며, 도 1의 (b)는 C-말단이 제거된 mTyr-CNK (1-303) 의 예측 구조를 나타낸다.
- [25] 도 2는 전체 티로시나아제 서열 중 제거된 C-말단 신장부의 서열 및 선택된 mTyr-CNK 의 서열을 나타낸다.
- [26] 도 3은 티로시나아제-CNK, mTyr-CNK, cTyr-CNK 의 발현 및 정제 분석 결과를 나타낸 도이다 (Sol; 수용성 상청액 분획; Ins; 불용성 세포 debris 분획; Elu;

Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 이용한 정제된 티로시나아제; Mk: 단백질 분자량 마커).

- [27] 도 4는 pH 변화에 따른 mTyr-CNK의 상대적인 초기 활성 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 5는 온도 변화에 따른 mTyr-CNK의 상대적인 초기 활성 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 6은 배양 시간 및 온도에 따른 mTyr-CNK의 열안정성 평가 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 7은 *in vitro* DOPA 변형 수율 확인을 위한 MAP (mussel adhesive protein) 아미노산 조성물 분석결과를 나타낸 도이다.

[31]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 제공한다.
- [33] 본 발명의 재조합 티로시나아제는 기존의 티로시나아제와 달리 저온 내지 상온 및 넓은 pH 에서도 높은 활성을 나타내는 새로운 생화학적 물성을 나타내는 신규한 티로시나아제이며, 샤페론 추가없이도 수용성으로 발현될 수 있다. 또한 넓은 pH 영역에서 높은 활성을 나타내어, 약산성, 중성 및 약염기성 pH 조건에서 발생하는 자연산화 반응을 억제하면서 효소 반응을 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 기존의 효소들과 달리 30°C 이하의 저온에서도 높은 효소 활성을 유지할 수 있고 특히 고분자 내에 존재하는 티로시나아제 기질의 전환을 효과적으로 촉매할 수 있다.
- [34] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [35] 본 발명의 티로시나아제는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지며, 본 발명의 티로시나아제와 동등한 정도의 활성 및 특성을 나타내는 한, 이와 80% 내지 99%, 바람직하게는 85 % 내지 99%, 더욱 바람직하게는 90% 내지 99%의 상동성을 갖는 티로시나아제도 제한없이 본 발명의 티로시나아제에 포함될 수 있다.
- [36] 본 발명의 티로시나아제는 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래, 바람직하게는 캔디다투스 니트로소푸밀루스 코렌시스(*Candidatus Nitrosopumilus Koreensis*) 유래 티로시나아제 서열의 일부를 재조합하는 방법으로 제조될 수 있다.
- [37] 특히 본 발명의 티로시나아제는 서열번호 1의 티로시나아제에서 C-말단 신장부가 제거된 것을 특징으로 할 수 있으며, 서열번호 1로 표시되는 티로시나아제 서열 중 C-말단 신장부 일부인 304 내지 415 부분이 제거된 것이거나, C-말단 신장부 전부인 294 내지 415 가 제거된 것일 수 있다.
- [38] C-말단 신장부의 제거 부위에 따라 효소 활성은 상이하게 나타날 수 있으며, 본

발명의 제조합 티로시나아제의 경우 코어 효소 활성 도메인 부위를 포함하는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 코어 효소 활성 도메인 부위 및 His294 및 Pro303 영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[39] 또한 본 발명의 제조합 티로시나아제는 최적 pH 에서 가장 높은 활성을 나타낼 수 있고, 이와 같은 최적 pH는 pH 3.5 내지 pH 10, 더욱 바람직하게는 pH 4.5 내지 pH 9.5, 더욱 바람직하게는 pH 6 내지 8일 수 있다.

[40] 상기와 같은 최적의 pH 범위는 상용의 버섯 티로시나아제와 유사한 정도의 넓은 활성 pH 범위이다. 이러한 pH 활성 범위에 의하여 본 발명의 제조합 티로시나아제는 통상 약 pH 7.5에서 최적 pH를 갖는 기존의 티로시나아제와 비교하여 보다 산성인 조건에서도 우수한 활성을 나타낼 수 있다. 또한 넓은 pH 영역에서 높은 활성을 띄고 있어, 약산성, 중성 및 약염기성 pH 조건에서 발생하는 자연산화 반응을 억제하면서 효소 반응을 수행할 수 있다.

[41] 또한 본 발명의 제조합 티로시나아제는 저온 또는 상온에서 활성인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 -20 내지 35°C, 더욱 바람직하게는 -10 내지 30°C, 더더욱 바람직하게는 0 내지 30°C 에서 높은 활성을 나타낼 수 있다.

[42] 본 발명의 제조합 티로시나아제는 특히 0°C 이하의 온도에서도 최대 활성의 약 80% 정도를 유지할 수 있으므로, 영하의 보관 온도에서도 활성을 유지할 수 있다는 장점이 있다. 또한 본 발명의 제조합 티로시나아제는 일반적인 활성 온도인 37°C가 아닌 0 내지 30°C 에서 최적의 활성을 나타낼 수 있으며, 예컨대 생체 외 저온 및 상온 조건에서 활성을 나타내고, 생체 내 주입을 통해 생체 온도인 37°C 조건으로 변화되는 경우, 그 활성을 급격하게 소실함으로써, 생체 내에서 원하지 않는 효소 촉매 반응이 발생하는 것을 용이하게 차단할 수 있다.

[43]

[44] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 제조합 티로시나아제를 포함하는 티로시나아제 기질 전환용 조성물을 제공한다.

[45] 본 발명의 “티로시나아제 기질” 이란, 티로시나아제에 의해 효소 반응이 일어날 수 있는 다양한 기질을 제한없이 포함할 수 있으며, monophenol, catechol, 바람직하게는 티로신 또는 DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine), 더욱 바람직하게는 L-티로신 또는 L-DOPA 일 수 있다.

[46] 본 발명의 “티로시나아제 기질 전환” 이란 티로시나아제와 반응할 수 있는 기질의 효소 반응을 촉매하여 전환시키는 것을 의미하며, 예컨대 티로시나아제 기질인 티로신을 L-DOPA로, 티로시나아제 기질인 L-DOPA를 도파 퀴논으로 전환시키는 것을 포함할 수 있다.

[47] 특히 본 발명의 제조합 티로시나아제는 활성 부위와 기질의 반응이 용이한 구조를 가지고 있어, 모노페놀(monophenol) 또는 카테콜(catechol) 기(group) 을 포함하는 천연고분자 및 모노페놀(monophenol) 또는 카테콜(catechol) 기(group) 를 포함하는 페놀릭 합성고분자의 모노페놀(monophenol) 또는 카테콜(catechol)의 반응을 효과적으로 촉매할 수 있다. 상기 모노페놀 또는

카테콜을 포함하는 천연고분자는 콜라젠, 젤라틴, 탄닌, 리그닌 및 콩단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 합성 고분자는 노볼락(Novolac)과 같은 페놀레진(phenolic resin)에 포함된 기질일 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 예에서는 홍합 접착 단백질 내에 포함된 기질, 예를 들어 홍합 접착 단백질의 L-티로신 잔기를 기질로 하는 반응을 제공한다. 대장균에서 생산된 홍합 접착 단백질의 경우 티로신 잔기들이 변형되어 있지 않아 별도의 효소 등을 이용하여 *in vitro* 상에서 티로신 잔기의 전환이 필요하다. 그러나 홍합 접착 단백질과 같은 고분자에 포함된 기질의 경우, 효소의 활성 부위와의 결합이 용이하지 않아, *in vitro*에서 기질의 전환이 용이하게 발생하기 어렵다는 단점이 있다. 그러나 본 발명의 제조합 티로시나아제는 홍합 접착 단백질의 L-티로신과 반응하여 이를 높은 효율로 L-DOPA로 전환시킬 수 있으며, 특히 서열번호 1로 표시되는 티로시나아제-CNK와 비교하더라도 현저히 높은 변형 수율로 L-티로신을 L-DOPA로 전환시킬 수 있다.

