



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052496
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/88 (2006.01) C12N 15/77 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/88 (2013.01)
C12N 15/77 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0144832
(22) 출원일자 2016년11월02일
심사청구일자 2016년11월02일
(30) 우선권주장
1020150153613 2015년11월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
남윤성
대전광역시 유성구 문지로 14 (도룡동, 과학기술
원관리아파트) 3-201
정기준
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동) 한국과학
기술원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 플러스

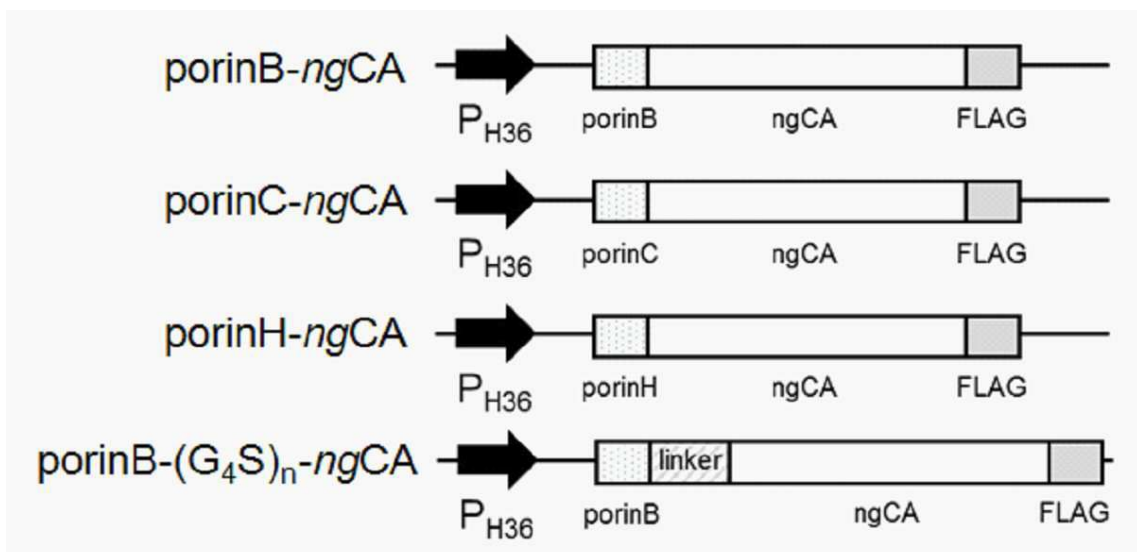
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 네이세리아 고노르호에아 유래 탄산무수화효소를 이용한 탄산무수화 활성이 증가된 형질전환체

(57) 요약

본 발명은 네이세리아 고노르호에아 유래 탄산무수화 효소를 이용한 탄산무수화 활성이 증가된 형질전환체 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 의해 세포 표면에 발현된 탄산무수화 효소의 경우 자체의 수화 활성 또한 우수하며, 열에 대한 안정성이 높아 산업적으로 유용한 전체 세포 효소 시스템으로서 이산화탄소의 효율적 고정에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Y 402/01001 (2013.01)

C07K 2319/035 (2013.01)

(72) 발명자

송석영

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동) 한국과학기술원

최재웅

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동) 한국과학기술원

구본일

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동) 한국과학기술원

명세서

청구범위

청구항 1

막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소가 순차적으로 연결된 구조를 갖는 이산화탄소의 탄산염 전환을 위한 아미노산 서열을 포함하는 단백질.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 막 단백질은 포린(porin)계열 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 단백질 링커는 하기 화학식 I의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질.

[화학식 I]

$(G_4S)_n$

G: 글리신(glycine), S: 세린(serine)이다;

n은 1 내지 10의 정수이다.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 탄산무수화 효소는 네이세리아 속(*Neisseria* sp.)에서 유래된 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 탄산무수화 효소는 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*)에서 유래된 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 아미노산 서열은 탄산무수화 효소의 C-말단에 화학식 II의 아미노산 서열을 갖는 표지단백질이 추가로 연결된 것을 특징으로 하는 단백질.

[화학식 II]

DYKDDDDK

D: 아스파르트산(aspartic acid), Y: 티로신(tyrosine), K: 리신(lysine).

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 8

제 7항의 핵산 분자를 포함하는 플라스미드.

청구항 9

제 8항의 플라스미드로 형질전환된 인간을 제외한 형질전환체.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 형질전환체는 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 형질전환체는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 12

제 7항의 핵산 분자를 인간을 제외한 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 단계를 포함하는 탄산무수화효소가 세포 표면에 발현되는 형질전환체의 생산 방법.

청구항 13

막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소가 순차적으로 연결된 구조를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 이용한 이산화탄소의 탄산염 전환 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 네이세리아 고노르호에아 유래 탄산무수화 효소를 이용한 탄산무수화 활성이 증가된 형질전환체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이산화탄소 방출을 감소시키는 것은 전세계적인 기후 재앙을 방지하기 위해 필수적인 것이며, 산업 원료로부터 방출되는 이산화탄소를 고정화하는 것은 인류의 생존을 위해 본질적으로 필요한 요소이다. 무기탄산염화(mineral carbonation) 방법은 다른 이산화탄소 고정화 방법에 비해 고정 효율이 좋기 때문에 많은 관심을 받아 왔다. 그러나, 무기물화(mineralization) 반응의 경우 매우 느린 반응 속도를 갖는 경우가 일반적이다.

[0003] 생체에서 이산화탄소를 중탄산염(bicarbonate)로 변화시키는 과정은 풍부하게 존재한다. 생체에서 상기 반응은 탄산무수화 효소(carbonic anhydrase, CA)의 존재로 인해 통상의 조건에서 빠르게 진행되며, 이산화탄소의 무기탄산염화 과정에 있어서의 율속단계(rate-limiting step)에 해당한다. 이산화탄소의 무기탄산염화 과정에서 상기 탄산무수화효소의 고효율성에도 불구하고, 짧은 반감기로 인해 실제적인 응용에는 제약이 많은 상황이다. 상기 효소의 안정성을 증가시키기 위해 다양한 고정화 방법이 도입되었으나, 대용량의 이산화탄소를 생산하는 장비에 사용하기에는 고비용이 소요되는 문제점이 있다. 탄산무수화 효소를 여러 유무기물질에 고정화해 안정화하는 방식이 여러 번 제시되었다. 키토산, 알긴산과 같은 고분자 비드나 레진, 금 등의 재료를 하이브리드 형태로 제작하여 틀을 만들고, 거기에 탄산무수화 효소의 아민기를 이용해 결합시킨다. 탄산무수화 효소는 소 유래 탄산무수화 효소가 많이 사용되었으나, 경우에 따라 미생물의 탄산무수화 효소나 사람의 탄산무수화 효소가 사용되기도 했다. 그러나 이 경우, 재료인 탄산무수화 효소를 정제하는 과정이 매우 복잡하고 값비싸, 산업적으로 정제 탄산무수화 효소를 사용하기란 불가능하다.

