

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-515819
(P2024-515819A)

(43)公表日 令和6年4月10日(2024.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/04 (2006.01)	C 1 2 N	9/04	Z Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 B 0 6 5
C 1 2 P	1/04 (2006.01)	C 1 2 P	1/04	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 P	7/04 (2006.01)	C 1 2 P	7/04		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
		審査請求	有	予備審査請求	未請求 (全30頁) 最終頁に続く

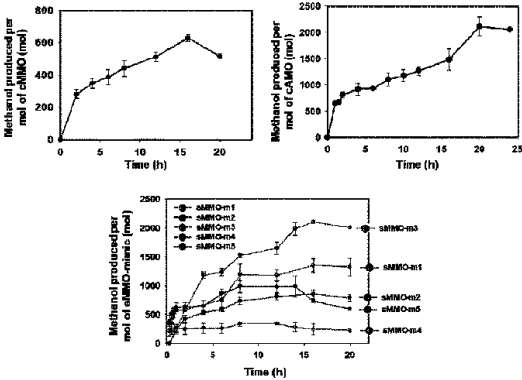
(21)出願番号	特願2023-566433(P2023-566433)	(71)出願人	518107501
(86)(22)出願日	令和4年4月15日(2022.4.15)		コリア ユニバーシティ リサーチ アンド
(85)翻訳文提出日	令和5年10月27日(2023.10.27)		ビジネス ファウンデーション
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/005480		KOREA UNIVERSITY RE
(87)国際公開番号	WO2022/231183		SEARCH AND BUSINESS
(87)国際公開日	令和4年11月3日(2022.11.3)		FOUNDATION
(31)優先権主張番号	10-2021-0056793		大韓民国ソウル城北区安岩路145
(32)優先日	令和3年4月30日(2021.4.30)		145, Anam-ro, Seongb
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		uk-gu, Seoul, Korea
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100167689 弁理士 松本 征二
		(72)発明者	リー, ジー ワン 大韓民国 06707 ソウル, ソチョ グ, ナンプスンファロ 309ギル, 38, (ソチョ ジュンギャング ヘイツ 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 メタン酸化活性を有する新規タンパク質

(57)【要約】

本発明は、メタン酸化活性ドメインと、FAD (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメインを含む電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合しているタンパク質に関し、生体内のNADHを還元剤として用いてメタンを酸化できるので、別の還元剤の使用なしにメタンをメタノールに酸化できるタンパク質、それを発現する微生物、それを活用したメタノール製造用組成物、メタノールの製造方法に関する。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

メタン酸化活性ドメインと電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合している、タンパク質。

【請求項 2】

前記メタン酸化活性ドメインは、p m o B 1 (Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1)、MMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase) または a m o B 1 (Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

前記 p m o B 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列からなり、MMOH は配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列からなる、請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記 a m o B 1 は、配列番号 4 のアミノ酸配列からなる、請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

前記電子伝達ドメインは、FAD (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメインを含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記電子伝達ドメインは、配列番号 5 または 6 のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

メタン酸化活性ドメインが融合したフェリチン単量体および FAD 結合ドメインを含む電子伝達ドメインが融合したフェリチン単量体が自己集合している、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記フェリチン単量体は、MMOB (Methane monooxygenase regulatory protein B) がさらに融合したものである、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記 MMOB は、配列番号 7 または 8 のアミノ酸配列からなる、請求項 8 に記載のタンパク質。

【請求項 10】

前記メタン酸化活性ドメインは、MMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase) であり、前記 MMOB は、MMOH が融合したフェリチン単量体に融合したものである、請求項 8 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記メタン酸化活性ドメインは、MMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase) であり、前記 MMOH および前記電子伝達ドメインが融合したフェリチン単量体と、MMOB が融合したフェリチン単量体とが自己集合している、請求項 8 に記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記 MMOB は、配列番号 7 または 8 のアミノ酸配列からなる、請求項 11 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記フェリチン単量体は、ヒトフェリチン重鎖単量体である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 14】

前記各ドメインは、フェリチン単量体の α -ヘリックスの内部、隣接する α -ヘリックスの間、N 末端、C 末端、AB ループ、BC ループ、CD ループ、DE ループ、N 末端と A ヘリックスの間、および E ヘリックスと C 末端の間からなる群より選択されるいずれか

10

20

30

40

50

1 つに融合したものである、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載のタンパク質を発現する微生物。

【請求項 16】

前記微生物は、フェリチン単量体をコードする遺伝子、メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子、および FAD (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメインを含む電子伝達ドメインをコードする遺伝子を含むベクターが導入されたものである、請求項 15 に記載の微生物。

【請求項 17】

前記メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子および FAD 結合ドメインを含む電子伝達ドメインをコードする遺伝子は、1 つのベクターに含まれるか、または 2 つのベクターにそれぞれ含まれる、請求項 16 に記載の微生物。

【請求項 18】

前記微生物は大腸菌である、請求項 15 に記載の微生物。

【請求項 19】

前記微生物は、FDH (formate dehydrogenase) をさらに発現する、請求項 15 に記載の微生物。

【請求項 20】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載のタンパク質または請求項 15 ～ 19 のいずれか一項に記載の微生物を含む、メタノール製造用組成物。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の組成物をメタンガスと反応させるステップを含む、メタノールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メタン酸化活性を有する新規タンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

メタン酸化細菌 (methanotrophs) 由来のメタン酸化酵素 (Methane monooxygenase, MMO) は、常温常圧の穏やかな条件下でメタンガスを含む様々な炭化水素 (C1 - C8) の酸化反応を触媒して高付加価値の産物を生産できる非常に有用なバイオ触媒であり、これを活用するバイオプロセスの開発に世界的な関心が集中されている。

【0003】

また、類似系列の酵素として、ニトロソモナス・ユーロピア (Nitrosomonas europaea) 由来のアモンニア酸化酵素 (Ammonia monooxygenase, AMO) などが、メタン酸化酵素と類似した機序で広い範囲の炭化水素 (C1 - C10 鎖状／ハロゲン化炭化水素、単／多環状芳香族炭化水素) に対して酸化反応を触媒できる有用なバイオ触媒であるが、現在までに 3D 構造、活性ドメインの究明、反応メカニズム、基質特異性などの基礎研究が非常に不十分である。

【0004】

現在、メタンガスの化学プロセスによるメタノールの生産は工程が複雑で副産物 (二酸化炭素、シンガス (syngas) など) による環境汚染の誘発、低反応転化率、高温、高圧の反応条件に起因する高エネルギー消費など、技術面、環境面、経済面で多くの問題を抱えている。また、メタンガスは、高価な輸送、貯蔵コストに起因する経済性の低下、および流出時の深刻な温室効果の誘発などの問題により、地元のガス田に容易に連携できる小規模バイオプラントを用いたメタノールの生産が技術面、経済面で非常に有利である。

【0005】

バイオプロセスの開発努力により、メタノール以外の他の高付加産物を生産するためのメタン酸化細菌の代謝工学的な菌株の改良が試みられているが、遺伝工学的ツールの活用

10

20

30

40

50

の限界、菌株の難培養性による問題などがあり、メタン酸化酵素を大量生産するために産業用菌株を用いて異種発現することは、水溶性タンパク質の発現が難しく、酵素複合体の精密な相互作用が求められるなどの高い技術的難易度のため産業的活用の成功事例がない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、優れたメタン酸化能を有するタンパク質を提供することを目的とする。

【0007】

本発明は、前記タンパク質を発現する微生物を提供することを目的とする。

10

【0008】

本発明は、前記タンパク質または微生物を含むメタノール製造用組成物を提供することを目的とする。

【0009】

本発明は、前記タンパク質または微生物を用いたメタノールの製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

1. メタン酸化活性ドメインと電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合している、タンパク質。

20

【0011】

2. 前記項目1において、前記メタン酸化活性ドメインは、pmoB1 (Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1)、MMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase)、またはamoB1 (Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1)である、タンパク質。

