



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0119190
(43) 공개일자 2018년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/04 (2006.01) C12N 11/10 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12P 17/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/04 (2013.01)
C12N 11/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0052361

(22) 출원일자 2017년04월24일

심사청구일자 2017년04월24일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이정국

서울특별시 마포구 백범로25길 63 105동 803호 (연리동, 삼성래미안아파트)

김현준

서울특별시 마포구 신수동 독막로 89-126번지 203호

오은경

서울특별시 마포구 신수동 광성로 35-14번지 303호

(74) 대리인

특허법인다나

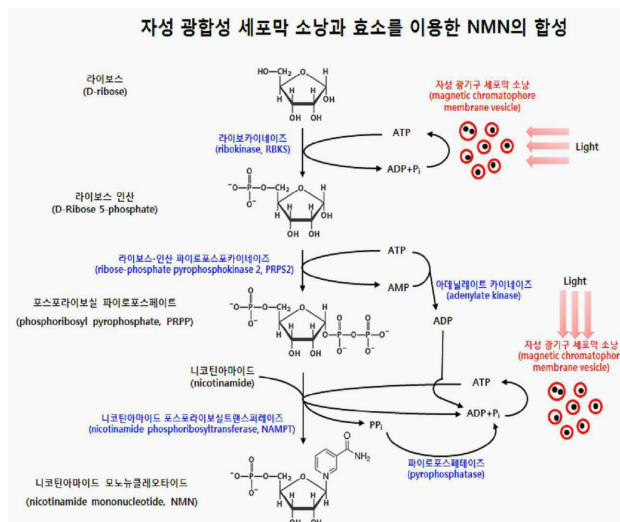
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 자성 광합성 세포막 소낭 및 이를 이용한 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle) 및 이를 니코틴 아마이드 모노뉴클레오타이드 (nicotinamide mononucleotide, NMN)의 생합성 효소들과 조합하여, NMN을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 NMN 생합성 효소를 고정화하고 자성 광합성 세포막 소낭을 이용함으로써 세포 외 (*in vitro*)에서 효소를 이용한 유용물질 생산에서 정제 비용을 줄이고, 각 효소 및 광합성 소낭을 반응액에서 쉽게 분리하여 재사용할 수 있도록 하여 지속적으로 유용물질의 생산이 가능하도록 하였다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12N 9/1077 (2013.01)

C12N 9/1205 (2013.01)

C12N 9/1235 (2013.01)

C12P 17/16 (2013.01)

C12Y 204/02012 (2013.01)

C12Y 207/01015 (2013.01)

C12Y 207/06001 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711048560

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 STEAM연구

연구과제명 광합성 생체 소재 활용 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle) 내부 공간에 자성 입자 (magnetic particle)를 포함하는 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 광기구 세포막 소낭 (chromatophore membrane vesicle) 및/또는 틸라코이드 세포막 소낭 (thylakoid membrane vesicle)인 자성 광합성 세포막 소낭.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 광기구 세포막 소낭은 로도박터 속 (*Rhodobacter* sp.), 로도스피릴럼 속 (*Rhodospirillum* sp.), 로도수도모나스 속 (*Rhodopseudomonas* sp.), 로지오박터 속 (*Rhoseobacter* sp.), 브래디리조비움 속 (*Bradyrhizobium* sp.) 및 루브리비박스 속 (*Rubrivivax* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 자색 비 유황세균으로부터 분리된 것인, 자성 광합성 세포막 소낭.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 틸라코이드 세포막 소낭은 시네크시스티스 속 (*Synechocystis* sp.), 시네크코쿠스 속 (*Synechococcus* sp.), 노스톡 속 (*Nostoc* sp.), 아나베나 속 (*Anabaena* sp.), 글로이오박터 속 (*Gloeobacter* sp.) 및 시아노박테리움 속 (*Cyanobacterium* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 조류로부터 분리된 것인, 자성 광합성 세포막 소낭.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 자성 입자는 자철석 (magnetite) 또는 마그헤마이트 (maghemite)를 포함하는, 자성 광합성 세포막 소낭.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 자성 입자는 시트르산 (citric acid), 폴리에틸렌글라이콜 (polyethylene glycol), 폴리비닐알콜 (polyvinyl alcohol) 및 덱스트란 (dextran)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 수용성 화합물로 코팅 (coating)된 것인, 자성 광합성 세포막 소낭의 제조 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 자성 광합성 세포막 소낭은 자석 (magnet)에 접촉 시 인력을 받아, 수용액 내에서 자석 방향으로 이동하는 것을 특징으로 하는 자성 광합성 세포막 소낭.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 자성 광합성 세포막 소낭은 적절한 빛에 노출 시 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP) 및 무기 인산 (inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP)을 형성하거나 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized, NADP+)을 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, NADPH)으로 변환하거나 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (nicotinamide adenine dinucleotide oxidized, NAD+)를 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH)로 변환하는 것을 특징으로 하는 자성 광합성 세포막 소낭.

청구항 9

- a) 광합성 세균으로부터 광합성 세포막 소낭을 분리하는 단계;
- b) 자성 입자 및 인지질 (phospholipid)을 혼합하여 자성 리포솜을 (magnetoliposome) 제조하는 단계; 및
- c) 상기 a) 단계에서 분리된 광합성 세포막 소낭과 상기 b)에서 제조한 자성 리포솜을 막 융합법 (membrane fusion)을 통해 융합하는 단계를 포함하는 자성 광합성 세포막 소낭 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 로도박터 속 (*Rhodobacter* sp.), 로도스피릴룸 속 (*Rhodospirillum* sp.), 로도수도모나스 속 (*Rhodopseudomonas* sp.), 로지오박터 속 (*Rhoseobacter* sp.), 브래 디리조비움 속 (*Bradyrhizobium* sp.) 및 루브리비박스 속 (*Rubrivivax* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 자색 비 유황세균으로부터 분리된 광기구 세포막 소낭인 것인, 자성 광합성 세포막 소낭 제조 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 시네코시스티스 속 (*Synechocystis* sp.), 시네코코쿠스 속 (*Synechococcus* sp.), 노스톡 속 (*Nostoc* sp.), 아나베나 속 (*Anabaena* sp.), 글로이오박터 속 (*Gloeobacter* sp.) 및 시아노박테리움 속 (*Cyanobacterium* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 조류로부터 분리된 틸라코 이드 세포막 소낭인 것인, 자성 광합성 세포막 소낭 제조 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 자성 입자는 자철석 (magnetite) 또는 마그헤마이트 (maghemite)를 포함하는, 자성 광합 성 세포막 소낭 제조 방법.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 자성 입자는 시트르산 (citric acid), 폴리에틸렌글라이콜 (polyethylene glycol), 폴 리마이닐알콜 (polyvinyl alcohol) 및 덱스트란 (dextran)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 수용성 화합물로 코팅 (coating)된 것인, 자성 광합성 세포막 소낭의 제조 방법.

청구항 14

- a) 라이보카이네이즈 (ribokinase, RBKS) 촉매하에 라이보스 (D-ribose)를 라이보스 인산 (D-ribose 5-phosphate)으로 변환시키는 단계;
- b) 라이보스-인산 파이로포스포카이네이즈 (ribose-phosphate pyrophosphokinase 2, PRPS2) 촉매하에 상기 a)

에서 생성된 라이보스 인산을 포스포라이보실 파이로포스페이트 (phosphoribosyl pyrophosphate)로 변환시키는 단계;

c) 니코틴아마이드 포스포라이보실트랜스퍼레이즈 (nicotiamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 촉매하에 상기 b)에서 생성된 포스포라이보실 파이로포스페이트와 니코틴아마이드 (nicotiamide)를 중합하여 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (NMN)를 합성하는 단계를 포함하고,

상기 a), b) 및 c) 단계에서 사용되는 각 효소들은 ATP를 소모하고 상기 각 단계에서 사용되는 ATP는 청구항 제 1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 자성 광합성 세포막 소낭에 의해 지속적으로 제공되는, 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (nicotinamide mononucleotide, NMN)의 지속적 생산 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 각 단계에서 사용된 효소들은 아가로스 수지 (agarose resin)에 고정화 (immobilization)되어 메쉬 (mesh) 안에 밀봉된 형태인 것을 특징으로 하는 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드의 지속적 생산 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 자성 광합성 세포막 소낭 및 상기 효소들은 반응으로의 투입 및 반응으로부터의 제거가 독립적으로 이루어질 수 있는 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드의 지속적 생산 방법.

청구항 17

- a) 기질로서 라이보스(D-ribose) 및 니코틴 아마이드(nicotiamide);
- b) 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (nicotinamide mononucleotide, NMN) 생합성 효소로서 라이보카이네이즈 (ribokinase, RBKS), 라이보스-인산 파이로포스포카이네이즈 (ribose-phosphate pyrophosphokinase 2, PRPS2) 및 니코틴아마이드 포스포라이보실트랜스퍼레이즈 (nicotiamide phosphoribosyltransferase, NAMPT); 및
- c) ATP 공급자로서 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 자성 광합성 세포막 소낭을 포함하는, 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드의 지속적 생산 시스템.

