(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0112181
(43) 공개일자 2024년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/1217 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0107774
(22) 출원일자 2023년08월17일
심사청구일자 2023년08월17일
(30) 우선권주장
1020230002872 2023년01월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김옥빈
경기도 고양시 일산동구 강송로125번길 52, 610동 306호 (백석동, 흰돌마을6단지라이프타운)
김남연
서울특별시 서초구 매헌로 16길 40
(74) 대리인
특허법인한일

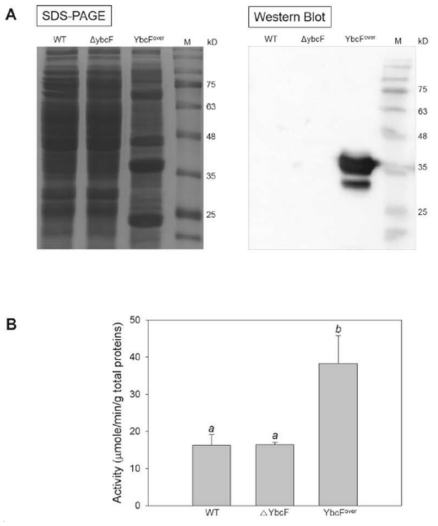
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **카바메이트를 생산하는 에세리키아 속 미생물 및 이를 이용한 카바메이트 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 YbcF 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 과발현된 플라스미드를 도입한, 카바메이트를 생산하는 에세리키아(Escherichia) 속 재조합 미생물 및 상기 미생물을 이용한 카바메이트 생산 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12P 13/02 (2013.01)
C12Y 207/02002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711170468
과제번호 2019R1A2C1008066
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 디카르복실 아미노산 수송단백질의 기능적 특성화
기 여 율 1/2
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345347440
과제번호 2021R1A6A1A10039823
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 기초과학연구소
기 여 율 1/2
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

YbcF 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 과발현된, 카바메이트 생산능이 증가된 에세리키아(Escherichia) 속 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 YbcF 단백질은 카바메이트 키나제 활성을 가지는 것인, 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물은 야생형 균주에 비해 카바메이트 키나제 활성이 강화된 것인, 재조합 미생물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물은 YbcF 단백질을 코딩하는 유전자가 결실된 균주에 비해 카바메이트 키나제 활성이 강화된 것인, 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 YbcF 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 재조합 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 YbcF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 것인, 재조합 미생물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*)인 것인, 재조합 미생물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 기탁번호 KCTC15520BP로 기탁된 대장균인 것인, 재조합 미생물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 미생물을 호기 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 카바메이트 생산 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 카바메이트 생산은 이화성 카바메이트 키나제 활성을 갖는 YbcF 단백질에 의해 카바모일 포스페이트에서 ADP로 포스페이트 그룹을 전달하여 ATP 및 카바메이트를 생산함으로서 완료되는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 YbcF 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 과발현된, 카바메이트를 생산하는 에세리키아(Escherichia) 속 재조합 미생물 및 상기 미생물을 이용한 카바메이트 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 카바모일 포스페이트(carbamoyl phosphate, CP)는 피리미딘 뉴클레오티드와 아르기닌/우레아의 생합성 및 항생제 합성에 관여하는 필수 대사 산물이다. 상기 CP는 생합성(anabolic) 경로 및 분해(catabolic) 경로의 여러 경우에 의해 생성될 수 있다. 상기 분해 경로에 의한 CP 생산의 예로서, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis 및 Lactobacillales 목의 여러 박테리아에서 발견되는 아르기닌 데이미나제(arginine deiminase, ADI) 경로에서 이화작용 오르니틴 트랜스카바밀라제(ornithine transcarbamylase, OTCase)에 의한 것을 들 수 있다. Lactobacillus brevis에서 아르기닌은 ADI에 의해 암모니아와 시트룰린으로 혐기적으로 분해되며 OTCase에 의해 오르니틴과 CP로 전환되고, 이들은 인산기를 전달하여 ATP를 생성하고 카바메이트를 남기는 이화작용 CK의 반응과 결합된다.

[0004] 대장균은 혐기성 알란토인 분해에서 옥사믹 트랜스카바밀라제(oxamic transcarbamylase, OXTCase) 반응을 통해 카바모일 포스페이트(carbamoyl phosphate, CP)를 생산하기 위해 이화성 트랜스카바밀라제를 사용하는 여러 유기체 중 하나이다. 이 경로가 대장균에 존재한다는 것은 오랫동안 알려져 왔지만, OXTCase 및 이화작용 카바메이트 키나제(carbamate kinase, CK)에 대한 유전자는 아직 실험적으로 확인되지 않았다.

[0005] 한편, 이전 연구에서 본 발명의 발명자들은 OXTCase에 대한 강력한 후보 유전자인 *fdrA*를 제시하였고, *fdrA* 근처에는 Smith 등이 CK 후보로 제안한 ybcF 유전자가 존재한다(PLoS Comput. Biol.2012;8:e1002540). 이 경우, *E. coli* 의 이화작용 CK를 담당하는 단백질을 코딩하는 유전자는 *L. brevis*의 CK가 ADI 경로에 위치하는 것과는 달리, 알란토인 경로에 위치하고 있음을 의미한다.

[0006] 따라서, 대장균 YbcF와 알란토인 분해 경로의 마지막 단계인 카바메이트 생산에 관한 연구가 여전히 필요한 실정이다.

