



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0133718
(43) 공개일자 2024년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/06 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) C12Q 1/26 (2006.01)	(71) 출원인 기꼬만 가부시킴가이샤 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지
(52) CPC특허분류 C12N 9/0022 (2013.01) C12N 15/63 (2013.01)	(72) 발명자 쿠제 케이타로 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬만 가부 시킴가이샤
(21) 출원번호 10-2024-7023922	이치야나기 아츠시 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬만 가부 시킴가이샤
(22) 출원일자(국제) 2023년01월18일 심사청구일자 없음	히즈메 타츠야 일본국 지바켄 노다시 노다 250반지 기꼬만 가부 시킴가이샤
(85) 번역문제출일자 2024년07월16일	(74) 대리인 리엔목특허법인
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/001336	
(87) 국제공개번호 WO 2023/140286 국제공개일자 2023년07월27일	
(30) 우선권주장 JP-P-2022-005869 2022년01월18일 일본(JP)	

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 발현 글루타민산 옥시다아제**

(57) 요약

프로테아제 처리를 필요로 하지 않는 글루타민산 옥시다아제를 제조하는 것.

소정의 아미노산 서열을 결실시킨 글루타민산 옥시다아제 변이체.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/26 (2013.01)

C12Y 104/03011 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

결실 영역을 가진 글루타민산 옥시다아제 변이체로서,

야생형 글루타민산 옥시다아제의 γ 쇄 영역과 β 쇄 영역 사이에 존재하는 γ β 간 영역의 전부 또는 일부를 결실시키고,

야생형 글루타민산 옥시다아제의 γ 쇄 영역의 카르복시 말단측의 아미노산을 1 ~ 10 아미노산 결실시키거나 혹은 결실시키지 않고,

야생형 글루타민산 옥시다아제의 β 쇄 영역의 아미노 말단측의 아미노산을 1 ~ 4 아미노산 결실시키거나 혹은 결실시키지 않고,

결실 영역이 1개의 연속된 결실 영역이며, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진, 글루타민산 옥시다아제 변이체.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

31 ~ 54의 연속된 아미노산을 결실시킨, 글루타민산 옥시다아제 변이체.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

결실 영역의 C 말단이 서열 번호 1의 510위에 대응하는 위치, 508위에 대응하는 위치, 또는 507위에 대응하는 위치인, 글루타민산 옥시다아제 변이체.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 전부 또는 일부를 결실시키지 않은 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 열안정성이 향상되어 있는 변이체.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 서열 번호 1의 459위 ~ 466위에 대응하는 영역까지의 아미노산 서열을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 열안정성이 향상되어 있는 변이체.

청구항 6

열안정성의 향상이 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리의 열처리 후의 잔존 활성에 의해 평가되는 것이며,

아미노산 서열을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제의 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 110% 이상인, 청구항 4에 기재된 변이체, 또는

아미노산 서열을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제의 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 110% 이상인, 청구항 5에 기재된 변이체.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 12 또는 서열 번호 13의 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지고, 또한 아미노산 서열을 결실시키고 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진 변이체.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

추가로

서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치, 및

서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치

로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 위치에서 서열 번호 1 및 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 치환을 가지고,

치환 전의 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 아미노산 치환 후의 변이체의 열안정성이 향상되어 있는 변이체.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신인,

서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌인,

서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는, 또는

서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택되는 변이체.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

서열 번호 69의 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지고,

또한 아미노산 서열을 결실시키고, 또한

서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치,

서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치, 및

서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치,

로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 위치에서 서열 번호 58의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 치환을 가지고, 해당 아미노산 치환이 청구항 9에 기재된 아미노산 치환 중 어느 하나이며, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진 변이체.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 더 결실시킨 글루타민산 옥시다아제 변이체.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 포함한 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

청구항 13에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함한 벡터.

청구항 15

청구항 14에 기재된 벡터를 포함한 숙주 세포.

청구항 16

청구항 15에 기재된 숙주 세포를 배양하여 청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다제 변이체를 생산하는 공정 및,

생산된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 취득하는 공정
을 포함하는, 글루타민산 옥시다아제 변이체의 제조 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체, 또는 청구항 12에 기재된 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트와 글루타민산을 포함한 시료를 접촉시켜 해당 시료에 포함되는 글루타민산을 산화시키는 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서,
글루타민산을 검출하는 방법.

청구항 19

아미노산 치환을 포함한 글루타민산 옥시다아제 변이체로서, 치환 전의 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 아미노산 치환 후의 글루타민산 옥시다아제 변이체의 열안정성이 향상되어 있으며,

(i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬했을 때에 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 및 615위로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 치환되어 있는,

(ii) 상기 (i)에서, 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 및 615위에 대응하는 위치 이외의 위치에서의 1 또는 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어진,

(iii) 상기 (i) 혹은 (ii)에서, 해당 글루타민산 옥시다아제 변이체의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진, 혹은

(iv) 상기 (i) 또는 (ii)에서, 해당 글루타민산 옥시다아제 변이체의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 아미노산의 배열 동일성을 가지고, 해당 글루타민산 옥시다아제 변이체에서의, 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)인 것

으로 이루어진 군에서 선택되는, 글루타민산 옥시다아제 변이체.

청구항 20

청구항 19에 있어서,
서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신인,

서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌인,

서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,

서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는 또는

서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택되는

글루타민산 옥시다제 변이체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 발현 글루타민산 옥시다아제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] L-글루타민산 측정은 옛날에는 L-글루타민산 탈탄산 효소 및 L-글루타민산 탈수소 산소를 이용하여 이루어져 왔다. 그러나 탈탄산 효소의 측정계에서 이산화탄소의 측정에 품이 많이 들고, 탈수소 산소의 측정계에서는 조효소(補酵素)의 흡광도 변화를 측정하기 때문에 모두 번잡하였다.

[0003] 그 후, 방선균의 고체 배양에 의해 L-글루타민산에만 작용하는 L-글루타민산 옥시다아제가 보고되었다(비특허 문헌 1). L-글루타민산 옥시다아제는 α 쇄, γ 쇄 및 β 쇄를 가진 1개의 폴리펩티드로서 코딩되어 있으며 2개의 폴리펩티드가 호모 2량체를 형성한다. 이 호모 2량체가 프로테아제에 의해 절단되어 성숙형이 된다. 성숙형은 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 로 구성되는 헥테로 6량체 구조이다.

[0004] 재조합 발현된 호모 2량체는 L-글루타민산 옥시다아제로서의 활성이 약해 원래의 방선균 L-글루타민산 옥시다아제와 비교하여 기질 친화성이 뒤떨어지고 열에도 불안정하였다. 이 재조합 발현된 호모 2량체 효소를 프로테아제 처리하면 원래의 방선균 L-글루타민산 옥시다아제와 동일한 구조가 되어 효소 화학적 성질도 동등해졌다(비특허 문헌 2). 이 전구체를 유전자 재조합 대장균을 이용하여 대량 생산하여 프로테아제 처리하는 방법이 공업적으로 이용되고 있다.

[0005] 특허 문헌 1은 L-글루타민산 옥시다아제 변이체를 기재하였다. 특허 문헌 1에는 제작되는 L-글루타민산 옥시다아제 변이체의 열안정성에 관한 기재는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) [특허 문헌 1] 국제 공개 제2021/193598호 팜플렛

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) [비특허 문헌 1] Kusakabe H et al., Agric. Biol. Chem., 47, 1323-1328(1983)

(비특허문헌 0002) [비특허 문헌 2] Arima J et al., J. Biochem., 134, 805-812(2003)

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0008] 특정 실시 형태에서, 본 개시내용은 간편하게 L-글루타민산 옥시다아제를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 특정 실시 형태에서, 본 개시내용은 L-글루타민산 옥시다아제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 특정 실시 형태에서, 본 개시내용은 서열 번호 58로 높은 배열 동일성을 가진 L-글루타민산 옥시다아제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] L-글루타민산 옥시다아제를 재조합 발현할 경우, 특히 산업 용도로 대규모로 L-글루타민산 옥시다아제를 재조합 발현할 경우 L-글루타민산 옥시다아제를 성숙형으로 하기 위해서는 종래의 공업적 제조법에서는 프로테아제에서의 처리가 필요하였다. 그러나 프로테아제 처리 공정은 번잡하여 고비용화를 초래하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 상기 과제 해결을 위해 예의 연구를 거듭한 결과, 일례로서 유전자 조작된 방선균 유래의 글루타민산 옥시다아제를 이용함으로써 상기 과제를 적어도 부분적으로 해결할 수 있다는 것을 발견하여 이것을 일 실시 형태로서 포함한 본 발명을 완성하였다. 또한, 본 발명자들은 특정 변이를 가진 글루타민산 옥시다아제를 이용함으로써 상기 과제를 적어도 부분적으로 해결할 수 있다는 것을 발견하여 이것을 일 실시 형태로서 포함한 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 개시내용은 이하의 실시 형태를 제공한다.

[0012] [1] 결실 영역을 가진 글루타민산 옥시다아제 변이체로서,

[0013] 야생형 글루타민산 옥시다아제의 γ 쇄 영역과 β 쇄 영역 사이에 존재하는 γ β 간 영역의 전부 또는 일부를 결실시키고,

[0014] 야생형 글루타민산 옥시다아제의 γ 쇄 영역의 카르복시 말단측의 아미노산을 1 ~ 10 아미노산 결실시키거나 혹은 결실시키지 않고,

[0015] 야생형 글루타민산 옥시다아제의 β 쇄 영역의 아미노 말단측의 아미노산을 1 ~ 4 아미노산 결실시키거나 혹은 결실시키지 않고,

[0016] 결실 영역이 1개의 연속된 결실 영역이며, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진, 글루타민산 옥시다아제 변이체.

[0017] [2] 31 ~ 54의 연속된 아미노산을 결실시키는 실시 형태 1에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체.

[0018] [3] 결실 영역의 C 말단이 서열 번호 1의 510위에 대응하는 위치, 508위에 대응하는 위치, 또는 507위에 대응하는 위치인, 실시 형태 1에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체.

[0019] [4] 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 전부 또는 일부를 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 열안정성이 향상되어 있는 실시 형태 1에 기재된 변이체.

[0020] [5] 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 서열 번호 1의 459위 ~ 466위에 대응하는 영역까지의 아미노산 서열을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 열안정성이 향

상되어 있는 실시 형태 4에 기재된 변이체.

- [0021] [6] 열안정성의 향상이 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리의 열처리 후의 잔존 활성에 의해 평가되는 것이며,
- [0022] 아미노산 서열을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제의 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 110% 이상인, 실시 형태 4에 기재된 변이체, 또는
- [0023] 아미노산 서열을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제의 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 110% 이상인, 실시 형태 5에 기재된 변이체.
- [0024] [7] 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 12 또는 서열 번호 13의 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지고, 또한 아미노산 서열을 결실시키고 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진, 실시 형태 1 ~ 6 중 어느 한 항에 기재된 변이체.
- [0025] [8] 또한
- [0026] 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치,
- [0027] 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치,
- [0028] 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치,
- [0029] 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치,
- [0030] 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치,
- [0031] 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치,
- [0032] 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치,
- [0033] 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치,
- [0034] 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치,
- [0035] 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치,
- [0036] 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치,
- [0037] 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치, 및
- [0038] 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치
- [0039] 로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 위치에서, 서열 번호 1 및 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 치환을 가지고,
- [0040] 치환 전의 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 아미노산 치환 후의 변이체의 열안정성이 향상되어 있는 실시 형태 1 ~ 7 중 어느 한 항에 기재된 변이체.
- [0041] [9] 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신인,
- [0042] 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0043] 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0044] 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0045] 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0046] 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루

어진 군에서 선택되는,

- [0047] 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0048] 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0049] 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌인,
- [0050] 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0051] 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0052] 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는 또는
- [0053] 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0054] 실시 형태 8에 기재된 변이체.
- [0055] [10] 서열 번호 69의 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지고,
- [0056] 또한 아미노산 서열을 결실시키고, 또한
- [0057] 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치,
- [0058] 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치,
- [0059] 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치,
- [0060] 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치,
- [0061] 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치,
- [0062] 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치,
- [0063] 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치,
- [0064] 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치,
- [0065] 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치,
- [0066] 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치,
- [0067] 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치,
- [0068] 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치, 및
- [0069] 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치
- [0070] 로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 위치에서 서열 번호 58의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 치환을 가지고, 해당 아미노산 치환이 실시 형태 9에 기재된 아미노산 치환 중 어느 하나이며, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진, 실시 형태 9에 기재된 변이체.
- [0071] [11] 서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 더 결실시키는 실시 형태 1 ~ 10 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체.
- [0072] [12] 실시 형태 1 ~ 10 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 포함한 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트.
- [0073] [13] 실시 형태 1 ~ 11 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0074] [14] 실시 형태 13에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함한 벡터.

- [0075] [15] 실시 형태 14에 기재된 백터를 포함한, 숙주 세포.
- [0076] [16] 실시 형태 15에 기재된 숙주 세포를 배양하여 실시 형태 1 ~ 11 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 생산하는 공정 및,
- [0077] 생산된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 취득하는 공정
- [0078] 을 포함한, 글루타민산 옥시다아제 변이체의 제조 방법.
- [0079] [17] 실시 형태 1 ~ 11 중 어느 한 항에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체, 또는 실시 형태 12에 기재된 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트와 글루타민산을 포함한 시료를 접촉시켜 해당 시료에 포함되는 글루타민산을 산화시키는 방법.
- [0080] [18] 글루타민산을 검출하는 실시 형태 17에 기재된 방법.
- [0081] [19] 아미노산 치환을 포함한 글루타민산 옥시다아제 변이체로서, 치환 전의 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 아미노산 치환 후의 글루타민산 옥시다아제 변이체의 열안정성이 향상되어 있고,
- [0082] (i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬하였을 때에 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 및 615위로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 치환되어 있는,
- [0083] (ii) 상기 (i)에서, 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 및 615위에 대응하는 위치 이외의 위치에서의 1 또는 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어지는,
- [0084] (iii) 상기 (i) 혹은 (ii)에서, 해당 글루타민산 옥시다아제 변이체의 전장(全長) 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는, 혹은
- [0085] (iv) 상기 (i) 또는 (ii)에서, 해당 글루타민산 옥시다아제 변이체의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 아미노산의 배열 동일성을 가지고, 해당 글루타민산 옥시다아제 변이체에서의, 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)인
- [0086] 것으로 이루어진 군에서 선택되는 글루타민산 옥시다아제 변이체.
- [0087] [20] 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신인,
- [0088] 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0089] 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0090] 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0091] 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0092] 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0093] 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0094] 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0095] 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌인,
- [0096] 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진

군에서 선택되는,

- [0097] 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는,
- [0098] 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는, 또는
- [0099] 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치로의 아미노산 치환이 류신, 발린 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택되는
- [0100] 실시 형태 19에 기재된 글루타민산 옥시다아제 변이체.
- [0101] 본 명세서에서는 본원의 우선권의 기초가 되는 일본 특허 출원 번호2022-005869호의 개시 내용을 포함한다.

발명의 효과

- [0102] 특정 실시 형태에서, 본 발명의 효과로서 프로테아제에서의 처리를 필요로 하지 않는 재조합 발현 글루타민산 옥시다아제를 얻을 수 있다. 특정 실시 형태에서, 열안정성이 향상된 글루타민산 옥시다아제를 얻을 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0103] L-글루타민산 옥시다아제는 α 쇄, γ 쇄 및 β 쇄를 가진 1개의 폴리펩티드로서 GLOD 유전자에 의해 코딩되어 있으며, 2개의 폴리펩티드가 호모 2량체를 형성한다. 천연에서는 이 호모 2량체가 프로테아제에 의해 절단되어 성숙형이 된다. 성숙형은 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 로 구성되는 헤테로 6량체 구조이다.
- [0104] 본 명세서에서 GLOD의 경우 특별히 언급하지 않는 한 이것은 L-글루타민산 옥시다아제를 말하는 것으로 한다. L-글루타민산 옥시다아제는 EC 1.4.3.11로 분류되는 산화 환원 효소이며, 이하의 화학 반응을 촉매한다.
- [0105] [화학식 1]
- [0106] $L\text{-글루타민산} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{옥소글루탈산} + NH_3 + H_2O_2$
- [0107] GLOD는 플라빈아데닌디뉴클레오티드(FAD)를 조효소로 한다. FAD를 조효소로 하는 산화 환원 효소는 FAD 결합 모티프 서열, 예를 들면 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly 모티프를 가진 것이 알려져 있다(식중, Xaa는 임의의 아미노산). 예를 들면 서열 번호 1을 기준 서열로 하면 서열 번호 1의 51위에서 56위의 아미노산 서열 "Gly-Ala-Gly-Ile-Ala-Gly"는 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly가 되는 FAD 결합 모티프 서열에 해당한다. 어느 실시 형태에서, 본 발명의 변이체에 관하여 서열 번호 1을 기준으로 하여 51위, 53위 및 56위에 각각 대응하는 위치의 Gly는 아미노산 치환되지 않아도 된다. 어느 실시 형태에서 L-글루타민산 옥시다아제 서열 번호 1의 51위, 53위 및 56위의 Gly는 아미노산 치환되지 않는다.
- [0108] GLOD는 아르기닌잔기에 의해 기질인 글루타민산을 인식하는 것이 알려져 있다. 예를 들면 서열 번호 1을 기준으로 하여 291위의 Arg(R)은 글루타민산의 인식에 중요한 위치이다. 어느 실시 형태에서, 본 개시내용의 변이체에 관하여 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치는 아미노산 치환되지 않아도 된다. 어느 실시 형태에서, 본 발명의 변이체에 관하여 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 Arg(R)인 경우 해당 아미노산은 치환되지 않는다.
- [0109] (기준 서열)
- [0110] 본 명세서에서는 편의상, 서열 번호 1을 기준 서열로 하여 GLOD의 각 위치를 규정한다. 서열 번호 1은 Streptomyces sp. X-119-6 유래 글루타민산 옥시다아제(StGLOD)의 아미노산 서열이며, 다만 천연 서열에서의 N 말단측의 분비 시그널 서열(MTTDTARRHTGAER)은 제거되어 있다. 또한, 서열 번호 1에서는 야생형에서 분비 시그널 서열이 절단된 직후의 α 쇄 영역의 제1 아미노산을 야생형 Ala에서 Met로 변경한다. 이 Met의 위치를 본 명세서에서는 서열 번호 1의 1위에 대응하는 위치로 한다.
- [0111] (GLOD의 각 서브유닛에 대해)
- [0112] 본 명세서에서 편의상, 서열 번호 1을 기준 서열로 하여 GLOD의 α 쇄를 1위에서 375위까지의 375 아미노산잔기로 구성되는 폴리펩티드로 한다(ANEM · · · EGEF). 본 명세서에서 편의상, 서열 번호 1을 기준 서열로 하여 GLOD의 γ 쇄를 376위에서 466위까지의 91아미노산으로 구성되는 폴리펩티드로 한다(YAAT · · · AEAA). 본 명세서에서

편의상, 서열 번호 1을 기준 서열로 하여 GLOD의 β 쇄를 507위에서 669위까지의 163아미노산으로 구성되는 폴리펩티드로 한다. 서열 번호 1을 기준 서열로 하여 467위에서 506위까지는 천연에서는 프로테아제로 제거되는 영역이다(LALP...SELR). 또한, 서열 번호 1을 기준 서열로 하여 670위에서 687위의 C 말단 서열(RRGAAAATEPMREEALTS)은 프로테아제에 의해 제거되는 영역이다.

[0113] (아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체)

[0114] 본 발명자들은 GLOD의 아미노산 서열 중 프로테아제로 제거되는 영역이 GLOD의 기능 발현을 방해하는 것은 아닌지 고려하여 γ 영역 및 β 영역 사이의 아미노산 서열을 결실시킨 GLOD 변이체 서열을 제작하고 이것을 발현시켰다. 프로테아제로 제거되는 영역을 결실시킬 때, 어느 실시 형태에서는 변이체로부터 γ 영역의 마지막 8아미노산(GEDDAEAA)도 제거하였다. 또한, β 쇄의 최초의 아미노산잔기(G)도 변이체에서는 제거하였다. 따라서, 제작한 변이체의 γ 쇄 영역- β 쇄 영역 사이의 경계는 γ 쇄의 C 말단(QQW)과 β 쇄의 N 말단(GVRP)을 연결한, γ 쇄 영역...QQW-GVRP... β 쇄 영역이라는 서열로 하였다. 그 결과, GLOD 활성을 나타내는 변이체를 얻을 수 있었다. 이 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체는 활성의 발현을 위해 프로테아제에서의 처리를 필요로 하지 않는다. 어느 실시 형태에서, 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체를 재조합 발현할 경우에 프로테아제의 처리를 행하지 않는다.

[0115] 나아가 본 발명자들은 개발을 계속하여 상기 경계 서열(γ 쇄 영역...QQW-GVRP... β 쇄 영역)을 다양한 아미노산 서열과 치환한 연결 영역 치환형 변이체를 제작하였다. 구체적으로는 상기 경계 서열(γ 쇄 영역...QQW-GVRP... β 쇄 영역)을 개변한 변이체로서 서열 번호 59의 아미노산 서열을 가진 변이체 M7GLOD Δ 49C, 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가진 변이체 StGLOD Δ 49Ai, 또는 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가진 변이체 StGLOD Δ 49C를 제작하고 재조합 발현을 실시하여 변이체의 활성을 확인하였다. 그 결과, 놀랍게도 모든 변이체가 GLOD 활성을 나타냈다. 이러한 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체도 또한 활성의 발현을 위해 프로테아제에서의 처리를 필요로 하지 않는다.

[0116] 서열 번호 59의 아미노산 서열을 가진 변이체 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 아미노산 서열을 가진 M7GLOD의 456위 ~ 511위의 56아미노산을 결실시키고, 그 위치에 M7GLOD의 서열과는 다른 7아미노산(QDAAEPP)을 삽입했다고 간주할 수도 있다. 달리 말하면, M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 456위 ~ 504위를 결실시키고, 505위 ~ 511위가 QDAAEPP로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 457위 ~ 505위를 결실시키고, 456위가 Q로 치환되고 506위 ~ 511위가 DAAEPP로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 458위 ~ 506위를 결실시키고, 456 ~ 457위가 QD로 치환되고 507위 ~ 511위가 AAEP로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 459위 ~ 507위를 결실시키고, 456 ~ 458위가 QDA로 치환되고 508위 ~ 511위가 AEPP로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 460위 ~ 508위를 결실시키고, 456 ~ 459위가 QDAA로 치환되고 509위 ~ 511위가 EPP로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 461위 ~ 509위를 결실시키고, 456 ~ 460위가 QDAE로 치환되고 510위 ~ 511위가 PP로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 462위 ~ 510위를 결실시키고, 456 ~ 461위가 QDAAEP로 치환되고 511위가 P로 치환되어 있다. 또는 M7GLOD Δ 49C는 서열 번호 58의 462위 ~ 510위를 결실시키고, 456 ~ 462위가 QDAAEPP로 치환되어 있다.

[0117] 서열 번호 12의 아미노산 서열을 가진 변이체 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가진 StGLOD의 456위 ~ 511위의 56아미노산을 결실시키고, 그 위치에 StGLOD의 서열과는 다른 7아미노산(RKLDKTE)을 삽입했다고 간주할 수도 있다. 달리 말하면, StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 456위 ~ 504위를 결실시키고, 505위 ~ 511위가 RKLDKTE로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 457위 ~ 505위를 결실시키고, 456위가 R로 치환되고 506위 ~ 511위가 KLDKTE로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 458위 ~ 506위를 결실시키고, 456 ~ 457위가 RK로 치환되고 507위 ~ 511위가 LDKTE로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 459위 ~ 507위를 결실시키고, 456 ~ 458위가 RKL로 치환되고 508위 ~ 511위가 DKTE로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 460위 ~ 508위를 결실시키고, 456 ~ 459위가 RKLD로 치환되고 509위 ~ 511위가 KTE로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 461위 ~ 509위를 결실시키고, 456 ~ 460위가 RKLDK로 치환되고 510위 ~ 511위가 TE로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 462위 ~ 510위를 결실시키고, 456 ~ 461위가 RKLDKT로 치환되고 511위가 E로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49Ai는 서열 번호 1의 462위 ~ 510위를 결실시키고, 456 ~ 462위가 RKLDKTE로 치환되어 있다.

