(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/53
C12N 9/02
C12P 7/22

(45) 공고일자 1999년12월15일
(11) 등록번호 10-0234348
(24) 등록일자 1999년09월16일

(21) 출원번호	10-1997-0703019	(65) 공개번호	특1997-0707288
(22) 출원일자	1997년05월03일	(43) 공개일자	1997년12월01일
번역문제출일자	1997년05월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB 95/02588	(87) 국제공개번호	WO 96/14419
(86) 국제출원일자	1995년11월02일	(87) 국제공개일자	1996년05월17일
(81) 지정국	EA 유라시아특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 핀랜드 국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 중국 체크 일본 대한민국 뉴질랜드 폴란드 싱가포르 슬로바키아 우크라이나 미국		
(30) 우선권주장	9422205.6 1994년11월03일 영국(GB)		

(73) 특허권자 비지퍼블릭리미티드캄퍼니 모건 데이비드 제이
영국 버크셔 (우편번호 : 알지6 1피티) 리딩 템즈 밸리 파크 드라이브 100
(72) 발명자 플리트쉬 사빈 라자
영국 에딘버러 (우편번호 : 이에이치9 3디제드) 웨스트 사빌 테라스 14 니커슨 다렌 폴
영국 옥스포드 (우편번호 : 오엑스1 3유에이치) 매너 로드 홀리웰 매너 웡 루엣-로크
영국 옥스포드 (우편번호 : 오엑스3 0제이엘) 크로치 크레슨트 29
(74) 대리인 김명신

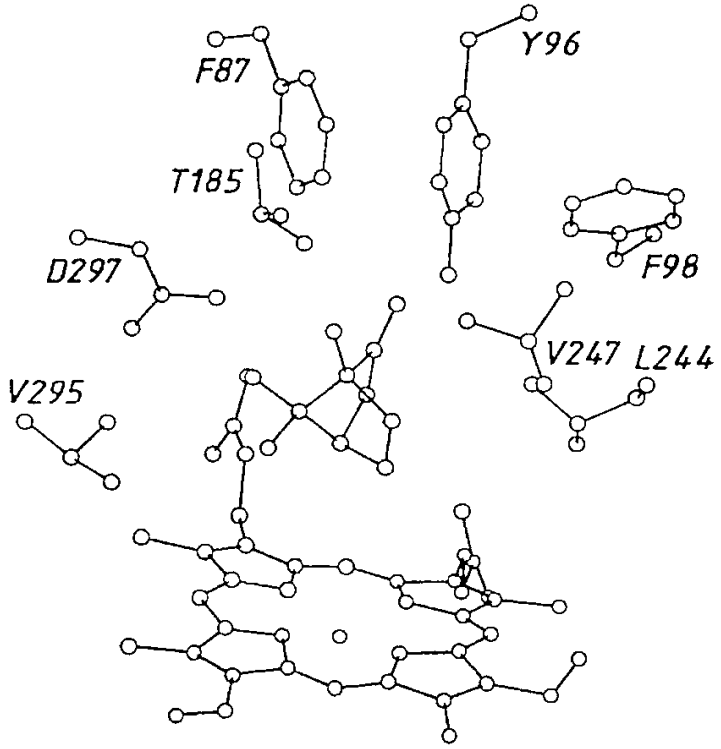
심사관 : 김형준

(54) 모노-옥시게나아제 시토크롬 P-450cam의 변이체

요약

본 발명은 모노 -옥시게나아제 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$의 변이체에 관한 것으로서, 위치 96에서 티로신 잔기 및/또는 위치 334에서 시스테인 잔기가 페닐알라닌을 제외한 특정 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것을 특징으로 한다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

모노-옥시게나아제 시토크롬 P-450$_{cam}$의 변이체

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 모노-옥시게나아제 시토크롬 P-450$_{cam}$의 변이체 및 상기 변이체로 특정 유기 화합물을 산화시키는 방법에 관한 것이다.

모노-옥시게나아제는 산소를 사용하여 비관능화된 탄화수소의 선택적 산화를 촉진하므로[1], 유기합성에서 중요하게 사용된다. 그러나, 결합된 전자-전달 단백질 및 충분한 양의 효소를 분리하기 어렵기때문에 상기 분야가 진보되기가 곤란했었다. 150개 이상의 다른 시토크롬 P-450 모노-옥시게나아제의 아미노산 서열의 유용성에도 불구하고, 단지 3개의 구조적 데이타만이 이용가능하며[2,3,4], 근소만이 박테리아계에서 성공적으로 과잉-발현되어왔다[5].

가용성이고 충분한 양으로 발현될 수 있는 하나의 시토크롬 P-450 모노-옥시게나아제는 캄퍼(1)에서 5-엑소-히드록시캄퍼로 위치- 및 입체- 선택적 히드록실화를 촉진하는 피. 푸티다(P. putida)에서 매우 특이적인 P-450$_{cam}$이다.[6] P-450$_{cam}$의 고해상도 결정 구조가 결정되어졌으며[2], 박테리아 효소의 작용기작이 포유류 대조군과 매우 유사하다고 믿기 때문에, 포유류 효소의 모델을 기준으로 한 구조가 사용되어왔다.

P-450$_{cam}$의 뉴클레오티드 서열과 상응하는 아미노산 서열이 기술되어졌다[5]. 상기효소의 활성자리의 위치는 공지되어 있으며, 구조-기능의 관계가 조사되어왔다[13,14]. P-450$_{cam}$의 변이체는 101, 185, 247[15], 87위치[16]에서 기술되어졌다. 티로신 96이 페닐 알라닌-96으로 변화된 변이체도 기술되어졌다[12,17,18]. 그러나 모든 경우에서 상기 논문은 공지된 산화 반응의 기작에서 돌연변이의 효과가 보고되었다. 다른 기질을 산화시키기위해 돌연변이를 생촉매로 제공하여 사용했다는 것은 기술되지 않았다.

