

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0004375 (43) 공개일자 2017년01월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 19/00 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01)		(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(52) CPC특허분류 C07K 19/00 (2013.01) C12N 9/0008 (2013.01)		(72) 발명자 홍순호 울산광역시 남구 굴화4길 20, 112동 601호 (무거동, 굴화주공1차아파트)
(21) 출원번호	10-2015-0094649	팜 반 등 울산광역시 남구 대학로 93 (무거동)
(22) 출원일자	2015년07월02일	(74) 대리인 특허법인다나
심사청구일자	2015년07월02일	

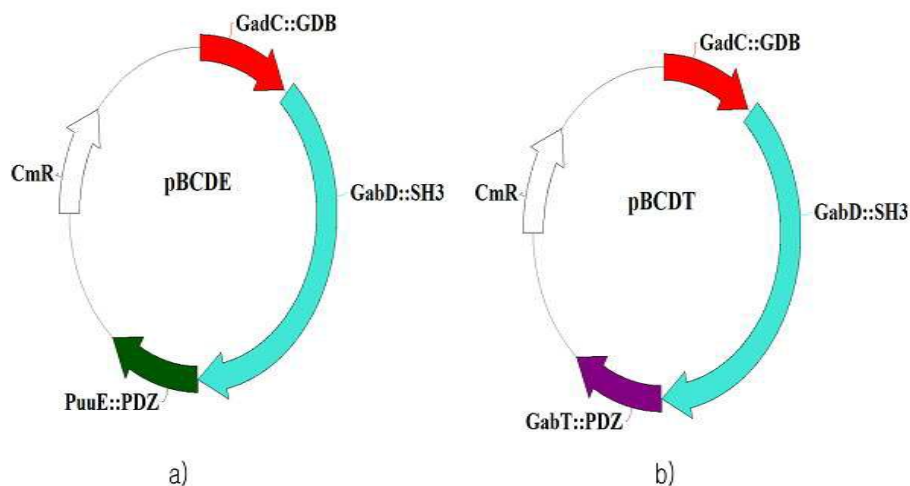
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 모듈식 스캐폴드를 이용한 감마 아미노부티르산의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 모듈식 스캐폴드를 이용한 감마 아미노부티르산의 생산방법에 관한 것으로, 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부티르산 전구체 없이 모듈식 합성 스캐폴드를 이용하여 GABA shunt 경로에 관여하는 특정 효소들을 세포 내에서 같은 위치에 함께 있도록 함으로써 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부티르산을 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/1096 (2013.01)
C12P 13/005 (2013.01)
C12Y 101/01001 (2013.01)
C12Y 101/01027 (2013.01)
C12Y 102/01024 (2013.01)
C12Y 102/03003 (2013.01)
C12Y 203/01054 (2013.01)
C12Y 206/01019 (2013.01)
C12Y 207/02012 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01111601
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	효소집적화 전략을 통한 신규 감마아미노부틸산 대사회로 합성
기 여 율	1/1
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2015.01.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제(γ -aminobutyric acid aminotransferase) 코딩 유전자;
 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제(succinic semialdehyde dehydrogenase) 코딩 유전자; 및
 GABA 트랜스포터(GABA transporter)를 각각 코딩하는 유전자를 포함하고,
 상기 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제, 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 및 GABA 트랜스포터
 의 일 말단에서 각각 PDZ, SH3 및 GDB 리간드가 융합되어 있는 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드.

청구항 2

제1항에 있어서,
 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제 코딩 유전자는 대장균 유래의 gabT 또는 PuvE 중 어느 하나인 감마
 아미노부티르산 생산용 스캐폴드.

청구항 3

제1항에 있어서,
 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 코딩 유전자는 대장균 유래의 gabD인 감마 아미노부티르산 생산용 스
 캐폴드.

청구항 4

제1항에 있어서,
 GABA 트랜스포터 코딩 유전자는 대장균 유래의 GadC인 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드.

청구항 5

제1항에 있어서,
 스캐폴드는 일 말단에 리간드가 융합된 효소들을 세포 내에서 같은 위치에 함께 있도록 하는 것인(co-
 localization), 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드.

청구항 6

제1항의 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드를 포함하는 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서,
 피루베이트 포르메이트 라이세아제(pyruvate formate lysase), 피루베이트 옥시다아제(pyruvate oxidase), 락

테이트 디하이드로게나아제(lactate dehydrogenase), 아세테이트 키나아제(acetate kinase), 알코올 디하이드로게나아제(alcohol dehydrogenase) 및 푸마레이트 리덕타아제(fumarate reductase)로 이루어진 군에서 선택된 효소를 코딩하는 유전자가 하나 이상 추가로 돌연변이된 것인 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서,

유전자는 대장균 유래의 *pf1B*, *poxB*, *ldhA*, *ackA*, *adhE* 또는 *frdB* 중 어느 하나인, 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물.

청구항 9

기질로 글루코스를 사용하여 제6항의 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 감마 아미노부티르산의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

배양은 pH 4.5 내지 6.5의 배양 배지에서 25 내지 37℃의 온도 조건에 수행하는 것인, 감마 아미노부티르산의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GABA shunt 경로에 관여하는 특정 효소들을 세포 내에서 같은 위치에 있도록 하는 모듈식 합성 스캐폴드를 이용하여 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부티르산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 4-탄소 비단백질성 아미노산인 감마 아미노부티르산(Gamma aminobutyric acid, GABA)은 포유동물의 뇌에서 주요 억제성 신경전달물질로 작용하며, 신경전달 및 저혈압, 이노 및 신경안정 효과의 유도 같은 몇몇 중요한 생리 기능을 갖는다. 나일론 4의 합성을 위한 단량체로 사용되는 GABA는 산업에서 GABA의 폭넓은 적용이 가능하다. GABA의 유익한 기능과 증가하는 상업적 요구로 인해 현재 GABA를 합성하고자 하는 많은 시도들이 있어왔는데 이는 GABA의 생합성 방법들이 가장 유망한 접근 중 하나인 것으로 드러났기 때문이다.

[0004] 합성 생물학은 재조합 단백질 생산 및 생산성 개선을 위한 경로 조작을 포함하여 수 많은 목적들을 위해 세포성 기능을 최적화할 수 있다. 상기 경로의 특정 장소에서 효소 주변에 국소적인 대사물질의 농도를 낮추거나, 효소를 줄임으로써 산물을 줄일 수 있다. 공간적 시간적으로 효소를 조직화하고 중간물질의 국소 농도를 증가하거나 훨씬 더 효율적인 효소 반응을 만드는 몇몇 새로운 스캐폴드 시스템들이 보고되어 있다. 생물학적 수소 생산에 관련된 2종의 대사 효소들의 공간적 조직화를 조절하는 RNA 앵커 기반 스캐폴드 또는 개선된 촉매 효율을 촉진하기 위한 DNA-기반 스캐폴드 시스템, 예를 들어, 레스베라트롤, 1,2-프로판디올 및 메탈로네이트를 생산하기 위한 DNA 스캐폴드의 적용은 이들 대사물질의 타이터를 향상시킨다. 특히, 대장균에서 D-글루카르산의 생산을 개선하기 위해 모듈식 합성 스캐폴드를 사용하여 이중 효소들을 조합한 경로에서 D-글루카르산의 수율이 5배 정도의 산물 농도로 유의적으로 증가되었다. 대사적 조작을 위한 강력한 도구로서 스캐폴드 단백질 시스템은 GABA 생산에서 스캐폴드 단백질을 적용하도록 한다.

[0005] GABA shunt에서, GABA는 숙신산으로 대사되고 나서, 2종의 이화 효소, GABA 아미노트랜스퍼라아제(GABA-AT)(E.C.2.6.1.19) 및 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제(SSADH)(E.C.1.2.1.16)에 의한 루프와 경쟁하면서 다시 크랩스 회로로 들어간다. 이는 GABA의 공급을 생산 및 보존할 이중 목적을 갖는 클로즈드-루프 공정인

것이다. GABA 트랜스포터는 세포외 글루코스를 산 활성화된 세포내 글루타메이트 디카르복실라아제(GadA & GadB)로 전달하는 역할을 담당하며, 탈카르복실화된 산물 GABA를 엄격한 일대일 교환으로 방출한다. 더욱이, GadC 유전자의 과발현은 대장균에서 GABA 함량의 유의적인 증가를 유도한다고 보고되어 있다(*Bioprocess and Biosystems Engineering* 2012, 35, pp. 645-650; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2013, 40, pp. 927-933). 세포에서 GABA 함량은 GABA shunt에 의해 유의적으로 분해된다고 암시되어 있으나, 현재 이 경로에 의한 GABA의 생산은 보고된바 없다.

