

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0008820

(43) 공개일자 2025년01월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C07K 14/245* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/245 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0107775
 (22) 출원일자 2023년08월17일
 심사청구일자 2023년08월17일
- (30) 우선권주장
 1020230087923 2023년07월06일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 이화여자대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- (72) 발명자
 김옥빈
 경기도 고양시 일산동구 강송로125번길 52, 610동 306호 (백석동, 환돌마을6단지라이프타운)
- 김남연
 서울특별시 서초구 매향로 16길 40
- (74) 대리인
 특허법인한얼

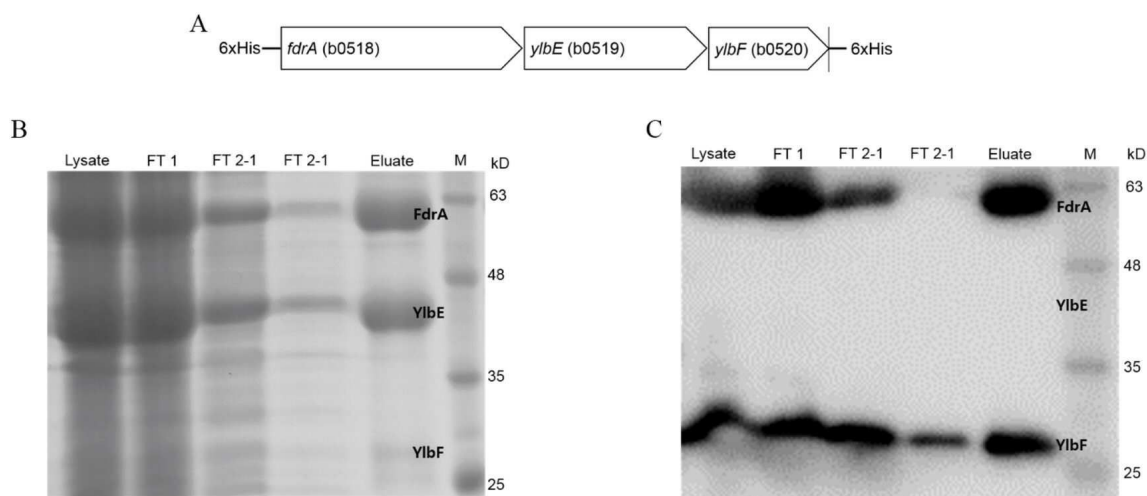
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 에세리키아 속 재조합 미생물 및 이를 이용한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산방법

(57) 요약

본 발명은 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군이 과발현된, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 에세리키아 (*Escherichia*) 속 재조합 미생물 및 상기 미생물을 이용한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/1018 (2013.01)

C12Y 201/03005 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365870
과제번호	2021R1A6A1A10039823
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	알란토인 험기대사에서 fdrA 오페론의 특성화 (기초연구지속지원 연구과제 (B유형))
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711182304
과제번호	2019R1A2C1008066
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	디카르복실 아미노산 수송단백질의 기능적 특성화
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