청구항 18

- d) 조 효소로서 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP); 및
- e) 상기 조 효소의 재순환을 위한 보조 효소로서 아데닐레이트 카이네이즈(adenylate kinase) 및 파이로포스페타이즈 (pyrophosphatase)를 더 포함하는, 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드의 지속적 생산 시스템.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 광합성 세균에서 유래한 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)과 자성 입자 (magnetic particle)를 융합하여 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle)을 제조하고, 이를 이용하여 빛에너지를 화학 에너지로 전환하며, 이 때 생성되는 화학 에너지와 고정화된 생합성 효소의 활성을 이용하여 라이보스 (D-ribose)로부터 고부가 산물인 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (nicotinamide mononucleotide, NMN)를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 광합성 세포막 (photosynthetic membrane)은 광합성을 수행하는 생물에서 나타나는 특징적인 세포내 구조로서, 광흡수체 (light-harvesting complex), 광반응 중심체 (reaction center), 전자전달계 (electron transfer chain) 등 광합성에 필요한 막 단백질 (membrane protein)들을 보유하고 있으며, 광합성의 명반응을 독립적으로 수행한다. 광합성 세포막의 종류에는 식물, 조류, 남세균에 존재하는 틸라코이드 세포막 (thylakoid membrane, TM)과 자색 비유황 세균 (purple nonsulfur bacteria)에 존재하는 광기구 세포막 (chromatophore membrane, intracytoplasmic membrane, ICM)이 있다. 광합성 세균의 세포를 파쇄 할 경우 소낭 (vesicle) 형태가 되는데 이를 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)이라고 한다.
- [0003] 광합성 세포막은 세포 내에서 빛 에너지를 화학에너지로 전환하는 역할 (명반응)을 수행한다. 광합성 세포막이 빛을 받으면 광흡수체가 빛을 흡수하고 이는 전자전달계 내에서의 전자이동을 유발한다. 전자전달계에서 전자가 이동할 때 양성자 농도 구배 (proton motive force)를 형성하게 되는데, 아데노신 삼인산 합성효소 (ATP synthase)는 양성자 농도 구배를 이용하여 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산 (inorganic phosphate, P_i)을 결합하여 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP)을 형성한다. 틸라코이드 세포막에서는 전자전달계에서 이동한 전자가 최종적으로 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized, $NADP^+$)으로 전달되며, 이로써 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, NADPH)으로 전환된다. 광기구 세포막에서는 순환적 전자전달 (cyclic electron flow)에 의해 전자가 전자전달계 내부에서 계속 순환하지만, 전자 공여체로서 숙신산 (succinate)이 존재할 경우 복합체 I (complex I), 복합체 II (complex II)를 이용하는 역전자전달 (reversed electron flow) 과정을 통해 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (nicotinamide adenine dinucleotide oxidized, NAD^+)가 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH)로 전환될 수 있고, 이는 피리딘 뉴클레오타이드 수소전이효소 (pyridine nucleotide transhydrogenase)에 의해서 NADPH로 상호 전환이 가능하다. 이렇게 형성된 ATP와 NAD(P)H는 세포 내에서 화학적 에너지원으로 작용하여 많은 생체 효소의 조효소로 쓰인다. 특히, 광합성 세포막 소낭은 세포 외의 환경 (*in vitro*)에서 독립적으로 광합성의 명반응을 수행하며 이를 통해 ATP와 NAD(P)H를 공급하는 역할을 할 수 있다 (대한민국 특허 등록 제 1017087520000).
- [0004] 생물학적인 방법으로 고부가 물질을 생산하는 방법에는 해당 물질을 만드는 효소를 정제하여 이용하는 방법과 유전공학적으로 조작된 균체를 이용하는 방법이 있다. 효소를 이용하는 방법은 균체를 이용하는 방법보다 부산물이 적고 생산속도가 빠르며 에너지 효율이 높다는 장점이 있지만, 반응에 사용되는 기질 뿐만 아니라 고단가의 조효소 (cofactor)를 효소반응에 요구하는 경우가 많아 조효소를 지속적으로 공급할 수 없다는 것이 제한요인으로 작용하고 있다. 정제된 광합성 세포막 소낭은 이런 제한요인을 극복하는데 유용하게 사용될 수 있다. 광합성 과정에 관여하는 많은 효소는 조효소로서 ATP 및 NAD(P)H를 필요로 한다. 광합성 세포막 소낭은 효소에 의해 소모된 ATP 및 NAD(P)H를 빛에너지를 이용하여 반복적으로 재생할 수 있기 때문에 조효소의 지속적인 공급 없이도 효소에 의한 반응을 지속적으로 유지할 수 있게 한다. 광합성 세포막 소낭을 실제 유용 물질 생산에 적용한 예로 아미노레불린산 (5-aminolevulinic acid)의 생산 방법이 있다. 특히 ATP 및 NAD(P)H를 조효소로 쓰는 모든 효소들에 광기구 세포막 소낭을 이용할 수 있기 때문에 다양한 고부가 산물 생산에 적용할 수 있다.
- [0005] 정제된 효소를 이용한 고부가 물질 생산에서의 또 다른 제한요인은 효소의 정제비용이 높다는 것이다. 이에 대한 해결책으로 효소 사용의 효율성을 높여서 높은 정제비용을 상쇄시키기 위한 효소 고정화 (enzyme immobilization) 방법을 사용한다. 보통의 효소들은 수용성 (soluble)이기 때문에 반응이 끝난 후 반응액에서 효소를 분리하기가 쉽지 않다. 효소 고정화는 미세한 크기의 효소를 보다 큰 불용성의 (insoluble) 지지체 (support or resin)에 결합시킴으로써 사용자가 효소를 쉽게 제어할 수 있도록 하는 것이다. 효소 고정화의 장점은 반응이 끝난 후 효소를 반응액에서 분리할 수 있다는 것이다. 이로써 이전 반응에 사용했던 효소를 다음 반응에 재사용하는 것이 가능하고, 반응이 끝난 반응액에서 산물 및 고단가의 조효소를 분리 및 재사용하기가 용이해진다. 결과적으로 효소 고정화를 통해 높은 효소 정제비용을 상쇄시키고 반응액의 후처리를 용이하게 하여 비용절감의 효과를 얻을 수 있다. (Datta et al. 2013. 3 Biotech. 3: 1-9)
- [0006] 효소 고정화에 대한 연구는 많이 진행되어 왔고, 실제 산업에서도 응용되고 있지만, 단백질-세포막 복합체인 광합성 세포막 소낭의 고정화 방법은 그 전례가 없다. 본 발명에서는 광합성 세포막 소낭의 활용 효율을 높이기 위해 자성 입자 (magnetic particle)를 광합성 세포막 소낭의 내부에 주입하여 자석에 의해 끌려오는 자성 광합

성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle)을 개발하였다. 자성 광합성 세포막 소낭은 반응액에서 용해된 형태로 존재하며 광합성 반응을 수행하다가 자석에 접촉 시 자석에 결합하여 반응액으로부터 쉽게 분리될 수 있다. 자성 광합성 세포막 소낭은 효소 고정화와 근본 원리는 다르지만 그 효과는 동일하며, 이 방법을 통해 효소 고정화의 이점을 획득하여 광합성 세포막 소낭을 이용한 고부가 물질 생산에서의 효율성 및 경제성을 증진시킬 수 있다.

[0007] 본 발명에서는 상기 광합성 세포막 소낭의 활용성을 검증하기 위해 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (nicotinamide mononucleotide, NMN)의 생합성 효소와 조합하여 NMN 생산 시스템을 구축하였다. NMN은 생체 내에서 에너지 대사에 관여하는 조효소인 NAD^+ 의 전구물질로서 항노화제 (anti-aging reagent)로 잘 알려진 고부가 물질이다 (Mills et al. 2016. Cell Metabolism 24: 1-12). 또한, 산화 스트레스 및 혈관 질환 (Picciotto et al. 2016. Aging Cell 15: 522-530), 급성 신부전증 (Guan et al. 2017. J. Am. Soc. Nephrol. 28: Inpress), 당뇨병 완화 (Yoshino et al. 2011. Cell Metabolism 14: 528-536) 에도 효과가 있음이 밝혀져 건강기능식품으로서 그 중요성이 높아지고 있다. 현재 NMN에 대한 실험실 규모의 연구가 많이 진행되어왔지만, 산업적 대량 생산에 대한 연구는 거의 없다. 이는 NMN 자체가 생체 내에서 쉽게 대사되어 다른 물질로 변환되어 축적되지 않고, NMN의 합성에 관여하는 효소들이 기질, 산물 및 조효소의 농도에 민감하게 반응하므로 조작이 어렵기 때문이다. 본 발명에서는 생체 외에서 NMN을 생산하기 위해 라이보스로부터 NMN을 합성하는 3단계 대사과정을 매개하는 효소 각각을 분리하여 생산회로를 구축하였다. 하지만 상기 NMN 생산회로를 구성하는 효소들 역시 기질, 중간 산물, 조효소에 의해서 영향을 받기 때문에 (Switzer et al. 1973. J. Biol. Chem. 248: 1063-1073. Sakuma et al. 1991. Clinica Chimica Acta 203: 143-152. Park et al. 2007. FEBS Lett. 581: 3211-3216. Burgos et al. 2009. Proc. Natl. Acad. Sci. 106: 13748-13753.) 상기 3종류의 효소를 단순히 조합하는 것만으로는 NMN을 효율적으로 생산할 수 없다. 따라서 본 발명에서는 효소 고정화를 통해 각 효소의 부분반응이 독립적이며 순차적으로 진행되게 함으로써 생산량을 증진시키고 자성 광기구 세포막 소낭을 이용하여 효소에 의해 소모된 ATP를 반응액 내에서 순환시켜 생산 비용을 절감한다.

[0008] 상기 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 설명을 위한 것일 뿐, 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 등록 제 1017087540000

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 정제된 효소를 이용한 고부가 물질 생산에서의 하나의 문제는 효소의 높은 정제 비용이다. 효소의 경우는 효소 고정화를 통한 효소의 회수 및 재사용을 통하여 이를 해결할 수 있었으나, 광합성 세포막 소낭은 그 구조적 특성 때문에 고정화가 용이하지 않아서 반응 후 반응액에 있는 광합성 세포막 소낭을 회수할 방법이 없었다. 이를 해결하기 위한 하나의 방법으로 본 발명에서는 광합성 세포막 소낭에 자성 입자를 주입하여 자성 광합성 세포막 소낭을 제조하는 방법을 개발하고자 하였다. 자성 광합성 세포막 소낭은 소낭 안쪽의 자성 입자에 의해 자석에 접촉 시 끌리는 특성이 있어서 반응액에서 광합성 세포막 소낭을 분리하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 자성 입자를 이용하여 광합성 세포막 소낭을 보다 효율적으로 이용하는 방법을 개발함으로써 광합성 세포막 소낭을 이용한 고부가 물질 생산에서의 비용절감을 실현하는 것이다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 문제는 NMN의 생체 외 (*in vitro*) 합성 방법을 개발하는 것이다. NMN의 생체 외 합성은 라이보스로부터 NMN을 생합성 하는 효소들에 의해 수행되는 데 이 효소들은 그 조효소로서 ATP를 필요로한다. 하지만 ATP의 높은 단가 때문에 ATP를 반응액에 지속적으로 공급하기는 현실적으로 불가능하다. 또한, NMN 생합성 효소들의 다양한 중간산물 저해 때문에 단순한 효소 조합만으로는 NMN을 생산하는 것이 용이하지 않다. 따라서, 본 발명의 또 하나의 목적은 ATP의 공급을 자성 광기구 세포막 소낭의 광합성 반응으로 해결하고, NMN 생합성 효소를 조작하는 방법을 모색하여, NMN을 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 마련하는 것이