[0006] 본 발명자들은 발효 후 GABA를 생산하는 클로즈드-루프 공정에 의한 GABA 생산 능력을 연구해 왔으나, 기존의 합성 스캐폴드를 이용한 GABA 농도 및 수율은 산업 공정에 사용될 정도로 충분하지는 않았고, 탄소 흐름을 GABA 경로로 더 인도할 수 있는 공정의 효율 개선이 요구된다(대한민국 공개특허 제2014-0129725호).

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2014-0129725호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Dueber et al. 2009, Nat Biotech, vol. 27(8), pp. 753-759

(비특허문헌 0002) Vo et al. 2013, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 40(8), pp. 927-933

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 감마 아미노부티르산 분해에 관련된 GABA shunt 경로에 관여하는 특정 효소들을 세포 내에서 같은 위치에 함께 있도록 하여 글루코스로부터 GABA 전환을 개선함으로써 효율적으로 감마 아미노부티르산을 생산할 수 있는 모듈식 합성 단백질 스캐폴드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 모듈식 합성 단백질 스캐폴드를 과발현하는 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 사용하여 기질인 글루코스로부터 우수한 효율의 감마 아미노부티르산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제(γ -aminobutyric acid aminotransferase) 코딩 유전자; 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제(succinic semialdehyde dehydrogenase) 코딩 유전자; 및 GABA 트랜스포터(GABA transporter)를 각각 코딩하는 유전자를 포함하고, 상기 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제, 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 및 GABA 트랜스포터의 일 말단에서 각각 PDZ, SH3 및 GDB 리간드가 융합되어 있는 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드를 포함하는 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 기질로 글루코스를 사용하여 상기 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 감마 아미노부티르산의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 GABA shunt 경로에 관여하는 특정 효소들을 세포 내에서 같은 위치에 함께 있도록 함으로써 GABA 전환을 개선하여 글루코스로부터 GABA 생산을 촉진할 수 있는 모듈식 합성 단백질 스캐폴드를 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 2종의 스캐폴드 디바이스 시스템 pBCDE 및 pBCDT 플라스미드를 도시한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 플라스미드 pBCDE 및 pBCDT로 형질전환된 대장균에서 과발현된 4종의 과발현된 유전자들의 SDS-PAGE 분석 결과로, M은 마커 단백질, 레인 L1a, L2a, L3a는 각각 형질전환되지 않은 균주, 유도되지 않은 균주, 0.01% 아라비노스 유도된 균주의 세포 추출물이고, 레인 L4a는 pBCDT (*GadC*::GDB, *GabD*::SH3 및 *PuuE*::PDZ)를 탑재한 균주의 세포 추출물이며, 레인 L1b는 형질전환되지 않은 균주의 세포 추출물, 레인 L2b는 pBCDE (*GadC*::GDB, *GabD*::SH3 및 *GabT*-PDZ)를 탑재한 균주의 세포 추출물의 결과이다(*GadC*::GDB: 60.27 kDa, *GabD*::SH3: 54.02 kDa, *GabT*::PDZ: 46.86 kDa, *PuuE*::PDZ: 45.82 kDa).

도 3은 스캐폴드 복합체가 있거나 없는 다양한 균주들에서 얻은 GABA 농도의 시간 별 프로파일 결과이다.

도 4는 다양한 D-글루코스를 배지에 보충한 경우 XB(pBSE, pJD57)(밝은 색) 및 XB(pBCDT, pJD57)(어두운 색)에서 스캐폴드 시스템의 GABA 농도를 나타낸 것이다.

도 5는 XB(pBCDE, pJD57)(네모) 및 XB(pBCDT, pJD57)(원)에서 D-글루코스 소비(흰색) 및 아세테이트 분비(검은 색)의 시간 별 프로파일을 나타낸 것이다.

도 6은 배양 48시간 후 GABA 생산에 대한 다양한 스캐폴드 단백질들(pJD758 내지 pID765 플라스미드)의 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0022] 본 발명은 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제(*gamma*-aminobutyric acid aminotransferase) 코딩 유전자; 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제(*succinic semialdehyde dehydrogenase*) 코딩 유전자; 및 GABA 트랜스포터(*GABA transporter*)를 각각 코딩하는 유전자를 포함하고, 상기 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제, 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 및 GABA 트랜스포터의 일 말단에서 각각 PDZ, SH3 및 GDB 리간드가 융합되어 있는 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드에 관한 것이다.

[0023] 본 명세서에서, "스캐폴드"는 맞춤 기능 및 특징을 갖는 새로운 생성물, 예를 들어 단백질의 조작용을 위한 폴리펩티드 플랫폼을 의미한다. 그러한 스캐폴드는 단백질 라이브러리의 제작에 유용하다. 스캐폴드는 전형적으로 서열-관련 단백질 패밀리의 정렬에서 관찰되는 보존된 잔기에 의해 규정된다. 고정된 잔기는 특히 정렬된 단백질의 기능이 상이할 경우에 폴딩 또는 구조에 필요할 수 있다. 따라서, 스캐폴드로부터 단백질을 조작할 때, 프레임워크의 유리한 특성에 중요한 아미노산 잔기는 유지되고, 다른 잔기는 무작위로 선발되거나 돌연변이될 수 있다. 단백질 스캐폴드의 상세한 설명은 시스템의 수, 위치 또는 간격 및 결합 패턴, 및 루프내의 임의의 고정된 잔기의 위치 및 종류를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드는 GABA 분해 경로인 GABA shunt에서 특이적으로 관여하는 효소, 즉, 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제, 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 및 GABA 트랜스포터를 발현하면서 이들이 세포 내에서 같은 위치에 함께 있도록(*co-localization*) 상기 효소들과 특이적으로 결합하는 리간드, PDZ, SH3 및 GDB를 각 효소의 C-말단에 물리적으로 연결시켜 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제에 의해 GABA로부터 전환되는 석시닉 세미알데히드가 다른 경쟁 효소들보다 더 가깝게 위치한 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제와 반응할 기회를 높이고, 이로부터 생산된 숙신산이 크랩스 회로로 들어가게 하면서 GABA 트랜스포터에 의해 세포 외 글루코스가 세포 내 글루타메이트 디카르복실라아제로 전달되도록 하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 상술한 바와 같이, 일 말단에 리간드가 융합된 효소들은 세포 내에서 같은 위치에 함께 있도록 하여 각각 독립

적으로 대사활동을 하는 것을 특징으로 한다.