[0004] 따라서, 탄산무수화 효소를 경제적으로 활용하기 위해 세포의 표면에 다수를 발현시키는 것이 강력한 방법이 될 수 있다. 이러한 방법은 효소 정제의 필요성을 감소시키고, 효소를 보다 쉽게 다룰 수 있도록 해 주는 장점이 있다. 미생물의 전체 세포 시스템에서, 탄산무수화 효소는 미생물 유전체에 제조합된 플라스미드를 삽입하여 줌으로써 세포 내에 위치시키는 것이 가능하다. 만일 탄산무수화 효소가 세포질(cytoplasm) 상에 존재한다면, 이산화탄소 고정에 따른 pH 감소에 의해 세포 내부의 항상성에 영향을 미치게 된다. 또한, 세포막은 확산의 장벽으로 작용하기 때문에 세포질에서 발현되는 효소의 활성은 제한될 수 밖에 없다. 이 대신 최근 대장균 또는 효모의 주변세포질(periplasm) 또는 표면(surface)에 탄산무수화 효소를 위치시키는 방법이 제안되었다.

그러나, 이와 같은 방법은 탄산무수화 효소의 열적 안정성 측면에 있어 제약 사항이 존재한다. 탄산무수화 효소는 40 °C 근처에서는 안정하지만, 50 °C로 열처리 하였을 때 효소의 활성이 급격히 감소하는 단점이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Jo et al. Engineered Escherichia coli with periplasmic carbonic anhydrase as a biocatalyst for CO₂ sequestration. Appl Environ Microbiol 79(21):6697-705. 2013.
- (비특허문헌 0002) Jong-Uk et al. Construction of heat-inducible expression vector of Corynebacterium-glutamicum and C-ammoniagenes: Fusion of lambda operator with promoters isolated from C-ammoniagenes. Journal of Microbiology and Biotechnology 18(4):639-647. 2008.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서 본 발명에서는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 세포의 표면에 다수의 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*) 유래 탄산무수화 효소를 발현하여 이산화탄소 고정화 효과 및 효소의 열적 안정성을 현저히 상승시키고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소가 순차적으로 연결된 구조를 갖는 이산화탄소의 탄산염 전환을 위한 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다.
- [0008] 또한 본 발명은 상기 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 플라스미드에 관한 것이다.
- [0010] 또한 본 발명은 상기 플라스미드로 형질전환된 인간을 제외한 형질전환체에 관한 것이다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 핵산 분자를 인간을 제외한 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 단계를 포함하는 탄산무수화 효소가 세포 표면에 발현되는 형질전환체의 생산 방법에 관한 것이다.
- [0012] 또한 본 발명은 막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소가 순차적으로 연결된 구조를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 이용한 이산화탄소의 탄산염 전환 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 의해 세포 표면에 발현된 탄산무수화 효소의 경우 자체의 수화 활성 또한 우수하며, 열에 대한 안정성이 높아 산업적으로 유용한 전체 세포 효소 시스템으로서 이산화탄소의 효율적 고정에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 코리네박테리움 글루타미쿰 표면에서 ngCA의 발현을 위한 플라스미드 제작에 관한 것이다.
- 도 2는 (a) 링커의 길이 n=2일 때와 (b) n=3일 때 형광을 이용한 ngCA의 발현 위치 분석에 관한 것이다.
- 도 3은 (a) porinB-(G₄S)₂-ngCA 및 (b) porinB-(G₄S)₃-ngCA의 SDS-PAGE 결과를 음성대조군 및 porinB-ngCA의 결과와 비교한 것이다.
- 도 4는 (a) porinB-(G₄S)₂-ngCA 및 (b) porinB-(G₄S)₃-ngCA의 웨스턴 블롯 결과를 음성대조군 및 porinB-ngCA의 결과와 비교한 것이다.
- 도 5는 porinB-(G₄S)₂-ngCA 및 porinB-(G₄S)₃-ngCA의 SDS-PAGE 결과로부터 ngCA의 발현량을 측정한 것이다.

도 6은 porinB-(G₄S)₂-ngCA에 대해 공초점 현미경 스캔 이미지에서 ngCA의 발현 차이를 측정한 것이다.

도 7은 porinB-(G₄S)₂-ngCA 및 porinB-(G₄S)₃-ngCA의 수화 실험을 통한 탄산무수화 효소 활성을 측정할 결과이다.

도 8은 링커의 길이 n=1, 2, 3 및 6일 때 60 ℃에서 6 시간 열처리 수행시 열안정성을 측정한 결과이다.

도 9는 상업적으로 판매되는 탄산무수화 효소(commercial CA) 및 대장균 분리생산 탄산무수화 효소(free ngCA)에 대한 표면 발현된 탄산무수화 효소의 열 안정성을 (a) 표면발현된 porinB-(G₄S)₂-ngCA에 대하여 50 ℃에서 30 일 및 (b) 표면발현된 porinB-(G₄S)₂-ngCA에 대하여 60 ℃에서 48시간 동안 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소가 순차적으로 연결된 구조를 갖는 이산화탄소의 탄산염 전환을 위한 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서 상기 막 단백질은 세포 외막을 통해 연결 통로를 이루는 단백질인 경우 특별히 제한되지는 않으나 포린(porin)계열 단백질을 사용할 수 있으며, 일예로 포린 B, 포린 C 또는 포린 H로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 선택하여 사용할 수 있고, 일예로 본 발명의 실시예에서와 같이 포린 B 단백질을 사용할 수 있다.
- [0017] 또한 본 발명에서 상기 단백질 링커는 특별히 제한되지는 않으나 하기 화학식 I의 구조를 갖을 수 있다.
- [0018] [화학식 I]
- [0019] (G₄S)_n
- [0020] G: 글리신(glycine), S: 세린(serine)이다;
- [0021] n은 1 내지 10의 정수이다.
- [0022] 본 발명에서 상기 탄산무수화 효소는 특별히 제한되지는 않으나 네이세리아 속(*Neisseria* sp.)에서 유래된 것을 사용할 수 있으며, 일예로 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*)에서 유래된 것을 사용할 수 있다.
- [0023] 탄산 무수화 효소에는 여러 종류가 있으며, 인간 유래 탄산무수화 효소가 가장 높은 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, 인간 유래 세포는 그 크기와 복잡성 때문에 클로닝(cloning)에 제약이 따른다. 따라서, 차선택으로 인간 유래 탄산무수화 효소 II의 활성에 필적할 수 있는 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*) 유래의 탄산무수화 효소(ngCA)를 사용하는 것이 바람직하다. 이는 상기 효소의 크기가 작고 단량체의 형태를 지니고 있어 박테리아에서 발현하기에 장점이 있기 때문이다.
- [0024] 또한 본 발명에서 상기 아미노산 서열은 제한되지는 않으나 탄산무수화 효소의 C-말단에 화학식 II의 아미노산 서열을 갖는 표지단백질이 추가로 연결될 수 있다.
- [0025] [화학식 II]
- [0026] DYKDDDDK
- [0027] D: 아스파르트산(aspartic acid), Y: 티로신(tyrosine), K: 리신(lysine).
- [0029] 또 다른 양태로, 본 발명은 상기 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0030] 또한 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 플라스미드에 관한 것이다.
- [0031] 또한 본 발명은 상기 플라스미드로 형질전환된 인간을 제외한 형질전환체에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서 상기 형질전환체는 인간을 제외한 대상이라면 특별히 제한되지는 않으나, 바람직하게는 미생물을 대상으로 할 수 있으며, 보다 바람직하게는 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.)의 미생물을 대상으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 대상으로 할 수 있다.
- [0033] 코리네박테리움 글루타미쿰은 단백질 발현을 위한 대표적인 미생물 세포인 대장균에 비해 열에 대한 안정성이