다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle) 내부 공간에 자성 입자 (magnetic particle)를 포함하는 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle)을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 광합성 세포막 소낭 내부에 자성입자를 주입한 자성 광합성 세포막 소낭을 이용하면 생체 외에서 광합성 세포막 소낭의 이용 및 재활용 효율을 높일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 정의하는 용어 “광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)”은 광합성 조건 하에서 광합성의 명반응을 세포 밖에서 (*in vitro*) 독립적으로 수행하며 이를 통해 아데노신 삼인산 (ATP)과 환원된 니코틴아마이드 다이뉴클레오타이드 (NADH) 또는 환원된 니코틴아마이드 다이뉴클레오타이드 인산 (NADPH)을 생산할 수 있는 세포막과 광기구 관련 효소의 복합체를 의미한다.
- [0015] 상기 광합성 세포막 소낭은 틸라코이드 세포막 (thylakoid membrane, TM) 또는 광기구 세포막 (chromatophore membrane, intracytoplasmic membrane, ICM)을 가지는 세균으로부터 소낭 (vesicle) 형태로 정제할 수 있으며, 이를 각각 틸라코이드 세포막 소낭(TM vesicle), 광기구 세포막 소낭 (ICM vesicle)으로 정의한다. 본 발명의 바람직한 구현을 위해서는 상기 틸라코이드 세포막 소낭 또는 광기구 세포막 소낭을 활용할 수 있다.
- [0016] 상기 광기구 세포막 소낭은 자색 비유황 세균으로부터 분리하며, 바람직하게는 로도박터 속 (*Rhodobacter* sp.), 로도스피릴럼 속 (*Rhodospirillum* sp.), 로도수도모나스 속 (*Rhodopseudomonas* sp.), 로지오박터 속 (*Rhoseobacter* sp.), 브래디리조비움 속 (*Bradyrhizobium* sp.) 및 루브리비박스 속 (*Rubrivivax* sp.) 등에서 선택될 수 있다.
- [0017] 상기 틸라코이드 세포막 소낭은 식물, 조류 (algae) 또는 남세균에서 분리하며, 바람직하게는 시네코시스티스 속 (*Synechocystis* sp.), 시네코코쿠스 속 (*Synechococcus* sp.), 노스톡 속 (*Nostoc* sp.), 아나베나 속 (*Anabaena* sp.), 글로이오박터 속 (*Gloeobacter* sp.) 및 시아노박테리움 속 (*Cyanobacterium* sp.)등에서 선택될 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 정의하는 용어 “자성 입자 (magnetic particle)”는 영구 자석 (permanent magnet) 또는 전자석 (electromagnet)에 의해 인력 (attractive force)을 받는 입자를 의미한다. 자성 입자의 크기에는 제한이 없으며, 구체적으로 자철석 (magnetite, Fe_3O_4) 또는 마그헤마이트 (maghemite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) 등에서 선택될 수 있다. 상기 자성 입자들은 수용액 상태에서 안정된 형태로 유지시키기 위해 “코팅 (coating)”될 수 있다. 상기 “코팅”은 자성 입자 표면에 공유 또는 비공유 결합으로 특정 화합물을 결합하여 자성 입자를 수용액 상태에서 안정화하는 과정을 의미한다. 상기 자성 입자의 코팅에 사용되는 재료는 수용성의 화합물일 수 있고, 구체적으로 시트르산 (citric acid), 폴리에틸렌글라이콜 (PEG), 폴리비닐알콜 (PVA), 덱스트란 (dextran) 등에서 선택될 수 있다.
- [0019] 일 실시예에서, 본 발명의 자성 광합성 세포막 소낭은 도 1에 나타난 것과 같이, 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*)에서 유래한 광기구 세포막 소낭 (chromatophore membrane vesicle)을 자성 리포솜 (magnetic liposome)과 융합된 구조를 가진다 (도 1). 자성 리포솜은 그 내부에 자성 입자 (magnetic particle)를 보유하고 있는 소낭 형태의 인지질 이중막이며 자석에 접촉 시 내부의 자성입자에 의해 인력 (attractive force)을 받는다. 자성 리포솜과 광기구 세포막 소낭을 막 융합법 (membrane fusion)을 통해 하나의 소낭 복합체로 만들 경우 혼성 소낭 (hybrid vesicle)이 형성된다. 이를 자성 광기구 세포막 소낭이라고 하며, 광기구 세포막 소낭과 자성 리포솜의 성질을 동시에 가진다.
- [0020] 구체적으로, 상기 자성 광기구 세포막 소낭은 세포 외 (*in vitro*)에서 독립적으로 광합성의 명반응을 수행하여 적절한 빛에 노출 시 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP) 및 무기 인산 (inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산 (adenosine triphosphate, ATP)을 형성하거나 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized, NADP^+)을 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, NADPH)으로 변환하거나 산화된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (nicotinamide adenine dinucleotide oxidized, NAD^+)를 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH)로 변환시킬 수 있다. 동시에 자석에 접촉 시 인력을 받아 끌려오는 점을 이용하여 반응액으로부터 자성 광기구 세포막 소낭을 분리하는 것이 용이하다. 이로써 광기구 세포막 소낭을 새로운 반응액에서 재사용이 가능하게 함으로써

광기구 세포막 소낭 정제의 고비용 문제에 대한 해결 방안을 마련하였다.

- [0022] 또한, 본 발명은,
- [0023] a) 광합성 세균으로부터 광합성 세포막 소낭을 분리하는 단계;
- [0024] b) 자성 입자 및 인지질 (phospholipid)을 혼합하여 자성 리포솜 (magnetoliposome) 제조하는 단계; 및
- [0025] c) 상기 a) 단계에서 분리된 광합성 세포막 소낭과 상기 b)에서 제조한 자성 리포솜을 막 융합법 (membrane fusion)을 통해 융합하는 단계를 포함하는 자성 광합성 세포막 소낭 제조 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에서 정의하는 용어 “자성 리포솜 (magnetic liposome)”은 상기 자성 입자가 인지질 이중막 (phospholipid bilayer) 안쪽의 닫힌 공간 (closed space) 안에 존재하는 소낭 (vesicle) 형태의 인지질-자성 입자 복합체를 의미하며, 자석에 의한 인력을 받아 수용액에서 용액과 분리가 가능한 특성을 가진다. 자성 리포솜을 형성하는 인지질의 종류는 제한이 없으나 구체적으로 인지질의 글리세롤 작용기의 *sn*-1 및 *sn*-2 위치에 공유 결합된 지방산 (fatty acid)이 팔미트산 (palmitic acid, 16:0), 팔미톨레산 (palmitoleic acid, 16:1 *cis*- Δ^9), 스테아르산 (stearic acid, 18:0), 올레산 (oleic acid, 18:1 *cis*- Δ^9), 리놀레산 (linoleic acid, 18:2 *cis*, *cis*- Δ^9 , Δ^{12}) 등에서 선택되고, *sn*-3 의 인산기 (phosphate)에 공유 결합된 작용기가 에탄올아민 (ethanolamine), 콜린 (choline), 세린 (serine), 글리세롤 (glycerol) 등에서 선택되어 형성되는 *sn*-1,2,3 작용기의 모든 조합에 의한 인지질을 포함할 수 있다. 또한, 자성 리포솜을 제조하는 하나의 실시예로서 박막 수화법 (thin film hydration)과 초음파 파쇄법 (sonication)을 이용하였으나, 다른 방법을 이용하여 자성 리포솜을 제조하는 것도 가능하다.
- [0027] 본 발명에서 정의하는 용어 “막 융합법 (membrane fusion)”은 독립된 형태로 존재하는 두 개 이상의 리포솜 (liposome) 소낭이 존재할 때, 두 이중막이 결합하여 하나의 연속된 이중막을 형성함과 동시에 리포솜 소낭 내부의 공간이 하나로 융합되어 혼성 소낭 (hybrid vesicle)을 형성하는 것을 유도하는 방법이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol, PEG)과 칼슘 이온 (Ca^{2+})을 이용한 방법 (Yen et al. 1982. Biochim Biophys Acta 688: 605-621)을 사용하였지만, 본 발명의 구현을 위해 다른 막 융합법을 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명은,
- [0030] a) ATP를 소모하여 ADP를 형성하는 라이보카이네이즈 (ribokinase, RBKS) 효소 반응을 이용하여 라이보스 (D-ribose)를 라이보스 인산 (D-ribose 5-phosphate)으로 변환시키는 단계;
- [0031] b) ATP를 소모하여 아데노신 일인산 (adenosine monophosphate, AMP)를 형성하는 라이보스-인산 파이로포스포카이네이즈 (ribose-phosphate pyrophosphokinase 2, PRPS2) 효소 반응을 이용하여 상기 a)에서 생성된 라이보스 인산을 포스포라이보실 파이로포스페이트 (phosphoribosyl pyrophosphate)로 변환시키는 단계;
- [0032] c) 파이로포스페이트 (pyrophosphate)를 형성하는 니코틴아마이드 포스포라이보실트랜스퍼레이즈 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 효소 반응을 이용하여 ATP를 소모하여 상기 b)에서 생성된 포스포라이보실 파이로포스페이트와 니코틴아마이드 (nicotinamide)를 중합하여 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (NMN)를 합성하는 단계를 포함하고,
- [0033] 상기 a), b) 또는 c) 단계에서 사용되는 ATP는 청구항 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 자성 광합성 세포막 소낭에 의해 지속적으로 제공되는, 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (nicotinamide mononucleotide, NMN)의 지속적 생산 방법을 제공한다.
- [0035] 구체적으로, NMN의 합성은 3종류의 주요 효소와 2종류의 보조 효소 및 자성 광기구 세포막 소낭으로 구성되며, 라이보스 (D-ribose)와 니코틴아마이드 (nicotinamide)를 시작물질로 하고, ADP를 조효소로 하여 NMN을 생산한다. 첫 번째 반응은 라이보카이네이즈 (RBKS)에 의해 촉매되며 라이보스에서 라이보스 인산 (D-ribose 5-phosphate)을 형성한다. RBKS는 반응 중 ATP를 소모하고, ADP를 형성하는데 이는 자성 광기구 세포막 소낭의 명

반응을 통해 다시 ATP로 재생된다. 두 번째 반응은 라이보스-인산 파이로포스포카이네이즈 (PRPS2)에 의해 촉매되며 라이보스 인산을 포스포라이보실 파이로포스페이트 (phosphoribosyl pyrophosphate)로 변환한다. PRPS2 반응에서 역시 ATP가 소모되어 아데노신 일인산 (AMP)이 생성되는데 이는 보조 효소 중 하나인 아데닐레이트 카이네이즈 (adenylate kinase)에 의해 다시 ADP로 재생되고 이는 자성 광기구 세포막 소낭에 의해 다시 ATP로 재생될 수 있다. 세 번째 반응은 니코틴아마이드 포스포라이보실트랜스퍼레이스 (NAMPT)에 의해 촉매되며, 포스포라이보실 파이로포스페이트를 니코틴아마이드와 중합하여 최종적으로 NMN을 생성하면서 파이로포스페이트 (PP_i)가 방출된다. 파이로포스페이트는 보조 효소 중 하나인 파이로포스페타이즈 (pyrophosphatase)에 의해 무기 인산으로 변환되며, 이는 자성 광기구 세포막 소낭의 반응의 기질로서 다시 쓰이게 된다.

[0036] 본 발명에서 제시한 하나의 구현예에서는 상기 NMN의 제조를 생체 외에서 구현하며, 상기 3개의 주요 효소 및 2개의 보조 효소를 스트렙타비딘 수지 (streptavidin resin)에 고정화 하고, 10~100 μm의 공극 (pore size)을 가지는 메쉬 (mesh)로 밀봉하여 개개의 효소가 독립적으로 반응액에서 분리되어 조작할 수 있다.

[0037] 또한 상기 자성 광기구 세포막 소낭은 자석을 이용하여 조작함으로써 효소들과 별개로 반응액에서 분리되도록 할 수 있다.