fdrA-y1bE-y1bF 유전자군이 과발현된, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 에세리키아(*Escherichia*) 속 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군은 서열번호 1을 포함하는 것인, 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*E.coli*)인 것인, 재조합 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물은 기탁번호 KCTC15530BP인 것인, 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미생물은 호기성 조건하에서 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 효소반응을 수행하여 옥살루레이트를 생산하는 것인, 재조합 미생물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 호기 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물로부터 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군이 과발현된, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 에세리키아(*Escherichia*) 속 재조합 미생물 및 상기 미생물을 이용한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 알란토인은 퓨린 분해의 주요 중간체로 발생하는 퓨린 유도체이다. 대장균(*E. coli*)과 스트렙토코커스 알란토익스(*S. alantoicus*)는 알란토인을 분해하고 재활용할 수 있으며 혐기 조건에서만 가능하다. 대장균은 이 질소가 풍부한 알란토인을 혐기성 성장을 위한 단독 질소원으로 사용한다. 알란토인($C_4H_6N_4O_3$)은 가수분해 고리 절단(A11B), 추가 가수분해(A11C) 및 산화(A11D) 과정을 거쳐 2몰의 NH_3 를 방출한 후 우레이도글리콜레이트($C_2H_5N_2O_4$)가 된다(도 1). 우레이도글리콜레이트는 글리옥실레이트 또는 옥살루레이트 생산으로 가는 분지형 중간체이다. 전자는 글리옥실레이트(C_2)가 TCA 사이클 또는 해당과정과 같은 중심 탄소 대사를 보충할 수 있도록 하는 탄소 아나플레로틱 공정에 대한 것이다. 우레이도글리콜레이트를 글리옥실레이트(A11A)로 전환하면 1몰의 우레아제(urease)(N_2)가 방출되는데, 이는 대장균이 우레아제 음성이기 때문에 폐기물이 된다. 후자는 질소 동화(재순환) 공정으로 우레이도글리콜레이트를 옥살루레이트로 산화시킨 후 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제(oxamate carbamoyltransferase, OXCCase)에 의해 end product인 옥사메이트와 함께 카바모일 포스페이트(CP)로 전환된다. 생화학적으로 중요한 분자로서의 카바모일 포스페이트(carbamoyl phosphate, CP)는 암모니아를 뉴클레오티드와 아미노산으로 동화시킨다. 또한, 암모니아로부터 CP를 형성하기 위해서는 2ATP가 필요합니다. 따라서 세포가 성장을 위해 질소 함유 분자를 합성해야 할 때는 CP를 그대로 사용하는 것이 유익하고, 그렇지 않으면 1몰 NH_3 의 방출 하에 카바메이트 키나아제(A11K)에 의해 ATP를 생산하는 데 CP를 사용한다. 이 경로에서 옥사메이트와 CP의 전환이 옥살루레이트를 형성하는데 OXCCase에 의해 촉매되는 것은 오래 전부터 알려져 왔다.
- [0004] 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제는 인산 분해 반응을 통해 옥살루레이트를 옥사메이트로 전환하며, 또한 그 역반응도 촉진하는 효소이다. 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제는 혐기적 조건에서 알란토인 분해반응에 필요하며, 반응 결과 동일한 양의 옥사메이트와 카바모일 포스페이트를 생산한다. 카바모일 포스페이트는 피리미딘 뉴클레오티드와 아르기닌/우레아의 생합성 및 항생제 합성에 관여하는 필수 대사 산물이다.
- [0005] 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제의 활성은 *Streptococcus allantoicus*(*S. allantoicus*), *Streptococcus faecalis* ATCC 11700 and *Streptococcus* D10에서 확인되며, *E. coli*는 혐기적 조건의 알란토인 분해반응에서 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 활성을 이용하는 미생물이다. *E. coli*의 YgeW이 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 갖는 다는 것을 확인하기 위한 학계의 시도가 존재하였으나, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성은 확인되지 않았고, 여전히 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제는 글로벌고아효소로 분리되어, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 갖는 재조합 단백질에 대하여 밝혀진 바가 없었다.
- [0006] 최근 본 발명자들은 강력한 후보인 *fdrA* 에 대하여, $\Delta fdrA$ 가 옥살루레이트를 CP와 옥사메이트로 전환하지 못하여 $\Delta fdrA$ 가 알란토인 분해 반응에서 옥사메이트를 생산하지 못하고, *fdrA* 플라스미드를 통해 $\Delta fdrA$ 에서 옥사메이트 생산이 회복되는 것을 확인하여, *fdrA*가 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 암호화하는 유전자인 것으로 기대하였으나, 정제된 FdrA를 이용해 분석한 결과 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 나타내지 못하여, 이러한 가설이 인정되지 않는 것을 확인하였다.
- [0007] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 대장균 알란토인 분해경로를 통한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산에 대해 연구 노력한 결과, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제가 대장균의 알란토인 오페론(*fdrA-y1bE-y1bF-ybcF*)의 일부 유전자 군인 *fdrA-y1bE-y1bF*의 세 유전자로 이루어진 효소라는 것을 확인하였으며, 대장균의 FdrA-Y1bE-Y1bF가 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 갖는다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은, *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군이 과발현된, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 에세리키아(*Escherichia*) 속 재조합 미생물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 상기 미생물을 이용한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군이 과발현된, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 에세리키아(*Escherichia*) 속 재조합 미생물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 용어, "*fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군"은, 대장균의 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질을 암호화하는 유전자로서, 혐기성 알라토인 분해 경로의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 암호화하는 알라토인 오페론(*fdrA-y1bE-y1bF-ybcF*)의 일부 유전자이며, 3개의 유전자로 구성된 것이 특징이다. 이와 같은 유전자의 서열은 공지된 데이터베이스, 예컨대 NCBI의 GenBank 등에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 바람직하게는 *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군은 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있으며, 각각 *fdrA*는 NCBI gene ID No. 946298의 서열인 서열번호 2로 표시되는 염기서열, *y1bE*는 NCBI gene ID No. 4056025의 서열인 서열번호 4으로 표시되는 염기서열, *y1bF*은 NCBI gene ID No. 945195의 서열인 서열번호 6로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0015] *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군은 서열번호 1의 염기서열일 수 있으며, *fdrA*유전자, *y1bE*유전자, *y1bF* 유전자 사이에 일부 염기를 더 포함할 수 있고, C-말단의 종결코돈이 제거된 형태일 수 있다. 또한, 단백질의 정제를 위하여 히스티딘이 테그된 형태일 수 있다.
- [0016] *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군은 대장균의 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질을 암호화하는 유전자로서, FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질은 FdrA 단백질, Y1bE 단백질, Y1bF 단백질을 포함할 수 있으며, 각각 FdrA 단백질은 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열, Y1bE 단백질은 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열, Y1bF 단백질은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열일 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 FdrA 단백질, Y1bE 단백질, Y1bF 단백질은 같이 발현되어 대장균의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 담당하는 단백질로서, 에세리키아(*Escherichia*) 속 미생물 유래의 단백질일 수 있으며, 보다 구체적으로 대장균 K-12 유래 단백질일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 발명자들은 새로운 유형의 카바모일트랜스퍼라제인 OXTCase를 발견하였다. 이 과정에서 *fdrA* 유전자의 SNP (single nucleotide polymorphism, 단일 뉴클레오티드 다형성)가 대사 흐름을 glyoxylate shunt로 바꾼다는 것에 주목하였으나, 당시 과학 데이터베이스에서 *fdrA*는 acyl-CoA 합성 효소, 옥사메이트:CoA 리가아제, 또는 지배적인 음성 *ftsH* 돌연변이의 다중복사 억제제를 코딩하는 유전자로 명시되어 있었고, Y1bE와 Y1bF는 알려지지 않은 기능으로 분류되어 있었다. 이는 OXTCase가 단백질 서열에 있어서 기존의 잘 알려진 카바모일트랜스퍼라제 계열의 효소와 유사성이 없다는 것이고, OXTCase에 대해 FdrA-Y1bE-Y1bF가 예측되기 어려웠던 점이다. 또한, OXTCase의 활성은 3개의 유전자가 필요하고, 3개의 유전자에 의해 암호화된 카바모일트랜스퍼라제는 존재하지 않았으므로, 이 OXTCase는 조성 소단위의 수까지 다른 완전히 새로운 효소에 해당하는 것이다. 결론적으로, 본 발명에서 FdrA-Y1bE-Y1bF로 구성된 신규 단백질은 OXTCase 활성을 가진다는 사실을 확인하였으며, 이와 카바메이트 키나아제(A11K, b0521)와 함께 대장균의 혐기성 알라토인 분해를 완성하였다.
- [0019] 본 발명의 FdrA 단백질, Y1bE 단백질 또는 Y1bF 단백질은 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7와 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열은 본 발명의 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7와 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상 또는 그 이상, 및 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 FdrA 단백질, Y1bE 단백질 또는 Y1bF 단백질에 동일 또는 상응하는 활성, 또는 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 FdrA 단백질, Y1bE 단백질 또는 Y1bF 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0020] 본 발명의 FdrA 단백질, Y1bE 단백질 또는 Y1bF 단백질은 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 FdrA 단백질, Y1bE 단백질 또는 Y1bF 단백질은 각각 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 또는 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(consisting essentially of) 수 있다. 본 발명의 FdrA 단백질, Y1bE 단백질 또는 Y1bF 단백질은

각각 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가(즉, 아미노산 서열 N-말단 그리고/또는 C-말단에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가) 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우를 제외하는 것이 아니다.

[0021] 본 발명의 FdrA 단백질, YlbE 단백질 또는 YlbF 단백질에 있어, 상기 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 FdrA 단백질, YlbE 단백질 또는 YlbF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군에 포함될 수 있다. 또한, FdrA 단백질, YlbE 단백질 또는 YlbF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 대장균 유래일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 FdrA 단백질, YlbE 단백질 또는 YlbF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 각각 상기 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 FdrA 단백질, YlbE 단백질 또는 YlbF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 각각 서열번호 2, 서열번호 4, 또는 서열번호 6의 염기서열과 90% 이상의 동일성을 가지면서 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열로 이루어진 또는 필수적으로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 가닥이다.

[0024] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1 염기서열과 90% 이상의 동일성을 가지면서 서열번호 3, 서열번호 5, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 경우라면, 상기 염기서열의 일부가 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드를 포함하더라도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 있어서, 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 염기를 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 염기로 치환시키는 것을 의미한다.

[0025] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키 고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리뉴클레오티드 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60℃, 1×SSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60℃, 0.1×SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68℃, 0.1×SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0027] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는

데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열 뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

- [0028] 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55℃의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60℃, 63℃ 또는 65℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [0029] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변하는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [0030] 상기 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0031] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [0032] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad.Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403(1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0033] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358(1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무페널티를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 미생물에 포함되는 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 에세리키아 속 미생물 내에서 발현될 수 있다.
- [0035] 상기 용어, "발현"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 본 발명의 목적상 "목적 단백질"은 전술한 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질일 수 있다.
- [0036] 상기 단백질의 도입은, 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 외래 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 도입된 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하

여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 강화될 수 있다.

[0037] 상기 용어, 단백질 활성의 "강화"는, 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향 조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 여기서 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다. 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

[0038] 상기 강화는 외래의 단백질을 도입하거나, 내재적인 폴리펩티드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량)를 통해 달성할 수 있다. 상기 단백질의 활성의 강화 여부는 해당 단백질의 활성 정도, 발현량 또는 해당 단백질로부터 배출되는 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.