현저히 우수하다. 코리네박테리움 글루타미쿰은 비병원성(non-pathogenic)이며, 포자를 형성하지 않는(non-sporulating) 그람-양성(Gram-positive) 박테리아로, 산업적인 용도로 널리 사용되어 왔다. 생물학적 유전자 조작에 있어 코리네박테리움 글루타미쿰은 재조합 복원 시스템의 고품질과 높은 복제개수(copy number) 플라스미드로 인해 유전적으로 보다 안정하다. 더욱이, 코리네박테리움 글루타미쿰의 세포외피(cell envelope)는 결정화된 단백질 층인 S-layer를 포함하고 있어, 매우 강도가 높다. 상기와 같은 안정적 특성에 의해, 코리네박테리움 글루타미쿰을 포함하는 산업 공정은 고농도에서 진행될 수 있다. 이에 따라, 코리네박테리움 글루타미쿰은 안정적인 전체 세포 생촉매(whole-cell biocatalyst)로의 활용을 위한 플랫폼으로 활용할 수 있다.

[0035] 또 다른 양태로, 본 발명은 상기 핵산 분자를 인간을 제외한 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 단계를 포함하는 탄산무수화 효소가 세포 표면에 발현되는 형질전환체의 생산 방법에 관한 것이다.

[0037] 또한 본 발명은 막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소가 순차적으로 연결된 구조를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 이용한 이산화탄소의 탄산염 전환 방법에 관한 것이다.

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

[0041] [실험재료]

[0042] 균주 및 유전자

[0043] 유전자 클로닝(gene cloning) 및 유지를 위한 숙주로 대장균(*E. coli* XL1-Blue; Stratagene Co., Santa Clara, CA, USA)을 사용하였으며, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*; ATCC 13032)을 탄산무수화 효소의 발현을 위한 주 숙주로 사용하였다.

[0044] 앵커링 단백질 유전자(anchoring protein gene)인 포린 B(porin B), 포린 C(porin C) 및 포린 H(porin H)는 각각 코리네박테리움 글루타미쿰 게놈으로부터 중합효소연쇄반응(PCR; C1000 Thermal Cycler, BioRad, Hercules)을 통해 확보하였다. 각각의 PCR 산물은 *Bam*HI 및 *Xba*I 제한효소로 절제한 후 pCES208 플라스미드(Jong-Uk et al., 2008)에 클로닝(cloning)되었다.

[0046] 합성 탄산무수화 효소

[0047] 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*) 유래의 탄산무수화 효소(*ngCA*)의 고발현을 위해 원래의 *ngCA* 유전자(GenScript Co., Piscataway, NJ, USA)의 코돈 빈도(codon frequency)를 조사하여, 코돈 최적화된 탄산무수화 효소 유전자를 합성하고, 중합효소연쇄반응을 통해 증폭하였다.

[0048] 증폭된 유전자를 상기와 동일한 제한효소를 사용하여 절제한 후 각각의 산물을 준비된 플라스미드에 클로닝하였다.

[0049] 유전자 발현 여부 검출이 보다 잘 이루어지도록 하기 위해 *ngCA* 효소 C-말단에 표지단백질(flag-tag; 서열 DYKDDDDK)를 융합시켰다.

[0050] 플라스미드를 제작하는 동안, 대장균은 37 °C, LB(Luria-Bertani)배지(트립톤 10 g/L, 효모추출물 5 g/L, 염화나트륨 5 g/L; BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 배양시켰다. DNA의 조작 방법은 통상적으로 널리 알려져 있는 일반적인 방법으로 수행하였다.

[0052] [시험예 1] 코리네박테리움 글루타미쿰 표면에서 *ngCA*의 발현

[0053] 하기 표 1과 같이 유전자를 포함하도록 플라스미드를 제작하여 사용하였다(도 1).

표 1

[0054] 막 단백질-단백질 링커-탄산무수화 효소

	막 단백질	단백질 링커	탄산무수화 효소
실시예 1	포린 B	(G ₄ S) ₂	ngCA
실시예 2	포린 B	(G ₄ S) ₃	ngCA
비교예 1	포린 B	-	ngCA
비교예 2	포린 C	-	ngCA
비교예 3	포린 H	-	ngCA

[0056] 각 플라스미드는 전기영동(Gene Pulser, Bio-Rad)을 통해 숙주세포인 코리네박테리움 글루타미쿰에 형질전환하였다. 음성 대조군으로는 pCES208 플라스미드를 가지고 있는 세포를 사용하였다.

[0057] 모든 형질전환된 세포는 250 mL 플라스크의 BHI(brain heart infusion; BD, Franklin Lakes, NJ, USA)배지에 접종한 후 30 °C에서 20 rpm으로 흔들어주면서 48 시간 동안 배양하였다. 배지에는 항생제로 25 µg/mL 농도의 카나마이신(kanamycin)을 첨가하였다.