【0012】

3. 前記項目2において、前記pmoB1は、配列番号1のアミノ酸配列からなり、MMOHは、配列番号2または3のアミノ酸配列からなる、タンパク質。

【0013】

4. 前記項目2において、前記amoB1は、配列番号4のアミノ酸配列からなる、タンパク質。

30

【0014】

5. 前記項目1において、前記電子伝達ドメインは、FAD (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメインを含む、タンパク質。

【0015】

6. 前記項目1において、前記電子伝達ドメインは、配列番号5または6のアミノ酸配列からなる、タンパク質。

【0016】

7. 前記項目1において、メタン酸化活性ドメインが融合したフェリチン単量体およびFAD結合ドメインを含む電子伝達ドメインが融合したフェリチン単量体が自己集合している、タンパク質。

40

【0017】

8. 前記項目1において、前記フェリチン単量体は、MMOB (Methane monooxygenase regulatory protein B) がさらに融合したものである、タンパク質。

【0018】

9. 前記項目8において、前記MMOBは、配列番号7または8のアミノ酸配列からなる、タンパク質。

【0019】

10. 前記項目8において、前記メタン酸化活性ドメインは、MMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase) であり、前記MMOBは、MMOHが融合し

50

たフェリチン単量体に融合したものである、タンパク質。

【0020】

11. 前記項目8において、前記メタン酸化活性ドメインは、MMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase) であり、前記MMOHおよび前記電子伝達ドメインが融合したフェリチン単量体と、MMOBが融合したフェリチン単量体とが自己集合している、タンパク質。

【0021】

12. 前記項目11において、前記MMOBは、配列番号7または8のアミノ酸配列からなる、タンパク質。

【0022】

13. 前記項目1において、前記フェリチン単量体は、ヒトフェリチン重鎖単量体である、タンパク質。

【0023】

14. 前記項目1において、前記各ドメインは、フェリチン単量体の α -ヘリックスの内部、隣接する α -ヘリックスの間、N末端、C末端、ABループ、BCループ、CDループ、DEループ、N末端とAヘリックスの間、およびEヘリックスとC末端の間からなる群より選択されるいずれか1つに融合したものである、タンパク質。

【0024】

15. 前記項目1～14のいずれかに記載のタンパク質を発現する微生物。

【0025】

16. 前記項目15において、前記微生物は、フェリチン単量体をコードする遺伝子、メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子、およびFAD (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメインを含む電子伝達ドメインをコードする遺伝子を含むベクターが導入されたものである、微生物。

【0026】

17. 前記項目16において、前記メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子およびFAD結合ドメインを含む電子伝達ドメインをコードする遺伝子は、1つのベクターに含まれるか、または2つのベクターにそれぞれ含まれる、微生物。

【0027】

18. 前記項目15において、前記微生物は大腸菌である、微生物。

【0028】

19. 前記項目15において、前記微生物は、FDH (formate dehydrogenase) をさらに発現する、微生物。

【0029】

20. 前記項目1～14のいずれかに記載のタンパク質、または請求項15～19のいずれかに記載の微生物を含む、メタノール製造用組成物。

【0030】

21. 前記項目20に記載の組成物をメタンガスと反応させるステップを含む、メタノールの製造方法。

【発明の効果】

【0031】

本発明のタンパク質はメタン酸化活性を有し、生体内のNADHをメタン酸化に必要な還元剤として用いることができる。

【0032】

本発明のタンパク質を用いたインビボ (in vivo) のメタノールの製造には、別の還元剤の導入が不要である。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1a～cは、各実施例で使用するベクターの概略図である。

【図2】図2は、各実施例で製造された組換えタンパク質の発現率および細胞質溶解度を

10

20

30

40

50

示すものである。

【図 3】図 3 a、b は、実施例で製造された c M M O、c A M O、s M M O - m i m i c s を含む組換えタンパク質が自己集合体を形成することを確認したものである。

【図 4 - 6】図 4 a ~ 6 d は、実施例で製造された c M M O、c A M O、s M M O - m 3 を含む組換えタンパク質の E X A F S (Extended X-ray absorption fine structure)、E P R および X A N E S の分析結果である。

【図 7】図 7 は、実施例で製造された c M M O、c A M O、s M M O - m i m i c s を含む組換えタンパク質のメタンガス酸化活性を確認したものである。

【図 8】図 8 は、実施例で製造された c M M O、c A M O、s M M O - m 3 の ^{13}C -メタンガス酸化活性を確認したものである。

【図 9】図 9 は、メタン酸化活性ドメインと、[2 F e - 2 S] および F A D 結合ドメインを含む電子伝達ドメインとが融合した組換えタンパク質のメタンガス酸化活性を確認したものである。

【図 10】図 10 は、c A M O、s M M O - m 3 タンパク質を発現する大腸菌ライセート (lysate) のメタンガス酸化活性を確認したものである。

【図 11】図 11 は、c A M O、s M M O - m 3 タンパク質を発現する大腸菌ライセート (lysate) の ^{13}C -メタンガス酸化活性を確認したものである。

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0035】

本発明は、メタン酸化活性ドメインと電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合しているタンパク質に関するものである。

【0036】

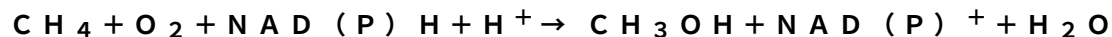
本発明のタンパク質は、メタン酸化活性および電子伝達活性を示すことができる。

【0037】

メタンは、下記数学式 1 の反応によって酸化してメタノールを形成できるが、本発明のタンパク質は、メタン酸化活性ドメインと電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合したものであり、還元剤である N A D H を用いてメタン酸化反応を行うことができ、特に、インビボ (in vivo) で反応時に体内の N A D H を活用することができる。このため、別の還元剤の使用が不要である。

【0038】

[数学式 1]



【0039】

メタン酸化活性ドメインは、メタンを酸化する活性を有するドメインであり、メタン酸化酵素における活性部位を含むドメインであるか、またはメタン酸化酵素に由来するものでなくとも、配列または構造的類似性などによりメタン酸化能を有する酵素の活性部位を含むドメインであれば、いずれも使用可能である。

【0040】

本発明でメタン酸化活性ドメインとしては、例えば、p m o B 1 (Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1)、M M O H (Soluble methane monooxygenase hydroxylase)、a m o B 1 (Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) などを用いることができるが、これらに限定されるものではない。M M O H は M M O H α であってもよい。より具体的には、例えば、p m o B 1 は配列番号 1 のアミノ酸配列を含むものを用いることができる。M M O H は、配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列を含むものを用いることができる。a m o B 1 は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むものを用いることができる。

【0041】

電子伝達ドメインは、例えば、F A D (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメ

10

20

30

40

50

インを含むことができる。

【0042】

FAD結合ドメインは、sMMO (soluble MMO (Methane monooxygenase)) 由来のものであってもよく、具体的には、その構成要素の1つであるMMORのFAD結合ドメイン (MMOR_F) であってもよい。

【0043】

電子伝達ドメインは、FAD結合ドメインを含むものであり、これはFAD結合ドメインのみからなっているとしてもよく、MMORにおいてFAD結合ドメイン以外に追加の部分をさらに含んでもよく、FAD結合ドメイン以外に2Fe-2Sドメインの少なくとも一部をさらに含んでもよく、FAD結合ドメインおよび2Fe-2Sドメインを含んでもよい。例えば、電子伝達ドメインとしては、配列番号5または6のアミノ酸配列を含むものを用いることができる。

【0044】

本発明のタンパク質は、メタン酸化活性ドメインと電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合したタンパク質であり、前記各ドメインは、1つのフェリチン単量体内に全て融合したものであっても、各フェリチン単量体にそれぞれ融合したものであっても、これらが混合されたものであってもよい。