[0007] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 대장균 YbcF의 알란토인 분해 경로를 통한 카바메이트 생산에 관해 연구 노력한 결과, 대장균의 *ybcF* 유전자가 *fdrA* 오페론에 속하고, 대장균 YbcF 단백질이 catabolic 카바메이트 키나제(CK) 활성을 가지고 ATP 및 카바메이트를 생산함으로써 알란토인 분해 경로를 완료할 수 있음을 확인하였으며, YbcF 과발현을 통해 CK 활성을 현저히 증가시킴을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은, YbcF 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 과발현된 카바메이트를 생산하는 에세리키아(Escherichia) 속 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 상기 미생물을 이용한 카바메이트 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설

명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, YbcF 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 과발현된 카바메이트를 생산하는 에세리키아(Escherichia) 속 재조합 미생물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 용어, "YbcF 단백질"은, 혐기성 알란토인 분해 경로의 카바메이트 키나제 활성을 담당하는 단백질로서 예측되며, 본 발명에서 카바메이트 키나제 활성을 확인하였다. 본 발명자들은 상기 YbcF 단백질을 코딩하는 *ybcF* 유전자를 *allK* 유전자로 재명명하였고, 이는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 YbcF 단백질은 에세리키아(Escherichia) 속 미생물 유래 단백질 일 수 있으며, 보다 구체적으로, 대장균 K-12 MG1655 유래 단백질일 수 있다.

[0017] 본 발명의 YbcF 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 서열번호 1과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열은 본 발명의 서열번호 1과 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 99.7% 이상, 99.8% 이상 또는 그 이상, 및 100% 미만의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열일 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 YbcF 단백질에 동일 또는 상응하는 활성, 또는 카바메이트 키나제 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 YbcF 단백질의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0018] 본 발명의 YbcF 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 YbcF 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지거나, 상기 아미노산 서열로 이루어지거나, 또는 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(consisting essentially of) 수 있다. 본 발명의 YbcF 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가(즉, 아미노산 서열 N-말단 그리고/또는 C-말단에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가) 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우를 제외하는 것이 아니다.

[0019] 본 발명의 YbcF 단백질에 있어, 상기 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 통상적으로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 YbcF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 ybcF 유전자일 수 있다. 또한, YbcF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 대장균 유래일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 YbcF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 YbcF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열과 90% 이상의 동일성을 가지면서 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열로 이루어진 또는 필수적으로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 가닥이다.

[0023] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열과 90% 이상의 동일성을 가지면서 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 경우라면, 상기 염기서열의 일부가 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드를 포함하더라도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 있어서, 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한

염기를 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 염기로 치환시키는 것을 의미한다.

[0024] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 폴리뉴클레오티드 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이드리드화할 수 있는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al.,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M.Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons,Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60℃, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60℃, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68℃ 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.

[0026] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열 뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[0027] 구체적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55℃의 Tm 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 Tm 값은 60℃, 63℃ 또는65℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[0028] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).

[0029] 상기 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0030] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.

[0031] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad.Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403(1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego,1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할

수 있다.

[0032] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358(1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 패널티 10, 갭 연장 패널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무페널티를 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 미생물에 포함되는 YbcF 단백질은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 에세리키아 속 미생물 내에서 발현될 수 있다.

[0035] 상기 용어, "발현"은 목적 단백질이 미생물 내에 도입되거나, 미생물 내에서 발현되도록 변형된 상태를 의미한다. 본 발명의 목적상 "목적 단백질"은 전술한 YbcF 단백질일 수 있다.

[0036] 상기 단백질의 도입은, 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 외래 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 코돈 최적화된 변이형 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 외래 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질과 동일/유사한 활성을 나타내는 한 그 유래나 서열에 제한 없이 사용될 수 있다. 또한 도입된 상기 외래 폴리뉴클레오티드가 숙주세포 내에서 최적화된 전사, 번역이 이루어지도록 이의 코돈을 최적화하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 숙주 세포 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질이 생성되어 그 활성이 강화될 수 있다.

[0037] 상기 용어, 단백질 활성의 "강화"는, 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 증가되는 것을 의미한다. 상기 강화는 활성화(activation), 상향 조절(up-regulation), 과발현(overexpression), 증가(increase) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 여기서 활성화, 강화, 상향조절, 과발현, 증가는 본래 가지고 있지 않았던 활성을 나타내게 되는 것, 또는 내재적 활성 또는 변형 전 활성에 비하여 향상된 활성을 나타내게 되는 것을 모두 포함할 수 있다. 상기 "내재적 활성"은 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화하는 경우, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성을 의미한다. 이는 "변형 전 활성"과 혼용되어 사용될 수 있다. 단백질의 활성이 내재적 활성에 비하여 "강화", "상향조절", "과발현" 또는 "증가"한다는 것은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물이 본래 가지고 있던 특정 단백질의 활성 및/또는 농도(발현량)에 비하여 향상된 것을 의미한다.

[0038] 상기 강화는 외래의 단백질을 도입하거나, 내재적인 폴리펩티드의 활성 강화 및/또는 농도(발현량)를 통해 달성할 수 있다. 상기 단백질의 활성의 강화 여부는 해당 단백질의 활성 정도, 발현량 또는 해당 단백질로부터 배출되는 산물의 양의 증가로부터 확인할 수 있다.

[0039] 상기 단백질 활성의 강화는 당해 분야에 잘 알려진 다양한 방법의 적용이 가능하며, 목적 단백질의 활성을 변형 전 미생물보다 강화시킬 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 분자생물학의 일상적 방법인 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려진 유전자 공학 및/또는 단백질 공학을 이용한 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다(예컨대, Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes.Advances in Cell Biology. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 등).

[0040] 이와 같은 단백질 활성의 강화는, 상응하는 단백질의 활성 또는 농도 발현량이 야생형이나 변형 전 미생물 균주에서 발현된 단백질의 활성 또는 농도를 기준으로 하여 증가되거나, 해당 단백질로부터 생산되는 산물의 양의 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치

하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다.

[0042] 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 또한, 본 발명의 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본원의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0044] 본 발명의 벡터를 형질전환 시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO4) 침전, 염화칼슘(CaCl2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포좀법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 용어 "재조합 미생물"은, 인위적으로 유전적 변형이 일어난 미생물을 모두 포함하며, 외부 단백질이 발현되도록 외부 유전자가 삽입되거나 내재적 유전자의 활성이 강화되거나 약화되는 등의 원인으로 인해서 특정 기작이 약화되거나 강화된 미생물로서, 목적하는 단백질 또는 산물의 생산을 위하여 유전적 변형(modification)을 포함하는 미생물일 수 있다.