새로운 생촉매를 발견하기 위한 시도로 우리는 야생형 단백질에 대한 기질이 아닌 유기분자의 특이적 산화를 실시할 수 있는 P-450$_{cam}$의 활성 자리를 재구상할 프로젝트를 시작해왔다. 우리의 초기 목표는 P-450$_{cam}$ 활성자리에 방향족 곁사슬을 함유하는 기질들의 결합을 촉진하는 "방향성 포켓"을 혼입하는 것이었다.

더구나 활성 자리로부터 떨어진 표면 잔기는 단백질의 취급 및 안정성에서의 효과와 동일하다(시스테인-334). 시스테인은 정제되는 동안 단백질의 바람직하지 못한 이합체화를 초래하므로 알라닌 잔기는 상기 두개의 특성을 향상시키기 위해 시스테인으로 치환된다.

$P\text{-}450_{cam}$의 3차원 구조는 도 1에서와 같이 캄퍼의 소수성 그룹에 접촉된 근접한 반 데르 발스를 제공하는 활성 자리를 나타낸다. 세개의 방향족 잔기(Y96, F87 및 F98)는 함께 분류되고, 반응의 위치- 및 입체-특이성을 지킬 수 있는 정확한 방향으로 기질을 유지시키기위해 티로신 96과 캄퍼 카르보닐 산소사이에 수소결합을 가지는 기질 결합 포켓을 그린다. 더 작고, 소수성의 비-방향족 곁사슬을 가진 상기 방향족 잔기의 치환은 소망되는 "방향족 포켓"을 제공할 수 있었다.

분자의 모델링은 세개의 방향족 잔기에 점 돌연변이의 유사한 효과를 조사하는데 사용되었다. 프로그램 GRID[7]는 방향족 프로브와, 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$의 가능한 변이체 사이의 상호반응에너지를 계산하는데 사용되며, 상기 잔기들은 알라닌으로 전환되었다(F87A, Y96A 및 F98A). 분자 모델링 패키지 퀀타(molecular modelling package Quanta[8])를 사용하여 결과가 검사되었다.

방향족 프로브에 접근가능한 활성자리 공동내에 변이체 F98A는 강한 결합 상호작용을 나타내며, Y96A는 약간 작고, F87A는 실질적으로 작다. 첫번째 경우에서 결합포켓에 더 중심일때 티로신 96은 알라닌으로 돌연변이되고 반면에 페닐알라닌 98은 한 쪽의 그루브내에 있다. 또한 티로신 96을 제거하면 기질에 결합된 수소가 손실되기 때문에 캄퍼에 대한 효소의 특이성이 감소된다.

본 발명의 한가지 측면에 따라 위치 96에서 티로신 잔기 및/또는 위치 334에서의 시스테인 잔기가 페닐알라닌을 제외한 특정 아미노산 잔기에 의해 치환되는 모노 -옥시게나아제 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$의 변이체가 제공된다.

본 발명의 다른 측면에 따라 위치 96에서의 티로신 잔기 및/또는 위치 334에서의 시스테인 잔기가 다른 아미노산 잔기에 의해 치환된 모노 -옥시게나아제 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$의 변이체가 제공되고, 상기 변이체는 -다중고리형 방향족 탄화수소, 선형 또는 가지형 알칸, 상기 화합물들의 할로겐화된 변형체 및 할로겐화된 탄화수소를 포함하는 비페닐기 및 디페닐기 화합물 중 어느 하나의 산화를 촉진시키는 성질을 갖는다.

본 발명의 다른 측면에 따라 상기 방법은 다중고리형 방향족 탄화수소, 선형 또는 가지형 알칸, 상기 화합물들의 할로겐화된 변형체 또는 할로겐화된 탄화수소를 포함하는 비페닐 또는 디페닐 화합물에서 선택된 화합물을 산화시키고, 산화조건 하에서 모노 -옥시게나아제 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$으로 상기 화합물 중 선택된 하나를 접촉시키는 것으로 이루어지며, 위치 96에서의 티로신 잔기 및/또는 위치 334에서의 시스테인 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환시킨다.

바람직하게 상기 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파라진, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 리신, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린 중 하나가 선택되고, 위치 96에서의 티로신 잔기의 경우에 상기 아미노산은 티로신이 아니며, 위치 334에서의 시스테인 잔기의 경우에 상기 아미노산은 시스테인이 아니다.

위치 96에서 티로신을 치환하는 아미노산은 편리하게 작은 소수성 아미노산 중 하나로, 예를 들면 알라닌, 글리신, 발린, 루신 또는 이소루신이며, 알라닌은 하기에 예시된 것과 같이 바람직하다.

선택적으로 위치 96에서 티로신을 치환하는 아미노산은 하전된 아미노산으로 예를 들면, 양극으로 하전된 기질에 수소결합하기위해 아스파르트산 또는 글루탐산과 같이 음극으로 하전된 산 ; 또는 캄퍼 족에 속하지 않는 음극으로 하전된 기질에 수소결합하기위해 리신, 아르기닌 또는 히스티딘과 같이 양극으로 하전된 화합물 중 하나일 것이다.

위치 96에서의 돌연변이는 변이효소가 상대적으로 넓은 범위에서 유기 기질의 산화를 촉진시키는 중요한 역할을 한다고 공지되어있다. 효소의 활성 자리에 인접한 다른 아미노산은 또한 활성자리의 형태와 특이성을 변화시키기 위해 돌연변이될 것이다. 상기 다른 아미노산은 위치 87, 98, 185, 244, 247, 295 및 297을 포함한다. 하나 이상의 상기 위치에서의 아미노산이 활성자리를 확장하기 위해 작은 소수성 아미노산으로 치환되거나 ; 또는 활성자리의 크기를 감소시키기 위해 큰 소수성 아미노산으로 치환되거나 ; 또는 기질의 상응하는 방향족 고리에 결합시키기 위해 방향족 고리를 가지는 아미노산에 의해 치환되는 것을 가정하였다.