[0039] 상기 단백질 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 단백질의 활성을 변형 전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등).

[0040] 이와 같은 단백질 활성의 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 단백질로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다.

[0042] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 또한, 본 발명의 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본원의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0044] 본 발명의 벡터를 형질전환 시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 용어 "재조합 미생물"은, 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 단백질이 발현되도록 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.

[0046] 예컨대, 본 발명의 재조합 미생물은 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질 또는 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 통해 유전적으로 변형된 미생물; 상기

단백질, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 변형된 미생물; 상기 단백질, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 재조합 미생물; 또는 상기 단백질 활성을 갖는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 또한, 본 발명의 재조합 미생물은, 알란토인 분해 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 강화되어 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산능이 강화된 미생물일 수 있다.

[0048] 구체적으로, 본 발명의 재조합 미생물은 FdrA-YlbE-YlbF 단백질이 강화된 미생물일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 미생물은 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군이 과발현된 미생물일 수 있다. 상기 FdrA-YlbE-YlbF 단백질은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있으며, 이와 동일한 활성을 나타내는 것을 제한 없이 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 목적상, 본 발명의 재조합 미생물은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물보다 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군이 과발현되어 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 생산하는 미생물을 의미한다. 상기 '비변형 미생물'은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 미생물 자체이거나, 야생형 미생물 자체이거나, 또는 알란토인 분해 경로에 관여하는 유전자의 발현량이 조절되기 전의 미생물일 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 모균주는 야생형 대장균 K-12, 상기 대장균 K-12에서 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군이 과발현된 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서는 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군 과발현 균주를 제작하였으며, 상기 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 코딩하는 *fdrA*, *y1bE*, *y1bF* 유전자를 *oxtcA*, *oxtcB*, *oxtcC* 유전자로 재명명하였고 이를 생물자원 센터(Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하여 기탁번호 KCTC15530BP를 부여받았다. 이에, 상기 본 발명의 재조합 미생물은 기탁번호 KCTC15530BP로 기탁된 대장균일 수 있다.

[0053] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 미생물을 이용한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0054] 구체적으로, 상기 재조합 미생물을 호기 조건 하에서 배양하는 단계; 상기 재조합 미생물로부터 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 수득하는 단계;를 포함하는 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산 방법을 제공한다.

[0055] 본 발명의 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 배양 과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 상기 용어, "배지"는 상기 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다.

[0057] 구체적으로, 본 발명의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한없이 어느 것이나 사용할 수 있으며, 본 발명의 미생물 내 FdrA-YlbE-YlbF 발현을 위한 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[0058] 상기 미생물은 대장균(*E. coli*)일 수 있으며, 보다 구체적으로 *E. coli* K-12일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 상기 미생물은 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군이 과발현된 재조합 미생물을 의미할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 질소원으로서 알란토인을 포함하는 대장균의 배양시, 글리세롤(50mM), 디메틸 설폭사이드(DMSO, 50 mM) 및 알란토인(20-40 mM)을 포함하는 질소 결핍 M9 최소 배지(_{MD}M9)상에서, 95% N₂ + 5% H₂ 가스 혼합물의 혐기성 조건하, 37℃에서 배양하였다. 이에 더해, 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성이 소실된 대장균에서 *fdrA-ylbE-ylbF* 유전자군이 포함된 플라스미드에 의한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성의 보완적인 발효 평가를 위해 추가적으로 0.2Mm 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드를 첨가하였다.

- [0061] 본 발명에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기 화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 또한, 상기 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 배지의 온도는 20℃ 내지 45℃, 구체적으로, 25℃ 내지 40℃일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 배양 기간은 유용 물질의 원하는 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 160 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0068] 본 발명에 따른 대장균 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질이 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 가지고 있음을 검증하였으며, *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군의 과발현을 통해 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 생산이 증가됨을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1은 탄소보충과 질소 동화로 이어지는 알란토인 혐기 분해 경로를 나타낸 것이다.
- 도 2은 HPLC 분석에서 옥사메이트 소모와 알려지지 않은 새로운 피크의 등장을 나타낸 것이다.
- 도 3는 대장균의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제에 의한 옥살루레이트 생산을 확인한 것이다.
- 도 4는 N-, C- 말단에 6개의 히스티딘으로 태깅된 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질의 모식도 및 SDS-PAGE와 western blot을 이용하여 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질의 발현 및 정제도를 확인한 것이다.
- 도 5은 pH, 온도, Mg²⁺ 농도에 따른 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 나타낸다.
- 도 6는 대장균의 FdrA-Y1bE-Y1bF 재조합 단백질에 의한 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 야생형 대장균 및 FdrA-Y1bE-Y1bF 소실 균주와 비교 평가한 것이다.
- 도 7는 카바모일 포스페이트(CP)와 옥사메이트 농도에 따른 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0073] 실험예 1. 균주 및 알란토인(allantoin) 발효

[0074] 본 연구에서 균주는 LMB109, LMB110 및 LMB135이고, 플라스미드는 pMB 183, pMB184, pMB 185, pMB190 및 pMB191를 이용하였으며, 균주를 글리세롤(50mM), 디메틸설폭사이드(DMSO, 50 mM) 및 알란토인(20-40 mM)을 포함하는 질소 결핍 M9 최소 배지(_{ND}M9)상에서, 95% N₂ + 5% H₂ 가스 혼합물의 혐기성 조건하, 37℃에서 배양하였다. 이에 더해, 구체적인 유전자가 포함된 플라스미드의 보완적인 발효 평가를 위해 추가적으로 0.2mM 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드를 첨가하였다.

[0076] 실험예 2. 유전자 결실 균주 및 플라스미드 제작

[0077] 대장균 K-12 MG1655(*F*-λ-*ilvG-rfb-50 rph-1*)의 유전자들은 Datsenko와 Wanner의 방법으로 결실시켰다. 삽입 불활성화를 위하여, pKD3의 *catR* 클로람페니콜 내성 유전자의 PCR 산물을 사용하였고, FRT서열을 측면에 배치하였다. 프라이머에는 FRT에 인접한 영역과 증폭된 유전자의 5' 및 3' 영역이 각각 포함되도록 제작하였다(하기 표 1). *ylbE*, *ylbF*, *fdrA-ylbE-ylbF*가 *catR*에 의해 대체된 균주는 LMB109, LMB110 및 LMB135로 나타내었다.