- [0026] 이때, 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제, 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 및 GABA 트랜스포터는 약 1:1:1의 비율인 것이 좋으나, 효소의 비율이 GABA 생산에 주요한 영향을 미치는 것은 아니다.
- [0027] 아울러, 상기 효소들에 각각 결합하는 리간드인, PDZ, SH3 및 GDB의 비율 역시 약 1:1:1인 것이 좋으나, 리간드의 개수가 GABA 생산 효율에 주요한 영향을 미치는 것은 아니다.
- [0028] 본 명세서에서, "대사 경로"는 하나의 화학 종을 다른 종으로 전환시키기 위한 동화 또는 이화 생화학 작용의 세트를 의미한다. 유전자 산물은 병렬로 또는 직렬로 동일 기질에 작용하여 동일 산물을 생산하거나, 동일 기질과 최종 산물 사이의 대사 중간생성물에 작용하거나 이를 생산하면 동일한 "대사 경로"에 속한다. 본 발명은 GABA 분해 경로인 GABA shunt 경로를 사용한다.
- [0029] 본 명세서에서, "대사 조작(metabolic engineering)"은 미생물에서 원하는 대사산물의 생산을 위하여, 생합성 유전자, 오페론과 연관된 유전자, 그리고 이들 폴리뉴클레오티드의 제어 요소(control elements)의 합리적 경로 디자인과 어셈블리를 수반한다. "대사 조작된"은 원하는 경로를 유도하는 중간생성물과 경쟁하는 경쟁 대사 경로(competiting metabolic pathway)의 감소, 파괴 또는 적중을 비롯한, 유전자 조작과 적절한 배양 조건을 이용한 전사(transcription), 전이(translation), 단백질 안정성(protein stability)과 단백질 기능성(protein functionality)의 조절과 최적화에 의한 대사 흐름(metabolic flux)의 최적화를 더욱 포함할 수 있다. 생합성 유전자는 숙주에 대해 외래성이거나, 돌연변이유발(mutagenesis), 재조합(recombination) 및/또는 내인성 숙주 세포에서 이중 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주 미생물에 대해 이중성일 수 있다. 일 측면에서, 폴리뉴클레오티드가 숙주 생물체에 이중 발생성인 경우에, 폴리뉴클레오티드는 코돈(codon) 최적화될 수 있다.
- [0030] 상기 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제, 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제 및 GABA 트랜스포터는 대장균(*E. coli*), 쉬겔라 다이센테리아(*Shigella dysenteriae*), 쉬겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 에스케리치아 알베르티(*Escherichia albertii*), 예르시니아 루케리(*Yersinia ruckeri*), 에드워드스IEL라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*), 브루셀라 오비스(*Brucella ovis*), 아케르만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*), 데선포비브리오 데선포리칸스(*Desulfovibrio desulfuricans*), 블라스토피렐룰라 마리나(*Blastopirellula marina*), 또는 포토박테리움 담셀라(*Photobacterium damsela*) 등에서 유래한 것일 수 있고, 바람직하게는, 대장균에서 유래한 것일 수 있다.
- [0031] 구체적으로, 감마 아미노부티르산 아미노트랜스퍼라아제는 대장균 유래의 gabT 또는 PuuE 중 어느 하나로부터 코딩될 수 있다.
- [0032] 석시닉 세미알데히드 디하이드로게나아제는 대장균 유래의 gabD로부터 코딩될 수 있다.
- [0033] GABA 트랜스포터는 대장균 유래의 GadC 유전자로부터 코딩될 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서, "유전자"는 유전적 기능이 관련되어 있는 핵산 분자(염색체, 플라스미드 등)의 뉴클레오티드 서열로, 예를 들어, 유기체의 게놈 내의 특정 물리적 위치("유전자좌")를 차지하는 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 포유동물의 DNA 서열)을 포함하는, 유기체의 유전 단위이다. 유전자는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 발현 생성물을 코딩할 수 있다. 일반적으로, 유전자는 폴리펩티드 코딩 서열과 같은 코딩 서열 및 프로모터 서열, 폴리아데닐화 서열, 전사 조절 서열(예를 들어, 인핸서 서열)과 같은 비코딩 서열을 포함한다. 다수의 진핵생물 유전자가 "인트론"(비코딩 서열)이 개재되어 있는 "엑손"(코딩 서열)을 갖는다.
- [0035] 본 명세서에서, "~에 의해 코딩되는" 또는 "~를 코딩하는"이란 핵산 서열이 폴리펩티드 서열을 코딩하는 것을 말하며, 여기서 상기 폴리펩티드 서열은 상기 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드인 적어도 3~5개 아미노산, 더 바람직하게는 적어도 8~10개 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 적어도 15~20개 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다. 상기 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드를 사용하여 번역학적으로 확인할 수 있는 폴리펩티드 서열도 포함된다. 따라서, 항원 "폴리펩티드", "단백질" 또는 "아미노산" 서열은 항원의 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 대해 70% 이상의 유사성, 바람직하게는 약 80% 이상의 유사성, 더 바람직하게는 약 90~95%의 유사성, 가장 바람직하게는 약 99%의 유사성을 가질 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서, "~로부터 얻은" 또는 "~유래의" 이란 예를 들어, 소정 유기체, 전형적으로 미생물과 같은 특정 공급원으로부터 단리되거나, 이로부터 유도된 폴리뉴클레오티드 추출물 또는 폴리펩티드 추출물 등과 같은 샘플을 의미한다. 또한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 특정 유기체 또는 미생물로부터 단리되거나, 이로

부터 유도된 상황도 의미할 수 있다.

- [0037] 본 발명의 효소를 코딩하는 유전자를 박테리아 계놈으로부터 얻는 방법은 분자 생물학 분야에서 일반적이며 잘 알려져있다. 예를 들어, 당해 유전자의 서열이 공지되어 있는 경우, 적합한 계놈 라이브러리가 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생성될 수 있으며, 원하는 유전자 서열에 상보적인 프로브를 이용하여 스크리닝될 수 있다. 일단 당해 서열이 단리되면, 그 DNA는 표준 프라이머-유도 증폭 방법, 예를 들어 PCR을 이용하여 증폭되어 적절한 벡터를 이용한 형질전환에 적합한 양의 DNA가 얻어질 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서, "벡터" 또는 "플라스미드"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내 및/또는 사이로 전달하는 핵산 분자, 바람직하게는 자가-복제성 핵산 분자이다. 이 용어는 1차적으로 DNA 또는 RNA의 세포 내로의 삽입을 위해 기능하는 벡터, 1차적으로 DNA 또는 RNA의 복제를 위해 기능을 하는 벡터의 복제물, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역을 위해 기능을 하는 발현 벡터를 포함한다. 또한, 하나 초과와 상기 기능을 제공하는 벡터도 포함된다. "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 때 폴리캡티드(들)로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드이다. "발현 시스템"은 대체로 요구되는 발현 생산물을 생산하도록 기능할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 의미한다.
- [0039] 본 발명의 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드 제작에 사용되는 재조합 벡터는 적합한 미생물 내에서 상기 유전자들의 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다.
- [0040] 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 계놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주 미생물로 형질전환 되면 벡터는 숙주 계놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 계놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로 본 발명에서 플라스미드(plasmid)와 벡터(vector)는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 도입된 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0041] "작동가능하게 연결된"이란 언급된 구성요소들이 그 일반적 기능을 수행하도록 구성되어 있는 요소들의 배열을 말한다. 따라서, 코딩 서열(예를 들어, 관심 있는 항원을 코딩하는 서열)에 작동 가능하게 연결된 특정 프로모터는 조절 단백질 및 적절한 효소가 존재할 경우 코딩 서열의 발현을 가능하게 할 수 있다. 일부 경우, 특정 조절 요소가 이들이 코딩 서열의 발현을 지시하는 기능을 할 수 있는 한 코딩 서열에 인접할 필요는 없다.
- [0042] 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질 전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0043] 통상적으로, 하나 이상의 제한효소로 DNA 서열 및 벡터를 절단하고 단편들을 함께 결합하여 최종적으로 발현될 DNA 서열을 벡터에 결합시킨다. 제한 효소 소화처리 및 결합은 당업자들에게 익히 알려져 있다.
- [0044] 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물은 생물의 계놈 내에서 또는 생물 내에서 계놈 외부에 하나 이상의 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 미생물은 야생형 생물체에서 발견되는 유전자의 감소(reduction), 파괴(disruption) 또는 적중(knockout) 및/또는 이종(heterologous) 폴리뉴클레오티드의 도입(introduction)을 포함한다. 본 발명의 재조합 미생물은 GABA 생산용 스캐폴드를 함유하는 재조합 미생물이다.
- [0045] 따라서, 본 발명은 상기 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드를 포함하는 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물을 제공한다.
- [0046] 본 명세서에서, "재조합 미생물" 및 "재조합 균주"라는 용어는 동의어로 사용되며, 본 발명의 특정 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 과다 발현하기 위하여 유전적으로 변형된 미생물을 지칭한다. 다시 말해, 재조합 미생물은 감마 아미노부티르산 생산용 스캐폴드를 형질전환시켜 제조된 것이다.
- [0047] 본 명세서에서, "형질전환 또는 트랜스펙션"은 세포외부 DNA가, 수반물질이 있고 없는 상태로 숙주 세포로 들어

가는 과정을 말한다. "트랜스펙션된 세포"란 세포 외부 DNA가 세포 내로 도입되어 세포 외부 DNA를 가지고 있는 세포를 가리킨다. DNA는 세포로 도입되어 핵산이 염색체에 삽입되거나 혹은 염색체 외 물질로 복제될 수 있다.

[0048] 적합한 미생물 속주는, 이에 제한되지는 않지만, 자이모모나스(*Zymomonas*), 에스케리키아(*Escherichia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 알칼리제네스(*Alcaligenes*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 버크홀데리아(*Burkholderia*), 올리고트로파(*Oligotropha*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 피치아(*Pichia*), 칸디다(*Candida*), 한세룰라(*Hansenula*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 또는 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 등의 속에 속하는 미생물을 사용할 수 있다. 이 중, 대장균(*E. coli*), 클루이베로마이세스 마시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 또는 사카로마이세스 세레비시아(*Sccharomyces cerevisiae*)가 바람직하고, 더 바람직하게는 대장균을 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명의 재조합 미생물이 포함하는 유전자들은 프로모터, 항생물질 저항성 유전자의 종류에 따라 적절한 유도 물질을 사용하여 발현될 수 있다. 예컨대, 아라비노스 및 안하이드로테트라사이클린에 의해 발현이 유도될 수 있다.

[0050] 또한 본 발명의 재조합 미생물은 GABA 생산 경로에서 함께 생산되는 부산물, 즉, 아세테이트, 포름산, 젖산, 숙신산 및 에탄올의 생산을 억제하기 위해, 경쟁 경로에 관여하는 효소들, 예컨대, 피루베이트 포르메이트 라이세아제(pyruvate formate lysase), 피루베이트 옥시다아제(pyruvate oxidase), 락테이트 디하이드로게나아제(lactate dehydrogenase), 아세테이트 키나아제(acetate kinase), 알코올 디하이드로게나아제(alcohol dehydrogenase) 또는 푸마레이트 리덕타아제(fumarate reductase) 등을 턱-아웃시키는 돌연변이가 추가로 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명의 재조합 미생물은 상기 효소를 코딩하는 유전자가 추가로 돌연변이된 것일 수 있다.