[0046] 예컨대, 본 발명의 재조합 미생물은 YbcF 단백질 또는 YbcF 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 중 어느 하나 이상을 통해 유전적으로 변형된 미생물; 상기 단백질, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 변형된 미생물; 상기 단백질, 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 재조합 미생물; 또는 상기 단백질 활성을 갖는 재조합 미생물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 또한, 본 발명의 재조합 미생물은, 알란토인 분해 경로 내 단백질 일부의 활성이 추가적으로 강화되어 카바메이트 생산능이 강화된 미생물일 수 있다.

[0048] 구체적으로, 본 발명의 재조합 미생물은 YbcF 단백질이 강화된 미생물일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 미생물은 ybcF 유전자가 과발현된 미생물일 수 있다. 상기 YbcF 단백질은 공지의 데이터 베이스인 NCBI의 GenBank에서 그 서열을 얻을 수 있으며, 이와 동일한 활성을 나타내는 것을 제한없이 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 목적상, 본 발명의 재조합 미생물은, 형질 변화 전 모균주 또는 비변형 미생물보다 카바메이트 키나제 활성이 강화되어 카바메이트 생산능이 향상된 미생물을 의미한다. 상기 '비변형 미생물'은 미생물에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 균주를 제외하는 것이 아니며, 천연형 미생물 자체이거나, 야생형 미생물 자체이거나, 또는 알란토인 분해 경로에 관여하는 유전자의 발현량이 조절되기 전의 미생물일 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 모균주는 야생형 대장균 K-12, 상기 대장균 K-12에서 YbcF가 강화된 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서는 YbcF 과발현 균주를 제작하였고, 이를 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하여 기탁번호 KCTC15520BP를 부여받았다. 이에, 상기 본 발명의 재조합 미생물은 기탁번호 KCTC15520BP로 기탁된 대장균일 수 있다.

[0053] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 미생물을 이용한 카바메이트 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0054] 구체적으로, 상기 미생물을 호기 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는 카바메이트 생산 방법을 제공한다.

[0055] 또한, 상기 미생물을 호기 조건하에서 배양한 이후, 상기 미생물로부터 카바메이트 키나제를 정제 등을 통해 수득함으로써, 카바메이트 키나제를 생산할 수 있다.

[0056] 상기 카바메이트 생산은 이화성 카바메이트 키나제 활성을 갖는 YbcF 단백질에 의해 카바모일 포스페이트에서

ADP로 포스페이트 그룹을 전달하여 ATP 및 카바메이트를 생산함으로서 완료되는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 배양 과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 회분식, 연속식 및 유가식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 상기 용어, "배지"는 상기 미생물을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 혼합한 물질을 의미하며, 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급한다.

[0059] 구체적으로, 본 발명의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한없이 어느 것이나 사용할 수 있으며, 본 발명의 미생물 내 YbcF 발현을 위한 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[0060] 상기 미생물은 대장균(*E. coli*)일 수 있으며, 보다 구체적으로 *E. coli* K-12 MG1655일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 상기 미생물은 YbcF가 과발현된 재조합 미생물을 의미할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0062] 본 발명에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 사카로오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소디움-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 그러나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 또한, 상기 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배지에 적절한 방식으로 첨가하여, 배지의 pH를 조정할수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배지의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 배지의 온도는 20℃내지 45℃, 구체적으로, 25℃내지 40℃일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 배양 기간은 유용 물질의 원하는 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 10 시간 내지 160 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0069] 본 발명에 따른 대장균 YbcF 단백질이 catabolic 카바메이트 키나제(CK) 활성을 가지고 있음을 검증하였으며, YbcF 과발현을 통해 CK 활성을 현저히 증가시킴을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 GC 함량에 따른 프로모터 영역 예측을 통한 *fdrA* 오페론을 검증한 것이다.

도 2는 대장균의 야생형(WT), *ybcF* 결실(Δ*ybcF*) 및 YbcF 과잉 생산(YbcF) 균주의 조세포 용해물을 사용한 YbcF의 CK 활성을 평가한 것이다.

도 3은 온도 및 pH에 따른 YbcF의 카바메이트 키나아제 활성을 나타낸 것이다.

도 4는 카바모일 포스파타제 및 ADP 농도에 따른 YbcF의 CK 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0074] **실험예 1. 세포배양**

[0075] 대장균 K-12 MG1655(*F-λ-ilvG-rfb-50 rph-1*) 및 LMB111(Δ*ybcF*)은 글리세롤(50 mM), 디메틸설폭사이드(DMSO, 50 mM) 및 알란토인(20 mM)을 포함하는 질소 결핍 M9 최소 배지(NDM9)상에서, 95% N_2 + 5% H_2 가스 혼합물의 혐기성 조건하, 48시간 동안 37℃에서 배양하였다.

[0076] 농축된 세포 현탁액을 생성하기 위해, 상기 배양 조건에서 성장한 대장균 세포를 5,000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 수득하였다. 이후, 상기 수득한 세포를 즉시 질소 결핍 3-(Nmorpholino) 프로판술폰산(MOPS) 완충액(염화암모늄 무첨가)에서 OD_{600}이 20이 되도록 재현탁하고, 95% N_2 + 5% H_2 가스 혼합물로 혐기적으로 변경하였다. 글리세롤(20 mM), DMSO(20 mM) 및 알란토인(20 mM)을 함유하는 동일 부피의 MOPS와 상기 세포를 혼합하여 알란토인 분해를 개시하고, 세포 현탁액을 37℃에서 배양하고 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 분석하였다.

[0078] **실험예 2. 오페론 검증-RT PCR**

[0079] RNAprotect 박테리아 시약 및 RNeasy 미니 키트를 사용하여 알란토인(20 mM), 글리세롤(50 mM) 및 DMSO(50 mM)에서 48시간 동안 혐기적으로 성장한 대장균 MG1655로부터 총 mRNA를 분리하였다. 이후, 상기 분리된 mRNA는 무작위 프라이머를 사용하여 ReverTra Ace qPCR RT 키트로 cDNA로 전사하였다. 상기 cDNA는 fdrA, ylbE, ylbF 및 ybcF 유전자에 다양한 조합으로 위치한 하기 표 1의 4개의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시켰다.