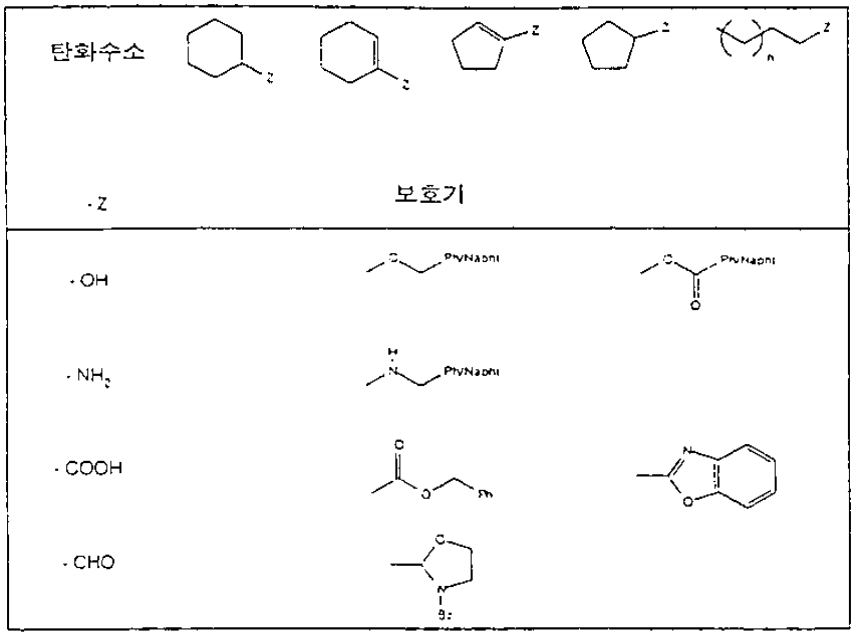
산화 반응에 대하여, 조건은 첨부된 참고문헌내에 기술되어 있다. 전형적으로 효소계는 변이효소뿐만 아니라 보조인자로서 NADH와 함께 푸티다레독신(putidaredoxin) 및 푸티다레독신 환원효소(putidaredoxin reductase)를 포함한다. 유기 화합물의 다양한 부류가 구상된다 :

1) 유기 화합물은 방향족 화합물이거나, 효소를 불활성화 또는 변성시키기 않는 조건하에서 사용된 탄화수소 또는 화합물이다. 상기 돌연변이가 효소의 표면내 방향족-결합 포켓을 조성하는 점에서 영향을 받으며, 상기 변이효소는 매우 다양한 방향족 화합물의 산화를 촉진시킬 수 있다. 방향족 및 다중방향족 화합물의 산화 예는 하기의 실시예 부분에서 논지되었으며, 야생형 효소가 캄퍼족 일원의 산화를 촉진한다고 사료된다.

2) 유기 화합물은 탄화수소, 예를 들면, 관능기를 운반하는 지방족 또는 지방족 고리 화합물이다. 방향족 보호기는 산화 반응에 앞서 관능기에 첨가되며, 산화 반응 후 관능기에서 제거된다. 적당한 방향족기는 페닐기이다. 방향족 보호기는 적절하게 기질을 수용할 것으로 기대된다. 그러므로 상기 보호기는 두가지 목적으로 제공된다 : 첫번째로 기질을 더욱 소수성으로 만들어, 소수성 효소 포켓에 대한 결합을 증가시킨다 ; 두번째로 활성 자리에서 적절하게 기질을 수용한다. 그러므로, 정확한 방향족 보호기를 가지고, 기질의 위치- 및 입체- 선택적 히드록시화가 양쪽에서 이뤄질 수 있다. 시클로헥실벤젠의 예는 하기 실시예 부분에 기술되어 있다.

단일 관능화된 탄화수소의 예로는 하기와 같은 시클로헥실, 시클로펜틸 및 알킬 유도체이다. 상기 화합물들의 산화 생성물은 특히 호모키랄형으로 생성되었을때 유기 합성을 위한 개시물질로서 유용하다. 방향족 보호기의 범위로, 예를 들면, 벤질 또는 나프틸 에테르 및 벤조일 또는 나프토일 에스테르 및 아미드가 구상된다. 관심부는 또한 카르복실 보호기로서 벤조옥사졸기이고, 알데히드 보호기로서 N-베닐 옥사졸리딘기이다. 둘다 효소적 산화 후 쉽게 제거될 수 있으며, 알데히드 및 산의 미생물적 산화에 대해 문헌내

에 이미 기술되어졌다.



3) 유기 화합물은 C5 내지 C12의 지방족 또는 지방족 고리 탄화수소이다. 시클로헥산 및 선형 탄화수소의 산화는 하기의 실시예 부분에 논지되어 있으며, 야생형 효소가 캄퍼족 일원의 산화를 촉진한다고 사료된다.

4) 유기 화합물은 할로겐화된 지방족 또는 지방족 고리 탄화수소이다. 린단(헥사클로로시클로헥산)의 산화가 또한 하기에 기술되어 있다.

도 2는 디페닐메탄(A) 및 P-450$_{cam}$ Y96A 변이체를 배양하여 형성되는 히드록실화 생성물의 기체 크로마토그래피를 나타낸다.

