



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0149319

(43) 공개일자 2022년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/0071 (2013.01)

C07K 14/195 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0056794

(22) 출원일자 2021년04월30일

심사청구일자 2021년04월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이지원

서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)

유연화

서울특별시 은평구 서오릉로20길 4-2, 102호(갈현동, 스위트빌)

최유빈

경기도 파주시 한울로 100, 609동 2701호(동패동, 한울마을 6단지)

(74) 대리인

특허법인리체

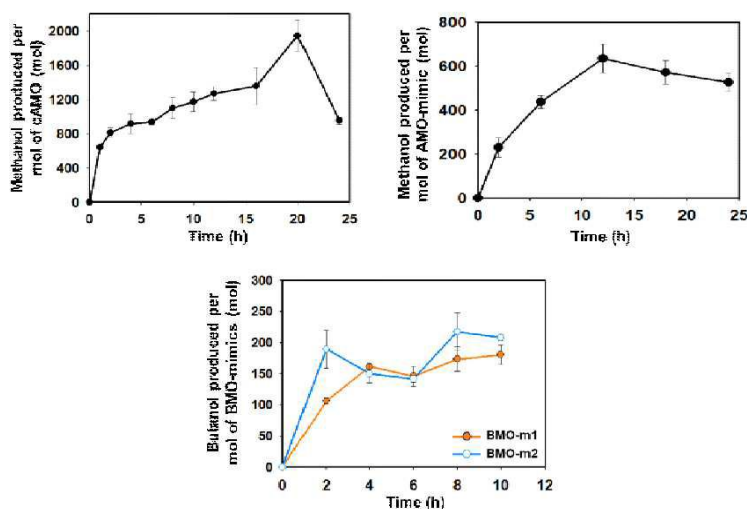
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 메탄 또는 부탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질

(57) 요약

본 발명은 메탄 산화 활성을 갖는 암모니아 산화 효소 활성 도메인, 또는 부탄 산화 활성을 갖는 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질에 관한 것으로서, 메탄 또는 부탄을 산화시켜 메탄올 또는 부탄올을 제조하는 활성을 갖는 단백질, 이를 발현하는 미생물, 이를 활용한 메탄올 또는 부탄올 제조용 조성물, 메탄올 또는 부탄올 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 7/04 (2013.01)

C12P 7/16 (2013.01)

C12Y 114/99039 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711126652
과제번호	2020M3D3A1A01080557
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	메탄산화효소 기능성 기반의 실용적 생물전환 기술 및 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메탄 산화 활성을 갖는 암모니아 산화 효소 활성 도메인, 또는 부탄 산화 활성을 갖는 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 암모니아 산화 효소 활성 도메인은 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 중에서 선택되는 단백질.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 amoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, amoB2는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 4

청구항 2에 있어서, amoB1 및 amoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.

청구항 5

청구항 2에 있어서, amoB1이 융합된 페리틴 단량체 및 amoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 부탄 산화 효소 활성 도메인은 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 중에서 선택되는 단백질.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 bmoB1은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, bmoB2는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 8

청구항 6에 있어서, bmoB1 및 bmoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.

청구항 9

청구항 6에 있어서, bmoB1이 융합된 페리틴 단량체 및 bmoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 인간 페리틴 중쇄 단량체인 단백질.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 각 도메인은 페리틴 단량체의 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것인 단백질.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 단백질을 발현하는 미생물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자; 및 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 중에서 선택되는 암모니아 산화 효소 활성 도메인, 또는 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 중에서 선택되는 부탄 산화 효소 활성 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 것인 미생물.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.

청구항 15

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 단백질을 포함하고, 상기 단백질은 암모니아 산화 효소 활성 도메인이 융합된 것인 메탄올 제조용 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 환원제를 더 포함하는 조성물.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 환원제는 듀로퀴놀인 조성물.

청구항 18

청구항 15의 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 단백질을 포함하고, 상기 단백질은 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 것

인, 부탄올 제조용 조성물.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 조성물은 환원제를 더 포함하는 조성물.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 상기 환원제는 듀로퀴놀인 조성물.

청구항 22

청구항 19의 조성물을 부탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 부탄올 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄 또는 부탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메탄산화세균(methanotrophs) 유래의 메탄산화효소(Methane monooxygenase, MMO)는 상온 상압의 온화한 조건에서 메탄가스를 포함한 다양한 탄화수소(C1-C8)의 산화 반응을 촉매하여 고부가가치의 산물을 생산할 수 있는 매우 유용한 바이오촉매로서 이를 활용하는 바이오공정 개발에 세계적인 관심이 집중되고 있다.

[0004] 또한, 유사 계열 효소로 Nitrosomonas europaea 유래의 암모니아산화효소(Ammonia monooxygenase, AMO), Nocardioideis sp. strain CF8 유래의 부탄산화효소(Butane monooxygenase, BMO)등이 메탄산화효소와 비슷한 기작으로 넓은 범위의 탄화수소 (AMO: C1 - C10 사슬형/할로겐화 탄화수소, 단/다고리형 방향족 탄화수소, BMO: C2 - C10 사슬형/할로겐화 탄화수소, 일부 방향족 탄화수소)에 대해 산화반응을 촉매할 수 있는 유용한 바이오촉매이나 현재까지 3D 구조, 활성 도메인의 규명, 반응 메커니즘, 기질 특이성 등에 대한 기초 연구가 매우 미비하다.