표 1

[0081]

Name	Primer	서열번호
fdrA-RT-F	5′ - ATG ATC CAC GCC TTT ATT AAA AAA GGG -3′	3
ylbE-RT-F	5′ - ATG TTT ACA TCA GTG GCG CAA G -3′	4
ylbF-RT-F	5′ - ATG ACG ATC ATC CAT CCT CTG -3′	5
ybcF-RT-F	5′ - ATG AAA ACA CTG GTT GTG GC -3′	6
fdrA-RT-R	5′ - TTA TTG CAA ACG TTC TAA TAA ACG AG -3′	7
ylbE-RT-R	5′ - TCA ACC AAT ACC CAT GCT TTC -3′	8
ylbF-RT-R	5′ - TCA TGG TTT TCC TTG TAA TAA TTG -3′	9
ybcF-RT-R	5′ - CTA CAG CGA AAT ACA GGT CC -3′	10

[0083] **실험예 3. *ybcF* 비활성화**

[0084] 대장균 K-12 MG1655(*F-λ-ilvG-rfb-50 rph-1*) 게놈의 *ybcF* 유전자는 문헌 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA.2000;97:6640-6645]의 방법을 사용하여 결실시켰다.

[0085] 구체적으로, ybcF 비활성화를 위해 pKD3로부터 catR 클로람페니콜 내성 유전자의 PCR 산물을 사용하였고, FRT 서열 옆에 위치시켰으며, 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0087]

Name	Primer	서열번호
fdrA_H1P1	5′ - CGC TGC TGG GGT TCT GGC TTG GCC AAC AAT TAT TAC AAG GAA AAC CAT GAG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C -3′	11
fdrA_H2P2	5′ - GAT AAG ACG CGT CAA GCG TCG CAT CAG GCA CAA ATG TCT AAT GCC TAC GAC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G -3′	12

[0089] 이때, 상기 프라이머는 각각 FRT에 인접한 영역의 일부와 증폭된 ybcF의 5′ 및 3′ 영역을 포함하며, ybcF가 catR로 대체된 균주를 LMB111로 지정하였다.

[0091] **실험예 4. 발효 생성물 분석**

[0092] 배양 상등액은 펌프(L-2130), 컬럼 오븐(L-2350), 오토샘플러(L-2200) 및 Aminex HPX-87H 이온 배제 컬럼(300 X 7.8mm)가 장착된 장착된 Hitachi LaChrom Elite HPLC 시스템을 사용하여 분석하였다.

[0093] 구체적으로, 이동상은 4 mM H_2SO_4을 사용하고, 0.55 ml/분의 일정한 유속으로 공급하였으며, 샘플은 10 μl 주입 후 25분 동안 실행하였다. 컬럼 온도는 알란토인과 옥사메이트의 경우 18℃, 옥살레이트와 기타 유기산의 경우 27℃로 조정하였으며, 정량 측정은 L-2490 굴절률 검출기를 사용하여 수행하였다.

[0095] **실험예 5. YbcF 발현 및 정제**

[0096] N-말단에 6개의 히스티딘을 포함하는 *ybcF* 과발현 플라스미드 pCA24N::ybcF((JW0510-AM,NBRP, NIG, Japan))를 MG1655로 형질전환시키고, 37℃에서 OD_{600}이 약 0.3이 되도록 LB 배지에서 호기적으로 성장시킨 후, 30℃에서 2 시간 동안 0.5 mM IPTG를 첨가하여 유도하였다. 그런 다음, 6X His-tagged 단백질 정제를 위해 세포 펠릿을 용해 완충액(20 mM Tris-Cl pH 8.3, 0.5% triton X-100, 1 mg/ml lysozyme)에 현탁하고, 산으로 세척된 유리 비즈와 같이 볼텍싱 및 5분간 아이싱을 6회 반복하여 세포 파괴시켰다. 세포 파괴물은 원심분리(13,000 xg, 4℃, 20분)로 제거하고, 상등액 세포 용해물을 수집하였다.

[0097] YbcF의 정제는 제조업체의 지시에 따라 Ni-NTA 스핀 컬럼을 사용한 친화성 크로마토그래피를 통해 수행하였다.

[0098] 또한, 단백질 농도는 Protein Assay Dye를 사용하여 Bradford 방법으로 측정하고, 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 표준 곡선을 작성하였다.

[0100] **실험예 6. 웨스턴 블랏팅**

[0101] 용출 분획은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

[0102] 구체적으로, 샘플은 12% 런닝 젤을 사용하여 SDS-PAGE에 적용하고, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell의 Amersham Hybond P 웨스턴 블랏팅 멤브레인 상에서 전기영동 트랜스퍼를 수행하였다. 블랏팅(15 V, 1시간 20분) 후, 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 차단하고, 상기 멤브레인을 1:2000으로 희석된 6X His-tag 단클론 일차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 양고추냉이 과산화효소-결합된 염소 항-마우스 2차 항체를 1:100000으로 희석하고, 실온에서 1시간 동안 멤브레인과 함께 인큐베이션하였다.

[0103] 과산화효소 활성 검출은 Dyne ECL Pico Plus를 사용하고, 현상에는 ImageQuant800을 사용하였다.

[0105] **실험예 7. 카바메이트 키나제 분석 방법**

[0106] 카바메이트 키나제 활성 분석은 ADP와 CP(carbamoyl phosphate di-lithium salt)의 전환시 ATP 생성으로 측정하였다.

[0107] 이를 위해 20 mM Tris-Cl(pH 6.0, 7.0 또는 8.0), 30 mM $MgCl_2$ 및 0.02% BSA를 포함하는 반응 혼합물에 2 mM ADP, 2 mM CP 및 100 nM YbcF(또는 용해물)를 첨가하고, 28℃ 또는 37℃에서 60분 동안 배양하였다.