[0118] 서열 번호 13의 아미노산 서열을 가진 변이체 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가진 StGLOD의 456위 ~ 511위의 56아미노산을 결실시키고, 그 위치에 StGLOD의 서열과는 다른 7아미노산(QDAAEPP)을 삽입했다고 간주할 수도 있다. 달리 말하면, StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 456위 ~ 504위를 결실시키고, 505위 ~ 511위가

QDAEPP로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 457위 ~ 505위를 결실시키고, 456위가 Q로 치환되고 506위 ~ 511위가 DAAEPP로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 458위 ~ 506위를 결실시키고, 456 ~ 457위가 QD로 치환되고 507위 ~ 511위가 AAEP프로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 459위 ~ 507위를 결실시키고, 456 ~ 458위가 QDA로 치환되고 508위 ~ 511위가 AEPP로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 460위 ~ 508위를 결실시키고, 456 ~ 459위가 QDAA로 치환되고 509위 ~ 511위가 EPP로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 461위 ~ 509위를 결실시키고, 456 ~ 460위가 QDAE로 치환되고 510위 ~ 511위가 PP로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 462위 ~ 510위를 결실시키고, 456 ~ 461위가 QDAEP로 치환되고 511위가 P로 치환되어 있다. 또는 StGLOD Δ 49C는 서열 번호 1의 462위 ~ 510위를 결실시키고, 456 ~ 462위가 QDAEPP로 치환되어 있다.

- [0119] 또한 본 발명자들은 개발을 계속하여, 결실시키는 영역의 길이를 바꾸면서 복수의 변이체를 제작하였다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은
- [0120] 결실 영역을 가진 글루타민산 옥시다아제 변이체로서,
- [0121] 야생형 글루타민산 옥시다아제의 γ 쇄 영역과 β 쇄 영역 사이에 존재하는 γ β 간 영역의 전부 또는 일부를 결실시키고,
- [0122] 야생형 글루타민산 옥시다아제의 γ 쇄 영역의 카르복시 말단측의 아미노산을 1 ~ 10 아미노산 결실시키거나 혹은 결실시키지 않고,
- [0123] 야생형 글루타민산 옥시다아제의 β 쇄 영역의 아미노 말단측의 아미노산을 1 ~ 4 아미노산 결실시키거나 혹은 결실시키지 않고,
- [0124] 결실 영역이 1개의 연속된 결실 영역이며, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진, 글루타민산 옥시다아제 변이체를 제공한다.
- [0125] 또한 본 발명자들은 개발을 계속하여, 결실시키는 영역의 길이가 다른 변이체를 다수 제작하였다. 어느 실시 형태에서 결실 변이체는,
- [0126] 서열 번호 1의 457위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 54),
- [0127] 서열 번호 1의 458위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 53),
- [0128] 서열 번호 1의 459위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 52),
- [0129] 서열 번호 1의 460위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 51),
- [0130] 서열 번호 1의 461위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 50),
- [0131] 서열 번호 1의 462위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 49),
- [0132] 서열 번호 1의 463위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 48),
- [0133] 서열 번호 1의 464위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 47),
- [0134] 서열 번호 1의 465위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 46),
- [0135] 서열 번호 1의 466위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 45),
- [0136] 서열 번호 1의 467위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 44),
- [0137] 서열 번호 1의 468위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 43),
- [0138] 서열 번호 1의 469위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 42),
- [0139] 서열 번호 1의 470위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 41),
- [0140] 서열 번호 1의 471위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 40),
- [0141] 서열 번호 1의 472위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 39),
- [0142] 서열 번호 1의 473위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 38),
- [0143] 서열 번호 1의 474위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(d Δ 37),

- [0144] 서열 번호 1의 475위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(dΔ36),
- [0145] 서열 번호 1의 476위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(dΔ35),
- [0146] 서열 번호 1의 477위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(dΔ34),
- [0147] 서열 번호 1의 478위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(dΔ33),
- [0148] 서열 번호 1의 479위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(dΔ32) 또는
- [0149] 서열 번호 1의 480위 ~ 510위에 대응하는 위치를 결실시킨다(dΔ31).
- [0150] 다른 실시 형태에서 결실 변이체는
- [0151] 서열 번호 1의 455위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ54),
- [0152] 서열 번호 1의 456위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ53),
- [0153] 서열 번호 1의 457위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ52),
- [0154] 서열 번호 1의 458위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ51),
- [0155] 서열 번호 1의 459위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ50),
- [0156] 서열 번호 1의 460위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ49),
- [0157] 서열 번호 1의 461위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ48),
- [0158] 서열 번호 1의 462위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ47),
- [0159] 서열 번호 1의 463위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ46),
- [0160] 서열 번호 1의 464위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ45),
- [0161] 서열 번호 1의 465위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ44),
- [0162] 서열 번호 1의 466위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ43),
- [0163] 서열 번호 1의 467위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ42),
- [0164] 서열 번호 1의 468위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ41),
- [0165] 서열 번호 1의 469위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ40),
- [0166] 서열 번호 1의 470위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ39),
- [0167] 서열 번호 1의 471위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ38),
- [0168] 서열 번호 1의 472위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ37),
- [0169] 서열 번호 1의 473위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ36),
- [0170] 서열 번호 1의 474위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ35),
- [0171] 서열 번호 1의 475위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ34),
- [0172] 서열 번호 1의 476위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ33),
- [0173] 서열 번호 1의 477위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ32) 또는
- [0174] 서열 번호 1의 478위 ~ 508위에 대응하는 위치를 결실시킨다(DΔ31).
- [0175] 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 58을 기준으로 하여,
- [0176] RWGEDDAEAAALTPESVRNLP TGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR
- [0177] 을 결실시킨 변이체를 제공한다. 이 결실 변이체를 본 명세서에서 편의상, M7GLOD-dΔ54라고 하는 경우가 있다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 58을 기준으로 하여 쇄길이가 다른 이하의 결실 영역을 결실시킨 변이체를 제공한다.

표 1

RWGEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR (M7GLOD-d 154)
WGEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR (M7GLOD-d 153)
GEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR (M7GLOD-d 152)
EDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR (M7GLOD-d 151)
DDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR (M7GLOD-d 150)
DAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR (M7GLOD-d 149)
AEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 148)
EAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 147)
AALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 146)
ALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 145)
LTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 144)
TPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 143)
VPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 142)
PESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 141)
ESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 140)
SVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 139)
VRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 138)
RNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 137)
NLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 136)
LPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 135)
PTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 134)
TGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 133)
GLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 132)
LLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR(M7GLOD-d 131)

[0178]

[0179] 다른 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 58을 기준으로 하여 채길이가 다른 이하의 결실 영역을 결실시킨 변이체를 제공한다.

표 2

YQRWGEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG (M7GLOD-D 154)
QRWGEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG (M7GLOD-D 153)
RWGEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG (M7GLOD-D 152)
WGEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG (M7GLOD-D 151)
GEDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 150)
EDDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 149)
DDAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 148)
DAEAAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 147)
AEAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 146)
EAALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 145)
AALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 144)
ALTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 143)
LTPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 142)
TVESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 141)
VPESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 140)
PESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 139)
ESVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 138)
SVRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 137)
VRNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 136)
RNLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 135)
NLPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 134)
LPTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 133)
PTGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 132)
TGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGG(M7GLOD-D 131)

[0180]

[0181]

어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 1을 기준으로 하여 쇄길이가 다른 이하의 결실 영역을 결실시킨 변이체를 제공한다.

표 3

QWGEDDAEAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 54)
WGEDDAEAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 53)
GEDDAEAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 52)
EDDAEAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 51)
DDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 50)
DAEAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 49)
AEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 48)
EAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 47)
AALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 46)
ALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 45)
LALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 44)
ALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 43)
LPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 42)
PQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 41)
QSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 40)
SVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 39)
VRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 38)
RNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 37)
NLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 36)
LPTGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 35)
PTGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 34)
TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 33)
GLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 32)
LLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGGVR (StGLOD-d 31)

[0182]

[0183]

다른 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 1을 기준으로 하여 채길이가 다른 이하의 결실 영역을 결실시킨 변이체를 제공한다.

표 4

YQQWGEDDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₅₄)
QQWGEDDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₅₃)
QWGEDDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₅₂)
WGEDDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₅₁)
GEDDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₅₀)
EDDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₉)
DDAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₈)
DAEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₇)
AEAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₆)
EAAALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₅)
AALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₄)
ALALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₃)
LALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₂)
ALPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₁)
LPQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₄₀)
PQSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₉)
QSVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₈)
SVRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₇)
VRNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₆)
RNLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₅)
NLP TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₄)
LPTGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₃)
PTGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₂)
TGLLGAHPSVDES RIGEEQVEYYRNSEL RGG (StGLOD-D ₁₃₁)

[0184]

[0185]

상기 변이체는 본 명세서에서 말하는 31 ~ 54의 연속된 아미노산을 결실시키는 글루타민산 옥시다아제 변이체에 포함되는 것으로 한다.

[0186]

어느 실시 형태에서 결실 영역의 C 말단은 서열 번호 1의 512위, 511위, 510위, 509위, 508위, 507위, 506위, 또는 505위에 대응하는 위치로 할 수 있다. 어느 실시 형태에서 결실 영역의 C 말단은 서열 번호 1의 510위, 508위, 또는 507위에 대응하는 위치로 할 수 있다. 편의상 본 명세서에서 결실 영역의 C 말단의 위치를 기점이 라고 하는 경우가 있다. 어느 실시 형태에서 결실 변이체는 기점에서부터 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 또는 54의 연속된 아미노산이 결실되어도 된다. 기점은 결실되기 때문에 글루타민산 옥시다아제 결실 변이체는 기점이 없다. 또한, 글루타민산 옥시다아제 결실 변이체는 기점에서부터 31 ~ 54의 연속된 아미노산을 가지지 않는다(즉, 기점 아미노산을 포함한 31 ~ 54 아미노산을 가지지 않는다).

[0187]

특정 이론에 구속되는 것을 바라는 것은 아니지만, 천연에서는 글루타민산 옥시다아제의 γ - β 간 영역은 프로테아제에 의해 제거된다(excised). 따라서, 해당 제거 영역(excised region)을 재조합 발현 글루타민산 옥시다아제로부터 미리 결실시켜도 활성을 가진 글루타민산 옥시다아제를 동일하게 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 이때, 제거 영역은 성숙 단백질에는 존재하지 않기 때문에 제거 영역이 활성 단백질에서 역할을 담당할 가능성은 낮다고 생각된다. 따라서, 제거 영역의 아미노산 서열에 대해 긴 서열을 결실시킨 결실 변이체와 짧은 서열을 결실시킨 결실 변이체 모두에 대해 활성이 확인된 경우(예를 들면 $\Delta 54$ 변이체와 $\Delta 31$ 변이체에 대해 활성이 확

인된 경우), 중간 길이의 영역을 결실시킨 변이체(예를 들면 $\Delta 53 \sim \Delta 32$ 변이체)에 대해서도 동일하게 활성을 나타낼 개연성이 높다고 합리적으로 생각할 수 있다.

- [0188] 변이체를 제작한 바, GLOD 활성이 확인되었다. 당업자라면 본 명세서의 개시에 기초하여 유사한 결실 변이체를 제작하고, 그 활성 유무를 루틴한 시험에 의해 확인할 수 있다. 활성이 없는 결실 변이체는 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진 글루타민산 옥시다아제 변이체로부터 제외된다.
- [0189] 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역을 결실시키고, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체를 제공한다. 특정 실시 형태에서 변이체는 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 더 결실시킬 수 있다.
- [0190] 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역을 결실시키고, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가지고, 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역의 전부 또는 일부를 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 열안정성이 향상되어 있는 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체를 제공한다. 특정 실시 형태에서 변이체는 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 더 결실시킬 수 있다.
- [0191] 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역을 결실시키고, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가지고, 서열 번호 1의 459위 ~ 466위에 대응하는 영역을 결실시키지 않는 글루타민산 옥시다아제와 비교하여 열안정성이 향상되어 있는 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체를 제공한다. 특정 실시 형태에서 변이체는 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 더 결실시킬 수 있다.
- [0192] 어느 실시 형태에서 결실 변이체는 서열 번호 58에 기초하여 제작할 수 있다. 어느 실시 형태에서 결실 변이체는 서열 번호 58과 90% 이상, 예를 들면 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 가진 글루타민산 옥시다아제에 기초하여 제작할 수 있다.
- [0193] 다른 실시 형태에서 결실 변이체는 서열 번호 1에 기초하여 제작할 수 있다. 어느 실시 형태에서 결실 변이체는 서열 번호 1과 90% 이상, 예를 들면 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 가진 글루타민산 옥시다아제에 기초하여 제작할 수 있다.
- [0194] 다른 실시 형태에서 결실 변이체는 공지의 글루타민산 옥시다아제 또는 이것과 90% 이상, 예를 들면 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 가진 글루타민산 옥시다아제에 기초하여 제작할 수 있다.
- [0195] (열안정성 향상 효과)
- [0196] 나아가 이들 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체에 대해 열처리를 실시하자 놀랍게도 모든 변이체가 아미노산 서열을 결실시키기 전의 각각 대응하는 GLOD 서열과 비교하여 잔존 활성이 향상되었다. 잔존 활성이란 냉장(예를 들면 4℃) 보존되어 있는 GLOD 시료의 활성을 1로 했을 때의, 열처리 후의 GLOD 시료의 활성 값을 나타낸다. 잔존 활성은 0 이상 1 이하의 값이 될 수 있지만, 열처리에 의해 GLOD가 활성화된 경우에는 1을 초과하는 값이 될 수 있다.
- [0197] 본 명세서에서, StGLOD Δ 49C, M7GLOD Δ 49C 및 StGLOD Δ 49Ai와 같은 γ 쇄와 β 쇄 사이의 아미노산 서열을 결실시킨 변이체 및 표 1-4에 기재된 변이체를 γ 쇄- β 쇄간 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체, 혹은 단순히 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체라고 하는 경우가 있다. 또한, 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체를 "GLOD Δ "라고 표기하는 경우가 있다. 또한, 결실시킨 아미노산잔기의 수XX를 GLOD Δ 뒤에 기재하는 경우가 있다(GLOD Δ XX). 예를 들면 49아미노산잔기를 결실시킨 GLOD 변이체를 GLOD Δ 49로 표기하는 경우가 있다. 또한, 서열 번호 1의 510위에 대응하는 위치를 기점으로 하는 결실 변이체를 "GLOD-d Δ "라고 표기하는 경우가 있다. 예를 들면, 서열 번호 58에 기초하며, 서열 번호 1의 510위에 대응하는 위치를 기점으로 하여 54아미노산이 결실되어 있는 변이체를 M7GLOD-d Δ 54로 표기하는 경우가 있다. 또한, 서열 번호 1의 508위에 대응하는 위치를 기점으로 하는 결실 변이체를 "GLOD-D Δ 라고 표기하는 경우가 있다. 예를 들면, 서열 번호 58에 기초하며, 서열 번호 1의 508위에 대응하는 위치를 기점으로 하여 54아미노산이 결실되어 있는 변이체를 M7GLOD-D Δ 54로 표기하는 경우가 있다. 본 명세서에서 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체라고 하는 경우, 여기에는 StGLOD 및 M7GLOD뿐 아니라, 이들의 개변체나 그들과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진 GLOD나 다른 유래의 GLOD로서, 서열 번호 1이나 서열 번호 12, 13의 결실 영역에 대응하는 영역이 결실되어 있는 GLOD 변이체도 포함되는 것으로 한다.
- [0198] 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체는 개변 전의 GLOD의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 한 경우, 개변 후의 GLOD 변이체의 열처리 후의 잔존 활성이 예를 들면 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이

상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상, 150% 이상, 200% 이상, 250% 이상, 300% 이상, 350% 이상, 예를 들면 400% 이상 향상될 수 있다. 여기서 잔존 활성이 10% 향상된다는 것은 개변 전의 GLOD의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 개변 후의 GLOD 변이체의 열처리 후의 잔존 활성이 110%인 것을 말한다.

[0199] 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체의 열안정성은 45℃에서 30분 혹은 35분의 열처리, 또는 65℃에서 30분의 열처리의 열처리 후의 잔존 활성에 의해 평가할 수 있다. 어느 실시 형태에서 서열 번호 1의 소정의 영역에 대응하는 영역을 결실시키는 GLODΔ는 해당 소정의 영역을 결실시키지 않는 GLOD의 45℃에서 30분 또는 35분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 105% 이상, 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 150% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 예를 들면 400% 이상일 수 있다. 결실되는 소정의 영역은 C 말단측으로서 서열 번호 1의 510위, 508위, 또는 507위에 대응하는 위치를 기점으로 할 수 있고, (기점을 포함하여) 31 ~ 54 연속 아미노산을 가질 수 있다. 어느 실시 형태에서 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역을 결실시키는 GLODΔ는 서열 번호 1의 459위 ~ 507위의 전부 또는 일부를 결실시키지 않는 GLOD의 45℃에서 30분 또는 35분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 105% 이상, 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 150% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 예를 들면 400% 이상일 수 있다. 다른 실시 형태에서 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역을 결실시키는 GLODΔ는 서열 번호 1의 459위 ~ 466위의 아미노산 서열을 결실시키지 않는 GLOD의 45℃에서 30분 또는 35분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 105% 이상, 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 150% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 예를 들면 400% 이상일 수 있다. 특정 실시 형태에서, 변이체는 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 더 결실시킬 수 있다. 다른 실시 형태에서 서열 번호 1의 457위 ~ 510위에 대응하는 영역의 전부 또는 일부(예를 들면 서열 번호 1의 510위, 508위, 혹은 507위에 대응하는 위치를 C 말단측의 기점으로 하여 31 ~ 54의 연속된 아미노산으로 이루어진 영역)를 결실시키고 있는 GLODΔ는 해당 결실이 없는 GLOD의 65℃에서 30분의 열처리 후의 잔존 활성을 100%로 했을 때에 변이체의 잔존 활성이 105% 이상, 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 150% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 예를 들면 400% 이상일 수 있다. 특정 실시 형태에서 변이체는 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 더 결실시킬 수 있다.

[0200] 본 발명자들은 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역, 또는 서열 번호 1의 510위, 508위, 혹은 507위에 대응하는 위치를 C 말단측의 기점으로 하여 31 ~ 54의 연속된 아미노산으로 이루어진 소정의 영역을 결실시킨 GLODΔ 변이체가 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있는 것을 발견했다. 당업자라면 이러한 지견에 기초하여 90% 이상의 서열 동일성을 가진 다른 GLOD나 다른 유래의 GLOD에 대해서도 대응하는 영역 아미노산 서열을 결실시킨 Δ 변이체는 동일하게 열안정성이 향상되어 각종 반응에 이용할 수 있다고 이해한다. 서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역에 대해서도 동일하다.

[0201] 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 서열 번호 59, 12, 또는 13의 아미노산 서열과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지고, 또한 소정의 영역을 결실시키고, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진 GLODΔ를 제공한다. 소정의 영역은 서열 번호 1의 510위, 508위, 혹은 507위에 대응하는 위치를 C 말단측의 기점으로 하여 31 ~ 54의 연속된 아미노산으로 이루어진 영역일 수 있다. 이 GLODΔ는 서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 더 결여시킬 수 있다.

[0202] GLOD는 자연계에 널리 분포하고 있으며, 미생물이나 동물 혹은 식물 기원의 효소를 탐색함으로써 얻을 수 있다. 미생물에서는 예를 들면, 방선균, 사상균, 효모, 혹은 세균 등으로부터 얻을 수 있다. 본 명세서에서 GLOD의 유래는 특별히 한정되지는 않으며, 예를 들면 스트렙토마이세스속, 예를 들면 *Streptomyces* sp. X-119-6, 및 *Streptomyces* sp. MOE7, 아조토박터속, *Embleya*속, *Kitasatospora*속, *Saccharothrix*속, *Alloactinosynnema*속, *Streptoalloteichus*속, *Actinoalloteichus*속, *Catenulispora*속, *Nannocystis*속, *Actinobacteria*속, *Actinophytocola*속, *Sphaerisporangium*속, *Microbispora*속, *Streptosporangium*속, *Phytohabitans*속, *Haliangium*속, *Archangium*속, *Streptacidiphilus*속, *Saccharothrix*속 또는 *Trichoderma*속의 미생물 유래인 GLOD를 의미하고, 특별히 언급이 없는 한 야생형 및 그 개변체 모두를 포함한다.

[0203] (GLOD를 코딩하는 유전자의 취득)

[0204] GLOD를 코딩하는 유전자(이하, 단순히 "GLOD 유전자"라고도 한다)를 얻으려면 통상 일반적으로 이용되고 있는 유전자의 클로닝 방법이 이용된다. 예를 들면, GLOD 생산 능력을 가진 미생물균체나 다양한 세포로부터 통상의 방법(常法)에 의해 염색체 DNA 또는 mRNA를 추출할 수 있다. 또한 mRNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성할 수 있다. 이와 같이 하여 얻어진 염색체 DNA 또는 cDNA를 이용하여 염색체 DNA 또는 cDNA의 라이브러리를 제작할 수 있다.

