

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 11월 3일 (03.11.2022)



WIPO PCT



(10) 국제공개번호

WO 2022/231183 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/005480

(22) 국제출원일:

2022년 4월 15일 (15.04.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0056793 2021년 4월 30일 (30.04.2021) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]: 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

(72) 발명자: 이지원 (LEE, Jee Won); 06707 서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호(방배동,서초중앙하이츠빌라), Seoul (KR). 유연화 (YU, Yeon Hwa); 03326 서울특별시 은평구 서오릉로20길 4-2, 102호 (갈현동,스위트빌), Seoul (KR). 최유빈 (CHOI, Yoo Bin);

10905 경기도 파주시 한울로 100, 609동 2701호(동패동, 한울마을6단지), Gyeonggi-do (KR).

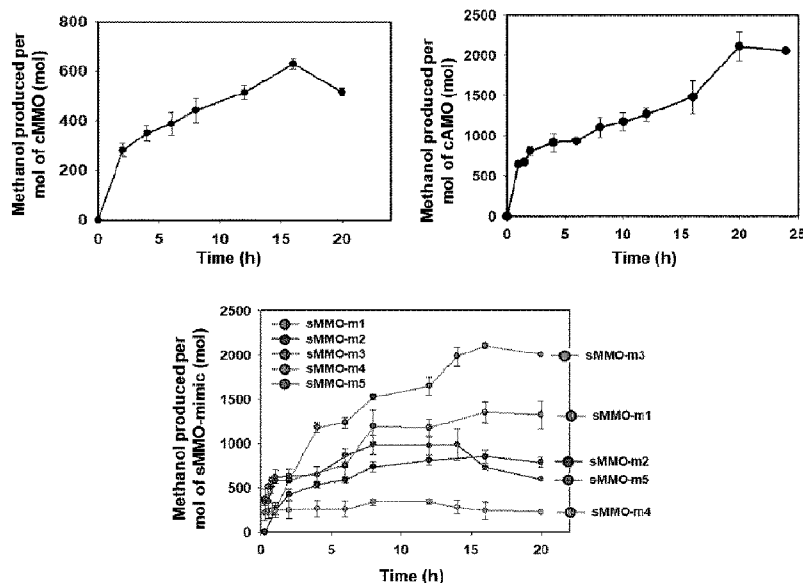
(74) 대리인: 특허법인리채 (LEECHAE INTELLECTUAL PROPERTY); 06236 서울특별시 강남구 테헤란로26길 12, 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: NOVEL PROTEIN HAVING METHANE OXIDATION ACTIVITY

(54) 발명의 명칭: 메탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질



(57) Abstract: The present invention relates to a protein in which ferritin monomers, in which a methane oxidation activity domain, and an electron transfer domain comprising a flavin adenine dinucleotide (FAD)-binding domain are fused, are self-assembled, and to: a protein which can oxidize methane by using NADH in vivo as a reducing agent, thus being capable of oxidizing methane to methanol without using a separate reducing agent; a microorganism expressing same; a composition for producing methanol by using same; and a method for producing methanol.

(57) 요약서: 본 발명은 메탄산화 활성 도메인; 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인; 이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질에 관한 것으로서, 생체 내 NADH를 환원제로 사용하여 메탄을 산화시킬 수 있으므로, 별도의 환원제 사용 없이도 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있는 단백질, 이를 발현하는 미생물, 이를 활용한 메탄을 제조용 조성물, 메탄을 제조 방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/231183 A1

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 메탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질

기술분야

- [1] 본 발명은 메탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] 메탄산화세균(methanotrophs) 유래의 메탄산화효소(Methane monooxygenase, MMO)는 상온 상압의 온화한 조건에서 메탄가스를 포함한 다양한 탄화수소(C1-C8)의 산화 반응을 촉매하여 고부가가치의 산물을 생산할 수 있는 매우 유용한 바이오촉매로서 이를 활용하는 바이오공정 개발에 세계적인 관심이 집중되고 있다.
- [4] 또한, 유사 계열 효소로 Nitrosomonas europaea 유래의 암모니아산화효소(Ammonia monooxygenase, AMO)등이 메탄산화효소와 비슷한 기작으로 넓은 범위의 탄화수소(C1 - C10 사슬형/할로젠화 탄화수소, 단/다고리형 방향족 탄화수소)에 대해 산화반응을 촉매할 수 있는 유용한 바이오촉매이나 현재까지 3D 구조, 활성 도메인의 규명, 반응 메커니즘, 기질 특이성 등에 대한 기초 연구가 매우 미비하다.
- [5] 현재 메탄가스의 화학 공정에 의한 메탄올 생산은 단계가 복잡하고 부산물(이산화탄소, syngas 등)에 의한 환경오염 유발, 낮은 반응 전환율, 고온, 고압의 반응 조건으로 인한 고에너지 소비 등, 기술적, 환경적, 경제적 측면의 많은 문제점을 안고 있다. 또한, 메탄가스는 고가의 수송, 저장 비용에 기인하는 경제성 저하 및 유출 시 심각한 온실효과 유발 등의 문제로 인해 현지 가스전에 쉽게 연계될 수 있는 소규모 바이오 플랜트를 이용한 메탄올 생산이 기술적, 경제적 측면에서 매우 유리하다.
- [6] 바이오 공정의 개발 노력으로 메탄올 외 다른 고부가산물 생산을 위한 메탄산화세균의 대사공학적 균주 개량이 시도되고 있으나 유전공학적 도구 활용의 한계, 균주의 난배양성으로 인한 어려움 등이 있으며 메탄산화효소의 대량생산을 위해 산업용 균주를 이용한 이중 발현은 수용성 단백질의 발현이 어렵고 효소 복합체의 정밀한 상호작용이 요구되는 등의 높은 기술적 난이도로 산업적 활용의 성공사례가 없다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 우수한 메탄 산화능을 갖는 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.
[9] 본 발명은 상기 단백질을 발현하는 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
[10] 본 발명은 상기 단백질 또는 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물을

제공하는 것을 목적으로 한다.

[11] 본 발명은 상기 단백질을 또는 미생물을 이용한 메탄올 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 1. 메탄산화 활성 도메인 및 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.

[14] 2. 위 1에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 pmoB1(Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1), MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase) 또는 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1)인 단백질.

[15] 3. 위 2에 있어서, 상기 pmoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, MMOH는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

[16] 4. 위 2에 있어서, 상기 amoB1은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

[17] 5. 위 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 단백질.

[18] 6. 위 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

[19] 7. 위 1에 있어서, 메탄산화 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것인 단백질.

[20] 8. 위 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 MMOB(Methane monooxygenase regulatory protein B)가 더 융합된 것인 단백질.

[21] 9. 위 8에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

[22] 10. 위 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOB는 MMOH가 융합된 페리틴 단량체에 융합된 것인 단백질.

[23] 11. 위 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOH 및 상기 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 MMOB가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.

[24] 12. 위 11에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

[25] 13. 위 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 인간 페리틴 중쇄 단량체인 단백질.

[26] 14. 위 1에 있어서, 상기 각 도메인은 페리틴 단량체의 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프,

N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것인 단백질.

[27] 15. 위 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질을 발현하는 미생물.

[28] 16. 위 15에 있어서, 상기 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 것인 미생물.

[29] 17. 위 16에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것인 미생물.

[30] 18. 위 15에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.

[31] 19. 위 15에 있어서, 상기 미생물은 FDH(formate dehydrogenase)을 더 발현하는 것인 미생물.

[32] 20. 위 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질 또는 청구항 15 내지 19 중 어느 한 항의 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물.

[33] 21. 위 20의 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법.

[34]

발명의 효과

[35] 본 발명의 단백질은 메탄 산화 활성을 가지며, 생체 내의 NADH를 메탄 산화에 필요한 환원제로서 사용할 수 있다.

[36] 본 발명의 단백질을 활용한 in vivo 메탄올 제조시에, 별도의 환원제 도입이 불필요하다.

[37]

도면의 간단한 설명

[38] 도 1a-c는 각 실시예에서 사용된 벡터의 개략도이다.

[39] 도 2는 각 실시예에서 제조된 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 나타낸 것이다.

[40] 도 3a-b는 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질이 자기조립체를 형성함을 확인한 것이다.

[41] 도 4a 내지 6d는 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-m3를 포함하는 재조합 단백질의 Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS), EPR 및 XANES 분석 결과이다.

[42] 도 7은 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

[43] 도 8은 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-m3의 ¹³C-메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

- [44] 도 9는 메탄산화 활성 도메인 및 [2Fe-2S]과 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자전달 도메인이 융합된 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.
- [45] 도 10은 cAMO, sMMO-m3 단백질을 발현하는 대장균 lysate의 메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.
- [46] 도 11은 cAMO, sMMO-m3 단백질을 발현하는 대장균 lysate의 ¹³C-메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

[47]

발명의 실시를 위한 형태

- [48] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[49]

- [50] 본 발명은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질에 관한 것이다.

- [51] 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 및 전자 전달 활성을 나타낼 수 있다.

- [52] 메탄은 하기 수학적 1의 반응에 따라 산화되어 메탄올이 형성될 수 있는데, 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 것으로서, 환원제인 NADH를 이용하여 메탄 산화 반응을 수행할 수 있으며, 특히, in vivo에서 반응 진행시에 체내의 NADH를 활용할 수 있다. 이에, 별도의 환원제의 사용이 불필요하다.

[53]

- [54] [수학적 1]

- [55] $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$

- [56] 메탄산화 활성 도메인은 메탄을 산화시키는 활성을 갖는 도메인으로서, 메탄산화 효소에서의 활성 부위를 포함하는 도메인이거나, 메탄 산화 효소 유래가 아니더라도, 서열 또는 구조적 유사성 등에 의해 메탄 산화능을 가지는 효소의 활성 부위를 포함하는 도메인이라면 모두 사용 가능하다.

- [57] 본 발명에서 메탄산화 활성 도메인으로는 예를 들면 pmoB1(Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1), MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase), amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. MMOH는 MMOH α 일 수 있다. 보다 구체적인 예를 들면, pmoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다. MMOH는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다. amoB1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.

- [58] 전자 전달 도메인은 예를 들면 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함할 수 있다.

- [59] FAD 결합 도메인은 sMMO(soluble MMO(Methane monooxygenase)) 유래일 수

있고, 구체적으로는 그 구성요소 중 하나인 MMOR의 FAD 결합 도메인(MMOR_F)일 수 있다.

- [60] 전자 전달 도메인은 FAD 결합 도메인을 포함할 수 있고, 이는 FAD 결합 도메인만으로 이루어진 것일 수도 있고, MMOR에서 FAD 결합 도메인 외에 추가 부분을 더 포함할 수도 있고, FAD 결합 도메인 외에 2Fe-2S 도메인의 적어도 일부를 더 포함할 수 있으며, FAD 결합 도메인 및 2Fe-2S 도메인을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 전자 전달 도메인은 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.
- [61] 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질로서, 상기 각 도메인은 1개의 페리틴 단량체 내에 모두 융합된 것일 수도 있고, 각 페리틴 단량체에 각각 융합된 것일 수도 있고, 이들이 혼합된 것일 수도 있다.
- [62] 즉, 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것일 수도 있고, 이들 도메인 모두가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것일 수도 있고, 이들 도메인 모두가 융합된 페리틴 단량체 및 각 도메인 중 하나가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것일 수도 있다.
- [63] 본 발명에 따른 페리틴 단량체는 MMOB(Methane monooxygenase regulatory protein B)가 더 융합된 것일 수 있다.
- [64] MMOB는 sMMO의 구성 성분인 MMOB일 수 있고, 예를 들면 MMOB는 서열번호 7의 아미노산 서열 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 예를 들면, MMOB는 메탄산화 활성 도메인인 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)과 함께 사용될 수 있다. 이 경우의 구체적인 예를 들자면, MMOH, MMOB, 전자 전달 도메인이 1개의 페리틴 단량체에 융합될 수도 있고, 2개의 페리틴 단량체에 나누어서 융합될 수도 있다. 2개의 페리틴 단량체로 나누어지는 경우, MMOH와 MMOB가 1개의 페리틴 단량체에 융합되고, 전자 전달 도메인이 나머지 페리틴 단량체에 융합될 수도 있고, MMOH와 전자 전달 도메인이 1개의 페리틴 단량체에 융합되고, MMOB가 나머지 페리틴 단량체에 융합될 수도 있다.
- [66] 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질로서, 페리틴 단량체로는 다양한 생물 유래 페리틴을 사용할 수 있고, 척추 동물의 경우 중쇄 또는 경쇄 단량체를 사용할 수 있다. 예를 들면 인간 페리틴 중쇄를 사용할 수 있다.
- [67] 페리틴 단량체에서 자가조립된 단백질에서 그 기능을 할 수 있는 것이라면 각 도메인의 결합 위치는 제한되지 않으며, 예를 들면 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서

선택되는 어느 한 곳에 융합된 것일 수 있고, 단백질에서 외부에 표출되어 그 기능을 용이하게 발휘한다는 측면에서 바람직하게는 C-말단에 융합된 것일 수 있다.