[0108] 농도 의존 동역학을 결정하기 위해, ADP를 2 mM로 고정한 상태에서 CP의 농도를 0 mM에서 3 mM로 변화시키면서 100 nM YbcF를 사용하여 CK 활성을 측정하였으며, 그 반대의 경우도 동일하게 실시하였다. 28℃에서 60분 후, ATP 측정 키트를 사용하여 반응 혼합물 내 ATP 농도를 측정하였으며, ATP 표준(10 μl) 또는 카바메이트 키나제 분석 샘플(10 μl)을 표준 반응 용액(90 μl, 0.5 mM D-루시페린, 1.25 μg/ml 반딧불이 루시퍼라제, 25 mM 트리신 완충액, pH 7.8, 5 mM $MgSO_4$, 100 μM 에틸렌디아민테트라아세트산, 1 mM 디티오트레이톨)을 첨가한 후, 28℃에서 15분 동안 배양하였다. 배양 후, ATP의 양은 560 nm에서 Spectramax i3 생물발광 판독기로 분석하였다.

[0109] 또한, ADP 및 CP의 KM 및 Vmax는 각각 Michaelis-Menten 방정식 및 Lineweaver-Burk 방정식을 사용하여 계산하였다.

[0111] **실험예 8. 통계방법**

[0112] 통계 분석은 PASW Statistics 18(SPSS, Inc.)을 사용하여 수행하였다. 데이터는 unpaired two-tailed Student's t-test 및 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 분석하였다. Post hoc 분석은 Duncan의 다중 비교 테스트를 사용하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의하였다.

[0114] **실시예 1. *frdA* 오페론 내 *ybcF* 유전자 확인**

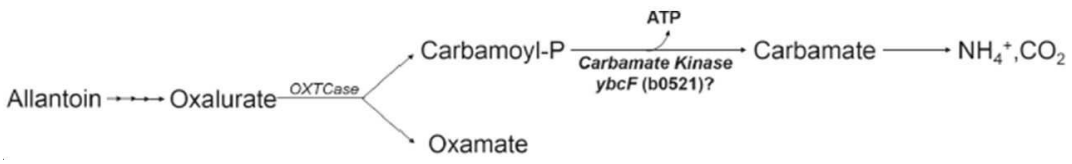
[0115] 낮은 G+C 함량은 이중 가닥 DNA의 가닥 사이에 상대적으로 낮은 스태킹 에너지를 제공하여 전사 시작 시 열 수 있게 한다. 이에, 대장균 게놈 내 *ybcF* 주변의 유전자 클러스터에 대한 가능한 프로모터 영역을 G+C 함량 백분율을 계산하여 조사하였다(https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/).

[0116] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 예상한 프로모터 영역인 fdrA 유전자 앞의 400bps 길이의 낮은 G+C 콘텐츠 영역 ca를 발견하였고, ybcF 앞의 영역은 G+C 함량이 약간 낮지만 매우 짧음을 확인하였다(도 1a). 이는 iPro54-PseKNC 및 iPro70-FMWin 두 바이오인포매틱스 도구를 사용한 G+C 함량 예측과 일치하였다.

[0117] 또한, 총 mRNA는 알란토인에서 혐기성으로 성장한 대장균의 야생형 균주로부터 분리하고, *fdrA*, *ylbE*, *ylbF* 및 *ybcF* 유전자에 결합하는 프라이머 쌍의 생각할 수 있는 모든 조합으로 증폭된 cDNA로 역전사됨을 확인하였다(도 1b). 상기 결과는, 4개의 유전자 *fdrA*, *ylbE*, *ylbF* 및 *ybcF* 각각 알란토인 분해 조건하에서 충분하고 동등하게 발현하고 있음을 나타낸 것이다(레인 1~4). 또한, 레인 5~10은 총 mRNA가 2개 유전자 전사체(*fdrA-ylbE*, *ylbE-ylbF*, *ylbF-ybcF*), 3개 유전자 전사체(*fdrA-ylbE-ylbF*, *ylbE-ylbF-ybcF*) 및 4개의 유전자 전사체(*fdrA-ylbE-ylbF-ybcF*)를 포함하여 이러한 인접 유전자 전사체의 가능한 모든 조합을 포함하고 있음을 보여주는 것이며, 이는 *ybcF* 유전자가 *fdrA* 오페론에 속함을 나타낸다.

[0119] **실시예 2. 알란토인 분해에 대한 *ybcF* 유전자 결실의 영향**

[0120] *ybcF*는 *fdrA* 오페론의 일부이기 때문에 이의 발현은 *fdrA* 상류에 위치한 공통 프로모터에 의해 제어되며, 따라서, 하기에 나타난 바와 같이, *ybcF*(및 *fdrA*)는 알란토인의 혐기성 분해에서 역할을 할 것으로 예상하고, 이를 확인하였다.

[0121] 

[0122] 구체적으로, 먼저, 질소 결핍 M9 배지 중의 글리세롤(50 mM), DMSO(50 mM) 및 알란토인(20 mM)상에서 대장균의 야생형 및 ΔybcF(LMB111) 균주를 48시간 동안 혐기 성장시켰다.

[0123] 그 결과 하기 표 3에 나타난 바와 같이, *ybcF* 결실로 인한 알란토인 분해의 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

표 3

		WT	*ΔybcF*
Consumption (mM)	Glycerol	21.6 ± 1.1[a, b]	19.4 ± 1.3
	Allantoin	21.0 ± 0.8	21.0 ± 0.9
Production (mM)	Oxamate	15.4 ± 2.5	13.1 ± 0.8
	Oxalate	3.8 ± 0.6	4.4 ± 0.1
	Succinate	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.6
	Formate	23.7 ± 2.5	21.3 ± 1.2
	Acetate	12.2 ± 1.6	12.3 ± 0.1
	Ethanol	13.2 ± 0.5	14.0 ± 0.9
Growth	OD_{600}	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0
	pH	6.6 ± 0	6.7 ± 0.1

[0125]

[0127] 다음으로, 농축된 세포 현탁액을 사용하여 ΔybcF 균주에 의한 알란토인 분해를 관찰하였다.