상기 고찰에 근거하여 위치 96(Y96)에서 티로신 대신에 알라닌, 리신, 발린 또는 페닐알라닌이 함유되어 있는 변이체 단백질이 구성되었다. 부가적인 변이체는 알라닌에 대해 위치 334에서 시스테인의 표면 돌연변이를 결합시킨 상기 활성자리 치환체로 구성되었다. 마지막으로 여러 활성 자리 돌연변이 및 표면 돌연변이는 다중 변이 효소를 구성하는 하나의 단백질내 결합되었다. 시토크롬 P-450$_{cam}$을 코딩하는 유전자 및 그의 천연적 전자-전달 파트너로 푸티다레독신 및 푸티다레독시 환원효소가 사슬 중합화반응(PCR)을 사용하여 피. 푸티다(P. Putida)의 전체 세포성 DNA에서 증폭되었다. 사용된 발현 벡터/이.콜라이(E. coli) 숙주의 결합체가 P-450$_{cam}$에 대해 균주 JM109내 pRH1091이고[9], 푸티다레독신에 대해 균주 JM109내 pUC118이며, 푸티다레독신 환원효소에 대해 균주 DH5$^{\alpha}$ 내 pGLW11이다. 올리고누클레오티드-방향자리-특이성 돌연변이화가 졸러(Zoller) 및 스미드(Smith)의 방법에 의한 M13mp19 서브클론을 사용하여 실시되었고[10], 변이체 선별은 군켈(Kunkel)의 방법이 사용되었다[11].

변이체 Y96A는 캄퍼(1)의 히드록실화를 촉진하는 것을 보여주며, 변이체 Y96F에서 보고된 것과 유사하게[12], 야생형의 효소와 비교하여 반응성이 덜 선택적이다. 상기에서 선택성의 감소로 인해 Y96과 캄퍼 사이의 수소결합의 손실을 일으킬 수 있다. 상기 야생형 및 Y96A 단백질의 특성이 부가적으로 다양한 결합 및 활성 분석으로 조사되었다.

가능한 기질의 결합이 분광학적인 방법에 의해 조사되었다. 기질이 존재하지 않는 야생형 효소는 6배위되고, 6번째 배위된 자리를 점유하며 약하게 물이 결합된 저스핀형내에 있고, 391nm에서 특징적인 최대의 소랫(Soret)을 보인다. 기질 유사 아다만탄온(2), 아다만탄(3) 및 노르보난(4)의 결합은 완전하게 햄(haem)에서 고스핀형으로 전환된다. 그러나 디페닐메탄(5)은 흡수 스펙트럼내 전이를 줄 수 없다.

화합물(3) 및 (4)에 대한 같은 결과를 주는 Y96A 변이체는 화합물(1) 과 (2)가 과량으로 첨가되었을 때도, 고스핀형으로 완전히 전환되지 않는다. 그러나 야생형에 대조적으로 Y96A는 변이체 단백질에 상기 화합물의 결합을 나타내는 디페닐메탄으로 햄에서 고속형으로 부분적으로 전환되는 것을 보여준다.

기대된 것과 같이, 캄퍼 및 아다만탄온에 대한 해리상수(K_{app})가 Y96A에서 증가되었다. 한편 상기 효소 포켓이 소수성 기질에 대해 더 선택적임을 나타내는, 소수성 기질인 아다만탄 및 노르보란에 대한 K_{app}값이 감소되었다. 결합내 큰 변화가 디페닐메탄으로 얻어졌고, 야생형 단백질에는 약하게 결합하지만, Y96A변이체에 대해 크게 증가된 친화성을 볼 수 있다(표 1).

Y96A 단백질에 의해 디페닐메탄이 일단 결합하면, 촉매 기질의 전환이 조사되었다. 변이체 단백질은 푸티다레독신 및 푸티다레독신 환원효소로 재구성되었다. 디페닐메탄(5)이 첨가되고, 상기 혼합물이 NADH 및 산소와 배양되었다.

100mM KCl, 20mM KH_2PO_4 pH 7.4 내 10μM 푸티다레독신, 2μM 푸티다레독신 환원효소, 1μM 시토크롬 P-

450_{cam} 모노 -옥시게나아제(야생형 또는 변이체) 및 1mM 디페닐메탄을 함유하는 용액이 25℃에서 5분동안 진탕기에서 예비배양되었다. 효소 반응은 전체 농도 2mM로 NADH를 먼저 첨가함에 의해 개시되었다. 부가적으로 4개의 NADH 분취량(매 시간에 1mM씩 NADH 농도를 증가시키기위해)이 5분 간격으로 첨가되고, 30분 후 0.5ml 클로로포름을 첨가함에 의해 상기 반응을 정지시킨다. 클로로포름층은 기체 크로마토그래피로 분석된다.

원배양 혼합물의 유기 추출물이 기체 크로마토그래피에 의해 분석된다. 한개의 주된 새로운 피크가 GC에 의해 검출되었고(표 2 참조), 확실한 시료인 파라-히드록시디페닐메탄(6)과 같은 보유시간을 갖는다. 오르도 및 메타 이성체와 같은 다른 방향족 히드록실화 생성물은 다른 보유시간을 갖는다. 구조(6)로서 생성물의 동일성 확인을 위해 질량 분석이 실시되고, 184에서 정확한 질량 피크를 준다.

상기의 실험기술을 사용하여, 본 발명자는 야생형 $P-450_{cam}$ 효소 및 또한 변이체 버젼 Y96A에 대한 기질로서 상당히 많은 유기 화합물을 조사하였다. 부가적인 작업으로 Y96V ; Y96L, Y96F, C334A로 명명된 변이체 ; 조합된 변이체 F87A ; Y96G, F193A와 조합된 활성 자리 및 표면 변이체 Y96A, C334A ; Y96V, C334A ; Y96L, C334A ; Y96F, C334A ; F87A, Y96G, F193A, C334A를 포함한다.

Y96A에 대한 결과를 표 2에 기술하고, 구조적으로 연관된 분자가 함께 분류 되었다. NADH 전환에 의해 산화가 일어나는 기질이 +로 표시되었다.