[0005] 현재 메탄 및 부탄가스의 화학 공정에 의한 메탄올 및 부탄올 생산은 단계가 복잡하고 부산물(이산화탄소, syngas 등)에 의한 환경오염 유발, 낮은 반응 전환율, 고온, 고압의 반응 조건으로 인한 고에너지 소비 등, 기술적, 환경적, 경제적 측면의 많은 문제점을 안고 있다. 특히, 메탄가스는 고가의 수송, 저장 비용에 기인하는 경제성 저하 및 유출 시 심각한 온실효과 유발 등의 문제로 인해 현지 가스전에 쉽게 연계될 수 있는 소규모 바이오 플랜트를 이용한 메탄올 생산이 기술적, 경제적 측면에서 매우 유리하다.

[0006] 바이오 공정의 개발 노력으로 메탄올 외 다른 고부가산물 생산을 위한 메탄산화세균 및 다양한 탄화수소물질 분해세균(hydrocarbon degrading bacteria)의 대사공학적 균주 개량이 시도되고 있으나 유전공학적 도구 활용의 한계, 균주의 난배양성으로 인한 어려움 등이 있으며 메탄산화효소 등의 대량생산을 위해 산업용 균주를 이용한 이중 발현은 수용성 단백질의 발현이 어렵고 효소 복합체의 정밀한 상호작용이 요구되는 등의 높은 기술적 난이도로 산업적 활용의 성공사례가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 우수한 메탄 또는 부탄 산화능을 갖는 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [0009] 본 발명은 상기 단백질을 발현하는 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 상기 단백질 또는 미생물을 포함하는 메탄올 또는 부탄올 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 상기 단백질 또는 미생물을 이용한 메탄올 또는 부탄올 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 1. 메탄 산화 활성을 갖는 암모니아 산화 효소 활성 도메인, 또는 부탄 산화 활성을 갖는 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.
- [0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 암모니아 산화 효소 활성 도메인은 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 중에서 선택되는 단백질.
- [0015] 3. 위 2에 있어서, 상기 amoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, amoB2는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0016] 4. 위 2에 있어서, amoB1 및 amoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.
- [0017] 5. 위 2에 있어서, amoB1이 융합된 페리틴 단량체 및 amoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.
- [0018] 6. 위 1에 있어서, 상기 부탄 산화 효소 활성 도메인은 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 중에서 선택되는 단백질.
- [0019] 7. 위 6에 있어서, 상기 bmoB1은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, bmoB2는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0020] 8. 위 6에 있어서, bmoB1 및 bmoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.
- [0021] 9. 위 6에 있어서, bmoB1이 융합된 페리틴 단량체 및 bmoB2가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.
- [0022] 10. 위 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 인간 페리틴 중쇄 단량체인 단백질.
- [0023] 11. 위 10에 있어서, 상기 각 도메인은 페리틴 단량체의 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것인 단백질.
- [0024] 12. 위 1 내지 11 중 어느 한 항의 단백질을 발현하는 미생물.
- [0025] 13. 위 12에 있어서, 상기 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자; 및 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 중에서 선택되는 메탄산화효소 활성 도메인, 또는 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 중에서 선택되는 부탄산화효소 활성 도메인을 코딩하는 유전자;를 포함하는 벡터가 도입된 것인 미생물.
- [0026] 14. 위 12에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.
- [0027] 15. 위 1 내지 11 중 어느 한 항의 단백질을 포함하고, 상기 단백질은 암모니아 산화 효소 활성 도메인이 융합된 것인 메탄올 제조용 조성물.
- [0028] 16. 위 15에 있어서, 환원제를 더 포함하는 조성물.
- [0029] 17. 위 15에 있어서, 상기 환원제는 듀로퀴놀(duroquinol)인 조성물.
- [0030] 18. 위 15의 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법.
- [0031] 19. 위 1 내지 11 중 어느 한 항의 단백질을 포함하고, 상기 단백질은 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 것인, 부탄올 제조용 조성물.
- [0032] 20. 위 19에 있어서, 상기 조성물은 환원제를 더 포함하는 조성물.