【0045】

つまり、本発明のタンパク質は、メタン酸化活性ドメインが融合したフェリチン単量体と電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合したものであってもよく、これらのドメインのすべてが融合したフェリチン単量体が自己集合したものであってもよく、これらのドメインのすべてが融合したフェリチン単量体および各ドメインの1つが融合したフェリチン単量体が自己集合したものであってもよい。

【0046】

本発明によるフェリチン単量体は、MMOB (Methane monooxygenase regulatory protein B) がさらに融合したものであってもよい。

【0047】

MMOBは、sMMOの構成成分であるMMOBであってもよく、例えば、MMOBは配列番号7のアミノ酸配列または配列番号8のアミノ酸配列を含むものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0048】

例えば、MMOBは、メタン酸化活性ドメインであるMMOH (Soluble methane monooxygenase hydroxylase) と共に使用することができる。この場合の具体例として、MMOH、MMOB、電子伝達ドメインが1つのフェリチン単量体に融合してもよく、2つのフェリチン単量体に分けて融合してもよい。2つのフェリチン単量体に分けられる場合は、MMOHとMMOBが1つのフェリチン単量体に融合し、電子伝達ドメインが残りのフェリチン単量体に融合してもよく、MMOHと電子伝達ドメインが1つのフェリチン単量体に融合し、MMOBが残りのフェリチン単量体に融合してもよい。

【0049】

本発明のタンパク質は、メタン酸化活性ドメインと電子伝達ドメインとが融合したフェリチン単量体が自己集合したタンパク質であり、フェリチン単量体としては様々な生物に由来するフェリチンを用いることができ、脊椎動物の場合は重鎖または軽鎖単量体を用いることができる。例えば、ヒトフェリチン重鎖を用いることができる。

【0050】

フェリチン単量体において、自己集合したタンパク質でその機能を果たすことができれば、各ドメインの結合位置は限定されず、例えば、 α -ヘリックスの内部、隣接する α -ヘリックスの間、N末端、C末端、ABループ、BCループ、CDループ、DEループ、N末端とAヘリックスの間、およびEヘリックスとC末端の間からなる群より選択されるいずれか1つに融合されてもよく、タンパク質から外部に表出されてその機能を容易に発揮するという点から、好ましくはC末端に融合されてもよい。

10

20

30

40

50

【0051】

本発明のタンパク質において、フェリチン単量体と各ドメインとの間には、リンカーをさらに含むことができる。

【0052】

リンカーとしては、当分野で公知のものを制限なく用いることができ、例えば、S1 (G3SG3TG3SG3)、S2 (GKLGGG) などを用いることができる。

【0053】

本発明のタンパク質は、例えば、フェリチン単量体をコードする遺伝子、メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子、およびFAD (flavin adenine dinucleotide) 結合ドメインを含む電子伝達ドメインをコードする遺伝子を含むベクターを生物体に形質転換させ、その生物体から得られるものであるが、これに限定されるものではない。

10

【0054】

本発明のタンパク質は、微生物内でのsoluble formへの発現率が高く、生合成時の製造収率が高い。

【0055】

また、本発明は、前記タンパク質を発現する微生物に関するものである。

【0056】

本発明の微生物は、フェリチン単量体をコードする遺伝子、メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子、および電子伝達ドメインをコードする遺伝子を含むベクターが導入され、前記タンパク質を発現するものであってもよい。

20

【0057】

本発明のタンパク質において、各ドメインは、1つのフェリチン単量体内に全て融合されたものであっても、各フェリチン単量体にそれぞれ融合されたものであっても、これらが混合されたものであってもよい。そのため、前記メタン酸化活性ドメインをコードする遺伝子およびFAD結合ドメインを含む電子伝達ドメインをコードする遺伝子は、1つのベクターに含まれてもよく、2つのベクターにそれぞれ含まれてもよい。

【0058】

ベクターとしては、当分野で公知の発現ベクターを用いることができ、例えば、BLUESCRIPTベクター (Stratagene)、T7発現ベクター (Invitrogen)、pETベクター (Novagen) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0059】

ベクターは、タンパク質の発現のためのプロモーター、分離／精製のためのタグ、形質転換マーカーなど、当分野で公知の追加の構成要素をさらに含むことができる。

【0060】

微生物としては、前記ベクターを導入して前記タンパク質を発現できるものであれば、その種類を限定せず、例えば大腸菌を用いることができる。

【0061】

本発明の微生物は前記タンパク質を発現するので、メタンの酸化によるメタノールの製造に用いることができる。本発明の微生物を用いる場合には、メタノールを生成するための別の還元剤の添加が不要である。

40

【0062】

本発明の微生物は、FDH (formate dehydrogenase) をさらに発現するものであってもよい。前記FDHは、細胞内NAD⁺をNADHに還元し、NADHの再利用による還元力を高めることができる。

【0063】

本発明の微生物は、FDHをコードする遺伝子を含むベクターが導入され、FDHを発現するものであってもよい。FDHをコードする遺伝子は、前記フェリチン単量体をコードする遺伝子を含むベクターに共に含まれてもよく、別個のベクターに含まれてもよい。

【0064】

また、本発明は、前述のタンパク質または前述の微生物を含むメタノール製造用組成物

50

に関するものである。

【0065】

前述のタンパク質はメタン酸化および電子伝達活性を有し、前述の微生物は前記タンパク質を発現する。このため、本発明の組成物はそれを含むことでメタンを酸化して、メタノールを製造することができる。

【0066】

メタンの製造は、前記組成物にメタンガスを処理することによって行うことができ、前記タンパク質を使用する場合には追加の還元剤を処理しなければならず、前記微生物を使用する場合には還元剤の使用が不要である。追加の還元剤としては、NADHをさらに含むことができる。

【0067】

また、本発明は、前述の組成物をメタンガスと反応させるステップを含むメタノールの製造方法に関するものである。

【0068】

本発明による組成物をメタンガスと反応させてメタンを酸化することによってメタノールを製造することができ、これは前述の組成物にメタンガスを注入して酵素反応を進めることによって行うことができる。

【0069】

メタノールの製造条件は特に限定されず、例えば、前述のタンパク質または微生物が適正活性を示す温度、pHなどで行うことができる。

【0070】

実施例

1. タンパク質生合成のための発現ベクターの製造

下記表1に示すベクター模式図に従い、PCRによって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)を製造した。製造したすべてのプラスミド発現ベクターは、アガロースゲルで精製した後、完全なDNAシーケンシングによって配列を確認した。

【0071】

このようにして製造されたPCR産物を順次にpT7-7、pET28a発現用ベクターに挿入し、それぞれのタンパク質を発現できる発現ベクターを構成した。

【0072】

各タンパク質の発現用ベクターは、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) -B2で行った (図1a-c)。

【0073】

10

20

30

40

50

【表 1】

組換え タンパク質	発現ベクター
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-COOH2. 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-COOH2. 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-COOH2. 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-COOH2. 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-COOH2. 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