[0038] 상기 세 단계로 이루어진 전체반응을 순차적이고 독립적으로 수행함으로써 기질 및 중간산물에 의한 효소의 저해를 최소화 하여 최종 산물인 NMN의 생산량을 대폭 증진시킬 수 있었고, 자성 광기구 세포막 소낭의 적용 가능성을 검증하였다.

[0039] 본 발명에서 정의하는 용어 “효소 고정화 (enzyme immobilization)”는 효소 또는 효소 복합체를 불용성의 지지체 (insoluble support)에 결합시키는 것을 의미하며, 이를 위한 방법에는 공유결합법 (covalent crosslinking), 가두기법 (entrapping), 캡슐화법 (encapsulation), 이온결합법 (ionic binding), 그리고 친화도 결합법 (affinity binding) 등이 포함될 수 있다 (Nisha et al. 2012. Che. Sci. Rev. Lett. 1: 148-155). 본 발명에서 효소 고정화를 위해 사용하는 방법은 친화도 결합법이며, 구체적으로는 아비딘 (avidin)과 스트렙 태그 (strep-tag)의 특이적인 결합을 이용한다. 아비딘은 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 특이적으로 인식하여 강하게 결합할 수 있는 단백질을 총칭하는 것이며, 진핵생물 (eukaryote) 및 박테리아 (bacteria)에서 분리할 수 있다. 아비딘 수지 (avidin resin)는 아비딘이 아가로스 (agarose) 중합체에 공유 또는 비공유 결합된 지지체로서, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체와 강한 결합을 형성한다. 스트렙 태그는 8개의 아미노산으로 구성된 바이오틴 (biotin)의 구조 유사체 (structural analog)이며, 유전자 조작을 통해 특정 단백질의 말단에 결합할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면 상기 아비딘 수지의 한 종류로서 스트렙토마이세스 아비딘니 (*Streptomyces avidinii*)에서 유래한 스트렙타비딘 (streptavidin)이 아가로스 중합체에 결합된 스트렙타비딘 수지 (streptavidin resin)를 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 정의하는 “메쉬 (mesh)”는 공극 (pore size)이 10 내지 100 μm의 막 (membrane) 또는 천 (fabric)을 의미하며, 그 재질에는 제한을 두지 않는다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는 NMN 생산에 자성 광기구 세포막 소낭을 활용하지만, 또 다른 양태에 따르면 자성 광기구 세포막 소낭 대신 자성 틸라코이드 세포막 소낭을, 또는 두 소낭을 동시에 활용할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 효소를 고정화하여 메쉬 안쪽에 밀봉하는 방법은 메쉬의 공극을 통과하지 못하는 지지체 (resin)에 효소를 고정함으로써 수행된다.

[0043] 본 발명의 일 양태에 따르면 자성 광합성 세포막 소낭을 활용한 NMN 생산을 위한 시스템을 제공한다.

[0044] 상기 일 양태에 따른 NMN 생산을 위한 시스템은 다음과 같이 구성된다:

[0045] a) 라이보스를 라이보스 인산으로 변환하면서 ATP를 소모하여 ADP를 형성하는 라이보카이네이즈 (RBKS);

[0046] b) 상기 a)에서 생성된 라이보스 인산을 포스포라이보실 파이로포스페이트로 변환하면서 ATP를 소모하여 AMP를 형성하는 라이보스-인산 파이로포스포카이네이즈 (PRPS2);

[0047] c) 상기 b)에서 생성된 포스포라이보실 파이로포스페이트와 니코틴아마이드를 중합하여 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (NMN)를 합성하며 파이로포스페이트를 형성하는 니코틴아마이드 포스포라이보실트랜스퍼레이스 (NAMPT);

[0048] d) 상기 a), b), 또는 c)에서 생성된 AMP를 ADP로 변환하는 아데닐레이트 카이네이즈;

- [0049] e) 상기 a), b), 또는 c)에서 생성된 파이로포스페이트를 무기 인산으로 변환하는 파이로포스페테이즈; 및
- [0050] f) 상기 a), b), c), d), 또는 e)에서 생성된 ADP와 무기 인산을 광합성 조건 하에서 ATP로 변환하는 자성 광기구 세포막 소낭.
- [0052] 상기 NMN생산을 위한 시스템에서 자성 광기구 세포막 소낭 및 개개의 효소들은 독립적으로 반응액에서 투입 및 제거가 가능하다. 이로써 전체 반응을 순차적으로 진행한다. 일례로 첫 번째 반응이 끝난 후 두 번째 반응을 진행하는 경우 첫 번째 반응에 사용한 효소들을 반응액에서 제거하고, 두 번째 반응에서 필요한 효소들을 반응액에 넣어서 두 번째 반응을 진행할 수 있다.
- [0053] 상기 NMN 생산을 위한 시스템에 포함된 효소들이 유래하는 유전체 (genome)의 종류에는 제한이 없으나, 바람직하게는 진핵 생물 (eukaryote) 또는 박테리아 (bacteria)에 속하는 유기체의 유전체에서 선택될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 양태에 따르면, 자성 광기구 세포막 소낭을 고정화 효소와 조합하여 NMN을 생산하며 1회의 반응 순환 (reaction cycle)을 수행한다. 하지만 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 자성 광기구 세포막 소낭과 고정화 효소를 회수하여 새 반응액에서 반복적으로 사용함으로써 최소 3회 이상의 반응 순환을 통해 NMN을 생산을 더욱 증진시킬 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 자성 광기구 세포막 소낭을 ATP를 소모하는 다른 효소와 조합함으로써 NMN이 아닌 다른 유용물질을 합성하는 방법 및 시스템을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명의 구현예에 따르면 자성 광기구 세포막 소낭을 고정화 할 경우, 반응이 끝난 후 반응액에서 광기구 세포막 소낭을 쉽게 분리할 수 있다. 이로써 얻는 효과는 반응액에서 분리한 광기구 세포막 소낭을 다음 반응에 재사용할 수 있어, 고비용의 정제비용을 상쇄할 수 있는 것이다. 또 하나의 효과는 광기구 세포막 소낭을 분리함으로써 남은 반응액에 있는 산물의 정제 및 고단가의 조효소의 회수가 용이해진다는 것이다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면 자성 광기구 세포막 소낭과 메쉬에 밀봉된 고정화 효소를 조합하여 사용함으로써 반응액에서 각 효소들의 투입과 제거가 독립적으로 이루어지게 되어 반응의 조작을 정교하게 할 수 있게 되었다. 이로써 얻는 이점은 자성 광기구 세포막 소낭 및 NMN 생합성 효소를 재사용할 수 있다는 것과 조효소인 ATP의 추가 투입 없이 반응이 지속된다는 것, 그리고 여러 반응 중간 산물에 의한 NMN 생합성 효소의 활성 저해를 완화할 수 있어 NMN 생산량을 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 자성 광합성 세포막 소낭의 제조 방법에 대한 도면이다.
- 도 2는 합성한 자성 입자의 자성을 확인하고, 입자의 크기를 측정하는 것이다.
- 도 3은 제조한 자성 리포솜의 자성을 확인하고, 입자의 크기를 측정하는 것이다.
- 도 4는 자성 리포솜 제조 과정에서 투입되는 인지질과 자성입자의 투입 비율에 따른 자성 리포솜의 수율을 비교한 것이다.
- 도 5는 자성 광기구 세포막 소낭의 자성을 확인한 것이다.
- 도 6은 자성 광기구 세포막 소낭의 광합성 기구를 정량하기 위해 흡광 스펙트럼을 분석하여 그 양을 자성 입자가 없는 광기구 세포막 소낭과 비교한 것이다.
- 도 7은 자성 광기구 세포막 소낭의 활성을 자성 입자가 없는 광기구 세포막 소낭과 비교한 것이다.
- 도 8은 연속적인 반응액의 교환을 통한 순환 반응에 따른 자성 광기구 세포막 소낭의 활성 변화를 측정하는 것이다.
- 도 9는 자성 광합성 세포막 소낭을 NMN 생합성 효소와 조합하여 NMN을 생산하는 방법에 관한 도면이다.
- 도 10은 NMN 생합성에 필요한 3종류 주요 효소들을 정제한 것을 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS PAGE)으로 확인한 것이다.

도 11은 도 9에서 명시된 방법으로 NMN을 실제로 생산한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참조로 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위함이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 점은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0060] 본 발명의 실시예에서는 광합성 세포막 소낭의 일종인 광기구 세포막 소낭을 이용하여 자성 광기구 세포막 소낭을 제조하고 (도 1), 이를 NMN 생합성 효소와 조합하여 사용함으로써 NMN을 합성하는 방법 (도 9)을 제시한다.

[실시예 1] 시트르산이 코팅된 산화철 자성 입자의 합성

[0063] 본 실시예에서는 염화철 (iron chloride)과 시트르산 (citric acid)을 재료로 하여 시트르산으로 표면이 코팅 (coating)된 산화철 자성 입자 (iron oxide magnetic particle)의 합성 및 선별 방법을 다룬다. 먼저 밀폐된 플라스크에 50 ml의 증류수와 3가 염화철 (FeCl_3) 5.88 g을 혼합 후 60℃까지 용액을 가열하고, 가열 도중 플라스크 안에 질소 기체를 채워준다. 새로운 50 ml의 증류수에 2가 염화철 (FeCl_2) 2.5 g을 용해시킨 후 즉시 가열된 3가 염화철 용액과 혼합 후, 스피너 (spin bar)를 이용하여 500 rpm으로 교반 (stirring)하면서 80℃까지 용액을 가열한다. 가열된 용액에 수산화암모늄 용액 (NH_4OH)을 12 ml 투입 후 교반속도를 유지하면서 80℃에서 30분 동안 교반한다. 이 후 2.5 g의 시트르산을 용액에 첨가한 후 90℃까지 온도를 높인 후 90분 동안 교반한다. 90분 후 교반을 유지하면서 용액을 상온으로 냉각한다. 냉각한 자성 입자 용액을 증류수에 50배 희석한 후 네오디뮴 자석 (neodymium magnet)을 이용하여 자석에 붙는 자성입자를 용액과 분리한다. 분리된 자성입자에 증류수를 넣은 후 0.22 μm 필터 (Merck Millipore)를 통과시킨 후 자석을 이용하여 자성 입자를 한 번 더 용액과 분리한 후 세척 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0)를 넣는다. 자석을 이용하여 자성입자를 분리하고 새로운 세척 버퍼를 투입하는 과정을 3회 반복한 후 최종적으로 자성입자를 세척버퍼에 넣어서 보관한다. 자성 입자의 양은 5N의 염산 (HCl)에 자성 입자를 용해시켜 355 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다 (Belikov et al. 2002. Pharma. Chem. J. 36: 333-336).

[0064] 선별한 자성입자를 입도 측정기 (Horiba SZ-100)를 통해 측정한 결과 평균 지름이 73 nm이며, 자석을 이용하여 수용액에서 분리가 가능하였다 (도 2).