[0128] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 상기 표 3의 성장 배양에서의 결과와 유사하게 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

표 4

	WT			*ΔybcF*		
Time (min)	Allantoin	Oxamate	Oxalate	Allantoin	Oxamate	Oxalate
0	13.4 ± 0.9[a, b]	0	0	13.7 ± 1.0	0	0
10	8.9 ± 0.9	7.1 ± 0.9	0.8 ± 0.1	8.9 ± 1.3	5.8 ± 0.9	1.2 ± 0.1
20	4.2 ± 0.9	14.2 ± 1.4	1.2 ± 0.5	4.2 ± 1.5	12.6 ± 1.4	2.0 ± 0.3
30	0.3 ± 0.5	20.6 ± 2.6	1.6 ± 0.5	0.4 ± 0.6	19.0 ± 4.4	2.5 ± 0.5
60	0	21.3 ± 4.2	1.6 ± 0.6	0	19.8 ± 5.6	2.6 ± 0.5
Rate for consumption or formation at 20 min (mmol/gCDW/h)	10.5 ± 0.4	16.0 ± 0.8	1.3 ± 0.6	10.9 ± 0.6	14.5 ± 2.0	2.3 ± 0.3

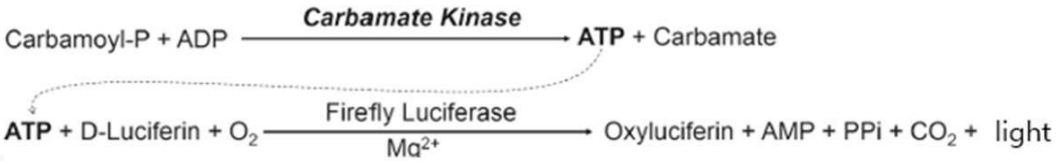
[0130]

[0132] 이는, 알란토인이 옥살루레이트로 분해된 다음 동등한 양의 옥사메이트와 CP로 분해되고, CP는 매우 불안정한 물질이지만 옥사메이트는 막다른 대사 산물인 바, 옥사메이트를 정량화하여 동일한 양의 CP가 생성된 것으로 추정하였다.

[0134] **실시예 3. 대장균 YbcF의 catabolic carbamate kinase 활성 확인**

[0135] 상기 실시예 2의 결과는 시험된 질소 결핍 성장 조건 하에서 아르기닌 및 피리미딘 생합성을 위한 CP의 빠른 소비 때문에 Δ*ybcF* 균주에서 알란토인 경로가 중단되지 않았을 수 있다는 가정하에, 효소 YbcF를 확인하기 위해 하기와 같이 직접 carbamate kinase 분석을 수행하였다.

[0136] 구체적으로, 하기에 나타난 바와 같이 생성된 ATP를 정량화하고, 재조합 반딧불이 루시퍼라제 및 기질 D-루시페린에 결합하여 CK 활성을 측정하였다.

[0137] 

[0138] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 야생형과 Δ*ybcF* 균주 사이의 CK 활성의 차이가 없었으며, 과잉 생산된 YbcF를 함유하는 세포 용해물은 상기 야생형 및 Δ*ybcF* 균주(약 16 μmole/min/g 총 단백질)보다 높은 CK 활성(38 μmole/min/g 총 단백질)을 보였다.

[0139] 상기 결과는, YbcF 과발현 균주의 조세포 용해물을 사용하여 YbcF가 CK 활성을 가짐을 확인한 것이다.

[0140] 본 발명자들은 상기 YbcF를 코딩하는 *ybcF* 유전자를 *allK* 유전자로 재명명하였고, 그에 따라 상기 YbcF 과발현 균주를 *Escherichia coli* AllK로 명명하였으며, 이를 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에 기탁하여 기탁번호 KCTC15520BP를 부여받았다.

[0142] **실시예 4. YbcF의 CK 효소 분석을 위한 조건 검색**

[0143] CK 효소 분석을 위한 최적의 온도 및 pH 값을 결정하기 위해 정제된 YbcF를 이용하였으며, YbcF 과잉 생산 및 정제는 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏팅을 통해 확인하였다.

[0144] 구체적으로, ATP 정량화에 권장되는 28℃ 및 CK 반응에 대한 최적 온도인 37℃에서 테스트한 결과, CK 활성이 37℃(0.61 μmol/min/mg YbcF)보다 28℃(1.29 μmole/min/mg YbcF)에서 2배 더 높았기 때문에 이후 실험은 28℃에서 실시하였다(도 3a). 또한, pH의 경우, pH 6, 7, 8에서 유의한 차이가 없었는 바, pH 8(1.37 μmole/min/mg YbcF)을 선택하였다(도 3b).

[0146] **실시예 5. YbcF의 CK kinetics**

[0147] CK kinetics는 상기 실시예 4에서 확인한 YbcF의 28℃, pH 8 조건에서 60분 동안 U/mg YbcF 단백질로 생성된 ATP의 양을 계산하였다. CK는 알란토인 분해를 위해 순방향으로 CP와 ADP의 두 기질을 가지고 있기 때문에, 상기 두 기질의 농도에 따른 CK 활성도를 측정하였다.

[0148] 구체적으로, ADP를 2 mM로 고정한 상태에서 CP 농도를 0-3 mM로 변경하면서 활성을 측정하였고, 또는, 반대로 CP를 2 mM로 고정한 상태에서 ADP 농도를 0-3 mM로 변경하면서 활성을 측정하였다.

[0149] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CP를 변화시켰을 때 Vmax_CP는 1.82 μmol/min/mg YbcF, KM_CP는 0.47 mM를 나타내었고, 또한, ADP를 변화시켰을 때의 Vmax_ADP는 1.94 μmol/min/mg YbcF, KM_ADP는 0.43 mM로 유사한 값을 보였다.