【0074】

使用する各タンパク質のアミノ酸配列は、下記表2に示す通りである。

【0075】

10

20

30

40

50

【表 2】

ドメイン	配列	配 列 番 号
pmoB1 (33-172)	HGEKSQA AFMRMRTIHWYDLSWSKEKV KINETVEIKGKFH VFEGWPETVDEPDVAFLNVGMGPV FIRKESYIGGQLVPRS VRLEIGKTYDFRVVLKARRPGDWHVHTMMNVQGGGPIIGP GKWITVEGSMSEFRNPVTT	1
MMOH _α (64- 321)	AKEYARMEAVKDERQFGSLQDALTRLNAGVRVHPKWNET MKVVS NFLEVGEYNAIAATGMLWDSAQA AEQKNGYLAQV LDEIRHTHQCA YVNYYFAKNGQDPAGHNDARRTRTIGPLW KGMKRVFSDGFISGDAVECSLNLQLVGEACFTNPLIVAVTE WAAANGDEITPTVFLSIETDEL RHMANGYQTVVSIANDPAS AKYLNTDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLFEYGSKFKEPWW KTWDRWVYEDWGGIWIGRL	2
MMOH _α (93- 295)	VRVHPKWNETMKVVS NFLEVGEYNAIAATGMLWDSAQA AEQKNGYLAQVLDEIRHTHQCA YVNYYFAKNGQDPAGHND ARRTRTIGPLWKGMKRVFSDGFISGDAVECSLNLQLVGEAC FTNPLIVAVTEWAAANGDEITPTVFLSIETDEL RHMANGYQ TVVSIANDPASAKYLNTDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLFEY GSK	3
amoB1 (38-177)	HGERSQEPFLRMRTVQWYDIKWGP EVTKVNENAKITGKFH LAEDWPRAAAQPDFSFFNVGSPSPVFVRLSTKINGHPWFISG PLQIGRDYEFVNLRARIPGRHMHAMLN VKDAGPIAGPGA WMNITGSWDDFTNPLKL	4
MMOR _F (99-348)	CRISFGEVGSFEAEVVGLNWVSSNTVQFLQKRPDECGNRG VKFEPLGQFMDLTIPGTDVSR SYSPANLPNPEGRLEFLIRVLPE GRFSDYLRNDARVGQVLSVKGPLGVFGLKERGMAPRYFVA GGTGLAPVVS MVRQMGEWTAPNETRIYFGVNTEPELFYIDE LKSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEGEQGSPIDALREDLES SDANPDIYLCGPPGMIDAACELVRSRGIPGEQVFEKFLPSG AA	5
MMOR(FR)	MQRVHTITAVTEDGESLRFECRSDEDVITAALRQNIFLMSSC REGGCATCKALCSEGDYDLKGCSVQALPPEEEEEGLVLLCR TYPKTDLEIELPYTHCRISFGEVGSFEAEVVGLNWVSSNTVQ	6

10

20

30

40

50

	FLLQKRPDECGNRGVKFEPGQFMDLTIPGTDVSRSPANLP NPEGRLEFLIRVLPEGRFSDYLRNDARVGVLSVKGPLGVF GLKERGMAPRYFVAGGTGLAPVVSMVRQMGEWTAPNETRI YFGVNTPELIFYIDELKSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEG EQGSPIDALREDLESSDANPDIYLCGPPGMIDAACELVRSRGI PGEQVFFFEKFLPSGAA	
MMOB	SVNSNAYDAGIMGLKGKDFADQFFADENQVVHESDTVVLV LKKSDEINTFIEILLTDYKKNVNPTVNVEDRAGYWWIKAN GKIEVDCDEISELLGRQFNVDYDFLVDVSSTIGRAYTLGNKFTI TSELMGLDRKLEDYHA	7
MMOB (retro)	AHYDELKRDLGMLESTITFKNGLTYARGITSSVDVLFDYVN FQRGLLESIEDCDVEIKGNAKIWWYGARDEVNVTNVNKK YDTLLIEEIFTNIEDSKKLVLVVTDEHVVQNEAFFQDAFD KGKLGMIADYANSNV	8

10

【0076】

2. 組換えタンパク質の生合成および精製

大腸菌株BL21 (DE3) [F⁻ompThsdS_B(rB⁻mB⁻)] を前記で製造された発現ベクターでそれぞれ形質転換した。cMMO、cAMO、sMMO-m1～m5、cMMO (FR)、cAMO (FR)、sMMO-m2 (FR) は、大腸菌株BL21に2つの発現ベクターを同時に形質転換し、アンピシリンとカナマイシンに抵抗性のある形質転換体を選択した。形質転換された大腸菌を50mLのLB (Luria-Bertani) 培地 (100mg L⁻¹アンピシリンと100mg L⁻¹カナマイシン、0.4mM CuSO₄またはFeSO₄を含有) を含有するフラスコ (250mL Erlenmeyer flasks、37℃、150rpm) で培養した。

20

【0077】

培地濁度 (O.D.₆₀₀) が約0.6に達したとき、IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1mM) を添加して遺伝子の発現を誘導した。20℃で14時間培養後、培養した大腸菌を5,000rpmで5分間遠心分離して菌体沈殿物を回収した後、5mLの破碎溶液 (50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、10mM イミダゾール、pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎機 (Branson Ultrasonics Corp.、Danbury、CT、USA) を用いて破碎した。破碎後、13,000rpmで10分間遠心分離し、上澄み液と不溶性凝集体を分離した。分離した上澄み液をまず組換えタンパク質に融合発現されたヒスチジンとニッケルとの結合を用いたNi²⁺-NTAアフィニティー (affinity) クロマトグラフィーを行った後、組換えタンパク質を濃縮し、バッファー交換を行うことにより、精製された組換えタンパク質を得た。各ステップの詳細は以下の通りである。

30

【0078】

1) Ni²⁺-NTAアフィニティー・クロマトグラフィー

組換えタンパク質を精製するために、前述の方法と同様にして培養した大腸菌を回収し、その細胞ペレットを5mLの破碎溶液 (50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、10mM イミダゾール、pH 8.0) に再浮遊し、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。破碎した細胞液を13,000rpmで10分間遠心分離してその上澄み液のみを分離した後、各組換えタンパク質をNi²⁺-NTAカラム (Qiagen、Hilden、Germany) を用いてそれぞれ分離した (洗浄バッファー: 50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、50mM イミダゾール、pH 8.0 / 溶出バッファー: 50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、250mM イミダゾール、pH 8.0)。

40

【0079】

50

2) 濃縮とバッファ交換

Ni²⁺-NTAアフィニティークロマトグラフィーを経て溶出した2 mLの組換えタンパク質を超遠心ろ過器 (ultracentrifugal filter、Amicon Ultra 100K、Millipore、Billerica、MA) に入れ、カラムの上に1 mLの溶液が残るまで5,000 rpmで遠心分離を行った。その後、Trisバッファ (20 mM Tris-HCl、250 mM NaCl、pH 8.0) でバッファ交換を行った。

【0080】

3. 製造されたcMMO、cAMO、sMMO-mimicsを含む組換えタンパク質の発現率および細胞質溶解度の分析

前記プロセスを経た後、精製された組換えタンパク質の発現率および細胞質溶解度をSDS-PAGEにより分析した。組換えタンパク質の破碎された細胞液を遠心分離して得られた上澄み液 (soluble fraction, sol) と不溶性凝集体 (insoluble fraction, insol)、精製された組換えタンパク質に対して、12% トリス・グリシン・プレキャストゲル (Tris-glycine precast gel、Invitrogen、California、U.S.A.) を用いてSDS-PAGEを行った。そして、ゲルをクマシーブルー染色溶液で染色し、染色されたタンパク質バンドに対して、デンスitomーター (densitometer、GS-800 Calibrated Densitometer、Bio-Rad、California、U.S.A.) により各組換えタンパク質の発現率および細胞質溶解度を分析した (図2)。

【0081】

4. 製造されたcMMO、cAMO、sMMO-mimicsを含む組換えタンパク質の構造の分析

前記プロセスを経た後、精製された組換えタンパク質の構造を分析するために透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて撮影を行った。タンパク質の染色画像を得るために、自然乾燥サンプルを含む電子顕微鏡グリッドを、2% (w/v) 水性ウラニルアセテート溶液と共に1時間室温でインキュベートした。タンパク質画像を200 kVで作動するTechnai 20 (FEI、Hillsboro、Oregon、U.S.A.) 電子顕微鏡を用いて観察したところ、球状の自己集合体が形成されていることを確認した。さらに、DLS (dynamic light scattering) 分析により、cMMOは 30.3 ± 1.9 nm、cAMOは 27.9 ± 4.7 nm、sMMO-m1は 23.7 ± 6.7 nm、sMMO-m2は 19.6 ± 5.5 nm、sMMO-m3は 20.5 ± 5.4 nm、sMMO-m4は 19.4 ± 7.1 nm、sMMO-m5は 17.8 ± 3.1 nmの大きさを有する自己集合体を形成することを確認した (図3 a-b)。