- [0205] 다음으로, 상기 GLOD의 아미노산 서열에 기초하여 적당한 프로브 DNA를 합성하고, 이것을 이용하여 염색체 DNA 또는 cDNA의 라이브러리로부터 GLOD 유전자를 선발하는 방법, 혹은 상기 아미노산 서열에 기초하여 적당한 프라이머 DNA를 제작하고 5' RACE법이나 3' RACE법 등의 적당한 폴리메라아제 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR법)에 의해 GLOD를 코딩하는 목적의 유전자 단편을 포함한 DNA를 증폭시키고, 이들 DNA 단편을 연결시켜 목적으로 하는 GLOD 유전자의 전장(全長)을 포함한 DNA를 얻을 수 있다.
- [0206] GLOD 유전자의 일례로서 *Streptomyces* sp. X-119-6 유래의 GLOD 유전자, 및 *Streptomyces* sp.MOE7 유래의 GLOD 유전자를 들 수 있지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0207] GLOD 유전자는 벡터에 연결되어 있어도 된다. 벡터로서는 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드 등의 임의의 벡터를 들 수 있으며, 예를 들면, pBluescriptII SK+(Stratagene사 제)를 들 수 있다. 플라스미드는 통상의 방법에 따라 취득할 수 있다. 예를 들면 GenElute Plasmid Miniprep Kit(Sigma-Aldrich사 제)를 이용함으로써 GLOD 유전자를 포함한 플라스미드를 추출, 정제할 수 있다. 얻어진 GLOD 유전자를 조작하여 GLOD 변이체 유전자를 제작하거나 정제 효소를 얻을 수 있다.
- [0208] (GLOD 유전자의 변이 처리)
- [0209] GLOD 유전자의 변이 처리는 기획하는 변이 형태에 따른 공지의 임의의 방법으로 실시할 수 있다. 즉, GLOD 유전자 혹은 해당 유전자가 편입된 재조합체 DNA와 변이원(變異原)이 되는 약제를 접촉·작용시키는 방법; 자외선 조사법; 유전자 공학적 수법; 또는 단백질 공학적 수법을 구사하는 방법 등을 폭넓게 이용할 수 있다.
- [0210] 상기 변이 처리에 이용되는 변이원이 되는 약제로서는 예를 들면, 히드록실아민, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소 구아니딘, 아질산, 아황산, 히드라진, 포름산, 혹은 5-브로모우라실 등을 들 수 있다.
- [0211] 이 접촉·작용의 제조조건은 이용하는 약제의 종류 등에 따른 조건을 채용할 수 있고, 실제로 원하는 변이를 GLOD 유전자에서 야기할 수 있다면 특별히 한정되지는 않는다. 통상, 바람직하게는 0.5 ~ 12M의 상기 약제 농도에서 20 ~ 80℃의 반응 온도하에서 10분간 이상, 바람직하게는 10 ~ 180분간 접촉·작용시킴으로써 원하는 변이를 야기할 수 있다. 자외선 조사를 실시하는 경우에도 상기와 같이 통상의 방법에 따라 실시할 수 있다.
- [0212] 단백질 공학적 수법을 구사하는 방법으로서 일반적으로 Site-Specific Mutagenesis로서 알려진 수법을 이용할 수 있다. 예를 들면, Kramer법(Nucleic Acids Res., 12, 9441-9456 (1984)), Eckstein법(Nucleic Acids Res., 13, 8749-8764 (1985); Nucleic Acids Res., 13, 8765 (1985); Nucleic Acids Res., 14, 9679 (1986)), Kunkel 법(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82,488-492 (1985)) 등을 들 수 있다.
- [0213] 아울러 상기 유전자 개변법 외에 유기 합성법 또는 효소 합성법에 의해 직접 원하는 개변 GLOD 유전자를 합성할 수도 있다.
- [0214] GLOD 유전자의 염기 서열은 예를 들면 멀티캐필러리 DNA 해석 시스템 Applied Biosystems 3730x1DNA analyzer(Thermo Fisher Scientific사 제)에 의해 확인할 수 있다.
- [0215] (형질 전환·형질 도입)
- [0216] GLOD 유전자는 통상의 방법에 의해 박테리오파지, 코스미드, 또는 원핵 세포 혹은 진핵 세포의 형질 전환에 이용되는 플라스미드 등의 벡터에 편입시킬 수 있다. 이것을 이용하여 각각의 벡터에 대응하는 숙주를, 통상의 방법에 의해 형질 전환 또는 형질 도입할 수 있다.
- [0217] 어느 실시 형태에서 GLOD를 원핵세포, 예를 들면 *Escherichia*속의 미생물, 예를 들면 대장균(*Escherichia coli*), *Brevibacillus*속의 미생물, 예를 들면 *Brevibacillus choshinensis*, *Corynebacterium*속의 미생물, 예를 들면 *Corynebacterium glutamicum*, *Streptomyces*속의 미생물, 예를 들면 *Streptomyces violaceoruber*를 이용하여 발현할 수 있다. 대장균의 숙주로서는 각종 대장균주, 예를 들면 K-12주, JM109주, DH5 α 주, BL21주, JM109(DE3)주, DH5 α (DE3)주, BL21(DE3)주, TG1주, 1100주, W3110주, C600주 등을 들 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 숙주를 형질 전환하거나 또는 숙주에 형질 도입하여 GLOD 유전자가 도입된 숙주 세포(형질 전환체)를 얻는다. 이러한 숙주 세포에 재조합 벡터를 이입하는 방법으로서 예를 들면 숙주 세포가 대장균(*Escherichia coli*)에 속한 미생물인 경우에는 칼슘 이온의 존재하에서 재조합 DNA의 이입을 실시하는 방법 등을 채용할 수 있는 전기천공법을 더 이용해도 된다. 나아가 시판되는 competent cell(예를 들면 ECOS Competent 대장균 BL21(DE3); 닛폰진 제)를 이용해도 된다. 또한 GLOD 유전자는 발현 숙주에 따라 코돈 최적화된 것일 수 있다.

- [0218] 어느 실시 형태에서 GLOD를 진핵 세포를 이용하여 발현할 수 있다. 진핵 숙주 세포의 일례로서는 효모를 들 수 있다. 효모로 분류되는 미생물로서는 예를 들면, 자이코사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*)속, 시조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 피키아(*Pichia*)속, 칸디다(*Candida*)속 등에 속한 효모를 들 수 있다. 삽입 유전자에는 형질 전환된 세포를 선택할 수 있도록 하기 위한 마커 유전자가 포함되어 있어도 된다. 마커 유전자로서는 예를 들면, URA3, TRP1와 같은 숙주의 영양 요구성을 상보하는 유전자 등을 들 수 있다. 또한, 삽입 유전자는 숙주 세포 중에서 목적 유전자를 발현할 수 있는 프로모터 또는 기타 제어 서열(예를 들면, 인핸서 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열 등)을 포함하는 것이 바람직하다. 프로모터로서는 구체적으로는 예를 들면, GAL1 프로모터, ADH1 프로모터 등을 들 수 있다. 효모로의 형질 전환 방법으로는 공지의 방법, 예를 들면, 아세트산리튬을 이용하는 방법(*Methods Mol. Cell. Biol.*, 5, 255-269(1995))이나 전기 천공(*J Microbiol Methods* 55 (2003) 481-484) 등을 바람직하게 이용할 수 있지만, 이로 한정되지는 않으며, 스페로플라스트법이나 글라스비드법 등을 포함한 각종 임의의 수법을 이용하여 형질 전환을 실시하면 된다.
- [0219] 또한, 예를 들면, 진핵 숙주 세포의 다른 예로서는 아스페르길루스(*Aspergillus*)속이나 트리코테르마(*Trichoderma*)속과 같은 곰팡이 세포(사상균을 포함한)를 들 수 있다. 곰팡이 세포의 형질 전환체의 제작 방법은 특별히 한정되지는 않으며, 예를 들면, 통상의 방법에 따라 GLOD를 코딩하는 유전자가 발현하는 형태로 숙주 사상균에 삽입하는 방법을 들 수 있다. 구체적으로는 GLOD를 코딩하는 유전자를 발현 유도 프로모터 및 터미네이터 사이에 삽입한 DNA 구조체(construct)를 제작하고, 그 다음에 GLOD를 코딩하는 유전자를 포함한 DNA 구조체로 숙주 사상균을 형질 전환함으로써 GLOD를 코딩하는 유전자를 과잉 발현하는 형질 전환체를 얻을 수 있다.
- [0220] GLOD를 코딩하는 유전자가 발현하는 형태로 숙주 사상균에 삽입하는 방법은 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면, 상동 재조합을 이용함으로써 숙주 생물의 염색체상에 직접적으로 삽입하는 수법; 플라스미드 벡터상에 연결함으로써 숙주 사상균 내에 도입하는 수법 등을 들 수 있다.
- [0221] 상동 재조합을 이용하는 방법에서는 염색체상의 재조합 부위의 상류 영역 및 하류 영역과 상동인 서열 사이에 DNA 구조체를 연결하여 숙주 사상균의 게놈 중에 삽입할 수 있다. 자신의 고(高)발현 프로모터 제어하에서 숙주 사상균 내에서 과잉 발현함으로써 셀프 클로닝에 의한 형질 전환체를 얻을 수 있다. 고발현 프로모터는 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면, 번역 신장 인자인 TEF1 유전자(*tef1*)의 프로모터 영역, α-아밀라아제 유전자(*amy*)의 프로모터 영역, 알칼리프로테아제 유전자(*alp*) 프로모터 영역 등을 들 수 있다.
- [0222] 벡터를 이용하는 방법에서는 DNA 구조체를 통상의 방법에 의해 사상균의 형질 전환에 이용되는 플라스미드 벡터에 편입시키고, 대응하는 숙주 사상균을 통상의 방법에 의해 형질 전환할 수 있다.
- [0223] 그러한 바람직한 벡터-숙주계로서는 숙주 사상균 중에서 GLOD를 생산시킬 수 있는 계라면 특별히 한정되지는 않으며, 예를 들면, pUC19 및 사상균의 계, pSTA14(*Mol. Gen. Genet.* 218, 99-104, 1989) 및 사상균의 계 등을 들 수 있다.
- [0224] DNA 구조체는 숙주 사상균의 염색체에 도입하여 이용하는 것이 바람직하지만, 이 다른 방법으로서 자율 복제형 벡터(Ozeki et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1133 (1995))에 DNA 구조체를 편입시킴으로써 염색체에 도입하지 않는 형태로 이용할 수도 있다.
- [0225] DNA 구조체에는 형질 전환된 세포를 선택하는 것을 가능하게 하기 위한 마커 유전자가 포함되어 있어도 된다. 마커 유전자는 특별히 한정되지는 않으며, 예를 들면, *pyrG*, *niaD*, *adeA*와 같은 숙주의 영양 요구성을 상보하는 유전자; 피리티아민, 하이그로마이신B 올리고마이신 등의 약제에 대한 약제 내성 유전자 등을 들 수 있다. 또한, DNA 구조체는 숙주 세포 중에서 GLOD를 코딩하는 유전자를 과잉 발현하는 것을 가능하게 하는 프로모터, 터미네이터 기타 제어 서열(예를 들면, 인핸서, 폴리아데닐화 서열 등)을 포함하는 것이 바람직하다. 프로모터는 특별히 한정되지는 않지만, 적당한 발현 유도 프로모터나 구성적 프로모터를 들 수 있으며, 예를 들면, *tef1* 프로모터, *alp* 프로모터, *amy* 프로모터 등을 들 수 있다. 터미네이터도 또 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면, *alp* 터미네이터, *amy* 터미네이터, *tef1* 터미네이터 등을 들 수 있다.
- [0226] DNA 구조체에서 GLOD를 코딩하는 유전자의 발현 제어 서열은 삽입하는 GLOD를 코딩하는 유전자를 포함한 DNA 단편이 발현 제어 기능을 가지고 있는 서열을 포함한 경우에는 반드시 필요하지는 않다. 또한, 공형질 전환법에 의해 형질 전환을 실시하는 경우에는 DNA 구조체는 마커 유전자가 없어도 되는 경우가 있다.
- [0227] DNA 구조체의 일 실시 형태는 예를 들면 pUC19의 멀티클로닝 사이트에 있는 In-Fusion Cloning Site에 *tef1* 유전자 프로모터, GLOD를 코딩하는 유전자, *alp* 유전자 터미네이터 및 *pyrG* 마커 유전자를 연결시킨 DNA 구조체이

다.

- [0228] 사상균으로의 형질 전환 방법으로서는 당업자에게 알려진 방법을 적절히 선택할 수 있고, 예를 들면, 숙주 사상균의 원형질체를 조제한 후에, 폴리에틸렌글리콜 및 염화칼슘을 이용하는 원형질체 PEG법(예를 들면, Mol. Gen. Genet. 218, 99-104, 1989, 일본 특개 2007-222055호 공보 등을 참조)를 이용할 수 있다. 형질 전환 사상균을 재생시키기 위한 배지는 이용하는 숙주 사상균과 형질 전환 마커 유전자에 따라 적절한 것을 이용한다. 예를 들면, 숙주 사상균으로서 아스페르길루스 소예를 이용하여 형질 전환 마커 유전자로서 pyrG 유전자를 이용한 경우에는 형질 전환 사상균의 재생은 예를 들면, 0.5% 한천 및 1.2M 소르비톨을 포함한 Czapek-Dox 최소 배지(디프코사)에서 실시할 수 있다.
- [0229] 또한, 예를 들면, 본 발명의 형질 전환 사상균을 얻기 위해, 상동 재조합을 이용하여 숙주 사상균이 본래 염색체상에 가진 GLOD를 코딩하는 유전자의 프로모터를 tef1 등의 고발현 프로모터로 치환해도 된다. 이 때에도 고발현 프로모터에 추가하여 pyrG 등의 형질 전환 마커 유전자를 삽입하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 이 목적을 위해, 일본 특개 2011-239681에 기재된 실시예 1이나 도 1을 참조하여 GLOD를 코딩하는 유전자의 상류 영역-형질 전환 마커 유전자-고발현 프로모터-GLOD를 코딩하는 유전자의 전부 또는 부분으로 이루어진 형질 전환용 카세트 등을 이용할 수 있다. 이 경우 GLOD를 코딩하는 유전자의 상류 영역 및 GLOD를 코딩하는 유전자의 전부 또는 부분이 상동 재조합을 위해 이용된다. GLOD를 코딩하는 유전자의 전부 또는 부분은 개시 코돈으로부터 도면 중의 영역을 포함한 것을 사용할 수 있다. 상동 재조합에 적절한 영역의 길이는 0.5kb 이상인 것이 바람직하다.
- [0230] 본 발명의 형질 전환 사상균이 제작된 것의 확인은 GLOD의 효소 활성이 인정되는 조건하에서 본 발명의 형질 전환 사상균을 배양하고, 이어서 배양 후에 얻어진 배양물에서의 GLOD의 활성을 확인함으로써 실시할 수 있다.
- [0231] 또한, 본 발명의 형질 전환 사상균이 제작된 것의 확인은 형질 전환 사상균으로부터 염색체 DNA를 추출하고, 이것을 주형으로 하여 PCR을 실시하고, 형질 전환이 일어난 경우에 증폭이 가능한 PCR 산물이 생기는 것을 확인함으로써 실시해도 된다.
- [0232] 예를 들면, 이용한 프로모터의 염기 서열에 대한 포워드 프라이머와, 형질 전환 마커 유전자의 염기 서열에 대한 리버스 프라이머의 조합으로 PCR을 실시하여 상정한 길이의 산물이 생기는 것을 확인한다.
- [0233] 숙주는 공지 미생물, 공지주 및 본 명세서에 기재된 공지 미생물이나 공지주의 동등물이나 균등물일 수 있다. 동등물이란 단백질의 재조합 발현에 관하여 동등한 기능을 발휘하는 숙주를 말한다. 균등물은 본원의 출원시에 공지였던 숙주에 기초하여 제작되고 개편된 숙주로서 본원의 출원 후에 개발된 것이나 본원의 출원시에 공지인 숙주와 성질이 유사한 숙주로서 본원의 출원 후에 발견된 것을 포함한다. 미생물의 학명이나 분류에 관하여 본원의 출원 후에 학명의 변경이나 속명의 변경, 분류의 변경 등이 있었던 경우에는 본 명세서의 기재가 우선하는 것으로 하여 본원의 출원시를 기준으로 한다.
- [0234] (하이 스루풋 스크리닝)
- [0235] GLOD는 기능성 GLOD 변이체를 취득하기 위해 하이 스루풋 스크리닝에 더 제공할 수 있다. 예를 들면 변이 도입된 GLOD 유전자를 가진 형질 전환 또는 형질 도입주의 라이브러리를 제작하고, 이것을 마이크로타이터 플레이트에 기초한 하이 스루풋 스크리닝에 제공해도 되고, 또는 액적형 마이크로 유체에 기초한 초하이 스루풋 스크리닝에 제공해도 된다. 예로서는 변이형을 코딩하는 변이 유전자의 조합(combinatorial) 라이브러리를 구축하고, 다음으로 파지 디스플레이(예를 들면 Chem. Rev. 105 (11): 4056-72, 2005), 이스트 디스플레이(예를 들면 Comb Chem High Throughput Screen. 2008; 11(2): 127-34), 세균성 디스플레이(예를 들면 Curr Opin Struct Biol 17: 474-80, 2007) 등을 이용하여 변이 GLOD가 큰 집단을 스크리닝하는 방법을 들 수 있다. 또한 Agresti et al, "Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution" Proceedings of the National Academy of Sciences 107 (9): 4004-4009 (Mar, 2010)를 참조할 것. GLOD 변이형의 스크리닝에 사용할 수 있는 초하이 스루풋 스크리닝 수법에 대한 동일 문헌의 기재에 참조에 의해 본 명세서에 편입시킨다. 예를 들면 에러 프론 PCR법에 의해 라이브러리를 구축할 수 있다. 또한 포화 돌연변이 유발을 이용하여 본 명세서에 기재된 영역이나 위치 또는 그들에 대응하는 영역이나 위치를 표적으로서 변이 도입하여 라이브러리를 구축해도 된다. 라이브러리를 이용하여 전기 컴피턴트 EBY-100 세포 등의 적당한 세포를 형질 전환하여 약 10의 7승의 변이체를 취득할 수 있다(1천만). 해당 라이브러리에서 형질 전환한 효모 세포를 이어서 셀 소팅에 제공할 수 있다. 표준 소프트 리소그래피법을 이용하여 제작한 폴리디메톡실록산(PDMS) 마이크로 유체 디바이스를 이용해도 된다. 플로우 포커스 디바이스를 이용하여 단()분산의 액적을 형성할 수 있다. 개별의 변이체를 함유

하는 형성된 액적을 적당한 소팅 디바이스에 제공할 수 있다. 세포를 선별할 때에는 GLOD 활성의 유무를 이용할 수 있다. 여기에는 예를 들면 상기 GLOD가 작용하면 발색하는 조성으로 한 반응액을 이용해도 된다. 예를 들면 DCIP를 이용하는 경우에는 96웰 플레이트, 192웰 플레이트, 384웰 플레이트, 9600웰 플레이트 등 및 플레이트 리더를 고용하여 600nm의 흡광도를 측정해도 된다. 변이 도입과 선별은 여러 차례 반복해도 된다. 여기서 말하는 변이는 아미노산의 치환, 삽입, 결실 및/또는 부가를 포함한다.

[0236] 예를 들면, GLOD에 1 ~ 10의 변이를 도입하여 GLOD 활성을 확인할 수 있다. 다음으로, 활성을 가진 것으로 확인된 GLOD 변이체에서부터 출발하고, 또한 1 ~ 10의 변이를 도입하여 활성을 확인할 수 있다. 일련의 하이 스루풋 스크리닝(예를 들면 약 10의 7승의 변이체를 취득하여 스크리닝하는 상기 수법)을 2라운드 이상, 5라운드 이상, 10라운드 이상, 15라운드 이상, 예를 들면 20라운드 이상 반복할 수 있다. 각 라운드로 1변이 이상, 5변이 이상, 예를 들면 10변이 이상을 도입하는 하이 스루풋 스크리닝을 예를 들면 10라운드 반복함으로써 출발 GLOD에서 보아 10변이 이상, 50변이 이상, 예를 들면 100 이상의 변이가 도입되고, 아울러 또한 활성을 가진 변이체를 신속하게 취득할 수 있다. 또한 20라운드 반복함으로써 출발 GLOD에서 보아 20변이 이상, 100변이 이상, 예를 들면 200 이상의 변이가 도입되고, 아울러 또한 활성을 가진 변이체를 신속하게 취득할 수 있다. 이러한 작업은 루틴한 프로세스의 반복에 의해 행할 수 있다.

[0237] 변이는 GLOD의 전장 아미노산 서열 중 첫번째 아미노산 ~ 마지막 아미노산 중 어느 하나 이상의 위치에 도입할 수 있다. 단, 활성 중심, 기질 인식 부위, 조효소 인식 모티프 및 이들 근방 등의 효소의 기능에 중요한 영역은 제외한다. GLOD는 산업에 널리 이용되고 있으며, 당업자는 그 활성 중심, 기질 인식 부위, 및 조효소 인식 모티프를 포함한 효소의 기능에 중요한 영역을 숙지하고 있다. 특정 실시 형태에서는 예를 들면 GLOD의 전장 서열 중, 우선 제1 ~ 10위의 부분에 1 또는 복수의 변이를 도입할 수 있다. 다음으로, 활성을 가진 것으로 확인된 GLOD 변이체에서부터 출발하고, 또한 제11 ~ 20위에 1 또는 복수의 변이를 도입하여 활성을 확인할 수 있다. 이것을 n 회 반복할 수 있다($n \leq 68$). 예를 들면 68번째에 제680 ~ 687위에 1 또는 복수의 변이를 도입할 수 있다. 도중에 효소의 기능에 중요한 영역이나 개변을 의도하지 않는 영역은 적절히 건너뛰어도 된다. 이로써 효소의 기능에 중요한 영역을 제외하고 전장 서열 중 모든 위치에 임의의 변이를 도입할 수 있고, 또 예를 들면 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 60 이상, 70 이상, 80 이상, 90 이상, 100 이상, 110 이상, 120 이상, 130 이상, 140 이상, 150 이상, 160 이상, 170 이상, 180 이상, 190 이상, 예를 들면 200 이상의 변이를 가지고, 활성을 가진 GLOD 변이체를 신속하게 취득할 수 있다.

[0238] 변이는 랜덤으로 도입해도 되고, 또는 합리적 설계에 의해 도입해도 된다. 어떤 실시 형태에서 합리적 설계에 의해 도입하는 변이 또는 랜덤으로 도입되는 변이는 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 치환 전의 아미노산과 치환 후의 아미노산이 유사한 화학적 특성을 가진 아미노산 치환을 포함한다(예를 들면, Stryer 등, Biochemistry, 제5판, 2002, 44 ~ 49페이지). 예를 들면 보존적 아미노산 치환은 (i) 염기성 아미노산의, 다른 종류의 염기성 아미노산과의 치환; (ii) 산성 아미노산의, 다른 종류의 산성 아미노산과의 치환; (iii) 방향족 아미노산의, 다른 종류의 방향족 아미노산과의 치환; (iv) 비극성 지방족 아미노산의, 다른 종류의 비극성 지방족 아미노산과의 치환; 및 (v) 극성 비하전(非荷電) 아미노산의, 다른 종류의 극성 비하전 아미노산과의 치환으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 염기성 아미노산은 예를 들면 아르기닌, 히스티딘 및 리신으로부터 선택될 수 있다. 산성 아미노산은 예를 들면 아스파라긴산 또는 글루탐산일 수 있다. 방향족 아미노산은 예를 들면 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로부터 선택될 수 있다. 비극성 지방족 아미노산은 예를 들면 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 메티오닌 및 이소류신으로부터 선택될 수 있다. 극성 비하전 아미노산은 예를 들면 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 아스파라긴 및 글루타민으로부터 선택될 수 있다.

