

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0040088 (43) 공개일자 2016년04월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 19/00</i> (2006.01) <i>C07K 14/195</i> (2006.01) <i>C07K 14/33</i> (2006.01) <i>C12N 11/16</i> (2006.01) <i>C12N 9/02</i> (2006.01) <i>C12N 9/42</i> (2006.01) <i>C12P 7/00</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>C07K 19/00</i> (2013.01) <i>C07K 14/195</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0130459 (22) 출원일자 2015년09월15일 심사청구일자 2015년09월15일 (30) 우선권주장 1020140133323 2014년10월02일 대한민국(KR)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 한성욱 서울특별시 성북구 길음로 119, 209동 1503호 (길음동, 길음뉴타운(대우푸르지오아파트)) 현정은 서울특별시 성북구 인촌로13길 18-21, 1층 (안암동2가) 강대회 경기도 광주시 초월읍 지월로55번길 24, 103동 1203호 (광주초월금강아미움아파트) (74) 대리인 이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 20 항

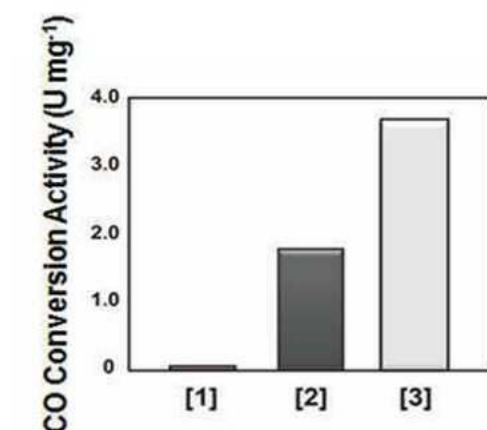
(54) 발명의 명칭 **일산화탄소 결합 단백질과 일산화탄소 디하이드로제네이즈를 함유하는 일산화탄소 전환효소 복합체 및 이를 이용한 일산화탄소의 전환방법**

(57) 요약

본 발명은 일산화탄소를 이산화탄소로 전환하기 위한 효소 복합체에 관한 것으로 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS), 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA) 및 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)를 포함하는 효소복합체와 상기 효소복합체의 생산방법 및 상기 효소복합체를 이용한 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른, 일산화탄소 전환효소 복합체는 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 우수한 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 복합체의 형성으로 안정성을 확보할 수 있으므로 공장 등에서 대량으로 발생하는 일산화탄소 제거공정에 유용하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C07K 14/33 (2013.01)
C12N 11/16 (2013.01)
C12N 9/0008 (2013.01)
C12N 9/244 (2013.01)
C12P 7/00 (2013.01)
C12Y 102/99002 (2013.01)
C12Y 302/01006 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013060623
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(원천)글로벌프론티어사업
연구과제명	미세조류 유래 혼합당 전환공정 및 β -lactam 중간체/아미노산 전구체 생산 시스템 구축
기 여 율	1/1
주관기관	부산대학교
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 코히즌 모듈에 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)이 결합되어 있는 효소복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA)을 코딩하는 유전자는 로도스피릴럼 속 균주 유래이고, 상기 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 코딩하는 유전자는 아세토박테리움 속 균주 유래이며, 상기 도커린 모듈은 클로스트리디움 속 균주 유래이고, 상기 소형셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)는 클로스트리디움 속 균주 유래인 것을 특징으로 하는 효소 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 도커린은 엔도-베타-1,4-클루칸아제-비 유전자의 도커린인 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA)은 CooA Doc 유전자가 도입된 재조합 대장균으로부터 생산된 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)은 CooS Doc 유전자가 도입된 재조합 대장균으로부터 생산된 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)는 두 개의 코히즌 모듈을 가진 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)은 서열번호 1에 기재된 염기서열에 의해 코딩되는 단백질인 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA)은 서열번호 2에 기재된 염기서열에 의해 코딩되는 단백질인 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)는 서열 번호 3에 기재된 염기서열에 의해 코딩되는 단백질인 것을 특징으로 하는 효소복합체.

청구항 10

소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 Ca 이온 함유 용액에서 혼합하여 4~5℃에서 1시간 이상 방치하는 것을 특징으로 하는 제1항의 효소복합체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA)은 CooA Doc 유전자가 도입된 재조합 대장균으로부터 생산된 것을 특징으로 하는 효소복합체의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)은 CooS Doc 유전자가 도입된 재조합 대장균으로부터 생산된 것을 특징으로 하는 효소복합체의 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)은 서열번호 1에 기재된 염기서열에 의해 코딩되는 단백질인 것을 특징으로 하는 효소복합체의 제조방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA)은 서열번호 2에 기재된 염기서열에 의해 코딩되는 단백질인 것을 특징으로 하는 효소복합체의 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)는 서열번호 3에 기재된 염기서열에 의해 코딩되는 단백질인 것을 특징으로 하는 효소복합체의 제조방법.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 효소복합체를 이용한 것을 특징으로 하는 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 방법.

청구항 17

세포 표면 고정화 모듈과 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 융합단백질이 세포표면에 고정되어 있는 세포에 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 효소복합체를 결합시키는 단계를 포함하는 효소복합체의 세포표면 고정

화 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 세포 표면 고정화 모듈은 서열번호 14의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 융합단백질은 녹색형광 단백질이 추가로 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 융합단백질이 세포표면에 고정되어 있는 세포는 세포 표면 고정화 모듈을 코딩하는 유전자와 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)가 융합된 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일산화탄소를 이산화탄소로 전환하기 위한 효소 복합체에 관한 것으로 더욱 자세하게는 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS), 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)를 포함하는 효소복합체와 상기 효소복합체의 생산방법 및 상기 효소복합체를 이용한 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일산화탄소는 제철소 등 산업현장에서 대량으로 발생하고 있으며 이는 지구 온난화를 유발하는 기체이자 두통, 의식불명을 일으키는 등 인체에 유해한 기체로서 그 농도가 해마다 증가하고 있으며 특히 중국 일대에서 많은 양이 배출되고 있어 일산화탄소의 전환이 환경적인 관점에서 많은 관심을 모으고 있다.

[0004] 최근 유용 효소 복합체 연구 분야에서 기체를 기질로 하는 효소에 관한 연구가 많이 진행되어 오고 있다. 대한민국 등록특허 10-0315563의 경우 높은 성장 속도 및 수소전환속도를 가지는 시이트로박터 속 Y19를 이용한 일산화탄소를 수소로 전환시키는 방법을 제시하고 있으나, 혐기성 미생물 조건에서 일산화탄소를 전환시키고 있어 실용적인 접근에 어려움이 있으며, 기체를 기질로 하는 효소의 경우 대부분 이산화탄소 전환에 집중되어 있어 일산화탄소의 전환에 대한 연구는 부족한 부분이 있다.