【0082】

製造されたcMMO、cAMO、sMMO-m3を含む組換えタンパク質の構造を分析するために、X線吸収分光法 (X-ray absorption spectroscopy、XAS) および電子常磁性共鳴 (Electron paramagnetic resonance、EPR) スペクトル分析を行った。タンパク質のX線吸収端近傍構造 (X-ray absorption near-edge structure、XANES)、広域X線吸収微細構造 (Extended X-ray absorption fine structure、EXAFS) およびEPR分析のために、トリス (Tris) バッファで溶媒交換されたサンプルを-80℃で3時間事前冷凍し、事前冷凍したサンプルは凍結乾燥機 (FDU-2100、DRC-1000、EYELA) を用いて-110℃で凍結乾燥した。XAS分析は、Aichi Synchrontron Radiation Center (Aichi) のXAFSビームライン (BL11S2) により測定し、EPRスペクトロメーター (JES-FA200) で測定した。cMMO EXAFSの分析結果、活性部位に存在する銅イオンと周辺リガンドの距離情報を確認し、XANESの分析結果、1、2価の銅イオン (Cu(I)、Cu(II)) が混在していることを確認した。さらに、EPR分析により、2価の銅イオンがvalence-scrambled stateで存在することを確認した (図4 a-c)。

【0083】

cAMO EXAFS分析により、活性部位に存在する銅イオンと周辺リガンドの距離

情報を確認した。メタン酸化反応が進行したサンプルの場合は、反応が進行していないサンプルと比較して、リガンドの距離が異なっており、一つのピーク ($\sim 2.2 \text{ \AA}$) が追加に観察されることを確認した。XANES分析により、1、2価の銅イオン (Cu(I) 、 Cu(II)) が混在していることを確認した。さらに、EPR分析により、2価の銅イオンが *valence-scrambled state* で存在することを確認した (図5a-c)。

【0084】

sMMO-m3 EXAFS分析により、活性部位に存在する鉄イオンと周辺リガンドの距離情報を確認した。また、XANES及びEPR分析により、2、3価の鉄イオン (Fe(II) 、 Fe(III)) が混在しており、メタン酸化反応が進行したサンプルの場合は、反応が進行していないサンプルと比較して、 $\text{Fe(III)} / \text{Fe(II)}$ の比率が増加したことを確認した。さらに、EPR分析により、3価の鉄イオンの存在を確認した (図6a-d)。

【0085】

5. 製造されたcMMO、cAMO、sMMO-mimicsを含む組換えタンパク質のメタンガス酸化活性の証明

精製された組換えタンパク質のメタンガス酸化活性を検証するために、20 mLの *sept-a-sealed vial* (catalogue no. 5182-0837、Agilent) に還元剤のNADH ($0.2 \sim 0.3 \text{ mM}$) を含む1 mLの組換えタンパク質溶液を注入した。組換えタンパク質によるメタン酸化反応のために、19 mLのヘッドスペース (headspace) の空気を注射器によって除去し、15 mLのメタンガスと4 mLの空気を注入した。その後、すぐにバイアルを30°Cのインキュベーターで最大24時間まで酵素反応を行った。そして、酵素反応により発生する酸化生成物であるメタノールの量をガスクロマトグラフィー (7890B GC、Agilent) により測定し、累積生産量を計算した (図7)。

【0086】

cMMO、cAMO、sMMO-m3の ^{13}C -メタンガス酸化活性を検証するために、前述のメタン酸化反応と同様の方法で酵素反応を行う一方、メタンガスを ^{13}C -メタンガスで置換して行った。核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance、NMR) 分析のために、反応が終わった5つのバイアルを80°Cで15分間加熱した後、ヘッドスペース (headspace) の気体19 mLを、十分に冷却したエタノール600 μL に注射器を用いて直接注入した。その後、60 μL のエタノール- d_6 を加えて、NMRチューブ (NORS55007、Sigma Aldrich) に移し、cMMO、cAMO、sMMO-m3酵素反応によって生成された (発生する酸化生成物である) ^{13}C -メタノールをNMR分析によって確認した (図8)。

【0087】

6. メタン酸化活性ドメインと、[2Fe-2S] およびFAD結合ドメインを含む電子伝達ドメインとが融合した組換えタンパク質のメタンガス酸化活性の証明

cMMO、cAMO、sMMO-m2に対して電子伝達ドメインが、[2Fe-2S] およびFAD結合ドメインを含む電子伝達ドメインで置換されたcMMO (FR)、cAMO (FR)、sMMO-m2 (FR) 組換えタンパク質を前述の方法で製造し、メタンガス酸化反応16時間後のメタノール生産量をガスクロマトグラフィーによって確認した。(cMMO (FR): N.D., cMMO: $629.28 (\pm 21.23) \text{ mol methanol/mol enzyme}$, cAMO (FR): $427.03 (\pm 50.2) \text{ mol methanol/mol enzyme}$, cAMO: $1355.16 (\pm 213.06) \text{ mol methanol/mol enzyme}$, sMMO-m2 (FR): $570.60 (\pm 50.96) \text{ mol methanol/mol enzyme}$, sMMO-m2: $886.62 (\pm 46.86) \text{ mol methanol/mol enzyme}$)。メタノール生産量の比較により、[2Fe-2S] およびFAD結合ドメインの両方を含む電子伝達ドメイン (MMOR (FR)) が融合した組換えタンパク質よりも、FAD結合ドメインのみを含む電子伝達ドメイン (MMORF) が融合した組換えタンパク

質の方が、より高いメタン酸化活性を有することを確認した（図9）。

【0088】

7. 組換えタンパク質を発現する大腸菌ライセート (lysate) のメタンガス酸化活性の証明

cMMO、cAMO、sMMO-m3タンパク質を発現する大腸菌を用いたメタンガス酸化活性を検証するために、大腸菌細胞内NAD(H)の前駆体を合成する酵素 (nicotinic acid phosphoribosyltransferase) が過剰発現されるように、当該酵素の遺伝情報を含んでいるpncB遺伝子が導入された菌株BL21(DE3) [$\Delta yrfE \Delta yjaD::pncB$] (Eng. Life Sci., 7, 343-353, 2007) を使用した。また、細胞内NAD⁺をNADHに還元させてNADHの再利用による還元力を高めるために、Pseudomonas sp. (strain 101) 由来のFDH (formate dehydrogenase) (1) Journal of solid-phase biochemistry, 5, 19-33, 1980, 2) Cell, 179 (6), 1255-1263, 2019) を、pETDuet-1ベクターを用いて、cMMO、cAMO、sMMO-m3タンパク質と同時に発現できる発現用ベクターを構築した（表3）。

【0089】

本菌株 (BL21 (DE3) [$\Delta yrfE \Delta yjaD::pncB$]) にcMMO、cAMO、sMMO-m3タンパク質の発現用ベクターでそれぞれ形質転換し、前述の培養方法によりタンパク質発現を行った。さらに、IPTG 1mMを添加する過程で、菌株内還元力を持続するためにギ酸ナトリウム (Sodium formate) 50mMを添加して20℃で14時間培養した。培養した大腸菌を4,500rpmで10分間遠心分離して菌体沈殿物を回収した後、メタンガスがパージされた破碎溶液に再浮遊し、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。破碎した細胞ライセートは、破碎前の大腸菌濁度 (O.D.₆₀₀) が30となるように懸濁し、3mLずつGCバイアルに分注した。組換えタンパク質が発現された大腸菌ライセートによるメタン酸化反応のために、19mLのバイアルヘッドスペースの空気を注射器によって除去し、10mLのメタンガスおよび9mLの空気を注入した。その後、すぐにバイアルを30℃のインキュベーターで最大52時間までライセート反応を行った。反応が終わったバイアルは、80℃で20分間加熱し、生成されたメタノールを気化させた。そして、ライセートにより発生する酸化生成物であるメタノールの量をガスクロマトグラフィーにより測定し、累積生産量を計算した (sMMO-m3発現ライセート最大メタノール生産量: 1280 MeOH (mol) / enzyme (mol)、cAMO発現ライセート最大メタノール生産量: 1460 MeOH (mol) / enzyme (mol)) (図10)。