[0239] 어떤 실시 형태에서 합리적 설계에 의해 도입되는 변이 또는 랜덤으로 도입되는 변이는 기능적으로 유사한 아미노산에서의 치환을 포함한다. 기능적으로 유사한 아미노산의 표는 당 기술 분야에서 널리 알려져 있다. 어떤 실시 형태에서 기능적으로 유사한 아미노산에서의 치환에서는 치환 전의 아미노산과 치환 후의 아미노산이 이하에 특정되는 아미노산 분류 중 어느 하나에 해당할 수 있다:

[0240] 1) 글리신(G), 알라닌(A);

[0241] 2) 아스파라긴산(D), 글루탐산(E);

[0242] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0243] 4) 아르기닌(N), 리신(K);

[0244] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V), 프롤린(P);

- [0245] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);
- [0246] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및
- [0247] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M).
- [0248] 전형적인 실시 형태에서, 보존적 아미노산 치환 또는 기능적으로 유사한 아미노산에서의 치환은 GLOD의 활성 중심, 기질 인식 부위, 조효소 인식 모티프 및 이들 근방 등의 효소의 기능에 중요한 영역에 존재하지 않고, 따라서 효소의 활성화에 유의미하게 영향을 미치지 않는다.
- [0249] GLOD 변이체는 또한, 변이 전의 서열과 비교하여 추가 아미노산이 삽입되는 것을 포함할 수 있다. 전형적인 실시 형태에서, 아미노산 삽입은 활성 중심, 기질 인식 부위, 조효소 인식 모티프 및 이들 근방 등의 효소의 기능에 중요한 영역에 존재하지 않고, 따라서 효소의 활성화에 유의미하게 영향을 미치지 않는다. GLOD 변이체는 또한, 변이 전의 서열과 비교하여 추가 아미노산이 부가되는 것을 포함할 수 있다. 어떤 실시 형태에서 아미노산 부가는 GLOD의 N 말단 또는 C 말단에 이루어져 효소의 활성화에 유의미하게 영향을 미치지 않는다. 부가의 예로서 GLOD의 정제를 보조하기 위한 히스티딘잔기의 짧은 스트레치(예를 들면 2 ~ 6의 히스티딘잔기)를 들 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 부가의 예로서 GLOD의 발현을 보조하기 위한 시그널 펩티드의 부가를 들 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 시그널 펩티드로서는 공지의 시그널 서열 또는 그 기능적 동등물을 들 수 있다.
- [0250] GLOD 변이체는 또한, 변이 전의 서열과 비교하여 아미노산의 결실을 포함할 수 있다. 전형적인 실시 형태에서, 아미노산 결실은 효소의 기능에 중요한 영역에 존재하지 않고, 따라서 효소의 활성화에 유의미하게 영향을 미치지 않는다. 어떤 실시 형태에서 결실은 1 ~ 2아미노산의 짧은 결실일 수 있다. 어떤 실시 형태에서 어느 GLOD의 아미노산 서열을 다른 GLOD의 아미노산 서열과 비교하여 한쪽 서열에서 아미노산이 결실되어 있는 경우, 해당 결실을 다른 GLOD에 도입할 수 있다. 양쪽의 GLOD가 활성을 나타내기 때문에 이러한 결실은 효소의 활성화에 유의미하게 영향을 미치지 않을 가능성이 높다.
- [0251] GLOD로의 변이 도입은 α 나선 구조나 β 시트 구조 등의 2차 구조나 구조 모티프가 파괴되지 않도록 행할 수 있다. 2차 구조의 영역은 예를 들면 2차 구조 예측 알고리즘에 의해 특정할 수 있다. 예측 알고리즘으로서는 예를 들면 NetSurfP-2.0을 들 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 네스트(nest), 니치(niche) 등의 다른 구조 모티프에 대해서도 동일하다.
- [0252] (열안정성 향상형 변이)
- [0253] 어느 실시 형태에서 본 발명은 열안정성 향상형 변이를 도입한 GLOD 변이체를 제공한다. 이 변이체는 해당 변이 도입 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다. 여기서, 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여, 열안정성이 향상되어 있다는 것은 소정의 온도 및 시간에서 GLOD를 열처리에 제공했을 때의 열처리 후의 GLOD 변이체의 잔존 활성이 해당 변이 도입 전의 GLOD의 열처리 후의 잔존 활성과 비교하여 향상되어 있는 것을 말한다.
- [0254] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체는
- [0255] 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치,
- [0256] 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치,
- [0257] 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치,
- [0258] 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치,
- [0259] 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치,
- [0260] 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치,
- [0261] 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치,
- [0262] 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치,
- [0263] 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치,
- [0264] 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치,
- [0265] 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치,

- [0266] 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치,
- [0267] 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치
- [0268] 로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 위치, 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13의 위치에서 서열 번호 1 혹은 58과 비교하여 아미노산 치환을 가지고, 치환 전의 변이체와 비교하여 아미노산 치환 후의 변이체의 열안정성이 향상되어 있다. 상기 위치에 관하여 아미노산이 치환되어 있다(아미노산 치환을 가지고)란 야생형 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되는 것을 의미하고, 따라서 치환 후의 아미노산으로부터 야생형 아미노산은 제거된다.
- [0269] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산(치환 후의 아미노산)은 티로신일 수 있다.
- [0270] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0271] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0272] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치에 도입되는 아미노산 치환은 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0273] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0274] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0275] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0276] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0277] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌일 수 있다.
- [0278] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0279] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0280] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0281] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 대응하는 위치에 대해서는 후술하기로 한다.
- [0282] 어느 실시 형태에서 상기 열안정성 향상형 변이를 야생형 GLOD나 종래형 GLOD에 도입할 수 있다. 여기서 말하는 종래형 GLOD란 활성 단백질의 발현에 프로테아제에서의 처리를 필요로 하는 종래의 GLOD를 말한다. 이러한 열안정성 향상형 변이를 도입한 GLOD는 야생형 GLOD나 종래형 GLOD와 마찬가지로 프로테아제에서의 처리 후에 활성을 발휘할 뿐 아니라, 변이 도입 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상된다고 생각된다. 편의상 이러한 변이체를 본 명세서에서 GLOD-T로 표기하는 경우가 있다. 또한, 그러한 열안정성 향상형 변이를 복수 도입할 수도 있다. 본 명세서에서 상기 열안정성 향상형 변이를 1개 도입한 GLOD를, GLOD-T1으로 표기하는 경우가 있다. 이하, 마찬가지로 변이를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13 도입한 변이체를 각각 GLOD-T2, GLOD-T3, GLOD-T4, GLOD-T5, GLOD-T6, GLOD-T7, GLOD-T8, GLOD-T9, GLOD-T10, GLOD-T11, GLOD-T12, 또는 GLOD-T13으로 표기하는 경우가 있다.

- [0283] 본 발명자들은 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위에 대응하는 위치에 아미노산 치환을 도입한 GLOD 변이체가 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다는 것을 발견하였다. 당업자라면 이러한 지견에 기초하여 서열 번호 1의 87위 등에 대응하는 위치에 동일한 아미노산 치환을 도입한 다른 유래의 GLOD도 이와 같이 열안정성이 향상되어 각종 반응에 이용할 수 있다고 이해한다.
- [0284] 어느 실시 형태에서 상기 열안정성 향상형 변이를 본 발명의 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체(GLOD Δ)에 도입할 수 있다. 특별히 언급이 없는 한 본 개시내용의 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체는 활성 단백질의 발현에 프로테아제에서의 처리를 필요로 하지 않는다. 본 개시내용의 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체는 상술한 것처럼 아미노산 서열 결실 전의 대응하는 GLOD와 비교하여 놀랍게 열안정성이 향상되어 있다. 이러한 본 발명의 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체(GLOD Δ)에 상기 열안정성 향상형 변이를 더 도입할 수 있다. 편의상 이러한 변이체를 본 명세서에서 GLOD Δ -T로 표기하는 경우가 있다. 본 명세서에서 열안정성 향상형 변이를 1개 도입한 GLOD Δ 를 GLOD Δ -T1으로 표기하는 경우가 있다. 이하, 마찬가지로 변이를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13 도입한 Δ 변이체를 각각 GLOD Δ -T2, GLOD Δ -T3, GLOD Δ -T4, GLOD Δ -T5, GLOD Δ -T6, GLOD Δ -T7, GLOD Δ -T8, GLOD Δ -T9, GLOD Δ -T10, GLOD Δ -T11, GLOD Δ -T12 또는 GLOD Δ -T13으로 표기하는 경우가 있다.
- [0285] (예비적 아미노산 치환)
- [0286] 예비적 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD-T나 GLOD-T1 ~ GLOD-T13 등의 열안정성 향상형 변이체나, 아미노산 서열 결실형 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ -T나 GLOD Δ -T1 ~ GLOD Δ -T13, 예를 들면 서열 번호 12, 13, 58, 59 혹은 60 또는 이들 중 어느 하나와 70% 이상, 80% 이상 혹은 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진 GLOD 변이체는 경우에 따라 국제 공개 제2021/193598에 기재된 아미노산 치환을 가질 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 GLOD 변이체에 관하여 본 명세서의 서열 번호 1을 기준으로 하여 106위의 Ala를 Ser로 치환할 수 있다. 이 아미노산 치환을 본 명세서에서 A106S로 기재한다. 이하, 마찬가지로 본 명세서의 서열 번호 1을 기준으로 하여 본 발명의 GLOD 변이체는 A106S, C210S, Q235E, D236E, D237E, P244H, T311S, W313F, Q333E, I334V, I334L, M336L, Q338E, R339K, T416S, A438P, K441E, Y455F, Q456R, Q457E, Q457K, L505I, P598A, C601S, 및 P609A로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 치환을 1 이상, 예를 들면 1 ~ 25 가질 수 있다. 이러한 위치에 대응하는 위치에 대해서도 동일하게 한다.
- [0287] 편의상 본 개시내용의 열안정성 향상형 아미노산 결실(Δ)이나 본 발명의 열안정성 향상형 변이(T)와 구별하기 위해 국제 공개 제2021/193598에 기재된 아미노산 치환을 J로 표기하는 경우가 있다. 즉 J를 국제 공개 제2021/193598에 기재된 아미노산 치환의 집합(세트, set)으로 하고, 각 구성요소의 순서는 불문하는 것으로 한다.
- [0288] [수식 1]
- [0289] $J = \{A106S, C210S, Q235E, D236E, D237E, P244H, T311S, W313F, Q333E, I334V, I334L, M336L, Q338E, R339K, T416S, A438P, K441E, Y455F, Q456R, Q457E, Q457K, L505I, P598A, C601S, P609A\}$
- [0290] 또한, J에 포함되는 변이를 1개 가진 변이체를 J1으로 하고, n개 가진 변이체를 Jn으로 하여 이하와 같이 J25까지 규정한다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 이하의 조합 변이체를 제공한다. 당업자라면 이러한 유한한 조합의 변이체를 하나하나 제작하여 그들의 활성이나 열안정성을 확인할 수 있다. 하기에서 결실되는 Δ 는 31 ~ 54 길이의 서열일 수 있다. 또한, 하기에서 결실되는 Δ 의 C 말단측의 기점은 서열 번호 1의 510위, 508위 또는 507위에 대응하는 위치일 수 있다.
- [0291] [수식 2]
- [0292] GLOD-T $\cap$ J
- [0293] [수식 3]
- [0294] GLOD-T $\cap\{J1 \sim J25\}$
- [0295] [수식 4]
- [0296] $\{GLOD-T1 \sim GLOD-T13\} \cap J$
- [0297] [수식 5]

- [0298] $\{GLOD-T1 \sim GLOD-T13\} \cap \{J1 \sim J25\}$
- [0299] [수식 6]
- [0300] $GLOD \Delta - T \cap J$
- [0301] [수식 7]
- [0302] $GLOD \Delta - T \cap \{J1 \sim J25\}$
- [0303] [수식 8]
- [0304] $\{GLOD \Delta - T1 \sim GLOD \Delta - T13\} \cap J$
- [0305] [수식 9]
- [0306] $\{GLOD \Delta - T1 \sim GLOD \Delta - T13\} \cap \{J1 \sim J25\}$
- [0307] (GLOD 변이체)
- [0308] GLOD 유전자에 본 개시내용의 아미노산 서열 결실을 도입함으로써 GLOD Δ 변이체를 제작하고, 프로테아제 처리를 행하지 않고 GLOD, 예를 들면 열안정성이 높은 GLOD를 제조할 수 있다. GLOD 유전자에 본 발명의 아미노산 치환(T)을 도입함으로써 GLOD-T변이체를 제작하고, 열안정성이 높은 GLOD를 제조할 수 있다. GLOD 유전자에 본 발명의 아미노산 서열 결실 및 아미노산 치환을 도입함으로써 GLOD Δ -T변이체를 제작하고, 프로테아제 처리를 실시하지 않고 GLOD, 예를 들면 열안정성이 높은 GLOD를 제조할 수 있다.
- [0309] 일부의 한정적인 실시 형태에서는 치환 후의 아미노산으로부터 천연 GLOD 서열에서의 아미노산(천연 아미노산)으로의 복귀 변이는 제외된다. 다른 실시 형태에서는 예를 들면 서열 번호 1의 87위 등에 대응하는 위치의 치환 후 아미노산은 천연 GLOD 서열에서의 해당 위치의 아미노산(천연 아미노산)과 동일할 수 있다.
- [0310] (대응하는 위치)
- [0311] 본 명세서에서 어느 기준이 되는 아미노산 서열 중의 특정 위치가 다른 유사한 아미노산 서열 중의 특정 위치와 대응하는 경우 이것을 대응하는 위치라고 한다. 또 대응하는 위치의 아미노산을 대응 아미노산이라고 한다. 본 명세서에서는 편의상 서열 번호 1에 나타내는 *Streptomyces* sp. X-119-6 유래의 GLOD의 아미노산 서열을 기준으로 하여 설명한다. 이 경우, 아미노산 서열에서의 "대응하는 위치"란 서열 번호 1에 나타내는 *Streptomyces* sp. X-119-6 유래의 GLOD의 아미노산 서열의 특정 위치에 대응하는 다른 생물종 유래의 GLOD의 아미노산 서열에서의 위치를 말한다.
- [0312] 아미노산 서열에서의 "대응하는 위치"를 특정하는 방법으로는 예를 들면 립만 피어슨(Lipman-Pearson)법 등 공지 알고리즘을 이용하여 아미노산 서열을 비교하여 각 GLOD의 아미노산 서열 중에 존재하는 보존 아미노산 잔기에 최대의 동일성을 부여함으로써 행할 수 있다. GLOD의 아미노산 서열을 이러한 방법으로 정렬시킴으로써 아미노산 서열 중에 있는 삽입, 결실에 관계없이 상동 아미노산잔기의 각 GLOD 서열에서의 서열 중의 위치를 결정하는 것이 가능하다. 대응하는 위치(상동 위치)는 삼차원 구조 중에서 동위치에 존재한다고 생각되어 대상이 되는 GLOD의 특이적 기능에 관해 유사한 효과를 가진 것으로 추정할 수 있다.
- [0313] (변이의 대응 위치)
- [0314] 본 명세서에서, "서열 번호 1의 아미노산 서열의 87위에 대응하는 위치"란 대상의 GLOD의 아미노산 서열을 서열 번호 1의 아미노산 서열과 비교한 경우에 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치를 말한다. 서열 번호 1의 다른 위치, 예를 들면 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위에 대해서도 마찬가지이다. 서열 번호 1의 106위, 210위, 235위, 236위, 237위, 244위, 311위, 313위, 333위, 334위, 334위, 336위, 338위, 339위, 416위, 438위, 441위, 455위, 456위, 457위, 457위, 505위, 598위, 601위, 및 609위에 대해서도 마찬가지이다. 예를 들면 서열 번호 1의 아미노산 서열의 87위에 대응하는 위치는 서열 번호 58로 말하면 87위이다.
- [0315] (대응하는 영역)
- [0316] 아미노산 서열에서의 "대응하는 영역"에 대해서도 상기 "대응하는 위치"와 마찬가지로 규정된다. 예를 들면 서열 번호 1의 459위 ~ 507위에 대응하는 영역은 서열 번호 58로 말하면 459위 ~ 507위이다. 또한, 서열 번호 1의 459위 ~ 466위에 대응하는 영역은 서열 번호 58로 말하면 459위 ~ 466위이다. 또한, 서열 번호 1의 457위 ~ 510

위에 대응하는 영역은 서열 번호 58로 말하면 457위 ~ 510위이다. 또한, 서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역은 서열 번호 58로 말하면 673위 ~ 690위이다.

- [0317] (아미노산 서열의 상동성, 동일성 또는 유사성)
- [0318] 아미노산 서열의 상동성, 동일성 또는 유사성은 GENETYX(GENETYX사 제)의 맥시멈 매칭이나 서치 호몰로지 등의 프로그램, 또는 DNASIS Pro(히타치솔루션즈사 제)의 맥시멈 매칭이나 다중 정렬, 또는 CLUSTAL W의 다중 정렬 등의 프로그램에 의해 계산할 수 있다. 아미노산 서열 동일성을 계산하기 위해 2 이상의 GLOD를 정렬하였을 때에 해당 2 이상의 GLOD에서 동일한 아미노산의 위치를 조사할 수 있다. 이러한 정보를 토대로 아미노산 서열 중의 동일 영역을 결정할 수 있다. 여기서 2 이상의 아미노산 서열에 대해 동일성%란 Blosum62 등의 알고리즘을 이용하여 2 이상의 아미노산 서열을 정렬했을 때에 정렬 가능함 영역의 총아미노산수를 분모로 하고 그 중 동일한 아미노산에 의해 점유되는 위치의 수를 분자로 했을 때의 퍼센티지를 말한다. 따라서, 통상 2 이상의 아미노산 서열에 동일성이 전혀 보이지 않는 영역이 있는 경우, 예를 들면 C 말단에 동일성이 전혀 보이지 않는 부가 서열이 한쪽의 아미노산 서열에 있는 경우 해당 동일성이 없는 영역은 정렬 불가능하기 때문에 동일성%의 산출에는 이용되지 않는다.
- [0319] 또한, 2 이상의 GLOD에서 유사한 아미노산의 위치를 조사할 수도 있다. 예를 들면 CLUSTALW를 이용하여 복수의 아미노산 서열을 정렬할 수 있고, 이 경우, 알고리즘으로서 Blosum62를 사용하여 복수의 아미노산 서열을 정렬했을 때에 유사(similar)하다고 판단되는 아미노산을 유사 아미노산이라고 부르는 경우가 있다. 본 개시내용의 변이체에서 아미노산 치환은 이러한 유사 아미노산 사이의 치환에 의한 것일 수 있다. 이러한 정렬에 의해 복수의 아미노산 서열에 대해 아미노산 서열이 동일한 영역 및 유사 아미노산에 의해 점유되는 위치를 조사할 수 있다. 이러한 정보를 토대로 아미노산 서열 중의 상동성 영역(보존 영역)을 결정할 수 있다.
- [0320] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체는 서열 번호 1 또는 서열 번호 58에 나타나는 아미노산 서열을 가진 GLOD로 정렬했을 때에 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 전장 아미노산 서열 동일성을 가지고, 또한 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다.
- [0321] 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 개변체는 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위에 대응하는 위치 이외의 위치에 1 또는 여러 개의 아미노산이 개변 혹은 변이 또는 결실, 치환, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열을 가지고, 또한 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다. 여기서 1 또는 여러 개의 아미노산이란 1 ~ 15개, 1 ~ 10개, 1 ~ 7개, 1 ~ 5개, 1 ~ 4개, 예를 들면 1 ~ 3개, 예를 들면 1 또는 2개의 아미노산을 말한다.
- [0322] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD Δ 는
- [0323] (i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬하였을 때에 서열 번호 1의 소정 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 경우에 따라 서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가지는, 여기서 해당 소정 영역은 서열 번호 1의 510위, 508위, 혹은 507위에 대응하는 위치를 C 말단측의 기점으로 하여 31 ~ 54의 연속한 아미노산으로 이루어진 영역이다,
- [0324] (ii) 상기 (i)에서 서열 번호 1의 소정 영역 이외의 위치에서의 1 또는 여러 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 혹은 서열 번호 1의 소정 영역 및 670위 ~ 687위에 대응하는 영역 이외의 위치에서의 1 또는 여러 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어진다,
- [0325] (iii) 상기 (i) 혹은 (ii)에서 해당 GLOD Δ 의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 12, 서열 번호 13 또는 서열 번호 59의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가진다,
- [0326] (iv) 상기 (i) 또는 (ii)에서 해당 GLOD Δ 의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 12, 서열 번호 13 또는 서열 번호 59의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지고, 해당 GLOD Δ 에서의 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)이거나, 혹은 (v) 상기 (i) 또는 (ii)에서 해당 GLOD Δ 의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 12, 서열 번호 13 또는 서열 번호 59의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지고, 해당 GLOD Δ 에서의

서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)이며, 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다.

- [0327] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD-T는
- [0328] (i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬했을 때에 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 치환되어 있거나,
- [0329] (ii) 상기 (i)에서 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위에 대응하는 위치 이외의 위치에서의 1 또는 몇 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나,
- [0330] (iii) 상기 (i) 혹은 (ii)에서 해당 GLOD-T의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지거나,
- [0331] (iv) 상기 (i) 또는 (ii)에서 해당 GLOD-T의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지고, 해당 GLOD-T에서의 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)이거나, 혹은
- [0332] (v) 상기 (i) 또는 (ii)에서 해당 GLOD-T의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 1 또는 서열 번호 58의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지고, 해당 GLOD-T에서의 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)이며, 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다.
- [0333] 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 티로신일 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 발명의 GLOD-T변이체에 관하여, 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여, 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌일 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD-T변이체에 관하여 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [0334] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLODΔ-T는
- [0335] (i) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬하였을 때에, 서열 번호 1의 소정 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 경우에 따라 서열 번호 1의 670위 ~ 687위에 대응하는 영역의 아미노산 서열을 결실시키고, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가지고, 여기서 해당 소정 영역은 서열 번호 1의 510위, 508위, 혹은 507위에 대응하는 위치를 C 말단측의 기점으로 하여 31 ~ 54의 연속한 아미노산으로 이루어진 영역이고, 또한
- [0336] 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬하였을 때에 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 대응하는 위치의 아미노산이 치환되어 있는, 예를 들면 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 류신, 이소류신, 발린 및 메티오닌 및 글루타민산, 아스파라긴산, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산으로 개편되어 있거나,
- [0337] (ii) 상기 (i)에서 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위에 대응하는 위치, 및 서열 번호 1의 해당 소정 영역 이외의 위치에서의 1 또는 여러 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 혹은 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위에 대응하는 위치 및 서열 번호 1의 소정 영역 및 670위 ~ 687위에 대응하는 영역 이외의 위치에서의 1 또는 여러 개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나,
- [0338] (iii) 상기 (i) 혹은 (ii)에서 해당 GLODΔ-T의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 59 또는 서열 번호 60 또는 서열 번호 69의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지거나,
- [0339] (iv) 상기 (i) 또는 (ii)에서 해당 GLODΔ-T의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 59 또는 서열 번호 60 또는 서열 번호 69의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지고, 해당 GLODΔ-T에서의 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)이거나, 혹은
- [0340] (v) 상기 (i) 또는 (ii)에서 해당 GLODΔ-T의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 59 또는 서열 번호 60 또는 서열 번호 69의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 예를 들면 99% 이상의 서열 동일성을 가지고, 해당 GLODΔ-T에서의 서열 번호 1의 291위에 대응하는 위치의 아미노산이 아르기닌이며, 서열 번호 1의 51 ~ 56위에 대응하는 위치의 아미노산 서열이 Gly-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly(여기서 Xaa는 임의의 아미노산을 나타냄)이며, 개변 전의 GLOD와 비교하여 열안정성이 향상되어 있다.
- [0341] 어느 실시 형태에서 본 발명은 서열 번호 60 또는 서열 번호 69의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 예를 들면 90% 이상, 예를 들면 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지고, 또한 서열 번호 1의 소정 영역을 결실시키고, 여기서 해당 소정 영역은 서열 번호 1의 510위, 508위, 혹은 507위에 대응하는 위치를 C 말단측의 기점으로 하여 31 ~ 54의 연속된 아미노산으로 이루어진 영역이며, 또한
- [0342] 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치,
- [0343] 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치,
- [0344] 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치,
- [0345] 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치,
- [0346] 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치,
- [0347] 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치,
- [0348] 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치,
- [0349] 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치,

- [0350] 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치,
- [0351] 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치,
- [0352] 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치,
- [0353] 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치, 및
- [0354] 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치
- [0355] 로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 위치에서 서열 번호 58의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 치환을 가진, 글루타민산 옥시다아제 활성을 가진 GLOD 변이체를 제공한다. 단, 특정 실시 형태에서 치환 아미노산에서 야생형 아미노산은 제외된다. 특정 실시 형태에서, 변이체는 추가로 670위 ~ 687위에 대응하는 영역을 결실시킬 수 있다.
- [0356] 특정 실시 형태에서 본 발명의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 87위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 티로신일 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 발명의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 103위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 133위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신 및 티로신으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 186위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 글루타민산, 아스파라긴산, 티로신, 글루타민, 아스파라긴, 알라닌, 류신, 시스테인, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 히스티딘 및 트레오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 297위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 376위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 393위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 428위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 티로신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌일 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 페닐알라닌, 류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 이소류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD Δ -T변이체에 관하여 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치에 도입되는 치환 아미노산은 류신, 발린, 및 페닐알라닌으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0357] (GLOD의 생산)
- [0358] 어느 실시 형태에서 본 발명은 GLOD 생산 능력을 가진 균주를 해당 GLOD를 발현할 수 있는 조건하에서 배양하는 공정, 및 배양물 또는 배양액으로부터 GLOD를 분리하는 공정을 포함한, GLOD의 제조 방법을 제공한다. 이 방법에는 본 발명의 GLOD를 코딩하는 유전자를 도입한 벡터로 형질 전환된 숙주 세포를 이용할 수 있다. 여기서 GLOD를 발현할 수 있는 조건이란 GLOD 유전자가 전사, 번역되어 해당 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드가 생산되는 것을 말한다.
- [0359] 또한, 상기 균주를 배양하는 배지로서는 예를 들면, 효모 엑기스, 트립톤, 펩톤, 고기 추출물, 옥수수 침지액 혹은 대두 혹은 밀기울의 침출액 등의 1종 이상의 질소원에 염화나트륨, 인산2수소칼륨, 인산수소2칼륨, 황산마그네슘, 염화마그네슘, 염화제2철, 황산제2철 혹은 황산망간 등의 무기 염류의 1종 이상을 첨가하고, 또한 필요에 따라 당질 원료, 비타민 등을 적절히 첨가한 것이 이용된다.
- [0360] 또한, 배지에 해당 GLOD가 작용할 수 있는 기질이나 그 유사 화합물, 예를 들면 당화아미노산, 당화펩티드류, 당화단백질 분해물, 혹은 당화헤모글로빈이나 당화알부민 등의 당화 단백질을 첨가함으로써 목적 효소의 제조량을 향상시킬 수 있다.