- [0033] 21. 위 19에 있어서, 상기 환원제는 듀로퀴놀(duroquinol)인 조성물.
- [0034] 22. 위 19의 조성물을 부탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 부탄올 제조 방법.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 단백질은 메탄 또는 부탄 산화 활성을 갖는다.
- [0037] 본 발명의 단백질은 메탄 또는 부탄 산화 활성을 갖는 도메인이 다수 포함되어, 그 활성이 높다.
- [0038] 본 발명의 조성물 및 방법은 메탄올 또는 부탄올을 고수율로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 실시예에서 사용된 각 벡터의 개략도이다.
- 도 2는 실시예에서 제조된 cAMO, AMO-, BMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도 분석 결과이다.
- 도 3은 실시예에서 제조된 cAMO, AMO-, BMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질이 자가조립체를 형성함을 확인한 것이다.
- 도 4는 cAMO 재조합 단백질의 X-ray absorption near-edge structure (XANES) 및 Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) 분석 결과이다.
- 도 5는 실시예에서 제조된 cAMO, AMO-, BMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 및 부탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0043] 본 발명은 메탄 산화 활성을 갖는 암모니아 산화 효소 활성 도메인, 또는 부탄 산화 활성을 갖는 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질에 관한 것이다.
- [0044] 암모니아 산화 효소 활성 도메인은 메탄을 산화시키는 활성을 갖는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 등을 사용할 수 있다. 구체적으로, amoB1으로는 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 것을 사용할 수 있고, amoB2로는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.
- [0045] 부탄 산화 효소 활성 도메인은 부탄 산화 활성을 갖는 것이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 등을 사용할 수 있다. 구체적으로, bmoB1으로는 서열번호 3의 아미노산을 포함하는 것을 사용할 수 있고, bmoB2로는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 단백질에서 각 도메인은 1개의 페리틴 단량체 내에 모두 융합된 것일 수도 있고, 각 페리틴 단량체에 각각 융합된 것일 수도 있고, 이들이 혼합된 것일 수도 있다.
- [0047] 즉, 본 발명의 단백질에서 2개의 암모니아 산화 효소 활성 도메인 또는 부탄 산화 효소 활성 도메인이 1개의 페리틴 단량체 내에 융합된 것일 수도 있고, 페리틴 단량체마다 1개의 도메인이 융합된 것일 수도 있다.
- [0048] 본 발명의 단백질은 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인이 더 융합된 것일 수 있다.
- [0049] 메탄은 하기 수화식 1의 반응에 따라 산화되어 메탄올이 형성될 수 있는데, 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 것으로서, 환원제인 NADH를 이용하여 메탄 산화 반응을 수행할 수 있으며, 특히, in vivo에

서 반응 진행시에 체내의 NADH를 활용할 수 있다. 이에, 별도의 환원제의 사용이 불필요하다.

[0050] [수학식 1]

[0051] $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$

[0052] 전자 전달 도메인은 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함한다.

[0053] FAD 결합 도메인은 sMMO(soluble MMO(Methane monooxygenase)) 유래일 수 있고, 구체적으로는 그 구성요소 중 하나인 MMOR의 FAD 결합 도메인일 수 있다.

[0054] 전자 전달 도메인은 FAD 결합 도메인을 포함하는 것으로서, 이는 FAD 결합 도메인만으로 이루어진 것일 수도 있고, MMOR에서 FAD 결합 도메인 외에 추가 부분을 더 포함할 수도 있고, FAD 결합 도메인 외에 2Fe-2S 도메인의 적어도 일부를 더 포함할 수 있으며, FAD 결합 도메인 및 2Fe-2S 도메인을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 전자 전달 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명의 단백질에서 페리틴 단량체로는 다양한 생물 유래 페리틴을 사용할 수 있고, 척추 동물의 경우 중쇄 또는 경쇄 단량체를 사용할 수 있다. 예를 들면 인간 페리틴 중쇄를 사용할 수 있다.

[0056] 페리틴 단량체에서 자가조립된 단백질에서 그 기능을 할 수 있는 것이라면 각 도메인의 결합 위치는 제한되지 않으며, 예를 들면 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것일 수 있고, 단백질에서 외부에 표출되어 그 기능을 용이하게 발휘한다는 측면에서 바람직하게는 C-말단에 융합된 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 단백질에서, 페리틴 단량체와 각 도메인의 사이에는 링커가 더 포함될 수 있다.

[0058] 링커로는 당 분야에 공지된 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면 S1(G3SG3TG3SG3), S2(GKLGGG) 등을 사용할 수 있다.

[0059] 본 발명의 단백질은 예를 들면 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자; 및 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 중에서 선택되는 암모니아산화효소 활성 도메인, 또는 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 중에서 선택되는 부탄산화효소 활성 도메인을 코딩하는 유전자;를 포함하는 벡터를 생물체에 형질전환시켜 그 생물체로부터 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 단백질은 미생물 내에서 soluble form으로의 발현율이 높아, 생합성시의 제조 수율이 높다.

[0062] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 발현하는 미생물에 관한 것이다.

[0063] 본 발명의 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자; 및 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 및 amoB2(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 2) 중에서 선택되는 암모니아산화효소 활성 도메인, 또는 bmoB1(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 1) 및 bmoB2(Particulate Butane monooxygenase subunit B_domain 2) 중에서 선택되는 부탄산화효소 활성 도메인을 코딩하는 유전자;를 포함하는 벡터가 도입되어, 상기 단백질을 발현하는 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 단백질에서 각 도메인은 1개의 페리틴 단량체 내에 모두 융합된 것일 수도 있고, 각 페리틴 단량체에 각각 융합된 것일 수도 있고, 이들이 혼합된 것일 수도 있는 바, 상기 암모니아 산화 효소 활성 도메인, 또는 부탄 산화 효소 활성 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것일 수 있다.