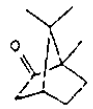
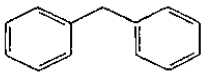
스핀 고/저 : 숫자는 인산 완충액내(40mM 인산, 68mM 칼륨, pH 7.4) 200μM 시험 화합물의 존재하에서 저스핀에서 고스핀 평형상태로 전화되는 P-450(OD_{417} 0.2-0.4)의 비율을 보여준다. 스핀 상태 평형은 UV/vis 분광광도계로 측정된다 : OD_{417}에서 저스핀 및 OD_{392}에서 고스핀, nd ; 실시하지 않음

Vs DTT : 숫자는 인산 완충액내 시험 화합물(200μM)과 경쟁적으로 P-450에 결합된 DTT(200μM)의 치환 비율을 보여준다. P-450에 결합된 DTT는 OD_{374} 및 OD_{461}에서 흡수 피크를 나타내고, 치환은 UV/vis 분광 광도계로 측정되었다.

실시예가 상기의 1) 내지 4)에서 확인한 각 화합물의 분류에 대해 표 2a 내지 2h내에 포함된다.

몇가지 기질 화합물에 대한 반응 생성물이 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제되고, 질량분석기, 핵자기공명 및/또는 공-용출에 의해 확인된다. 표 3은 변이체 Y96A, C334A에 의한 저급 선형, 가지형 및 고리형 탄화수소의 산화에 대한 NADH 소비를 기술하였다. 표 4a 내지 4h는 변이체 및 기질 결합체에 대한 생성물 분포를 기술하였으며, 상기가 데이타에 설명되어졌다.

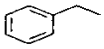
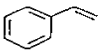
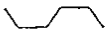
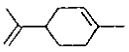
[표 1]

	$K_{app}(\mu M)^a$	
	WT	Y96A
 1	6.3	12
 2	12	28
 3	8.4	1.4
 4	330	92
 5	> 1500[b]	73

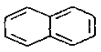
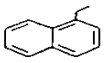
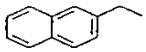
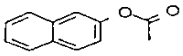
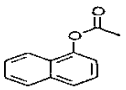
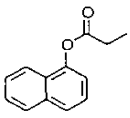
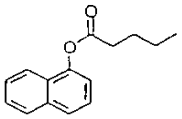
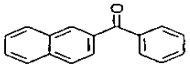
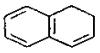
[a]값은 슬리거(Sligar)의 방법을 사용하여 두개의 독립된 측정의 평균값이다(S.G. Sligar, Biochemistry, 1976, 15, 5399-5406). K_{app}값은 완충액에서 K^+의 농도에 강하게 의존한다. [K^+] 150mM에서, 캄퍼에 대한 K는 야생형 및 Y96A에서 0.6μM이다. 상기 표의 데이타는 높은 이온 농도에서 기질의 염화를 피하기위해 인산 완충액 pH 7.4내 [K^+]=70mM에서 측정되었다.

포화되지 않음.

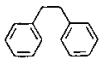
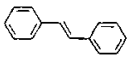
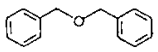
[표 2a]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:1-고리	⊿스핀 고/저	Vs DTT	⊿스핀 고/저	Vs DTT	NADH 전환?	GC?	NADH 전환?	GC?
 벤젠	-	-	-	-				
 톨루엔	-	-	30	30				
 에틸벤젠	-	-	40	40				
 스티렌	-	-	30	30				
 시클로헥센	-	5	40	40				
 1,3-시클로헥사디엔	nd	nd	nd	nd				
 1,4-시클로헥사디엔	-	5	15	20				
 시클로헥산	-	-	60	60			+	
 헥산	-	-	70	60			+	
 메틸시클로헥산	50	50	100	70				
 (S)-(+)-카르본	10	60	10	80				

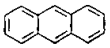
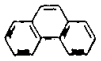
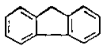
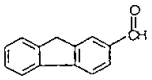
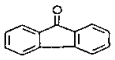
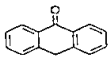
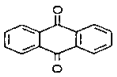
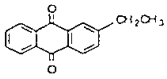
[표 2b]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:2-고리, 나프탈렌	스핀 고/저	Vs DTT	스핀 고/저	Vs DTT	NADH 전환?	GC?	NADH 전환?	GC?
 나프탈렌	-	-	15	20				
 1-에틸나프탈렌	-	-	5	20				
 2-에틸나프탈렌	-	-	10	20				
 2-나프탈아세테이트	-	5	-	5				
 1-나프틸아세테이트	-	5	-	5				
 1-나프틸프로피오네이트	-	20	0	20				
 1-나프틸부티레이트	-	5	-	5				
 나프틸페닐케톤	-	5	-	5				
 1,2-디히드로나프탈렌	5	20	30	90				
 1,2,3,4-테트라히드로나프탈렌	5	10	40	40				

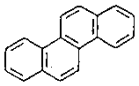
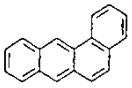
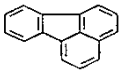
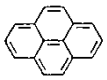
[표 2c]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:2-고리, DPH	스피린 고/저	Vs DTT	스피린 고/저	Vs DTT	NADH전환?	GC?	NADH전환?	GC?
 디페닐메탄	-	5	45	nd			+	+
 디페닐에테르	10	5	20	50				
 벤조페논	-	20	-	20				
 시클로헥실페닐케톤	-	30	60	nd				
 페닐벤조에이트	-	5	-	-				
 N-페닐벤질아민	-	5	45	nd				
 비벤질	-	-	55	55				
 cis-스틸벤	-	20	40	50				
 비시클	-	20	-	90				
 시클로헥실벤젠	20	20	80	nd				
 trans-스틸벤	-	-	-	-				
 벤질에테르	-	5	55	nd				