- [48] 따라서 본 발명은 홍합 접착 단백질 내 포함된 티로시나아제 기질 전환용인 것을 특징으로 하는, 티로시나아제 기질 전환용 조성물 또는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 제조합 티로시나아제를 포함하는, 천연고분자 또는 합성 고분자 내 모노페놀 또는 카테콜 기질 전환용 조성물을 제공한다.
- [49] 또한 본 발명은 넓은 pH 범위와 저온 및 상온에서 활성을 나타내는 서열번호 2로 표시되는 제조합 티로시나아제를 이용함에 따라, 다양한 pH, 저온 및 상온 환경에 존재하는 티로시나아제 기질 전환용도로 이용할 수 있다.
- [50] 따라서 본 발명은 pH 4.5 내지 pH 9.5 환경의 티로시나아제 기질 전환용 조성물 및 -20°C 내지 35°C 환경의 티로시나아제 기질 전환용 조성물을 제공한다.
- [51]
- [52] 또한 본 발명은 서열번호 2의 제조합 티로시나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 이는 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 염기서열 또는 이와 기능적 동등성이 있는 상동성 폴리뉴클레오타이드를 제한없이 포함할 수 있다.
- [53] 또한 본 발명은 서열번호 3의 제조합 티로시나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 이는 바람직하게는 서열번호 5로 표시되는 염기서열 또는 이와 기능적 동등성이 있는 상동성 폴리뉴클레오타이드를 제한없이 포함할 수 있다.
- [54] 상기 상동성 폴리뉴클레오타이드란, 두 개 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열 사이에 유사한 또는 상호 교환 가능한 서열을 지칭한다. 바람직하게는, 상동성인 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 95%, 더 바람직하게는 97%, 더 바람직하게는 98%, 더더욱 바람직하게는 99%의 서열 동일성을 갖는 것을 말하며, 이와 같은 상동성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의

코돈 최적화 서열에 의해 상기 조건을 만족하게 되는 폴리뉴클레오티드 서열 역시 모두 제한없이 포함할 수 있다.

[55]

[56] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[57] 용어 벡터는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 발현 벡터는 목적인 코딩서열과 특정 숙주생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다. 발현벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 이와 같은 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비 형질전환 세포와 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 카나마이신, 블레오마이신, 클로로앰피니콜, 앰피실린과 같은 항생제 유전자가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[58] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[59] 용어 형질전환체는 숙주세포에 새로운 목적 폴리뉴클레오티드가 도입된 것을 말하며, 숙주세포는 대장균, 효모, 동물, 식물 세포 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[60] 또한 본 발명은 상기 형질전환체로부터 제조합 티로시나아제를 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 제조합 티로시나아제의 생산 방법을 제공한다.

[61] 보다 구체적으로, 상기 생산방법은 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현벡터에 클로닝하여 티로시나아제 발현벡터를 제조하고 이를 대장균에 형질전환시키는 단계; 형질전환된 대장균에서 통상의 방법을 통해 상기 제조합 티로시나아제 단백질의 발현을 유도하는 단계; 및 이를 수용성 분액과 불용성 분액으로 나누고 컬럼을 이용하여 분리 및 정제하는 단계;를 포함할 수 있다.

[62] 상기 생산방법에 따르면, 본 발명의 제조합 티로시나아제가 별도의 샤페론 없이도 대장균에서 inclusion body를 형성하지 않으면서 수용성으로 과량 발현되어 검출될 수 있으므로 대량 생산이 가능하다.

[63]

[64] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 제조합 티로시나아제를 티로시나아제 기질에 처리하는 단계;를 포함하는 티로시나아제 기질 전환 방법을 제공한다.

[65] 본 발명의 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 제조합 티로시나아제는 앞서 설명한 바와 같은 온도 및 pH 활성을 가지므로, 저온 및 상온, 예컨대 바람직하게는 -20 내지 35°C, 더욱 바람직하게는 -10 내지 30°C, 더더욱 바람직하게는 0 내지 30°C 에서 기질을 효과적으로 전환시킬 수 있다. 따라서 본

발명에 따른 상기 티로시나아제 기질 전환 방법은 바람직하게는 -20 내지 35°C, 더욱 바람직하게는 -10 내지 30°C, 더더욱 바람직하게는 0 내지 30°C에서 재조합 티로시나아제를 티로시나아제 기질에 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[66]

[67] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 생체 소재를 제공한다.

[68] 본 발명의 “생체소재”란 의료용 재료의 일종으로, 의약품을 제외한 합성, 천연 또는 그들의 복합체 형태로 일정기간 인체의 조직 또는 기관을 대신하여 그 기능의 일부 또는 전부를 대체할 수 있는 소재를 의미한다.

[69] 또한 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 생체 접착 소재 제조용 조성물을 제공한다.

[70] 본 발명에 있어 “생체 접착 소재”란 생체에 국소적으로 적용되어 외과 수술용 봉합사를 대체해 손쉽고, 즉각적으로 상처에 접착 및 봉합할 수 있고, 피부 화상 또는 수술로 인해 발생한 전층 결함 조직을 메우거나, 결함 조직 내의 재생과 흉터 최소화를 위해 이용될 수 있는 소재를 제한없이 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 “생체 조직”은 특별하게 제한되지 않으며, 예를 들어 피부, 신경, 뇌, 폐, 간, 신장, 위, 소장, 직장 및 뼈 등을 포함한다.

[71] 본 발명의 재조합 티로시나아제는 생체 접착 소재의 제조에 있어 중요한 역할을 하는 L-DOPA 를 티로신으로부터 효율적으로 전환시킬 수 있으므로, 생체 접착 소재를 제조하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다.

[72]

[73] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[74]