[68] 본 발명의 단백질에서, 페리틴 단량체와 각 도메인의 사이에는 링커가 더 포함될 수 있다.

[69] 링커로는 당 분야에 공지된 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면 S1(G3SG3TG3SG3), S2(GKLGGG) 등을 사용할 수 있다.

[70] 본 발명의 단백질은 예를 들면 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자, 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 생물체에 형질전환시켜 그 생물체로부터 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[71] 본 발명의 단백질은 미생물 내에서 soluble form으로의 발현율이 높아, 생합성시의 제조 수율이 높다.

[72]

[73] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 발현하는 미생물에 관한 것이다.

[74] 본 발명의 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자, 및 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입되어, 상기 단백질을 발현하는 것일 수 있다.

[75] 본 발명의 단백질에서 각 도메인은 1개의 페리틴 단량체 내에 모두 융합된 것일 수도 있고, 각 페리틴 단량체에 각각 융합된 것일 수도 있고, 이들이 혼합된 것일 수도 있는 바, 상기 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것일 수 있다.

[76] 벡터로는 당 분야에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있고, 예를 들면 들어 BLUESCRIPT 벡터(Stratagene), T7 발현 벡터(Invitrogen), pET 벡터(Novagen) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 벡터는 단백질 발현을 위한 프로모터, 분리/정제를 위한 태그, 형질전환 마커 등 당 분야에 공지된 추가 구성요소를 더 포함할 수 있다.

[78] 미생물은 상기 벡터가 도입되어 상기 단백질을 발현할 수 있는 것이라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 대장균을 사용할 수 있다.

[79] 본 발명의 미생물은 상기 단백질을 발현하므로, 메탄의 산화에 의해 메탄올을 제조하는데 활용될 수 있다. 본 발명의 미생물 사용시에 메탄올 생성을 위한 별도의 환원제의 첨가가 불필요하다.

[80] 본 발명의 미생물은 FDH(formate dehydrogenase)를 더 발현하는 것일 수 있다. 상기 FDH는 세포내 NAD⁺를 NADH로 환원시켜 NADH 재사용을 통한 환원력을 높일 수 있다.

[81] 본 발명의 미생물은 FDH를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입되어,

FDH를 발현하는 것일 수 있다. FDH를 코딩하는 유전자는 상기 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터에 함께 포함될 수 있고, 또는 별개의 벡터에 포함될 수 있다.

[82] 또한, 본 발명은 전술한 단백질 또는 전술한 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물에 관한 것이다.

[83] 전술한 단백질은 메탄 산화 및 전자 전달 활성을 가지는 것이고, 전술한 미생물은 상기 단백질을 발현하는 것이므로, 본 발명의 조성물은 이를 포함하여 메탄을 산화시켜 메탄올을 제조할 수 있다.

[84] 메탄 제조는 상기 조성물에 메탄 가스를 처리하여 수행될 수 있고, 상기 단백질의 사용시에는 추가 환원제를 처리 해야 하고, 상기 미생물의 사용시에는 환원제의 사용이 불필요하다. 추가 환원제로는 NADH를 더 포함할 수 있다.

[85]

[86] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법에 관한 것이다.

[87] 본 발명에 따른 조성물을 메탄 가스와 반응시켜 메탄이 산화됨에 따라 메탄올이 제조될 수 있고, 이는 전술한 조성물에 메탄 가스를 주입시키고 효소 반응을 진행시킴으로써 수행될 수 있다.

[88] 메탄올 제조 조건은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 전술한 단백질 또는 미생물이 적정 활성을 나타내는 온도, pH 등의 조건에서 수행될 수 있다.

[89]

[90] 실시예

[91] 1. 단백질 생합성을 위한 발현 벡터 제조

[92] 하기 표 1에 기재된 벡터 모식도에 따라 PCR을 통하여 chimeric MMO (pMMO(pmoB1) + sMMO(MMOR_F)), chimeric AMO (AMO(amoB1) + sMMO(MMOR_F)), sMMO-mimics (sMMO-m1 ~ sMMO-m5), cMMO(Full reductase, FR)(pMMO(pmoB1) + sMMO(MMOR)), cAMO(FR)(AMO(amoB1) + sMMO(MMOR)), sMMO-m2(FR)를 제작하였다. 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 젤에서 정제한 다음, 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[93] 이렇게 만들어진 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7, pET28a 발현용 벡터에 삽입하여 각각의 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다.

[94] 각각의 단백질들의 발현용 벡터들은 pT7-cMMO-B1, pET28a-cMMO-B2, pT7-cAMO-B1, pET28a-cAMO-B2, pT7-sMMO-m1-B1, pET28a-sMMO-m1-B2, pT7-sMMO-m2-B1, pET28a-sMMO-m2-B2, pT7-sMMO-m3-B1, pET28a-sMMO-m3-B2, pT7-sMMO-m4-B1, pET28a-sMMO-m4-B2, pT7-sMMO-m5-B1, pET28a-sMMO-m5-B2, pT7-cMMO(FR)-B1, pET28a-cMMO(FR)-B2, pT7-cAMO(FR)-B1, pET28a-cAMO(FR)-B2, pT7-sMMO-m2(FR)-B1, pET28a-sMMO-m2(FR)-B2로 진행하였다. (도 1a-c)

[95] [표 1]

재조합 단백질	발현 벡터
cMMO	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ (G ₃ SG ₃ TG ₃ SG ₃))-BamHI-pmoB1(H33-T172)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F (C99-A348)-HindIII-COOH
cAMO	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-amoB1(H38-L177)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F -HindIII-COOH
sMMO-m1	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOH _α (A64-L321)-BamHI-MMOB-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F -HindIII-COOH
sMMO-m2	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-MMOH _α (V93-K295)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F -HindIII-COOH
sMMO-m3	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOR _F -BamHI-MMOH _α (A64-L321)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOB(retro)-HindIII-COOH
sMMO-m4	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOR _F -BamHI-MMOH _α (A64-L321)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOB-HindIII-COOH
sMMO-m5	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOR _F -BamHI-MMOH _α (A64-L321)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -HindIII-COOH
cMMO(FR)	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-pmoB1-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR-HindIII-COOH
cAMO(FR)	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-amoB1-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR-HindIII-COOH
sMMO-m2 (FR)	1. NH ₂ -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-MMOH _α (V93-K295)-HindIII-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR-HindIII-COOH

[96] 사용된 각 단백질의 아미노산 서열은 하기 표 2와 같다.

[97]

[98] [표2]

도메인	서열	서열 번호
pmoB1 (33-172)	HGEKSQA AFMRMRTIHWYDLSWSKEKVKINETVEIKGKFH VFEGWPETVDEPDVAFLNVGMPGPVFIRKESYIGGQLVPRS VRLEIGKTYDFRVVLKARRPGDWHVHTMMNVQGGGPIIGP GKWITVEGSMSEFRNPVTT	1
MMOH _α (64- 321)	AKEYARMEAVKDERQFGSLQDALTRLNAGVRVHPKWNET MKVVS NFLEVGEYNAIAATGMLWDSAQA AEQKNGYLAQV LDEIRHTHQCA YVNYYFAKNGQDPAGHNDARRTRTIGPLW KGMKRVFSDGFISGDAVECSLNLQLVGEACFTNPLIVAVTE WAAANGDEITPTVFLSIETDEL RHMANGYQTVVSIANDPAS AKYLNTDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLFEYGSKFKVEPWV KTWDRWVYEDWGGIWIGRL	2
MMOH _α (93- 295)	VRVHPKWNETMKVVS NFLEVGEYNAIAATGMLWDSAQA A EQKNGYLAQVLDEIRHTHQCA YVNYYFAKNGQDPAGHND ARRTRTIGPLWKGMKRVFSDGFISGDAVECSLNLQLVGEAC FTNPLIVAVTEWAAANGDEITPTVFLSIETDEL RHMANGYQT VVS IANDPASAKYLNTDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLFEYG SK	3
amoB1 (38-177)	HGERSQEPFLRMRTVQWYDIKWGP E VTKVNENAKITGKFH LAEDWPRAAAQPDFSFFNVGSPSPVFVRLSTKINGHPWFISG PLQIGRDYEF EVNLRARIPGRHHMHAMLN VKDAGPIAGPGA WMNITGSWDDFTNPLKL	4
MMOR _F (99-348)	CRISFGEVGSFEAEVVGLN WVSSNTVQFLLQKRPDEC GNRG VKFEPGQFMDLTIPGTDVSR SYSPANLPNPEGRLEFLIRVLPE GRFSDYLRNDARVGQVLSVKGPLGVFGLKERGMAPRYFVA GGTGLAPVVS MVRQMQEWTAPNETRIYFGVNTEPELFYIDE LKSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEGEQGSPIDALREDLES SDANPDIYLCGPPGMIDAACELVRSRGIPGEQVFF EKFLPSG AA	5
MMOR(FR)	MQRVHTITAVTEDGESLRFECRSD EDVITAALRQNIFLMSSC REGGCATCKALCSEG DYDLKGCSVQALPPEEEEEGLVLLCR TYPKTDLEIELPYTHCRISFGEVGSFEAEVVGLN WVSSNTVQ	6

	FLLQKRPDECGNRGVKFEPPGQFMDLTIPGTDVSRSPANLP NPEGRLEFLIRVLPEGRFSDYLRNDARVGQVLSVKGPLGVF GLKERGMAPRYFVAGGTGLAPVVSMVRQMQEWTAPNETRI YFGVNTEPELFYIDELKSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEG EQGSPIDALREDLESSDANPDIYLCGPPGMIDAACELVRSRGI PGEQVFFEKFLPSGAA	
MMOB	SVNSNAYDAGIMGLKGKDFADQFFADENQVVHESDTVVLV LKKSDINTFIEEILLTDYKKNVNPTVNVEDRAGYWWIKAN GKIEVDCDEISELLGRQFNVDYDFLVDVSSTIGRAYTLGNKFTI TSELMGLDRKLEDYHA	7
MMOB (retro)	AHYDELKRDLGMLESTITFKNGLTYARGITSSVDVLFDYVN FQRGLLESIEDCDVEIKGNAKIWWYGARDEVNVTNPNKK YDTLLIEEIFTNIEDSKKLVLVVTDSHVQVQNEAFFQDAFD KGKLGMIADYANSNVS	8

[99]

[100] 2. 재조합 단백질의 생합성 및 정제

[101] 대장균 균주 BL21(DE3)[F_{ompThsdS_B}(rB-mB)]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질 전환하였다. cMMO, cAMO, sMMO-m1 ~ m5, cMMO(FR), cAMO(FR), sMMO-m2(FR)는 대장균 균주 BL21에 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질 전환하였으며, 앰피실린과 카나마이신에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린과 100 mg L⁻¹ 카나마이신, 0.4 mM CuSO₄ 또는 FeSO₄ 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다.

[102] 배지 탁도(O.D.₆₀₀)가 약 0.6에 도달할 때,

IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM)을 첨가하여 유전자의 발현을 유도하였다. 20°C에서 14시간 배양 후, 배양한 대장균을 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 먼저 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 재조합 단백질을 농축하고 버퍼 교환을 진행하여 정제된 재조합 단백질을 얻을 수 있었다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[103] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[104] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM

NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(Quiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다. (세척 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0 / 용출 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0).

[105] 2) 농축과 버퍼교환

[106] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 2 mL의 재조합 단백질을 ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)에 담아 컬럼 위에 1mL의 용액이 남을 때까지 5,000 rpm으로 원심 분리를 진행하였다. 그 후에 Tris 버퍼(20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8.0)로 버퍼 교환을 해주었다.