[0005] 또한, 대한민국 등록특허 10-1102458의 경우 셀룰로좀 기본골격 소단위로 소형 셀룰로오즈 결합 단백질 에이(miniCbpA)유전자를 사용하는 것은 제시하고 있으나, 일산화탄소의 전환에 접목시키지 않고 있다. 대한민국 등록특허 10-0315662는 로도슈도모나스 팔루스트 P4를 이용해 일산화탄소를 수소로 전환하는 개별적인 일산화탄소 전환효소에 대한 연구에 집중이 되어 있고 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키기 위한 효소 복합체에 대한 연구는 없었다. 개별 일산화탄소 전환 효소는 일산화탄소 결합 단백질과 복합체를 이룰때와 대비하여 일산화탄소에 대한 친화도가 낮아 전환효율이 낮은 문제가 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 일산화탄소 전환효율이 뛰어난 효소복합체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 일산화탄소 결합 헵 단백질과 일산화탄소 디하이드로제네이즈가 복합체를 이루는 경우 높은 효율로 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시킬 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 일산화탄소를 높은 효율로 이산화탄소로 전환시킬 수 있는 효소복합체 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 효소복합체를 이용하여 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 코히즌 모듈에 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)이 결합되어 있는 효소복합체를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 Ca²⁺ 이온 함유 용액에서 혼합하여 4~5℃에서 1시간 이상 방치하는 것을 특징으로 하는 효소복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 효소복합체를 이용한 것을 특징으로 하는 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 세포 표면 고정화 모듈과 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 융합단백질이 세포표면에 고정되어 있는 세포에 상기 효소복합체를 결합시키는 단계를 포함하는 효소복합체의 세포표면 고정화 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른, 일산화탄소 전환효소 복합체는 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 우수한 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 복합체의 형성으로 안정성을 확보할 수 있으므로 공장 등에서 대량으로 발생하는 일산화탄소 제거공정에 유용하다. 또한 이로 인해 전환되는 이산화탄소는 기존에 발명된 이산화탄소 전환 기술들과 연계하여 사용될 수 있어 산업적으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명에서 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헵 단백질 유전자와 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자의 설계를 통해 본 발명에서 제시된 키메릭 일산화탄소 결합 헵 단백질 CooA Doc 유전자와 키메릭 일산화탄소 디하이드로제네이즈 CooS Doc 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22(+)-CooA Doc(도 1A)와 pET22b(+)-CooS Doc(도 1B)의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명에서 제시된 재조합 벡터 pET22(+)-CooA Doc와 pET22b(+)-CooS Doc가 삽입된 대장균의 발현 단백질의 Western blot 분석 기법을 발현을 확인한 그림이다.
- 도 3은 도커린 모듈이 연결된 키메릭-락케이즈의 복합체 형성을 확인하기 위하여, 소형 셀룰로즈-결합 단백질이 가진 셀룰로즈-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제 후 전기영동하여 58kDa의 단백질 밴드를 확인한 그림이다.
- 도 4는 본 발명에서 제시된 일산화탄소 전환효소 복합체의 활성을 확인하기 위하여 일산화탄소를 기질로 사용하여 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헵 단백질과 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질을 어셈블리시킨 복합체의 활성 분석을 실행하여 효소 활성의 증대를 증명한 그림이다. 가로축의 [1]은 miniCbpA only, [2]는 chimeric CooS Doc only, [3]은 CO Conversion complex를 의미한다.
- 도 5의 A는 세포표면 고정화모듈과 녹색형광단백질의 융합유전자가 삽입된 재조합 벡터 모식도를 나타낸 것이고, B는 세포표면 고정화모듈과 골격 단백질의 융합유전자가 삽입된 재조합 벡터 모식도를 나타낸 것이며,

C는 세포표면 고정화 모듈에 의하여 세포표면에 고정된 녹색형광단백질을 확인할 수 있는 형광현미경 사진이다.

도 6은 세포표면에 고정된 일산화탄소 전환효소 복합체의 일산화탄소 전환효율을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] 본 발명은 종래의 개별적인 일산화탄소 전환효소는 전환효율이 낮다는 것을 인지하고 높은 효율로 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키기 위한 효소복합체를 제조하였다. 본 발명에 따른 효소복합체의 기본적인 구조는 하나의 Cellulose binding module(CBM)을 가지고 있는 기본 골격 소단위체(Primary scaffolding subunit)가 주축이 되어 Catalytic module을 가진 효소 소단위체들이 합쳐져서 이루어진다. 이 구조를 이루기 위해 기본 골격 소단위체에 있는 Cohesin module이 강력하게 각각의 효소 소단위체에 있는 도커린 모듈과 상호작용 하여 결합하게 된다.
- [0022] 본 발명에서는, 기본 골격 소단위체(Primary scaffolding subunit)로 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)를 이용하였고 효소 소단위체로 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA) 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 이용하였다.
- [0023] 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)와 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA) 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 결합하여 효소복합체를 형성하기 위해 오버랩 PCR을 이용하여 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA)을 코딩하는 키메라 유전자 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)를 코딩하는 키메라 유전자를 제조하였다. 또한, 상기 키메라 유전자를 벡터에 도입후 재조합 대장균을 제조하였으며 이를 이용해 상기의 각 단백질을 발현시켰다. 이후, 저온에서 복합체 형성을 유도한 결과 도커린 모듈이 결합된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)의 도커린과 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 코히즌 모듈(Cohesin module)이 결합하여 효소 복합체를 형성하는 것을 확인하였다.
- [0024] 따라서, 일 관점에서 본 발명은, 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 코히즌 모듈에 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)이 결합되어 있는 효소복합체에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA)을 코딩하는 유전자는 로도스피릴럼 속 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨데, *Desulfitobacterium hanfniense*, *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, *Azotobacter vinelandii*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris* 의 유래인 것을 사용할 수도 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 코딩하는 유전자는 아세트박테리움 속 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨데, *Moorella thermoacetica*, *Rhodospirillum rubrum*, *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, *Methanococcus vanniellii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Clostridium pasteurianum*, *Oligotropho carboxidovorans*, *Aeropyrum pernix*, *Ferroglobus placidus* 의 유래인 것을 사용할 수도 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 도커린 모듈은 클로스트리디움 속 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨데, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosovens*, *butyribrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefacien* 의 유래인 것을 사용할 수도 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 소형셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)는 클로스트리디움 속 균주 유래인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨데, *Acetivibrio cellulolyticus* ScaA, *Ruminococcus flavefaciens* ScaA 의 유래인 것을 사용할 수도 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, CooA Doc란 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헴 단백질(CooA)을 코딩하는 키메라 유전자를 의미하고 CooS Doc란 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)를 코딩하는 키메라 유전자를 의미한다.

- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA)은 CooA Doc 유전자가 도입된 재조합 대장균으로부터 생산된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)은 CooS Doc 유전자가 도입된 재조합 대장균으로부터 생산된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)는 2개의 코히즌 모듈을 가진 것을 특징으로 할 수 있으나, Coh1~Coh9의 모든 코히즌 모듈을 가질 수도 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 서열번호 1은 CooS Doc의 염기서열이고, 서열번호 2는 CooA Doc의 염기서열이며, 서열번호 3은 소형셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 염기서열이고, 서열번호 4~13은 각 합성에 사용한 primer의 염기서열을 나타낸다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS) 유전자는 서열번호 1에 기재된 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 1에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명에 포함된다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 유전자는 서열번호 2에 기재된 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 2에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명에 포함된다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 코히즌 모듈(Cohesin module)을 포함하는 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA) 유전자는 서열번호 3에 기재된 것이 바람직하나, 유전자 코드의 디제너러시를 고려하여 상기 서열번호 3에 기재된 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자도 본 발명에 포함된다.
- [0037] 본 발명의 다른 실시예에서는, 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA)과 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)과 소형 셀룰로즈-결합단백질(mCbpA)의 결합으로 인한 복합체 형성을 확인하기 위해 상기 단백질을 저온에서 일정 비율로 섞어 배양하였고 효소복합체의 형성을 확인하였다.
- [0038] 따라서, 본 발명은 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 Ca이온 함유용액에서 혼합하여 4~5℃에서 1시간 이상 방치하는 것을 특징으로 하는 상기의 효소복합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명에 있어서, Ca이온 함유용액으로 CaCl₂ 용액을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)은 1:1:1 몰비로 혼합하는 것이 바람직하나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 다른 실시예에서는 효소복합체 활성을 확인하기 위해 일산화탄소를 기질로 하는 활성 분석을 수행한 결과, 일산화탄소 전환효소 복합체가 형성된 경우 단일 전환효소보다 높은 활성이 측정되었다(도 4).
- [0041] 따라서, 본 발명은 상기의 효소복합체를 이용한 것을 특징으로 하는 일산화탄소를 이산화탄소로 전환시키는 방법에 관한 것이다.
- [0042] 또 다른 관점에서, 본 발명은 세포 표면 고정화 모듈과 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)의 융합단백질이 세포표면에 고정되어 있는 세포에 상기 효소복합체를 결합시키는 단계를 포함하는 효소복합체의 세포표면 고정화 방법에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 세포 표면 고정화 모듈은 서열번호 14의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 융합단백질은 녹색형광 단백질이 추가로 융합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 융합단백질이 세포표면에 고정된 세포는 세포 표면 고정화 모듈을 코딩하는 유전자와 소형 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA)가 융합된 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0048] **실시예 1: 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자, 일산화탄소 결합 유전자, 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자의 증폭**
- [0049] 일산화탄소 전환효소 복합체 형성을 위한 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자를 클로닝하기 위하여 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여(Foong F, Hamamoto T, Shoseyov O, Doi RH. J Gen Microbiol. 1991 137:1729-36; Park JS, Matano Y, Doi RH. J Bacteriol. 2001 183:5431-5.) 정방향 프라이머(Forward primer: 서열번호4)의 5'에는 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헴 단백질 CooA 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열(cgacgacgat)이, 역방향프라이머(Reverse primer: 서열번호5)의 5'에는 제한효소 NotI 인식서열(gcggccgc)이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다.
- [0051] [서열번호 4] 5'-cgacgacgatGGATCCGCTGGCTCC-3'
- [0052] [서열번호 5] 5'-ATATgcggccgcTAAAGCATTTTTTAAGAACAGCTAAA-3'
- [0054] 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 195bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0055] 또한 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이로부터 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer: 서열번호 6)의 5'에는 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열(attaacatc)이, 역방향프라이머(Reverse primer: 서열번호 7)의 5'에는 제한효소 NotI 인식서열(gcggccgc)이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다.
- [0057] [서열번호 6] 5'-attaacatcGGATCCGCTG-3'
- [0058] [서열번호 7] 5'-ATATgcggccgcTAAAGCATTTTTTAAGAACAGCTAAA-3'
- [0060] 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 195bp의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0061] 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헴 단백질 CooA 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer: 서열번호 8)의 5'에는 제한효소 SacI 인식서열(gagctc), 역방향 프라이머(Reverse primer: 서열번호 9)의 5'에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열(cagcgatcc)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다.
- [0063] [서열번호 8] 5'-ATATgagctccATGCCGCTCGTTTCA-3'
- [0064] [서열번호 9] 5'-cagcgatccATCGTCGTCGTCGTC-3'
- [0066] 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 666bp의 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헴 단백질 CooA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

- [0067] 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자 CooS 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer: 서열번호10)의 5'에는 제한효소 SacI 인식서열(gagctc), 역방향프라이머(Rreverse primer: 서열번호 11)의 5'에는 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 부분의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열(cagcgatcc)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다.
- [0069] [서열번호 10] 5'-GCGCgagctccATGAATTCAAATTTTAGCTGTAAACCTGTGCAA
- [0070] GTGCGGACAAAA-3'
- [0071] [서열번호 11] 5'-cagcgatccGATGTTTAATTCTTTTCGTTTCTTT
- [0072] TCGA-3'
- [0074] 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 1881bp의 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 CooS 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0075] 그리고 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체(primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer: 서열번호 12)의 5'에는 제한효소 BamHI 인식서열(ggatcc), 역방향 프라이머(Rreverse primer: 서열번호 13)에는 제한효소 XhoI 인식서열(ctcgag)이 각각 삽입된 프라이머를 합성하였다.
- [0077] [서열번호 12] 5'-ggatccgcagcgacatcatcaa-3'
- [0078] [서열번호 13] 5'-GCGCctcgaggctataggatctccaatatttat-3'
- [0080] 그 결과, 1659bp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로즈-결합 단백질-에이 유전자의 일부인 mCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0082] **실시예 2:섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 일산화탄소 결합 유전자 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자의 연결 및 클로닝**
- [0083] 실시예 1에서 얻은 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 일산화탄소 결합 유전자 CooA 및 산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자 CooS 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.
- [0084] 그 후 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자와 일산화탄소 결합 유전자 CooA 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자 CooS 를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(Forward primer: 서열번호 5, 서열번호 7)의 5'에는 제한효소 SacI 인식서열(gagctc), 역방향프라이머(Rreverse primer: 서열번호 2)의 5'에는 제한효소 NotI 인식서열(gcgccgc)이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다.
- [0086] PCR 반응을 수행하여서 그 결과, 861bp 및 2076bp의 섬유소 분해효소의 도커린 도메인의 유전자가 연결된 일산화탄소 결합 유전자 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0087] 그 후, 키메릭 일산화탄소 결합 유전자 CooA Doc 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터(E.coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 SacI 과 NotI 으로 에스세리시아 콜라이(대장균, E. coli) BL21에 형질전환 하였다. 이어 재조합 대장균 으로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리 하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) CooA Doc라 명명하였고(도 1A), 상기 재조합 대장균을 BL21/CooA Doc 명

명하였다.

[0088] 또한, 키메릭 일산화탄소 디하이드로제네이즈 유전자 CooS Doc 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (E.coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 SacI 과 NotI 으로 에스세리시아 콜라이 (대장균, E. coli) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 재조합 대장균 으로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) CooS Doc라 명명하였고(도 1B), 상기 재조합 대장균 을 BL21/CooS Doc 명명하였다.

[0090] 실시예 3: 재조합 대장균의 일산화탄소 결합 단백질 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질 발현

[0091] 실시예 2에서 확보한 재조합 대장균의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 및 SDS-PAGE를 수행하였다.