발명의 실시를 위한 형태

[75] 실시예 1. 재조합 티로시나아제의 선정

[76] 국내특허출원 10-2015-0053189 에서 확인한 재조합 티로시나아제 (이하, 티로시나아제-CNK) 를 개선하여 효소 활성이 더욱 향상된 재조합 티로시나아제를 제조하기 위한 서열 분석 및 구조 분석을 수행하였다. 구조적 상동성 모델을 I-TASSER 서버 (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) 를 이용하여 분석하였으며, 모델 구조는 Discovery Studio software (Dassault Systems BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2016, San Diego: Dassault Systems, 2017) 를 이용하여 분석하였다. 단백질 이온화도, residual pK 값, SAP (응집 스코어) 및 docking simulations (CDOCKER) 는 pH 6.0 에서 Discovery Studio modules 및 CHARMM force field 를 이용하여 확인하였다. PyMol 1.8.6.2 (Schrodinger, LLC, Cambridge, MA, USA) 을 이용하여 상기 결과를 시각화하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [77] 도 1의 (a)에 나타낸 바와 같이, I-TASSER server를 이용한 상동성 모델에서 전체 티로시나아제-CNK는 회색으로 표시된 C-말단 신장부(304-415)를 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한 His294 및 Pro303 사이에 붉은 리본으로 표시된 헬리컬 영역을 가지고 있었다. SAP 분석에 의하면, 이는 소수성 패치의 dynamic 노출의 결과로 aggregation-prone 영역일 것으로 예측되었다. 이러한 결과를 통해 티로시나아제-CNK의 일부 부위를 제거하면 남은 티로시나아제-CNK 부위의 기능적인 폴딩을 개선할 수 있을 것임을 예측하였다. 도 1의 (b)에 나타낸 바와 같이, 전체 티로시나아제-CNK에서 C-말단 신장부를 제거하여 제조한 재조합 티로시나아제인 mTyr-CNK는 CDOCKER docking 시뮬레이션을 이용한 L-tyrosinase 결합 복합체 구조 분석 결과 활성 부위의 진입 부분이 노출된 형태를 가질 수 있음을 예측하였다.
- [78] 이와 같은 C-말단 신장부의 제거를 통해 기존 티로시나아제-CNK의 효소 활성을 더욱 개선할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 C-말단 신장부를 제거한 신규한 재조합 효소를 제조하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 전체 티로시나아제 서열 중 304-415에 해당하는 부분(회색)을 제외하고 1-303의 서열로만 이루어진 C-말단 신장부가 제거된 재조합 티로시나아제를 제조하였다. 전체 티로시나아제-CNK(1-415)의 서열은 서열번호 1에 나타내었으며, 유전자 변형을 통해 제조된 신규한 티로시나아제 mTyr-CNK(1-303)는 서열번호 2에, 코어 서열을 포함하는 제조된 신규한 티로시나아제 cTyr-CNK(1-293)은 서열번호 3에 나타내었다.
- [79]
- [80] 실시예 2. 재조합 티로시나아제 발현 및 정제
- [81] 선정된 신규한 티로시나아제를 제조하기 위하여 *Escherichia coli* DH5 α (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 세포를 재조합 벡터 제조를 위한 숙주세포로 사용하였으며 *E. coli* BL21 (DE3) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 재조합 티로시나아제 발현을 위해 사용하였다. 상기 대장균 세포들은 50 μ g ampicillin mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함된 LB 배지에서 배양하였다. 구체적으로 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 티로시나아제 기반 신규 재조합 티로시나아제를 제조하기 위하여 이의 유전자를 코돈 최적화하여 합성하고 이를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다. 최적화된 DNA의 양 말단에는 *Nde*I, *Xho*I의 제한효소 사이트를 첨가하고 발현용 프로모터 T7을 포함하는 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 티로시나아제 발현 벡터를 제조하였다. 발현 벡터에는 재조합 단백질의 정제를 위하여 C-말단에 6개의 히스티딘 서열로 이루어진 히스티딘 태그(histidine tag, HHHHHH)가 포함되도록 하였으며, 유전자 도입을 확인하기 위하여 앰피실린 저항성 유전자가 포함되도록 하였다. 제조된 벡터 구조 pmTyr-CNK를 직접 서열 분석법을 통해 확인하였다. cTyr-CNK(1-293) 유전자를 유사한 방법으로 pET23b+ 벡터에 삽입하였으며, 최종 벡터는 pcTyr-CNK로 기재하였다.

- [82] 상기 벡터에 포함된 티로시나아제를 효과적으로 발현하기 위하여 제조한 벡터 pmTyr-CNK 과 pcTyr-CNK 을 각각 발현할 수 있는 대장균을 제조하였다. 티로시나아제 유전자를 포함하고 있는 벡터 pmTyr-CNK과 pcTyr-CNK 을 각각 42°C 에서 1분 30초간 열충격을 가하여 대장균 BL21(DE3)에 도입하였다. pmTyr-CNK과 pcTyr-CNK 을 각각 앰피실린 항생제에서 저항 내성을 지니는 벡터이므로, 앰피실린이 첨가되어 있는 LB-한천 배지에서 배양하여 벡터가 도입된 형질전환 대장균을 선별하였다.
- [83] 상기 제조된 형질전환체를 50μg/mL 앰피실린이 첨가된 통상의 37°C, 50mL 의 LB 배지에서 200rpm으로 진탕 배양하여 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 0.8~1.0 정도에 도달했을 때 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 1 mM)를 첨가하여 상기 제조합 티로시나아제 단백질의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 추가로 20시간 동안 20°C에서 배양한 후, 배양된 세포를 15840g에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 수득한 펠렛을 -80°C 에서 보관하였다. 제조합 티로시나아제를 정제하기 위하여, 건중량 당 5ml lysis 완충액 (50 mM 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer), pH 8.0, 10mM 이미다졸(imidazole), 300mM NaCl) 을 제부유시켰으며, 상기 세포들을 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다 Lysate 를 10분 동안 15,840g 및 4°C 조건에서 원심분리하였으며, 상청액을 수집하여 Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity purification column (Qiagen, Germantown, MD, USA) 에 가하고, 세척 완충액 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸; pH 8.0) 및 용출 완충액 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM 이미다졸 및 0.02 mM CuSO₄; pH 8.0) 를 이용하여 순수한 티로시나아제를 수득하였다. 발현 수준 및 단백질의 순도는 SDS-PAGE 를 이용하여 확인하였으며, 겔 분석은 이미지 분석 소프트웨어 (CLIQS; TotalLab Ltd., Newcastle upon Tyne, UK)를 이용하여 수행하였다. 상기 단백질의 농도는 BCA 어세이를 통해 확인하였다. 티로시나아제-CNK, mTyr-CNK 및 cTyr-CNK 단백질의 기능적 발현 및 정제 결과를 도 3에 나타내었다.
- [84] 도 3에 나타낸 바와 같이, 제조합 티로시나아제 단백질이 수용성으로 과량 발현되어 검출되었으며, 이를 통해 제조합 티로시나아제 단백질이 수용성 형태로 대량 생산될 수 있음을 확인하였다. 특히 mTyr-CNK 는 서열번호 1의 티로시나아제-CNK 와 비교하여 세포 내에서의 단백질 총 발현량이 매우 탁월하게 향상되어 일부 불용성의 inclusion body가 형성되었으나, 서열번호 1의 티로시나아제-CNK 는 기능적인 발현을 위해서 GroES 및 GroEL 라는 샤페론이 필요한 것과 달리 총 단백질의 약 50% 정도가 샤페론 없이도 수용성으로 발현됨을 확인하였다. mTyr-CNK는 95% 이상의 높은 순도로 정제되었으며, cTyr-CNK 역시 동일 조건에서 수용성으로 발현되고 정제되었다.

[85]

[86] 실시예 3. 제조합 티로시나아제 단백질 분석

[87] **3.1 최적 pH 분석**

[88] 실시예 2에서 제조된 재조합 티로시나아제 단백질의 성질을 분석하기 위하여 최적 pH를 분석하였다. L-DOPA를 반응물로 이용하여 L-도파크롬의 형성을 각기 다른 pH 에서 측정하는 분석을 수행하였으며, 이와 같은 분석법은 50mM 반응 완충액 (glycine-HCl buffer at pH 1-3, sodium acetate buffer at pH 3.5-5, sodium phosphate buffer at pH 5.5-7, tris-HCl buffer at pH 7.5-9, 및 glycine-NaOH buffer at pH 9.5-11), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA 및 0.4μM 정제된 mTyr-CNK 를 이용하여 수행하였다. L-도파크롬의 형성은 472nm 에서 흡광도를 측정하는 방법으로 모니터링하였다. 상용의 버섯 티로시나아제 (Sigma-Aldrich) 를 비교군으로 이용하였으며 mTyr-CNK의 최적 pH 분석 결과를 도 4에 나타내었다. 모든 측정은 3회 반복하였다.

[89] 도 4 에 나타낸 바와 같이, L-DOPA를 기질로 사용하였을 때 mTyr-CNK 의 상대적 초기 활성은 변화하였으며, 특히 pH 5 이상 pH 9 이하 범위에서 높은 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다. mTyr-CNK 는 상용의 버섯 티로시나아제와 유사하게 상대적으로 넓은 pH 영역에서 높은 활성을 나타내었으며, 기존에 알려진 티로시나아제가 약 pH 7.5에서 최적 pH를 갖는 것과 비교하여 보다 산성인 조건에서도 우수한 활성을 나타낼 수 있는 장점이 있음을 확인하였다.