표 1

	Strains or Plasmids	Primers	References
	Strains		
	LMB076	<i>fdrA_H1P1</i> : 5'-ATT AAC ACT GCT CGT GCA ATT GCC ATG GGT GCA ATT TTT AAG GAG TTG TTT GTG TAG GCT GGA GCT T -3' <i>fdrA_H2P2</i> : 5'-TCG ATA ACC GCA TTG GCT TGC GCC ACT GAT GTA AAC ATG GGA ACC CC C CAT ATG AAT ATC CTC CTT A -3'	(2)
	LMB109	<i>ylbE_H1P1</i> : 5'-GCA ATA AAA AAC TGG CTC GTT TAT TAG AAC GTT TGC AAT AAG GGG TTC CCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C -3' <i>ylbE_H2P2</i> : 5'-GTG CGC TAC TAC TGG CAA GCA GAG GAT GGA TGA TCG TCA TTG CGC GTT CC C ATA TGA ATA TCC TCC TTA G -3'	This study
	LMB110	<i>ylbF_H1P1</i> : 5'-GGC GCT GGA AGC ACT GGC TGA AAG CAT GGG TAT TGG TTG AGG AAC GCG CAG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C -3' <i>ylbF_H2P2</i> : 5'-CCG CGC TGG AGT AAG GCG TTG CCC CCA AGA GCC ACA ACC AGT GTT TTC ATC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G -3'	This study
	LMB135	<i>fdrAylbEylbF_H1P1</i> : 5'-ATT AAC ACT GCT CGT GCA ATT GCC ATG GGT GCA ATT TTT AAG GAG TTG TTT GTG TAG GCT GGA GCT T -3' <i>fdrAylbEylbF_H2P2</i> : 5'-CCG CGC TGG AGT AAG GCG TTG CCC CCA AGA GCC ACA ACC AGT GTT TTC ATC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G -3'	This study
	Plasmids		
	pMB183	pNTR-SD- <i>fdrA</i> -F: 5'-CGG GAT CCT AAG GAG GAG GTG GCC ATG ATC CAC GCC TTT ATT A -3' pNTR-SD- <i>ylbF</i> -R: 5'-CGG AAT TCT CAT GGT TTT CCT TGT AAT -3'	This study
	pMB184	pNTR-SD- <i>fdrA</i> -F: 5'-CGG GAT CCT AAG GAG GTG GCC ATG ATC CAC GCC TTT ATT A -3' pNTR-SD- <i>ylbE</i> -R: 5'-CGG AAT TCT CAA CCA ATA CCC ATG CTT -3'	This study
	pMB185	pNTR-SD- <i>ylbE</i> -F: 5'-CGG GAT CCT AAG GAG GTG GCC ATG TTT ACA TCA GTG GCG C -3' pNTR-SD- <i>ylbF</i> -R: 5'-CGG AAT TCT CAT GGT TTT CCT TGT AAT -3'	This study
	pMB190	pET30b- <i>fdrA</i> _F: 5'-GGA ATT CCA TAT GAT GAT CCA CGC CTT TA -3' pET30b- <i>ylbF</i> _R: 5'-CCC AAG CTT TGG TTT TCC TTG TAA TAA -3'	This study
	pMB191	pET-HS_F: 5'-ATG ATG GTG CAT ATG TAT ATC TCC TTC TTA AAG TTA AAC -3' pET-HS_R: 5'-CAT CAT CAT ATG ATC CAC GCC TTT ATT AAA AAA G -3'	This study

[0079]

[0000]

[0082] 보완적인 발효 평가를 위해 pNTR-SD::유전자 플라스미드를 사용하였고, FdrA-YlbE-YlbF를 생산하기 위해 pET30b 플라스미드를 사용하였다. 대장균 MG1655 게놈 DNA의 상응하는 프라이머를 사용하여 특정 완전 유전자를 증폭하

였다. 상응하는 단편을 플라스미드의 해당 제한 부위에 클로닝하였으며, 플라스미드 pMB190은 FdrA-Y1bE-Y1bF의 C-말단에 6 개의 히스티딘을 갖도록 지정하였다. 그런 다음, 부위 특이적 돌연변이 유도 키트를 사용하여 매뉴얼에 따라 6개의 히스티딘을 FdrA의 앞쪽에 추가로 부착하였다. 클로닝 생성물을 DH5 α 로 형질전환하고 염기서열 시퀀싱을 통해 최종적으로 확인한 후, 실험에 사용하였다.

[0084] **실험예 3. FdrAY1bEY1bF의 발현 및 정제**

[0085] FdrA 앞(N-말단)과 Y1bF의 뒤(C-말단)에 6X His가 각각 포함된 *fdrA-y1bE-y1bF* 과발현 플라스미드 pMB191을 BL21(DE3)로 형질 전환하고 37°C에서 약 0.4의 OD₆₀₀까지 LB 배지에서 호기적으로 성장시킨 다음, 30°C에서 4시간 동안 0.2mM IPTG로 유도하였다. Histidine-tagged 단백질의 정제를 위해, 세포 펠릿을 용해 완충액(20mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer pH 8.3, 0.5% triton X-100, 1mg/mL lysozyme)에 현탁하고 산으로 세척된 유리 비즈와 같이 볼텍싱 및 5분간 아이싱을 6회 반복하여 세포 파괴시켰다. 원심분리(13,000rpm, 4°C, 20분)를 통해 세포 파편을 제거하고 상층액을 수집하였으며, FdrA-Y1bE-Y1bF의 정제는 제조업체의 지시에 따라 Ni-NTA Spin Columns를 이용한 친화성 크로마토그래피를 통해 수행하였다. 단백질 농도는 Protein Assay Dye를 사용하여 Bradford 방법으로 측정하고, 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

[0087] **실험예 4. 웨스턴 블랏팅**

[0088] 용출 분석은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

[0089] 구체적으로, 샘플은 12% 런닝 젤을 사용하여 SDS-PAGE에 적용하고, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell의 Amersham Hybond P 웨스턴 블랏팅 멤브레인 상에서 전기영동 트랜스퍼를 수행하였다. 블랏팅(15 V, 1시간 20분) 후, 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 차단하고, 상기 멤브레인을 1:2000으로 희석된 6X His-tag 단클론 일차 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. 그 후, 양고추냉이 과산화효소-결합된 염소 항-마우스 2차 항체를 1:100000으로 희석하고, 실온에서 1시간 동안 멤브레인 과 함께 배양하였다.

[0090] 과산화효소 활성 검출은 Dyne ECL Pico Plus를 사용하고, 현상에는 ImageQuant800을 사용하였다.

[0092] **실험예 5. 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 분석 방법**

[0093] 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제의 구체적인 활성은 단백질 1mg당 분당 1 μ moles의 옥사메이트 소비를 측정하는 효소의 양으로 표현하였다. Tris buffer pH(6.0-10.0), Mg이온 농도(0-20mM) 및 반응온도(25°C, 30°C, 37°C)에서 측정하였다. 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 반응에 특정된 표준 혼합물은 옥사메이트(5-40mM), CP(5-40mM), MgCl₂ 10mM, Tris buffer(pH9.0) 100mM, 효소 및 증류수를 1.0ml volume에 포함하고, 조세포 용해물은 반응부피의 10% 양으로 추가하며, 동역학 분석은 100nM FdrAY1bEY1bF를 이용하였다. 효소를 첨가하여 반응을 시작하여 30°C에서 10분 동안 진행하였고 반응물을 95°C에서 5분 동안 끓여 반응을 중단하였으며, 반응물에서 HPLC를 이용하여 옥사메이트를 측정하였다.

[0094] 또한, 옥사메이트와 CP의 Michaelis-Menten 상수(K_M)와 최대 속도(V_{max})는 각각 Michaelis-Menten 방정식과 Lineweaver-Burk 방정식을 이용하여 계산하였다.

[0096] **실험예 6. HPLC 분석**

[0097] 배양 상등액과 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 반응물은 펌프(L-2130), 컬럼 오븐(L-2350), 오토 샘플러(L-2200) 및 Aminex HPX-87H 이온 제거 컬럼(300×7.8mm)가 장착된 장착된 Hitachi LaChrom Elite HPLC 시스템을 사용하여 분석하였다.