[107]

[108] 3. 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도 분석

[109] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 SDS-PAGE로 분석하였다. 재조합 단백질의 파쇄된 세포액을 원심분리하여 얻은 상등액(soluble fraction, sol)과 불용성 응집체 (insoluble fraction, insol), 정제된 재조합 단백질을 12 % Tris-glycine precast gel(Invitrogen, California, U.S.A.)을 사용하여 SDS-PAGE를 진행하였다. 그리고 젤을 코마시블루 염색 용액으로 염색하고, 염색된 단백질 밴드를 densitometer(GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, California, U.S.A.)를 통해 각 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 분석하였다. (도 2)

[110]

[111] 4. 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 구조 분석

[112] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM) 촬영을 하였다. 단백질의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2 % (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 단백질 이미지를 200 kV에서 작동하는 Tecnai 20(FEI, Hillsboro, Oregon, U.S.A.) 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 구형 자가조립체가 형성된 것을 확인하였다. 추가적으로 DLS(dynamic light scattering) 분석을 통하여 cMMO는 30.3±1.9 nm, cAMO는 27.9±4.7 nm, sMMO-m1은 23.7±6.7 nm, sMMO-m2는 19.6±5.5 nm, sMMO-m3는 20.5±5.4 nm, sMMO-m4는 19.4±7.1 nm, sMMO-m5는 17.8±3.1 nm의 크기를 지니는 자가조립체를 형성함을 확인하였다. (도 3a-b)

[113] 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-m3를 포함하는 재조합 단백질의 구조 분석을 위하여 X-ray absorption spectroscopy (XAS) 및 Electron paramagnetic resonance (EPR) spectra 분석을 진행하였다. 단백질의 X-ray absorption near-edge structure

(XANES), Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) 및 EPR 분석을 위해, Tris 버퍼로 용매 교환된 샘플을 -80°C에서 3시간동안 사전 냉동하고, 사전 냉동된 샘플은 동결 건조기(FDU-2100, DRC-1000, EYELA)를 사용하여 -110°C에서 동결 건조되었다. XAS 분석은 Aichi Synchrontron Radiation Center (Aichi)의 XAFS beam line (BL11S2)에 의해 측정되었으며, EPR spectrometer (JES-FA200)으로 측정되었다. cMMO EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 구리 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였으며, XANES 분석 결과 1, 2가 구리이온(Cu(I), Cu(II))이 혼재되어 있음을 확인하였다. 추가적으로 EPR 분석을 통하여 2가 구리 이온이 valence-scrambled state로 존재함을 확인하였다. (도 4a-c)

[114] cAMO EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 구리 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였으며, 메탄 산화 반응이 진행된 샘플의 경우에는 반응을 하지 않은 샘플과 비교하여 리간드의 거리가 달라진 것을 확인하였으며 한 개의 피크(~2.2 Å)가 추가적으로 관찰되는 것을 확인하였다. XANES 분석 결과 1, 2가 구리이온(Cu(I), Cu(II))이 혼재되어 있음을 확인하였다. 추가적으로 EPR 분석을 통하여 2가 구리 이온이 valence-scrambled state로 존재함을 확인하였다. (도 5a-c)

[115] sMMO-m3 EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 철 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였다. 또한 XANES 및 EPR 분석결과 2, 3가 철 이온(Fe(II), Fe(III))이 혼재되어 있으며 메탄 산화 반응이 진행된 샘플의 경우에는 반응을 하지 않은 샘플에 비해 Fe(III)/Fe(II) 비율이 증가하였음을 확인하였다. 추가적으로 EPR 분석을 통하여 3가 철 이온의 존재를 확인하였다. (도 6a-d)

[116]

[117] **5. 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성 증명**

[118] 정제된 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 20 mL의 septa-sealed vial(catalogue no. 5182-0837, Agilent)에 환원제인 NADH(0.2 ~ 0.3 mM)를 포함하는 1 mL의 재조합 단백질 용액을 주입하였다. 재조합 단백질을 통한 메탄 산화 반응을 위해 19 mL의 headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 15 mL의 메탄 가스와 4 mL의 공기를 주입함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 30°C의 인큐베이터에서 최대 24시간까지 효소 반응을 진행하였다. 그리고 효소 반응에 의해 발생하는 산화 생성물인 메탄올의 양을 가스 크로마토그래피(7890B GC, Agilent)를 통해 측정하여 누적 생산량을 계산하였다. (도 7)

[119] cMMO, cAMO, sMMO-m3의 ¹³C-메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 상기 명시된 메탄 산화 반응과 동일한 방법으로 효소 반응을 진행하되, 메탄 가스를 ¹³C-메탄 가스로 치환하여 진행하였다. Nuclear magnetic resonance (NMR)분석을 위해 반응이 끝난 vial 5개를 80°C에서 15분 가열한 뒤 headspace 기체 19 ml을 충분히 냉각된 에탄올 600 µl에 주사기를 이용하여 직접 주사하였다. 그 후 ethanol-d₆를 60 µl 추가하여 NMR tube(NORS55007, Sigma Aldrich)로 옮겨

cMMO, cAMO, sMMO-m3 효소 반응에 의해 생성된(발생하는 산화 생성물인) ¹³C-메탄올을 NMR 분석을 통해 확인하였다. (도 8)

[120]

[121] **6. 메탄산화 활성 도메인 및 [2Fe-2S]과 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자전달 도메인이 융합된 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성 증명**

[122] cMMO, cAMO, sMMO-m2에 대해 전자전달 도메인이 [2Fe-2S] 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자전달 도메인으로 치환된 cMMO(FR), cAMO(FR), sMMO-m2(FR) 재조합 단백질을 상기 명시된 방법으로 제조하여 메탄 가스 산화 반응 16시간 후 메탄올 생산량을 가스 크로마토그래피를 통해 확인하였다. (cMMO(FR): N.D., cMMO: 629.28(±21.23) mol methanol/mol enzyme, cAMO(FR): 427.03(±50.2) mol methanol/mol enzyme, cAMO: 1355.16(±213.06) mol methanol/mol enzyme, sMMO-m2(FR): 570.60(±50.96) mol methanol/mol enzyme, sMMO-m2: 886.62(±46.86) mol methanol/mol enzyme). 메탄올 생산량의 비교를 통해 [2Fe-2S] 및 FAD 결합 도메인 모두를 포함하는 전자전달 도메인(MMOR(FR))이 융합된 재조합 단백질보다 FAD 결합 도메인만을 포함하는 전자전달 도메인(MMOR_F)이 융합된 재조합 단백질의 경우 메탄 산화 활성이 더 높은 것을 확인하였다. (도 9)

[123]

[124] **7. 재조합 단백질을 발현하는 대장균 lysate의 메탄 가스 산화 활성 증명**

[125] cMMO, cAMO, sMMO-m3 단백질을 발현하는 대장균을 이용한 메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 대장균 세포 내 NAD(H)의 전구체를 합성해주는 효소(nicotinic acid phosphoribosyltransferase)가 과발현 될 수 있도록 해당 효소의 유전정보를 담고 있는 *pncB* 유전자가 도입된 균주 BL21(DE3)[$\Delta yrfE\Delta yjAD::pncB$](*Eng. Life Sci.*, 7, 343-353, 2007)를 사용하였다. 또한 세포내 NAD⁺를 NADH로 환원시켜 NADH 재사용을 통한 환원력을 높이기 위해 *Pseudomonas* sp. (strain 101)유래 FDH(formate dehydrogenase) (1)*Journal of solid-phase biochemistry*, 5, 19-33, 1980, 2)*Cell*, 179(6), 1255-1263, 2019)를 pETDuet-1 벡터를 이용하여 cMMO, cAMO, sMMO-m3 단백질과 동시 발현될 수 있는 발현용 벡터를 구축하였다. (표 3)

[126]

본 균주(BL21(DE3)[$\Delta yrfE\Delta yjAD::pncB$])에 cMMO, cAMO, sMMO-m3 단백질들의 발현용 벡터들로 각각 형질 전환하여 상기 명시된 배양방법을 통해 단백질 발현을 진행하였다. 추가적으로 IPTG 1 mM을 첨가하는 과정에서 균주 내 환원력 지속을 위해 Sodium formate 50 mM를 첨가하여 20°C에서 14시간 배양하였다. 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 메탄 가스가 퍼징된 파쇄 용액에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포 lysate은 파쇄전 대장균 탁도(O.D.₆₀₀) 30이 되도록 현탁하여 3 mL씩 GC vial에 분주하였다. 재조합 단백질이 발현된 대장균 lysate를 통한 메탄 산화 반응을 위해 19 mL의 vial

headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 10 mL의 메탄 가스와 9 mL의 공기를 주입함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 30°C의 인큐베이터에서 최대 52시간까지 lysate 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 vial은 80°C에서 20분 가열하여 생성된 메탄올이 기화되도록 하였다. 그리고 lysate에 의해 발생하는 산화 생성물인 메탄올의 양을 가스 크로마토그래피를 통해 측정하여 누적 생산량을 계산하였다. (sMMO-m3 발현 lysate 최대 메탄올 생산량: 1280 MeOH (mol)/enzyme (mol), cAMO 발현 lysate 최대 메탄올 생산량: 1460 MeOH (mol)/enzyme (mol)) (도 10)

[127]

[128] [표3]

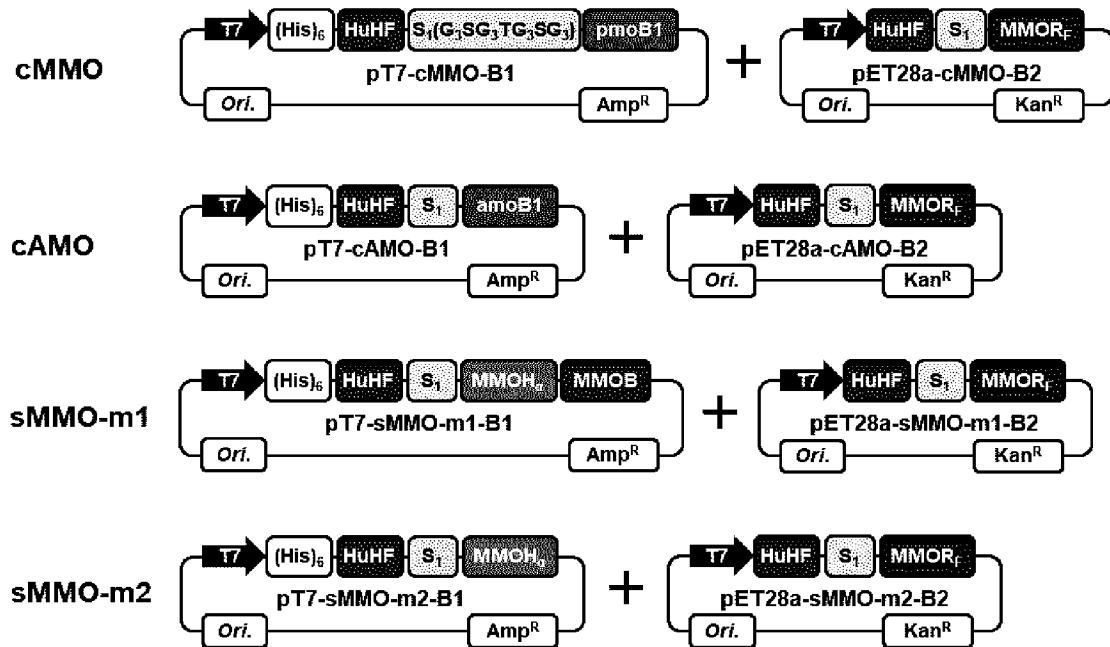
제조합 단백질	발현 벡터
cAMO (w/ <i>P.FDH</i>)	1-1.NH ₂ -NcoI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-amoB1(H38-L177)-HindIII-COOH 1-2. NH ₂ -NdeI- <i>P.FDH</i> -XhoI-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F -HindIII-COOH
sMMO-m3(w/ <i>P.FDH</i>)	1-1.NH ₂ -NcoI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOR _F -BamHI-MMOR _α (A64-L321)-HindIII-COOH 1-2.NH ₂ -NdeI- <i>P.FDH</i> -XhoI-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _α (retro)-HindIII-COOH