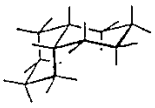
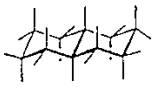
[표 2d]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:3-고리	⊿스핀 고/저	Vs DTT	⊿스핀 고/저	Vs DTT	NADH전환?	GC?	NADH전환?	GC?
 안트라센								
 페난트렌	-	-	20	20			+	
 플루오렌	-	-	-	50				
 2-플루오렌카르복스알데히드	-	-	-	50				
 9-플루오렌온	-	20	-	5				
 안트론	-	5	-	5				
 안트라퀴논								
 2-에틸안트라퀴논								

[표 2e]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:4,5-고리	⊿스핀 고/저	Vs DTT	⊿스핀 고/저	Vs DTT	NADH전환?	GC?	NADH전환?	GC?
 크리센	-	-	-	-				
 1,2-벤즈안트라센	-	-	-	-				
 플루오란텐	-	5	20	10				
 피렌*	-	-	-	-				
 페릴렌*	-	-	-	-				

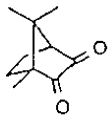
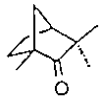
[표 2f]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:고리형 알칸	⊿스핀 고/저	Vs DTT	⊿스핀 고/저	Vs DTT	NADH 전환?	GC?	NADH 전환?	GC?
 cis-데카히드로나프탈렌	nd	nd	nd	nd				
 trans-데카히드로나프탈렌	20	10	90	70				
 시클로헥산	-	-	60	60			+	
 메틸시클로헥산	50	50	100	70				

[표 2g]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:n-알칸	⊿스핀 고/저	Vs DTT	⊿스핀 고/저	Vs DTT	NADH 전화?	GC?	NADH 전화?	GC?
n-펜탄	-	5	55	40			+	
n-헥산	-	-	60	40			+	
n-헵탄	5	5	60	40			+	
n-옥탄	-	5	80	45			+	
n-노난	-	-	70	45			+	
n-데칸	nd	nd	nd	nd				
n-운데칸	nd	nd	20	20				
n-도데칸	nd	nd	5	5				
$CH_3(CH_2)_{14}CH_3$ n-헥사데칸	-	-	-	-				
$CH_3(CH_2)_{15}CH_3$ n-헵타데칸	-	-	-	-				
$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3,Na$ SDS	-	20	-	60				
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CO_2H$ 올레산	-	10?	-	20?				
$[(CH_3)_2CH(CH_2)_3CH(CH_3)(CH_2)_3CH(CH_3)CH_2CH_2-]_2$ 스쿠알란	-	-	-	20				
 이소프렌	-	-	10	10				

[표 2h]

P450cam-기질 상호반응	야생형		변이체 Y96A		야생형		변이체 Y96A	
부분군:캄퍼-유사체	⊿스핀 고/저	Vs DTT	⊿스핀 고/저	Vs DTT	NADH 전화?	GC?	NADH 전화?	GC?
 (1R)-(-)-캄퍼퀴논	80	80	80	80				
 (1R)-(-)-펜촌	40	70	50	80				
 디시클로펜타디엔	50	80	90	90				

[표 3]

알칸 기질:		야생형	Y96A
주사슬 길이	이름		
C4	n-부탄	-	-
C4	2-메틸부탄	바탕	4.6
C4	2,3-디메틸부탄	바탕	16.8
C4	2,2-디메틸부탄	바탕	14.0
C5	n-펜탄	바탕	5.8
C5	2-메틸펜탄	3.8	11.7
C5	3-메틸펜탄	1.3	14.2
C5	2,4-디메틸펜탄	0.2	12.6
C5	2,2-디메틸펜탄	5.2	12.8
C5	2,2,4-트리메틸펜탄	0.9	5.3
C5	3-에틸펜탄	바탕	16.2
C6	n-헥산	바탕	6.0
C6	2-메틸헥산	바탕	10.6
C7	n-헵탄	2.7	4.4
C7	2-메틸헵탄	바탕	2.1
C7	4-메틸헵탄	1.4	10.2
C8	n-옥탄	바탕	5.8
C7	시클로헵탄	4.4	42.5

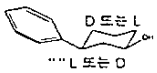
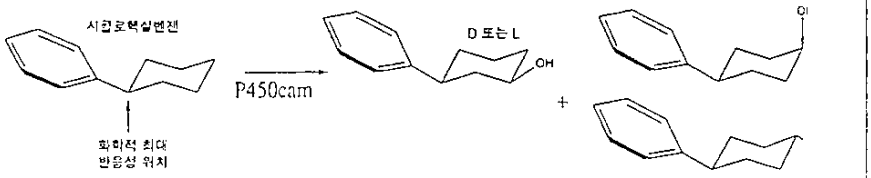
상기에 기록된 모든 변이체는 또한 C334A 돌연변이를 포함한다.

NADH 소비율로서 측정된 전환율(nmol NADH/nmol P450cam/s).

P450cam 활성자리 변이체로 기질 산화에 의한 생성물 구조 및 분포.

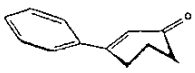
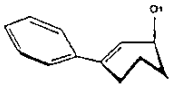
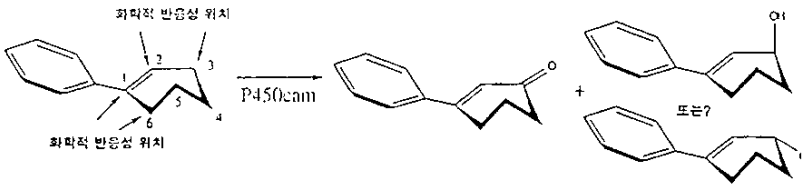
바탕 -전형적인 바탕 NADH 산화율은 0.07nmol NADH(nmole P450cam)sec이다

[표 4a]

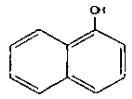
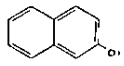
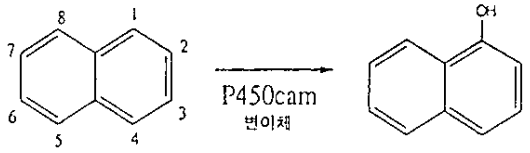
시클로헥실벤젠 생성물		변이체에 대한 생성물(%)				
		WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V
	3-올	43	20	54	38	28
	3-올	20	20	27	23	39
 트란스-4-올		25	15	6	23	10
 시스-4-올		12	45	13	16	23
총생성물(면적/10^5)		0.8	7.4	1.1	10.4	12.5
						

P450cam 활성자리 변이체로 기질을 산화시킴에 의한 생성물 구조 및 분포. 상기에 기록된 모든 변이체는 또한 C334A 돌연변이를 포함한다.