[0092] 재조합 대장균을 IPTG로 발현 유도하여 키메릭 일산화탄소 결합 단백질 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질이 발현되도록 하는 조건을 조성하여 30에서 5시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) 해당 단백질을 얻은 후 SDS-PAGE에 로딩하였다. 그 후, 단백질의 C-terminal에 연결되어 있는 His-tag을 이용하여 Western Blot 분석 기법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 예상한 일산화탄소 결합 단백질 및 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질 사이즈와 동일한 위치에서 나타남을 확인할 수 있었다(도 2).

[0094] 실시예 4: 재조합 대장균의 소형 셀룰로즈-결합 단백질 발현

[0095] 도커린 모듈이 연결된 키메릭-락케이즈의 복합체 형성을 확인하기 위하여, 소형 셀룰로즈-결합 단백질이 가진 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 실행하였다.

[0096] pET22b(+)mCbpA를 발현 유도하여 mCbpA 단백질이 배양액으로 분비되도록 하는 조건을 조성하여 LB 배지에 접종하여 24시간 동안 37에서 배양하고, IPTG를 함유한 LB 액상배지에서 5시간 동안 37에서 배양한 상등액을 준비하고 농축하여(Millipore, amicon 10kDa cut off) mCbpA 소형 셀룰로즈-결합 단백질을 얻었다.

[0097] 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로즈 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로즈 (Sigmacell Type 50, SIGMA) 를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1M 소듐 클로라이드(sodium chloride) 0.02M 트리스 버퍼 (pH 8.0)로 세 번 행구어낸 후 0.05M 트리스 버퍼 (pH 12.5)로 용리하였다. 이의 SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동하였다. 그 결과, 분자량 58kDa의 단백질 밴드를 확인하였다(도 3).

[0099] 실시예 5: 일산화탄소 전환효소 복합체 형성의 확인 및 활성 분석

[0100] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헵 단백질과 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질과 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA의 결합으로 인한 복합체의 형성을 확인하기 위해 셀룰로즈 결합 단백질 에이(mCbpA), 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA) 및 도커린 모듈이 연결된 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)을 15mM CaCl₂ , 25mM sodium acetate buffer [pH 6.0]에서 혼합하여 4~5℃에서 12시간 방치하여 복합체 형성을 유도하였다.

[0101] 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헵 단백질과 아세토박테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질과 소형 셀룰로즈-결합 단백질 mCbpA의 결합으로 인한 복합체의 활성을 확인하기 위해 일산화탄소를 기질로 하는 활성 분석을 수행하였다. 상기 방법대로 실행한결과, 일산화탄소 전환효소 복합체가 형성된 경우(3) 단일 전환효소(2) 보다 활성이 높게 나타났다(도 4).

[0102] 이 결과로부터, 일산화탄소 결합 헵 단백질(CooA)과 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS)이 효소복합체를 이루는 경우 단일 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질(CooS) 보다 월등한 일산화탄소 전환 효과가 있는

것을 확인할 수 있다.

[0104] 실시예 6: 일산화탄소 전환효소 복합체의 세포표면 고정화

[0105] 일산화탄소 전환효소 복합체를 세포표면에 고정화하여, 더 높은 일산화탄소 고정화 효율을 가지는 세포를 얻기 위하여, 세포표면 고정화 모듈 유전자를 이용하여 일산화탄소 전환효소 복합체의 세포표면 고정화를 수행하였다.

[0107] 6-1: 세포표면 고정화 모듈 유전자와 GFP 유전자 및 골격단백질 유전자의 연결 및 클로닝

[0108] 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈이 융합된 녹색형광 단백질 유전자를 클로닝하기 위하여 랄스 토니아 유트로파의 gDNA로부터 Type-IV Pili (T4P) 유전자의 염기서열(서열번호 14)을 참고로 하여 정방향 프라 이머(Forward primer)의 5' 제한효소 EcoR I 인식서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 해파리 유래의 녹색형광 단백질 GFP 유전자의 N-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하 여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 514bp의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0110] Type-IV Pili (T4P) -F: gaattcATGGATGGCATTCTCGGGCGCCATCGTTTGGGCCTTCTCGCA(서열번호 15)

[0111] Type-IV Pili (T4P) -R: ttccggatccCTGAAACGTGAGTGTGAACGTCGAGGTGGCGCTGCATG(서열번호 16)

[0113] 또한 해파리의 지노믹디엔에이로부터 녹색형광 단백질 GFP 유전자의 염기서열(서열번호 17)을 참고로 하여 정방 향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자의 C- terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Hind III 인식서열 이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 730bp의 녹색형광 단백질 GFP 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0114] GFP-F: cacgttttcagGGATCCGGAATAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTTTCTACTGG(서열번호 18)

[0115] GFP-R: aagcttTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAG(서열번호 19)

[0117] 일산화탄소 전환 효소 복합체 형성을 위한 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈이 융합된 클로스 트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자를 클로닝하기 위하여, 랄스토니아 유트로파의 gDNA로부터 Type-IV Pili (T4P) 유전자의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5' 제한효소 EcoR I 인식서 열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자의 N- terminal 부분의 10bp 크기의 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이 머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 514bp의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

[0118] T4P-F: GCGCgaattcATGGATGGCATTCTCGGGCGCCATCGTTTGGGCCTTCTCGCA(서열번호 21)

[0119] N-term-R: atgtcgtctgcCTGAAACGTGAGTGTGAACGTCGAGGTGGCGCTGCATG(서열번호 22)

[0121] 또한 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자의 염기서열(서열번호 20)을 참고로 하여 정방향 프라 이머(Forward primer)의 5'에는 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자의 C-terminal 부분의 10bp 크기의 서열이, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Sal I 인식서열이 삽입되도록 프라이 머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 1647bp의 클로 스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.