[0059] [시험예 2] ngCA의 발현 분석

[0060] SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯(western blot)

[0061] 세포질, 막, 분비소포(secretosome)에서 ngCA의 발현 레벨은 SDS-PAGE와 웨스턴 블로팅(western blotting)을 순차적으로 시행하여 측정하였다. 상기 배양한 세포는 4 °C에서 6,000 rpm으로 10 분간 원심분리(Sonic, Vibra cell, Newtown, CT, USA)하여 수득하였다. 수득한 세포는 PBS(phosphate-buffered saline; 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.2) 버퍼에서 재침전시키고, 전체, 수용성, 불용성, 막 단백질 분획으로 분리하였다. 12% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동한 후, 상기 겔은 쿠마시 브릴리안트 블루(Coomassie brilliant blue; 50% 메탄올, 10% 아세트산, 1 g/L Coomassie brilliant blue R-250)에 담가 1 시간 동안 염색(staining)한 후, 탈색용액(destaining solution; 10% 메탄올 및 10% 아세트산)에서 탈색하였다.

[0062] 단백질 밴드는 트랜스블롯(transblot) 장치(Bio-Rad)를 이용하여 100 mA로 60 분간 폴리비닐 디플루오라이드 막(polyvinyl difluoride membrane; Roche, Basel, Switzerland) 위로 이동시켰다. 상기 막은 실온에서 1.5 시간 동안 블로킹 용액(Tris-buffered saline, 24.7 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 및 0.5% Tween-20®)과 5 wt% 탈지유(skim milk)와 함께 배양하였다. 상기 막은 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 단일클론 항-FLAG M2 항체(Sigma-Aldrich)와 함께 배양하여 표지단백질로 표지된 단백질의 면역검출(immune-detection)을 수행하였다. 배양 후, 각각의 막은 TBS-T로 5 분간 4 회 세척한 후 ECL Kit(Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Agent, GE Healthcare Bio-science AB)를 이용하여 단백질을 검출하였다.

[0064] 막 분획에서 발현된 ngCA의 정량을 위해 SDS-PAGE 겔에서 단백질의 함량을 실버 스테이닝 키트(silver staining kit; GE Healthcare)로 분석하였다. 막 단백질 분획에서 발현된 ngCA의 비율(%) 확정을 위해 Quantity One Software(Bio-Rad)를 사용하였다.

[0066] 상기 결과, 포린 B는 코리네박테리움 글루타미쿰에서 ngCA에 대한 고정화 능력이 있음을 나타냈다. 또한, 앵커링 단백질과 효소 사이의 펩티드 링커는 입체 장애(steric hindrance)를 방지하고, ngCA의 고정화가 잘 일어나도록 한다. 플라스미드에 추가적인 코돈을 삽입함으로써, ngCA와 앵커링 단백질은 각각 형질전환된 세포에서 Gly₄Ser (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)의 더블렛(doublet) 및 트리플렛(triplet)에 의해 결합되어 porinB-(G₄S)₂-ngCA 및 porinB-(G₄S)₃-ngCA를 형성하였다.

- [0068] 발현 세포의 유세포 분석(flow-cytometric analysis)
- [0069] 세포를 두 번 세척하고 PBS에 재침전시켰다. 그리고 1:250 비율로 희석된 상기 세포를 4 °C에서 1 시간 동안 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 단일클론 항-FLAG M2 항체(Sigma-Aldrich)로 면역염색(immunostaining)하였다. 상기 세포를 PBS 용액으로 1회 세척하여 결합되지 않은 탐침들(probes)을 제거하였다. 염색된 세포를 약 10^6 cells/mL의 농도로 희석한 후 FACS(fluorescent activated cell sorter; MoFlo XDP, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)로 분석하여 형광 강도를 측정하였다.
- [0071] 공초점 현미경 스캔(confocal microscopy scanning)
- [0072] 배양된 세포를 세척한 후 PBS에 재침전시켰다. FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 단일클론 항-FLAG M2 항체(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 면역염색(immunostaining)한 후, 세포를 4 %(v/v) 포름알데히드(Sigma-Aldrich)로 고정하고 형광 측정을 위한 봉입제(mounting medium; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)에 재침전시켰다. 세포 샘플을 공초점 현미경(Leica TCS SP8 Hyvolution (resolution = 140 nm, Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Strasse, Wetzlar, Germany))으로 관찰하였다. 이 때 여기 파장(excitation wavelength)은 488 nm 아르곤 레이저를 사용하였고, 영상은 552 nm 필터로 특정한 빛만 통과시켰다.
- [0074] 상기 결과, FITC가 세포들의 세포질에 존재하지 않았기 때문에, 형광 세포는 세포질이 아닌 세포의 표면에 *ngCA*를 나타내게 됨을 알 수 있었다(도 2). 대조군 중에서 *porinB-ngCA*가 발현된 세포 또한 다른 포린 패밀리(*porin* family)를 발현하는 다른 세포에 비해 형광 신호 강도가 강하였으나, G_4S 링커가 삽입된 *porinB-(G_4S)_2-ngCA* 또는 *porinB-(G_4S)_3-ngCA* 단백질이 발현된 세포의 경우 상대적인 형광 신호의 세기가 링커가 결합되지 않은 상기 대조군들에 비해 현저히 상승하는 것을 확인하였으며, 음성 대조군으로 *ngCA* 단백질이 발현되지 않은 세포의 경우 형광이 나타나지 않음을 확인하였다.
- [0076] 또한, *porinB-(G_4S)_3-ngCA*의 SDS-PAGE와 웨스턴 블롯 결과를 음성대조군 및 *porinB-ngCA*의 결과와 비교한 것도 3 내지 도 5에 도시하였다. 대조군인 *porinB-ngCA*의 경우 *ngCA*의 농도는 0.230 mg/mL로 측정되었고, 이는 *porinC-ngCA*의 경우에 비해 매우 높은 값을 나타내었다. 반면 링커를 통해 연결된 실시예 *porinB-(G_4S)_3-ngCA*에서는 *ngCA*의 농도가 상기 대조군보다 높은 0.27 mg/mL 정도로 증가하였다. 또한 대조군인 *porinB-ngCA*의 경우 세포 표면 상의 *ngCA*의 양이 0.15×10^{-1} pg/cell로 측정되었고, 이는 *porinC-ngCA*의 0.23×10^{-1} pg/cell에 비해 매우 낮은 값을 나타내었다. 반면 링커를 통해 연결된 실시예 *porinB-(G_4S)_2-ngCA*에서는 *ngCA*의 농도가 상기 대조군보다 높은 0.26×10^{-1} pg/cell을 나타내는 것을 확인하였다(도 5).
- [0078] *ngCA*의 발현 차이는 공초점 현미경 스캔 이미지에서도 확인할 수 있었다(도 6). 상기 결과로부터 *porinB-(G_4S)_2-ngCA*에서 *ngCA*가 세포 표면에 성공적으로 발현되었음을 확인하였다.
- [0080] [시험예 3] 수화(hydration) 실험을 통한 탄산무수화 효소(CA) 활성 측정
- [0081] 탄산무수화 효소는 이산화탄소를 수화시키며, 탄산수소 이온(HCO_3^-)은 반응 용액의 pH를 낮추는 역할을 한다. 따라서, 수화 반응이 일어나는 동안 pH의 변화를 감지할 수 있다. 40 mL 유리병을 구멍이 있는 격막 튜브(rubber speta sleeve)로 덮고, 20 mM Tris-HCl (pH 8.44-8.48; Sigma-Aldrich) 12 mL을 주입하였다. pH 측정기(Thermo scientific)의 탐침을 유리병을 덮고 있는 튜브의 구멍을 통해 주입하였다. 유리병에 400 μ L의 탄산무수화 효소 샘플을 주입하였다. 얼음 플라스크에 이산화탄소(Special gas, 대전, 대한민국)를 주입하였다. 8 mL의 이산화탄소-포화된 물을 주입한 직후 용액의 pH를 기록하였다. 상기 용액은 전체 반응에 걸쳐 750 rpm의 속도로 마그네틱 교반하였다.