【0090】

【表3】

組換え タンパク質	発現ベクター
cAMO (w/ P.FDH)	1-1.NH ₂ -NcoI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-amoB1(H38-L177)-HindIII-COOH 1-2. NH ₂ -NdeI-P.FDH-XhoI-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F -HindIII-COOH
sMMO-m3(w/ P.FDH)	1-1.NH ₂ NcoI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOR _F -BamHI-MMOH _α (A64-L321)-HindIII-COOH 1-2.NH ₂ -NdeI-P.FDH-XhoI-COOH 2. NH ₂ -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOB(retro)-HindIII-COOH

10

20

30

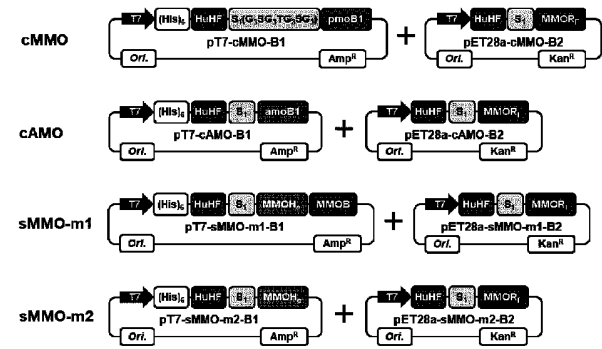
40

50

【図面】

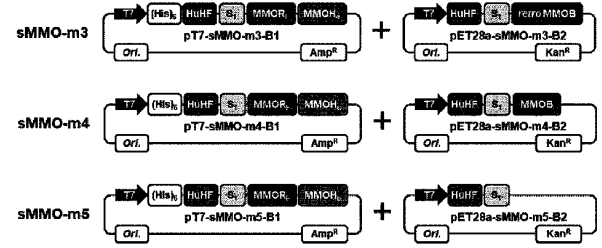
【図 1 a】

[図 1a]



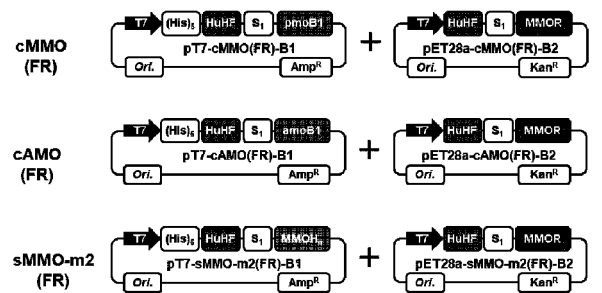
【図 1 b】

[図 1b]



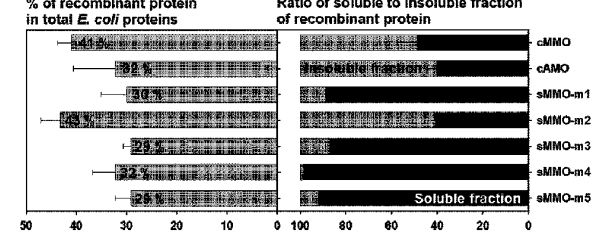
【図 1 c】

[図 1c]



【図 2】

[図 2]



10

20

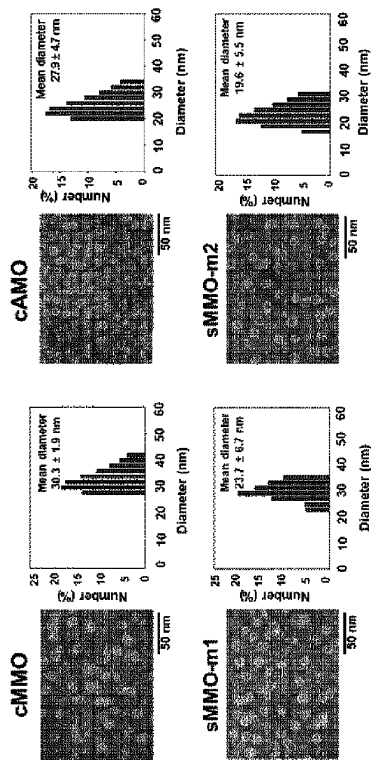
30

40

50

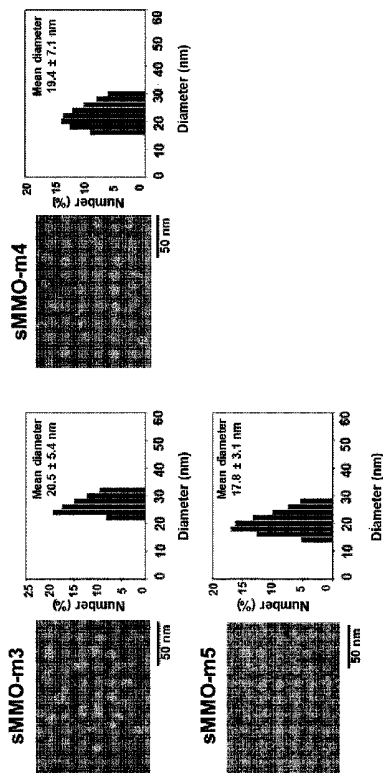
【図 3 a】

[図3a]



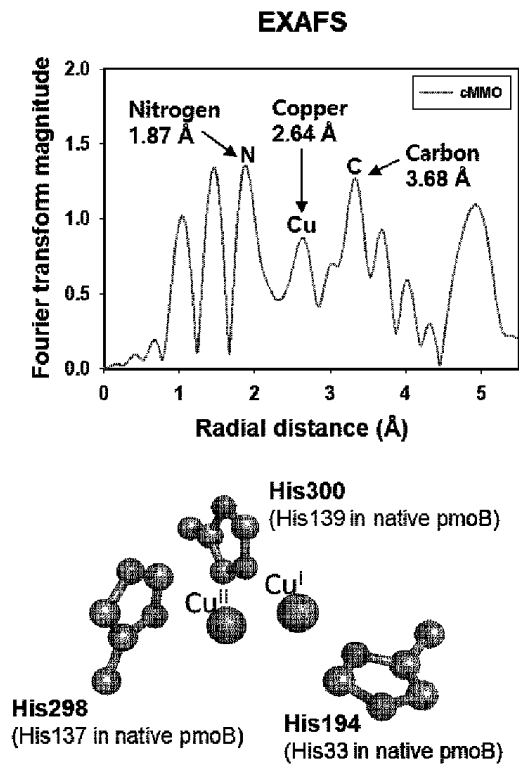
【図 3 b】

[図3b]



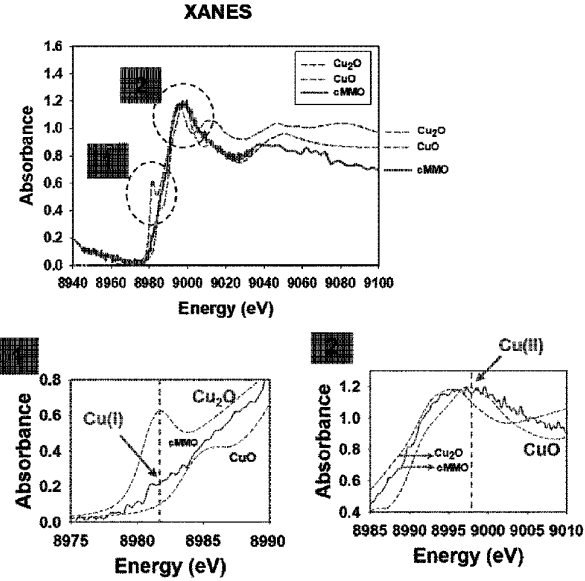
【図 4 a】

[図4a]