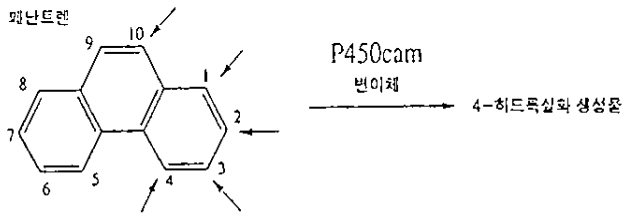
[표 4b]

페닐시클로헥센 생성물	변이체에 대한 생성물(%)	
	WT	Y96A
 3-온(A)	24	25
 3-올(B)	76	75
총생성물(면적/10^6)	42	36
		

[표 4c]

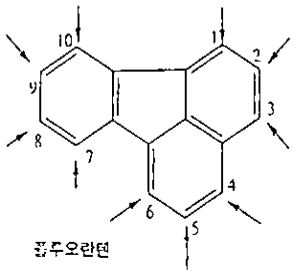
나프탈렌 생성물	변이체에 대한 생성물(%)					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
 1-올	100	100	100	100	100	100
 2-올	0	0	0	0	0	0
총생성물(면적/10^5)	(0.016)	1.1	2.4	0.7	1.4	0.1
						

[표 4d]

페난트렌 생성물	변이체에 대한 생성물(%)					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	38	49	41	35.5	41	27
B	15	23	31	41	38	41
C	12	13	5	9	11	3
D	35	15	23	14.5	10	29
총생성물(면적/10^6)	0.075	7.0	4.5	2.8	1.6	0.065
						

[표 4e]

플루오란텐 생성물	변이체에 대한 생성물(%)					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	0	84	-	-	-	0
B	0	16	-	-	-	100
총생성물(면적/10^6)	0	2.7	-	-	-	0.2

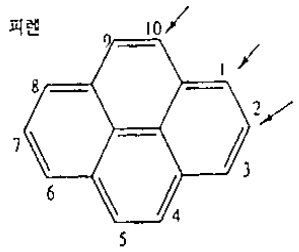


플루오란텐

P450cam
변이체
2-히드록실화 생성물

[표 4f]

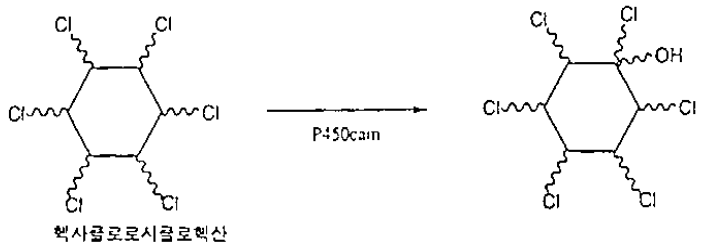
피렌 생성물	변이체에 대한 생성물(%)					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	0	40	43	23	30	33
B	0	43.6	29	64.5	55	40
C	0	5	12.5	7.9	12	20
D	0	11.4	15.5	4.6	3	7
총생성물(면적/10^6)	0	1.2	1.5	1.5	1.6	0.02



P450cam
변이체
4-히드록실화 생성물

[표 4g]

린단 생성물 (헥사클로로시클로헥산)	변이체에 대한 생성물(%)	
	WT	Y96A
A	100	100
전환율 nmole NADH(nmoleP450)$^{-1}$s^{-1}	7.5	43.5



[표 4h]

헥산 생성물	변이체에 대한 생성물(%)	
	Y96F	Y96A
2-헥산온	10	15
3-헥산온	16	28
2-헥산올	24	26
3-헥산올	50	32
상대활성(WT=1)	18.2	25.5
2-메틸헥산 생성물	변이체에 대한 생성물(%)	
	Y96F	Y96A
2-메틸-2-헥산올	72	74
5-메틸-2-헥산온	16	14
2-메틸-3-헥산올	7	4
5-메틸-2-헥산올	5	8
상대활성(WT=1)	2.3	2.6

[참고문헌]

1. Cytochrome P-450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry, ed. P R Ortiz de Montellano, Plenum Press, New York, 1986.

2. T L Poulos, B C Finzel and A J Howard, J. Mol. Biol., 1987, 195, 687-700.

3. J A Peterason, U.-Y. Lu, J Geisselsoder, S Graham-Lorence, C Carmona, F Witney, and M C Lorence, J. Biol. Chem., 1992, 267, 14193-14203.

4. K G Ravichandran, S S Boddupali, C A Hasemann, J A Peterson, and J Deisenhofer, Science, 1993, 261, 731-736.

5. B P Unger, I C Gunsalus, and S G Sligar, J. Biol. Chem., 1986, 261, 1158-1163 ; J S Miles, A W Munro, B N Rospendowski, W E Smith, J McKnight, and A J Thomson, Biochem. J., 1992, 288, 503-509 ;

T H Richardson, M J Hsu, T Kronbach, H J Barnes, G Chan, M R Waterman, B Kemper, and E F Johnson, Arch. Biochem. Biophys., 1993, 300, 510-516 ; S S Boddupalli, T Oster, R W Estabrook, and J A Peterson, J Biol. Chem., 1992, 267, 10375-10380 ; H Li K Darish and T L Poulos, J Biol. Chem., 1991, 266-11909-11914.