[90]

[91] **3.2 최적 온도 분석**

[92] pH 값을 6으로 고정하고 온도를 0 내지 60°C 범위로 달리하며 mTyr-CNK의 최적의 온도를 확인하는 실험을 수행하였다. 온도에 따른 반응 분석은 50 mM Tris buffer (pH 6.0), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA 및 0.4 μM 정제된 mTyr-CNK 를 포함하는 200μL 부피의 반응액에서 수행하였다. 상용의 버섯 티로시나아제 (Sigma-Aldrich) 를 역시 비교군으로 이용하였다. 모든 측정은 3회 반복하였으며, 측정 결과를 도 5에 나타내었다.

[93] 도 5에 나타낸 바와 같이, mTyr-CNK 는 실온인 20°C 내지 25°C 에서 최적의 활성을 나타내었으며, 심지어 0°C 에서도 최대 활성의 80% 이상을 유지하는 것을 확인하였다. 즉 mTyr-CNK 는 통상의 티로시나아제와 달리 저온 조건인 0 내지 10°C 에서도 높은 활성을 나타내었고, 일반적인 활성 온도인 37°C가 아닌 20°C 부근의 상온에서 최고의 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과에 따라 재조합 mTyr-CNK 가 기존의 티로시나아제와 달리 저온 및 상온에서도 높은 활성을 나타낼 수 있는 새로운 성질을 갖는 효소임을 확인하였다.

[94]

[95] **3.3 mTyr-CNK 의 열안정성 및 kinetic parameter 분석**

[96] mTyr-CNK 활성의 kinetic parameter 를 L-티로신을 이용한 L-도파크롬 형성 측정방법 및 spectrometric assay 을 이용한 L-DOPA 분석을 통해 확인하였다. 분석은 50 mM Tris buffer (pH 6.0) 및 0.01 mM CuSO₄ 를 포함하는 200 μL 용액을

이용하여 수행하였다. Kinetic 분석을 위하여 0.4 μ M 정제된 효소와 기질인 0.025-0.0625 mM 농도의 L-티로신 및 L-DOPA 를 이용하였다. L-도파크롬의 형성은 475nm 에서의 흡광도 측정을 통해 확인하였으며, 3600 M⁻¹cm의 몰 흡광계수를 이용하여 흡광도를 변환하였다. 모든 측정은 3회 반복 수행하였다. mTyr-CNK 의 열안정성은 다양한 온도에 노출된 효소의 활성이 얼마나 유지될 수 있는지를 확인하는 방법을 통해 수행하였으며, 50 mM Tris buffer (pH 6.0), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA 및 0.4 μ M 정제된 mTyr-CNK 를 포함하는 200 μ L 용액을 이용하였다. Kinetic parameter 측정값과 열안정성 평가 결과를 각각 표 1 및 도 6 에 나타내었다.

[97] [표1]

Temperature (°C)	Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	V_{max} Mono/ V_{max} Di	$(k_{cat}/K_m \text{ Mono}) / (k_{cat}/K_m \text{ Di})$
20	L-tyrosine	2.12 $\pm$ 0.14	3.33 $\pm$ 0.18	1.57 $\pm$ 0.01	3.83	0.87
	L-DOPA	0.49 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.07	1.81 $\pm$ 0.26		
25	L-tyrosine	2.42 $\pm$ 0.63	3.25 $\pm$ 0.81	1.35 $\pm$ 0.01	3.78	1.02
	L-DOPA	0.67 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.25	1.33 $\pm$ 0.08		

[98] 표 1에 나타낸 바와 같이, 종래의 상당수 티로시나아제에서 monophenolase 활성이 diphenolase 활성에 비해 100 배 이상 낮은 것과 비교하여, mTyr-CNK는 3.83 이라는 현저하게 높은 V_{max} mono/ V_{max} di (monophenolase/diphenolase activity ratio) 를 나타내었으며, monophenolase 반응의 k_{cat}/K_m 값은 diphenolase 반응값보다 약간 낮은 87% 수준인 것으로 나타났다. mTyr-CNK의 활성 비 (V_{max} mono/ V_{max} di) 는 서열번호 1로 표시되는 티로시나아제-CNK 의 알려진 kinetic 파라미터 (표 2, pH6 및 25°C 조건) 와 비교하여 약 2배 이상 높은 값을 나타내었다.

[99] [표2]

L-티로신	$k_{cat} = 4.3 \pm 1.08$ (s ⁻¹)
	$K_m = 9.2 \pm 2.4$ (mM)
	$k_{cat}/K_m = 0.47$ (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)
L-DOPA	$k_{cat} = 2.2 \pm 0.47$ (s ⁻¹)
	$K_m = 2.6 \pm 0.56$ (mM)
	$k_{cat}/K_m = 0.85$ mM ⁻¹ ·s ⁻¹)

[100]

[101] 한편 His294 및 Pro303 사이의 헬리컬 영역이 제거된 cTyr-CNK의 kinetic 파라미터는 pH 6 및 25°C 조건에서 표 3과 같이 나타났다.

[102]

[103] [표3]

L-티로신	$k_{cat} = 2.13 \pm 0.79 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
	$K_m = 1.60 \pm 0.65 \text{ (mM)}$,
	$k_{cat}/K_m = 1.37 \pm 0.07 \text{ (mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$
L-DOPA	$k_{cat} = 2.05 \pm 0.10 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
	$K_m = 0.56 \pm 0.04 \text{ (mM)}$
	$k_{cat}/K_m = 3.65 \pm 0.09 \text{ (mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$

[104]

[105] 이러한 결과는 mTyr-CNK와 cTyr-CNK 가 비록 동일한 코어 효소활성 도메인을 공유하지만 His294 및 Pro303 사이의 헬리컬 영역의 제거로 인하여 mTyr-CNK의 효소활성이 변화됨을 보여주는 결과이다. 이러한 결과는 C-말단 도메인이 제거된 mTyr-CNK은 코어 효소활성 도메인의 구조에는 직접적인 큰 영향을 받지 않으며, 오직 효소 활성 및 특이도만 변형되었음을 나타낸다. 한편 L-티로신에 대한 효소의 턴오버 수 (turnover number) 및 결합 친화도는 L-DOPA에 대한 턴오버수 및 결합 친화도보다 높게 나타났다.

[106] 또한 도 6에 나타낸 바와 같이 mTyr-CNK 단백질은 30°C 이하에서는 매우 안정하였으나, 37 및 40°C에서의 반감기는 각각 25분 및 5분 미만인 것을 확인하였다. 이와 같은 30°C를 초과하는 온도에서의 mTyr-CNK의 불안정성은 효소를 이용한 공정에서 반응 후 효소를 선택적으로 불활성화시키는데 이용될 수 있다. 이러한 특징은 카테콜관련 생촉매 반응에서 원하지 않는 자가산화반응이 최소화되어야 하고 폴리머 고분자의 페놀성 모이어티의 변형이 강화되어야 하는 경우 유용하게 사용될 수 있다.

[107] 한편 mTyr-CNK는 30°C 이하에서도 열안정성을 잘 유지할 수 있으므로, 통상적으로 효소가 보관되는 냉장 (2 내지 8°C) 및 냉동 (20°C) 조건에서도 활성을 잘 유지할 수 있을 것으로 예상되었다. 특히, 생체내의 온도인 37°C에서 효소의 활성 저하가 빠르게 일어나, 생체 온도보다 낮은 조건에서 효소반응을 수행하고 생체 내 환경으로 온도를 바꾸었을 때 효소의 활성이 빠르게 사라질 수 있으므로, 의료용 생체 소재에 적용 가능성이 매우 높을 것으로 기대되었다.