- [0361] 배지의 시작(初發) pH는 pH7 ~ 9로 조정하는 것이 적당하다. 배양은 20 ~ 42℃의 배양 온도, 바람직하게는 25 ~ 37℃ 전후의 배양 온도에서 4 ~ 24시간, 더욱 바람직하게는 25 ~ 37℃ 전후의 배양 온도에서 8 ~ 16시간, 환기 교반 심부 배양, 진탕 배양, 정지 배양 등에 의해 실시하는 것이 바람직하다.
- [0362] 배양 종료 후, 해당 배양물로부터 GLOD를 채취하려면, 통상의 효소 채취 수단을 이용하여 얻을 수 있다. 예를 들면, 통상의 방법에 의해 균체를 초음파 파괴 처리, 마쇄 처리하거나, 또는 라이소자임 등의 용균(溶菌) 효소를 이용하여 본 효소를 추출하거나, 또는 톨루엔 등의 존재하에서 진탕 혹은 방치하여 용균시켜 본 효소를 균체 외로 배출시킬 수 있다. 그리고, 이 용액을 여과, 원심분리하여 고형 부분을 제거하고, 필요에 따라 스트렙토마이신 황산염, 프로타민 황산염, 혹은 황산망간 등에 의해 핵산을 제거한 후, 여기에 황산암모늄, 알코올, 아세트론 등을 첨가하여 분획하고, 침전물을 채취하여 조효소를 얻는다.
- [0363] 조효소로부터 정제 효소 표품을 더 얻으려면 예를 들면, 세파텍스, 슈퍼텍스 혹은 울트로겔 등을 이용하는 겔 여과법, 이온 교환성 담체, 소수성 담체, 히드록시 아파타이트를 이용하는 흡착 용출법, 폴리아크릴아미드겔 등을 이용하는 전기 영동법, 자당 밀도 구배 원심법 등의 침강법, 친화성 크로마토그래피법, 분자체막 혹은 중공사막 등을 이용하는 분획법 등을 적절히 선택하거나, 또는 이것들을 조합하여 실시함으로써 정제된 GLOD 효소 표품을 얻을 수 있다.
- [0364] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체는 예를 들면
- [0365] (i) FAD를 조효소로 하고,
- [0366] (ii) 기질로서 글루타민산을 인식하고,
- [0367] (iii) 작용으로서 글루타민산을 산화하여 2-옥소글루탈산, 암모니아 및 과산화수소를 생성하는
- [0368] 것일 수 있다.
- [0369] 어느 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체는 30 ~ 40℃, 예를 들면 35℃에서 30분 또는 35분 열처리 후의 잔존 활성이 열처리 전의 활성을 100%로 했을 때에 50% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 예를 들면 90% 이상일 수 있다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체는 예를 들면 60℃에서 30분 또는 35분 열처리 후의 잔존 활성이 열처리 전의 활성을 100%로 했을 때에 50% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 예를 들면 75% 이상일 수 있다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체는 예를 들면 65℃에서 30분 또는 35분 열처리 후의 잔존 활성이 열처리 전의 활성을 100%로 했을 때에 50% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 예를 들면 75% 이상일 수 있다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체는 예를 들면 70℃에서 30분 또는 35분 열처리 후의 잔존 활성이 열처리 전의 활성을 100%로 했을 때에 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 예를 들면 35% 이상일 수 있다.
- [0370] 본 개시내용의 GLOD 변이체로부터는 글루타민산에 대한 활성을 나타내지 않는 GLOD는 제외하는 것으로 한다.
- [0371] (조성물, 시약, 전극, 센서 및 키트)
- [0372] 어느 실시 형태에서 본 발명은 GLOD를 포함한, 글루타민산 측정용 시약 조성물, 측정 시약, 전극, 센서 또는 키트를 제공한다. 해당 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트는 환원형 화합물의 측정용 시약, 과산화 수소의 측정용 시약, 완충제, 계면활성제, 염류, 방부제 등을 포함할 수 있다. 또한, 용해 보조제, 안정화제, 반응성 향상제, 당화해모글로빈 변성제, 환원제, 소혈청 알부민, 당류(글리세린, 유당, 수크로오스 등) 등을 첨가해도 된다. 해당 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트는 필요에 따라 그 외의 공지된 안정화제나 협잡 물질의 소거제 등을 추가할 수 있다. 종래의 각종 시약, 전극, 센서나 키트에 이용되고 있는 기술을 적절히 개변하여 본 발명의 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트에 이용할 수 있다.
- [0373] 계면활성제로서는 비이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 예를 들면, 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 등을 들 수 있다.
- [0374] 비이온 계면활성제로서는 예를 들면, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, 지방산소르비탄에스테르, 알킬폴리글루코시드, 지방산디에탄올아미드, 알킬모노글리세릴에테르 등을 들 수 있다.
- [0375] 양이온성 계면활성제로서는 예를 들면, 알킬트리메틸암모늄염, 디알킬디메틸암모늄염, 알킬벤질디메틸암모늄염, 피리디늄염, 예를 들면 알킬피리디늄염, 포스포늄염, 예를 들면 알킬포스포늄염, 이미다졸륨염, 예를 들면 알킬이미다졸륨염, 이소퀴노늄염, 예를 들면 알킬이소퀴노늄염 등을 들 수 있다.

- [0376] 과산화수소의 측정용 시약은 퍼옥시다아제 및/또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 발색 기질로서는 4-아미노안티피린 외에, 예를 들면 ADOS(N-에틸-N-(2-히드록시-3-술포프로필)-m-아니시딘), ALOS(N-에틸-N-(2-히드록시-3-술포프로필)아닐린), TOOS(N-에틸-N-(2-히드록시-3-술포프로필)-m-톨루이딘나트륨), DA-67(10-(카르복시-메틸아미노카르보닐)-3, 7-비스(디메틸아미노)-페노시아진), DA-64(N-(카르복시-메틸아미노카르보닐)-4,4'-비스(디메틸아미노)-디페닐아민) 등을 들 수 있다.
- [0377] (글루타민산의 측정 방법)
- [0378] 어느 실시 형태에서 본 발명은 글루타민산의 측정 방법을 제공한다. 글루타민산 측정은 정성적 또는 정량적인 방법일 수 있다. 정량법은 글루타민산을 포함한 시료와 본 발명의 GLOD를 접촉시키는 공정, 및 반응 생성물 또는 소비물을 측정하는 공정을 포함할 수 있다. 해당 정량법에서 말하는 접촉이란 GLOD가 글루타민산의 산화 반응을 촉매할 수 있도록 해당 효소와 시료를 물리적으로 하나로 하는 모든 형태를 포함하고, 예를 들면 용액 중에서 유리된 효소와 글루타민산을 혼합하는 경우뿐 아니라, 고상(固相) 담체에 담지된 효소에 글루타민산을 포함한 용액 시료를 첨가 또는 적하하는 양상도 포함한다.
- [0379] 측정에 이용하는 시료(샘플)는 글루타민산을 포함할 가능성이 있는 모든 시료로 할 수 있다. 시료는 적절히 가공 처리된 것일 수 있다.
- [0380] 이용하는 효소량 및 반응 시간을 일정하게 하여 첨가하는 글루타민산의 양을 변화시킨 경우에 글루타민산 첨가량이 감소함에 따라 검출되는 발색 기질의 흡광도도 비례적으로 감소하는 글루타민산 농도 범위를 조사함으로써 해당 GLOD를 이용한 경우에 검출 가능한 최저 글루타민산 농도(검출 한계 농도)를 결정할 수 있다. 검출 한계가 측정 시료중 또는 혈중의 글루타민산 농도보다 낮아지도록 효소량 및 반응 시간을 설정할 수 있다.
- [0381] 정량적 측정에서는 미리 농도 기준의 글루타민산을 포함한 대조의 흡광도 등의 측정치로부터 최소 이송법 등의 회귀 분석을 실시함으로써 검량선을 작성해둘 수도 있다. 작성한 검량선에 대해 글루타민산 농도가 미지인 시료의 측정치를 플로팅함으로써 해당 시료중의 글루타민산 농도를 정량할 수 있다.
- [0382] 글루타민산을 포함한 시료에 GLOD를 작용시키는 시간은 예를 들면 5초 이상, 10초 이상, 20초 이상, 30초 이상, 1분 이상, 60분 미만, 30분 미만, 10분 미만, 예를 들면 5분 미만, 예를 들면 0.5분 이상 ~ 60분 미만, 1분 이상 ~ 30분 미만, 1분 이상 ~ 20분 미만, 예를 들면 1분 이상 ~ 10분 미만, 예를 들면 1분 이상 ~ 5분 미만으로 할 수 있다. 작용 온도는 이용하는 효소의 지적(至適) 온도에도 따르지만, 예를 들면, 20 ~ 45℃이며, 통상의 효소 반응에 이용되는 온도를 적절히 선택할 수 있다.
- [0383] 사용하는 GLOD의 효소량은 시료 용액 중에 포함되는 기질의 양에도 따르지만, 예를 들면, 종료농도가 0.1 ~ 50U/ml, 예를 들면 0.2 ~ 10U/ml가 되도록 첨가할 수 있다. 작용시킬 때의 pH는 GLOD가 작용 가능한 pH, 예를 들면 지적pH를 고려하여 완충제를 이용하여 조정할 수 있다. 반응 pH는 예를 들면 3 ~ 11, 5 ~ 9, 예를 들면 6 ~ 8이다.
- [0384] 과산화수소의 측정은 과산화수소를 생성하는 공정과 동시에 실시할 수 있으며, GLOD의 작용시와 동시에 진행시킬 수 있다. 생성물 대신에 소비물을 측정해도 되고, 측정하는 소비물로서는 용존 산소를 들 수 있으며, 용존 산소계 등을 이용하여 반응액 중의 용존 산소량을 측정할 수 있다.
- [0385] (GLOD 활성의 측정 방법)
- [0386] 이하에 기질로서 글루타민산을 이용한 GLOD 활성의 측정 방법을 예시하지만, 측정 방법은 이에 한정되지는 않는다. 글루타민산은 시판되는 것일 수 있다. 본 명세서에서 특별히 언급이 없는 한 효소 역가는 글루타민산을 기질로 하여 30℃, pH7.4로 측정했을 때의, 1분간에 1μmol의 과산화수소를 생성하는 효소량을 1U로 정의한다.
- [0387] A: 활성 측정용 시약
- [0388] (시약 1) 250mM 인산칼륨버퍼 pH7.4
- [0389] (시약 2) 30mM 4-아미노안티피린(4-AA) 용액
- [0390] (시약 3) 15mM N-에틸-N-(2-히드록시-3-술포프로필)-3-메틸아닐린나트륨염(TOOS) 용액
- [0391] (시약 4) 300U/ml 서양고추냉이과산화효소(POD) 용액
- [0392] (시약 5) 300mM 글루타민산수소나트륨 용액

- [0393] B: 활성 측정법
- [0394] 300 μ l의 시약1, 12.5 μ l의 시약2, 25 μ l의 시약3, 12.5 μ l의 시약4, 탈이온수(375-V) μ l 및 V μ l의 GLOD 용액을 혼합하여 30℃에서 5분간 보온한다. 그 후, 시약5를 25 μ l 가해 잘 혼합한 후, 셀 홀더를 30℃로 보온한 분광 광도계 U-3900(히타치하이테크사이언스 제)을 사용하여 파장 555nm의 광의 흡광도(A_{555})를 측정하고, 1분당 A_{555} 변화량(ΔA_s)을 산출하였다. 아울러 대조 실험으로서 25 μ l의 시약5 대신에 탈이온수 25 μ l를 첨가하여 파장 555nm의 광의 흡광도(A_{555})를 측정하고, 1분당 A_{555} 변화량(ΔA_0)을 산출하였다.
- [0395] 옥시다아제 활성(U/ml)은 하기 계산식에 기초하여 산출할 수 있다. 식 중의 "39.2"는 4-AA와 TOOS가 축합되어 형성되는 퀴논이민 색소의, 파장 555nm의 광에 대한 밀리몰 흡광 계수($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 나타낸다.
- [0396] [식]
- [0397]
$$U/\text{ml} = (\Delta_s - \Delta A_0) \times 600 \times df / (39.2 \times 0.5 \times V)$$
- [0398]
$$= 30.6 \times (\Delta A_s - \Delta A_0) \times df / V$$
- [0399] 다른 발색 시약을 이용할 경우에는 해당 발색 시약에 따른 파장과 해당 파장에서의 밀리몰 흡광 계수를 사용할 수 있다.
- [0400] 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 글루타민산 옥시다아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 그러한 폴리뉴클레오티드를 가진 벡터를 제공한다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 그러한 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포, 즉 그러한 벡터를 포함한 숙주 세포를 제공한다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 그러한 숙주 세포를 배양하여 글루타민산 옥시다아제 변이체를 생산하는 공정, 및 생산된 글루타민산 옥시다아제 변이체를 취득하는 공정을 포함한다, 글루타민산 옥시다아제 변이체의 제조 방법을 제공한다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용은 글루타민산 옥시다아제 변이체 또는 이것을 포함한 조성물, 시약, 전극, 센서 또는 키트와 글루타민산을 포함한 시료를 접촉시켜 해당 시료에 포함되는 글루타민산을 산화시키는 방법을 제공한다. 일 실시 형태에서 이 방법은 글루타민산을 검출할 수 있다. 일 실시 형태에서 이 방법은 글루타민산을 측정할 수 있다.
- [0401] (새로운 GLOD의 제작 방법)
- [0402] 본 발명자는 GLOD에 특정 아미노산 서열 결실을 도입한 GLOD Δ 를 제작하였다. 또한, GLOD Δ 에 특정 아미노산 치환을 도입한 GLOD Δ 를 제작하였다. 본 발명의 결실 및 변이는 적절히 조합할 수 있다. 또 본 발명의 지견에 기초하여 새로운 변이체를 제작할 수도 있다. 따라서 어느 실시 형태에서 본 발명은 이하의 공정을 포함한다, GLOD 또는 GLOD Δ 를 개변하여 열안정성 향상형 GLOD 변이체를 제작하는 방법을 제공한다:
- [0403] (i) GLOD 유전자 또는 GLOD Δ 유전자를 취득한다,
- [0404] (ii) GLOD 유전자 또는 GLOD Δ 유전자를 벡터에 도입하여 숙주 세포를 형질 전환하고 GLOD 또는 GLOD Δ 를 발현시켜 발현 산물을 분리한다,
- [0405] (iii) 발현 산물의 활성을 확인한다,
- [0406] (iv) 발현 산물의 열처리 후의 잔존 활성을 측정한다,
- [0407] (v) GLOD 또는 GLOD Δ 의 아미노산 서열을 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열과 정렬했을 때에 서열 번호 1의 87위, 103위, 133위, 186위, 297위, 376위, 393위, 428위, 516위, 566위, 568위, 585위, 615위로 이루어진 군에서 선택되는 위치에 대응하는 위치의 아미노산을 치환하도록, 예를 들면 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 류신, 이소류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산에 치환하도록 상기 GLOD 유전자 또는 GLOD Δ 유전자를 개변한다,
- [0408] (vi) 개변 후의 유전자를 벡터에 집어넣어 숙주 세포를 형질 전환하고, 개변체를 발현시켜 발현 산물을 분리한다,
- [0409] (vii) 개변체의 발현 산물의 열처리 후의 잔존 활성을 측정하여 공정(iv)의 값과 비교한다,
- [0410] (viii) 개변 전의 GLOD 혹은 GLOD Δ 의 열처리 후의 잔존 활성과 비교하여 개변 후의 개변체의 열처리 후의 잔존 활성이 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 또는 10% 이상 증대되어 있는 경우, 해당 개변체를 열안정성 향상형 GLOD 변이체로

한다,

[0411] (ix) 필요에 따라 공정(viii)의 개변체에 대해 공정(v) ~ (vii)를 반복한다, 및

[0412] (x) 공정(viii) 또는 (ix)의 열안정성 향상형 GLOD 변이체를 키트 또는 조성물에 배합한다.

[0413] 특정 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T에 대해 아미노산 서열을 결실시킨 영역에 펩티드 링커를 삽입할 수 있다. 펩티드 링커는 예를 들면 1 ~ 20개의 아미노산잔기로 구성되는 링커일 수 있다. 펩티드 링커는 GLOD의 부분 아미노산 서열과 다른 아미노산 서열로 구성될 수 있다. 펩티드 링커는 예를 들면 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 아미노산잔기로 구성될 수 있다. 펩티드 링커는 예를 들면 2-19, 3-18, 4-17, 5 ~ 16, 6-15, 예를 들면 7-14의 아미노산잔기로 구성될 수 있다. 펩티드 링커를 구성하는 아미노산잔기는 천연 아미노산 및 글리신일 수 있다. 예를 들면, Ala, Asn, Cys, Gln, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, Asp, Glu, Arg, His 및 Lys를 들 수 있다. 예를 들면 Gly, Ala, Ser, 및 Thr을 들 수 있다. 어느 실시 형태에서 펩티드 링커는 GGGGS 또는 그 반복 서열일 수 있다. 반복 회수는 2, 3, 4회일 수 있다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T는 펩티드 링커를 가지지 않는다.

[0414] 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T는 서열 번호 1과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다. 결실(Δ)이 있는 경우에는 이것을 서열 동일성의 계산에 포함하지 않는 것으로 한다. 다른 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T로부터 서열 번호 1과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진 서열은 제외된다.

[0415] 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T는 서열 번호 58과 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진다. 결실(Δ)이 있는 경우에는 이것을 서열 동일성의 계산에 포함시키지 않는 것으로 한다. 다른 실시 형태에서 본 발명의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T로부터 서열 번호 58와 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진 서열은 제외된다. 어느 실시 형태에서 본 개시내용의 GLOD 변이체, 예를 들면 GLOD Δ 또는 GLOD Δ -T로부터, 공지의 GLOD나 공지의 GLOD 변이체는 제외된다.

[0416] 서열 번호 1의 459위 ~ 507위를 결실시킨 변이체에서는 아미노산의 넘버링이 어긋난다. 서열 번호 1의 516위에 대응하는 위치는 결실 변이체에서는 N 말단에서부터 세어 467번째 위치가 된다. 서열 번호 1의 566위에 대응하는 위치는 결실 변이체에서는 N 말단에서부터 세어 517번째 위치가 된다. 서열 번호 1의 568위에 대응하는 위치는 결실 변이체에서는 N 말단에서부터 세어 519번째의 위치가 된다. 서열 번호 1의 585위에 대응하는 위치는 결실 변이체에서는 N 말단에서부터 세어 536번째의 위치가 된다. 서열 번호 1의 615위에 대응하는 위치는 결실 변이체에서는 N 말단에서부터 세어 566번째의 위치가 된다.

[0417] [실시예]

[0418] 본 발명의 GLOD를 이하의 실시예에 의해 더 예증하기로 한다. 단, 이것은 어디까지나 예증 목적이며, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0419] [실시예 1] 아미노산 서열의 결실에 의한, *Streptomyces* sp. X-119-6 유래의 글루타민산 옥시다아제(StGLOD)의 내열성 향상

[0420] 1. 글루타민산 옥시다아제(GLOD) 발현용 플라스미드의 구축

[0421] 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가진 *Streptomyces* sp. X-119-6 유래의 글루타민산 옥시다아제(StGLOD)의 발현용 플라스미드(pKK223-3-StGLOD)는 NEBuilder HiFi DNA 어셈블리(New England Biolabs사 제)를 사용하여 제작하였다.

[0422] 서열 번호 2의 염기 서열을 가진 StGLOD 유전자는 서열 번호 3(StGLOD-f1), 서열 번호 4(StGLOD-f2) 및 서열 번호 5(StGLOD-f3)의 3단편으로 분할하여 Integrated DNA Technologies사에 합성 위탁하였다. StGLOD-f1의 3' 말단측의 15염기와 StGLOD-f2의 5' 말단측의 15염기는 유전자를 어셈블리하기 위한 중복 서열이다. StGLOD-f2의 3' 말단측의 15염기와 StGLOD-f3의 5' 말단측의 15염기는 유전자를 어셈블리하기 위한 중복 서열이다.

[0423] 플라스미드 단편은 주형으로서 pKK223 플라스미드를 사용하고, 서열 번호 6(gggtcatcttcattcatgaattctgtttcctgtgtgaaattg) 및 서열 번호 7(gcgttaacttcttaagcttggtgttttggcggatgag)의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 조제하였다. 서열 번호 6 혹은 서열 번호 7 프라이머에는 pKK223-3과 어닐링되는 서열의 5' 말단측에 각각 StGLOD-f1 혹은 StGLOD-f3와 중복되는 15염기 서열이 부가되어 있다. PCR 후의 용액

에 DpnI(New England BioLabs 제)를 1.0 μ l 첨가하여 37℃에서 1시간 처리한 후, GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Cytiva제)를 이용하여 증폭한 단편을 정제하였다.

[0424] 하기 표의 조성으로 50℃ 60분간 반응시켜 StGLOD의 발현용 플라스미드(pKK223-3-StGLOD)를 얻었다. 얻어진 플라스미드로 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적한 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

표 5

[0425]	시료	용량
	NEBuilder HiFi DNA 어셈블리	10.0 μ l
	32ng/ μ l pKK223-3 단편	3.1 μ l
	40ng/ μ l StGLOD-f1	2.3 μ l
	40ng/ μ l StGLOD-f2	2.3 μ l
	40ng/ μ l StGLOD-f3	2.3 μ l
	합계용량	20.0 μ l

[0426] 2. StGLOD 결실 변이체의 제작

[0427] pKK223-3-StGLOD를 주형으로 하여 부위 특이적 변이를 도입하여 StGLOD 결실 변이체를 코딩하는 유전자를 보존 유지하는 플라스미드를 얻었다. PCR의 반응액은 KOD one PCR Master Mix(도요보 제)를 10 μ l, 2 μ M의 Fw프라이머를 3 μ l, 2 μ M의 Rv프라이머를 3 μ l, 40 μ g/ml의 주형 DNA(pKK223-3-StGLOD)를 0.5 μ l, 이온 교환수를 3.5 μ l 혼합하여 조제하였다. 서열 번호 8(gataagaccgaagcgaccaatgcgtacgga) 및 서열 번호 9(cagcttacgataatagtcgtacagaccg)의 프라이머를 이용하여 제작한 결실 변이체를 StGLOD Δ 49Ai, 서열 번호 10(gcagagccacctgacgaatgcgtacgga) 및 서열 번호 11(cgcatcttgataatagtcgtacagaccg)의 프라이머를 이용하여 제작한 결실 변이체를 StGLOD Δ 49C라고 명명하였다. StGLOD Δ 49Ai 또는 StGLOD Δ 49C의 아미노산 서열은 각각 서열 번호 12 또는 서열 번호 13으로 나타냈다. PCR의 반응 조건은 "98℃ 10초 → 55℃ 5초 → 68℃ 35초"의 사이클을 7회 반복하였다.

[0428] PCR 후의 용액에 DpnI를 1 μ l 첨가하여 37℃에서 1시간 처리하여 주형인 pKK223-3-StGLOD를 분해시켰다. 얻어진 DpnI 처리 용액 2 μ l를, 5 μ l의 Ligation High Ver.2(도요보 제), 1 μ l의 5U/ μ l T4 polynucleotide kinase, 7 μ l의 이온 교환수와 혼합하여 16℃에서 1시간 반응시킨 후, 그 반응액을 이용하여 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적한 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

[0429] PCR 후의 용액에 DpnI를 1 μ l 첨가하여 37℃에서 1시간 처리하여 주형인 pKK223-3-StGLOD Δ 49C를 분해시켰다. 얻어진 DpnI 처리 용액을 이용하여 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적한 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

[0430] 3. GLOD의 재조합 생산

[0431] GLOD 생산주를 시험관에 투입한 LB-amp 배지(암피실린 농도 50 μ g/ml) 2.5ml로 접종하여 37℃, 160rpm으로 하룻밤 중(種)배양하였다. 종배양액 2.5ml를 진탕 플라스크에 투입한 0.1mM IPTG를 포함한 LB-amp 배지(암피실린 농도 50 μ g/ml) 250ml에 접종하여 25℃, 130rpm으로 16시간 배양하였다.