[0051] 상기 코딩 유전자는 대장균 유래의 *pflB*, *poxB*, *ldhA*, *ackA*, *adhE* 또는 *frdB* 중 어느 하나일 수 있다.

[0053] 본 발명은 또한 기질로 글루코스를 사용하여 상기 감마 아미노부티르산 생산용 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 감마 아미노부티르산의 생산방법에 관한 것이다.

[0054] 종래에는 글루타메이트 또는 MSG와 같은 감마 아미노부티르산의 전구체를 이용하여 감마 아미노부티르산을 생산하였으나, 본 발명은 이러한 전구체 없이 GABA shunt 경로에 관여하는 특정 효소들을 같은 위치에 함께 있도록 하는 스캐폴드로 형질전환된 재조합 미생물을 사용하여 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부티르산을 우수한 효율로 수득할 수 있는 것을 특징으로 한다. 다시 말해, 본 발명은 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 표준 클로닝 기술 및 통상적인 방법을 이용하여, 특정 효소를 코딩하는 유전자를 기본 벡터에 삽입하여 형질전환시킨 재조합 미생물을 배양함으로써 구현할 수 있다.

[0055] 본 명세서에서, "기질"은 효소의 작용에 의해 다른 화합물로 전환되거나 전환되게 되어있는 임의의 물질 또는 화합물을 지칭한다. 상기 용어는 단일 화합물뿐만 아니라 용제, 혼합물 및 최소한 하나의 기질을 포함하는 다른 재료와 같은 화합물의 조합 및 이들의 유도체를 포괄한다. 게다가, 용어 "기질"은 바이오매스 유도된 설탕과 같은 출발 재료로서 사용하기 적합한 탄소 공급원을 제공하는 화합물뿐만 아니라 본 명세서에 기재된 대사 조작 미생물과 연관된 경로에서 사용되는 중간생성물과 최종 대사산물을 포괄한다. 미생물에 의해 통상적으로 사용되는 적합한 탄소 기질을 포괄한다. 구체적으로, 상술한 재조합 미생물을 탄소원을 함유하는 배지에서 배양한 다음, 상기 배양된 미생물로부터 GABA를 회수할 수 있다. 이때 재조합 미생물의 배양 및 GABA 수득과정은 종래 발효공업에서 통상적으로 알려진 배양방법 및 GABA 분리정제방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0056] 본 발명에서 사용하는 배지는 적합한 탄소 기질을 포함하는 발효 배지일 수 있다. 적합한 기질은 단당류, 올리고당류, 다당류, 및 C1 기질 또는 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 탄소 공급원을 사용할 수 있다. 단당류, 예를 들어 글루코스 및 프락토스, 올리고당류, 예를 들어 락토스 또는 수크로스, 다당류, 예를 들어 전분 또는 셀룰로오스 또는 그 혼합물과, 재생가능한 공급재료로부터의 비정제된 혼합물을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 탄소 기질은 글루코스, 수크로스, 셀룰로스, 글리세롤 등이다. 가장 바람직하게는 글루코스를 사용할 수 있다.

[0057] 적절한 탄소 공급원 외에, 발효 배지는 적합한 미네랄, 염, 보조 인자, 완충액 및 GABA 생성에 필요한 효소 경로의 촉진 및 배양물의 성장에 적합한, 당업자에게 공지된 기타 성분을 포함할 수 있다.

[0058] 전형적으로, 세포는 효소 반응 조건에서 배양할 수 있다.

[0059] 본 명세서에서, "효소 반응 조건"이란 효소가 기능하도록 허용하는 환경에서 이용가능한 임의의 필수적인 조건

(즉, 온도, pH, 물질 비저해)과 같은 요인을 의미한다. 효소 반응 조건은 시험관에서와 같은 시험관내, 또는 세포 내와 같은 생체 내일 수 있다.

[0060] 구체적으로, 적절한 배지에서 약 25℃ 내지 약 37℃ 범위의 온도에서 성장시킨다. 본 발명에서 적합한 성장 배지는 루리아 베르타니(Luria Bertani, LB) 액체 배지, 사부로 텍스트로스(Sabouraud Dextrose, SD) 액체 배지 또는 효모 배지(Yeast Medium, YM) 액체 배지와 같이 일반적으로 상업적으로 제조된 배지이다. 일 실시예에서는 LB 브로스(액체 배지)를 사용하였다.

[0061] 발효에 적합한 pH 범위는 pH 4.5 내지 6.5이며, 가장 바람직하게는 약 pH6.0 내지 6.5일 수 있다. 발효는 호기 조건 또는 혐기 조건 하에 실시될 수 있으며, 여기서 혐기 또는 미세호기 조건이 바람직하다.

[0062] 본 발명은 배치식 발효 방법을 이용한다. 고전적인 배치 발효는 배지의 조성이 발효 시작시에 정해지며, 발효 동안 인공적으로 변경되지 않는 폐쇄 시스템이다. 따라서, 발효의 시작시에 배지에 원하는 유기체 또는 유기체들이 접종되며, 상기 시스템에 어떠한 것도 첨가하지 않고서 발효가 일어나는 것을 가능케 한다. 그러나, 전형적으로 "배치" 발효는 탄소 공급원의 첨가와 관련하여 배치식이며, pH 및 산소 농도와 같은 인자를 제어하려는 시도가 흔히 이루어진다. 배치 시스템에서, 이 시스템의 대사 산물 및 생물질 조성물은 발효가 중단되는 시점까지 끊임없이 변화한다. 배치 배양 내에서 세포는 정적 유도기(static lag phase)를 통하여 고 성장기로, 그리고 마지막으로 성장 속도가 감소되거나 정지되는 정상기로 완화된다. 미처리된 경우, 정상기의 세포는 결국 죽을 것이다. 로그기의 세포는 일반적으로 최종 생성물 또는 중간체의 벌크 생성에 책임이 있다.

[0063] 표준 배치 시스템이 변화된 것은 유가식(Fed-Batch) 시스템이다. 또한, 유가식 발효 공정이 본 발명에서 적합하며, 이는 발효가 진행됨에 따라 기질이 증분식으로 첨가된다는 것을 제외하고는 전형적인 배치 시스템을 포함한다. 유가식 시스템은 이화 대사 산물 억제제가 세포의 대사 작용을 저해하는 경향이 있을 때 그리고 배지 중에 한정된 양의 기질이 있는 것이 바람직한 경우 유용하다. 유가식 시스템 중 실제 기질 농도의 측정은 어려우며, 따라서 pH, 용존 산소 및 CO₂와 같은 폐기 가스의 분압과 같은 측정 가능한 인자의 변화를 기반으로 하여 계산된다.

[0064] 본 발명은 배치식으로 실시될 수 있지만, 본 방법은 연속식 발효 방법에 적용 가능한 것으로 생각된다. 연속식 발효는 규정된 발효 배지가 계속하여 생물 반응기에 첨가되고, 동일한 양의 조절 배지가 프로세싱을 위하여 동시에 제거되는 개방 시스템이다. 연속식 발효에서는 일반적으로 배양물이 일정한 고밀도로 유지되는데, 여기서 세포는 주로 대수기 성장 상태에 있다.

[0065] 연속식 발효는 세포 성장 또는 최종 생성물 농도에 영향을 주는 하나의 인자 또는 임의의 개수의 인자의 조절을 허용한다. 예를 들어, 한 가지 방법은 제한 영양소, 예를 들어 탄소 공급원 또는 질소의 수준을 고정된 비율로 유지하고 모든 다른 파라미터는 조정되게 할 것이다. 다른 시스템에서, 배지 탁도로 측정되는 세포 농도는 일정하게 유지하면서 성장에 영향을 주는 많은 인자는 계속하여 변경시킬 수 있다. 연속식 시스템은 정상 상태 성장 조건을 유지하도록 노력하며, 따라서 배출되는 배지로 인한 세포 손실은 발효에서 세포 성장 속도에 대하여 균형이 맞추어져야 한다. 연속식 발효 공정에 있어서 영양소 및 성장 인자를 조정하는 방법뿐만 아니라, 생성물 형성 속도를 최대화하는 기술도 산업 미생물학 분야에서 잘 알려져 있다.

[0066] 본 발명은 배치식, 유가식 또는 연속식 공정 중 어느 하나를 이용하여 실시될 수 있다.

[0067] 상기와 같은 방법에 의해 본 발명의 재조합 미생물을 이용하여 생산된 감마 아미노부티르산은 현저히 높은 수율로 수득 가능하므로, GABA 생산성이 매우 향상되어 산업적으로 대량생산이 가능하게 한다.

[0068] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 특히, 하기 실시예에서는 본 발명에 따른 유전자를 발현시키기 위하여 특정 발현벡터와 대장균(*Escherichia coli*) 숙주세포만을 예시하였으나, 다른 종류의 적절한 발현벡터와 숙주세포를 사용하는 것 역시 당업자에게 자명한 사항이라 할 것이다.