[0082] 탄산무수화 효소의 활성은 pH가 8.0에서 7.0으로 변화하는데 필요한 시간으로 결정하였다. 이 시간 데이터는 아래 수식식 I에 의해 WA(Wilbur-Anderson)단위의 탄산무수화 효소 활성도로 변환될 수 있다.

[0084] [수식식 I]

$$Activity(Uml^{-1}O.D.^{-1}) = \frac{t_0 - t}{t} \times \frac{df}{Sample\ solution(ml^{-1}O.D.^{-1})}$$

[0085]

[0086] 상기 식에서, t_0 와 t 는 각각 비촉매화된 버퍼 및 탄산무수화 효소로 활성화된 용액에서 pH가 8.0에서 7.0으로 변화하는데 필요한 시간을 나타낸다. 또한 df 는 실험회차에 따른 실험적 차이를 보정하기 위한 희석 인자(dilution factor)이다.

[0087] 양성대조군으로, 상업적으로 판매되는 소 유래 탄산무수화 효소 (88% 단백질, 2613 U/mg, Sigma, BCA)가 사용되었다.

[0089] 상기 방법에 따라 수화 실험을 통한 탄산무수화 효소(CA) 활성을 측정한 결과를 도 7에 도시하였다. 이로부터 porinB-(G₄S)₂-ngCA 또는 porinB-(G₄S)₃-ngCA를 발현시킨 경우 pH가 빠르게 낮아지는 것을 알 수 있으며, 탄산무수화 효소의 활성이 가장 높음을 확인하였다.

[0091] [시험예 4] 링커의 길이에 따른 탄산무수화 효소의 열 안정성

표 2

[0092]

	막 단백질	단백질 링커	탄산무수화 효소
실시예 1	포린 B	(G ₄ S) ₂	ngCA
실시예 2	포린 B	(G ₄ S) ₃	ngCA
실시예 3	포린 B	(G ₄ S) ₁	ngCA
실시예 4	포린 B	(G ₄ S) ₆	ngCA
비교예 1	포린 B	-	ngCA

[0094] 링커의 길이에 따른 탄산 무수화 효소의 열 안정성을 비교하기 위하여, 상기 표 2의 실시예 1 내지 실시예 4의 실험군을 구성하고, 각 실시예의 단백질 링커는 상기 시험예에서와 동일한 과정을 통해 제조하고, 60 ℃에서 각각 6 시간 동안 열처리한 후, 잔여 효소 활성을 측정하였다.

[0095] 또한 링커의 길이 n=3인 경우와, n=0인 대조군에 대하여, 60 ℃에서 각각 2 시간 동안 열처리한 후, 잔여 효소 활성을 측정하였다.

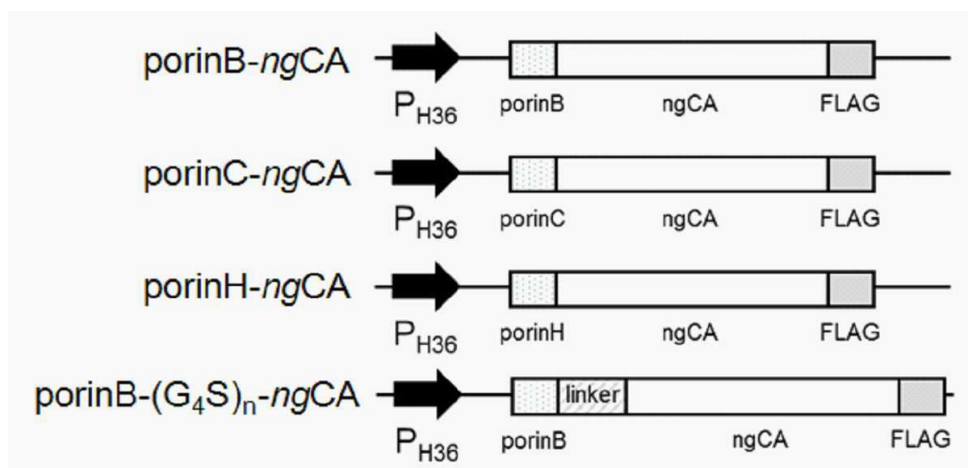
[0097] 이를 통해 열 안정성을 측정한 결과를 도 8에 도시하였다.

[0098] 링커의 길이 n이 각각 1, 2, 3 및 6인 경우에 대하여 잔여 효소 활성도를 측정한 결과, 각각 71.4%, 81.7%, 53.6% 및 48.5%의 평균 활성을 나타내어 모두 높은 활성을 유지하고 있으며, 특히 n=2일 때 81.7%로 가장 높은 활성을 나타내어 열에 대한 안정성이 porinB-(G₄S)₂-ngCA가 실험군 중 가장 우수함을 확인할 수 있었으며, 이후 장기적 열적 안정성은 porinB-(G₄S)₂-ngCA를 통해 확인하였다.