청구범위

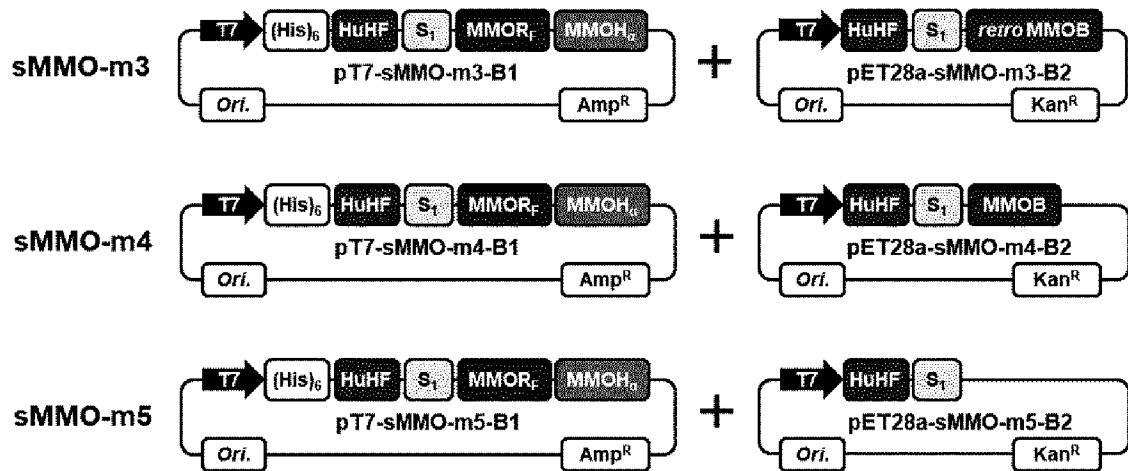
- [청구항 1] 메탄산화 활성 도메인 및 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 pmoB1(Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1), MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase) 또는 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1)인 단백질.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 pmoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, MMOH는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서, 상기 amoB1은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 단백질.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 메탄산화 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것인 단백질.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 MMOB(Methane monooxygenase regulatory protein B)가 더 융합된 것인 단백질.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOB는 MMOH가 융합된 페리틴 단량체에 융합된 것인 단백질.
- [청구항 11] 청구항 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOH 및 상기 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 MMOB가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [청구항 13] 청구항 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 인간 페리틴 중쇄 단량체인 단백질.
- [청구항 14] 청구항 1에 있어서, 상기 각 도메인은 페리틴 단량체의 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진

- 균에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것인 단백질.
- [청구항 15] 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질을 발현하는 미생물.
- [청구항 16] 청구항 15에 있어서, 상기 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자, 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 것인 미생물.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것인 미생물.
- [청구항 18] 청구항 15에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.
- [청구항 19] 청구항 15에 있어서, 상기 미생물은 FDH(formate dehydrogenase)를 더 발현하는 것인 미생물.
- [청구항 20] 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질 또는 청구항 15 내지 19 중 어느 한 항의 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물.
- [청구항 21] 청구항 20의 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법.

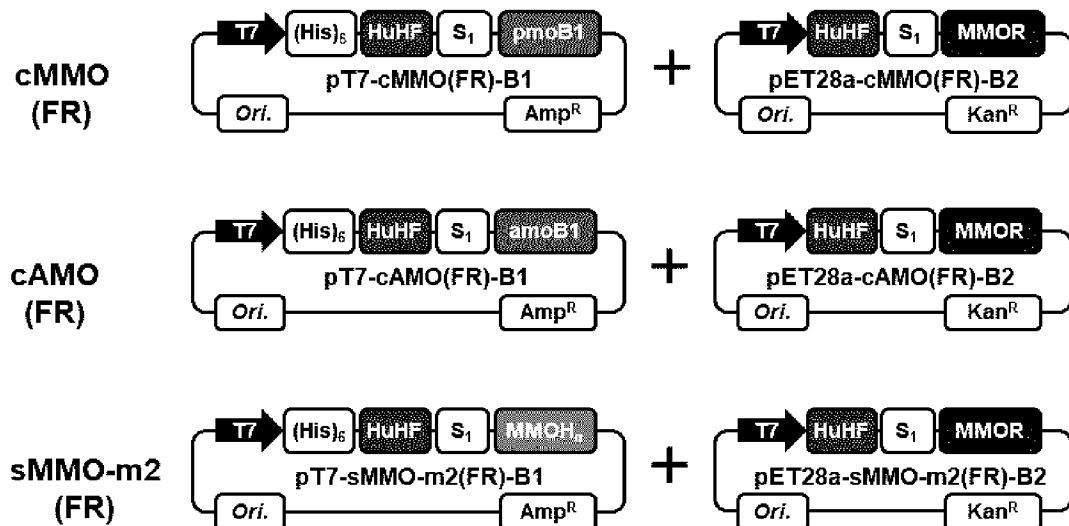
[도 1a]



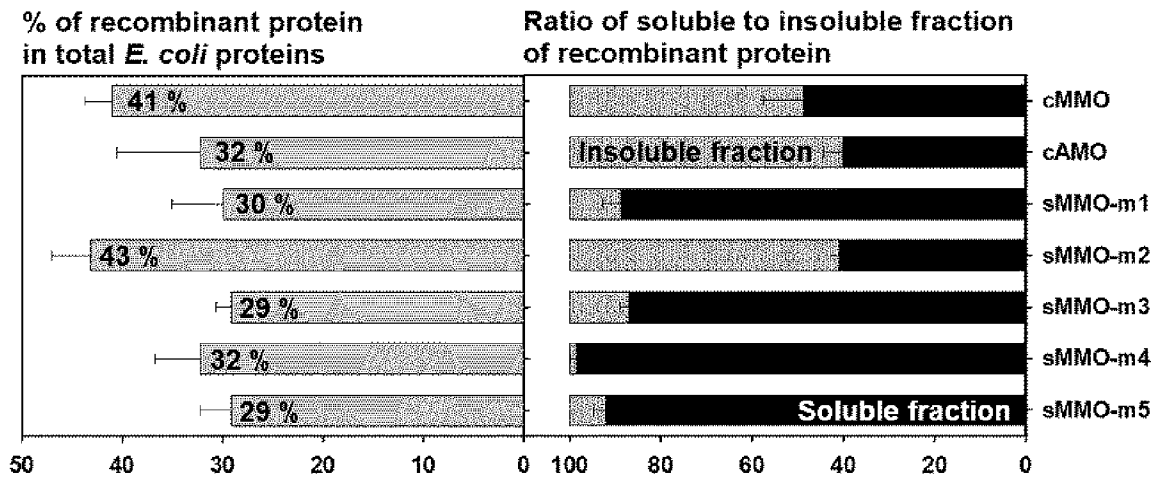
[도 1b]



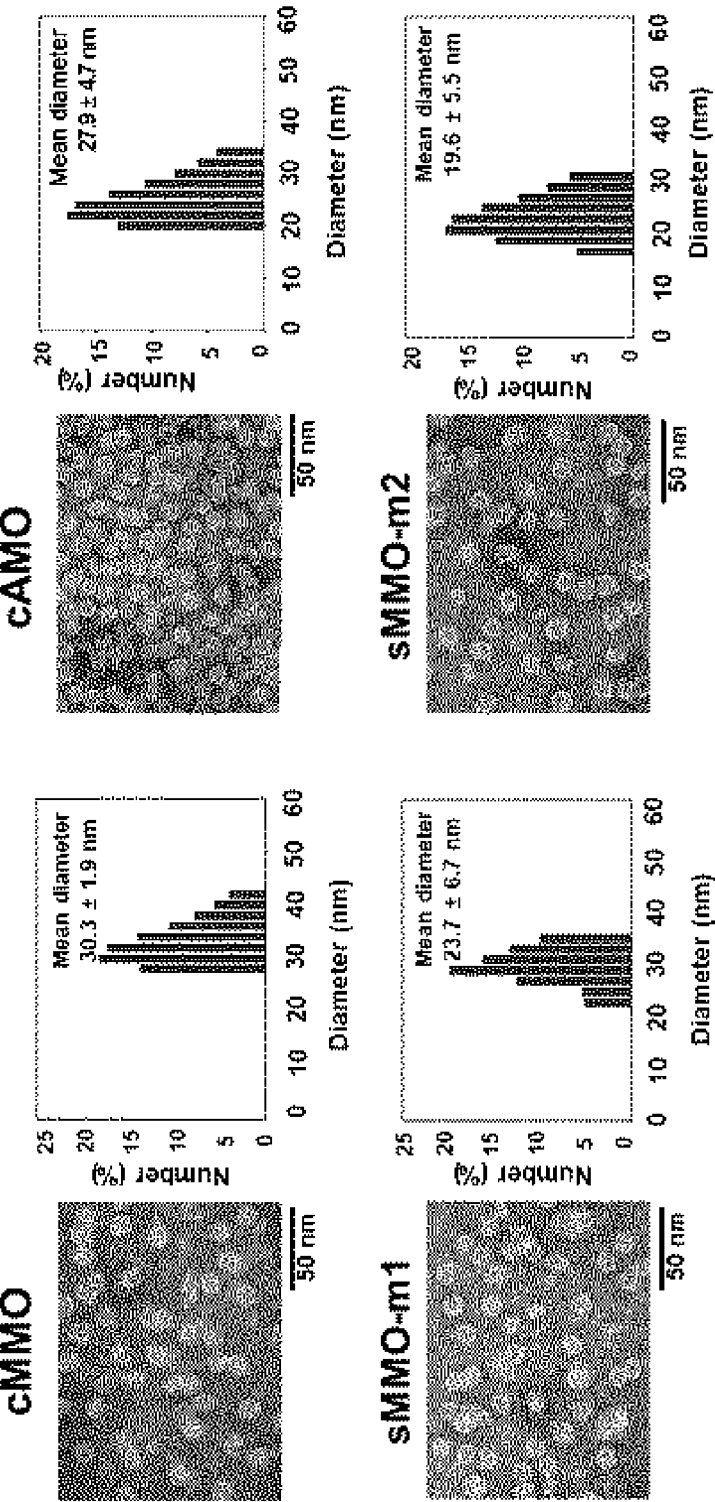
[도 1c]



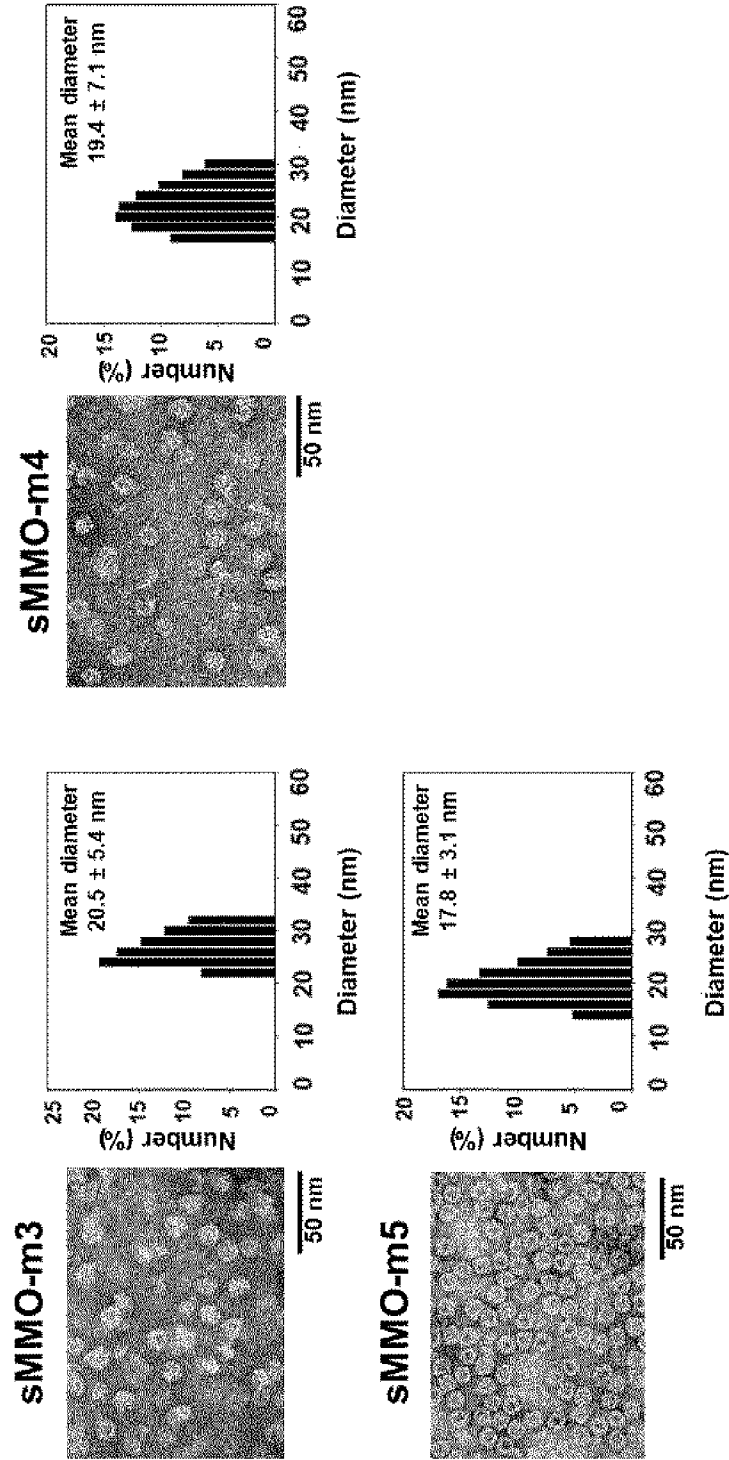
[도2]