6. I C Gunsalus and G C Wagner, Methods Enzymol., 1978, 52, 166-188.

7. P J Goodford, J Med. Chem., 1985, 28, 849-857.

8. Quanta 4.0, Molecular Simulations Inc., 16 New England Executive Park, Burlington, MA 01803-5297.

9. J E Baldwin J M Blackburn, R J Heath, and J D Sutherland, Bioorg, Med. Chem. Letts. 1992, 2, 663-668.

10. M J Zoller and M Smith, Nucleic Acids Res., 1982, 10, 6487.

11. T A Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci., 1985, 82, 488-492.

12. C Di Primo, G Hui Bin Hoa, P. Douzou, and S Sligar, J. Biol. Chem., 1990, 265, 5361-5363.

13. D Filipovic, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 189, No. 1, 1992, November 30, 1992, pages 488-495.

14. S G Sligar, D Filipovic, and P S Stayton, Methods in Enzymology, Vol. 206, pages 31-49.

15. P J Loida and S G Sligar, Protein Engineering, Vol. 6, No. 2, pages 207-212, 1993.

16. S F Tuck et al., The Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 1, January 5, 1993, pages 269-275.

17. W M Atkins and S G Sligar, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 263, No. 35, 15 December 1988, pages 18842-18849.

18. W M Atkins and S G Sligar, Biochemistry 1990, 29, 1271-1275.

(57) 청구의 범위

청구항 1

위치 96에서 티로신 잔기가 페닐알라닌을 제외한 특정 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것을 특징으로 하는 모노 -옥시게나아제 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$의 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변이체는 다중고리형 방향족 탄화수소, 선형 또는 가지형 알칸, 할로겐화 탄화수소를 포함하는 디페닐 및 비페닐 화합물 중 어느 하나의 산화를 촉진시키는 성질을 갖는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 리신, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판 및 발린 중 어느 하나에서 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 위치 87, 98, 185, 244, 247, 295 및 297에서 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 5

모노 -옥시게나아제 시토크롬 $P\text{-}450_{cam}$을 산화 조건하에서 다중고리형 방향족 탄화수소, 선형 또는 가지형 알칸, 상기 화합물의 할로겐화 변형체 및 할로겐화 탄화수소를 포함하는 디페닐 또는 비페닐 화합물에서 선택된 화합물 중의 하나와 접촉시켜서 화합물을 산화시키는 방법에 있어서, 위치 96에서 티로신 잔기가 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것을 특징으로 하는 화합물의 산화방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 리신, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판 및 발린 중 어느 하나에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 하나 이상의 위치 87, 98, 185, 244, 247, 295 및 297에서 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 아미노산은 알라닌, 발린, 루신 및 글리신 중 어느 하나로부터 선택되

는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 아미노산은 알라닌, 발린, 루신 및 글리신 중 어느 하나로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 10

제3항에 있어서, 하나 이상의 위치 87, 98, 185, 244, 247, 295 및 297에서 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 11

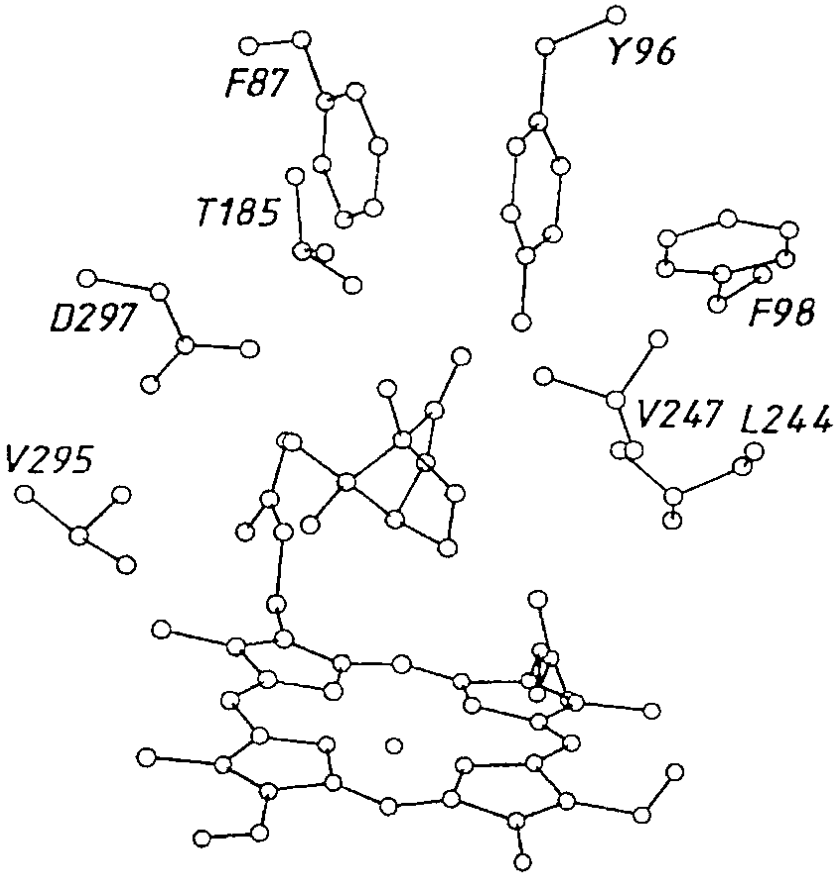
제8항에 있어서, 하나 이상의 위치 87, 98, 185, 244, 247, 295 및 297에서 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 알라닌, 발린, 루신 및 글리신 중 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

도면1



도면2