- [0123] 골격 단백질-F:cacgtttcag GCAGCGACAT CATCAATGT(서열번호 23)
- [0125] C-term-R:GCGC gtcgac TATAGGATCTCCAATATTTATTGTAA(서열번호 24)
- [0127] 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자와 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자 GFP 및 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA의 증폭산물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다.
- [0128] 그 후 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자와 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자 GFP 및 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA 를 연결하기 위해 회수한 DNA 절편을 이용하여 오버랩(Overlap) PCR 반응을 수행하였다. 회수한 두 DNA 절편으로부터 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 EcoR I, 역방향프라이머(Reverse primer)의 5'에는 제한효소 Hind III 인식서열 및 제한효소 Sal I 인식서열이 각각 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. PCR 반응을 수행하여서 그 결과 1244bp 및 2161bp의 랄스토니아 속 균주 유래의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자 GFP 및 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0130] 그 후, 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 해파리 유래의 녹색형광 단백질 유전자는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (E.coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 EcoRI 과 Hind III 로 에스세리시아 콜라이 (대장균, E. coli) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) PilF GFP 라 명명하였고 도 5의 A에 나타내었다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/PilF GFP 명명하였다.
- [0131] 또한, 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질 유전자 mCbpA는 절단한 후 대장균 발현 벡터 (E.coli expression vector)인 pET22b(+)에 라이게이션(ligation)시켜 EcoRI 과 Sal I 으로 에스세리시아 콜라이 (대장균, E. coli) BL21에 형질전환을 하였다. 이어 형질전환체로부터 라이게이션(ligation)된 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. 상기 재조합 벡터를 pET22(+) PilF mCbpA라 명명하였고 도 5의 B에 나타내었다. 그리고 상기 대장균 형질전환체를 BL21/PilF mCbpA 명명하였다.
- [0133] 6-2: 대장균 형질전환체의 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 해파리 유래의 녹색형광 단백질 및 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질의 세포 표면 고정화
- [0134] 6-1에서 확보한 형질전환체의 효소 단백질의 랄스토니아 속 균주의 세포 표면 고정화 여부를 확인하기 위하여, His-Tag을 이용한 정제 후 단백질이 하나의 세포에 함께 부착되어 있는지를 녹색형광 단백질을 이용하여 시각적으로 확인하였다. 랄스토니아 균주의 배양액에 확보한 단백질을 넣은 후 세포 표면에 고정화 됨을 형광 현미경 (본 실시예에서는 confocal laser-scanning microscope LSM 5 Exciter (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하였다.)을 이용하여 확인하였으며, 하나의 세포에서 발현하는지를 상 대조 (phase contrast)그림에서 확인할 수 있다.
- [0135] 그 결과, 도 5의 C에 나타난 바와 같이, 녹색의 형광 염색이 하나의 세포 표면에 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 반면, 세포 표면 고정화 모듈이 융합되어 있지 않은 녹색형광 단백질의 경우는 상 대조 그림에서 세포가 분명하게 보이지만, 형광 염색은 전혀 되지 않은 것으로, 형광 염색약이 세포 표면에 임의로 붙어서 발광하는 것이 아님을 확인해 주었다. 이를 통해, 효소 복합체가 성공적으로 세포 표면에 고정될 수 있다는 것을 확인할 수 있다.
- [0137] 6-3: 일산화탄소 전환 효소 복합체가 세포 표면에 고정된 랄스토니아 유트로파 균주의 활성 분석
- [0138] 세포 표면 고정화 모듈 유전자가 연결된 클로스트리움 속 균주 유래의 골격 단백질과 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 유전자의 도커린 모듈이 연결된 로도스피릴럼 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 결합 헴 단백질과 아세트박

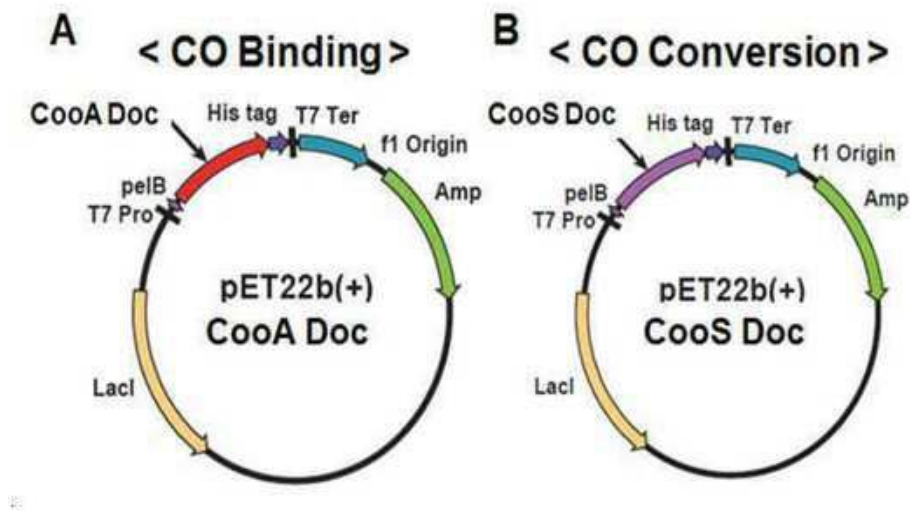
테리움 속 균주로부터 유래한 일산화탄소 디하이드로제네이즈 단백질의 결합으로 인한 복합체가 고정화된 란스 토니아 유트로파 균주의 일산화탄소 전환 효율을 분석하기 위해 일산화탄소를 기질로 하는 활성 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 일산화탄소 전환 효소 복합체가 세포표면에 고정화된 경우, 효소복합체가 고정되지 않은 대조군에 비해 활성이 증가하는 것을 확인하였다.

[0140]

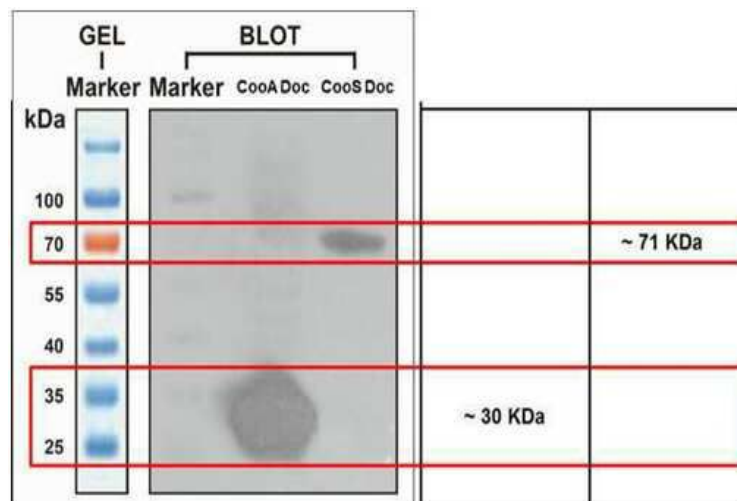
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