[0071] (박테리아 균주 및 배양 조건)

[0072] 본 발명에 사용된 박테리아 균주는 대장균 XL1-Blue 및 PflB, FrdA, AdhE, PoxB, ackA 및 LdhA 유전자들이 봉쇄된 2종류의 대장균 균주를 포함한다(표 1).

[0073] 상기 균주를 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 앰피실린 및/또는 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 클로람페니콜이 첨가된 Luria-Bertani 배지(10 g/L의 박토-트립톤, 5 g/L의 박토-이스트 추출물 및 5 g/L의 소듐 클로라이드)에서 배양하였다. 상기 배지에 2% 아가를 첨가하여 고체 배지로 제조하였다. 균주를 10 mL의 LB 배지를 포함한 20 mL-튜브에 접종하고 200 rpm에서 37°C에서 오버나이트 동안 배양하였다. 10 g/L의 D-글루코스가 첨가된 100 mL의 LB 배지를 포함한 250 mL-플라스크에 정상기의 전배양물을 접종하여 600 nm에서 초기 흡광도가 1.2에 도달할 때까지 배양하고, 유전자 발현은 1%의 L-아라비노스 및 108nM의 aTc(안하이드로테트라사이클린)로 유도하였다. 그리고 나서, 30°C에서 250 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 발효 동안 샘플을 수거하여 -20°C에서 저장하고 이후 분석에 사용하였다.

표 1

균주 및 플라스미드 목록

균주/플라스미드	구체적인 설명 ^a	참고문헌
균주		
XL1_Blue	F' (proAB ⁺ lacI ^q lacZAM15 Tn10 (Tet ^r))	Laboratory stock
XB1	<i>E. coli</i> XL1_Blue (Δ ackA, <i>ldhA</i>)	본 발명
XB5	<i>E. coli</i> XL1_Blue (Δ pf1B, <i>frdB</i> , <i>poxB</i> , <i>ldhA</i>)	본 발명
XB6	<i>E. coli</i> XL1_Blue (Δ pf1B, <i>poxB</i> , <i>ldhA</i>)	본 발명
XB8	<i>E. coli</i> XL1_Blue (Δ pf1B, <i>adhE</i> , <i>poxB</i> , <i>frdB</i> , <i>ldhA</i>)	본 발명
플라스미드		
pBAD30	pBAD30, araC promoter, Amp ^r	NEB ^b
pBAD30C	pBAD30, (Amp ^r was replaced with Cm ^r)	본 발명
pBCDT	pBAD30C, (<i>GadC-GDB</i> , <i>GabD-SH3</i> , <i>GabT-PDZ</i>)	본 발명
pBCDE	pBAD30C, (<i>GadC-GDB</i> , <i>GabD-SH3</i> , <i>PuuE-PDZ</i>)	본 발명
pJD757	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₁ PDZ ₁ , Amp ^r	b
pJD758	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₂ PDZ ₂ , Amp ^r	b
pJD759	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₃ PDZ ₃ , Amp ^r	b
pJD760	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₄ PDZ ₄ , Amp ^r	b
pJD761	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₅ PDZ ₅ , Amp ^r	b
pJD762	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₆ PDZ ₆ , Amp ^r	b
pJD763	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₇ PDZ ₇ , Amp ^r	b
pJD764	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₈ PDZ ₈ , Amp ^r	b
pJD765	P _{tet} , GDB ₁ SH3 ₉ PDZ ₉ , Amp ^r	b

a: New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A. b: Moon, T. S. et al. *Metabolic Engineering* 2010, vol. 12, pp. 298-305

[0074]

[0076] (GABA 생산의 최적화)

[0077] GABA 생산에 대한 온도, pH 및 D-글루코스 효과의 최적화를 위해, 균주를 pH6.5에서 25, 30 및 37°C에서 배양하여 온도의 효과를 시험하였다. 그리고 나서, pH5.5, 6.5, 7 및 7.5의 수준으로 조정하고, 30°C에서 배양하여 최적화된 pH 값을 조사하였다. 마지막으로, GABA 생물변환은 LB 배지에 10, 20, 30, 40 g/L의 D-글루코스를 보충하여 조사하였다. 샘플을 수거하였을 때 배양의 OD₆₀₀를 동시에 측정하였다. 각 샘플 당 최소 3회 측정치를 얻었다.

[0079] (제조용 플라스미드의 제작)

[0080] 본 발명에서 사용되거나 제작된 플라스미드는 표 2에 나열하였다. GDB, SH3 및 PDZ 단백질 상호작용 도메인으로 구성된 9종의 스캐폴드 구조 플라스미드는 Moon 교수로부터 제공받았다. 해당 리간드 플라스미드를 부착한 효소를 생성하기 위해, 3개의 유전자(GDB, SH3 및 PDZ)를 표 2에 나열된 PCR 프라이머를 사용하여 이미 기술된 아미노산 서열로 합성하였다. *GadC*, *GabD*, *GabT* 및 *PuuE* 유전자들은 Expand high-fidelity polymerase chain reaction(PCR) system(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 XB 염색체 DNA로부터 증폭하였다. *GDB* 유전자를 오버랩 PCR에 따라 *GadC* 유전자에 융합시키고, SH3 및 PDZ 리간드 서열은 리버스 프라

이머에 의해 각각 *GabD* 및 *GabT/PuuE* 에 부착하였다. 클로닝 벡터로 pGEMT-easy를 사용하여, 모든 유전자를 정확한 제한효소 부위에 클로닝/절단하였다. 마지막으로, 2개의 결과물을 얻었다. 즉, *GadC::GDB::GabD::SH3::GabT::PDZ* 및 *GadC::GDB::GabT::SH3::PuuE::PDZ*는 *SacI/XbaI* 다중 클로닝 부위(MCS)의 아라비노스 유도성 업스트림을 수행하는 pBad30-C 발현 플라스미드(New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)에 서브 클로닝된다(도 1). pBad30 플라스미드에서 앰피실린 저항성이 *SbfI/PvuI* 위치에서 클로람페니콜 유전자로 대체되므로 pBad30-C로 명명하였다. 합성 스캐폴드는 스캐폴드 및 효소 농도의 독립적인 작동을 가능케 한다.

표 2

PCR 프라이머

명칭	서열(5'-3')
<i>GadC-SacI-F</i>	GGGGAGCTCAAGAAGGAGATATACCATGGCTACATCAGTACAGACA
<i>GadC-R</i>	CCAGAGCCAGAGCCACGCGGGTGTTCCTTGTTCATTCATCA
<i>GDB_F_L</i>	TGATGAATGACAAGAAACACCCGCGTGGCTCTGGCTCTGG
<i>GDB-KpnI_R</i>	GGGGGTACCTCAATCTTCATCTTCATCGCCCG
<i>GabD-KpnI-F</i>	GGGGGTACCAAGAAGGAGATATACCATGAACTTAACGACAG
<i>GabD-XmaI-R</i>	GGGCCCGGGTCAGCCCGGACGACGCTTTCGGCGGCAGCGCCGGCGGGCCAGAG CCAGAGCCAGAGCCAGAGCCTTCCAGAAGACCGATGCACATATA
<i>PuuE-XmaI-F</i>	GGGCCCGGGAAGAAGGAGATATACCATGAGCAACAATGAATTCCATCAGCG
<i>PuuE-XbaI-R</i>	GGGTCTAGATCATCACACCAGAGATTCTTTCACGCCAGAGCCCGGCGCGCATCGCTC AGCGCATCCTGCA
<i>GabT-XmaI-F</i>	GGGCCCGGGAAGAAGGAGATATACCATGAACAGCAATAAAGAGTT
<i>GabT-XbaI-R</i>	GGGTCTAGATCATCACACCAGAGATTCTTTCACGCCAGAGCCCGGCGCGCCTGCTTC GCCTCATCAAAAC
<i>Clr-SbfI_F</i>	GGGCCTGCAGGATGAACCTTTAATAAAATTGAT
<i>Clr-PvuI_R</i>	GGGCGATCGTTATAAAAGCCAGTCATTAG

[0083] (GABA 분석)

GABA 생물변환은 Hong 등의 *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2012, vol. 35, pp. 645-650에 기재된 설명에 따라 OptimaPak C18 column(4.6×150 mm, RS tech Corporation, Daejeon, Korea)을 이용하여 HPLC에서 정량적으로 분석하였다. 첫째, 샘플을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 나서, 100 μ l의 상등액을 에펜도르프 튜브에 부가하였다. 다음으로, 200 μ l의 1M 소듐 바이카보네이트 버퍼 pH 9.8, 아세토니트릴에 녹인 100 μ l의 80 g/L의 단실클로라이드 및 600 μ l의 이차 증류수를 부가하여 1 mL의 반응 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물을 80℃에서 40분간 인큐베이션 하였다. 다음으로, 100 μ l의 20 μ l/mL의 아세트산을 부가하여 반응을 종결하였다. 혼합물을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 0.2 μ m 밀리포어 필터를 통해 여과하고, UV 검출을 이용하여 애질런트 시스템에서 HPLC에 따라 분석하였다. 유도 샘플은 용출액 A[테트라하이드로퓨란/메탄올/50 mM 소듐 아세테이트, pH 6.2 (5:75:420, by vol.)] 및 용출액 B(메탄올)을 이용한 이중 비선형 구배(binary nonlinear gradient)를 사용하여 분리하였다. 컬럼 온도는 30℃로 세팅하였다. 용출 조건은 평형(6분, 20% B), 구배(20분, 20% B) 및 세척(3분, 100% B)으로 수행하였다. 이동상의 유속은 1mL/분이고, 샘플은 UV 286 nm에서 측정하였다. GABA에 대한 표준 곡선은 8개의 표준 용액, 즉 0.1, 0.2, 0.3, 1, 2, 3, 5, 및 10 g/L의 GABA (Sigma, Missouri, USA)에 대해 동일한 과정을 수행하여 측정하였다.