【図 4 b】

[図4b]



10

20

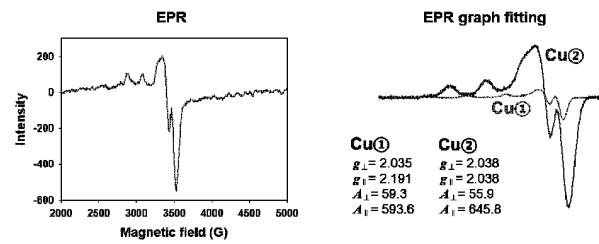
30

40

50

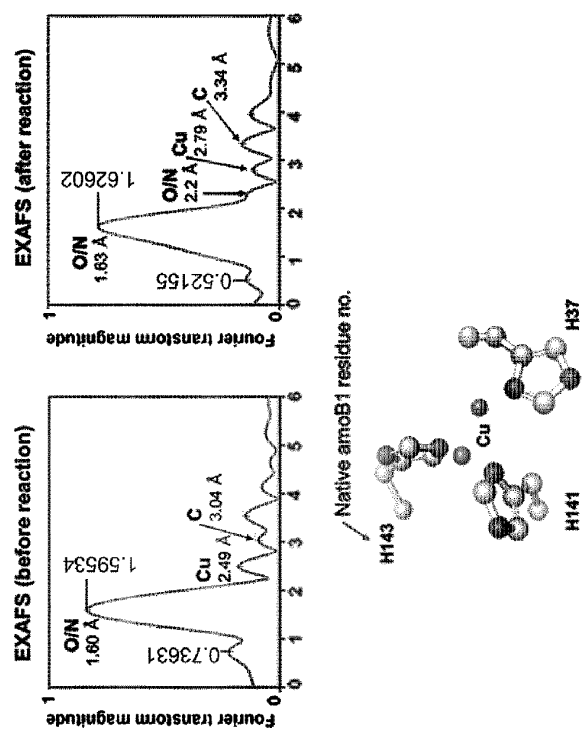
【 図 4 c 】

[図 4c]



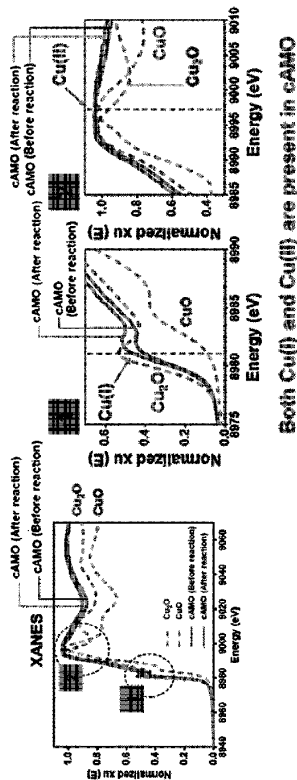
【 図 5 a 】

[図 5a]



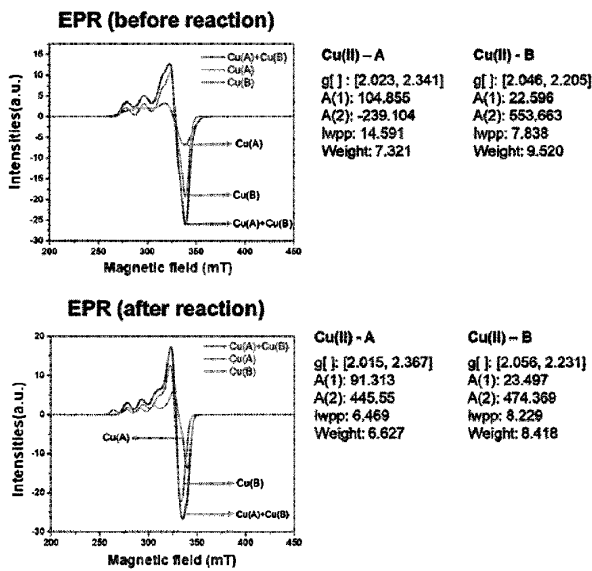
【 図 5 b 】

[図 5b]



【 図 5 c 】

[図 5c]



10

20

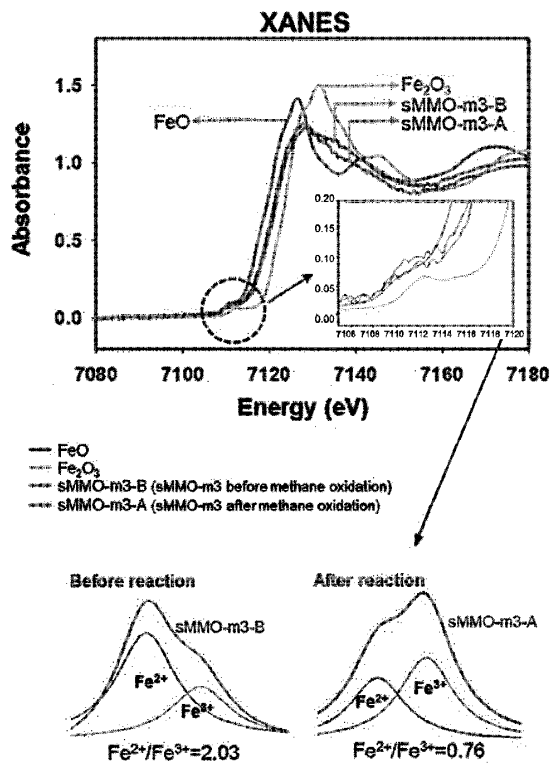
30

40

50

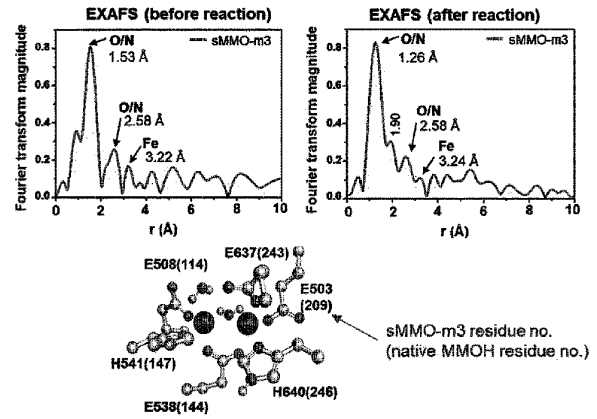
【図 6 a】

[5.6a]



【図 6 b】

[5.6b]

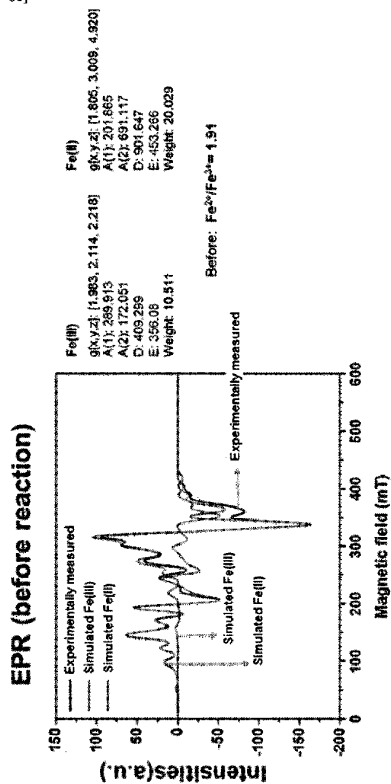


10

20

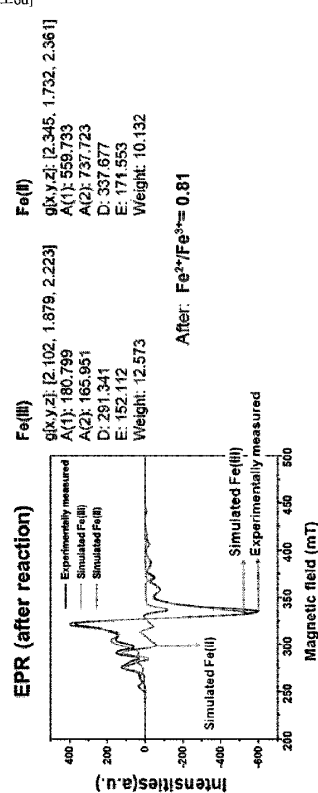
【図 6 c】

[5.6c]