[0151] 상기 결과는, 대장균의 YbcF가 알란토인 분해를 위한 두 기질인 CP와 ADP에 대한 KM값이 각각 0.47 mM 및 0.43 mM의 유사한 친화성을 가짐으로써 catabolic CK를 수행하기 용이한 것으로 해석될 수 있다.

[0153] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0155]

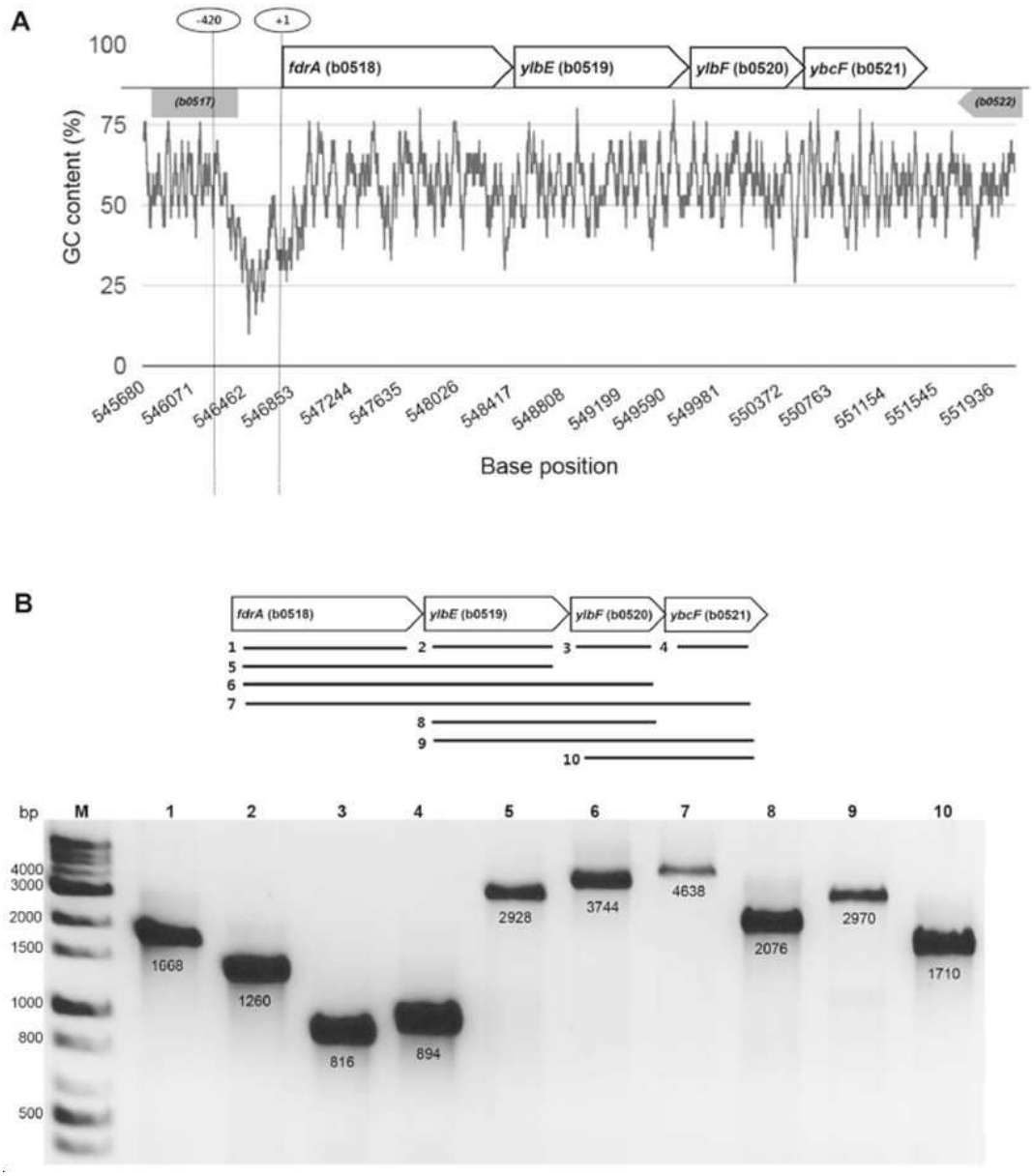
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15520BP