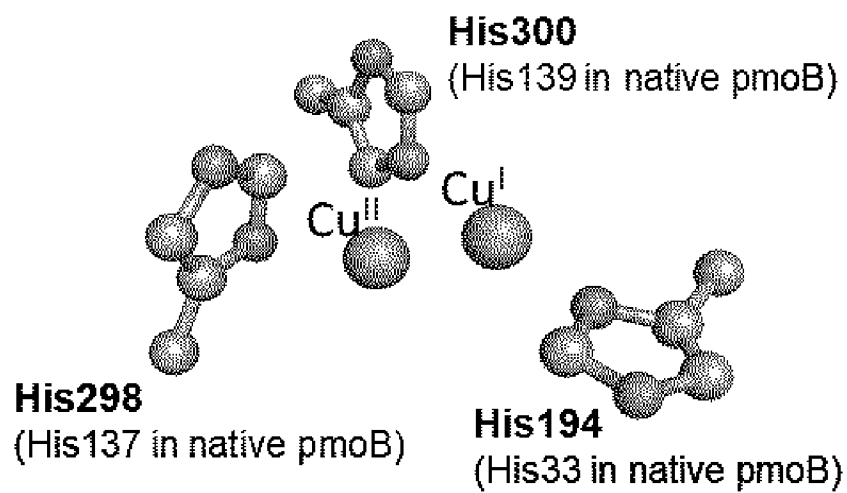
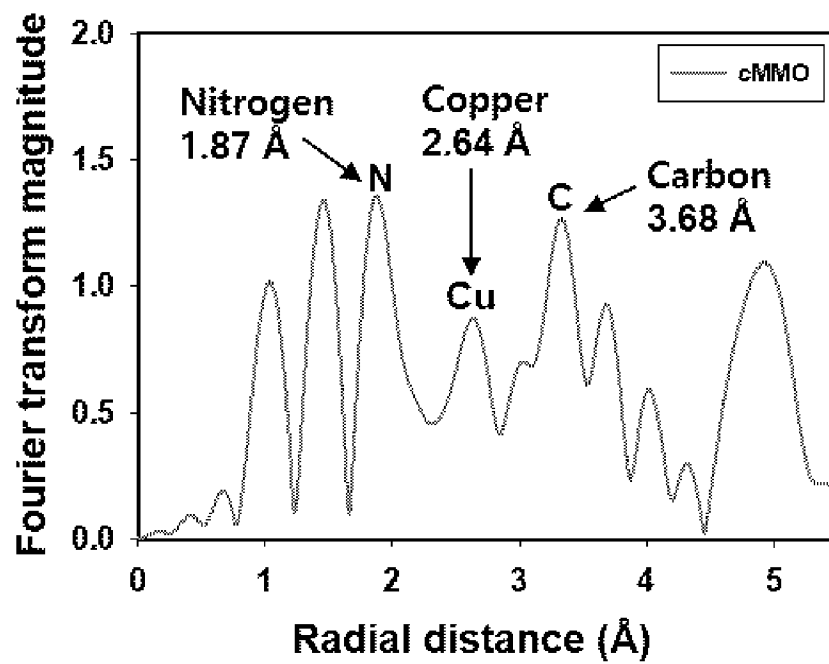
[도3a]



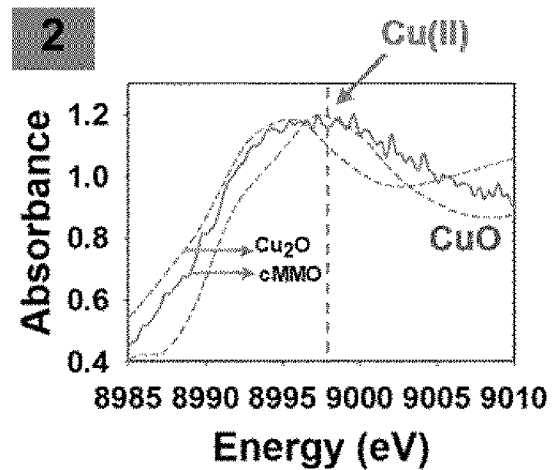
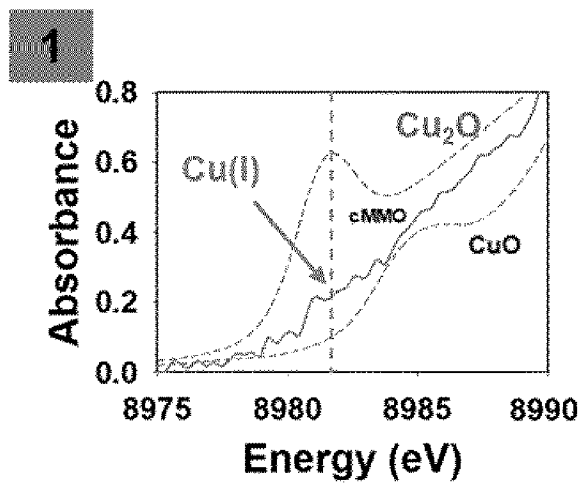
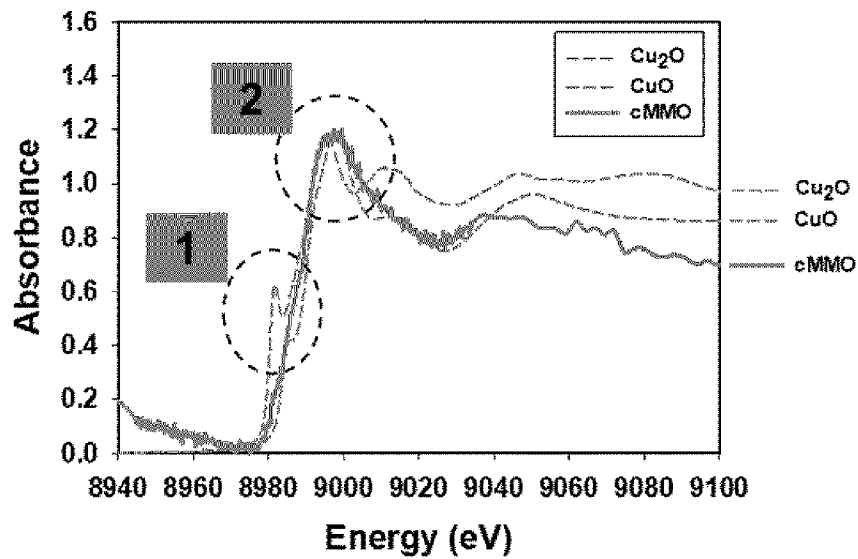
[도3b]



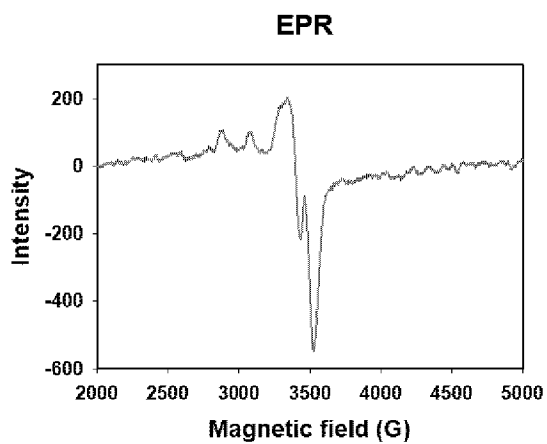
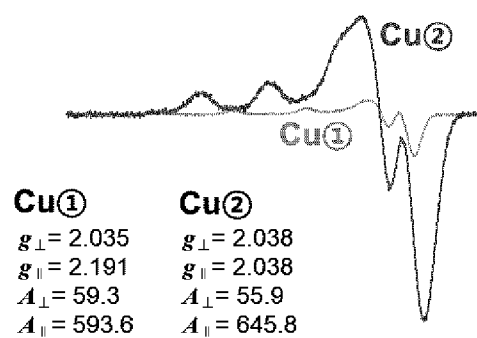
[도4a]

EXAFS

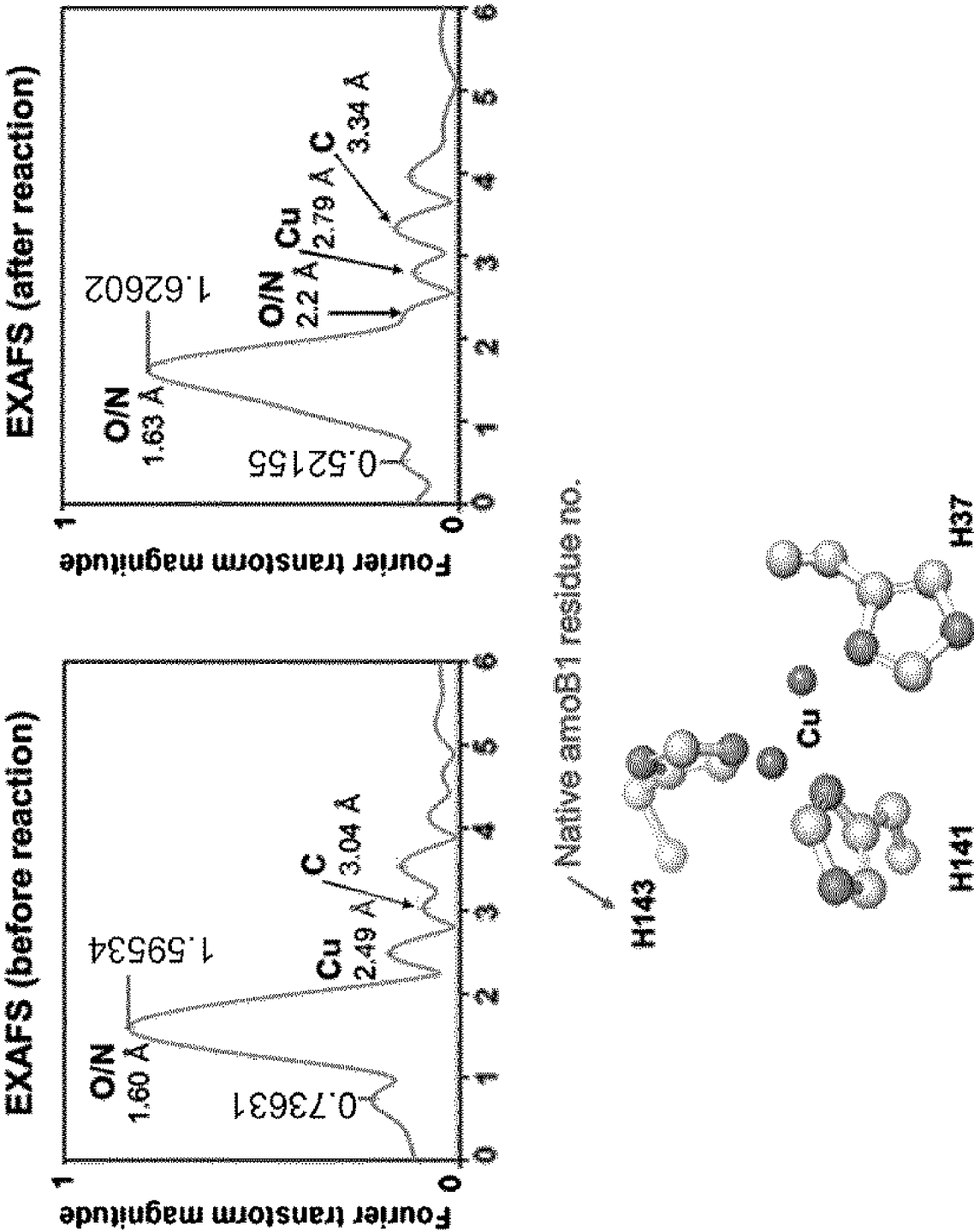
[도4b]