[0086] (글루코스 및 산 분석)

글루코스 및 임의의 산은 Aminex HPX-87H 컬럼(300×7.8 mm, Bio-Rad)를 사용하여 HPLC에서 동시에 분석하였다. 샘플을 에펜도르프 튜브에 부가하고 나서, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 다음으로, 1 mL의 상등액을 0.2 μ m 밀리포어 필터를 통해 여과하고, RID 검출을 이용하여 애질런트 시스템에서 분석하였다. 유도 샘플의 분리는 이동상으로 0.008N H₂SO₄를 사용하여 달성하였다. 컬럼 온도는 50℃로 세팅하였다. 이동상의 유속은 0.6mL/분이었다. 글루코스 및 젖산에 대한 표준 곡선은 7개의 표준 용액, 즉, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 및 10 g/L의 글루

코스 및 젓산(Sigma, Missouri, USA)에 대해 동일한 과정을 수행하여 측정하였다.

[0089] <실시예 1> GABA 합성 경로의 구축

[0090] 본 발명에서, GABA 합성 플라스미드는 직교 아라비노스-유도성 프로모터를 사용하나 스캐폴드 플라스미드는 테트라사이클린-유도성 프로모터를 사용하여 독립적인 발현을 추진하였다. GABA-T 및 GABase를 코딩하는 3개의 유전자들을 각각 리간드 GDB, SH3 및 PDZ에 융합시키고, p15A-기반 배지-카피 플라스미드에 클로닝하고 pBCDE 및 pBCDT로 명명하였다. 결합 도메인 GDB, SH3 및 PDZ는 ColE1-기반 하이-카피 플라스미드(high-copy plasmid)에 클로닝하였다.

[0091] 우선, pBCDE 및 pBCDT 플라스미드로 XL1-Blue 일명, XB(pBCDE), XB(pBCDT)를 형질전환 시켰다. 유전자 발현은 8시간 배양 후 11% SDS-PAGE에서 분석하였다(도 2). 이러한 종류의 균주를 구별하기 위해 프리-스캐폴드로 명명하였다. 표준 프로토콜에 따라 2종의 프리-스캐폴드 균주들을 계속적으로 컴피턴트 세포로 만들었고, 스캐폴드 구조 플라스미드 pJD757로 형질전환 시켜 2종의 스캐폴드 균주 XB(pBCDE, pJD57) 및 XB(pBCDT, pJD57)를 생산하였다. 단백질이 발현될 때, 각 도메인 GDB, SH3 및 PDZ는 각각 GABA-T, SSADH, 및 GABA-AT 효소를 타겟으로 할 것이다. 3종의 효소 GABAT₁SSADH₁GABA-AT₁ (비율 1:1:1)를 포함하는 스캐폴드 복합체는 서로 결합되어 있다.

[0092] 두 번째, 4종의 조작된 대장균 균주, XBM1, XBM5, XBM6 및 XBM8에도 동일한 프로토콜을 적용하였다(표 1). 이들 균주는 하기 효소 코딩 유전자들이 불활성화되어 있다: 피루베이트 포르메이트 라이세아제(pyruvate formate lyase), 피루베이트 옥시다아제(pyruvate oxidase), 락테이트 디하이드로게나아제(lactate dehydrogenase) A, 아세테이트 키나아제(acetate kinase), 알코올 디하이드로게나아제(alcohol dehydrogenase) 및 푸마레이트 리덕타아제(fumarate reductase). 이 실험의 목적은 유전자가 결실된 대장균 숙주 대 이들 결실이 없는 숙주에서 GABA 생산에 대한 효과를 비교하는 것이다.

[0093] 마지막으로, 2종의 프리-스캐폴드 컴피턴트 세포 XB(pBCDE) 및 XB(pBCDT) 각각을 다른 스캐폴드 플라스미드, 즉, 제조합 균주에서 각 효소의 수를 변화시켜 GABA 생산에 어떻게 영향을 미치는지를 시험하기 위한 pJD758, pJD759, pJD760, pJD761, pJD762, pJD763, pJD764 및 pJD765로 형질전환 시켰다. 다른 말로, 이들 복합체 GABAT₁SSADH₁GABA-AT₁(1: b: c)에서 각 효소의 수의 존재를 타겟 도메인 SH3 및 PDZ의 비율 (b:c)을 변화시켜 다양화 하였다. 상기 언급된 조건에서 형질전환체 모두에 대해 GABA 생산을 시험하였다.

[0095] <실시예 2> GABA 생산의 최적화

[0096] 제조합 균주를 사용하여 온도 및 pH를 포함한 GABA 전환을 위한 최적화 배양 조건의 결과는 표 3에 제시하였다. GABA 전환은 25, 30 및 37℃에서 조사하였다.

[0097] 표 3에 나타난 바와 같이, 최고 GABA 전환은 스캐폴드 균주에 대해 30℃에서 얻었다. 30℃에서 XB(pBCDT, pJD57)에서 최대 함량 0.68±0.04 g/L를 얻었다. 온도를 25℃ 이하로 낮출수록 GABA는 더 적게 생산되었다. 왜냐하면, 단지 0.45±0.13 g/L인 반면, 37℃에서 GABA는 0.55±0.1g/L를 얻었기 때문이다. 유사하게, 30℃에서 XB(pBCDE, pJD57)는 10g/L의 D-글루코스로부터 0.7±0.07 g/L를 전환하였다. 37℃ 보다 더 높은 온도에서는 0.63±0.02g/L의 GABA를 얻었고, 25℃에서는 0.55±0.1 g/L만이 검출되었다.

[0098] 배양 온도는 발효에 의한 최대 GABA 수율에 영향을 주는 주요 인자이다. 왜냐하면, GABA의 높은 효율적인 전환은 높은 세포 밀도 및 또한, 세포에서 생화학적 반응을 위한 적당한 배양 온도가 필요하기 때문이다. 그러나, 30℃ 내지 37℃ 사이에서 제조합 균주의 세포 밀도는 유의적으로 차이가 없다. OD₆₀₀ 세포 밀도는 측정 시 2.3±0.1 근처이나, 25℃에서 OD₆₀₀는 1.8±0.09 근처였다(미도시됨). 배양 시간 동안 2종의 스캐폴드 균주의 GABA 전환에 대한 시간 프로파일은 유사하게 점차 증가하였다(도 3).

[0099] 계속적으로, 온도는 30℃로 유지하고, 균주들에 대해 pH 별, 4.5, 5.5, 6.0 및 6.5 로 시험하였다. pH6.0에서 GABA는 가장 높은 농도를 생산하였다: 10 g/L의 D-글루코스로부터 0.69±0.12 g/L 및 0.64±0.125 g/L의 GABA (도 4). XB(pBCDE, pJD57) 균주의 경우, pH 4.5 또는 5.5에서 균주들은 낮은 GABA 함량, 즉, 단지 각각 0.45±0.08 또는 0.47±0.01 g/L의 GABA 함량을 보이나, pH6.5에서 GABA는 0.62±0.1 g/L를 얻었다. XB (pBCDT, pJD57) 균주의 경우, pH 4.5에서 검출된 GABA 전환은 0.48± 0.04 g/L의 GABA이나 pH5.5에서는 0.54±0.1 g/L의 GABA를 얻었다. 그러나, pH6.0에서 GABA 생산은 0.64±0.11 g/L까지 증가하였고, pH6.5에서는 0.63±0.06

g/L로 감소하였다. pH가 GABA 전환에 엄격하게 영향을 줄 뿐만 아니라 생물학적 공정에서 중요한 역할을 담당하는 것은 잘 알려져 있다. 산성 분위기 하에서만, GABA 트랜스포터를 코딩하는 pH-조절된 유전자들이 가장 알맞으며, 바람직하게 발현된다. 그러나, 효소 GABase는 알칼리 pH 최적을 갖는다. 이 데이터는 중성 pH가 GABA shunt에 의한 GABA 전환에 적합함을 보여준다. 발효 48시간 동안, 두 시스템의 pH는 6.0에서 6.4 근처로 증가하였다(미도시됨).