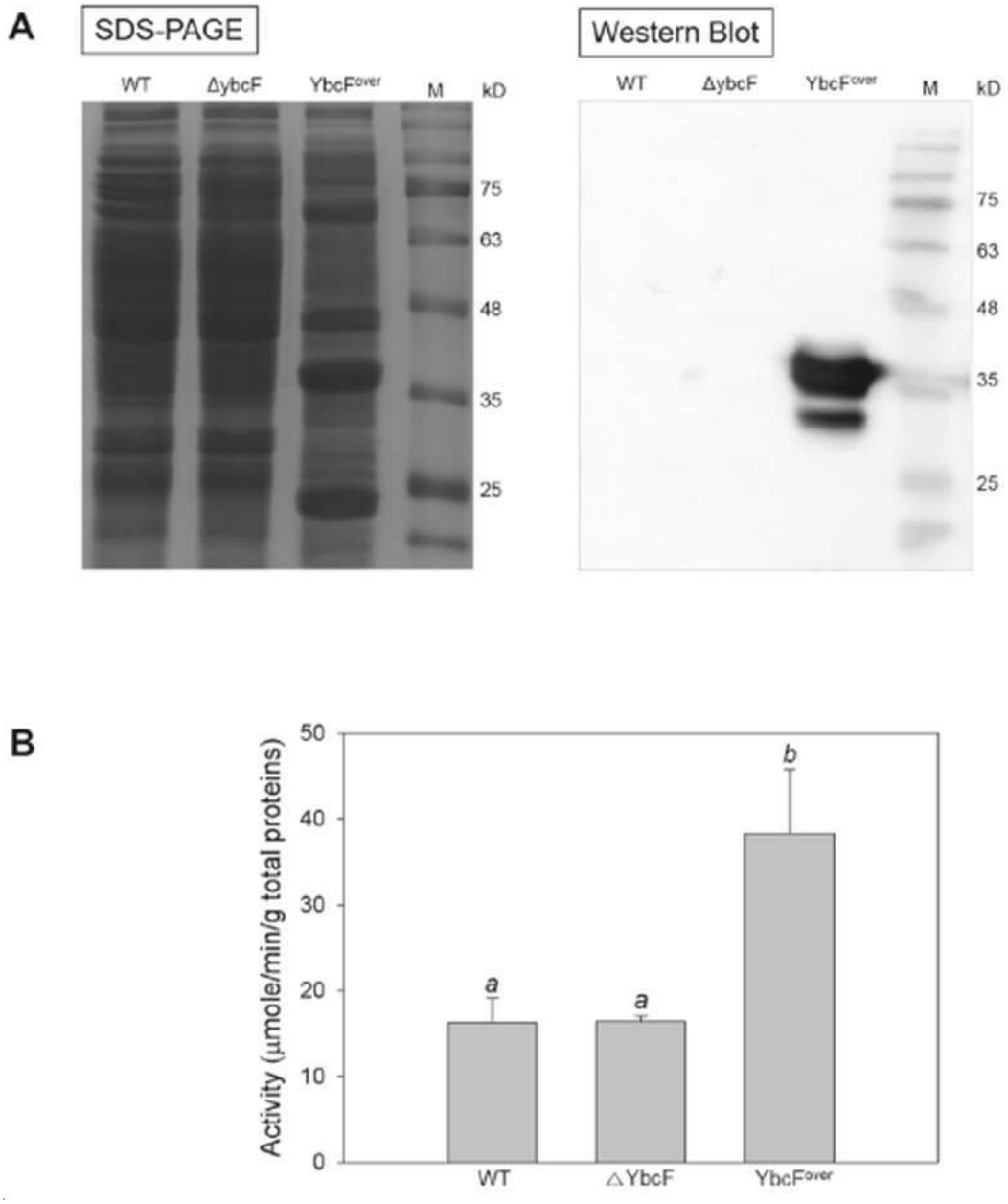
수탁일자 : 20230725

도면

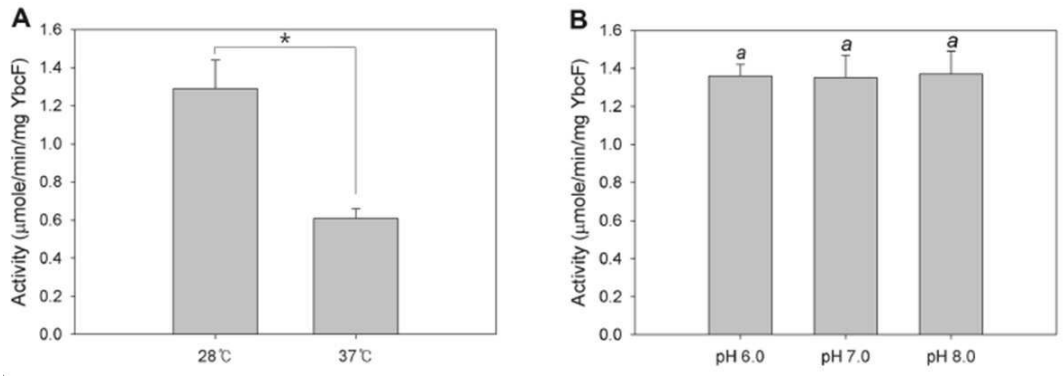
도면1



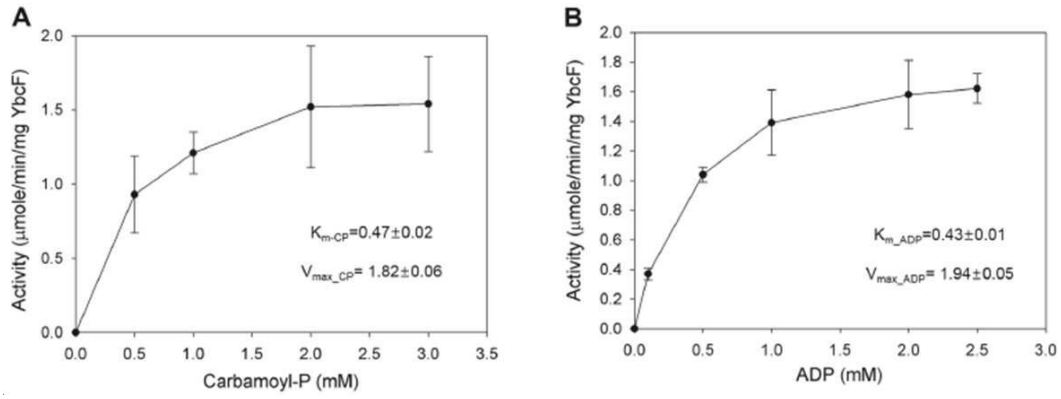
도면2


A
SDS-PAGE
WT
ΔybcF
YbcF^over
M
kD
75
63
48
35
25
Western Blot
WT
ΔybcF
YbcF^over
M
kD
75
63
48
35
25
B
Activity (μmole/min/g total proteins)
50
40
30
20
10
0
a
a
b
WT
△YbcF
YbcF^over

도면3


A
Activity (μmole/min/mg YbcF)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
28℃
37℃
B
Activity (μmole/min/mg YbcF)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
a
a
pH 6.0
pH 7.0
pH 8.0

도면4


A
Activity (μmole/min/mg YbcF)
Carbamoyl-P (mM)
$K_{m\text{-}CP}$=0.47±0.02
V_{max_CP}= 1.82±0.06
B
Activity (μmole/min/mg YbcF)
ADP (mM)
K_{m_ADP}=0.43±0.01
V_{max_ADP}= 1.94±0.05

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.