[0065] 벡터로는 당 분야에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있고, 예를 들면 들어 BLUESCRIPT 벡터(Stratagene), T7 발현 벡터(Invitrogen), pET 벡터(Novagen) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 벡터는 단백질 발현을 위한 프로모터, 분리/정제를 위한 태그, 형질전환 마커 등 당 분야에 공지된 추가 구성요소를 더 포함할 수 있다.

[0067] 미생물은 상기 벡터가 도입되어 상기 단백질을 발현할 수 있는 것이라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면

대장균을 사용할 수 있다.

[0068] 본 발명의 미생물은 상기 단백질을 발현하므로, 메탄의 산화에 의해 메탄올을 제조하는데 활용될 수 있다. 본 발명의 미생물 사용시에 메탄올 생성을 위한 별도의 환원제의 첨가가 불필요하다.

[0070] 또한, 본 발명은 전술한 단백질 또는 전술한 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물 또는 부탄올 제조용 조성물에 관한 것이다.

[0071] 전술한 메탄 산화 활성을 갖는 암모니아 산화 효소 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질은 메탄 산화 활성을 갖는 것이고, 부탄 산화 효소 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질은 부탄 산화 활성을 갖는 것이고, 전술한 미생물은 상기 단백질을 발현하는 것이므로, 본 발명의 조성물은 이를 포함하여 메탄 또는 부탄을 산화시켜 메탄올 또는 부탄올을 제조할 수 있다.

[0072] 메탄올 또는 부탄올의 제조는 상기 조성물에 메탄 가스 또는 부탄 가스를 처리하여 수행될 수 있다.

[0073] 본 발명의 조성물은 메탄 또는 부탄 산화에 사용되는 환원제를 더 포함할 수 있다. 환원제는 예를 들면 듀로퀴놀(duroquinol)일 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 메탄 가스 또는 부탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 또는 부탄올 제조 방법에 관한 것이다.

[0076] 본 발명에 따른 조성물을 메탄 가스 또는 부탄 가스와 반응시켜 메탄 또는 부탄이 산화됨에 따라 메탄올 또는 부탄올이 제조될 수 있고, 이는 전술한 조성물에 메탄 가스 또는 부탄 가스를 주입시키고 효소 반응을 진행시킴으로써 수행될 수 있다.

[0077] 메탄올 또는 부탄올 제조 조건은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 전술한 단백질 또는 미생물이 적정 활성을 나타내는 온도, pH 등의 조건에서 수행될 수 있다.

[0079] 실시예

[0080] 1. 단백질 생합성을 위한 발현 벡터 제조

[0081] 하기 표 1에 기재된 벡터 모식도에 따라 PCR을 통하여 chimeric AMO (AMO(amoB1) + sMMO(MMOR_F)), AMO-mimic, BMO-mimics(BMO-m1 ~ BMO-m2)를 제작하였다. 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 겔에서 정제된 다음, 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[0082] 이렇게 만들어진 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7, pET28a 발현용 벡터에 삽입하여 각각의 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다.

[0083] 각각의 단백질들의 발현용 벡터들은 pT7-cAMO-B1, pET28a-cAMO-B2, pET28a-AMO-B1, pT7-AMO-B2, pT7-BMO-m1, pET28a-BMO-m2-B1, pT7-BMO-m2-B2로 진행하였다. (도 1)

표 1

재조합 단백질	발현 벡터
cAMO	1. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ (G ₃ SG ₃ TG ₃ SG ₃)-BamHI-amoB1(H38-L177)-HindIII-COOH 2. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F (C99-A348)-HindIII-COOH
AMO-mimic	1. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-amoB1-HindIII-COOH2. NH_2 -NdeI-huHF-BamHI-amoB2(Q270-L420)-H ₆ -HindIII-COOH
BMO-m1	NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-bmoB1(H41-L180)-S ₂ (GKLGGG)-bmoB2(Q272-H418)-HindIII-COOH
BMO-m2	1. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-bmoB1-HindIII-COOH2. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-BamHI-bmoB2-HindIII-COOH