[실시예 2] 자성 리포솜의 제조

[0067] 본 실시예는 실시예 1에서 합성한 자성 입자를 이용하여 자성 리포솜 (magnetoliposome)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 자성 리포솜 제조에는 박막 수화법 (thin film hydration)과 초음파 파쇄법 (sonication)을 이용한다. 10 mg의 인지질 (phospholipid, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, Avanti lipids)을 10 ml 용량의 유리병에 넣은 후 질소 기체를 흘려보내 인지질의 용매인 클로로포름(CHCl_3)을 제거하여 유리병 바닥에 인지질의 막 (film)이 형성되게 한다. 여기에 3 ml의 리포솜 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10% sucrose)와 50 mg의 자성 입자를 넣은 후 3000 rpm으로 30분 간 교반한다. 이 과정에서 인지질과 자성 입자의 비율은 1:5로 하였고, 이는 다양한 비율에서의 자성 리포솜 수율을 비교하여 얻은 결과이다 (도 4). 다음, 용액을 초음파 파쇄기 (Branson sonifier 250)를 이용하여, 아웃풋 (output) 2로 상온에서 10분 간 용액에 초음파를 조사한다. 이후, 용액에 2 mM의 염화칼슘 (CaCl_2)을 첨가하고, 1000 g로 1분 간 원심분리한 후 상층액을 얻는다. 이 과정은 시트르산이 코팅된 자성 입자가 칼슘이온과 반응 시 침전물을 형성함을 이용하여 리포솜 내부에 들어가지 않은 자성 입자를 제거하기 위함이다. 상층액을 자석에 접촉시켜 자성 리포솜이 유리병의 벽면에 붙도록 한 후 상층액을 버리고 새로운 리포솜 버퍼를 첨가한다. 이 과정을 3회 반복하여 최종적으로 리포솜 버퍼에 자성 리포솜을 용해시켜 4℃에 보관한다.

[0068] 상기 방법으로 제조한 자성 리포솜은 자성 입자와 마찬가지로 자석에 끌려오는 특성이 있었고, 그 평균 지름은 74 nm로 측정되었다 (도 3). 또한, 제조한 자성 리포솜에 포함된 인지질과 자성 입자의 양을 측정한 결과 그 질량비가 약 1:5로 존재하였다. 자성 리포솜의 인지질 정량은 스튜어트 방법 (Stewart. 1980. Anal. Biochem. 104: 10-14)을 이용하였다.

[0070] [실시예 3] 자성 광기구 세포막 소낭의 제조

[0071] 본 실시예는 실시예 2에서 제조한 자성 리포솜과 광합성 세포막 소낭 (photosynthetic membrane vesicle)을 막 융합법 (membrane fusion)을 이용하여 결합한 자성 광합성 세포막 소낭 (magnetic photosynthetic membrane vesicle)의 제조 방법에 관한 것이다. 본 실시예에서는 광합성 세포막 소낭의 한 종류인 광기구 세포막 소낭 (chromatophore membrane vesicle)을 이용하여 자성 광기구 세포막 소낭 (magnetic chromatophore membrane vesicle)을 제조하였다. 본 실시예에서 사용하는 막 융합법은 폴리에틸렌글라이콜-칼슘 융합법 (PEG-Ca²⁺ fusion, Yen et al. 1982. Biochim Biophys Acta 688: 605-621)이다.

[0072] 먼저 광기구 세포막 소낭을 분리하기 위해 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, ATCC BAA-808, Cohen-Bazire et al. 1956. J. Cell. Comp. Physiol. 49: 25-68)를 250 ml의 시스트롬 최소배지 (Sistrom. 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616, 조성은 표 1)에서 광합성 배양 (photosynthetic culture)을 수행한다. 광합성 배양 조건은 15 Watt/m²의 광도, 30℃의 온도의 혐기조건이다. 광합성 배양을 수행한 세균 배양액이 660 nm 에서의 흡광도가 2.0이 되었을 때, 균체 (cell pellet)를 수득한다. 이후 본 실시예에서 실시하는 모든 과정은 기체조성이 90%의 질소, 5%의 수소, 5%의 이산화탄소로 이루어진 혐기상자 (anaerobic chamber, model 10, Coy laboratory product)안에서 수행한다. 세균 배양액을 4℃, 7,000 g 에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 수득하고, 수득한 균체는 8 ml의 파쇄 버퍼 (10 mM Tris, pH 8.0, 10% sucrose)로 용해시킨 후 프로테아제 억제제 혼합액 (protease inhibitor cocktail, Roche)을 제조사의 지시량만큼 첨가한다. 수득한 균체의 파쇄 (lysis)를 위해 초음파파쇄기 (model VCX130, Sonics & Materials)를 이용하여, 50% 증폭 (amplification)으로 2분 간 초음파를 조사하고 2분 간 얼음물에서 냉각시키는 과정을 4회 반복한다. 다음, 파쇄된 균체를 4℃, 7,000 g 에서 10분 간 원심분리하고, 그 상층액 (세포 파쇄액)을 분리한다. 세포 파쇄액에 포함된 광기구 세포막 소낭의 양을 측정하기 위해 490 μl의 색소추출용액 (acetone:methanol = 7:2)에 10 μl의 세포 파쇄액을 넣고, 섞어준 후 6,000 g에서 1분 간 원심분리하여 얻은 추출액에서 770 nm에서의 박테리오클로로필 에이 (bacteriochlorophyll a, bch a)의 흡광도를 측정한다. 측정한 흡광도와 83.9 mM⁻¹ (Kim and Lee. 2010. J Bacteriol. 192: 198-207)의 몰흡광계수 (molar extinction coefficient)를 통해 세포 파쇄액의 박테리오클로로필 에이의 농도 (μg bch a/ml)를 계산하여 세포 파쇄액 내의 광기구 세포막 소낭의 양을 결정한다.

[0073] 다음 과정은 상기 세포 파쇄액에 포함된 광기구 세포막 소낭과 실시예 2에서 제조한 자성 리포솜을 결합하기 위한 막 융합법 (membrane fusion)에 관한 것이다. 상기 세포 파쇄액 0.2 mg bch a와 자성 리포솜 0.8 mg phospholipid을 혼합한 후, 혼합액과 동일한 부피의 퓨전 버퍼 (25 mM Na₂HPO₄, pH 7.0, 0.5 mM CaCl₂, 55% polyethylene glycol 6000)를 첨가한 후 10 분에 1회씩 10초 간 교반 (by vortexing) 하는 과정을 30℃에서 총 6회 실시한다. 이후 용액을 자석에 접촉시켜 자석에 끌려오는 부분 (자성 광기구 세포막 소낭)을 획득한 후 남은 상층액을 제거하고, 리포솜 버퍼를 이용하여 2회 세척하는데 이 때 안정제 (stabilizer)로서 5 μg bch a/ml의 로도박터 스페로이데스 세포 파쇄액을 첨가해준다. 최종적으로 획득한 자성 광기구 세포막 소낭은 리포솜 버퍼에 용해시켜 보관한다.

[0074] 상기 방법으로 제조한 자성 광기구 세포막 소낭은 자성 입자, 자성 리포솜과 같이 자석에 끌려오는 특성을 보였다 (도 5). 또한 자성 광합성 세포막 내의 광합성 기구 (photosynthetic apparatus)의 양을 확인하기 위해 흡광스펙트럼 (absorbance spectrum)을 분석한 결과, 막 융합 전후 광기구 세포막에 존재하는 주요 광기구인 B875와 B800-850의 농도가 동일하게 유지되는 것을 확인하였다 (도 6).

표 1

[0075]

시스트롬 최소배지	
첨가물	최종농도
KH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	8.5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.78 mM
L-Glutamic acid	0.67 mM
L-Aspartic acid	0.25 mM

Succinic acid	34 mM
Nitrilotriacetic acid	1.05 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.2 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.23 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	7 μM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.16 μM
EDTA	4.7 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	38 μM
MnSO ₄ ·H ₂ O	9.1 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6 μM
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.85 μM
H ₃ BO ₃	1.8 μM
니코틴산	8.1 μM
티아민염산염	1.5 μM
Biotin	41 nM

[0078] [실시예 4] 자성 광기구 세포막 소낭의 활성 측정

[0079] 본 실시예에서는 상기 실시예 3에서 제조한 자성 광기구 세포막 소낭의 ATP 합성 활성 (ATP synthase activity)을 측정함으로써 자성 입자가 광기구 세포막 소낭에 미치는 영향을 확인하고 광기구 세포막의 재사용 가능성을 검증한다.

[0080] 자성 광기구 세포막 소낭의 ATP 합성 활성 측정은 광반응 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM Na₂PO₄, 100 mM sucrose, 10 mM MgCl₂, 1 mM Adenosine diphosphate, 5 mM sodium ascorbate, 100 μl FeCl₃)에서 진행하였고, 자성 광기구 세포막 소낭의 농도는 1 μg bch a/ml로 하였다. 반응 조건은 15 Watts/m² 광도, 30℃의 온도로 하였다. 반응 산물인 ATP는 ATP 검출 키트 (Sigma, CAT. FLAA)를 이용하여 정량하였다. 자성 광기구 세포막 소낭의 활성을 자성 입자가 없는 광기구 세포막 소낭과 비교한 결과 (도 7) 활성에 변화가 없었고, 이는 광기구 세포막 소낭의 ATP 합성 활성의 최저 이론값인 1 nmole ATP/min/μg bch a 보다 높은 수치였다. 따라서, 자성 입자가 광기구 세포막 소낭의 활성에 영향을 미치지 않는 사실을 확인하였다.

[0081] 다음은, 반응 후 자성 광기구 세포막 소낭을 회수하고, 반응액을 교체하는 과정을 반복하면서 자성 광기구 세포막 소낭의 활성을 측정하였다. 1회의 반응 순환 (reaction cycle)은 2시간의 광반응과 6시간의 회수과정으로 구성된다. 광반응에서는 상기 광반응 버퍼에 자성 광기구 세포막 소낭을 넣고 ATP 합성 반응을 진행하고, 회수과정에서는 광반응이 끝난 반응액을 자석에 접촉시켜 자성 광기구 세포막 소낭을 광반응 버퍼와 분리한다. 회수과정은 4℃의 빛이 없는 조건에서 수행하며, 안정제로서 5 μg bch a/ml의 로도박터 스페로이데스 세포 파쇄액을 첨가해준다. 회수과정이 끝나면 광반응 버퍼를 제거하고, 다시 새로운 광반응 버퍼를 투입하여 다음 반응 순환을 진행한다. 상기 방법으로 자성 광기구 세포막 소낭의 반응을 진행한 결과 (도 8) 반응 순환이 지속되면서 약간의 활성 감소가 있었지만, 3회 반응 순환까지 ATP 합성 활성의 최저 이론값인 1 nmole ATP/min/μg bch a 이상으로 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 이를 통해 자성 광기구 세포막 소낭을 반응액에서 회수하여 재사용이 가능함을 확인하였다.