[108]

[109] 실시예 4. DOPA 변형활성 비교

[110] 홍합 접착 단백질은 대표적인 DOPA-tethered 생체재료로 알려져 있고, DOPA는 빠르고 강한 수중 접착을 위해 필수적이다. 제조합 홍합 접착 단백질을 이용하는 것은 많은 양의 단백질을 생산할 수 있다는 점에서 장점이 있으나, 15% 이하라는 낮은 in vitro DOPA 변형 수율이 걸림돌로 작용한다. 본 발명의 mTyr-CNK의 in vitro DOPA 변형 효율을 확인하기 위하여, mTyr-CNK를 제조합 홍합 접착 단백질의 in vitro DOPA 변형에 적용하였으며, 이에 따른 DOPA

함량의 변화를 아미노산 조성물 분석법을 이용하여 확인하였다. 모델 단백질로는 홍합 접착단백질 중 fp-151 (이하 'MAP') 를 이용하였다.

- [111] 동결건조된 MAP 분말을 50 mM Tris buffer (pH 6.0) 및 25 mM 아스코르브산을 포함하는 용액을 이용하여 1mg/mL 의 최종 농도가 되도록 용해시켰다. 정제된 서열번호 1의 티로시나아제-CNK 또는 mTyr-CNK 를 최종 농도가 0.01mg/mL 이 되도록 추가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 부드럽게 교반하면서 3시간 동안 배양하였으며, 10mM 아세트산으로 투석하고 추가 연구를 위하여 -80°C에 저장하였다. 25 μ L의 페놀을 6 M HCl 에서 500 μ L의 티로시나아제-처리된 MAP 용액에 추가하였다. 아르곤 가스를 이용하여 산소를 제거한 후 1시간 동안 156 °C에서 시료를 배양하면서 산 가수분해를 수행하였다. 증류수 및 메탄올을 이용하여 단백질의 가수분해물을 세척하고 용매를 증발시켜다. 그 후 아미노산 조성물을 이온 교환 컬럼 및 닌하이드린-기반 검출 시스템 (Amino acid analyzer S4300; Sykam, Eresing, Germany) 을 이용하여 분석하였다. mTyr-CNK 및 티로시나아제-CNK 를 이용한 in vitro DOPA 변형 분석 결과를 도 7에 나타내었다.

- [112] 도 7에 나타낸 바와 같이, mTyr-CNK 는 버섯 티로시나아제에서 보고된 15% 이하의 변형율과 비교하여 현저하게 높은 53%의 변형 수율을 나타내었다. 한편 비교예로 사용된 서열번호 1의 티로시나아제-CNK는 37% 정도의 변형 수율을 나타내었다. 상기와 같은 결과는 mTyr-CNK가 매우 높은 monophenolase/diphenolase 활성 비율을 나타내며, L-티로신에 대하여 증가된 효소 활성을 나타낼 수 있음을 보여주는 결과이다.

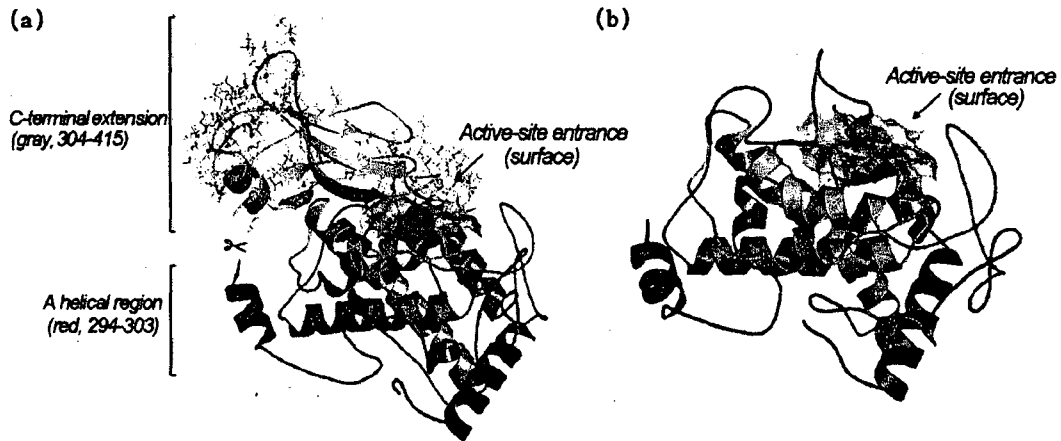
[113]

- [114] 본 발명의 서열번호 2로 표시되는 mTyr-CNK은 매우 우수한 효소 활성을 나타낼 뿐만 아니라 넓은 pH 및 온도에서 안정성을 유지할 수 있고, 특히 0°C 에서 최대 활성의 80% 를 유지하고 30°C 이하에서도 지속적으로 매우 안정한 상태를 유지하는 우수성을 나타낸다. 이러한 우수성은 거대 분자인 페놀성 기질이 상대적으로 mTyr-CNK 의 활성부위에 접근이 용이하기 때문인 것으로 예상된다. 따라서 mTyr-CNK는 약학적 카테콜 중간체의 생합성 및 페놀성 식물성 화학물질의 생합성, 카테콜 생성 화학물의 검출 및 정량을 위한 티로시나아제-기반 바이오 센서 및 페놀성 및 치환된 페놀성 화합물의 해독과 같은 바이오 의약 및 산업적 적용을 위한 모노페놀 모노옥시다아제(monophenol monooxygenase) 로 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제.
- [청구항 2] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제는 서열번호 1의 티로시나아제에서 C-말단 신장부가 제거된 것을 특징으로 하는, 재조합 티로시나아제.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 재조합 티로시나아제는 pH 4.5 내지 pH 9.5 에서 활성인 것을 특징으로 하는, 재조합 티로시나아제.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 재조합 티로시나아제는 -20°C 내지 35°C 에서 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 재조합 티로시나아제.
- [청구항 5] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 티로시나아제 기질 전환용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 티로시나아제 기질은 티로신 또는 DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine) 인 것을 특징으로 하는, 티로시나아제 기질 전환용 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 조성물은 홍합 접착 단백질 내 포함된 티로시나아제 기질 전환용인 것을 특징으로 하는, 티로시나아제 기질 전환용 조성물.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 조성물은 pH 4.5 내지 pH 9.5 환경의 티로시나아제 기질 전환용인 것을 특징으로 하는, 티로시나아제 기질 전환용 조성물.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 조성물은 -20°C 내지 35°C 환경의 티로시나아제 기질 전환용 인 것을 특징으로 하는, 티로시나아제 기질 전환용 조성물.
- [청구항 10] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는, 천연고분자 또는 합성 고분자 내 모노페놀 또는 카테콜 기질 전환용 조성물.
- [청구항 11] 제1항의 재조합 티로시나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 12] 제11항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 13] 제12항의 벡터로 형질전환된, 형질전환체.
- [청구항 14] 제13항의 형질전환체로부터 재조합 티로시나아제를 분리 및 정제하는 단계; 를 포함하는 재조합 티로시나아제의 생산 방법.
- [청구항 15] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 티로시나아제 기질에 처리하는 단계; 를 포함하는 티로시나아제 기질 전환 방법.
- [청구항 16] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 생체 소재.
- [청구항 17] 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 재조합 티로시나아제를 포함하는 생체 접착 소재 제조용 조성물.