[0086] 사용된 각 단백질(도메인)들의 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

도메인	서열	서열 번호
amoB1 (38-177)	HGERSQEPFLRMRTVQWYDIKWGPEVTKVNEAKITGKFHLAEDWPRAAAQPDFSFFNVGSPSPVFLSTKINGHPWFISGP LQIGRDYEFVNLRLRIPGRHHMAMLVNKDAGPIAGPGAWMNITGSWDDFTNPLKL	1
amoB2(270-420)	QAGQSKVAALPVAPNPVSIVITDANYDVPGRALRVMEVTNNGDIPVTFGEFTTAGIRFINSTGRKYLDQPYPRELIAVGLNF DDESAIQPGQTKELKMEAKDALWEIQRLMALLGDPESRFGGLMSWDAEGNRHINSIAGPVI PVFTKL	2
bmoB1(41-180)	HGEESQQAQFQRTSTVVFDVKFSDDTVDVGESVITGMVRVMKSWPDHLEPPMGYLTVSTPGPVFYVQEREMSGEFTPQSV RIEKGATYPFKLVIKARQPGTWHVHPGFGVEGAGTLVGAGKIDITVNDTGVFENTVTL	3
bmoB2(272-418)	QVVRTTPVPLAEEVSGAVAPEIESIRFNAEADTLTKLRVENTGAAAVRLQRVQFGDVEFVSPSFASAADPDAQAMTVTPDQ AIEPGGSATFTVEIQSEDLIVRSLVPVNEAELRVTGLLFFEDETGEQVVSEVNELTSAIILQDFH	4
MMOR _F (99-348)	CRISFGEVGSFEAEVVGLNWWSSNTVQFLQKRPDECGNRGVKFEPPQGFMDLTIPGTDVSRSYSPANLPNPEGRLEFLIRVLP EGRFSDYLRNDARVGVLSVKGPLGVFGLKERGMAPRYFVAGGTGLAPVVMVRQMQEWTAPNETRIYFGVNTEPELFYIDEL KSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEQEGSPIDALREDLESSDANPDIVLCGPPGMIDAACELVSRGIPGEQVFEKFLPSGA A	5

[0090] 2. 재조합 단백질의 생합성 및 정제

[0091] 대장균 균주 BL21(DE3)[F⁻ompThsdS_B(rB⁻mB⁻)], pGro7/BL21(DE3)[F⁻ompThsdS_B(rB⁻mB⁻)]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질 전환하였다. AMO-mimic과 BMO-m1을 제외한 cAMO, BMO-m2는 대장균 균주 BL21에 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질 전환하였으며, 앰피실린과 카나마이신에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린과 100 mg L⁻¹ 카나마이신, 0.4 mM CuSO₄ 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다.

[0092] AMO-mimic은 pGro7/BL21에 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질 전환하여 앰피실린과 카나마이신, 클로로암페니콜에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린과 100 mg L⁻¹ 카나마이신, 20 mg L⁻¹ 클로로암페니콜, 0.5 g L⁻¹ 아라비노스와 0.4 mM CuSO₄ 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다.

[0093] BMO-m1은 앰피실린에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100mg L⁻¹ 앰피실린, 0.4 mM CuSO₄ 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다.

[0094] 배지 탁도(O.D.₆₀₀)가 약 0.6에 도달할 때, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM)을 첨가하여 유전자의 발현을 유도하였다. 20°C에서 14시간 배양 후, 배양한 대장균을 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다.

[0095] 분리된 상등액을 먼저 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 재조합 단백질을 농축하고 버퍼 교환을 진행하여 정제된 재조합 단백질을 얻을 수 있었다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[0096] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[0097] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL

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

2) 농축과 버퍼교환

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

3. 제조된 cAMO, AMO-, BMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도 분석

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

4. 제조된 cAMO, AMO-, BMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 구조 분석

상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM) 촬영을 하였다. 단백질의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2 % (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 단백질 이미지를 200 kV에서 작동하는 Tecnai 20(FEI, Hillsboro, Oregon, U.S.A.) 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 구형 나노입자가 형성된 것을 확인하였다. 추가적으로 DLS(dynamic light scattering) 분석을 통하여 cAMO는 27.9±4.7 nm, AMO-mimic은 29.8±1.3 nm, BMO-m1은 17.6±4.9 nm, BMO-m2는 15.2±4.0 nm의 크기를 지니는 구형 나노입자를 형성함을 확인하였다. (도 3)

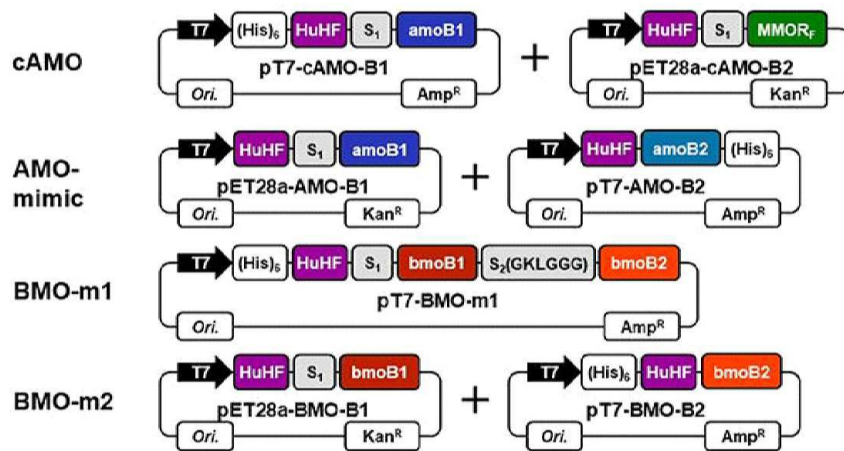
제조된 cAMO 재조합 단백질의 구조 분석을 위하여 X-ray absorption spectroscopy (XAS) 분석을 하였다. 단백질의 X-ray absorption near-edge structure (XANES) 및 Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) 분석을 위해, Tris 버퍼로 용매 교환된 샘플을 -80 °C에서 3시간동안 사전 냉동하고, 사전 냉동된 샘플은 동결 건조기(FDU-2100, DRC-1000, EYELA)를 사용하여 -110 °C에서 동결 건조되었다. XAS 분석은 Aichi Synchrotron Radiation Center (Aichi)의 XAFS beam line (BL11S2)에 의해 측정되었다. cAMO EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 구리 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였으며, 메탄 산화 반응이 진행된 샘플의 경우에는 반응을 하지 않은 샘플과 비교하여 리간드의 거리가 달라진 것을 확인하였으며 한 개의 피크(~2.2 Å)가 추가적으로 관찰되는 것을 확인하였다. XANES 분석 결과 1, 2가 구리이온(Cu(I), Cu(II))이 혼재되어 있음을 확인하였다. (도 4)