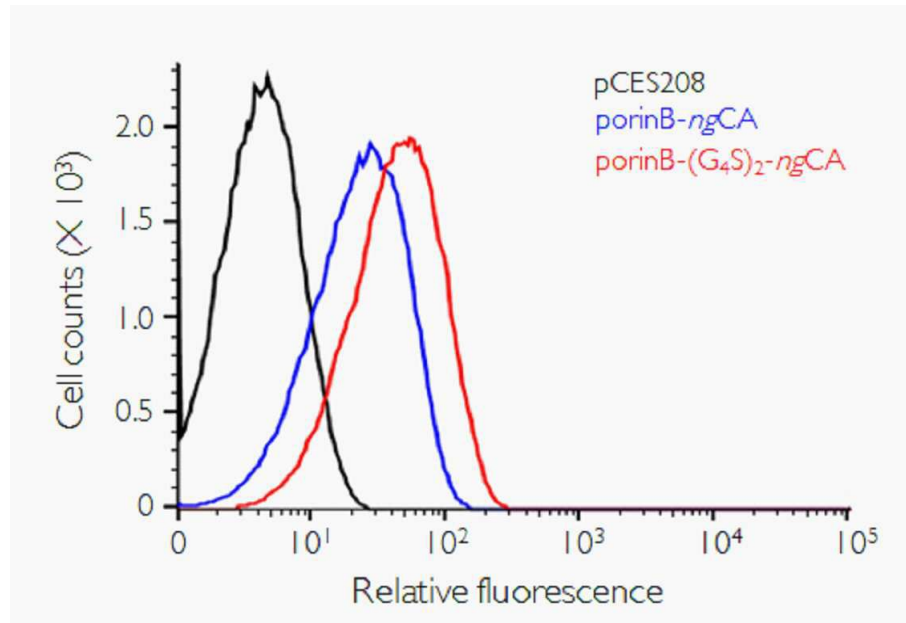
- [0100] [시험예 5] 상업적으로 판매되는 탄산무수화 효소(commercial CA) 및 대장균 분리생산 탄산무수화 효소(free ngCA)에 대한 표면 발현된 탄산무수화 효소의 열 안정성
- [0101] 형질전환된 세포와 배양된 세포를 이용하여 표면 발현된 ngCA의 열 안정성을 평가하였다. 양성대조군으로, 상업적으로 판매되는 소 유래 탄산무수화 효소 (88% 단백질, 2613 U/mg, Sigma, BCA)가 사용되었다. 세포 펠릿(pellets)은 4 °C에서 13,000 rpm으로 10 분간 원심분리(Eppendorf 5451R)를 통해 분리한 후 약 10 OD(optical density)의 농도로 PBS에 재침전시켰다. 샘플들은 50 °C와 60 °C의 전자식 건조기(Corning)에서 최대 30 일까지 배양하였다. 각 샘플의 세포는 6 시간 경과할 때마다 4 °C의 냉장고로 이동시킨 후 각 샘플의 수화에 의한 활성을 상기 시험예 3과 같은 방법으로 측정하였다. 매회 측정시 측정 당일 아침에 배양액에서 수득한 세포를 실험에 사용하였다.
- [0102] 대장균 분리생산 탄산무수화 효소(free ngCA)는 합성 단백질의 일반적 생산 도구인 대장균의 세포질에 발현된 것을 정제하여 사용하였다. 상기 free ngCA는 표면 발현된 탄산무수화 효소 대비하여 열 안정성을 비교하기 위한 대조군 그룹으로 사용하였다. 정제된 효소는 0.01 mg/mL의 농도로 희석하였다. 샘플들은 50 °C와 60 °C의 전자식 건조기(Corning, Corning, NY, USA)에서 배양하였다. 각 샘플의 세포는 6 시간 경과할 때마다 4 °C의 냉장고로 이동시킨 후 각 샘플의 수화에 의한 활성을 상기 시험예 3과 같은 방법으로 측정하였다.
- [0104] 상기 실험 결과를 도 9에 도시하였다. 열처리를 수행하지 않은 효소들에 대하여, 6시간 간격으로 열처리를 수행하여 잔여 활성을 측정한 값을 측정한 결과, 상기 도면에서 확인할 수 있는 바와 같이 porinB-(G4S)₂-ngCA의 경우 50 °C에서 7일 경과 후에도 평균 58.4%의 잔여 활성을 나타내고 있음을 알 수 있으나, 대조군인 BCA는 1.7%, free ngCA는 33.1%로 활성이 급격히 감소하였으며, porinB-(G4S)₂-ngCA의 경우 60 °C에서 24 시간 경과 후에도 43.4%의 잔여 활성을 나타내고 있는 반면, BCA는 4.4%, free ngCA는 7.1%로 잔여 활성이 급격히 감소한 것을 알 수 있었다. 도면에는 나타내지 않았지만, 37 °C에서는 30일 동안 약 121.3 %의 활성이 유지되었고, 그에 비해 BCA와 ngCA는 각각 39.3 %, 29.7 %로 감소하는 것으로 나타났다.
- [0105] 또한, porinB-(G4S)₃-ngCA의 경우 24 시간 경과 후에도 60°C에서 약 60%, 80°C에서 약 35%의 잔여 활성을 나타내고 있음을 알 수 있으나, 대조군인 BCA 및 free ngCA의 경우 열처리 수행 직후부터 잔여 활성이 급격히 감소하였으며, BCA의 경우 각각 약 15%와 약 5%, free ngCA의 경우 각각 약 5%와 약 1%의 잔여활성만이 남아, 열에 대한 활성의 감소가 실시예에 비해 현저히 큼을 알 수 있었다.
- [0107] 상기 결과로부터, 본 발명에 의해 세포 표면에 발현된 탄산무수화 효소의 경우 자체의 수화 활성 또한 우수하며, 열에 대한 안정성이 높아 산업적으로 유용한 전체 세포 효소 시스템으로서 이산화탄소의 효율적 고정