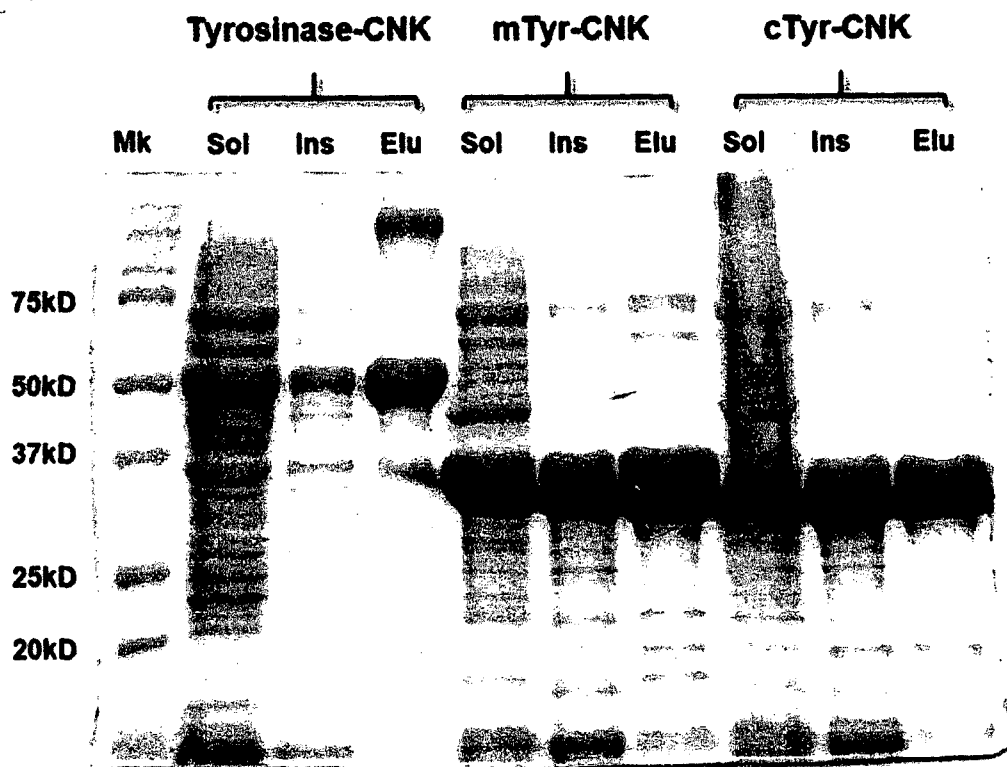
[도 1]



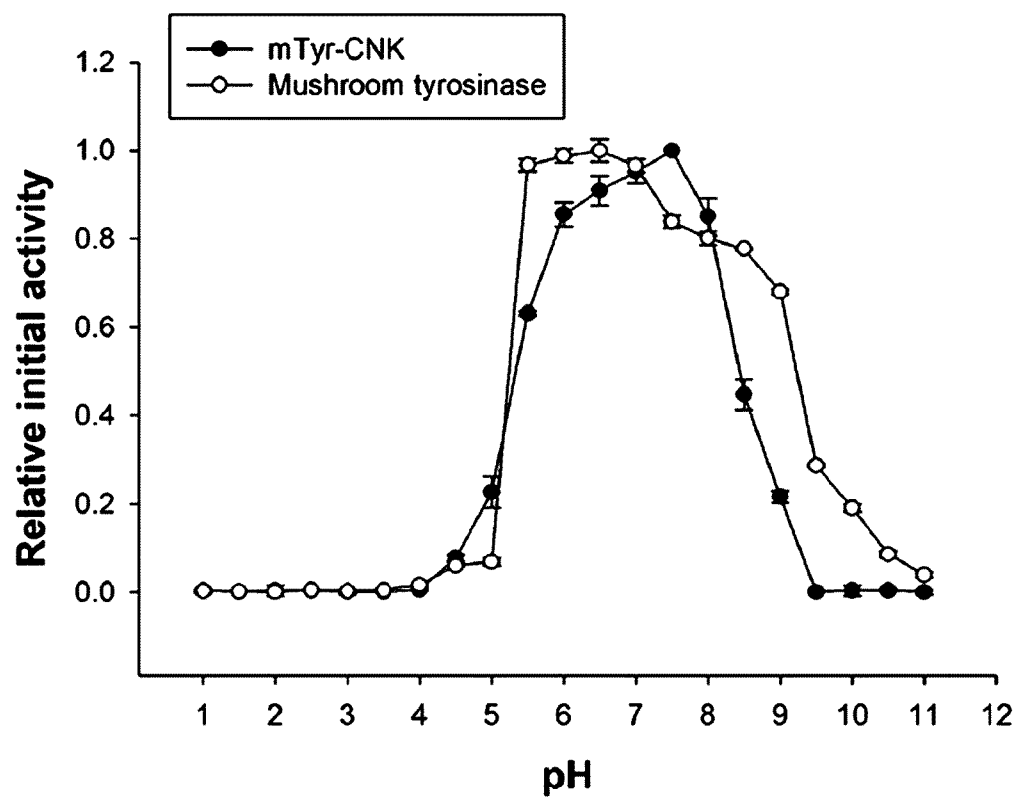
[도 2]

MTKKNKDFL PDERQRYCNA LIZLAQTIEP GRTLSKYDEF VAIEYGVTRR LRNGIPIGOG AHFVPGFLAN RREYLMRFEK AIRVDSTLS LPTWNNSSGD
 DTDTEIFTD DENGPPGDPH NGNKITSQYT VERGNEVESE LDGGRNGSVL VRDSTLLSSS KLSQVSGYGE LAMDAVNGDN DFDSPLPGLE GPHGSIENWI
 OGHGTSMTSP HDPIFFLHNA NIDRLNBEHQ ELHPGIVENTN PHNEDSGYGR LNDMMNPDG SEDITTYRTO TATGISLQQL LPTPSDYDIV TPRVLDNML
 TIIPIVRQFL ANTLQIRNQT TGEILSRYKI IGSVPDKFAA NNGILNQILT TIGVEDRIGR TESDNDFVDV ILEISHTDNH VNSARGVQLG GDDIEVFVRG
 TSTGTLAKTQ EIPLP

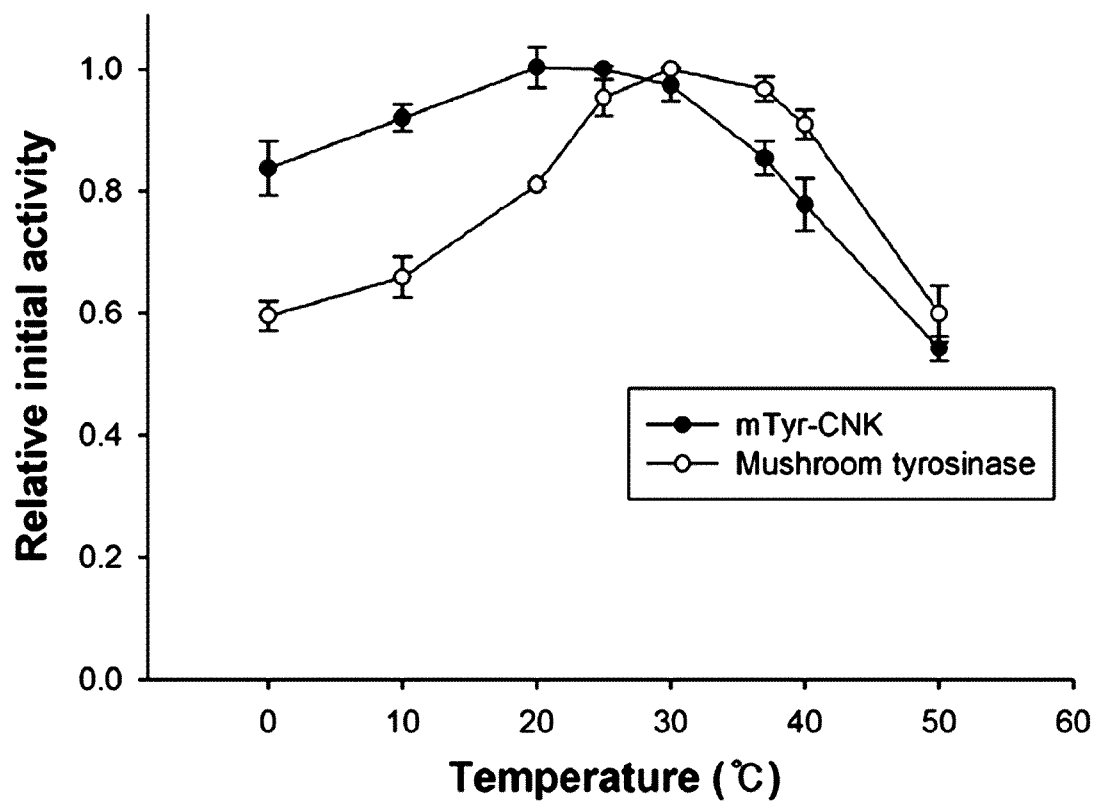
[도 3]