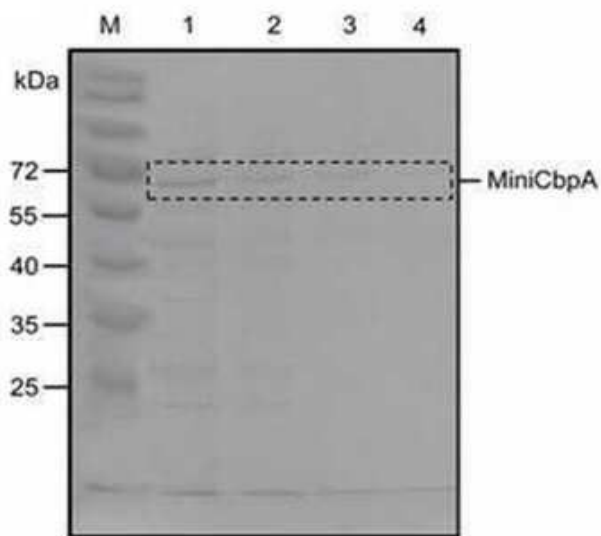
도면1



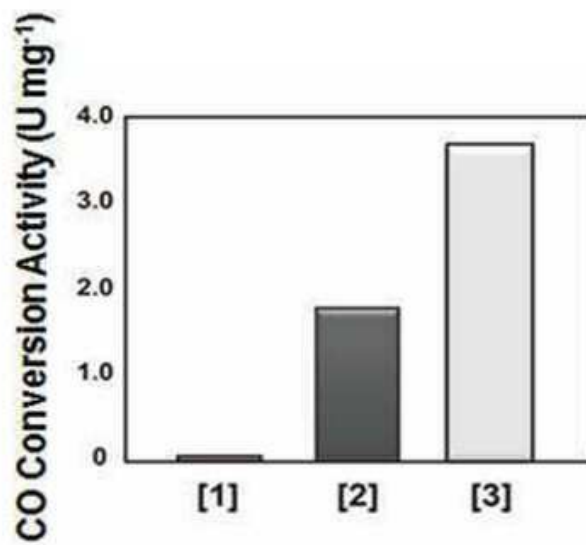
도면2



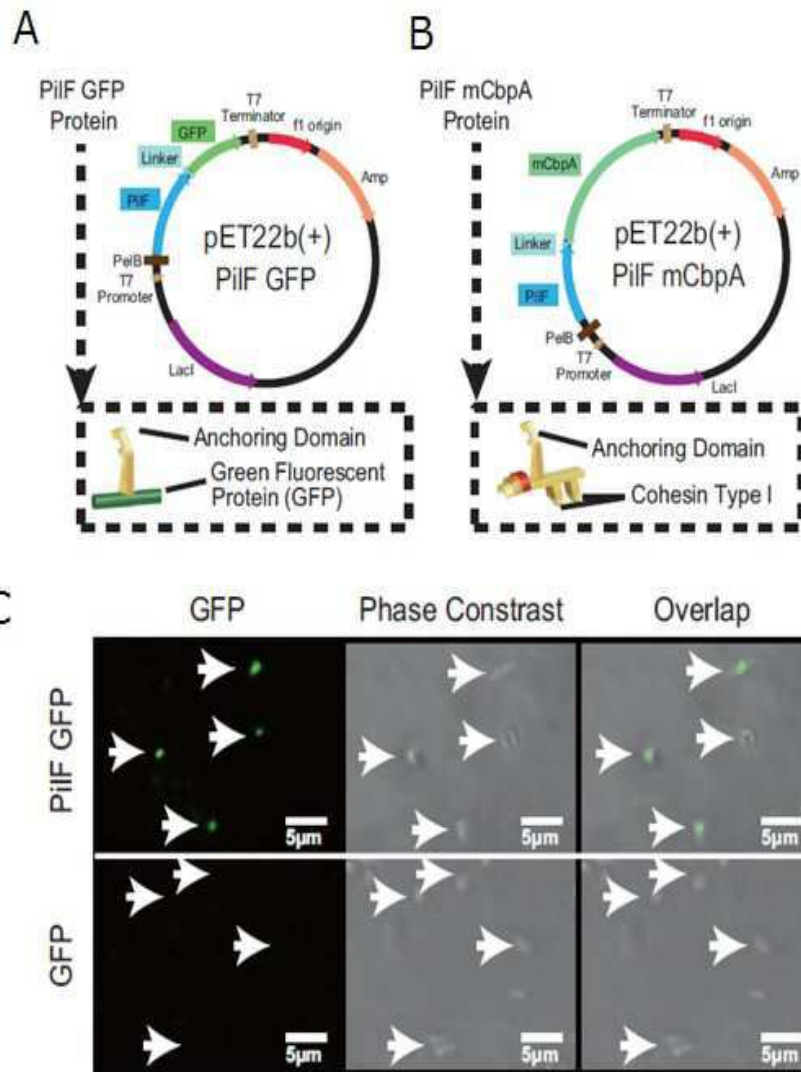
도면3



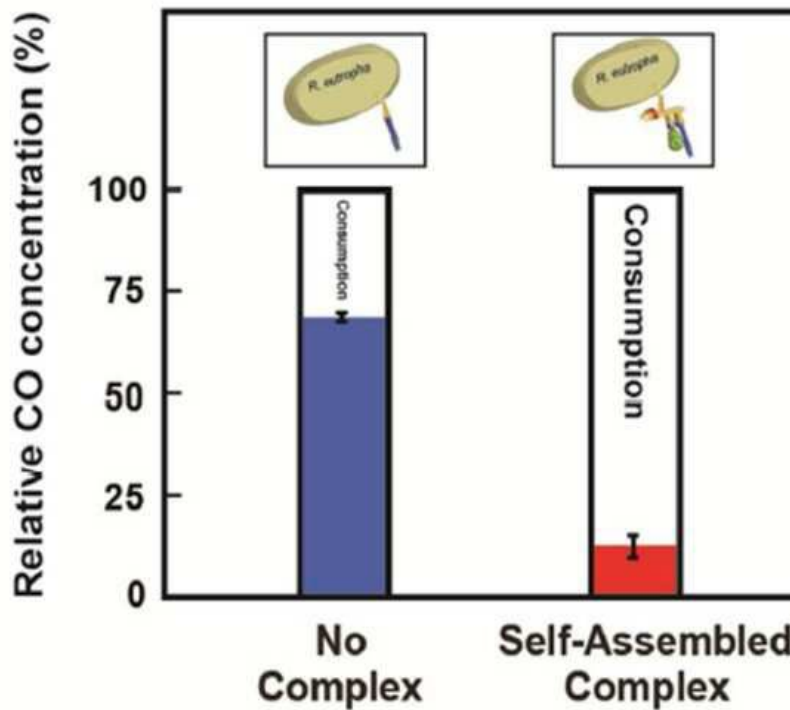
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Enzyme Complex Comprising of Carbon Monoxide Binding Protein and Carbon Monoxide Dehydrogenase and Application for Carbon Monoxide Conversion
- <130> PP-B1611
- <150> KR 2014-0133323
- <151> 2014-10-02
- <160> 24
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2112
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CooS Doc
- <400> 1