[0100] 3종 효소, GABAT, SSADH 및 GABA-AT가 과발현되지 않을 때는 GABA가 검출되지 않았다(표 3). 2종의 프리-스캐폴드 균주 XB(pBCDE) 및 XB(pBCDT)(대조군으로 사용됨)는 GABA 농도, 즉, 같은 발효 조건에서 48시간 후 0.34 ± 0.012 g/L 및 0.36 ± 0.01 g/L를 생산하였다. 대조적으로, 2종의 균주 XB(pBCDE, pJD57) 및 XB(pBCDT, pJD57)는 각각 0.7 ± 0.08 g/L 및 0.71 ± 0.04 g/L의 GABA를 생산하였고, 이는 대조군 대비 2.1배 및 2.02배 개선된 함량이다(도 4). 따라서, 스캐폴드 단백질 복합체는 세포질체에서 특정 장소에 GABase를 함께 위치시키는 역할을 담당하여 숙신산에서부터 효율적 반응을 통해 석시닉 세미알데히드를 형성하고, 마지막으로 GABA를 생산한다.

[0101] 두 개의 시스템의 차이는 GABA-AT 효소를 코딩하는 유전자에 있다(*GabT* & *PuuE*). 유전자 *PuuE* 및 *GabT* 둘 다 GABA-AT 활성을 가지고 있으며, 대장균 세포에서 석시닉 세미알데히드에 의해 GABA를 대사하며, 그들의 아미노산 서열은 67.4% 유사하다. 그러나, 두 시스템 pBCDE 및 pBCDT 간의 GABA 생산의 유의적인 차이 즉, 스캐폴드 단백질 복합체의 유무에 따른 차이는 두 경우에서 발견되지 않았다. 1:1:1의 비율로 GABAT, SSADH 및 GABA-AT를 같은 위치에서 함께 있도록 조작한 세포에서 스캐폴드 단백질의 존재는 대조군과 비교하여 GABA 생산을 증가시켰다. GABA 농도의 시간 프로파일은 재조합 균주들의 활성이 48시간 후 감소하나, GABA 농도는 안정되게 유지됨을 보여준다(미도시됨).

[0102] GABA 생산에 대한 초기 글루코스 농도의 효과는 글루코스의 다양한 농도를 사용하여 조사하였다.

[0103] 도 4에 나타난 바와 같이, 최종 GABA 농도는 글루코스 농도가 10 내지 20 g/L으로 증가함에 따라 증가하였고, 더 높은 글루코스 농도에서는 GABA 농도가 감소하였다. 초기 글루코스 농도가 20 g/L일 때, 최종 GABA 농도는 대장균 XB (pBCDE, pJD757) 및 대장균 XB(pBCDT, pJD757)에서 각각 1.12 ± 0.11 및 1.24 ± 0.13 g/L로 얻었다. 30 및 40 g/L의 글루코스에서는 더 낮은 GABA 농도를 얻었으며, 이는 높은 삼투압과 글루코스에 의한 이화 억제에서 기인한 것으로 보인다. 어떤 연구에서는 각 균주들이 GABA 생산의 최적 글루코스 수준을 갖는다고 보여주고 있다. 비록 20 g/L의 글루코스를 통해 더 높은 GABA 농도를 얻을 수 있으나, GABA/글루코스 비율에 근거하여, 10 g/L의 글루코스가 GABA 생산을 위해 훨씬 적당한 것으로 간주될 수 있다.

[0104] 재조합 균주의 세포내 대사에 대한 합성 스캐폴드 도입의 영향을 이해하기 위해, 글루코스, GABA 및 다른 대사물질 농도의 시간 프로파일을 모니터링 하였다. 주요 대사물질인 아세테이트를 HPLC 분석을 통해 측정하였다.

[0105] 도 5에 나타난 바와 같이, 대장균 XB(pBCDE, pJD757)를 배양하였을 때, 글루코스 농도는 48시간 동안 3.6 ± 0.2 g/L까지 계속적으로 감소하였다. 아세테이트 농도는 36시간째에 1.1 ± 0.2 g/L로 유의적으로 증가하였고, 배양 말기에 1.2 ± 0.17 g/L까지 유지되었으며, GABA 농도는 0.7 g/L까지 증가하였고, 이는 GABA /글루코스 비율이 12.2%에 상응하는 것이다. 대장균 XB (pBCDT, pJD757)를 배양하였을 때, 글루코스 농도는 배양 48시간 동안 10 g/L 에서 3.55 ± 0.2 g/L까지 감소하였다. 아세테이트 농도는 36시간 동안 1.2 ± 0.1 g/L까지 증가하였고, 계속적으로 1.34 ± 0.1 g/L까지 증가한다. 배양 말기, 12%의 GABA/글루코스 비율을 얻었다. 이들 결과는 세포내 탄소 흐름이 경쟁 아세테이트 경로로 향하였음을 시사하는 것이다.

[0106] GABA 생산을 증가하기 위한 한 가지 방법으로 GABA와 더불어 세포질에서 생산되는 아세테이트, 젖산, 포름산 및 에탄올 같은 부산물의 형성을 줄이는 방법이 있다. 따라서, GABA 생산에서 경쟁 대사 경로의 효과를 돌연변이 균주에서 조사하였다. 경쟁 경로에 있는 유전자들을 다양한 조합으로 결실시킨 대장균 XBM1 내지 XBM6를 시험하였다. pBCDE 및 pJD757 플라스미드를 XB와 다른 것들에 형질전환 시키고, 48시간 배양 후 GABA 농도를 모니터링 하였다.

[0107] 표 4에 나타난 바와 같이, 0 대장균 XBM1(pBCDE, pJD759) 균주에서 $.78 \pm 0.02$ g/L의 최대 GABA 농도를 얻었다.

[0108] 유사한 방법으로, pBCDT 및 pJD757 플라스미드를 탑재한 균주의 GABA 농도 프로파일을 모니터링 한 결과, 2종의 돌연변이 대장균 균주로부터 상대적으로 더 높은 GABA 농도를 얻었다. 최대 GABA 함량은 XBM1(pBCDT, pJD757)에 의해 0.75 ± 0.02 g/L를 얻었으며, 대장균 XB(pBCDT, pJD757) 균주에 의해 얻은 것보다 2% 더 높다. 이들 결과는 더 높은 GABA 농도는 경쟁 대사 경로의 불활성화에 의해 달성될 수 있음을 보여주는 것이다.

표 3

다양한 pH 및 온도 하에서 얻은 최종 GABA 농도 (g/L)

온도	25℃	30℃	37℃	
pBCDE	0.45±0.13	0.68±0.04	0.55±0.1	
pBCDT	0.55±0.1	0.7±0.07	0.63±0.02	
pH	pH 4.5	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5
pBCDE	0.45±0.08	0.47±0.01	0.69±0.12	0.63±0.1
pBCDT	0.48±0.04	0.54±0.1	0.67±0.05	0.63±0.08

[0109]

표 4

전환으로부터 얻은 최종 GABA 농도 (g/L)

균주	플라스미드	
	pBCDE	pBCDT
XB	0.34 ± 0.011	0.36 ± 0.013
XB (pJD757)	0.71 ± 0.071	0.70 ± 0.083
XB1 (pJD757)	0.76 ± 0.015	0.79 ± 0.154
XB5 (pJD757)	0.77± 0.162	0.75 ± 0.147
XB6 (pJD757)	0.86 ± 0.143	0.79 ± 0.092
XB8 (pJD757)	0.78 ± 0.085	0.71 ± 0.076

[0110]

[0112] <실시예 3> 다양한 스캐폴드 구조의 시험

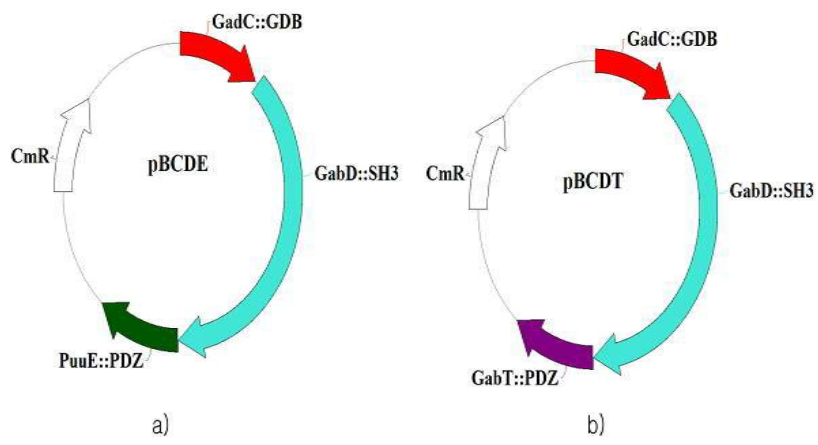
[0113] 단백질-단백질 상호작용 스캐폴드 도메인의 수를 변화시키는 것은 일련의 반응들을 위한 효소 타이타의 최적화로 인해 특정 산물의 수율 개선을 유도함이 보고되어 있다. 따라서, 8종의 스캐폴드 구조 플라스미드 pJD758에서 pJD765까지 각각을 pBCDE 및 pBCDT 플라스미드와 조합하여 대장균 XB 균주에 형질전환 시켜 16종의 재조합 균주를 제작하였다.