XANES

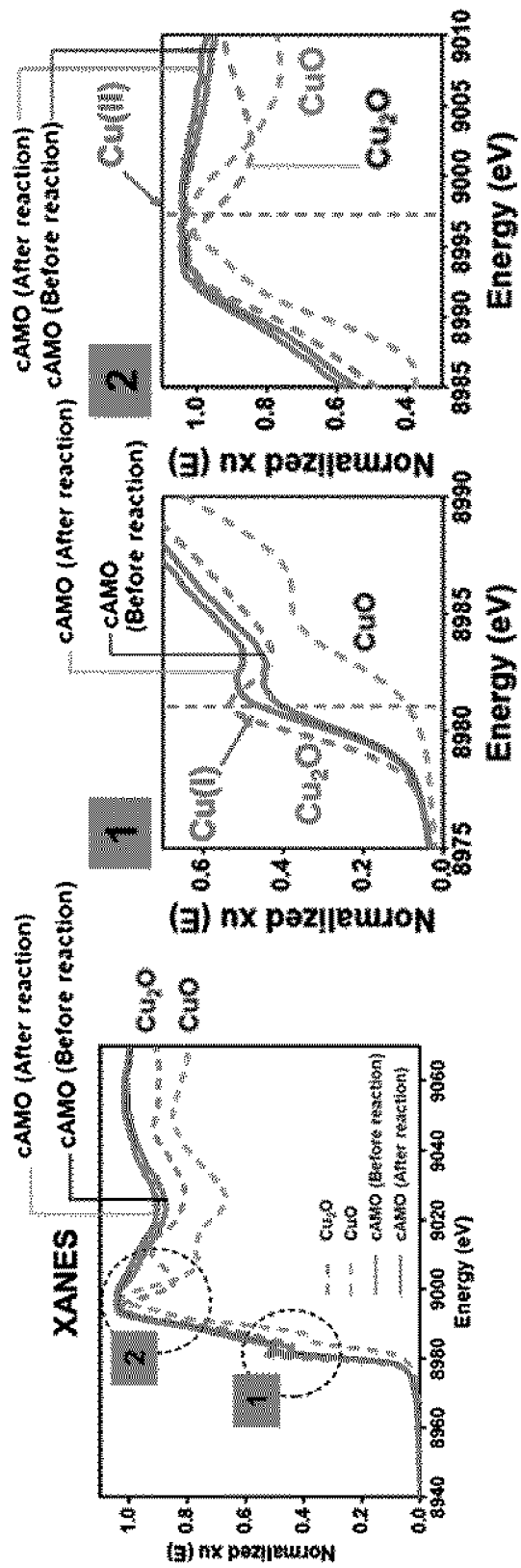
[도4c]

**EPR graph fitting**

[도5a]

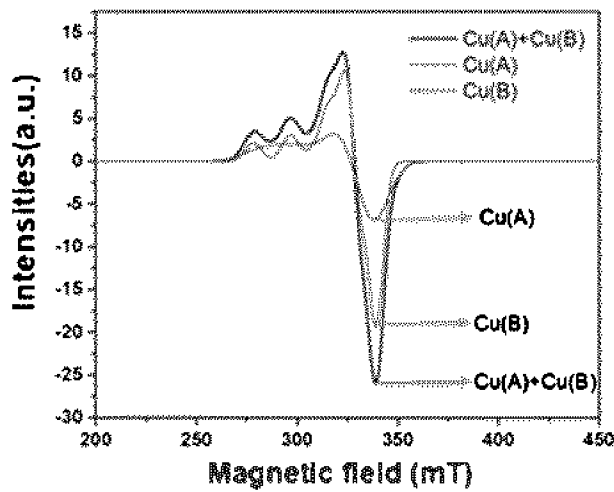


[도5b]



Both Cu(I) and Cu(II) are present in CAMO

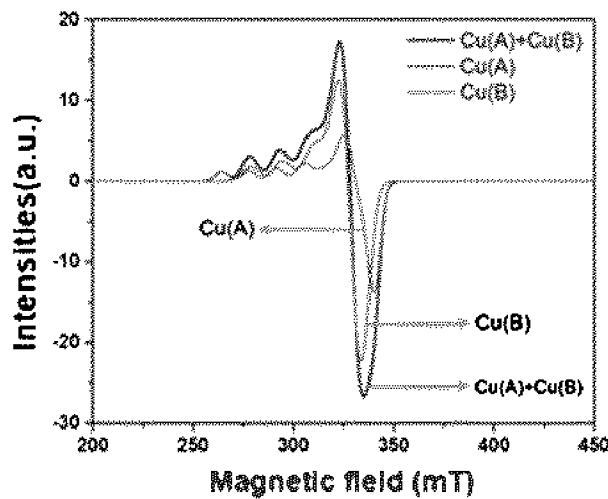
[도5c]

EPR (before reaction)**Cu(II) - A**

g[] : [2.023, 2.341]
 A(1): 104.855
 A(2): -239.104
 lwpp: 14.591
 Weight: 7.321

Cu(II) - B

g[] : [2.046, 2.205]
 A(1): 22.596
 A(2): 553.663
 lwpp: 7.838
 Weight: 9.520

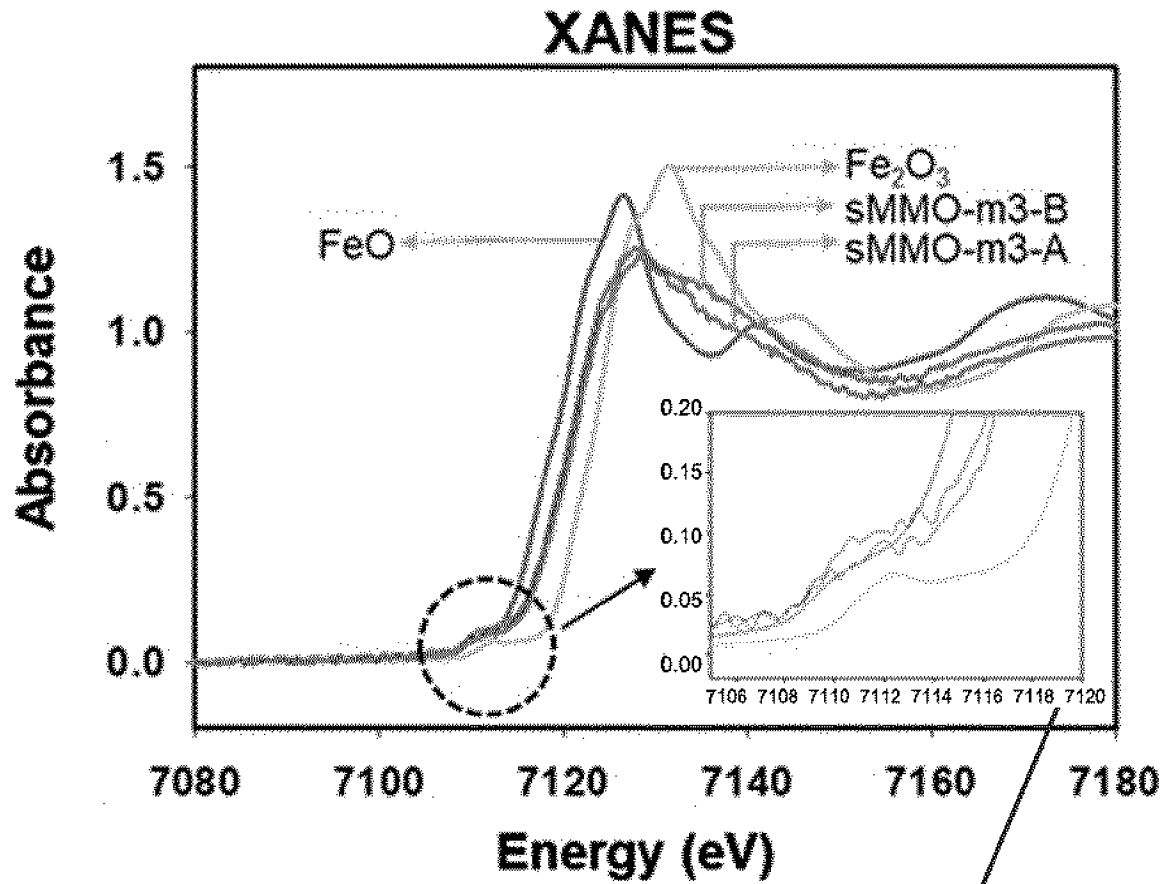
EPR (after reaction)**Cu(II) - A**

g[] : [2.015, 2.367]
 A(1): 91.313
 A(2): 445.55
 lwpp: 6.469
 Weight: 6.627

Cu(II) - B

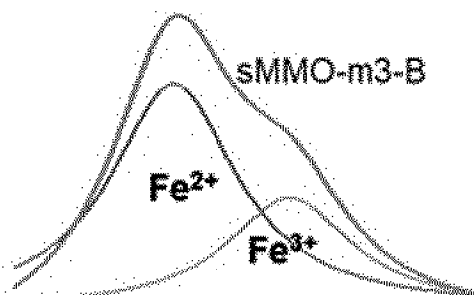
g[] : [2.056, 2.231]
 A(1): 23.497
 A(2): 474.369
 lwpp: 8.229
 Weight: 8.418

[도6a]

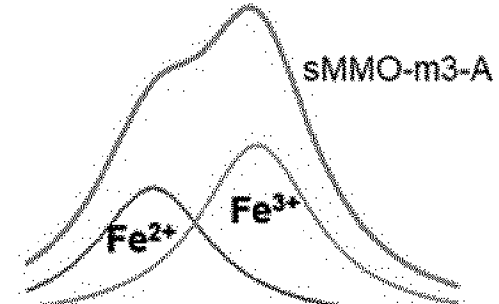


- FeO
- Fe₂O₃
- sMMO-m3-B (sMMO-m3 before methane oxidation)
- sMMO-m3-A (sMMO-m3 after methane oxidation)