5. 제조된 cAMO, AMO-, BMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 및 부탄 가스 산화 활성 증명

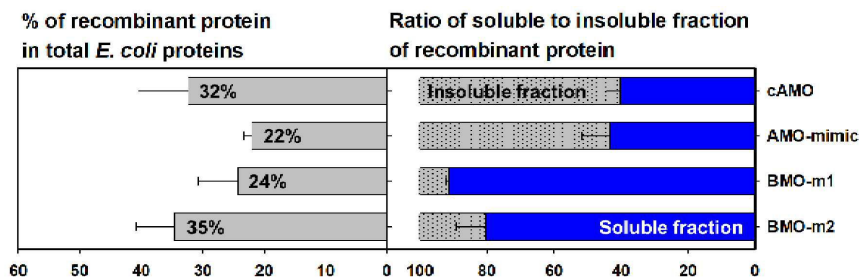
정제된 재조합 단백질의 메탄 및 부탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 20 mL의 septa-sealed vial(catalogue no. 5182-0837, Agilent)에 환원제인 NADH(0.2 mM) 또는 duroquinol(0.35 mM)을 포함하는 1 mL의 재조합 단백질 용액을 주입하였다. 재조합 단백질을 통한 메탄 및 부탄 산화 반응을 위해 19 mL의 headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 15 mL의 메탄 또는 부탄 가스와 4 mL의 공기를 주입함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 30°C의 인큐베이터에서 최대 24시간까지 효소 반응을 진행하였다. 그리고 효소 반응에 의해 발생하는 산화 생성물인 메탄올 또는 부탄올의 양을 가스 크로마토그래피(7890B GC, Agilent)를 통해 측정하여 누적 생산량을 계산하였다. (도 5)