[0432] 배양액을 8,000rpm으로 10분간 원심하여 얻은 펠릿을 4ml의 10mM 인산칼륨 버퍼(PPB) pH7.5로 재현탁하였다. 균체 현탁액을 초음파 파쇄한 후, 15,000rpm으로 15분간 원심하여 얻은 상청을 회수하여 GLOD 조효소액으로 하였다.

[0433] 4. GLOD 활성의 측정

[0434] GLOD의 활성 측정 시약에는 4-아미노안티피린(4-AA)(후지필름와코순약 제), TOOS(도진화학연구소 제), 서양고추냉이과산화효소(POD)(도요보 제)를 이용하였다. 활성 측정 시약 조성을 표 2에 나타냈다. GLOD 용액의 회석에는 0.15%의 소혈청알부민(BSA, Sigma-Aldrich 제)을 포함한 10mM PPB(pH7.4)를 이용하였다.

표 6

시료	용량	최종농도
250mM PPB pH7.4	300 μ l	100mM
30mM 4-AA	12.5 μ l	0.5mM
15mM TOOS	25 μ l	0.5mM
300U/ml POD	12.5 μ l	5U/ml
탈이온수	(375-V) μ l	
GLOD용액	V μ l	
합계용량	725 μ l	

상기 표의 시약 725 μ l를 30℃에서 5분간 보온한 후, 300mM 글루타민산 수소 나트륨(GluNa, 후지필름와코순약제) 용액 25 μ l를 첨가하여 혼합하고, 셀 홀더를 30℃로 보온한 분광 광도계 U-3900(히타치하이테크사이언스제)을 사용하여 파장 555nm의 광의 흡광도(A_{555})를 측정하고 1분당 A_{555} 변화량(ΔA_s)을 산출하였다. 기질 용액(GluNa 용액) 대신에 이온 교환수 25 μ l를 첨가한 측정도 실시하여 1분당 A_{555} 변화량(ΔA_0)을 산출하였다.

옥시다아제 활성(U/ml)은 하기 계산식에 기초하여 산출하였다. 식 중의 "39.2"는 4-AA와 TOOS가 축합되어 형성되는 퀴논이민 색소의, 파장 555 nm의 광에 대한 밀리몰 흡광 계수($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)를 나타낸다.

[식]

$$U/\text{ml} = (\Delta A_s - \Delta A_0) \times 600 \times df / (39.2 \times 0.5 \times V)$$

$$= 30.6 \times (\Delta A_s - \Delta A_0) \times df / V$$

5. GLOD의 열안정성의 평가

GLOD의 종료농도가 0.05U/ml가 되도록 GLOD 조효소액을 10mM PPB pH6.0으로 희석하였다. 계속해서 240 μ l의 0.05U/ml의 GLOD 용액과 160 μ l의 250mM PPB pH6.0을 혼합하고, 소정 온도로 보온한 세정 중에 30분간 혹은 35분간 가열하였다. 가열 후에는 신속하게 얼음 위에서 GLOD 용액을 냉각하고 GLOD 용액 375 μ l를 사용하여 활성을 측정하였다. 가열하지 않고 얼음 위에서 냉각시킨 시료의 활성을 1로 하여 가열 후의 시료의 잔존 활성(Residual activity)를 산출하였다. 각 GLOD에 대해 잔존 활성을 3회 산출하고, 그 평균값으로 열안정성을 평가하였다.

45℃ 30분간 가열 후의, StGLOD 결실 변이체의 잔존 활성을 표 3에 나타냈다.

표 7

변이체명	잔존활성
StGLOD	0.57
StGLOD Δ 49Ai	0.68
StGLOD Δ 49C	0.94

상기 표에 나타낸 StGLOD 결실 변이체의 잔존 활성은 StGLOD와 비교하여 0.11 ~ 0.37 증가하고, StGLOD 결실 변이체는 모두 열안정성이 향상되었다. 달리 말하면, 잔존 활성은 야생형과 비교하여 약 20% 및 약 65% 향상되었다.

[실시에 2] 아미노산 치환에 의한 StGLOD Δ 49C의 내열성 향상

6. 개변형 StGLOD Δ 49C의 제작

StGLOD Δ 49C의 발현과 잔존 활성을 확인할 수 있었다. 그래서 StGLOD Δ 49C에 기초한 개변형 변이체를 더 제작하였다.

StGLOD Δ 49C 발현용 플라스미드(pKK223-3-StGLOD Δ 49C)를 주형으로 하여 부위 특이적 변이를 도입하고, 개변형 StGLOD를 코딩하는 유전자를 보존 유지하는 플라스미드를 얻었다. PCR의 반응액은 KOD one PCR Master Mix(도요보제)를 10 μ l, 2 μ M의 Fw프라이머를 3 μ l, 2 μ M의 Rv프라이머를 3 μ l, 40 μ g/ml의 주형 DNA(pKK223-3-

StGLOD)를 0.5 μ l, 이온 교환수를 3.5 μ l 혼합하여 조제하였다. 제작한 변이체명과 Fw프라이머, Rv프라이머의 조합은 표 4에 나타냈다. PCR의 반응 조건은 "98℃ 10초 → 55℃ 5초 → 68℃ 35초"의 사이클을 15회 반복하였다. 다중 변이형 StGLOD Δ 49C의 발현용 플라스미드는 단변이 도입을 반복하여 구축하였다. 예를 들면, pKK223-3-StGLOD Δ 49C/F87Y를 주형으로 하여 서열 번호 20 및 서열 번호 16의 프라이머를 이용하여 PCR을 실시함으로써 이중 변이형인 StGLOD Δ 49C/F87Y/Y103I의 발현용 플라스미드를 구축하였다.

표 8

[0450]

변이체명	Fw프라이머	Rv프라이머
StGLOD Δ 49C/F87Y	cgtatcaagacgtaccatgcaaaaaagga (서열번호15)	cgtcttgatacgccctcccacacggttggc (서열번호14)
StGLOD Δ 49C/Y103F	gatccagcgcagttcgcggaagctggggcg (서열번호17)	ctgcgctggatcagcgaatggagatggctc (서열번호16)
StGLOD Δ 49C/Y103L	gatccagcgcagttagcggaagctggggcg (서열번호18)	ctgcgctggatcagcgaatggagatggctc (서열번호16)
StGLOD Δ 49C/Y103V	gatccagcgcaggtcgcggaagctggggcg (서열번호19)	ctgcgctggatcagcgaatggagatggctc (서열번호16)
StGLOD Δ 49C/Y103I	gatccagcgcagatcgcggaagctggggcg (서열번호20)	ctgcgctggatcagcgaatggagatggctc (서열번호16)
StGLOD Δ 49C/Y103M	gatccagcgcagatggcggaagctggggcg (서열번호21)	ctgcgctggatcagcgaatggagatggctc (서열번호16)
StGLOD Δ 49C/F133Y	cgccgcctgttttataatgtagatatgtac (서열번호23)	aaacaggcggcggttttaagcccagcttgctc (서열번호22)
StGLOD Δ 49C/F133L	cgccgcctgtttttaaattgtagatatgtac (서열번호24)	aaacaggcggcggttttaagcccagcttgctc (서열번호22)
StGLOD Δ 49C/F297L	caccttgccctttttacattcgtttttgggc (서열번호26)	aaaggcaaggtgcaggcgcgaggtcatgtt (서열번호25)
StGLOD Δ 49C/F297V	caccttgccctttgttcattcgtttttgggc (서열번호27)	aaaggcaaggtgcaggcgcgaggtcatgtt (서열번호25)
StGLOD Δ 49C/F297I	caccttgccctttattcattcgtttttgggc (서열번호28)	aaaggcaaggtgcaggcgcgaggtcatgtt (서열번호25)
StGLOD Δ 49C/F297M	caccttgccctttatgcattcgtttttgggc (서열번호29)	aaaggcaaggtgcaggcgcgaggtcatgtt (서열번호25)
StGLOD Δ 49C/Y376F	gaggagagccctttcgccgcaactcaaacg (서열번호31)	aggctctccctctggaaccgtctgaatggc (서열번호30)
StGLOD Δ 49C/Y376L	gaggagagccctttagccgcaactcaaacg (서열번호32)	aggctctccctctggaaccgtctgaatggc (서열번호30)
StGLOD Δ 49C/Y376I	gaggagagccctatcgccgcaactcaaacg (서열번호33)	aggctctccctctggaaccgtctgaatggc (서열번호30)
StGLOD Δ 49C/Y376M	gaggagagccctatggccgcaactcaaacg (서열번호34)	aggctctccctctggaaccgtctgaatggc (서열번호30)
StGLOD Δ 49C/F393L	gttactatcccccttaagctctttacgttt (서열번호36)	ggggatagtaacaatcgccaggtctcctgt (서열번호35)
StGLOD Δ 49C/F393V	gttactatccccgttagctctttacgttt (서열번호37)	ggggatagtaacaatcgccaggtctcctgt (서열번호35)
StGLOD Δ 49C/F393I	gttactatccccattagctctttacgttt (서열번호38)	ggggatagtaacaatcgccaggtctcctgt (서열번호35)
StGLOD Δ 49C/F393M	gttactatccccatgagctctttacgttt (서열번호39)	ggggatagtaacaatcgccaggtctcctgt (서열번호35)
StGLOD Δ 49C/F428Y	gtcttacttgaatatagccgtcgttggtgg (서열번호41)	ttcaagtaagactttggtggcctgatcata (서열번호40)
StGLOD Δ 49C/F428M	gtcttacttgaatgagccgtcgttggtgg (서열번호42)	ttcaagtaagactttggtggcctgatcata (서열번호40)
StGLOD Δ 49C/Y467F	gcgaccaatgcgttcggaggggtagtacg (서열번호44)	cgcattggtcgcaggtggctctgccgcatc (서열번호43)
StGLOD Δ 49C/Y517F	gatgctgagcgctttggctatgcgcttgaa (서열번호46)	gcgctcagcatcgtaaaagaatcccaacg (서열번호45)
StGLOD Δ 49C/Y517L	gatgctgagcgcttaggctatgcgcttgaa (서열번호47)	gcgctcagcatcgtaaaagaatcccaacg (서열번호45)
StGLOD Δ 49C/Y517V	gatgctgagcgcttggtatgcgcttgaa (서열번호48)	gcgctcagcatcgtaaaagaatcccaacg (서열번호45)
StGLOD Δ 49C/Y517M	gatgctgagcgcatgggctatgcgcttgaa (서열번호49)	gcgctcagcatcgtaaaagaatcccaacg (서열번호45)

StGLOD Δ 49C/Y519I	gagcgctatggcattgctgttgaactta (서열번호51)	gccatagcgctcagcatcgtaaaagaatc (서열번호50)
StGLOD Δ 49C/Y519M	gagcgctatggcatggcgttgaactta (서열번호52)	gccatagcgctcagcatcgtaaaagaatc (서열번호50)
StGLOD Δ 49C/Y536L	attgaggtgttcttaacaggagcgggacag (서열번호54)	gaacacctcaatacgacggcgtggacaga (서열번호53)
StGLOD Δ 49C/Y536M	attgaggtgttcatgacaggagcgggacag (서열번호55)	gaacacctcaatacgacggcgtggacaga (서열번호53)
StGLOD Δ 49C/F566L	caaatgaccgcgttacacttagatgtggtg (서열번호57)	cgcggtcatttgatggggttatagacagc (서열번호56)

[0451] 제작한 변이체의 PCR, GLOD의 제조합 생산, 활성의 측정 및 열안정성의 평가는 모두 상기 StGLOD Δ 49C와 동일하게 실시하였다. 50℃ 35분간 가열 후의, 개변형 StGLOD Δ 49C의 잔존 활성을 하기 표에 나타냈다.

표 9

변이체명	잔존활성
StGLOD Δ 49C	0.22
StGLOD Δ 49C/F87Y	0.61
StGLOD Δ 49C/Y103F	0.26
StGLOD Δ 49C/Y103L	0.36
StGLOD Δ 49C/Y103V	0.33
StGLOD Δ 49C/Y103I	0.32
StGLOD Δ 49C/Y103M	0.32
StGLOD Δ 49C/F133Y	0.37
StGLOD Δ 49C/F133L	0.24
StGLOD Δ 49C/F297L	0.59
StGLOD Δ 49C/F297V	0.53
StGLOD Δ 49C/F297I	0.75
StGLOD Δ 49C/F297M	0.74
StGLOD Δ 49C/Y376F	0.27
StGLOD Δ 49C/Y376L	0.28
StGLOD Δ 49C/Y376I	0.25
StGLOD Δ 49C/Y376M	0.27
StGLOD Δ 49C/F393L	0.55
StGLOD Δ 49C/F393V	0.26
StGLOD Δ 49C/F393I	0.25
StGLOD Δ 49C/F393M	0.24
StGLOD Δ 49C/F428Y	0.79
StGLOD Δ 49C/F428M	0.29
StGLOD Δ 49C/Y467F	0.25
StGLOD Δ 49C/Y517F	0.92
StGLOD Δ 49C/Y517L	0.74
StGLOD Δ 49C/Y517V	0.94
StGLOD Δ 49C/Y517M	0.87
StGLOD Δ 49C/Y519I	0.31
StGLOD Δ 49C/Y519M	0.26
StGLOD Δ 49C/Y536L	0.51
StGLOD Δ 49C/Y536M	0.25
StGLOD Δ 49C/F566L	0.43

[0453] 상기 표에 나타난 개변형 StGLOD Δ 49C의 잔존 활성은 StGLOD Δ 49C와 비교하여 0.02 ~ 0.72 증가하였으며, 개변형 StGLOD Δ 49C는 모두 열안정성이 향상되었다. 다르게 표현하면 제작한 개변형 효소의 잔존 활성은 개변 전의 StGLOD Δ 49C와 비교하여 약 9% 이상 ~ 약 325% 이상 향상되었다.

[0454] StGLOD Δ 49C의 열안정성 향상에 기여한 8종류의 아미노산 치환(F87Y, Y103I, F133Y, F297M, F393L, F428Y, Y517F, Y536L)을 조합한 8중 변이체를 제작하고, 표 9보다 가혹한 열처리 조건(60℃, 65℃ 또는 70℃에서 35분

간)으로 가열한 후의, StGLOD 결실 변이체의 잔존 활성을 하기 표에 나타냈다.

표 10

[0455]

열처리조건	잔존활성
60℃, 35분	0.90
65℃, 35분	0.78
70℃, 35분	0.36

[0456]

상기 표에 나타난 StGLOD Δ49C의 8중 변이체는 60℃에서 35분간 가열해도 안정되어 있으며, 70℃에서 35분간 가열해도 1/3 이상의 활성이 잔존하였다. 표 9에 나타난 아미노산 치환을 조합함으로써 StGLOD Δ49C의 열안정성이 비약적으로 향상된다는 것이 분명해졌다.

[0457]

[실시에 3] 열안정성 향상형 StGLOD 동족체(homolog)의 취득

[0458]

7. 열안정성 향상 변이를 가진 StGLOD 동족체의 발현용 플라스미드의 구축

[0459]

서열 번호 58의 아미노산 서열을 가진 Streptomyces sp. MOE7 유래의 추정 글루타민산 옥시다아제(M7GLOD)를 StGLOD Δ49C와 동일하게 결실시킨 아미노산 서열(M7GLOD Δ49C-T8, 서열 번호 59)을 디자인하고, 또한 8종류의 아미노산 치환(F87Y, Y103I, F133Y, F297M, F393L, F428Y, Y517F, Y536L)을 도입한 아미노산 서열(M7GLOD Δ49C-T8, 서열 번호 60)을 디자인하였다.

[0460]

M7GLOD Δ49C-T8 발현용 플라스미드(pET22b-M7GLOD Δ49C-T8)는 In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech사 제)를 사용하여 제작하였다. 서열 번호 61의 염기 서열을 가진 M7GLOD Δ49C-T8 유전자는 서열 번호 62(M7GLOD Δ49C-T8-f1), 서열 번호 63(M7GLOD Δ49C-T8-f2) 및 서열 번호 64(M7GLOD Δ49C-T8-f3)의 3단편으로 분할하여 Integrated DNA Technologies사에 합성 위탁하였다. M7GLOD Δ49C-T8-f1의 5'말단측의 15염기는 pET-22b(+)에 어셈블리하기 위한 중복 서열이다. M7GLOD Δ49C-T8-f1의 3'말단측의 15염기와 M7GLOD Δ49C-T8-f2의 5'말단측의 15염기는 유전자를 어셈블리하기 위한 중복 서열이다. M7GLOD Δ49C-T8-f2의 3'말단측의 15염기와 M7GLOD Δ49C-T8-f3의 5'말단측의 15염기는 유전자를 어셈블리하기 위한 중복 서열이다. M7GLOD Δ49C-T8-f3의 3'말단측의 15염기는 pET-22b(+)에 어셈블리하기 위한 중복 서열이다.

[0461]

플라스미드 단편은 주형으로서 pET-22b(+) 플라스미드를 사용하고, 서열 번호 65(catatgtatatctccttcttaaag) 및 서열 번호 66(taacaagcccgaaaggaag)의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 조제하였다. PCR 후의 용액에 DpnI(New England BioLabs제)를 1.0 μl 첨가하여 37℃에서 1시간 처리한 후, GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit(Cytiva 제)를 이용하여 증폭한 단편을 정제하였다.

[0462]

하기 표의 조성으로 50℃ 15분간 반응을 실시하여 M7GLOD Δ49C-T8 발현용 플라스미드(pET22b-M7GLOD Δ49C-T8)를 얻었다. 얻어진 플라스미드로 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적한 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다. 그 후, pET22b-M7GLOD Δ49C-T8으로 E.coli BL21(DE3)주를 형질 전환하여 M7GLOD Δ49C-T8의 생산주를 제작하였다.

표 11

[0463]

시료	용량
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μl
50ng/ μl pET-22b(+) 단편	2 μl
10ng/ μl M7GLOD Δ49C-T8-f1	2 μl
10ng/ μl M7GLOD Δ49C-T8-f2	2 μl
10ng/ μl M7GLOD Δ49C-T8-f3	2 μl
합계용량	10 μl

[0464]

pET22b-M7GLOD Δ49C-T8을 주형으로 하여 서열 번호 67(atcgaggtctttatactggagctggacaa) 및 서열 번호 68(aaagacctcgatgcggcgccatggaccga)의 프라이머를 사용하여, "6. 개변형 StGLOD Δ49C의 제작"에 기재된 방법에 따라 Y536L의 아미노산 치환을 포함하지 않은 M7GLOD Δ49C-T8을 코딩하는 유전자를 유지하는 플라스미드(pET22b-M7GLOD Δ49C-T7)를 얻었다. Y536L의 아미노산 치환을 포함하지 않은 M7GLOD Δ49C-T8을 M7GLOD Δ49C-T7(서열 번호 69)으로 칭한다.

[0465] pET22b-M7GLOD Δ 49C-T7을 주형으로 하고 표 12의 프라이머를 이용하여 "6. 개변형 StGLOD Δ 49C의 제작"과 동일한 방법으로 각종 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7의 발현용 플라스미드를 구축하였다. 제작한 변이체명과 Fw프라이머, Rv프라이머의 조합은 표 12에 나타났다.

표 12

변이체명	Fw프라이머	Rv프라이머
M7GLOD Δ 49C-T7/R186G	attcgtaccaatggcactcaagtacgtcgc (서열번호71)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186A	attcgtaccaatgcgactcaagtacgtcgc (서열번호72)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186C	attcgtaccaattgcactcaagtacgtcgc (서열번호73)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186L	attcgtaccaatctgactcaagtacgtcgc (서열번호74)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186M	attcgtaccaatatgactcaagtacgtcgc (서열번호75)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186F	attcgtaccaattttactcaagtacgtcgc (서열번호76)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186Y	attcgtaccaattatactcaagtacgtcgc (서열번호77)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186S	attcgtaccaatagcactcaagtacgtcgc (서열번호78)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186T	attcgtaccaataccactcaagtacgtcgc (서열번호79)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186N	attcgtaccaataacactcaagtacgtcgc (서열번호80)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186Q	attcgtaccaatcagactcaagtacgtcgc (서열번호81)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186H	attcgtaccaatcatactcaagtacgtcgc (서열번호82)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186D	attcgtaccaatgatactcaagtacgtcgc (서열번호83)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)
M7GLOD Δ 49C-T7/R186E	attcgtaccaatgaaactcaagtacgtcgc (서열번호84)	attggtacgaatccaagtgtggttacg (서열번호70)

[0467] 계속해서 pET22b-M7GLOD Δ 49C-T7 혹은 각종 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7의 발현용 플라스미드로 E.coli BL21(DE3)주를 형질 전환하여 M7GLOD Δ 49C-T7 및 각종 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7의 생산주를 제작하였다.

[0468] 8. M7GLOD Δ 49C-T7의 재조합 생산 및 열안정성 평가

[0469] M7GLOD Δ 49C-T7 및 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7 생산주를 시험관에 투입한 LB-amp 배지(암피실린 농도 50 μg/ml) 2.5ml에 접종하여 37℃, 180rpm으로 하룻밤 종배양하였다. 종배양액 2.5ml를 진탕 플라스크에 투입한 LB-amp 배지(암피실린 농도 100 μg/ml) 250ml에 접종하여 37℃, 130rpm으로 배양하고 배양액의 Od600이 0.6 ~ 1.0에 도달한 단계에서 이소프로필-β-D-싸이오갈락토포라노사이드(IPTG)를 종농도 1mM 혹은 0.1mM가 되도록 더해 15℃, 130rpm으로 16시간 배양하였다.

[0470] 배양액을 8,000rpm으로 10분간 원심하여 얻은 펠릿을 4 ~ 25ml의 10mM 인산칼륨 버퍼(PPB) pH6.0으로 재현탁하였다. 균체 현탁액을 초음파 파쇄한 후, 15,000rpm으로 15분간 원심하여 얻은 상청을 회수하여 M7GLOD Δ 49C-T7 및 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7 조효소액으로 하였다.

[0471] M7GLOD Δ 49C-T7 및 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7을 70℃에서 30분간 가열하고, 상술한 방법에 따라 그 잔존 활성을 산출하였다(표 13). M7GLOD Δ 49C-T7은 60℃ 또는 65℃에서도 30분간 가열하여 그 잔존 활성을 산출하였다.

[0472] M7GLOD Δ 49C-T7은 60℃에서 30분간 가열 후의 잔존 활성이 0.93, 65℃에서 30분간 가열 후의 잔존 활성이 0.69로서 높은 열안정성을 나타냈다. 표 9에 나타낸 아미노산 치환을 조합함으로써 StGLOD로 한정되지 않아 GLOD의 열안정성이 향상된다는 것이 실증되었다.

표 13

[0473]

변이체명	70℃ 30분 처리후 잔존활성
M7GLOD Δ 49C-T7	0.17
M7GLOD Δ 49C-T7/R186G	0.33
M7GLOD Δ 49C-T7/R186A	0.43
M7GLOD Δ 49C-T7/R186C	0.26
M7GLOD Δ 49C-T7/R186L	0.29
M7GLOD Δ 49C-T7/R186M	0.29
M7GLOD Δ 49C-T7/R186F	0.22
M7GLOD Δ 49C-T7/R186Y	0.56
M7GLOD Δ 49C-T7/R186S	0.37
M7GLOD Δ 49C-T7/R186T	0.25
M7GLOD Δ 49C-T7/R186N	0.54
M7GLOD Δ 49C-T7/R186Q	0.54
M7GLOD Δ 49C-T7/R186H	0.34
M7GLOD Δ 49C-T7/R186D	0.66
M7GLOD Δ 49C-T7/R186E	0.75

[0474]

또한 각종 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7의 잔존 활성은 M7GLOD Δ 49C-T7과 비교하여 0.05 ~ 0.58 증가하였으며, 개변형 M7GLOD Δ 49C-T7은 모두 열안정성이 향상되었다. 다시 말하면 제작한 개변형 효소의 잔존 활성은 개변 전의 M7GLOD Δ 49C-T7과 비교하여 약 29% ~ 약 341% 향상되었다.