atgaattcaa attttagctg taaaacctgt gcaagtgcgg acaaaaatct cgaaacattc 60

attgctgata taagtgttga aacatctcat caccgcatgg aaggacaaaa tgttaaatgt 120

ggtttcgggt tacaaggcat ttgctgccgt ttatgttcaa acggaccatg tcgaattacc 180

ccagatggac caaaagggtg ctgcggcgct accgcagata caattgttgc tcgtaatttc	240
ttaagagcag tatcagccgg atcaggatgt tatattcaca ttgttgaaaa tacagcccg	300
ttacttaaaa aaactgcggc tagtaaaggc ctgttaaaag ggaaaattgc actggcaaaa	360
ctggttgaga tttttgaaat cgatgaaact gatgaacata tttgtgccga aaaaatcgct	420
gatctggttt tagctgattt gtataaacct gattatgaaa aaatggaact tgttgaaaag	480
atggcctata aaccgcgttt tgaacgttgg aaagaactgg gtatcttgcc tgggtggagca	540
aaatccgaag tttttgcggg agttgttaaa acctcaacga atcttaactc tgatccagtt	600
gatatgtatc taaattgctt aaaactggga atttcaaccg gtctttatgg tttaacactg	660
acaaatcttc ttaatgatgt tattttaggt gaaccatcga tccgattagc tcccgttgg	720
ttacgcgtta ttgataccga ttatattaat atcatgatta ccggtcacca gcattcattg	780
ttttcctatc tacaggatca cctgattgac gaagcagtta ttgagaaaagc taaggctgta	840
ggtgcaaaag ggittaaact agttggctgt acctgtgttg gacaagacct tcaactacgt	900
ggcgaacatt accaagaggt atttaacgga catgcgggaa ataactttac cagtgaagcg	960
attcttgcta ctggcgcaat tgatgccgta ttatccgaat tcaattgtac tttaccaggc	1020
attgaaccaa tctgtgacga atttaaaatt aaacaaatct gtttggacga cgtttctaaa	1080
aaggctaattg ctgaaatgaa accttttatt ttgaagaaa gagaaagcca ggctgacgaa	1140
attattaacg aagtgattga ggcttatcaa gcgcgacgtg gcaatgttcc tttgaatatg	1200
gatccagagc atgggaatga cgatacctta accggtgtca gtgaagggtc attaaaatca	1260
tttttaggtg gaacctggaa accactgatt gatttactag ttagtggcga tatcaaaggg	1320
attgccggtg ttgttggatg ttcaagctta acagccggtg gacatgatgt cttaacggtt	1380
gggttggtta aagaactgat tgctaaagat attcttgttt tatctgccgg atgttcac	1440
ggcggactcg aaaaatttgg tttaatgtca ccttccgagg ctgcgctggc agggccaaaa	1500
ctacgggcag tttgtgaaag tctgggaatt ccaccagttt taaactttgg tccatgtctc	1560
gccattggcc gtctggaatt agttgctacg gaactggccg aagctatcgg tgttgatctt	1620
ccgcaattac cactcgtttt atcggcgccg caatggttag aagagcaagc tttagctgat	1680
ggagcgtttg gtttagccct tggtttacca ttacatctcg gacttcacc atttgtaact	1740
ggtagtccag tagctgttca ggtctttact caagacatgc ttaactttac tggcgggtcaa	1800
ttaattatag atgataatgc aaaatcagca gccgaaacac tcgatggaat catcgaaaag	1860
aaacgaaaag aattaaacat cggatccgct ggctccgctg ctggttctgg ggaattcgat	1920
gttaacaaag atggaaaggt aaatgctatc gattatgcag tgcttaaatc aattctttta	1980
ggtacaaata ctaacgttga tttatcagta tcagacatga ataaggatgg taaagttaat	2040

gctttggatt tagctgttct taaaaaatg ctttttagcgg ccgcactcga gcaccaccac 2100
caccaccact ga 2112

<210> 2

<211> 897

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CoaA Doc

<400> 2

atgccgcctc gtttcaacat cgccaatgtc ctgttaggcc ccgacggaga gacgtttttc 60
cgcggtttcc gcagtaagat ccacgccaag ggacgccttg tttgcaccgg agaaggcgac 120
gagaacggcg tggtcgtcgt tgcgatggg cgcttcgggg tttatctggt cggcgaggag 180
cgcgagatca gcctgtttta cctgacctcg ggcgacatgt tttgcatgca ttcgggctgt 240
ctggtcgagg cgaccgagcg gaccgaggtg cgcttcgccg atatccgcac ctttgaacaa 300
aagctacaga cctgtccgtc gatggcctgg gggtgatcg ccacctcgg ccgggcgctg 360

acctcgtgca tgcgcacat cgaagacctg atgttccacg acatcaagca gcgcacgcc 420
ggctttttca tcgacacgc caataccacc ggacgccaga cccagggcgg cgtcatcgtc 480
tcggtcgatt tcacggtcga ggaaatgcc aatctcatcg gctcgtcag ccaaaccacc 540
tcgacggcgc tcaacagcct gatcaaggaa ggttatatct cgcgccaggg tcgcgccat 600
tacaccatcc ccaaccttgt tcgctgaaa gccgccgccg atggcgaccg cgacgacgac 660
gacgatggat ccgttggtc cgctgctggt tctggggaat tcgatgttaa caaagatgga 720
aaggtaatg ctatcgatta tgcagtgtt aaatcaattc ttttaggtac aaatactaac 780

gttgatttat cagtatcaga catgaataag gatggtaaag taaatgcttt ggatttagct 840
gttcttaaaa aaatgctttt agcgccgca ctcgagcacc accaccacca cactga 897

<210> 3

<211> 1782

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MiniCbpA

<400> 3

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgtgc tctcgtgc ccagccggcg 60
atggccatgg atacggaat taattcgat ccgaattcgg cagcgacatc atcaatgtca 120
gttgaatttt acaactctaa caaatcagca caaacaact caattacacc aataatcaaa 180

attactaaca catctgacag tgatttaaatt ttaaattgacg taaaagttag atattattac	240
acaagtgatg gtacacaagg acaaactttc tgggtgtgacc atgctgggtgc attattagga	300
aatagctatg ttgataaac tagcaaagtg acagcaaact tcgttaaaga aacagcaagc	360
ccaacatcaa cctatgatac atatgttgaa tttggatttg caagcggagc agctactctt	420
aaaaaaggac aatttataac tattcaagga agaataacaa aatcagactg gtcaaaactac	480
actcaacaa atgactattc atttgatgca agtagttcaa caccagttgt aaatccaaaa	540
gttacaggat atatagggtg agctaaagta cttggtacag caccaggtcc agatgtacca	600
tcttcaataa ttaatcctac ttctgcaaca ttgataaaaa atgtaactaa acaagcagat	660
gttaaaacta ctatgacttt aaatggtaac acatttaaaa caattacaga tgcaaacggt	720
acagctctaa atgcaagcac tgattatagt gtttctggaa atgatgtaac aataagcaaa	780
gcttatttag caaaacaatc agtaggaaca actacattaa actttaactt tagtgcagga	840
aatcctcaaa aattagtaat tacagtagtt gacacaccag ttgaagctgt aacagctaca	900
attggaaaag tacaagtaaa tgctggagaa acggtagcag taccagttaa cttacaaaaa	960
gttcagcag ctggtttagc aacaattgaa ttaccattaa cttttgattc tgcattatta	1020
gaagtagtat caataactgc tggagatatc gtattaaatc catcagtaaa cttctcttct	1080
acagtaagtg gaagcacaat aaaattatta ttcttagatg atacattagg aagccaatta	1140
atcactaagg atggagtttt tgcaacaata acatttaaaag caaaagctat aactggaaca	1200
actgcaaaag taacttcagt taaattagct ggaacaccag tagttggtga tgcgcaatta	1260
caagaaaaac cttgtgcagt taaccagga acagtaacta tcaatccaat cgataataga	1320
atgcaaatat cagttggaac agcaacagta aaagctggag aaatagcagc agtgccagta	1380
acattaacaa gtgttccatc aactggaata gcaactgctg aagcacaagt aagttttgat	1440
gcaacattat tagaagtagc atcagtaact gctggagata tcgtattaaa tccaacagta	1500
aacttctctt atacagtaaa cggaatgta ataaaattat tattcctaga tgatacatta	1560
ggaagccaat taattagtaa agatggagtt ttgttaacaa taaacttcaa agcaaaagct	1620
gtaacaagca cagtaacaac accagttaca gtatcaggaa cacctgtatt tgcagatggt	1680
acattagcag aagtacaatc taaaacagca gcaggtagcg ttacaataaa tattggagat	1740
cctatagcgg ccgcactcga gcaccaccac caccaccact ga	1782
<210> 4	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer 1
 <400> 4
 cgacgacgat ggatccgctg gctcc 25