도면

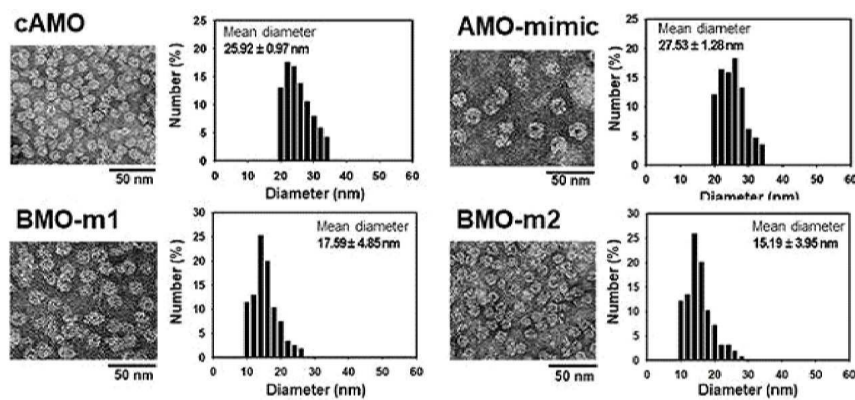
도면1



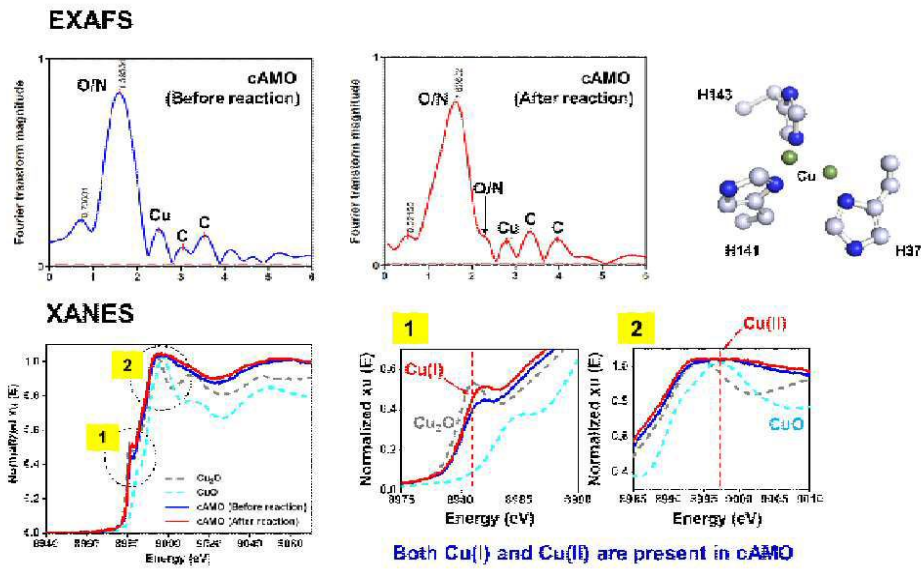
도면2



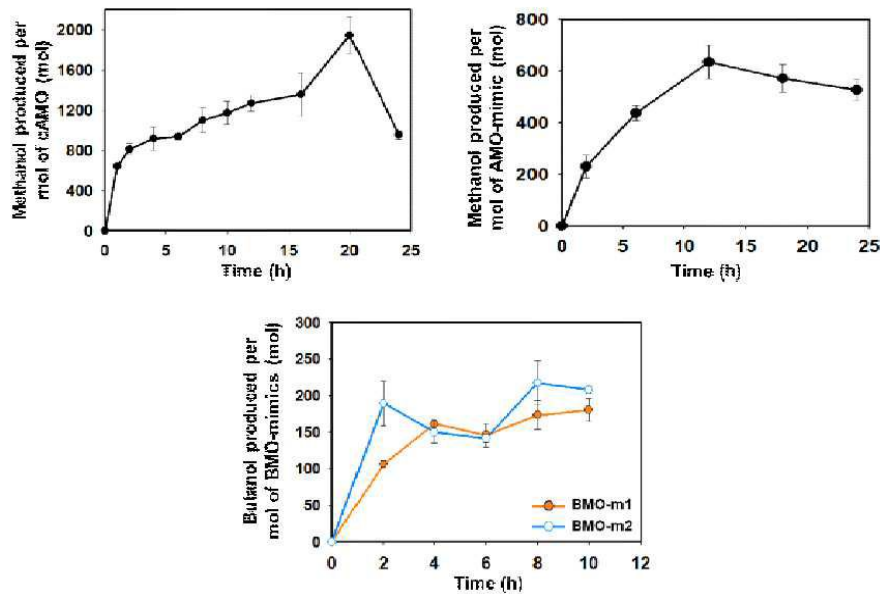
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> NEW PROTEIN CAPABLE WITH METHANE OR BUTANE OXIDATION ACTIVITY
- <130> 03010
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 140

<212> PRT

<213> Nitrosomonas europaea

<400> 1

His Gly Glu Arg Ser Gln Glu Pro Phe Leu Arg Met Arg Thr Val Gln

1 5 10 15

Trp Tyr Asp Ile Lys Trp Gly Pro Glu Val Thr Lys Val Asn Glu Asn

20 25 30

Ala Lys Ile Thr Gly Lys Phe His Leu Ala Glu Asp Trp Pro Arg Ala

35 40 45

Ala Ala Gln Pro Asp Phe Ser Phe Phe Asn Val Gly Ser Pro Ser Pro

50 55 60

Val Phe Val Arg Leu Ser Thr Lys Ile Asn Gly His Pro Trp Phe Ile

65 70 75 80

Ser Gly Pro Leu Gln Ile Gly Arg Asp Tyr Glu Phe Glu Val Asn Leu

85 90 95

Arg Ala Arg Ile Pro Gly Arg His His Met His Ala Met Leu Asn Val

100 105 110

Lys Asp Ala Gly Pro Ile Ala Gly Pro Gly Ala Trp Met Asn Ile Thr

115 120 125

Gly Ser Trp Asp Asp Phe Thr Asn Pro Leu Lys Leu

130 135 140

<210> 2

<211> 151

<212> PRT

<213> Nitrosomonas europaea

<400> 2

Gln Ala Gly Gln Ser Lys Val Ala Ala Leu Pro Val Ala Pro Asn Pro

1 5 10 15

Val Ser Ile Val Ile Thr Asp Ala Asn Tyr Asp Val Pro Gly Arg Ala

20 25 30

Leu Arg Val Thr Met Glu Val Thr Asn Asn Gly Asp Ile Pro Val Thr

35 40 45

Phe Gly Glu Phe Thr Thr Ala Gly Ile Arg Phe Ile Asn Ser Thr Gly
 50 55 60
 Arg Lys Tyr Leu Asp Pro Gln Tyr Pro Arg Glu Leu Ile Ala Val Gly
 65 70 75 80
 Leu Asn Phe Asp Asp Glu Ser Ala Ile Gln Pro Gly Gln Thr Lys Glu
 85 90 95