[0098] 구체적으로, 이동상은 2.2mM H₂SO₄을 사용하고, 0.55 ml/분의 일정한 유속으로 공급하였으며, 샘플은 10 μ L 주입 후 25분 동안 실행하였다. 컬럼 온도는 18°C로 조정하였으며, 정량 측정은 L-2490 굴절률 검출기 및 L-2400 UV 검출기(210nm)를 사용하여 수행하였다.

[0100] 실험예 7. LC-MS 분석

[0101] 옥살레이트 측정을 위한 양성 및 음성 대조군은 LC-MS로 분석하였다. 액체 크로마토그래피 분석은 heated electrospray ionization(H-ESI I) source가 부착된 Q-Exactive™ Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer가 장착된 Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLC 시스템으로 수행하였다.

[0102] 크로마토그래피 분리는 40℃에서 유지하며, Aminex HPX-87H 이온 제거 컬럼(300×7.8mm)으로 수행하였으며, 이동상의 흐름은 분당 0.5mL로 유지하였다. ESI 음이온 모드에서, 질량 분석기는 스프레이 전압, 3.00Kv; sheath gas 유속, 임의의 50 units; auxiliary gas 유속, 임의의 10 units; 이온트랩스퍼 튜브 온도, 320℃; auxiliary gas 히터온도, 300℃로 설정하여 작동하였다.

[0103] 해당 기기는 외부적으로 Pierce® ESI-음이온 교정 용액과 Pierce® LTQ VELOS ESI-양이온 교정 용액으로 교정되며, 데이터 수집 및 분석은 Xcalibur 2.1 소프트웨어를 통해 수행하였다.

[0105] 실험예 8. 통계방법

[0106] 통계 분석은 PASW Statistics 18을 사용하여 수행하였다. 데이터는 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 분석하였다. Post hoc 분석은 Duncan의 다중 비교 테스트를 사용하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의하였다.

[0108] 실시예 1. *fdrA-y1bE-y1bF*의 보완에 의한 옥사메이트 카바모일 트랜스퍼레이즈 활성 회복 확인

[0109] *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자군의 구체적인 기능을 평가하기 위하여, 계놈에서 *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자가 결실된 균주에 *fdrA-y1bE-y1bF* 유전자를 가진 플라스미드를 보완하였다. 하기 표 2에 기재된 바와 같이, *E. coli*의 야생형 및 돌연변이 균주는 질소 결핍 M9 배지에서 48시간 동안 글리세롤 + DMSO와 함께 알란토인에서 48시간 동안 혐기적으로 발효하였다. 이 경우 야생형 균주에서 대부분의 알란토인(19.5mM)은 주로 옥사메이트(17.7mM)로 분해되고 적은 일부는 옥살레이트(2.4mM)로 분해되는 것을 확인하였다. $\Delta fdrA$ (LMB076) 및 $\Delta y1bE$ (LMB109) 균주에서는 옥사메이트가 생성되지 않은 반면, $\Delta y1bF$ (LMB110) 균주에서는 소량의 옥사메이트(1.2mM)만이 생성되었으며, 야생형 균주에 비해 옥살레이트 비율이 증가하였다. *fdrA* 및 *y1bF* 클로닝된 플라스미드(pNTR-SD::*fdrA*, pNTR-SD::*y1bF*)는 야생형 대장균에 비해 각각 최대 23% 및 71%까지 옥사메이트 생산을 보완하였으며, 그에 반해 $\Delta y1bE$ 균주에서 *y1bE* 클로닝된 플라스미드(pNTR-SD::*y1bE*)에 의한 보완 효과는 없는 것으로 나타났다. 옥사메이트는 단일 유전자 결실 돌연변이인 균주와 마찬가지로 $\Delta fdrAy1bEy1bF$ (LMB135) 균주에서도 생성되지 않았다. 이어서, $\Delta fdrAy1bEy1bF$ 균주를 단일 유전자 클로닝된 플라스미드(pNTR-SD::*fdrA*; pNTR-SD::*y1bE*; pNTR-SD::*y1bF*)로 개별적으로 보완하였고, 이 경우 옥사메이트 생산의 회복이 관찰되지 않았다.

표 2

		WT		<i>ΔfdrA</i>		<i>Δy1bE</i>		<i>Δy1bF</i>		<i>ΔfdrAy1bEy1bF</i>		
		none	<i>fdrA</i>	none	<i>y1bE</i>	none	<i>y1bF</i>	none	<i>fdrA</i>	<i>y1bE</i>	<i>y1bF</i>	
Consumption (mM)	Allantoin	19.5±1.0	20.0±0.2	20.0±0.2	14.0±0.3	13.9±0.1	19.5±0.4	19.6±0.3	13.3±2.2	11.4±0.6	11.7±1.1	11.8±0.6
		0	2	3	3	0	0.4	9	7	8	2	1
		17.7±1.0	0	4.1±1.5	0	0	1.2±0.3	12.6±1.0	0	0	0	0
Production (mM)	Oxamate	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Oxalate	2.4±1.4	12.0±1.1	8.7±1.1	10.6±0.5	9.2±0.5	10.4±0.7	2.6±0.7	8.0±2.5	6.6±0.6	7.0±0.4	5.5±0.1
		2	2	2	5	5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

[0111]

[0113] 또한, 하기 표 3을 보면 다중 유전자 클로닝 플라스미드(pMB183_pNTR-SD::*fdrAy1bEy1bF*; pMB184_pNTR-SD::*fdrAy1bE*; pMB185_pNTR-SD::*y1bEy1bF*)로 보완된 야생형 대장균 및 돌연변이 균주를 질소 결핍 M9 배지에서 글리세롤 + DMSO와 함께 72시간 동안 알란토인에서 혐기 발효하였고, *fdrA-y1bE-y1bF*로 보완된 $\Delta fdrAy1bEy1bF$ 균주만이 야생형 균주만큼 옥사메이트가 회복된 것을 확인하였다. 한편, *fdrA-y1bE* 또는 *y1bE-y1bF*로 보완된 $\Delta fdrAy1bEy1bF$ 균주는 야생형 균주에 비해 7% 및 16%의 옥사메이트 생산량만을 나타낸다. 따라서, 종합하면,

OXCCase는 3개의 유전자 *fdrA-y1bE-y1bF*로 구성된 효소일 것으로 해석된다.