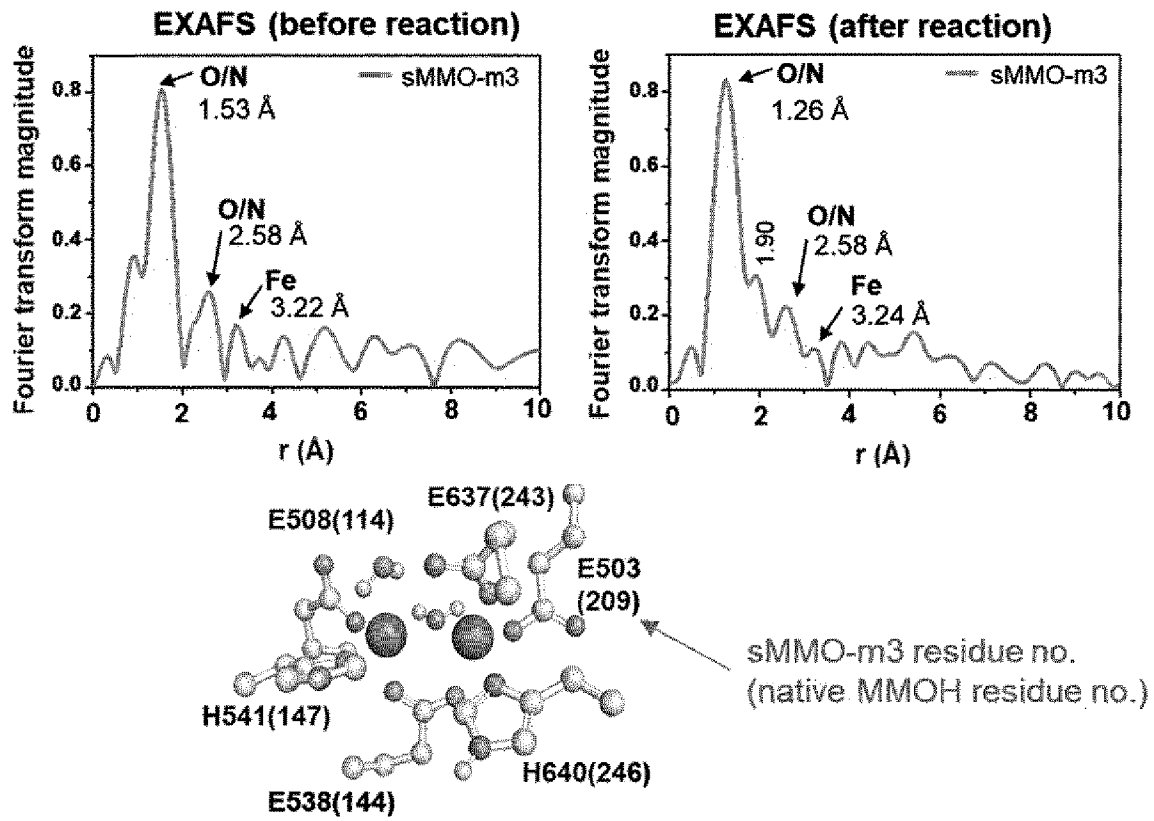
Before reaction



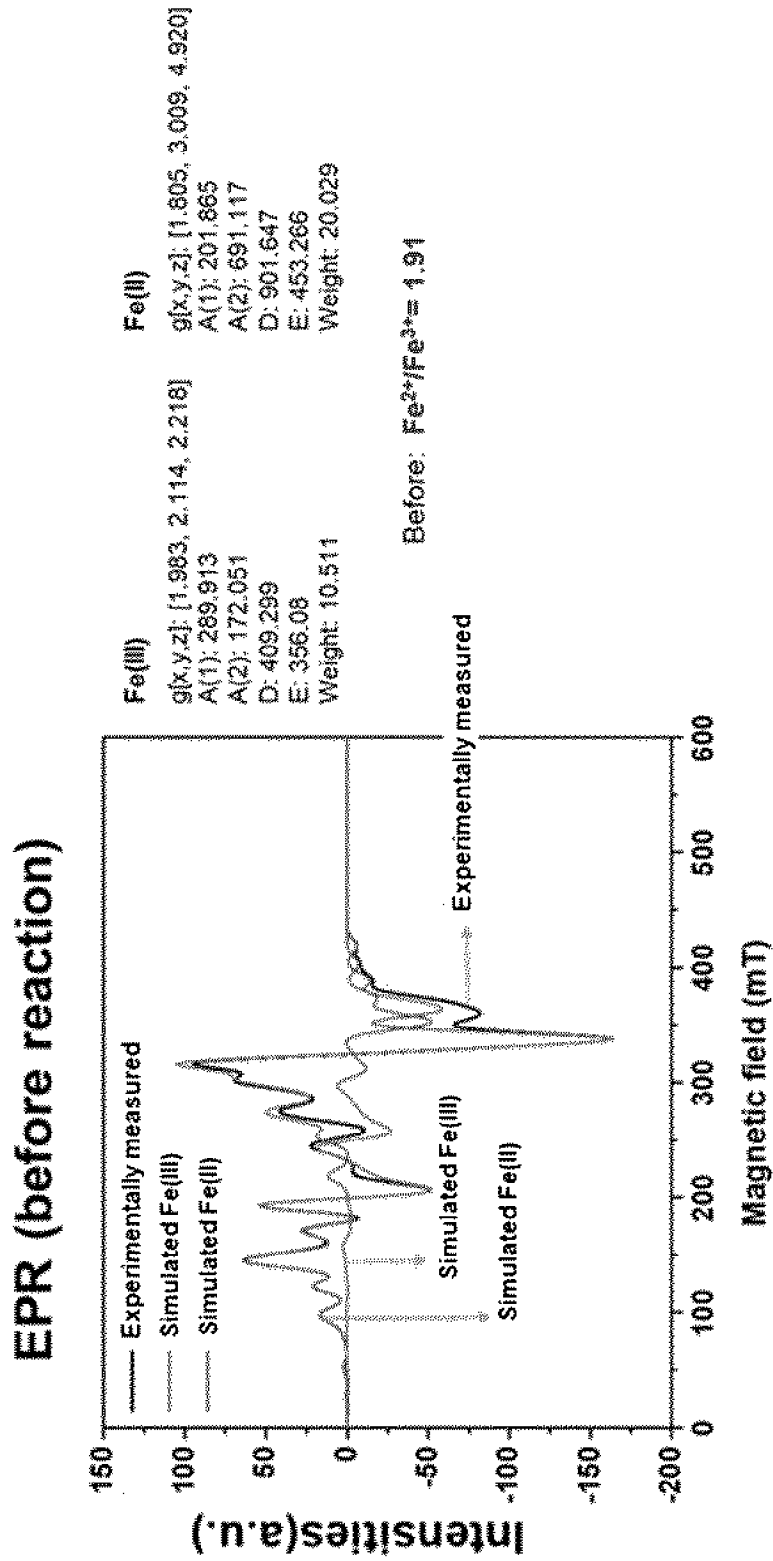
After reaction



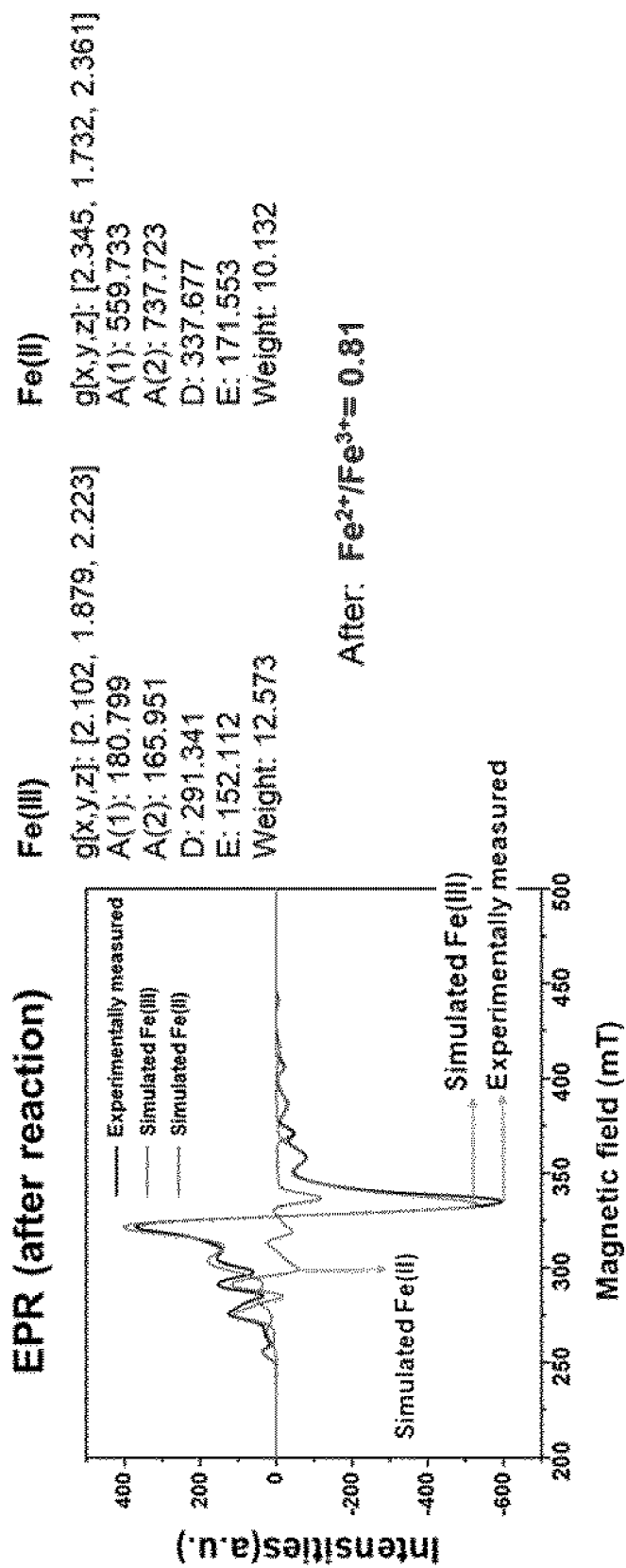
[도6b]



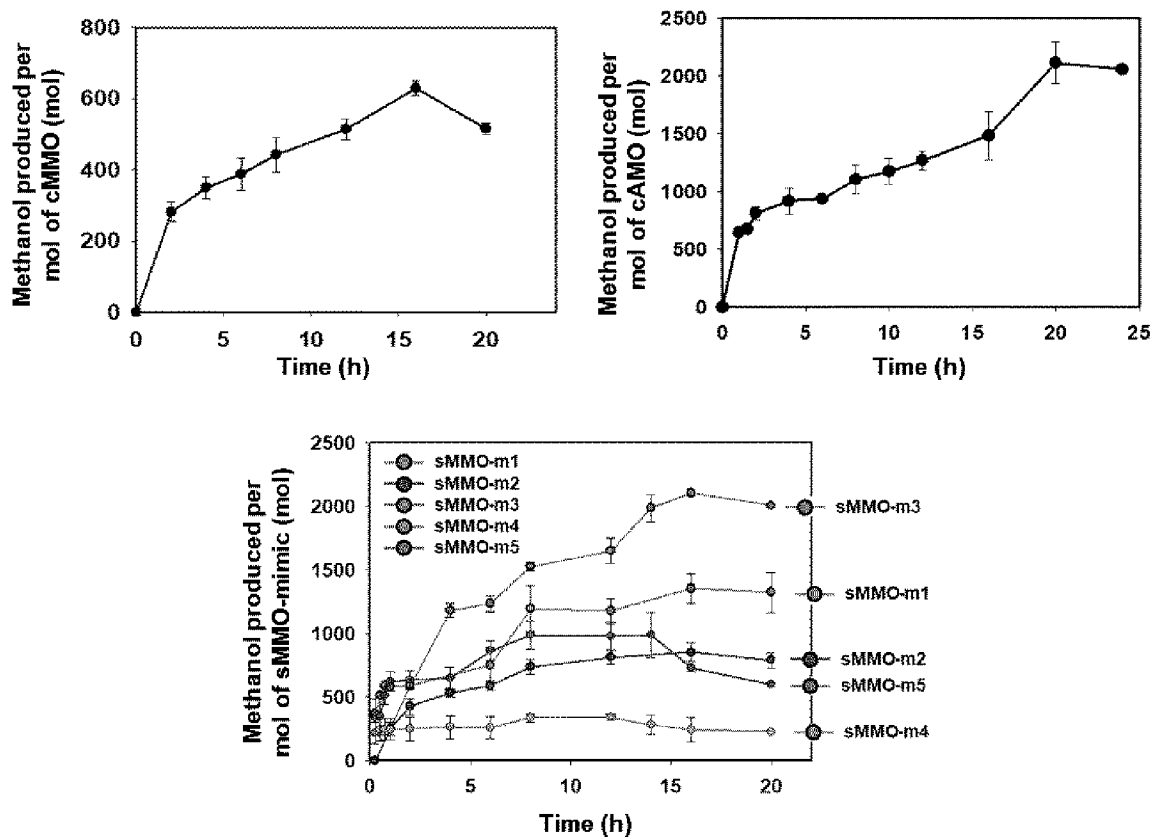
[도6c]



[도6d]

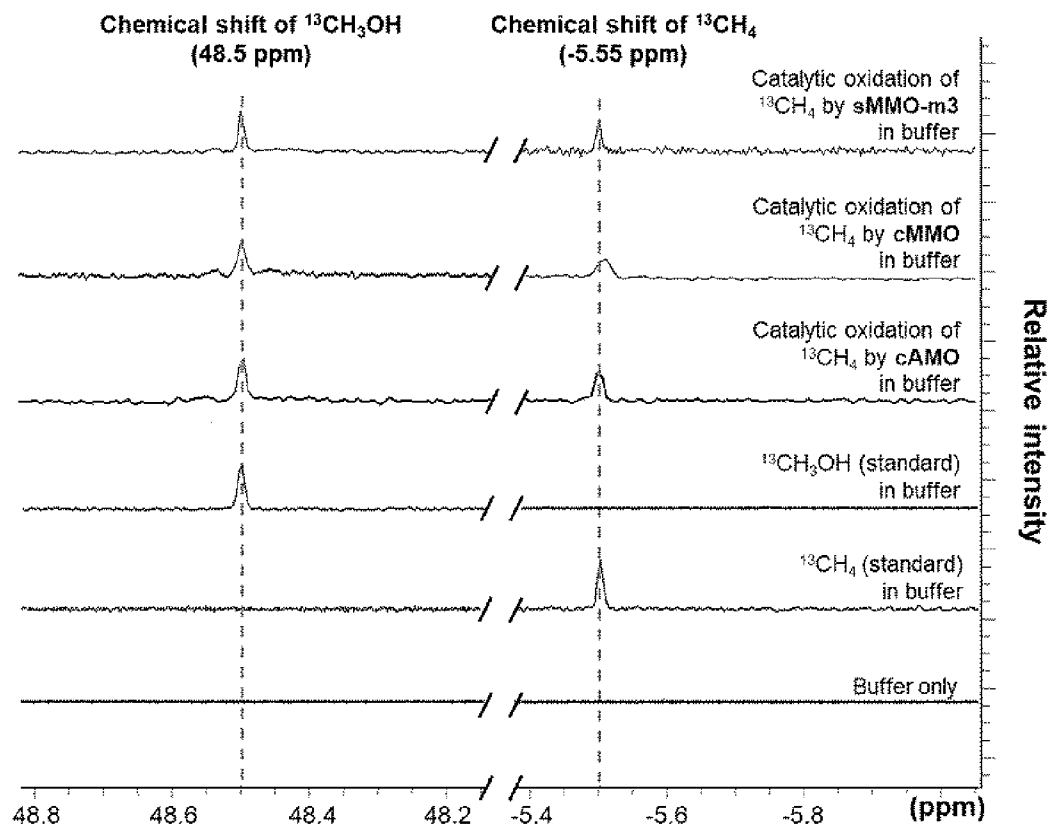


[도7]