[0083] [실시예 5] 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 생합성 효소의 정제 및 고정화

[0084] 본 발명의 바람직한 구현예 중 하나로 자성 광기구 세포막 소낭을 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드 (NMN)를 생합성하는 효소와 조합하여 NMN을 생산하였다 (도 9). 이를 위해 NMN을 합성하는 3종류의 주요 효소와 2종류의 보조 효소의 정제 및 고정화 방법을 본 실시예에서 다룬다.

- [0085] NMN 합성에 필요한 3종류의 주요 효소에는 라이보카이네이즈 (ribokinase, RBKS), 라이보스-인산 파이로포스포 카이네이즈 (ribose-phosphate pyrophosphokinase 2, PRPS2), 니코틴아마이드 포스포라이보실트랜스퍼레이즈 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT)가 있으며, 라이보스 (D-ribose)와 니코틴아마이드 (nicotinamide)를 기질로하여 NMN을 합성하는 과정에서 각각 첫 번째, 두 번째, 세 번째 반응을 촉매 한다. 상기 세 주요 효소는 모두 인간 (*Homo sapiens*)의 유전체의 정보를 바탕으로 합성한 유전자에 의해 암호화 (coding)된 것으로, 본 실시예의 구현을 위해 해당 유전자의 합성 시 대장균의 코돈 (codon)으로 코돈 최적화 (codon-optimization)하고 대장균 내에서 효소를 발현한다. 코돈 최적화되어 합성된 RBKS, PRPS2, NAMPT의 유전자 서열은 각각 서열번호 5, 6, 7에 명시되어 있다. RBKS와 NAMPT는 pASK-IBA7 벡터 (IBA), PRPS2는 pASK-IBA3 벡터 (IBA)에 각각 클로닝하여 대장균을 형질전환 (transformation)한 후 세 주요 효소를 발현하는 대장균을 획득한다. 상기 벡터에 유전자를 클로닝할 경우 스트랩 태그 (strep-tag)가 효소에 결합된 상태로 발현되기 때문에 효소의 정제 과정은 스트랩 태그를 이용한다. 세 주요 효소를 발현하는 대장균을 각각 500 ml의 LB (Luria-Bertani media)에 진탕배양 (250 rpm, 37℃)하여 600 nm에서의 흡광도가 0.5가 되었을 때 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 무수 테트라사이클린 (anhydrotetracycline)을 첨가한다. 무수 테트라사이클린은 효소 발현의 유도제 (inducer)로서 작용한다. 이어, 세포를 30℃로 옮긴 후, 12시간 동안 진탕배양한 후 6000 g, 10분 간 원심분리 하여 균체를 획득한다. 균체를 스트랩 버퍼 (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl)로 1회 세척한 후, 동 버퍼 10 ml에 용해하여 세포 파쇄를 진행한다. 세포 파쇄는 초음파 파쇄로 진행하였고, 상기 실시예 3에서와 동일한 방법으로 진행하여 세포 파쇄액을 획득한다. 다음, 세포 파쇄액을 1 ml의 스트렙타비딘 수지 (streptavidin resin, IBA)와 혼합한다. 스트렙타비딘은 스트랩 태그와 강하게 결합하는 특성이 있는 단백질이다. 따라서 세포 파쇄액과 스트렙타비딘 수지를 혼합 시 스트렙타비딘 수지에 NMN 합성에 필요한 효소들이 결합하게 된다. 이렇게 효소가 결합된 스트렙타비딘 수지를 5 ml의 스트랩 버퍼로 3회 세척 후, 최종적으로 스트랩 버퍼에 용해하여 4℃에 보관한다. 이 상태의 효소는 스트렙타비딘 수지에 고정화된 상태이며, 원심분리 또는 거름망 (strainer)를 이용하여 쉽게 분리가 가능하다. 효소의 정량은 소량의 고정화 효소에 용출 버퍼 (스트랩 버퍼 + 2.5 mM desthiobiotin)를 첨가하여 스트렙타비딘 수지와 효소를 분리한 후, 로우리 방법 (Lowry method)을 이용한다. 정제된 효소의 정제도를 확인하기 위해 용출된 효소를 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS PAGE)을 이용하여 확인하였고 (도 10), 높은 순도로 정제됨을 확인하였다.
- [0086] NMN 반응에 필요한 2종류의 보조 효소는 조효소의 재순환을 위해 필요하며, 아데닐레이트 카이네이즈 (adenylate kinase)와 파이로포스페타이즈 (pyrophosphatase)가 있다 (도 9). 두 보조 효소는 모두 로도박터 스페로이데스의 유전체에서 유래한 것이다. 아데닐레이트 카이네이즈는 전방 프라이머 (forward primer)로 서열번호 1, 후방 프라이머 (reverse primer)로 서열번호 2를 이용하였고, 파이로포스페타이즈는 전방 프라이머로 서열번호 3, 후방 프라이머로 서열번호 4를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 로도박터 스페로이데스의 유전체로부터 유전자를 확보하였다. 확보한 유전자는 제한 효소 *Bsa* I 을 이용하여 pASK-IBA3 벡터에 클로닝하였다. 이후 두 효소의 정제 및 고정화 과정은 상기 주요 효소의 과정과 동일하다.
- [0087] 고정화된 효소들은 28 μm 의 공극 (pore size)을 가진 메쉬 (mesh) 안에 각각 밀봉하여 반응에 이용하였다. 이는 고정화된 효소들을 각각 독립적으로 조작하기 위함이다. 이하 고정화된 효소들은 모두 메쉬 안에 밀봉된 것을 의미한다.
- [0089] [실시예 6] 자성 광기구 세포막 소낭을 활용한 니코틴아마이드 모노뉴클레오타이드의 합성
- [0090] 본 실시예에서는 상기 실시예 3에서 제조한 자성 광기구 세포막 소낭과 상기 실시예 5에서 정제한 고정화된 NMN 합성 효소를 이용하여 NMN을 합성하는 방법에 관한 것을 다룬다. 전체 반응은 1당량의 라이보스와 1당량의 니코틴아마이드를 기질로 하고 아데노신 이인산 (adenosine diphosphate, ADP)를 조효소로 사용하여 최종산물인 NMN을 1당량을 획득하는 것 (도 9)이다. 각 주요 효소의 반응은 순차적이며, 독립적으로 이루어지며 여기서 자성 광기구 세포막 소낭의 역할은 효소에 의해 소모된 ATP를 재생하는 것이다 ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$). 보조 효소인 아데닐레이트 카이네이즈는 아데노신 일인산 (adenosine monophosphate, AMP)을 ADP로 재생하고, 파이로포스페타이즈는 주요 효소에서 반응에서 나오는 파이로포스페이트 (pyrophosphate, PP_i)를 무기 인산 (phosphate, P_i)으로 변환한다.
- [0091] 모든 반응은 NMN 버퍼 (10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.5, 2 mM sodium ascorbate, 1 mM MgCl_2 , 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin)에서 수행한다. 첫 번째 반응은 100 ml의 NMN 버퍼에 3 mM ADP, 1mM 라이보스를 첨가하고, 0.25 mg

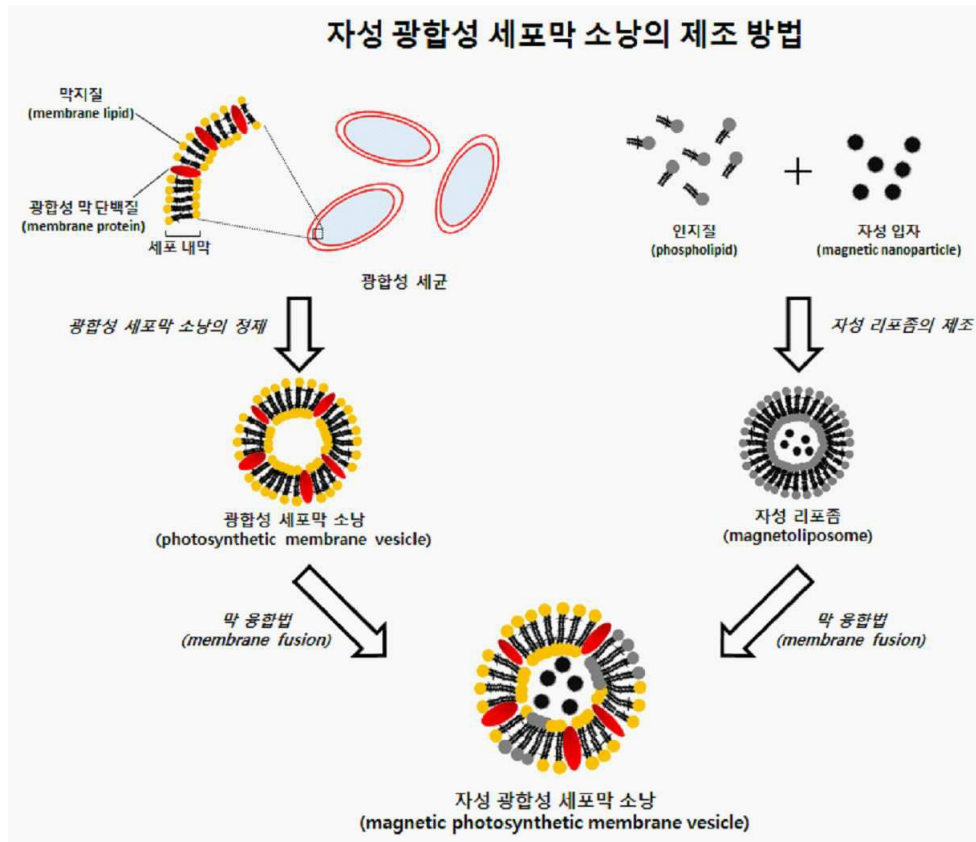
의 고정화된 RBKS와 60 mg bch *a*의 자성 광기구 세포막 소낭을 첨가하여 반응을 시작한다. 라이보스는 1시간에 1 mM씩 총 4회에 걸쳐 추가로 넣어주는데 이는 RBKS의 기질저해를 방지하기 위함이다. 첫 번째 반응은 30℃, 15 Watts/m² 광도 조건에서 6시간 동안 수행한다. 첫 번째 반응이 끝나면 자석으로 자성 광기구 세포막 소낭을 반응액에서 제거하고, 고정화된 RBKS를 제거 (메쉬 제거)한다. 두 번째 반응이 들어가기 전에 1 mg의 고정화된 아데닐레이트 카이네이즈를 첨가하여 2시간 반응하는데 이는 반응액 내의 잉여 ADP의 양을 감소시켜 두 번째 주요 효소인 PRPS2의 ADP에 의한 저해를 완화하기 위함이다. 다음, 아데닐레이트 카이네이즈를 제거한 후, 반응액에 1 mg의 고정화된 PRPS2를 첨가하고, 5 mM의 ATP를 추가로 넣어준다. 두 번째 반응은 자성 광기구 세포막 소낭을 이용하여 ATP를 재생하지 않는데 이는 자성 광기구 세포막 소낭의 기질인 ADP가 PRPS2를 저해하기 때문이다. 두 번째 반응을 빛이 없는 30℃에서 6시간 반응하고, 거름망을 이용하여 고정화된 PRPS2를 제거한다. 다음, 세 번째 반응은 반응액에 5 mM의 니코틴아마이드를 첨가 후, 1 mg의 파이로포스페테이즈, 1 mg의 고정화된 아데닐레이트 카이네이즈, 60 mg bch *a*의 자성 광기구 세포막 소낭 (첫 번째 반응에서 사용한 것 재사용), 4 mg의 고정화된 NAMPT를 첨가하고 4시간 동안 반응하면서 2시간에 한 번씩 샘플을 확보하여 생성된 NMN의 양을 확인한다. NMN의 정량 (Zhang et al. 2011. Anal. Biochem. 412: 18-25) 시 25 μ l의 샘플에 10 μ l의 20% 아세토펜 (acetophenone), 10 μ l의 2 M 수산화칼륨 (potassium hydroxide)을 첨가하고, 2분 간 얼음에 방치 한 후, 45 μ l의 88% 포름산 (formic acid)을 첨가한다. 이를 37℃에서 10분 간 반응하고 샘플의 형광 (fluorescence)을 측정한다. 형광 측정 시 382 nm의 여기 (excitation) 파장에서 방출 (emission) 되는 445 nm 파장의 형광을 측정한다.