[0475]

[실시예 4] M7GLOD-T8을 대상으로 한, 결실에 의한 열안정성 향상 효과의 검증

[0476]

9. M7GLOD 발현용 플라스미드의 구축

[0477]

M7GLOD(서열 번호 58)의 발현용 플라스미드(pET22b-M7GLOD)는 "7. 열안정성 향상 변이를 가진 StGLOD 동족체의 발현용 플라스미드의 구축"과 동일한 방법으로 제작하였다. M7GLOD 유전자(서열 번호 85)를 포함한 DNA 단편(서열 번호 86)을 Integrated DNA Technologies사에 합성 위탁하였다. 서열 번호 86의 5'말단측의 15염기, 및 3'말단측의 15염기는 pET-22b(+)에 어셈블리하기 위한 중복 서열이다. 서열 번호 65 및 서열 번호 66을 이용하여 증폭시킨 pET-22b(+) 플라스미드 단편을 in-fusion 반응에 의해 서열 번호 86의 염기 서열과 결합시켜 pET22b-M7GLOD를 얻었다. 얻어진 플라스미드로 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적인 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

[0478]

10. M7GLOD-T8 발현용 플라스미드의 구축

[0479]

동일한 수법에 의해 M7GLOD에 8종류의 아미노산 치환(F87Y, Y103I, F133Y, F297M, F393L, F428Y, Y566F, Y585L)을 도입한 M7GLOD-T8(서열 번호 87)의 발현용 플라스미드(pET22b-M7GLOD-T8)를 제작하였다. 아울러 Y566F 및 Y585L의 아미노산 치환은 M7GLOD Δ 49C-T8(서열 번호 60)에 대해서는 Y517F 및 Y536L로서 도입되었다.

[0480]

pET22b-M7GLOD를 주형으로 하여 서열 번호 88(ccgtcgttggtggaattc) 및 서열 번호 89(gcgctcagcatcgtaaaaag)의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 단편을 증폭시켰다. pET22b-M7GLOD Δ 49C-T8을 주형으로 하여 서열 번호 90(cttttgacgatgctgagcgc) 및 서열 번호 91(gaattccacacacgacgg)의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 단편을 증폭시켰다. 양 단편을 DpnI 처리한 후에 정제하여 in-fusion 반응에 의해 결합시켜 pET22b-M7GLOD-T8을 얻었다. 얻어진 플라스미드로 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적인 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

[0481]

11. 각종 결실형 M7GLOD-T8의 제작 및 열안정성 평가

[0482]

각종 결실형 M7GLOD-T8은 pET22b-M7GLOD-T8을 주형으로 하여 "6. 개변형 StGLOD Δ 49C의 제작"과 동일하게 PCR를 실시하고, 서열 번호 87의 460위 내지 508위를 코딩하는 영역 모두 혹은 일부를 결실시켜 제작하였다. PCR은 "98℃ 10초, 68℃ 40초"를 35사이클 실시하였다. 이용한 프라이머는 표 14에 기재한다.

표 14

[0483]

변이체명	Fw프라이머	Rv프라이머
M7GLOD-D Δ 32-T8	gtacgcccggaactcaagttcatggagga (서열 번호92)	aagattgctgctacactttcgggtaccgtaag (서열 번호93)
M7GLOD-D Δ 35-T8	gtacgcccggaactcaagttcatggagga (서열 번호92)	tacactttcgggtaccgtaagggtgcttc (서열 번호94)
M7GLOD-D Δ 39-T8	gtacgcccggaactcaagttcatggagga (서열 번호92)	taccgtaagggtgcttcggcatcgctctc (서열 번호95)
M7GLOD-D Δ 43-T8	gtacgcccggaactcaagttcatggagga (서열 번호92)	tgcttcggcatcgctctcgcccaacgctg (서열 번호96)
M7GLOD-D Δ 47-T8	gtacgcccggaactcaagttcatggagga (서열 번호92)	gtcctcgcccaacgctgtagtattcata (서열 번호97)
M7GLOD-D Δ 49-T8	gtacgcccggaactcaagttcatggagga (서열 번호92)	gccccaacgctgtagtattcatacaggcc (서열 번호98)

[0484]

PCR 산물을 DpnI로 처리한 후, 그 중 2μL를 5μL의 Ligation High Ver. 2(도요보 제), 1μL의 T4 polynucleotide kinase(도요보 제), 7μL의 이온 교환수와 혼합하여 16℃에서 60분 라이게이션 반응을 실시하였다. 얻어진 반응 산물로 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적한 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

[0485]

그 후, M7GLOD-T8 및 각종 결실형 M7GLOD-T8의 발현용 플라스미드로 E.coli BL21(DE3)주를 형질 전환하여 M7GLOD-T8 및 각종 결실형 M7GLOD-T8의 생산주를 제작하고, "8. M7GLOD Δ 49C-T7의 재조합 생산"에 따라 재조합 생산하였다. M7GLOD-T8 및 각종 결실형 M7GLOD-T8을 65℃에서 30분간 가열하고, 상술한 방법에 따라 그 잔존 활성을 산출하였다(표 15).

표 15

[0486]

변이체명	65℃ 30분 처리후 잔존활성
M7GLOD-T8	0.13
M7GLOD-D Δ 32-T8	0.27
M7GLOD-D Δ 35-T8	0.27
M7GLOD-D Δ 39-T8	0.18
M7GLOD-D Δ 43-T8	0.56
M7GLOD-D Δ 47-T8	0.67
M7GLOD-D Δ 49-T8	0.31

[0487]

각종 결실형 M7GLOD-T8의 잔존 활성은 M7GLOD-T8과 비교하여 0.05 ~ 0.54 증가하였으며, 결실형 M7GLOD-T8은 모두 열안정성이 향상되었다. 다시 말하면 제작한 개전형 효소의 잔존 활성은 개변 전의 M7GLOD Δ 49C-T7과 비교하여 약 38% ~ 약 415% 향상되었다.

[0488]

[실시예 5] 아미노산 치환에 의한 StGLOD의 열안정성 향상

[0489]

12. StGLOD의 발현용 플라스미드의 구축

[0490]

StGLOD(서열 번호 1)의 발현용 플라스미드(pET22b-StGLOD)는 "7. 열안정성 향상 변이를 가진 StGLOD 동족체의 발현용 플라스미드의 구축"과 동일한 방법으로 제작하였다. pKK223-3-StGLOD를 주형으로 하여 서열 번호 99(gaaggagatatcatatgaatgaaatgacctacgagcaattg) 및 서열 번호 100(tcctttcgggctttgttaagaagttaacgcctctc)의 프라이머를 이용하여 StGLOD 유전자를 포함한 단편을 PCR에 의해 증폭시켰다. pET-22b(+) 플라스미드를 주형으로 하여 서열 번호 101(caaagcccgaaaggaagctgagttggctgc) 및 서열 번호 102(tcctttcgggctttgttaagaagttaacgcctctc)의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR은 "2. StGLOD 결실 변이체의 제작"과 동일하게 실시하였다.

[0491]

양 단편을 DpnI 처리한 후에 정제하여 in-fusion 반응에 의해 결합시켜 pET22b-StGLOD를 얻었다. 얻어진 플라스미드로 E.coli JM109주를 형질 전환하였다. 얻어진 형질 전환체를 배양하여 추출한 플라스미드의 염기 서열은 목적한 서열로 되어 있는 것을 DNA 시퀀스 해석에 의해 확인하였다.

[0492] 13. StGLOD 변이체의 제작

[0493] StGLOD 발현용 플라스미드(pET22b-StGLOD)를 주형으로 하여 부위 특이적 변이를 도입하고, "6. 개변형 StGLOD Δ 49C의 제작"과 동일한 방법으로 각종 개변형 StGLOD의 발현용 플라스미드를 구축하였다. 제작한 변이체명과 Fw 프라이머, Rv프라이머의 조합은 표 16에 나타냈다.

표 16

[0494]

변이체명	Fw프라이머	Rv프라이머
StGLOD/F87Y	(서열번호15)	(서열번호14)
StGLOD/Y103I	(서열번호20)	(서열번호16)
StGLOD/F133Y	(서열번호23)	(서열번호22)
StGLOD/F297L	(서열번호26)	(서열번호25)
StGLOD/F297I	(서열번호28)	(서열번호25)
StGLOD/F297M	(서열번호29)	(서열번호25)
StGLOD/F393L	(서열번호36)	(서열번호35)
StGLOD/F428Y	(서열번호41)	(서열번호40)
StGLOD/Y566L	(서열번호47)	(서열번호45)
StGLOD/Y566V	(서열번호48)	(서열번호45)
StGLOD/Y566M	(서열번호49)	(서열번호45)
StGLOD/Y568I	(서열번호51)	(서열번호50)
StGLOD/Y585L	(서열번호54)	(서열번호53)
StGLOD/F615L	(서열번호57)	(서열번호56)
StGLOD/R186G	atccgtacgaatggcgaacaagtacgc(서열번호104)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186A	atccgtacgaatgcggaacaagtacgccgc(서열번호105)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186C	atccgtacgaattgcaacaagtacgccgc(서열번호106)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186L	atccgtacgaatctggaacaagtacgccgc(서열번호107)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186M	atccgtacgaatatggaacaagtacgccgc(서열번호108)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186F	atccgtacgaattttgaacaagtacgccgc(서열번호109)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186Y	atccgtacgaattatgaacaagtacgccgc(서열번호110)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186S	atccgtacgaatagcgaacaagtacgccgc(서열번호111)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186T	atccgtacgaataccgaacaagtacgccgc(서열번호112)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186N	atccgtacgaataacgaacaagtacgccgc(서열번호113)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186Q	atccgtacgaatcaggaacaagtacgccgc(서열번호114)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186H	atccgtacgaatcatgaacaagtacgccgc(서열번호115)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186D	atccgtacgaatgatgaacaagtacgccgc(서열번호116)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)
STGLOD/R186E	atccgtacgaatgaagaacaagtacgccgc(서열번호117)	attcgtacggatccaggtgtgattacgttt(서열번호103)

[0495] 계속해서 pET22b-StGLOD, 혹은 각종 개변형 StGLOD의 발현용 플라스미드로 E.coli BL21(DE3)주를 형질 전환하여 StGLOD 및 각종 개변형 StGLOD의 생산주를 제작하고, "8. M7GLOD Δ 49C-T7의 재조합 생산"에 따라 재조합 생산하였다. StGLOD 및 각종 개변형 StGLOD를 50℃에서 30분간 가열하고, 상술한 방법에 따라 그 잔존 활성을 산출하였다(표 17).

표 17

[0496]

변이체명	50℃ 30분 처리후 잔존활성
StGLOD	0.18
StGLOD/F87Y	0.24
StGLOD/Y103I	0.19
StGLOD/F133Y	0.26
StGLOD/F297L	0.29
StGLOD/F297I	0.50
StGLOD/F297M	0.33
StGLOD/F393L	0.37
StGLOD/F428Y	0.52
StGLOD/F566L	0.45
StGLOD/F566V	0.94
StGLOD/F566M	0.72
StGLOD/Y568I	0.81
StGLOD/Y585L	0.72
StGLOD/F615L	0.68
StGLOD/R186G	0.41
StGLOD/R186A	0.21
StGLOD/R186C	0.38
StGLOD/R186L	0.36
StGLOD/R186M	0.38
StGLOD/R186F	0.36
StGLOD/R186Y	0.43
StGLOD/R186S	0.44
StGLOD/R186T	0.21
StGLOD/R186N	0.41
StGLOD/R186Q	0.29
StGLOD/R186H	0.47
StGLOD/R186D	0.62
StGLOD/R186E	0.70

[0497]

각종 개변형 StGLOD의 잔존 활성은 StGLOD와 비교하여 0.01 ~ 0.76 증가하였으며, 개변형 StGLOD는 모두 열안정성이 향상되었다. 다시 말하면 제작한 개변형 효소의 잔존 활성은 개변 전의 StGLOD와 비교하여 약 6% ~ 약 422% 향상되었다. StGLOD Δ 49C 혹은 M7GLOD Δ 49C-T7을 대상으로 찾아낸 열안정성을 향상시키는 아미노산 치환은 그들 모효소에 한정되지 않으며 StGLOD의 열안정성 향상에도 기여한다는 것이 실증되었다. 따라서 이들 아미노산 치환을 다른 유래의 GLOD나 이들과 높은 서열 동일성을 가진 GLOD에 도입한 경우도 이와 같이 열안정성이 향상된다고 생각된다.

산업상 이용가능성

[0498]

본 발명의 글루타민산 옥시다아제 변이체는 프로테아제에서의 처리를 필요로 하지 않고 대규모 생산이 가능하다. 또한, 본 개시내용의 글루타민산 옥시다아제 변이체는 글루타민산의 산화 반응에 이용할 수 있다.

[0499]

본 명세서에서는 특허 출원 및 제조업자의 메뉴얼을 포함한 다양한 문서가 인용되었다. 이들 문서의 개시는 본 발명의 특허성에 관련된다고는 보이지 않지만, 그 전체를 참조에 의해 본 명세서에 편입시키기로 한다. 보다 상세하게는 모든 참조 문서를 각개 문서가 참조에 의해 편입된다고 구체적 및 개별적으로 나타나 있는 경우와 동일하게 참조에 의해 본 명세서에 편입시키는 것으로 한다.

[0500]

[서열표]

[0501]

서열 번호 1 Streptomyces sp. X-119-6 유래 글루타민산 옥시다아제 (StGLOD)의 아미노산 서열

[0502]

MNEMTYEQLARELLLVGPAPTNECLKLRYLDVLIDNGLNPPGPPKRILIVGAGIAGLVAG

[0503]

DLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTFHAKKGEPSPFADPAQYAEAGAMRLPSFHPLTLA

[0504] LIDKLGKRLFFNVDIDPQTGNQDAPVPPVYKSFKDGTWTNGAPSPEFKEPDKRNHT
 [0505] WIRTNREQVRRAYATDPSSINEGFHLTGCETRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVKQDDGTR
 [0506] VNKPFKEWLAGWADVVRDFDGYSMGRFLREYAEFSDEAVEAIGTIENMTSRLHLAFFHSF
 [0507] LGRSIDPRATYWEIEGGSRLPETLAKDLRDQIVMQRMVRLEYDPRDGHGELTGP
 [0508] GGPAVAIQTVPEGEFYAATQWTGDLAIVTIPFSSLRFKVTPPFSYKKRRAVIETHYDQ
 [0509] ATKVLEFSRRWWEFTEADWKRELDIAIAPGLYDYYQQWGEDDAEALALPQSVRNLPGL
 [0510] LGAHPSVDESRIEGEEQVEYYRNSLRGGVRPATNAYGGGSTTDNPNRFMYPSHPVPGTQ
 [0511] GGVVLAAYSWSDDAARWDSFDDAERYGYALENLQSVHGRRIEVFTGAGQTQSWLRDPYA
 [0512] CGEAAVYTPHQMTAFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSCLKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVG
 [0513] DTGVTAAAGRRGAAAATEPMREALTS

[0514] 서열 번호 2 Streptomyces sp. X-119-6 유래 글루타민산 옥시다아제 (StGLOD)의 염기 서열

[0515] atgaatgaaatgacctacgagcaattggcccgcaattgttatttggttggtcggcccccacgaacgaggatcttaaattacgctatttggtatgtgctgatt
 gataacgggctgaacccgcccgggtccgcctaagcgtatcttgatcgtcggggctggtattgcaggccttgttgccggagatttgttgacccgcgctgggcat
 gatgttactattcttgaagctaataccaaccgtgtgggagggcgtatcaagacgttccatgcaaaaaaggagagccatctccattcgctgatccagcgcag
 tacgcggaagctggggcgatgcgtcttcttcttcccttaccaccacttaccttggcacttatcgacaagctgggcttaaaacgccgcctgtttttaatgtagat
 attgaccacaaaactggaaatcaagatgctccagtcaccaccggtcttctataagctcttttaaggacggcaagacgtggacaaaaggagccccgagccctgag
 ttttaagagcccgataaacgtaatacacacctggatccgtacgaatcgcaacaagtacgccgcgcccaatacgccacagaccgcagctccatcaatgaaggc
 ttcctatcgacgggatgtgagaccgccttactgtctccgacatggttaaccaagcgttgaaccggtacgcgactattattcagtcagcaggacgatgga
 actcgtgtgaataagcctttcaagaatggcttgcagggtgggcccacgtcgtgcgtgatttcgacggttattctatgggcccgttcttacgtgaatatgcc
 gaggtttcggatgaggcagtggaagcaattggcacaattgaaaacatgacctcgccctgcaccttgccctttttcatctgctttttgggccgttccgatatc
 gatccgcgcgccacttactgggagatcgagggggggtcacgcatgcttctgaacactggcaaaggacctgcgcgatcagatcgttatgggtcagcgcgatg
 gtacgcttagagtactatgacccgggcccgcgatggccatcatggtgagcttactggccctgggggtccggccgtggccattcagacgggtccagaggagag
 ccttacgcccaactcaaacgtggacaggagacctggcgatgttactatccctttagctctttacgctttgttaaagtaacgccacccttctctataaaa
 aagcgcgcgcgggttaattgagaccatattgatcaggccaccaaagcttacttgaatttagccgtcgttggtgggaattcacagaggcggactggaagcgt
 gaggcttgatgctatcgccccgggtctgtacgactattatcaacagtggggtgaagacgacgccgaagcagcgttgactgccgcagtcagtcgcgaacttg
 cctaccggttgcttggggcccacccaagcgtcgacgaatcgcgatcggagaggagcaagttgagtattatcgtaacagcgaactcgtggcgaggatgcgc
 cctgcgaccaatgcgtacggagggggtagtacgaccgataatcctaatcgtttcatgtaactatccctcccaccctgttcaggcacgcaggggggggtcgtat
 ctgtcagcatacagttggagcgatgatgcagctcgttgggatcttttgacgatgctgagcgtatggctatgcgcttgaaaacttacagctctgtccacggc
 cgtcgtattgaggtgttctatacaggagcgggacagaccaatcatggtgcgcgatccgtacgcatgcggcgaggcagctgtctatacaccccatcaaatg
 accgctttcacttagatgtggtgcgtcccagggggcccgtctattttcggggtgagcacgtttcattaaacaatgcctggatcgagggggcggtggaaca
 gccgttctgcggcgatcgctgtaaatgaagccccgtaggtagacctgggggtcacagccgctgctgggcgccgtggggcgggccgcgctactgagcctatg
 cgcgaggaggcgttaacttcttaa

[0516] 서열 번호 3 StGLOD-f1

[0517] atgaatgaaatgacctacgagcaattggcccgcaattgttatttggttggtcggcccccacgaacgaggatcttaaattacgctatttggtatgtgctgatt
 gataacgggctgaacccgcccgggtccgcctaagcgtatcttgatcgtcggggctggtattgcaggccttgttgccggagatttgttgacccgcgctgggcat
 gatgttactattcttgaagctaataccaaccgtgtgggagggcgtatcaagacgttccatgcaaaaaaggagagccatctccattcgctgatccagcgcag
 tacgcggaagctggggcgatgcgtcttcttcttcccttaccaccacttaccttggcacttatcgacaagctgggcttaaaacgccgcctgtttttaatgtagat
 attgaccacaaaactggaaatcaagatgctccagtcaccaccggtcttctataagctcttttaaggacggcaagacgtggacaaaaggagccccgagccctgag
 ttttaagagcccgataaacgtaatacacacctggatccgtacgaatcgcaacaagtacgccgcgcccaatacgccacagaccgcagctccatcaatgaaggc
 ttcctatcgacgggatgtgagaccgccttactgtctccgacatggttaaccaagcgttgaaccggtacgcgactattattcagtcagcaggac

[0518] 서열 번호 4 StGLOD-f2

[0519] tcagtcagcaggacgatggaactcgtgtgaataagcctttcaagaatggcttgcagggtgggcccacgtcgtgcgtgatttcgacggttattctatgggc
 cgcttcttacgtgaatatgccgagtttcggatgaggcagtggaagcaattggcacaattgaaaacatgacctcgccctgcaccttgccctttttcatctg
 tttttgggccgttccgatatcgatccgcgcgccacttactgggagatcgagggggggtcacgcatgcttctgaacactggcaaaggacctgcgcgatcag

atcgttatgggtcagcgcatggtacgcttagagtactatgacccgggcccgcgatggccatcatggtgagcttactgggcctgggggtccggccgtggccatt
cagacgggtccagaggagagccttacgccgcaactcaaactggacaggagacctggcgatgttactatcccttttagctctttacgctttgttaaagta
acgccacccttctttataaaaaagcgcgcggttaattgagaccatattgatcagccaccaaaagtcttacttgaatttagccgtcgttgggtgggaattc
acagaggcgactggaagcgtgagcttgatgctatgcggcggtctgtacgactattatcaacagtggggtgaagac

[0520] 서열 번호 5 StGLOD-f3

[0521] cagtggggtgaagacgacgccgaagcagcgcttgactgccgcagtcagtcgcaacttgccctaccgcttgcttggggcccaccaagcgtcgacgaatcg
cgtatcgagaggagcaagttgagtattatcgtaacagcgaactgcgtggcgagtgccgctgcgaccaatgcgtacggagggggtagtacgaccgat
cctaactcgtttcatgtactatccctccaccccggttcaggcacgcaggggggggtcgtactgcagcatacagttggagcgatgatgcagctcgttgggat
tcttttgacgatgctgagcgctatggctatgcgcttgaaaacttacagctctgtccacggccgctcgtattgaggtgtctatacaggagcgggacagacc
tcatggctgcgcgatccgtacgcatgcggcgaggcagctgtctatacaccatcaaatgaccgctttcacttagatgtggtgcgtcccaggggggccgct
tattttgcgggtgagcacgtttcattaaaacatgcctggatcgagggggcggtggaacacgcgttcgtgcggcgatcgctgtaaatgaagcccccgtaggt
gacactggggtcacgccgctgctggcgccgctggggcgccgctactgagcctatgcgcgaggagcgtaacttcttaa

[0522] 서열 번호 6 ~ 11 프라이머 서열

[0523] 서열 번호 12 StGLOD Δ49Ai의 아미노산 서열

[0524] MNEMTYEQLARELLLVGPAPTNEDLKLRYLDVLIDNGLNPPGPPKRILIVGAGIAGLVAGDLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTFHAKKGEPSPFADPAQ
YAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFFNVDIDPQTGNQDAPVPPVYKSFKDGTWTNGAPSPFEKPEPKRNHTWIRTNREQVRRAYATDPSSINEG
FHLTGCETRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVKQDDGTRVKNPFKEWLAGWADVVRDFDGYSMGRFLREYAEFSDEAVEAIGTIENMSTRLLHLAFFHSFLGRSDI
DPRATYWEIEGGSRLPETLAKDLRDQIVMGQRMVRLEYDPRDGHGELTGPGGPAVAIQTVPEGEPAATQTTWGLDAIVTIPFSSRLRFVKTTPFSYK
KRRAVIETHYDQATKVLLEFSRRWWEFTADWKRELDIAIAPGLYDYRYKLDKTEATNAYGGGSTDNPNRFMYPPSHPVPGTQGGVLAAYSWSDAARWDS
FDDAERYGYALENLQSVHGRRIEVFYTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQMTAFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSLEKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVGD
TGVTAAGRGAATAATEPMREELTS