 Leu Lys Met Glu Ala Lys Asp Ala Leu Trp Glu Ile Gln Arg Leu Met
 100 105 110
 Ala Leu Leu Gly Asp Pro Glu Ser Arg Phe Gly Gly Leu Leu Met Ser
 115 120 125
 Trp Asp Ala Glu Gly Asn Arg His Ile Asn Ser Ile Ala Gly Pro Val
 130 135 140
 Ile Pro Val Phe Thr Lys Leu
 145 150
 <210> 3
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Nocardioides sp.
 <400> 3
 His Gly Glu Glu Ser Gln Gln Ala Phe Gln Arg Thr Ser Thr Val Val

 1 5 10 15
 Phe Tyr Asp Val Lys Phe Ser Asp Asp Thr Val Asp Val Gly Glu Ser
 20 25 30
 Val Thr Ile Thr Gly Met Val Arg Val Met Lys Ser Trp Pro Asp His
 35 40 45
 Thr Leu Glu Pro Pro Glu Met Gly Tyr Leu Thr Val Ser Thr Pro Gly
 50 55 60
 Pro Val Phe Tyr Val Gln Glu Arg Glu Met Ser Gly Glu Phe Thr Pro
 65 70 75 80

 Gln Ser Val Arg Ile Glu Lys Gly Ala Thr Tyr Pro Phe Lys Leu Val
 85 90 95
 Ile Lys Ala Arg Gln Pro Gly Thr Trp His Val His Pro Gly Phe Gly

100 105 110
 Val Glu Gly Ala Gly Thr Leu Val Gly Ala Gly Lys Asp Ile Thr Val
 115 120 125
 Asn Asp Thr Gly Val Phe Glu Asn Thr Val Thr Leu
 130 135 140
 <210> 4
 <211> 147
 <212> PRT

 <213> Nocardioides sp.
 <400> 4
 Gln Val Val Arg Thr Thr Pro Val Pro Leu Ala Glu Glu Glu Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Ala Pro Glu Ile Glu Ser Ile Arg Phe Asn Ala Glu Ala
 20 25 30
 Asp Thr Leu Thr Met Lys Leu Arg Val Glu Asn Thr Gly Ala Ala Ala
 35 40 45
 Val Arg Leu Gln Arg Val Gln Phe Gly Asp Val Glu Phe Val Ser Pro
 50 55 60

 Ser Phe Ala Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ala Gln Ala Met Thr Val Thr
 65 70 75 80
 Pro Asp Gln Ala Ile Glu Pro Gly Gly Ser Ala Thr Phe Thr Val Glu
 85 90 95
 Ile Gln Ser Glu Asp Leu Ile Val Arg Ser Leu Val Pro Val Asn Glu
 100 105 110
 Ala Glu Leu Arg Val Thr Gly Leu Leu Phe Phe Glu Asp Glu Thr Gly
 115 120 125
 Glu Gln Val Val Ser Glu Val Asn Glu Leu Thr Ser Ala Ile Leu Gln

 130 135 140
 Asp Phe His
 145
 <210> 5
 <211> 250

<212> PRT

<213> Methylococcus capsulatus

<400> 5

Cys Arg Ile Ser Phe Gly Glu Val Gly Ser Phe Glu Ala Glu Val Val

1 5 10 15

Gly Leu Asn Trp Val Ser Ser Asn Thr Val Gln Phe Leu Leu Gln Lys

20 25 30

Arg Pro Asp Glu Cys Gly Asn Arg Gly Val Lys Phe Glu Pro Gly Gln

35 40 45

Phe Met Asp Leu Thr Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Arg Ser Tyr Ser

50 55 60

Pro Ala Asn Leu Pro Asn Pro Glu Gly Arg Leu Glu Phe Leu Ile Arg

65 70 75 80

Val Leu Pro Glu Gly Arg Phe Ser Asp Tyr Leu Arg Asn Asp Ala Arg

85 90 95

Val Gly Gln Val Leu Ser Val Lys Gly Pro Leu Gly Val Phe Gly Leu

100 105 110

Lys Glu Arg Gly Met Ala Pro Arg Tyr Phe Val Ala Gly Gly Thr Gly

115 120 125

Leu Ala Pro Val Val Ser Met Val Arg Gln Met Gln Glu Trp Thr Ala

130 135 140

Pro Asn Glu Thr Arg Ile Tyr Phe Gly Val Asn Thr Glu Pro Glu Leu

145 150 155 160

Phe Tyr Ile Asp Glu Leu Lys Ser Leu Glu Arg Ser Met Arg Asn Leu

165 170 175

Thr Val Lys Ala Cys Val Trp His Pro Ser Gly Asp Trp Glu Gly Glu

180 185 190

Gln Gly Ser Pro Ile Asp Ala Leu Arg Glu Asp Leu Glu Ser Ser Asp

195 200 205

Ala Asn Pro Asp Ile Tyr Leu Cys Gly Pro Pro Gly Met Ile Asp Ala

210 215 220

Ala Cys Glu Leu Val Arg Ser Arg Gly Ile Pro Gly Glu Gln Val Phe

225	230	235	240
Phe	Glu	Lys	Phe
Leu	Pro	Ser	Gly
Ala	Ala		
245	250		