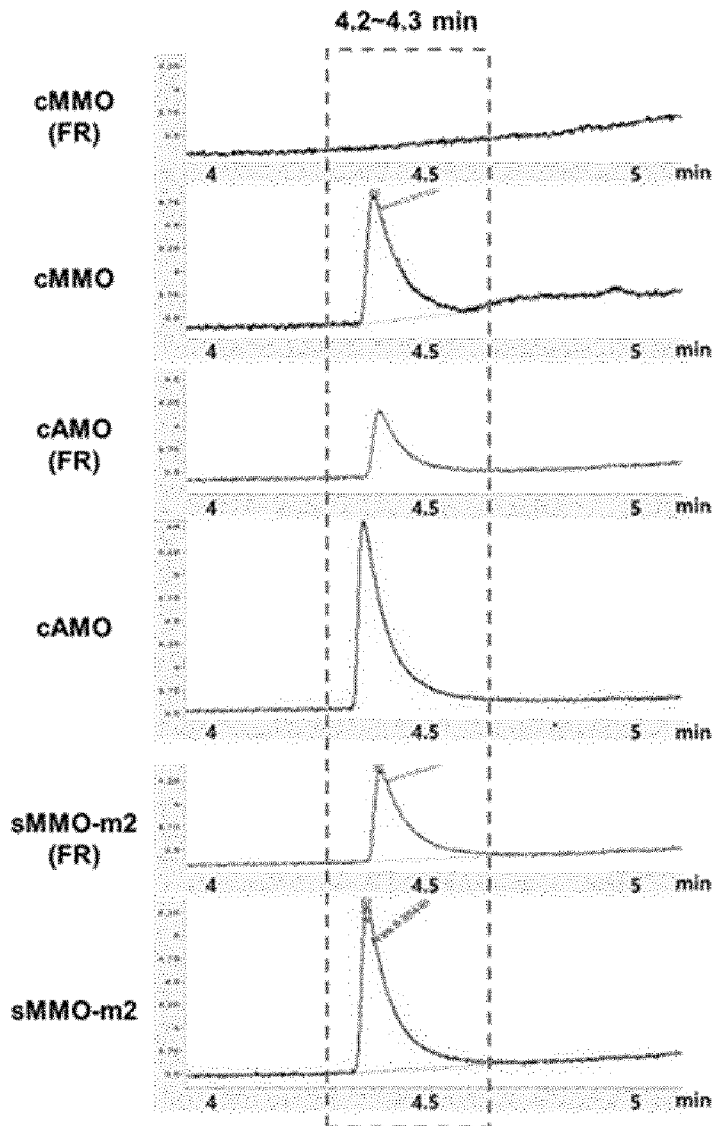


[도8]

In vitro catalytic oxidation ^{13}C -NMR



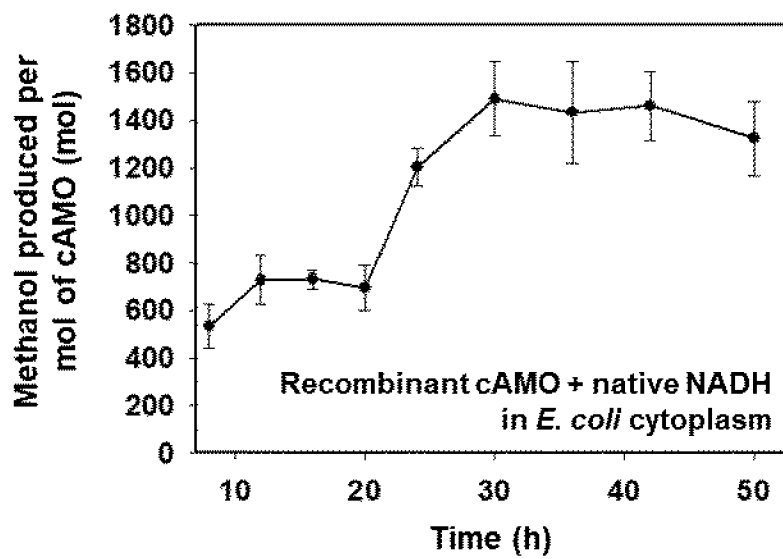
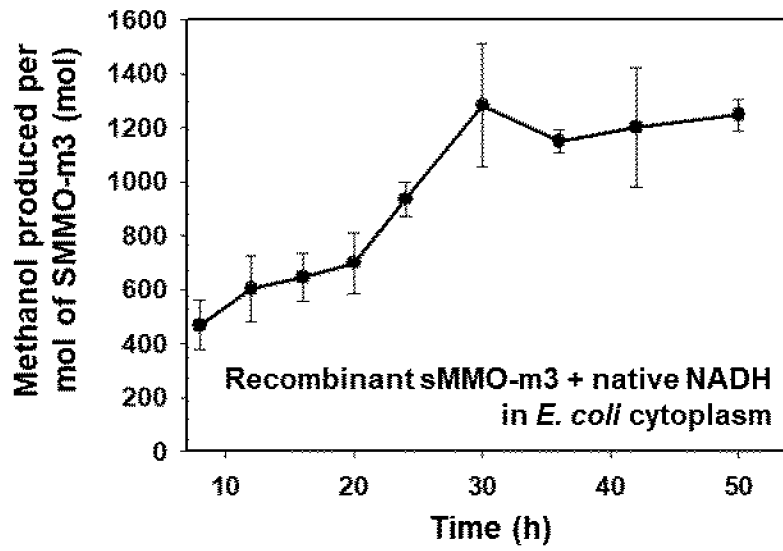
[도9]



mol Methanol produced per mol enzyme
(mol methanol/mol enzyme)

Enzyme \ Reductase	Full reductase (FR)	FAD-binding domain only (R _F)
cMMO	N.D.	629.28 ± 21.23
cAMO	427.03 ± 50.2	1355.16 ± 213.06
sMMO-m2	570.60 ± 50.96	886.62 ± 46.86

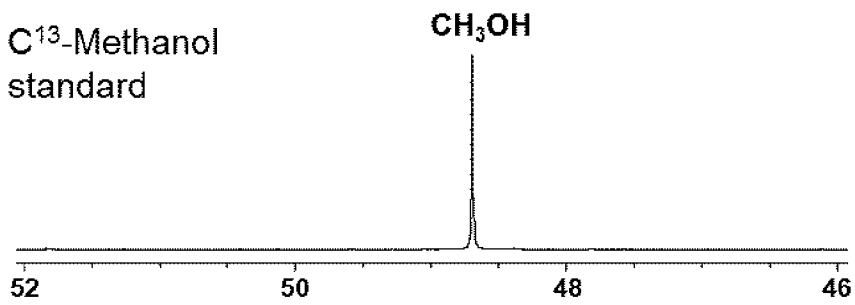
[도10]



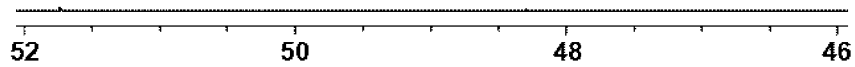
[도11]

Cell lysate catalytic oxidation ^{13}C -NMR

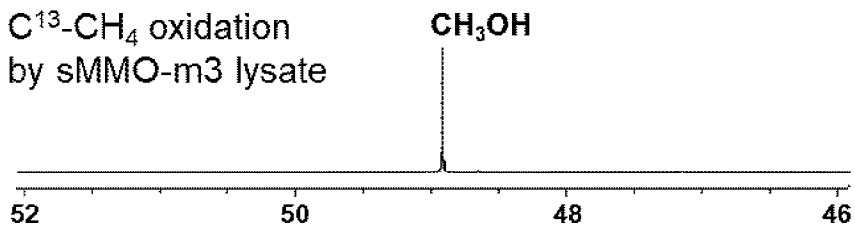
C^{13} -Methanol
standard



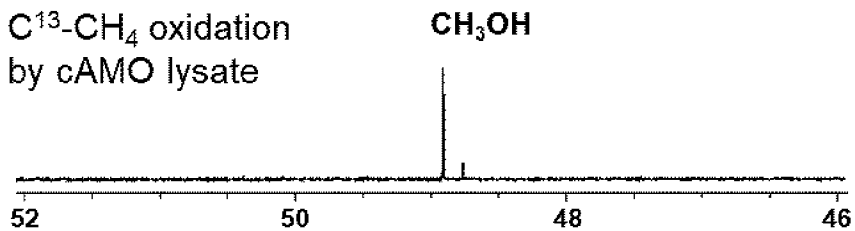
C^{13} - CH_4 oxidation
by *P.FDH* lysate



C^{13} - CH_4 oxidation
by sMMO-m3 lysate



C^{13} - CH_4 oxidation
by cAMO lysate



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/02(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 7/04(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 9/02(2006.01); C12N 11/02(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 메탄산화효소(methane monooxygenase), MMOH, 전자 전달 도메인(electron transfer domain), 페리틴(ferritin), 자가 조립(self assembly), 메탄(methane), 메탄올(methanol)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2020-0114723 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 07 October 2020 (2020-10-07) See abstract; and claims 1 and 3-4.	1-19
A	ROSS, Matthew O. et al. A tale of two methane monooxygenases. Journal of Biological Inorganic Chemistry. 2017, vol. 22, pp. 307-319. See page 309; and figure 3.	1-19
A	KIM, Hyun Jin et al. Biological conversion of methane to methanol through genetic reassembly of native catalytic domains. Nature Catalysis. 2019, vol. 2, pp. 342-353. See entire document.	1-19
A	PARK, Yeo Reum et al. Biocatalytic oxidations of substrates through soluble methane monooxygenase from Methylosinus sporium 5. Catalysts. 2018, vol. 8, article no. 582, pp. 1-16. See entire document.	1-19
A	ZHANG, Yu et al. Self-assembly in the ferritin nano-cage protein superfamily. International Journal of Molecular Sciences. 2011, vol. 12, pp. 5406-5421. See entire document.	1-19
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 July 2022		Date of mailing of the international search report 22 July 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005480

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005480

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **21**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 21 refers to a claim violating the manner of referring to a dependent claim (PCT Rule 6.4(a)), and thus is unclear.
3. ☒ Claims Nos.: **20**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/005480

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0114723 A	07 October 2020	EP 3957730 A1	23 February 2022
		US 2022-0170051 A1	02 June 2022
		WO 2020-204425 A1	08 October 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/02(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 7/04(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/02(2006.01); C12N 11/02(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 메탄산화효소(methane monooxygenase), MMOH, 전자 전달 도메인(electron transfer domain), 페리틴(ferritin), 자가 조립(self assembly), 메탄(methane), 메탄올(methanol)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2020-0114723 A (고려대학교 산학협력단) 2020.10.07 요약; 청구항 1, 3-4 참조.	1-19
A	ROSS, MATTHEW O. 등, 'A tale of two methane monooxygenases', Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2017, 22권, 페이지 307-319 페이지 309; 도면 3 참조.	1-19
A	KIM, HYUN JIN 등, 'Biological conversion of methane to methanol through genetic reassembly of native catalytic domains', Nature Catalysis, 2019, 2권, 페이지 342-353 전체 문헌 참조.	1-19
A	PARK, YEO REUM 등, 'Biocatalytic oxidations of substrates through soluble methane monooxygenase from Methylosinus sporium 5', Catalysts, 2018, 8권, article no. 582, 페이지 1-16 전체 문헌 참조.	1-19
A	ZHANG, YU 등, 'Self-assembly in the ferritin nano-cage protein superfamily', International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12권, 페이지 5406-5421 전체 문헌 참조.	1-19
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년07월22일(22.07.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년07월22일(22.07.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: **21**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 21은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a)를 위반한 청구항을 인용하고 있어 불명료합니다.

3. ☒ 청구항: **20**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