[0525] 서열 번호 13 StGLOD Δ49C의 아미노산 서열

[0526] MNEMTYEQLARELLLVGPAPTNEDLKLRYLDVLIDNGLNPPGPPKRILIVGAGIAGLVAGDLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTFHAKKGEPSPFADPAQ
YAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFFNVDIDPQTGNQDAPVPPVYKSFKDGTWTNGAPSPFEKPEPKRNHTWIRTNREQVRRAYATDPSSINEG
FHLTGCETRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVKQDDGTRVKNPFKEWLAGWADVVRDFDGYSMGRFLREYAEFSDEAVEAIGTIENMSTRLLHLAFFHSFLGRSDI
DPRATYWEIEGGSRLPETLAKDLRDQIVMGQRMVRLEYDPRDGHGELTGPGGPAVAIQTVPEGEPAATQTTWGLDAIVTIPFSSRLRFVKTTPFSYK
KRRAVIETHYDQATKVLLEFSRRWWEFTADWKRELDIAIAPGLYDYQDAEPPATNAYGGGSTDNPNRFMYPPSHPVPGTQGGVLAAYSWSDAARWDS
FDDAERYGYALENLQSVHGRRIEVFYTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQMTAFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSLEKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVGD
TGVTAAGRGAATAATEPMREELTS

[0527] 서열 번호 14 ~ 57 프라이머 서열

[0528] 서열 번호 58 Streptomyces sp. MOE7 유래 추정 글루타민산 옥시다아제(M7GLOD)의 아미노산 서열

[0529] MDDKTYQQLARELLLVGPEPANEDLKLRYLDVLIDNGLEPPVDRKRILIVGAGIAGLVAGHLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTFHAKKGEPAPFTDPAQ
YAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFFNVDIDPKTGNQGAALPPVYKSFKDGTWTYKPSPEFREPKRNHTWIRTNRTQVRRAYVKDPSAINEG
FHLTGCESTRITVSDMVNQALEPVRDYYSVLQSDGRRVKNPFKEWLDGWAGVIRDFDGFSGMRFLREYAGFSDEAVEAIGTIENMSTRLLHLAFFHSFLGRSDI
DPSATYWEIEGGSRLPEALAKDLRDQIVMGQRMVRLEYDPRDGHGGLAGPSGPAVAIETVPENEPSAEPQTWTADLAIVTVPFSSRLRFVAVTTPFSYK
KRRAVIETHYDQATKVLLEFSRRWWEFTEDWKRELDIAIAPGLYEYQYQWGEDDAEALTVPESVRNLPGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVR
PATQVHGGGSTDNPNRFMYPPSHAVPGSKGGVLAAYSWSDAARWDSFDDAERYGYALENLQSVHGRRIEVFYTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQ
TSFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSLEKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVPYDTAAARAEAPRERAGTASATRTREKAVTS

[0530] 서열 번호 59 결실형 M7GLOD(M7GLOD Δ49C)의 아미노산 서열

[0531] MDDKTYQQLARELLLVGPEPANEDLKLRYLDVLIDNGLEPPVDRKRILIVGAGIAGLVAGHLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTFHAKKGEPAPFTDPAQ
YAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFFNVDIDPKTGNQGAALPPVYKSFKDGTWTYKPSPEFREPKRNHTWIRTNRTQVRRAYVKDPSAINEG
FHLTGCESTRITVSDMVNQALEPVRDYYSVLQSDGRRVKNPFKEWLDGWAGVIRDFDGFSGMRFLREYAGFSDEAVEAIGTIENMSTRLLHLAFFHSFLGRSDI
DPSATYWEIEGGSRLPEALAKDLRDQIVMGQRMVRLEYDPRDGHGGLAGPSGPAVAIETVPENEPSAEPQTWTADLAIVTVPFSSRLRFVAVTTPFSYK
KRRAVIETHYDQATKVLLEFSRRWWEFTEDWKRELDIAIAPGLYEYQDAEPPATQVHGGGSTDNPNRFMYPPSHAVPGSKGGVLAAYSWSDAARWDS
FDDAERYGYALENLQSVHGRRIEVFYTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQMTSFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSLEKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVPY

DTAAARAEAPRERAGTASATRTREKAVTS

[0532] 서열 번호 60 8종류의 열안정성 변이를 도입한 M7GLOD Δ 49C(M7GLOD Δ 49C-T8)의 아미노산 서열

[0533] MDDKTYQLARELLLVGPEPANEDLKLRYLDVLIDNGLEPPVDRKRILIVGAGIAGLVAGHLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTYHAKKGEPAPFTDPAQ
IAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFYNVDIDPKTGNQGAALPPVYKSFKDGKTWYTGKPSPEFREPDKNHTWIRTNRTQVRAQYVKDPSAINEG
FHLTGCSRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVLQSDGRRVKNPKFEWLDGWAGVIRDFDGFSGMRFLREYAGFSDEAVEAIGTIENMTSRLHLAFMHSFLGRSDI
DPSATYWEIEGGSRLPEALAKDLRDQIVMGQRMVRLEYYPGRDGHGGLAGPSGPAVAIETVPENEPSAEPQTTWADLAIVTVPLSSSLRFVAVTPPFYSYK
KRRAVIETHYDQATKVLLEYSRRWWEFTEEDWKRELDIAIAPGLYEYQDAAEPPATQVHGGGSTDNPNRFMYYPHAVPGSKGGVLAAYSWSDAARWDS
FDDAERFGYALENLQSVHGRIEVLFTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQMTSFHLDVVRPEGPVYFAGEHVSLKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVPY
DTAAARAEAPRERAGTASATRTREKAVTS

[0534] 서열 번호 61 M7GLOD Δ 49C-T8의 염기 서열

[0535] atggacgacaagacctatcagcagtagcacgcgaactgctgctttagggcccgagccagcgaatgaagatcttaattgcgctatttagacgtacttat
gataacgggctggagccccagtcgatcgtaacgtatcttaattgtggggcgaggatcgccggcctggtcgcgggacatttgttgacacgcgcgggacac
gatgtcaccatcctggaggcgaatgcaaatcgcttggaggtcgcattaagacatatcatgcaaagaaaggcgaaccggcccccttcaccgacccggctcaa
attgcagaggcgggagctatgcgtttgccttcattccatcccttaacgttagcgctgattgataaattagggttgaagcgtcgcttgttctataatgttgac
attgacctaaagacgggcaatcaaggtgcagcattgccgcctgtcgtttacaagagctttaaggacggtaaaacttggacgtatggtaaaccttctcggaa
ttccgtgaaccagacaaacgttaaccacacttggattcgtaccaatcgcaactcaagtacgtcgccccagtagtgaaggaccccgagtcgcattaacgaagg
ttccatttaaccgggtgcgagtcgcgtttgacagtttctgataggtaaccaagctttagaaccggttcgtgactactattctgtattgcagagcgacggg
cgccgcgtaaataagccatttaaggagtggttagacggctgggcccgtgtaacccgcgatttcgacggattctcaatgggacgtttctgcgcgagtacgt
gggttttcggacgaggcggtagaagcaatcggtaccatcgagaatatgacaagtcgtttgcatttgacatttgacagcttcttaggtcgagtgacatt
gacccagcgacacatttgggagattgaaggcggtagccgtcagctgcctgaggctctggcaaaagacctgcgtgatcagattgtaattgggccaacgcag
gtgcgttttagagtagctacgaccaggacgtgatggacacatggaggtctggcaggacctctggtcctgcggttgcaatcgaaactgtacccgagaacgag
ccaagtgcagagccgcagacgtggactgcggacctggcgatgtcactgtaccatttcgtctcttcgctttgttgcggtgactccccattcagttataaa
aacgtcgtgcagttatcgaaactcactatgatcaggcaacaaaagtctgttagagttatctcgtcgctggtgggagtttacagaagaggactggaagcgt
gagttggacgcgattgccccggcctgtatgaatactaccaggtatgctcagaaccgccggaactcaagttcatggaggaggttcaacaactgacaatcca
aacggttttatgtattatccgagtcacgcggtgcctgggttctaagggtggtgtggttttgcccgctatagttggagtgacgatgcagcgcttgggattcc
tttgatgacgccgaacgttttgctacgcccggaaaaccttcaatcggtccatggccgccgcatcgaggtcttttaactggagctggacaaactcagtc
tggttgcgcgacccctacgctcgggtgagccgcgatttacacaccacatcagatgacatttctcacttagacgtagtcgccccggaggggccagtagt
tttgccgggagagcatgtctctcttaagcatgcgtggatcgagggggccgttgaaaccgcggtccgtgctgcgacgcggttaacgaagccccctaccat
gacacagctgctgctcgtgcggaggccccctcgcaacgtgccggtacagcatcagccactcgacgcgcgagaaggccgtgacttcttaa

[0536] 서열 번호 62 M7GLOD Δ 49C-T8-f1

[0537] ggagatatacatatggacgacaagacctatcagcagtagcacgcgaactgctgctttagggcccgagccagcgaatgaagatcttaattgcgctattta
gacgtacttatgataacgggctggagccccagtcgatcgtaacgtatcttaattgtggggcgaggatcgccggcctggtcgcgggacatttgttgaca
cgcgcgggacacgatgtcaccatcctggaggcgaatgcaaatcgcttggaggtcgcattaagacatatcatgcaaagaaaggcgaaccggcccccttcacc
gacccggctcaaattgcagaggcgggagctatgcgtttgccttcattccatcccttaacgttagcgctgattgataaattagggttgaagcgtcgcttgttc
tataatgttgacattgacctaaagcgggcaatcaaggtgcagcattgccgcctgtcgtttacaagagctttaaggacggtaaaacttggacgtatggtaaa
ccttctcgggaattccgtgaaccagacaaacgttaaccacacttggattcgtaccaatcgcaactcaagtacgtcgccccagtagtgaaggaccccgagtcg
attaacgaagggttccatttaaccgggtgcgagtcgcgtttga

[0538] 서열 번호 63 M7GLOD Δ 49C-T8-f2

[0539] gcgagtcgcgtttgacagtttctgataggtaaccaagctttagaaccggttcgtgactactattctgtattgcagagcgacggcgcccgtaataaagc
catttaaggagtggttagacggctgggcccgtgtaatccgcgatttcgacggattctcaatgggacgtttctgcgcgagtacgtgggttttcggacagg
cggtagaagcaatcggtaccatcgagaatatgacaagtcgtttgcatttgacatttgacagcttcttaggtcgagtgacattgacccagcgacat
attgggagattgaaggcggtagccgtcagctgcctgaggctctggcaaaagacctgcgtgatcagattgtaattgggccaacgcagtggtgcgttttagagtagt
acgacccaggacgtgatggacacatggaggtctggcaggacctctggtcctgcggttgcaatcgaaactgtacccgagaacgagccaagtgcagagccgc
agacgtggactgcggacctggcgattgtcactgtaccatttcgtctcttcgctttgttgcggtgactccccattcagttataaaaaacgtcgtgcagtt
tcgaaactcactatgatcaggcaacaaaagtctgttagagttatctcgtcgctggtg

[0540] 서열 번호 64 M7GLOD Δ 49C-T8-f3

[0541] ttctcgtcgctggtgggagtttacagaagaggactggaagcgtgagttggacgcgattgccccggcctgtatgaatactaccaggtatgctcagaaccgcc

ggcaactcaagttcatggaggaggttcaacaactgacaatccaaaccgttttatgtattatccgagtcacgcggtgcctggttctaagggtggtgtggtttt
ggccgcgtatagttggagtgacgatgcgcgcgttgggattcccttgatgacgccgaacgttttggtacgcctggaaaaccttcaatcggtccatggccg
ccgcatcgaggtcttttaactggagctggacaaactcagtcaggttgcgcgaccctacgcctgcggtgagccgcagtttacacaccatcagatgac
atcttttcaacttagacgtagtgcccccggaggggccagtatactttgcgggagagcatgtctctttaagcatcggtggatcgagggggccgttgaaaccgc
ggtccgtgctgcgatcgcggttaacgaagccccgtaccatagcacacagctgctgctgctgcggaggccctcgcaacgtgccggtacagcatcagccac
tcgcacgcgcgagaaggccgtgacttcttaacaaagccccgaaa

[0542] 서열 번호 65 ~ 68 프라이머 서열

[0543] 서열 번호 69 7종류의 열안정성 변이를 도입한 M7GLOD Δ 49C (M7GLOD Δ 49C-T7)의 아미노산 서열

[0544] MDDKTYQLARELLLVGPEPANEDLKLRYLDVLIDNGLEPPVDRKRILIVGAGIAGLVAGHLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTYHAKKGEPAPFTDPAQ
IAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFYNVDPKGTGNQGAALPPVYKSFKDGKTWTYKPSPEFREPDKNHTWIRNRTQVRRAYVKDPSAINEG
FHLTGCSRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVLQSDGRRVKNPKFEWLDGWAGVIRDFDGFSGRFLREYAGFSDEAVEAIGTIENMSTRLLHAFMHSFLGRSDI
DPSATYWEIEGGSRLPEALAKDLRDQIVMGQRMVRLLEYDPRDGHGGLAGPSGPAVAIETVPENEPSAEPQWTADLAIIVTVPLSSLRVAVTPPF SYK
KRRAVIETHYDQATKVLLEYSRRWWEFTEEDWKRELDIAIAPGLYEYQDAAEPPATQVHGGGSTDNPNRFMYYP SHAVPGSKGGVLAAYSWSDDAARWDS
FDDAERFGYALENLQSVHGRRIEVFYTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQMTSFHLDVVRPEGPVYFAGEHVS LKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVY
DTAAARAEAPRERAGTASATRTREKAVTS

[0545] 서열 번호 70 ~ 84 프라이머 서열

[0546] 서열 번호 85 M7GLOD의 염기 서열

[0547] ATGGACGACAAGACCTATCAGCAGTTAGCACGCGAACTGCTGCTTGTAGGGCCCGAGCCAGCGAATGAAGATCTTAAATTGCGCTATTTAGACGTACTTATT
GATAACGGGTGGAGCCCCAGTCGATCGTAAACGTATCTTAATTGTGGGGGAGGGATCGCCGGCCTGGTCGCGGGACATTGTTGACACGCGCGGGACAC
GATGTCACCATCCTGGAGCGAATGCAAATCGCGTTGGAGGTCGCATTAAGACATTTTCATGCAAAGAAAGCGAACCAGCCCCCTTCACCGACCCGGCTCAA
TATGCAGAGCGGGAGCTATGCGTTTGCTTCATTCCATCCCTTAACGTTAGCGTGATTGATAAATTAGGGTTGAAGCGTCGCTTGTCTTTAATGTTGAC
ATTGACCCTAAGACGGGCAATCAAGGTGCAGCATTGCCGCTGTCGTTTACAAGAGCTTTAAGGACGGTAAACTTGGACGTATGGTAAACCTTCTCCGGAA
TTCCGTGAACAGACAAACGTAACACACTTGGATTTCGTACCAATCGCACTCAAGTACGTCGCGCCAGTATGTGAAGGACCCGAGTGCGATTAAACGAAGGG
TTCCATTTAACCGGGTGCAGTGCAGTTTGACAGTTTCTGATATGGTGAACCAAGCTTTAGAACCGGTTCTGACTACTATTCTGTATTGCAGAGCGACGGG
CGCCGCTAAATAAGCCATTTAAGGAGTGGTTAGACGGCTGGGCGGTGTAATCCGCGATTTCGACGGATTCTCAATGGGACGTTTCTGCGCGAGTACGCT
GGGTTTTCGGACGAGCGGTAGAAGCAATCGGTACCATCGAGAATATGACAAGTCGTTTGCAATTTTGCATTTTTTCACAGCTTCTTAGGTCGAGTGACATT
GACCCAGCGCGACATATTGGGAGATTGAAGGCGGTAGCCGTCAGCTGCCTGAGGCTCTGGCAAAAGACCTGCGTGATCAGATTGTAATGGGCCAACGCATG
GTGCGTTTAGAGTACTACGACCCAGGACGTGATGGACCATGGAGGCTGCGAGGACCCCTGCTGCTGCGGTGCAATCGAAACTGTACCCGAGAACGAG
CCAAGTGCAGAGCCGAGACGTGGAGCTGCGGACCTGGCGATTGTCAGTGTACCATTTTCGCTCTTCGCTTTGTTGCGGTGACTCCCCATTCAAGTTATAAA
AAACGTCGTGAGTTATCGAACTCACTATGATCAGGCAACAAAGTGTGTAGAGTTTCTCGTCGCTGGTGGGAGTTTACAGAAGAGGACTGGAAGCGT
GAGTTGGACGCGATTGCCCCCGCCTGTATGAATACTACCAGCGTTGGGGCGAGGACGATGCCGAAGCAGCCCTTACGGTACCCGAAAGGTGTACGCAATCTT
CCAACGGGATTGTTAGGGGCCCATCTTCCGTTGACGAGCAACTGATTGATGACGAGCAGGTAGAGTATCTGCGTAATTCAACATTGCGTGGAGGCGTACGC
CCGGCAACTCAAGTTCATGGAGGAGTTCAACAACGTGACAATCCAAACCGTTTTATGTATTATCCGAGTCAACGCGTGCTGTTCTAAGGGTGGTGTGGTT
TTGGCCGCTATAGTTGGAGTGACGATGCAGCGGTGGGATTCCTTTGATGACGCCGAACGTTATGGCTACGCCCTGGAACCTTCAATCGGTCCATGGC
CGCCGATCGAGGCTTTTATACTGGAGCTGGACAACTCAGTCATGGTTGCGGACCCCTACGCTGCGGTGAGGCCGAGTTTACACACCACATCAGATG
ACATCTTTTCACTTAGACGTAGTGCGCCGGAGGGGCCAGTATACTTTGCGGAGAGCATGTCTCTCTTAAGCATGCGTGGATCGAGGGGGCCGTTGAAACC
GCGGTCCGTGCTGCGATCGCGTTAACGAAGCCCCGTACCATACGACACAGCTGCTGCTGCTGCGGAGGCCCTCGGAACGTGCCGTTACAGCATCAGCC
ACTCGCACGCGGAGAAGCCGTGACTTCCTAA

[0548] 서열 번호 86 M7GLOD의 염기 서열을 포함한 DNA 단편

[0549] GGAGATATACATATGGACGACAAGACCTATCAGCAGTTAGCACGCGAACTGCTGCTTGTAGGGCCCGAGCCAGCGAATGAAGATCTTAAATTGCGCTATTTA
GACGTACTTATTGATAACGGGTGGAGCCCCAGTCGATCGTAAACGTATCTTAATTGTGGGGGAGGGATCGCCGGCCTGGTCGCGGGACATTGTTGACA
CGCGCGGACACGATGTACCATCCTGGAGGCGAATGCAAAATCGCGTTGGAGGTCGCATTAAGACATTTTCATGCAAAGAAAGCGAACCAGCCCCCTTACC
GACCCGGCTCAATATGCAGAGGCGGAGCTATGCGTTTGCTTCATTCCATCCCTTAACGTTAGCGTGATTGATAAATTAGGGTTGAAGCGTCGCTTGTTC
TTAATGTTGACATTGACCCTAAGACGGGAATCAAGGTGCAGCATTGCCGCTGTCGTTTACAAGAGCTTTAAGGACGGTAAACTTGGACGTATGGTAAA
CCTTCTCCGAATCCGTGAACCAGACAAACGTAACCACTTGGATTTCGTACCAATCGCACTCAAGTACGTCGCGCCAGTATGTGAAGGACCCGAGTGCG
ATTAACGAAGGGTCCATTTAACGGGTGCGAGTCGCGTTTGACAGTTTCTGATATGGTGAACCAAGCTTTAGAACCGGTTCTGACTACTATTCTGTATTG
CAGAGCGACGGGCGCGCTAAATAAGCCATTTAAGGAGTGGTTAGACGGCTGGGCCGTTGTAATCCGCGATTTCGACGGATTCTCAATGGGACGTTTTCTG

CGCGAGTACGCTGGGTTTTTCGGACGAGGCGGTAGAACGAATCGGTACCATCGAGAATATGACAAGTCGTTGCATTTGGCATTTTTTCACAGCTTCTTAGGT
CGCAGTGACATTGACCCAGCGCGACATATTGGGAGATTGAAGGCGGTAGCCGTCAGCTGCCTGAGGCTCTGGCAAAAGACCTGCGTGATCAGATTGTAATG
GGCCAACGCATGGTGCCTTTAGAGTACTACGACCCAGGACGTGATGGACACCATGGAGGTCTGGCAGGACCCCTCTGGTCTGCGGTTGCAATCGAACTGTA
CCCGAGAACGAGCCAAGTGCAGAGCCGAGACGTGGACTGCGGACCTGGCGATTGTCAGTGTACCATTTTCGCTCTCTCGCTTTGTTGCGGTGACTCCCCCA
TTCAGTTATAAAAAACGTCGTGCAGTTATCGAACTCACTATGATCAGGCAACAAAAGTGTGTTAGAGTTTTCTCGTCGCTGGTGGGAGTTTACAGAAGAG
GACTGGAAGCGTGAGTTGGACGCGATTGCCCGCGCTGTATGAATACTACAGCGTTGGGGCGAGGACGATGCCGAAGCAGCCCTACGGTACCCGAAAGT
GTACGCAATCTTCCAACGGGATTGTTAGGGGCCATCCTTCCGTTGACGAGCAACTGATTGATGACGAGCAGGTAGAGTATCTGCGTAATTCAACATTGCGT
GGAGGCGTACGCCCGCAACTCAAGTTCATGGAGGAGGTTCAACAACCTGACAATCCAAACCGTTTTATGTATTATCCGAGTCACGCGGTGCCTGGTTCTAAG
GGTGGTGTGGTTTTGGCCGCGTATAGTTGGAGTGACGATGCAGCGCGTTGGGATTCTTTGATGACGCCGAACGTTATGGCTACGCCCTGGAAAACCTTCAA
TCGGTCCATGGCCCGCATCGAGGTCCTTTATACTGGAGCTGGACAACTCAGTCATGGTTGCGCGACCCCTACGCCCTGCGGTGAGGCCGAGTTTACACA
CCACATCAGATGACATCTTTTCACTTAGACGTAGTGCGCCCGAGGGGCCAGTATACTTTGCGGGAGAGCATGTCTCTCTTAAGCATGCGTGGATCGAGGGG
GCCGTGAAACGCGGTCCGTGCTGCGATCGCGTTAACGAAGCCCCCTACCATACGACACAGCTGCTGCTCGTGCGGAGGCCCTCGCGAACGTGCCGT
ACAGCATCAGCCACTCGCACGCGGAGAAGGCCGTGACTTCCTAACAAAGCCCGAAA

[0550] 서열 번호 87 M7GLOD-T8의 아미노산 서열

[0551] MDDKTYQQLARELLLVGPEPANEDLKLRYLDVLIDNGLEPPVDRKRILIVGAGIAGLVAGHLLTRAGHDVTILEANANRVGGRIKTYHAKKGEPAPFTDPAQ
IAEAGAMRLPSFHPLTLALIDKLGLKRRLFNVIDPKTGNQGAALPPVYKSFKDGTWTYKPSPEFREPDKRNHTWIRTNRTQVRRQYVVKDPSAINEGF
HLTGCE SRLTVSDMVNQALEPVRDYYSVLQSDGRRVKNPKFKEWLDGWAGVIRDFDGFSGMRFLREYAGFSDEAVEAIGTIENMTSRLHLAFMHSFLGRSDID
PSATYWEIEGGSRLPEALAKDLRDQIVMGQRMVRLEYYPGRDGHGGLAGPSGPAVAIETVPENEPSAEPQTWTADLAIIVTVPLSSLRFVAVTPPFSYKK
RRAVIETHYDQATKVLLEYSSRRWFEEDWKREDAIAPGLYEYYQRWGEDDAEAALTVPESVRNLPGLLGAHPSVDEQLIDDEQVEYLRNSTLRGGVRP
ATQVHGGSTTDNPNRFMYYPHAVPGSKGGVLAAYSWSDAARWDSFDDAERFGYALENLQSVHGRRIEVFLTGAGQTQSWLRDPYACGEAAVYTPHQM
SFHLDVVRPEGPVYFAGEHVS LKHAWIEGAVETAVRAAIAVNEAPVPYDTAAARAEAPRERAGTASATRTREKAVTS

[0552] 서열 번호 88 ~ 117 프라이머 서열

[0553] 본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 그대로 인용에 의해 본 명세서에 추가할 수 있는 것으
로 한다.

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.