[0114] 도 6에 나타난 바와 같이, 0.72±0.02 g/L(12.5%)의 최대 GABA 농도는 대장균 XB(pBCDE, pJD59)에 의해 10 g/L의 초기 글루코스로부터 얻었다. 비록 어떤 재조합 균주들은 다른 균주들에 비해 훨씬 더 많은 GABA를 생산하였으나, 시험된 재조합 균주 중에서 GABA 농도의 유의적인 변화는 발견되지 않았다. 이들 결과는 GABA 생산이 하나의 복합체에서 효소 수에 의해 유의적으로 영향을 받는 것은 아님을 시사하는 것이다.

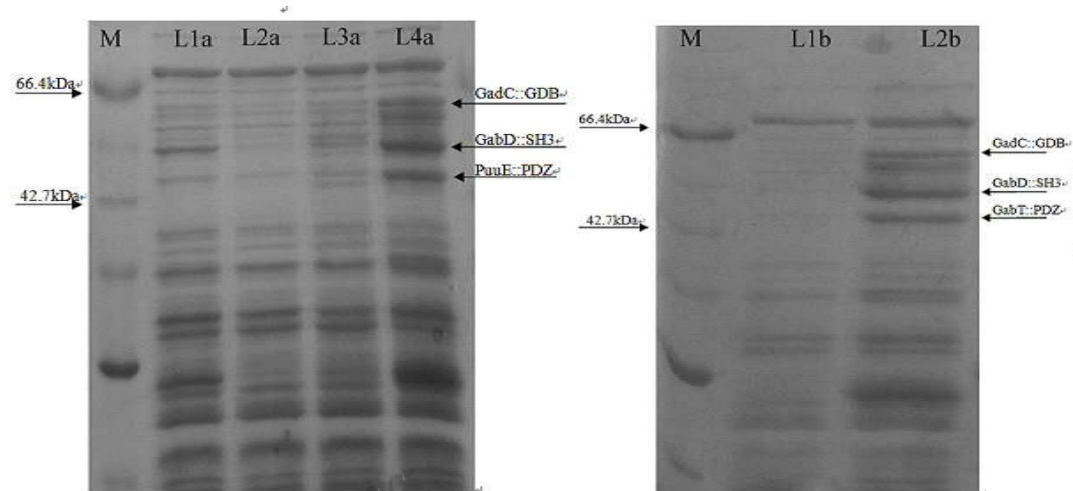
[0115] 요약하면, 기존의 GABA 생산은 하나 이상의 공정이 요구되는 글루타메이트 디카르복실라아제를 이용하여 MSG로부터 GABA의 생물변환 방식이었으나, 본 발명에서는, 단백질 스캐폴드의 도입에 의해 GABA 운반체 및 GABase(SSADH 및 GABA-AT)를 물리적으로 연결하였고, 탄소 흐름이 TCA 회로에서 GABA shunt 경로로 전용되도록 하여 우수한 수율의 GABA를 얻을 수 있었다.

도면

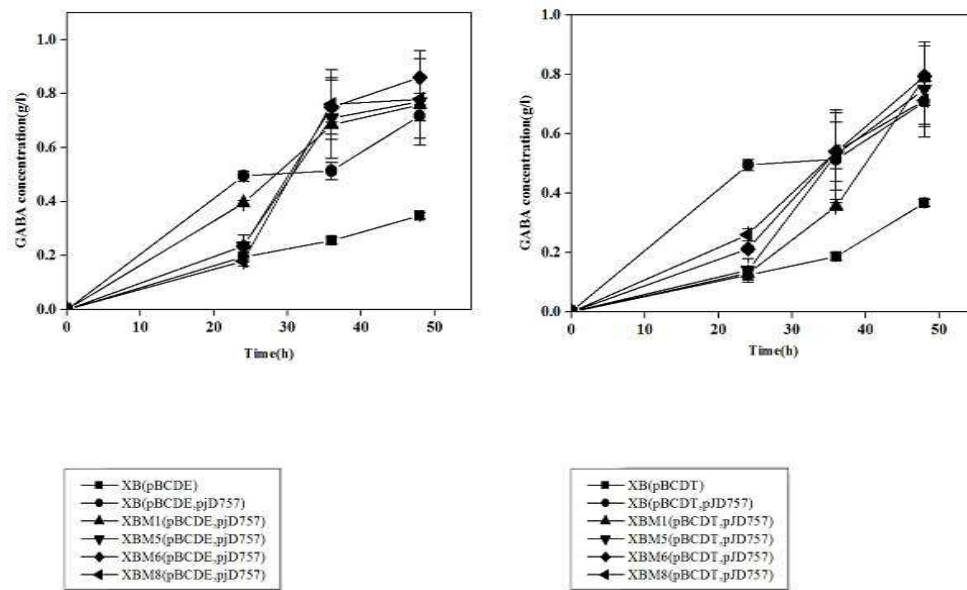
도면1



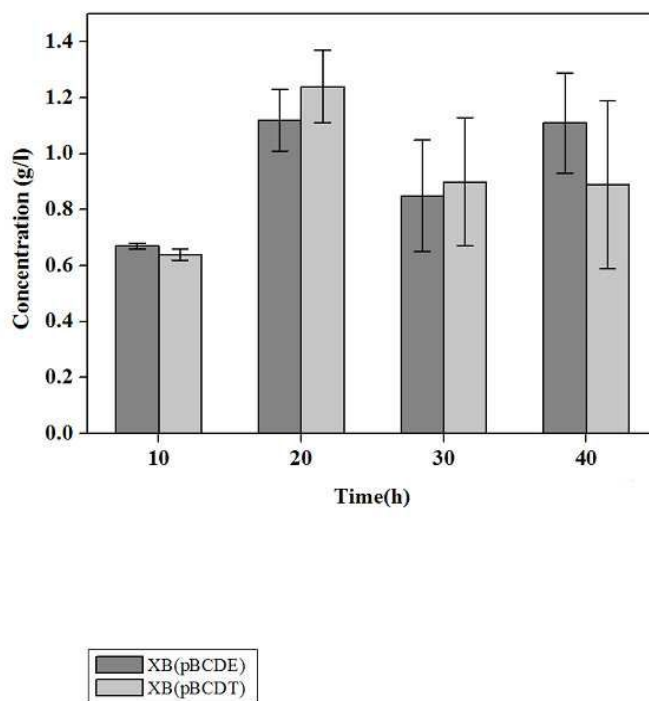
도면2



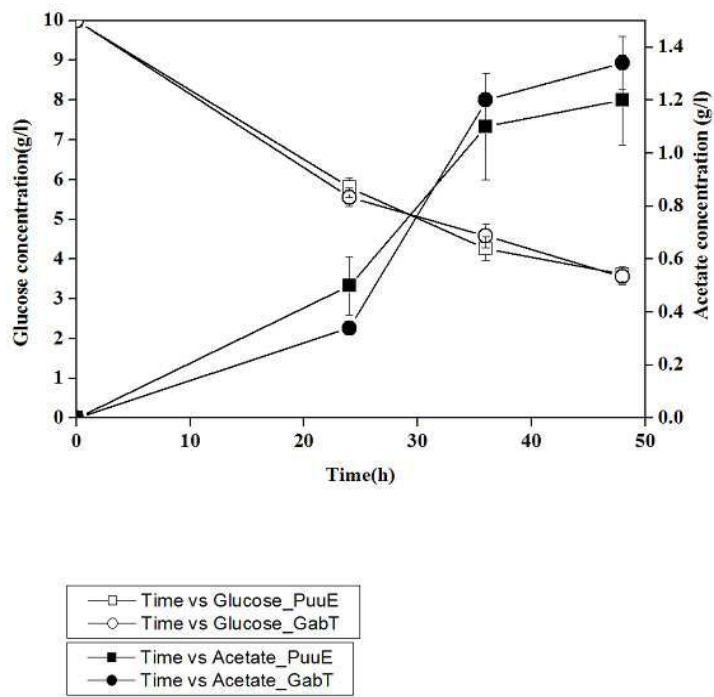
도면3



도면4



도면5



도면6