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 2
 <400> 5
 atatgcggcc gctaaaagca tttttttaag aacagctaaa 40
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 3
 <400> 6
 attaaacatc ggatccgctg 20
 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 4
 <400> 7
 atatgcggcc gctaaaagca tttttttaag aacagctaaa 40
 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 5
 <400> 8
 atatgagctc catgccgcct cgtttca 27
 <210> 9
 <211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 6
 <400> 9
 cagcggatcc atcgctcg tcgtc 25
 <210> 10
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 7
 <400> 10
 gcgcgagctc catgaattca aattttagct gtaaacctg tgcaagtgcg gacaaaa 57

 <210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 8
 <400> 11
 cagcggatcc gatgtttaat tcttttcgtt tcttttcga 39
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 9
 <400> 12
 ggatccgcag cgacatcatc aa 22
 <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 10
 <400> 13
 gcgcctcgag gctataggat ctccaatatt tat 33

<210> 14
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> Ralstonia eutropha T4P
 <400> 14
 atggatggca ttctcgggcg cattgtcgcc atcgtcttgg gccttctcgc actggctgga 60
 attgcctatg cgggctacaa cgggttccag aaccacaagg ccagtgtggt ggcgaccaac 120
 atcgcgcagc tgatcacaaa cgctcgcgcc gggttctcgc agggcaacaa cggctatacc 180
 aactttacta cggcaaacgt cgcacgatg atcacgagcg gcatgttccc gtccgacatg 240
 gtgcgcggta ccacgtgat cgactcctgg ggaaatgcgg tcacgctcgc gtcggccaat 300
 agcggatcgc agggggtgat caccttcggc ggcggaatg cgcagacggc aaaacagtgt 360

 gtcagaccg cccttggcct caaggactac gtgacgttgg cgatcggatc gacgaccttc 420
 aatcagacca acctgcccga ccaggccacc gcaggtgcgg catgcagcgc cacctcgacg 480
 ttcacactca cgtttcag 498
 <210> 15
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 gaattcatgg atggcattct cgggcgccat cgtttgggcc ttctcgca 48
 <210> 16
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

 <400> 16
 ttccggatec ctgaaacgtg agtgtgaacg tcgaggtggc gctgcatg 48
 <210> 17
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> GFP
 <400> 17

atgagtaaag gagaagaact ttctactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60
 gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggatgatgc aacatacga 120
 aaacttacc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180
 gtcactactt tcgcgtatgg tcttcaatgc ttgcgagat acccagatca tatgaaacag 240
 catgactttt tcaagagtgc catgccccgaa ggttatgtac aggaagaac tatattttc 300

aaagatgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgaaggatga tacccttgtt 360
 aatagaatcg agttaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 420
 ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaaca aaagaatgga 480
 atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 540
 cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600
 ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt 660
 cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaa 714

<210> 18
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18

cacgtttcag ggtatccgga taatgagtaa aggagaagaa cttttcactg g 51

<210> 19
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19

aagctttttg tatagtcat ccatgccatg tgtaatccca g 41

<210> 20
 <211> 1647
 <212> DNA
 <213> Chlorstridium sp.
 <400> 20

gcagcgacat catcaatgtc agttgaattt tacaactcta acaaatcagc acaaacaaac 60

tcaattacac caataatcaa aattactaac acatctgaca gtgatttaaa tttaaatgac 120
 glaaaagtta gatattatta cacaagtgat ggtacacaag gacaaacttt ctggtgtgac 180
 catgctggtg cattattagg aaatagctat gttgataaca ctagcaaagt gacagcaaac 240
 ttcgttaaag aaacagcaag cccaacatca acctatgata catatgttga atttggattt 300
 gcaagcggag cagctactct taaaaaagga caatttataa ctattcaagg aagaataaca 360
 aaatcagact ggtcaaaacta cactcaaaca aatgactatt catttgatgc aagtagttca 420
 acaccagttg taaatccaaa agttacagga tatataggtg gagctaaagt acttggtaga 480

gcaccaggtc cagatgtacc atcttcaata attaatccta cttctgcaac atttgataaa 540
 aatgtaacta aacaagcaga tggttaaaact actatgactt taaatggtaa cacatttaaa 600
 acaattacag atgcaaacgg tacagctcta aatgcaagca ctgattatag tgtttctgga 660
 aatgatgtaa caataagcaa agctttatta gcaaaacaat cagtaggaac aactacatta 720
 aactttaact ttagtgcagg aaatcctcaa aaattagtaa ttacagtagt tgacacacca 780
 gttgaagctg taacagctac aattggaaaa gtacaagtaa atgctggaga aacggtagca 840
 gtaccagtta acttaacaaa agttccagca gctggtttag caacaattga attaccatta 900

acttttgatt ctgcatcatt agaagtagta tcaataactg ctggagatat cgtattaaat 960
 ccatcagtaa acttctcttc tacagtaagt ggaagcaca taaaattatt attcttagat 1020
 gatacattag gaagccaatt aatcactaag gatggagttt ttgcaacaat aacatttaaa 1080
 gcaaaagcta taactggaac aactgcaaaa gtaacttcag ttaaattagc tggaacacca 1140
 gtagttggtg atgcgcaatt acaagaaaaa ccttgtgcag ttaaccagg aacagtaact 1200
 atcaatcaa tcgataatag aatgcaaat tcagttggaa cagcaacagt aaaagctgga 1260
 gaaatagcag cagtgccagt aacattaaca agtgttccat caactggaat agcaactgct 1320

gaagcacaag taagttttga tgcaacatta ttagaagtag catcagtaac tgctggagat 1380
 atcgtattaa atccaacagt aaacttctct tatacagtaa acggaaatgt aataaaatta 1440
 ttattcctag atgatacatt aggaagccaa ttaattagta aagatggagt ttttgtaaca 1500
 ataaacttca aagcaaaagc tgtaacaagc acagtaacaa caccagttac agtatcagga 1560
 acacctgtat ttgcagatgg tacattagca gaagtacaat ctaaaacagc agcaggtagc 1620
 gttacaataa atattggaga tcctata 1647

<210> 21

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

gcgcgaattc atggatggca ttctcgggcg ccatcgtttg ggccttctcg ca 52

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

atgtcgtcgc ctgaaacgtg agtgtgaacg tcgaggtggc gctgcatg 48

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

cacgtttcag gcagcgacat catcaatgt 29

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

gcgcgtcgac tataggatct ccaatattta ttgtaa 36