[0092]

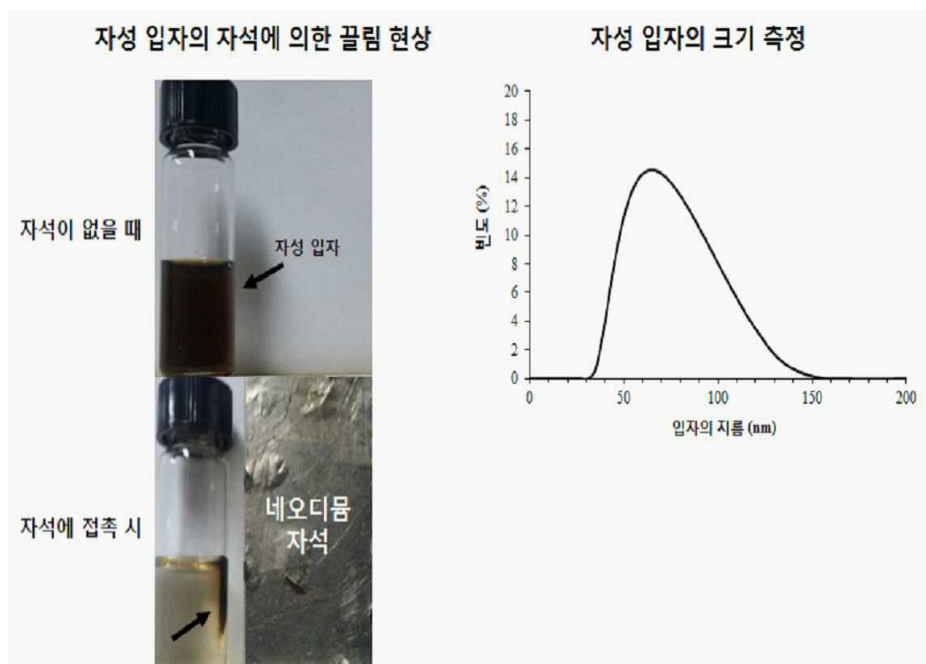
상기 반응으로 형성된 NMN의 양은 3.1 mM 이었으며, 이는 1.03 g/l 에 해당하는 생산량이었다 (도 11). 두 번째 반응에서 ATP의 첨가가 있었지만, 높은 활성의 아데닐레이트 카이네이즈와 높은 농도의 자성 광기구 세포막 소낭을 사용하여 NMN 생산을 위한 ATP 첨가량을 경감할 수 있었다. 결과적으로, 본 실시예에서는 자성 광기구 세포막 소낭을 실제 효소반응에 응용할 수 있음을 NMN 합성을 통해 확인할 수 있었다. 당업자는 본 실시예를 응용하여 계속되는 효소의 재사용을 통해 투자비용 대비 산물 생산량을 더욱 증진시킬 수 있을 것이다.