표 3

		WT		<i>ΔfdrA-y1bE-y1bF</i>		
			none	<i>C</i> (<i>fdrA-y1bE-y1bF</i>)	<i>C</i> (<i>fdrA-y1bE</i>)	<i>C</i> (<i>y1bE-y1bF</i>)
Consumption (mM)	Allantoin	40.6±0.6 ^a	25.5±3.4	40.6±0.4	14.3±7.7	40.9±0.6
Production (mM)	Oxamate	38.3±5.6	0	37.5±1.1	2.9±3.3	6.2±3.0
	Oxalate	2.8±0.8	17.9±2.7	0.7±1.2	5.3±4.3	14.8±1.2

실시예 2. 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제에 의해 생성된 옥살루레이트 확인

대장균의 OXCCase의 활성은 LB broth에서 성장한 세포가 아니라 알란토인을 질소원으로 사용한 배지에서 성장한 세포에서 나타났다. 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제의 옥살루레이트 생산을 확인하기 위하여, 대장균의 야생형 및 $\Delta fdrA$ 균주는 질소 결핍 M9 배지에서 글리세롤 + DMSO와 함께 알란토인에서 혐기 발효하였다. 각 세포의 용해물을 표준 혼합물에 첨가하여 OXCCase 반응을 시작하고, 야생형 및 $\Delta fdrA$ 균주에 의한 반응물을 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC-MS) 분석을 위한 양성 및 음성 대조군으로 사용하는 경우, 도 2에서 나타나는 바와 같이, 옥사메이트의 분해(지연 시간 10.08분) 및 알려지지 않은 새로운 피크(지연 시간 7.54분)는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석에서 야생형 대장균에 의한 반응물에서만 나타난다. $\Delta fdrA$ 변이주와 비교하여 야생형 대장균의 총 이온 크로마토그램(TIC)에서 새로운 피크(지연 시간 7.99분)가 나타났으며, 그 질량(131.0084)을 LC-MS를 이용하여 분석한 결과 옥살루레이트의 분자량으로 확인되었다 (도 3). 이에, 옥살루레이트 형성이 옥사메이트 소실과 밀접한 관련이 있으며 그 반대로 마찬가지로 판단되며, 따라서 우리는 OXCCase의 구체적인 활성을 분당 1 μ mole의 옥사메이트가 소비되는데 필요한 효소의 양 (mg)으로 판단하였다.

실시예 3. 대장균의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 정제

대장균의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 정제하기 위하여, FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질을 확인하고자 하였다. 처음에는 FdrA-Y1bE-Y1bF의 과발현을 위해, *fdrA-y1bE-y1bF*를 pET30b 플라스미드에 삽입하여 C-말단(pMB190)에 6개의 히스티딘을 갖도록 하였다. 그러나, 이렇게 제작된 플라스미드 (pMB190)에 의해 생산되어 정제된 단백질을 확인한 결과, *y1bF*의 C-말단에만 6개의 히스티딘이 존재하여 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 및 웨스턴블롯 이미지에서 Y1bF 크기의 밴드(31kD)만 관찰되었다 (데이터를 제공하지 않음). 이러한 이유로, pMB190에서 유전자 조작을 진행하여 추가로 6개의 히스티딘이 FdrA(pMB191) 바로 앞에 위치하도록 하였고, 그 결과 FdrA-Y1bE-Y1bF에서 FdrA, 62 kD; Y1bE, 46kD; Y1bF, 31kD인 것을 SDS-PAGE로 확인할 수 있었다. 또한, 히스티딘 태그가 있는 FdrA 및 Y1bF 밴드만 웨스턴 블롯 이미지에 표시된 것을 확인하여 (도 4), 대장균의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제를 구성하는 FdrA-Y1bE-Y1bF 단백질을 성공적으로 과발현 및 정제하여 확인하였다.

실시예 4. FdrAY1bEY1b의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성 확인

그 후 FdrA-Y1bE-Y1b의 옥사메이트 카바모일트랜스퍼라제 활성을 확인하기 위하여, 최적의 pH, 온도 및 마그네슘(Mg^{2+}) 이온 농도를 조건을 평가하기 위하여 과잉 생산된 FdrA-Y1bE-Y1bF의 조세포 용해물을 사용하였다. 활성은 mg 총 단백질에 대한 분당 옥사메이트 소비량으로 나타냈으며, 첫 번째 측정은 반응액 버퍼의 pH에 대한 것이며, pH는 6.0~10.0 범위에서 측정하였다. 이에, 도 4에 나타내지는 않았지만, pH 6.0 및 pH 7.0에서 OXCCase의 활성은 없는 것을 확인하였다. OXCCase의 활성은 pH 8.0에서 9.0 범위에서 증가하고 pH 9.0 이후 감소하므로 대장균의 OXCCase 활성을 위한 최적 pH로 pH 9.0을 선택하였다. 이 후, 최적의 pH를 9.0으로 고정한 다음, 최적의 온도 조건을 테스트하였고, 대장균의 OXCCase는 25℃와 37℃보다 30℃에서 최적의 활성을 보이는 것을 확인하였다. OXCCase는 활성을 위해 Mg^{2+} 이온이 필요하므로, 따라서 Tris 버퍼(pH 9.0) 및 온도(30℃) 조건을 고정한 후, 대장균의 최적 OXCCase 활성을 위한 Mg^{2+} 이온 농도를 탐색하였고, 대장균의 OXCCase 활성은 10mM Mg^{2+}

이온에 의해 포화됨을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0125] 대장균의 재조합 효소에 대한 OXTCase 활성은 조세포 용해물을 사용하여 평가하기 위하여, 도 6에 나타난 바와 같이, 대장균의 야생형 및 $\Delta fdrAylbEylbF$ 균주를 질소 결핍 M9 배지에서 글리세롤 + DMSO를 탄소원으로, 알란토인을 유일한 질소원으로 하여 혐기조건으로 발효시켰다. 과잉 생산된 FdrA-YlbE-YlbF를 함유하는 세포 용해물을 준비하기 위해서는 LB 배지에서 IPTG로 유도된 조건하에서 호기로 배양하였다. 각 세포의 용해물을 표준 혼합물에 첨가하여 반응을 시작하였고, 과잉 생산된 FdrA-YlbE-YlbF의 세포 용해물은 야생형 균주($0.38 \mu\text{mol/min/mg}$ 총 단백질)보다 8배 더 높은 OXTCase 활성($3.06 \mu\text{mol/min/mg}$ 총 단백질을) 분명히 보여주었고, *fdrA-ylbE-ylbF*가 소실된 균주에서는 OXTCase 활성을 나타내지 않았다.

[0126] FdrA-YlbE-YlbF의 OXTCase 동역학 평가를 위해서는 정제된 FdrAYlbEYlbF(100nM)를 각 분석에 사용하였으며, Tris 버퍼(pH 9.0) 및 10mM Mg^{2+} 이온을 포함하는 완충액에서 30℃에서 10분 동안 반응하였다. 활성은 mg FdrA-YlbE-YlbF 단백질에 대한 분당 옥사메이트 소모량으로 나타냈고, OXTCase는 알란토인 분해 경로의 역방향에서 CP와 옥사메이트(EC 2.1.3.5)라는 두 가지 기질을 가지고 있으므로, 두 기질의 농도에 따른 대장균의 OXTCase 활성을 측정하였다. 옥사메이트를 40mM로 고정한 상태에서 CP의 농도를 0-40mM에서, 또는 CP를 40mM로 고정한 상태에서 옥사메이트의 농도를 0-40mM에서 활성을 측정하였고, CP가 변했을 때, $V_{\text{max-CP}}$ 는 $15.4 \mu\text{mol/min/mg}$ FdrAYlbEYlbF였고, $K_{\text{M-CP}}$ 는 1.3 mM이었다. 이로부터 CP에 대한 k_{cat} 는 35.5 sec^{-1} , $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 은 $27.3 \text{ sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ 로 계산되었다 (표 4). 옥사메이트가 변할 때는 $V_{\text{max-OX}}$ 는 $27.0 \mu\text{mol/min/mg}$ FdrAYlbEYlbF이고 $K_{\text{M-OX}}$ 는 36.9mM이었으며, 이로부터 옥사메이트에 대한 k_{cat} 는 58.5 sec^{-1} , $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 은 $1.6 \text{ sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ 로 계산되었다(표 4). OXTCase의 두 기질에 대한 V_{max} 값이 유사함에도 불구하고 이들에 대한 K_{M} 값은 놀랍게도 달랐으며, 이는 CP에 대한 친화도가 옥사메이트에 비해 약 30배 높은 것으로 나타났다(도 7). 따라서 두 기질에 대한 k_{cat} 값은 유사한 수준이지만 CP에 대한 $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 값은 옥사메이트에 비해 약 20배 높았다(표 4).