도면

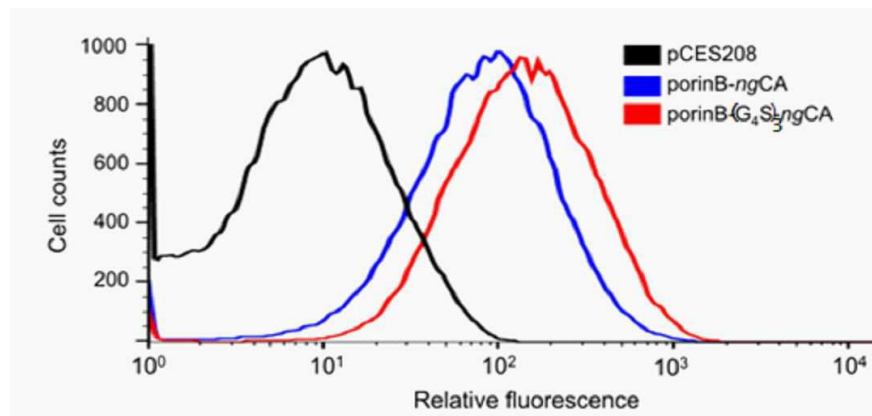
도면1



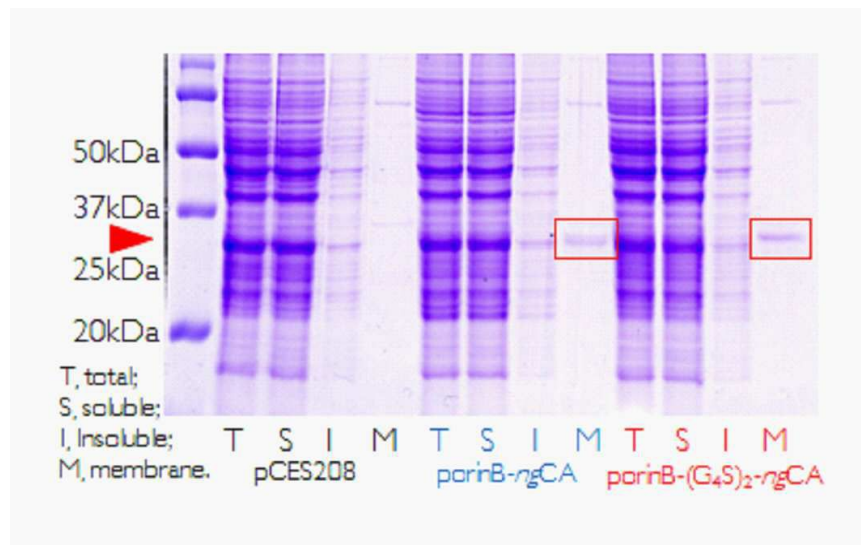
도면2a



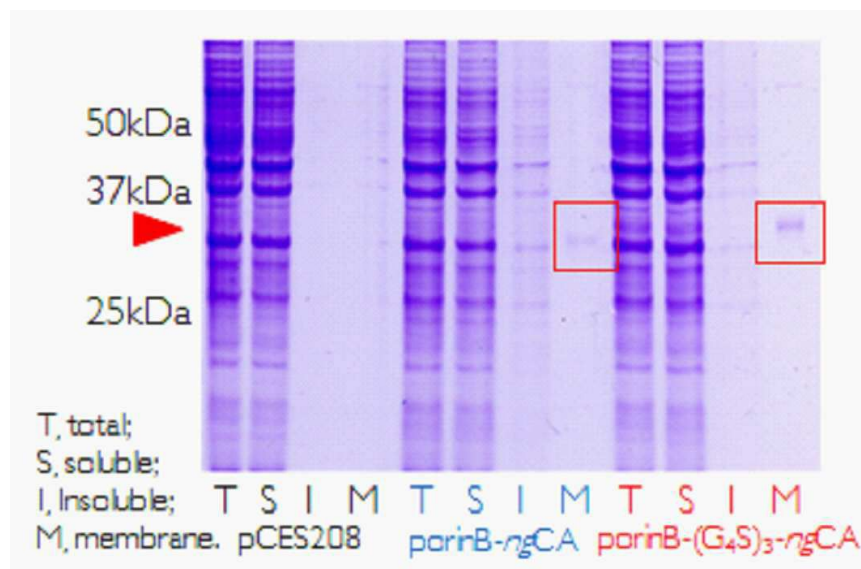
도면2b



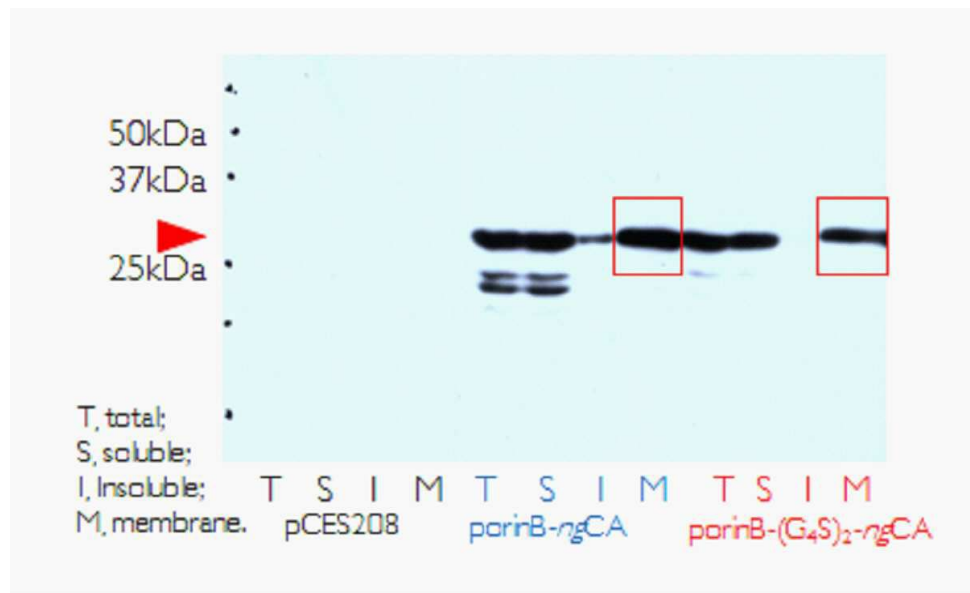
도면3a



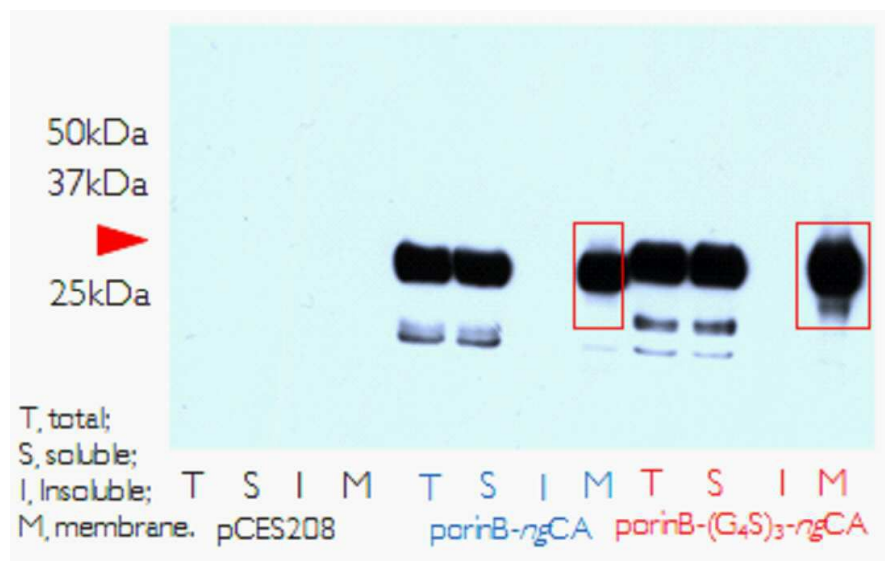