도면

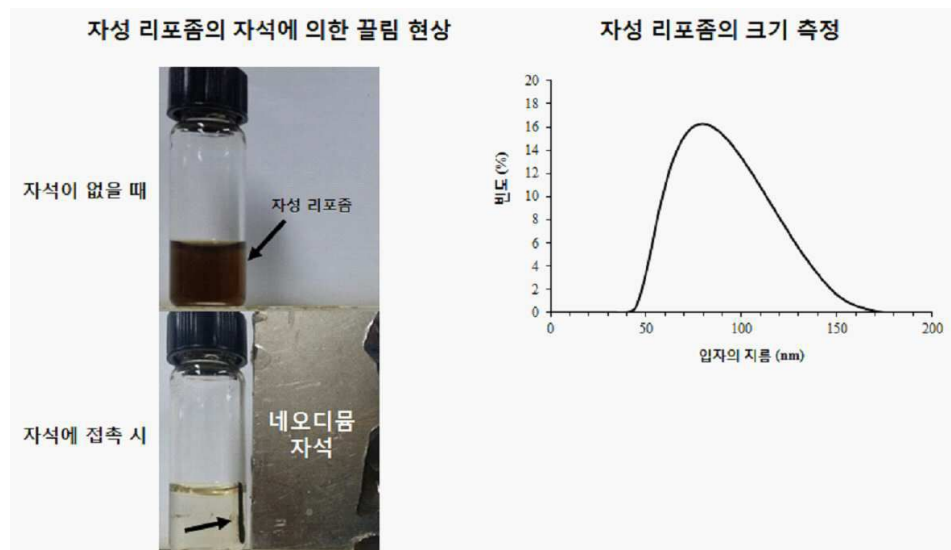
도면1



도면2



도면3



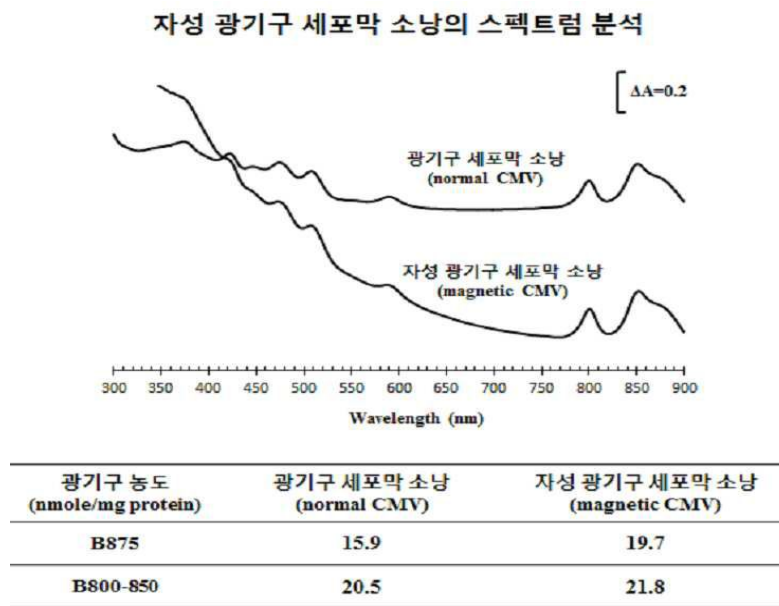
도면4



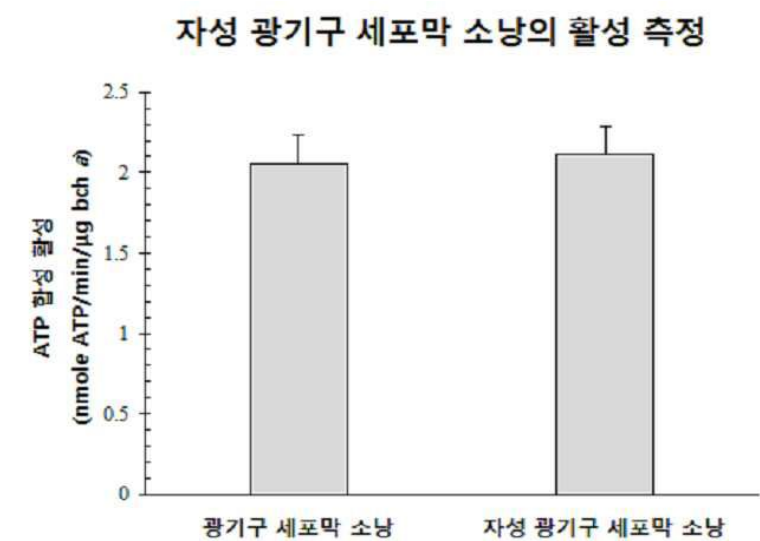
도면5



도면6

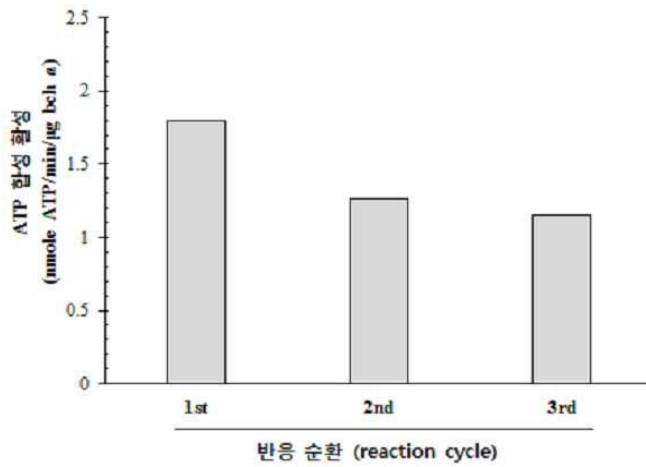


도면7



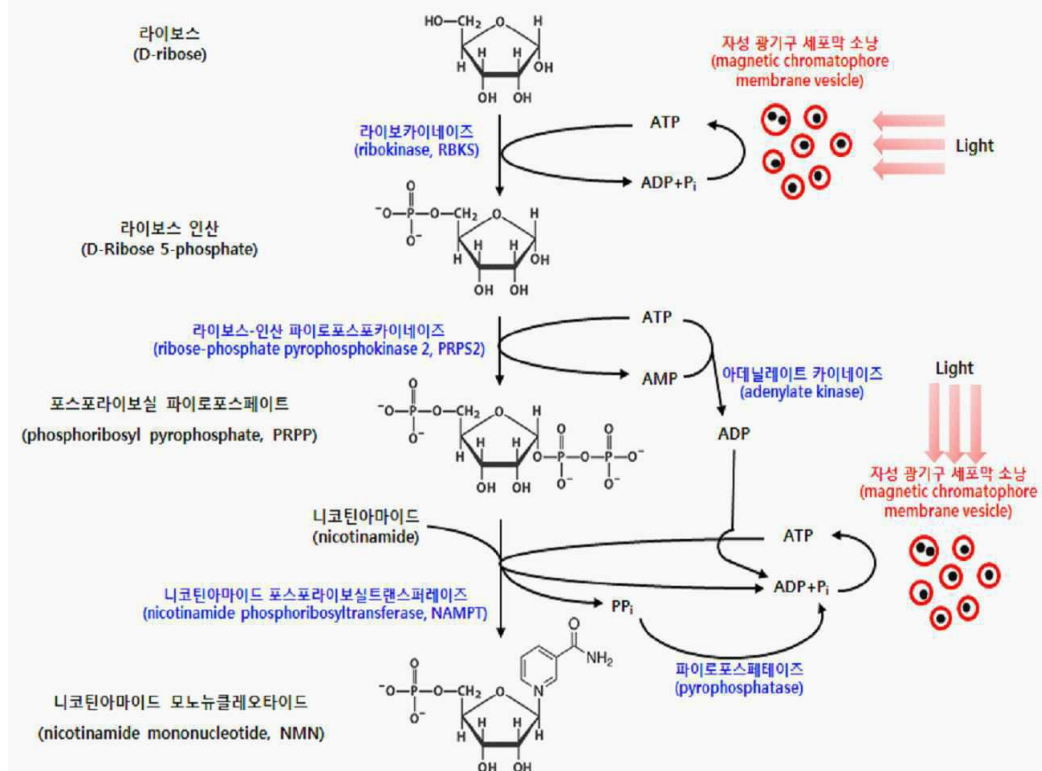
도면8

순환 반응에 따른 자성 광기구 세포막 소낭의 활성

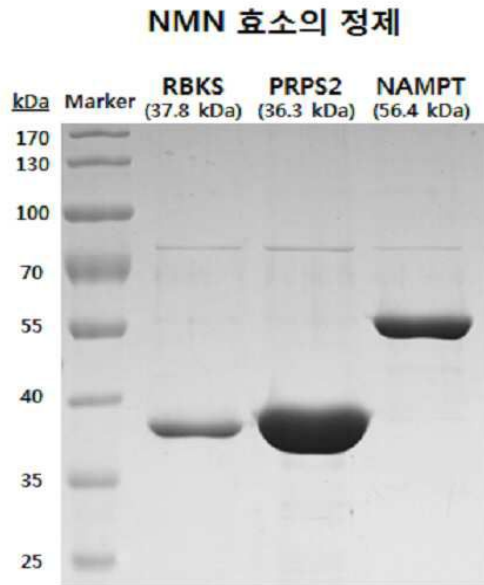


도면9

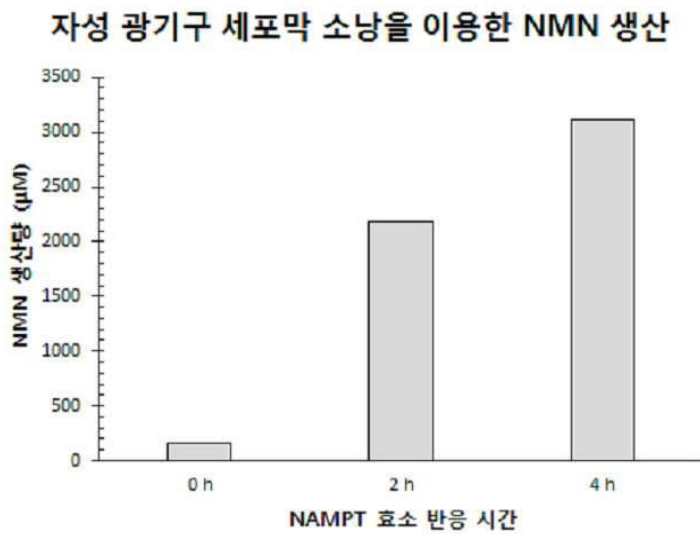
자성 광합성 세포막 소낭과 효소를 이용한 NMN의 합성



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> The magnetic photosynthetic membrane vesicle and the method for production of nicotinamide mononucleotide using magnetic photosynthetic membrane vesicle
- <130> P17U10C0469
- <160> 7
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 32

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> adenylate kinase forward primer
 <400> 1
 aaaaaaggtc tcaaatgctg cgcgaggcca ag 32

<210> 2
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> adenylate kinase reverse primer
 <400> 2
 aaaaaaggtc tcagcgctcc cgcgcttgctc aagaac 36

<210> 3
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pyrophosphatase forward primer
 <400> 3
 aaaaaaggtc tcaaatgacc gtctctgaac gg 32

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pyrophosphatase reverse primer
 <400> 4
 aaaaaaggtc tcagcgctga gaaggccggg cggggc 36

<210> 5
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ribokinase
 <400> 5
 atggcagcgt caggggagcc ccagcgtcaa tggcaagaag aagttgcgac ggtggtagtg 60

gtgggctcgt gcatgaccga cctggttagt cttacttctc gtttgccaaa aacgggagaa	120
accattcatg gacataagtt ttttattggt tttggtggga aaggtagcaa tcaatgtgtc	180
caagctgcac ggcttgggtc aatgacgtcc atggtgtgta aggttggaag agattcgttt	240
ggcaatgatt acatagaaaa cttaaacag aatgatatat ctacagaatt tacatatcag	300
actaaagatg ctgctacagg aactgcaagc ataatcgta acaatgaagg ccagaatc	360
attgtaattg tagctggagc aaacttactg ctgaatcagg aggacctgcg cgcagcagcc	420
aacgttatta gcagagcaaa agtcatgggtc tgccagctag aaattacccc ggcaacatct	480
ttggaagccc ttacaatggc cgcgcgtagt ggtgtgaaaa ccctgttcaa tccagccctt	540
gcgattgcgg atctggaccc ccagttctat accctctcag atgttttctg ctgcaacgaa	600
agtgaggcgg agatattaac tggcctcacg gttggcagcg cagcagatgc tggggaggct	660
gcgttagttt tattgaaacg aggttgtcag gttgtaatca ttaccttagg ggctgaaggt	720
tgtgtggtgc tgtcacagac agaacctgaa ccgaagcaca tcccagaccga gaaagtcaag	780
gctgtagata ccacgggtgc aggtgacagc tttgtaggtg ctctggcctt ctacctggca	840
tattatccaa atctgtcctt ggaagacatg ctcaaccgtt ccaattttat cgcagcagtt	900
agtgtccagg ccgccggaac tcaatcatct tacccttaca aaaaagatct tccgcttact	960
ctgttttaa	969
<210> 6	
<211> 957	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ribose-phosphate pyrophosphokinase	
<400> 6	
atgccaaca tagtgctgtt ctcaggcagc tctcatcagg acctgagtca gcgcgtggcc	60
gaccgccttg gtctggagct gggcaaagtc gttacgaaga aatttagcaa ccaggaaacc	120
tcagttgaaa ttggtgaaag cgttcgcggt gaagatgttt acatcatcca gagtggctgt	180
ggggaaatta atgacaacct gatggaatta ctattatga tcaatgcctg taaaatagca	240
tcgtcaagca gagtaactgc cgtcatcccg tgcctcccg atgcgcgaca agataaaaag	300
gacaagagtc gtgcgccaat ttctgcaaaa cttgtggcca atatgttatc ggtggctggc	360
gcggatcata tcatcaccat ggacctgcat gcttctcaga tccagggtatt ttttgatatt	420
cctgtggata atttatatgc ggagcccgcg gtcttgcaat ggattcgga aaacatagca	480
gagtgaaga attgtatcat tgtttcacct gatgcagggg gtgcaaaaag ggttacttcc	540

attgcagacc gcttgaatgt tgaatttgct ttgatccaca aagagcgtaa aaaagcgaac	600
gaagtggatc ggatggtcct ggtgggcat gtaaaggatc gtgtggccat cctcgttgat	660
gatatggctg atacttgctg taccatctgc catgctgccg ataaactgct gtccgctgga	720
gccaccaaag tgiatgcaat ccttacgcat gggatttttt ctggaccagc tatttccaga	780
ataaataatg ccgcgttga ggcagtagta gtcacaaaca caatcccga agaggacaaa	840
atgaaacact gcacgaagat tcagttatc gacatttcga tgattttggc ggaagcaatt	900
cgtcgcacac acaatggatg atccgtaagc tacttattca gtcatgtccc gctataa	957
<210> 7	
<211> 1476	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nicotinamide phosphoribosyltransferase	
<400> 7	
atgaatccgg cggccgaagc cgagttcaac atcctgctgg ccaccgactc gtacaaggtt	60
actcattata agcaatatcc gcccaatacc agcaaagttt acagctattt tgaatgccgt	120
gaaaagaaga ccgaaaactc caaattacgt aaggtcaagt atgaggagac ggtattttat	180
gggctgcagt acattcttaa caagtactta aaaggtaaag tagtaaccaa agaaaaaatc	240
caggaagcca aagatgtgta caaagaacac ttccaagatg atgtgttcaa tgaaaagggt	300
tggaaactaca tcctggagaa gtatgatggt catcttccga ttgaaataaa agctgtgcct	360
gagggttttgc tcatcccccg cggaaatggt ctctttacgg ttgaaaacac agatccagag	420
tgctactggc ttaccaattg gattgagacg attctggttc agtcttggtg tcctatcaca	480
gtggccacaa attcgcggga gcagaagaaa atcttggcca agtacttgct tgaaaccagt	540
ggtaacttag atggctcgtg atataaactg catgatttcg gctacagagg cgtctcttcc	600
caggaaactg ctggcatagg cgcactctgt catctcggtt actttaaagg tacggacaca	660
gtggcggggc ttgcgtgat caaaaaatat tacggaacta aagaccggt tccaggtat	720
agtgtcccgg cggcagagca cagtaccata acagcttggg ggaaagacca tgaaaaggat	780
gcttttgaac acattgtaac tcagttttca agcgtgcctg tatcagtggc cagcgatagc	840
tatgatattt ataatgcgtg cgagaagatt tggggtgaag acctacgcca tcttatagtg	900
tcacgtagta ccagggcgcc gctgataatc cgtcctgatt ctggtaatcc gcttgacacg	960
gtgttaaagg ttttggagat tttaggcaag aagtttcttg tcaactgaaa ctcaaagggc	1020
tataagcttc tgccaccgta tctccggtt attcaaggag acggtgtaga tattaatacc	1080

ttacaagaga ttgtggaagg catgaaacaa aaaatgtgga gtattgaaaa tatcgcttt	1140
ggatccggtg gaggtttgct acagaagttg acacgggatc tcttgaattg ttctttcaag	1200
tgtagctatg ttgtaacgaa tggccttggg attaacgtct ttaaagacct agttgccgat	1260
cccaacaaaa ggtcgaaaaa ggggcgatta tctttacatc gcacgccagc agggaaat	1320
gtgacactgg aggagggaaa aggagacctg gaagaatatg gtcaggacct gctgcacact	1380
gttttcaaga acggcaaggt gacaaaatcg tattcattcg atgaaataag aaaaaatgcc	1440
cagctgaata ttgaactgga ggcagcacac cat	1476