[0127] 상기 결과들을 종합하여, OXTCase가 알란토인 오페론 (*fdrA-ylbE-ylbF-ybcF*)에 있는 3개의 유전자 (*fdrA-ylbE-ylbF*)로 구성되며, 대장균의 FdrA-YlbE-YlbF가 OXTCase 활성을 갖는다는 것을 확인하였다.

표 4

	Carbamoyl phosphate	Oxamate
K_{M} (mM)	1.3	36.9
V_{max} ($\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg OXTCase}$)	15.4	27.0
k_{cat} (sec^{-1})	35.5	58.5
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)	27.3	1.6

[0132] OXTCase의 활성은 효소 분석에 의해 평가된다. 이전 타연구에서는 옥살루레이트에 대한 개선된 비색 분석을 사용하여 *S. alantoicus*의 OXTCase 활성을 측정하였다. 특정 활성은 1분당 $1 \mu\text{mole}$ 의 옥살루레이트 형성에 필요한 효소의 양으로 정의되었다. 그러나, 현재는 옥살루레이트를 구할 수가 없었기에 측정을 위한 표준 물질로 사용할 수 없었다. 따라서, 우리는 다음과 같은 방법으로 OXTCase 활성을 측정하였다. 1960년에 구축된 OXTCase 반응에 대한 화학양론에 따르면, 명백한 평형 상수는 옥살루레이트의 평형 농도 및 옥사메이트 및 CP의 초기 농도로부터 계산될 수 있다. 계산값은 평형 상태에서의 옥살루레이트의 값으로부터 산정되었다. 그 결과, 기질로서 사용된 옥사메이트의 소비는 반응에 의해 생성된 옥살루레이트의 양과 동일하였다. 게다가, *S. alantoicus*에 의한 옥살루레이트의 인분해는 옥사메이트의 형성이 옥살루레이트 분해와 상관관계가 있다는 것을 보였다. 우리는 옥사메이트가 소비된 양은 HPLC를 사용하여 분석할 수 있었다. 또한, OXTCase 반응 후에 새로 발생한 HPLC 피크의 옥살루레이트 여부는 LC-MS를 사용하여 평가할 수 있었다. 따라서, 우리는 OXTCase 효소 활성을 계산하는 파라미터를 옥살루레이트 대신 옥사메이트의 값으로 산정하였다.

[0133] 결론적으로 OXTCase가 알란토인 오페론에 있는 3개의 유전자로 구성된 효소임을 확인한 바, 본 발명은 대장균의 FdrA-Y1bE-Y1bF가 OXTCase 활성을 갖는다는 것을 실험적으로 입증한 최초의 발명이다.

[0135] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0137]

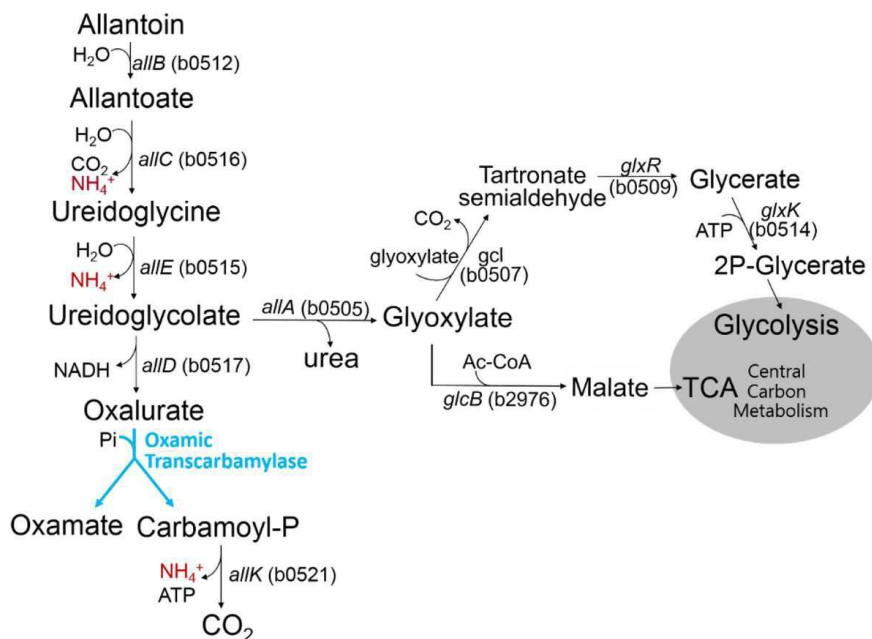
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15530BP