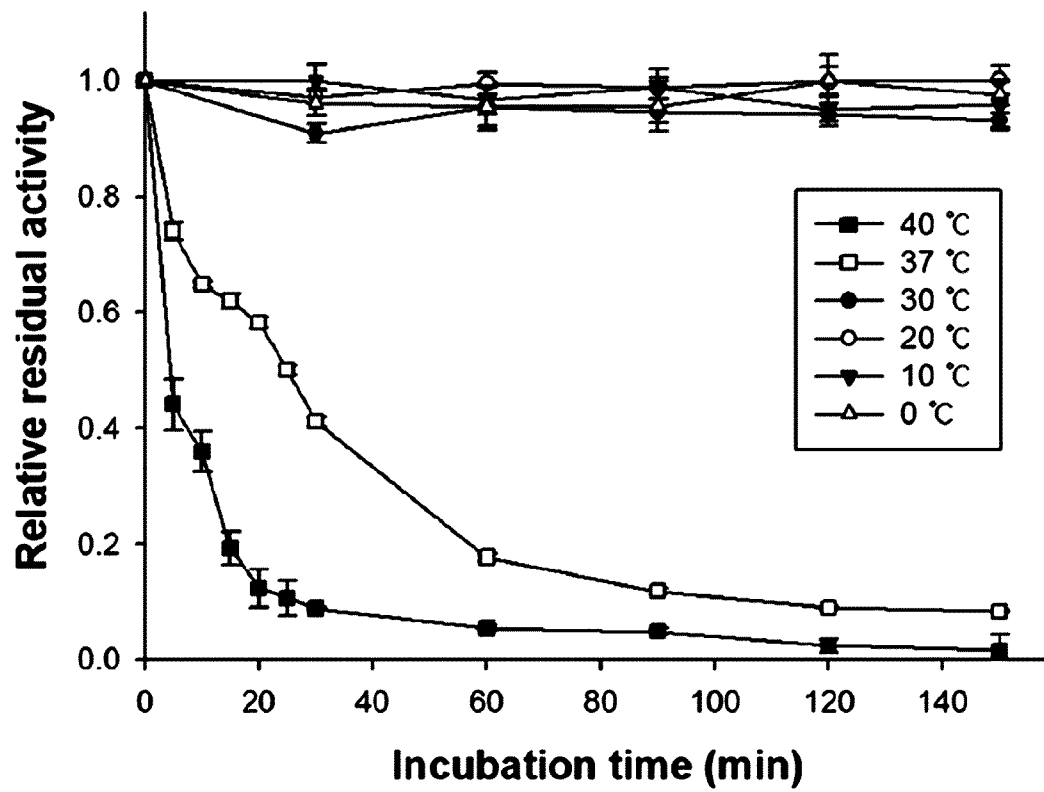
[도4]



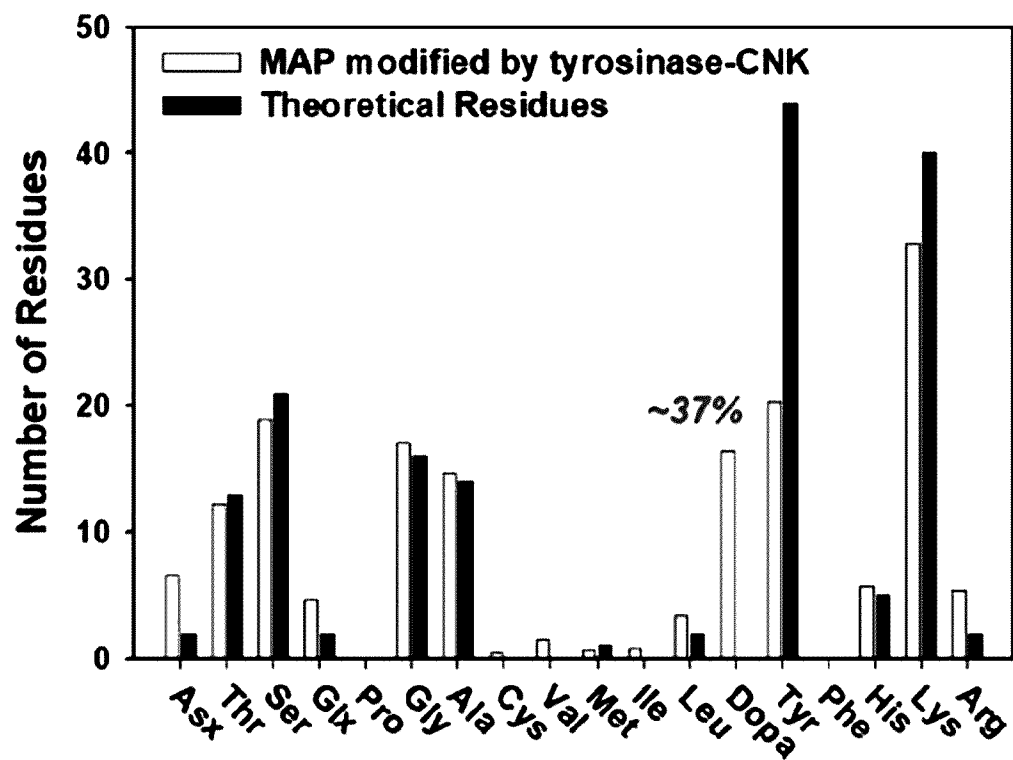
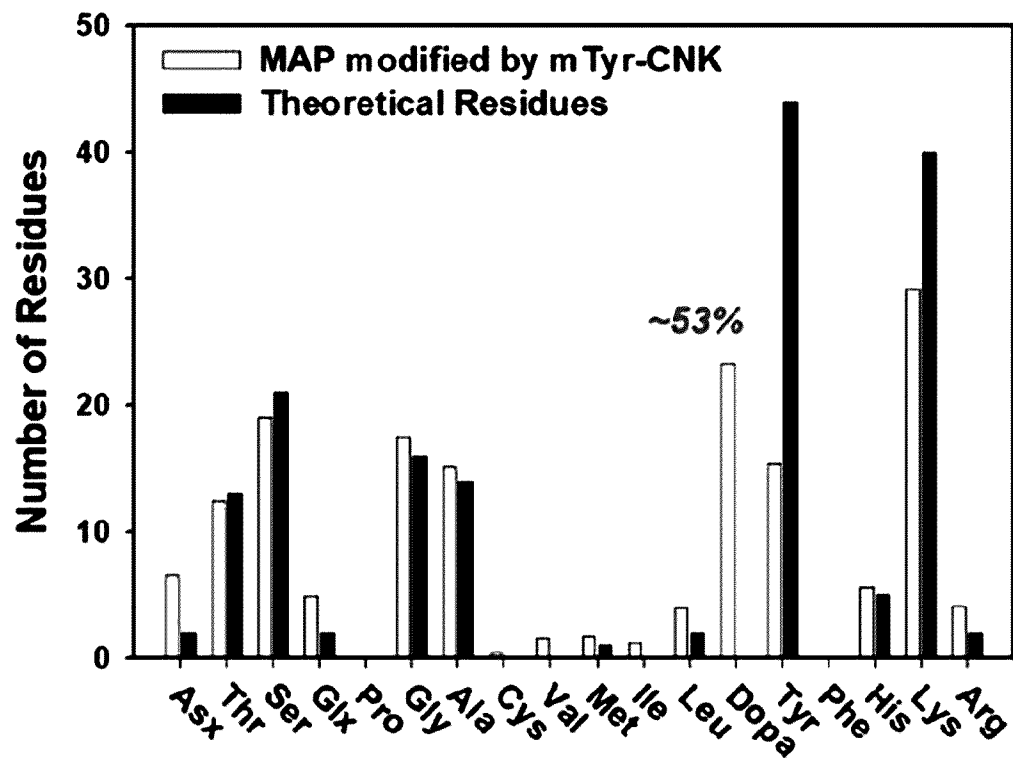
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/015183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/02; C12N 15/63; C07K 19/00; C07K 14/47; C12N 15/12; C07K 14/435; C12N 15/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: tyrosinase, C-terminus, removal, substrate, biobonding material