【図 6 d】

[5.6d]

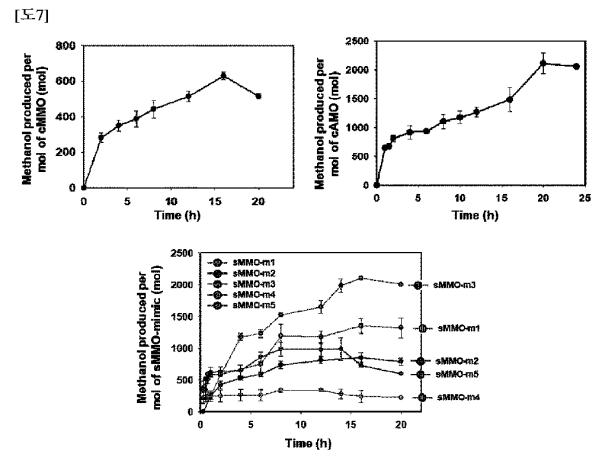


30

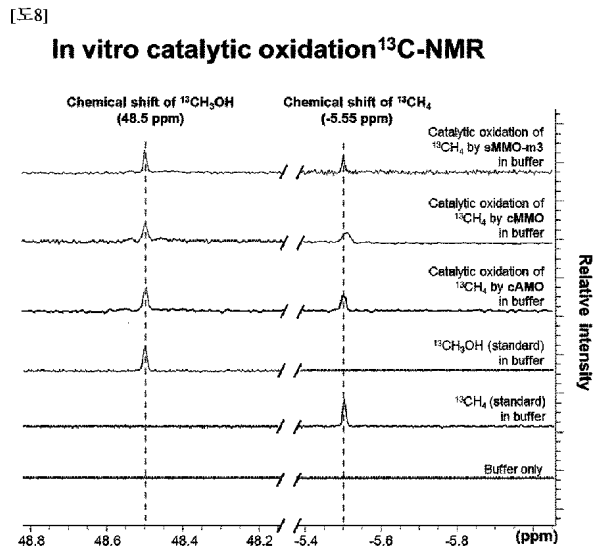
40

50

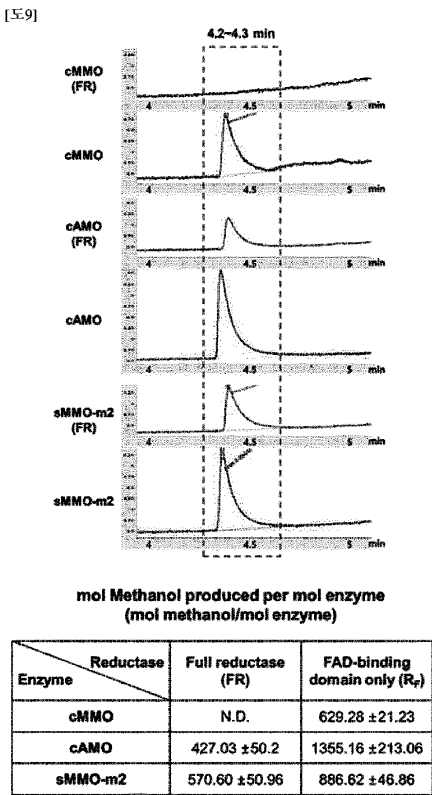
【 図 7 】



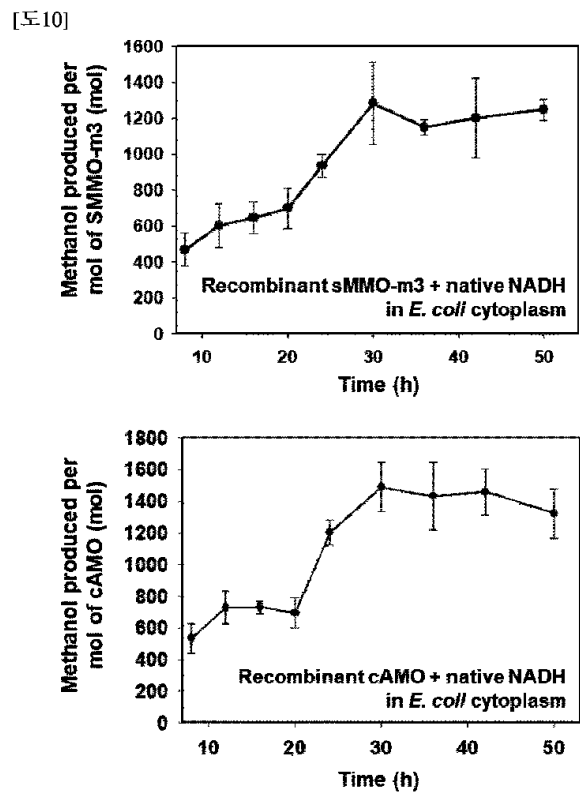
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



10

20

30

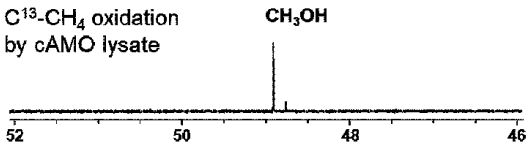
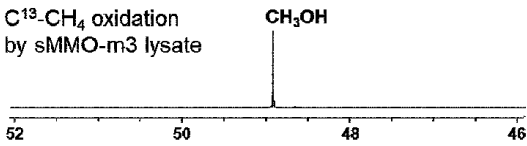
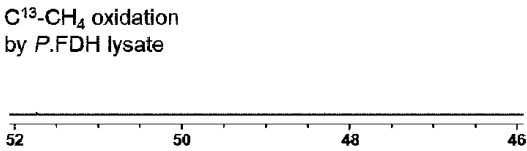
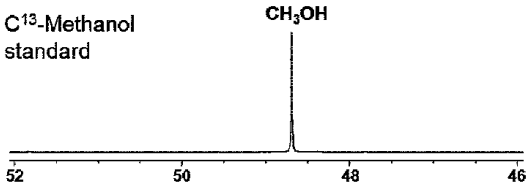
40

50

【 図 1 1 】

[図 11]

Cell lysate catalytic oxidation¹³C-NMR



【 配 列 表 】

2024515819000001.a p p

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

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 13ter.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 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:			10
			20
			30
			40
			50

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).	

10

20

30

40

50

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

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/005480

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 "I" 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

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/005480

제1기제관 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:

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/005480

제2기제란 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,

10
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.

20

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/53 (2006.01)	C 1 2 N	15/53	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),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,J
P,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,N
G,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

ヴィラ, パンベドング), 5 ドング 5 2 2 ホ

(72)発明者 ユー, イェオン フワー
大韓民國 0 3 3 2 6 ソウル, ウンピョング, ソオルンロ 2 0 ギル, 4 - 2, (スイート
ヴィレ, ギャルハイオンドング), 1 0 2 ホ

(72)発明者 チェ, ヨー ビン
大韓民國 1 0 9 0 5 キョンギド, パジュシ, ハヌル口, 1 0 0, (ハンウル マエウル 6
ダンジ, ドングパエドング), 6 0 9 ドング, 2 7 0 1 ホ

F ターム (参考) 4B064 AC02 CA02 CA19 CD04 CD30 DA16
4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 CA05 CA54 CA60
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 EA60 FA72 FA74