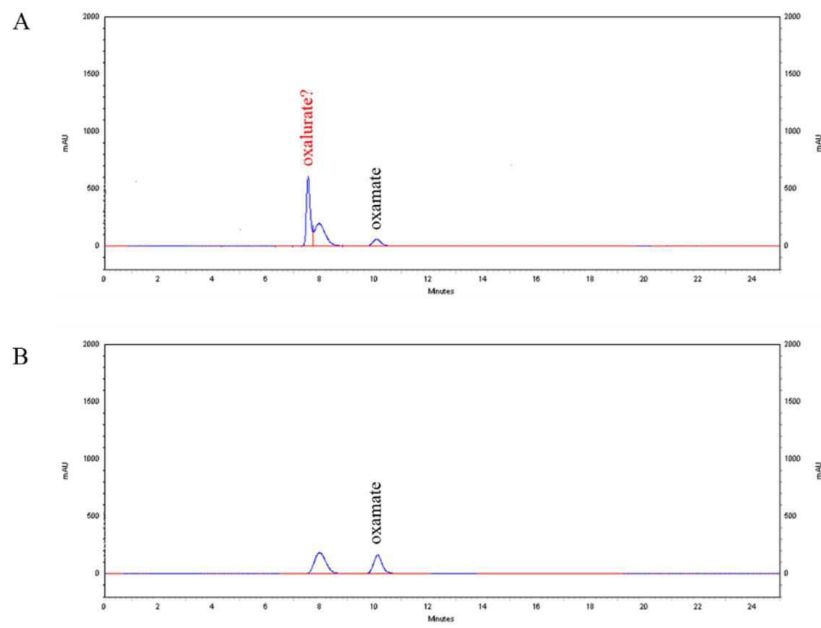
수탁일자 : 20230801

도면

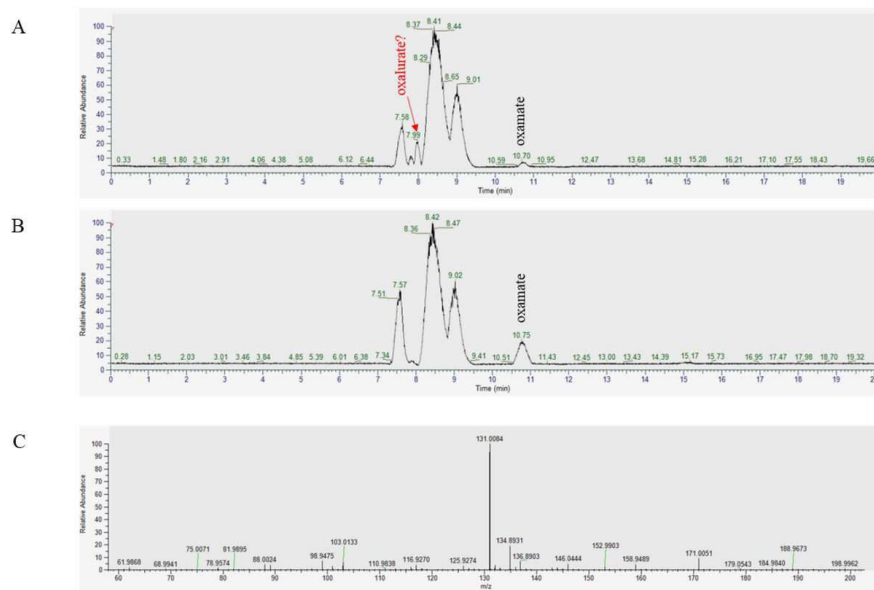
도면1



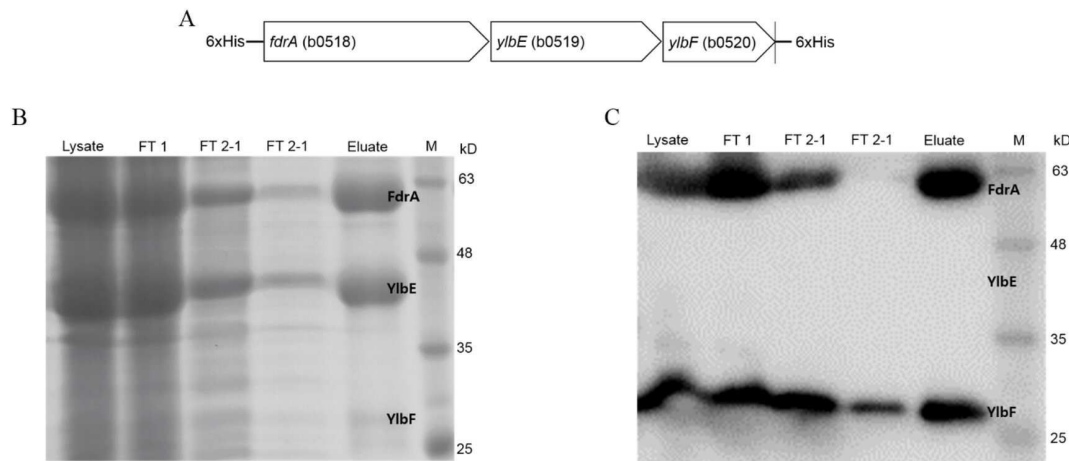
도면2



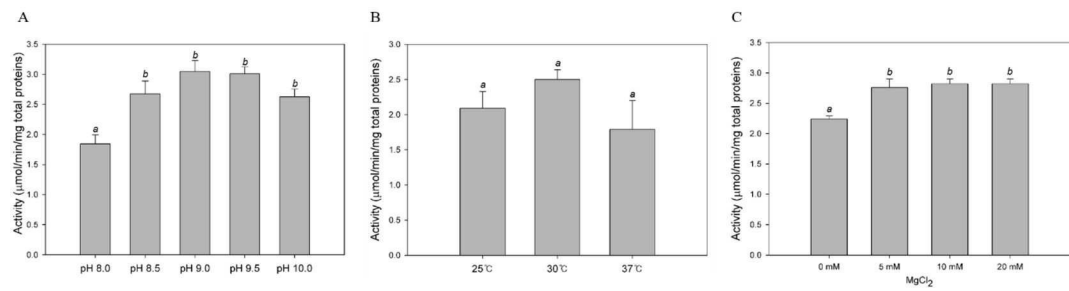
도면3



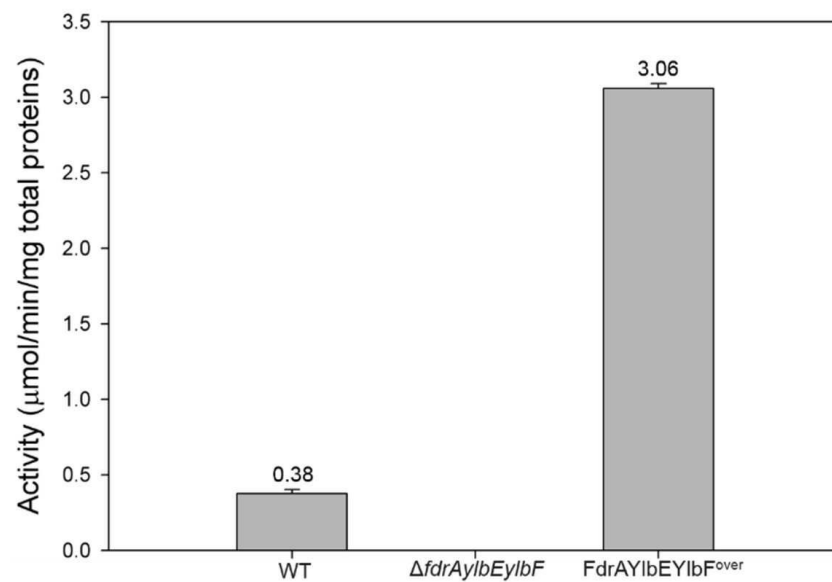
도면4



도면5

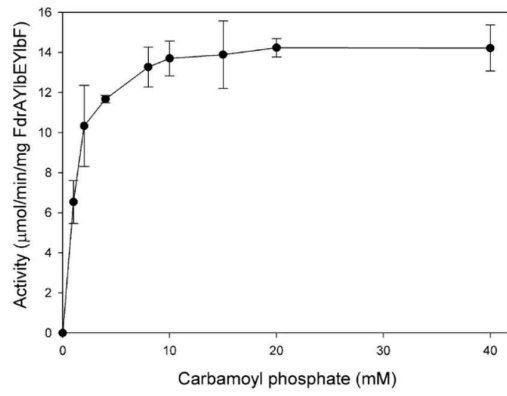


도면6

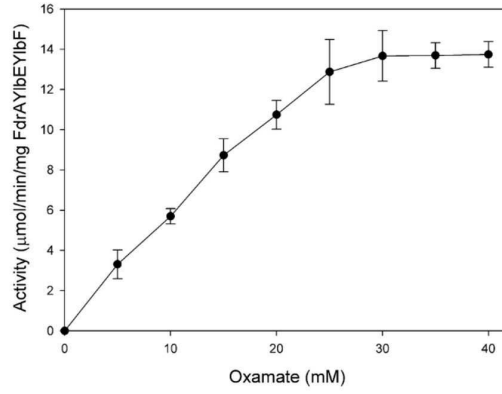


도면7

A



B



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.