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2016-0123088 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 25 October 2016 See claims 1-7; paragraphs [0025], [0032]; example 1; and sequence no. 1 of pages 11-13.	1-17
Y	KR 10-2010-0105256 A (CHUNG-ANG UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 29 September 2010 See example 2; and experimental example 3.	1-17
Y	KR 10-2012-0114072 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 16 October 2012 See claims 1, 11-12; and paragraphs [0046]-[0047].	16, 17
A	NCBI Reference Sequence: WP_014962752.1 (18 June 2014) See the entire document.	1-17
A	KR 10-2008-0030550 A (VALTION TEKNIILLINEN TUTKIMUSKESKUS) 04 April 2008 See the entire document.	1-17
PX	DO, Hyunsu et al., "A Tyrosinase, mTyr-CNK, That Is Functionally Available as a Monophenol Monooxygenase", Scientific Reports, 08 December 2017, vol. 7, 17267, inner pages 1-8 See inner pages 1, 5-6; and figure 1.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 APRIL 2018 (06.04.2018)

Date of mailing of the international search report

06 APRIL 2018 (06.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

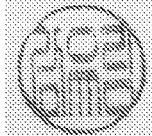
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/015183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0123088 A	25/10/2016	KR 10-1718319 B1	21/03/2017
KR 10-2010-0105256 A	29/09/2010	KR 10-1096678 B1	22/12/2011
KR 10-2012-0114072 A	16/10/2012	KR 10-1412773 B1	30/06/2014
KR 10-2008-0030550 A	04/04/2008	AU 2006-212149 A1	17/08/2006
		AU 2006-212149 B2	04/03/2010
		CA 2597462 A1	17/08/2006
		CN 101137749 A	05/03/2008
		EP 1848798 A1	31/10/2007
		EP 1848798 B1	03/07/2013
		FI 118567 B1	31/12/2007
		FI 20055059 A0	10/02/2005
		JP 2008-530989 A	14/08/2008
		JP 5069133 B2	07/11/2012
		NZ 560352 A	25/06/2010
		US 2009-0203882 A1	13/08/2009
		US 7910344 B2	22/03/2011
		WO 2006-084953 A1	17/08/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/02(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/02; C12N 15/63; C07K 19/00; C07K 14/47; C12N 15/12; C07K 14/435; C12N 15/53 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 테로시니아제, C-말단, 제거, 기질, 생체 접촉 소재																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2016-0123088 A (중남대학교산학협력단) 2016.10.25 청구항 1-7; 문단 [0025], [0032]; 실시예 1; 및 페이지 11-13의 서열번호 1 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2010-0105256 A (중앙대학교 산학협력단) 2010.09.29 실시예 2; 및 실험예 3 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2012-0114072 A (포항공과대학교 산학협력단) 2012.10.16 청구항 1, 11-12; 및 문단 [0046]-[0047] 참조.</td> <td>16, 17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI Reference Sequence: WP_014962752.1 (2014.06.18) 전체 문헌 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2008-0030550 A (발터온 테크놀리넨 투트키무스케스쿠스) 2008.04.04 전체 문헌 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>DO, HYUNSU 등, 'A tyrosinase, mTyr-CNK, that is functionally available as a monophenol monooxygenase', Scientific Reports, 2017.12.08, 7권, 17267, 내부페이지 1-8 내부페이지 1, 5-6; 및 도면 1 참조.</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2016-0123088 A (중남대학교산학협력단) 2016.10.25 청구항 1-7; 문단 [0025], [0032]; 실시예 1; 및 페이지 11-13의 서열번호 1 참조.	1-17	Y	KR 10-2010-0105256 A (중앙대학교 산학협력단) 2010.09.29 실시예 2; 및 실험예 3 참조.	1-17	Y	KR 10-2012-0114072 A (포항공과대학교 산학협력단) 2012.10.16 청구항 1, 11-12; 및 문단 [0046]-[0047] 참조.	16, 17	A	NCBI Reference Sequence: WP_014962752.1 (2014.06.18) 전체 문헌 참조.	1-17	A	KR 10-2008-0030550 A (발터온 테크놀리넨 투트키무스케스쿠스) 2008.04.04 전체 문헌 참조.	1-17	PX	DO, HYUNSU 등, 'A tyrosinase, mTyr-CNK, that is functionally available as a monophenol monooxygenase', Scientific Reports, 2017.12.08, 7권, 17267, 내부페이지 1-8 내부페이지 1, 5-6; 및 도면 1 참조.	1-17
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
Y	KR 10-2016-0123088 A (중남대학교산학협력단) 2016.10.25 청구항 1-7; 문단 [0025], [0032]; 실시예 1; 및 페이지 11-13의 서열번호 1 참조.	1-17																					
Y	KR 10-2010-0105256 A (중앙대학교 산학협력단) 2010.09.29 실시예 2; 및 실험예 3 참조.	1-17																					
Y	KR 10-2012-0114072 A (포항공과대학교 산학협력단) 2012.10.16 청구항 1, 11-12; 및 문단 [0046]-[0047] 참조.	16, 17																					
A	NCBI Reference Sequence: WP_014962752.1 (2014.06.18) 전체 문헌 참조.	1-17																					
A	KR 10-2008-0030550 A (발터온 테크놀리넨 투트키무스케스쿠스) 2008.04.04 전체 문헌 참조.	1-17																					
PX	DO, HYUNSU 등, 'A tyrosinase, mTyr-CNK, that is functionally available as a monophenol monooxygenase', Scientific Reports, 2017.12.08, 7권, 17267, 내부페이지 1-8 내부페이지 1, 5-6; 및 도면 1 참조.	1-17																					
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2018년 04월 06일 (06.04.2018)		국제조사보고서 발송일 2018년 04월 06일 (06.04.2018)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516 																					

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/015183

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0123088 A	2016/10/25	KR 10-1718319 B1	2017/03/21
KR 10-2010-0105256 A	2010/09/29	KR 10-1096678 B1	2011/12/22
KR 10-2012-0114072 A	2012/10/16	KR 10-1412773 B1	2014/06/30
KR 10-2008-0030550 A	2008/04/04	AU 2006-212149 A1	2006/08/17
		AU 2006-212149 B2	2010/03/04
		CA 2597462 A1	2006/08/17
		CN 101137749 A	2008/03/05
		EP 1848798 A1	2007/10/31
		EP 1848798 B1	2013/07/03
		FI 118567 B1	2007/12/31
		FI 20055059 A0	2005/02/10
		JP 2008-530989 A	2008/08/14
		JP 5069133 B2	2012/11/07
		NZ 560352 A	2010/06/25
		US 2009-0203882 A1	2009/08/13
		US 7910344 B2	2011/03/22
		WO 2006-084953 A1	2006/08/17