도면3b



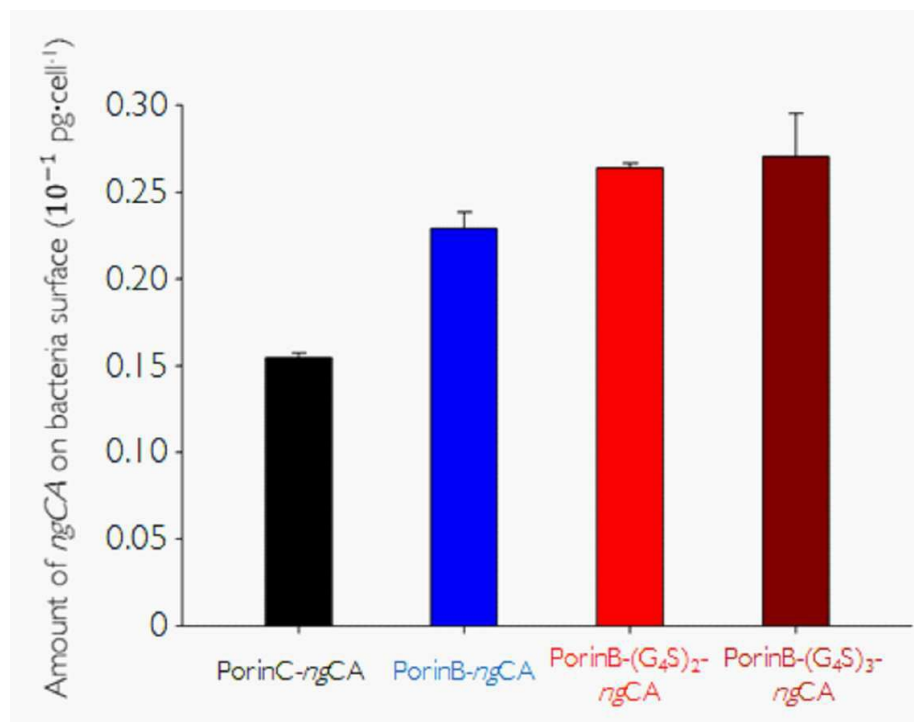
도면4a



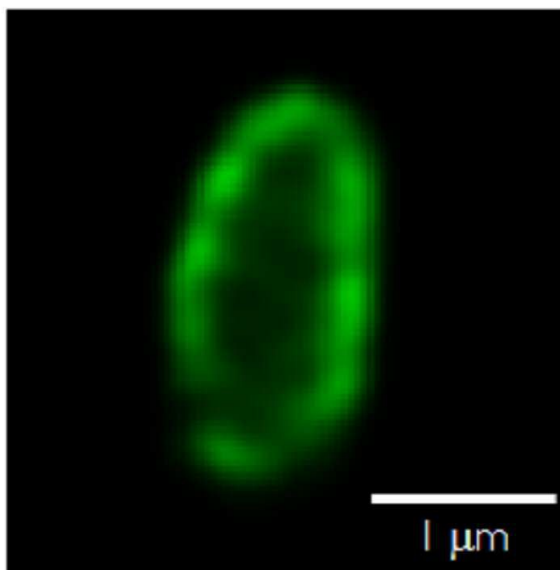
도면4b



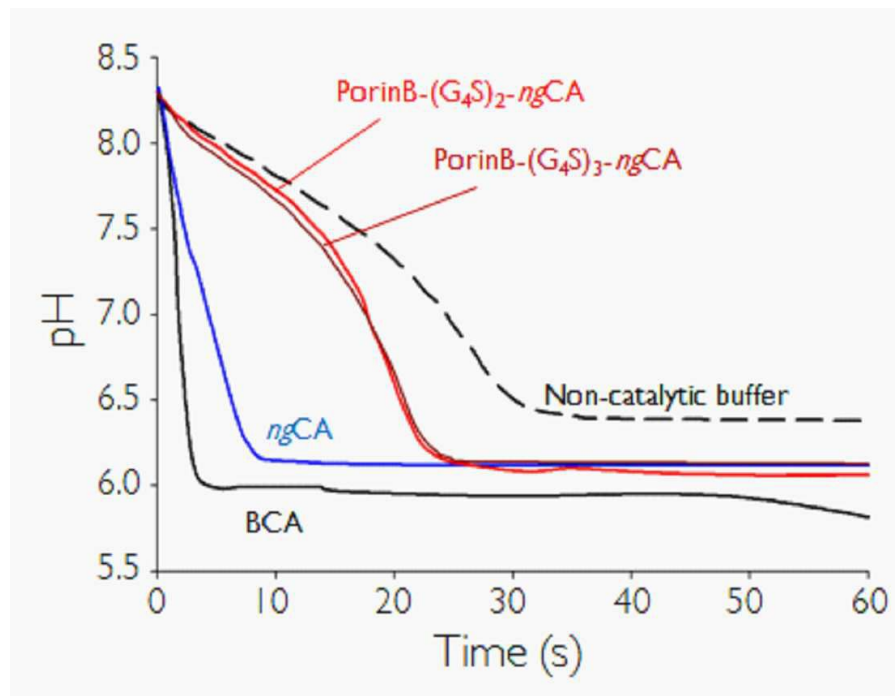
도면5



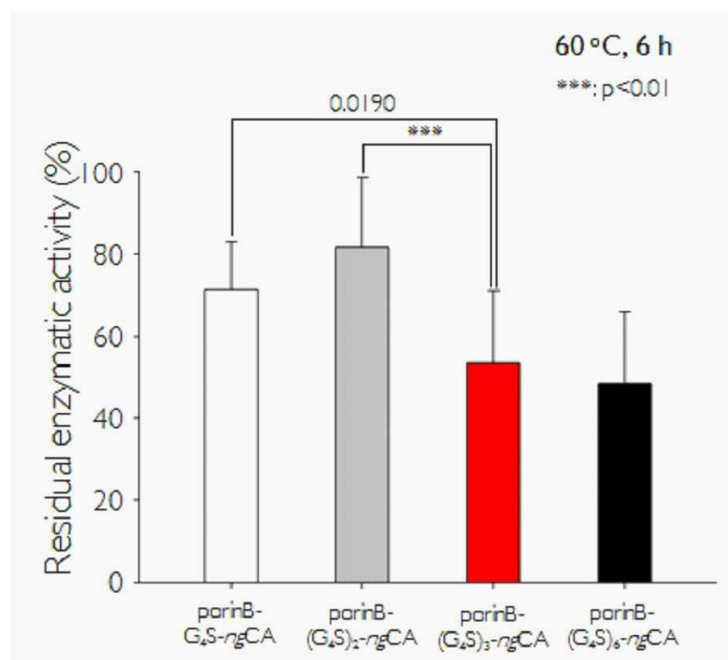
도면6



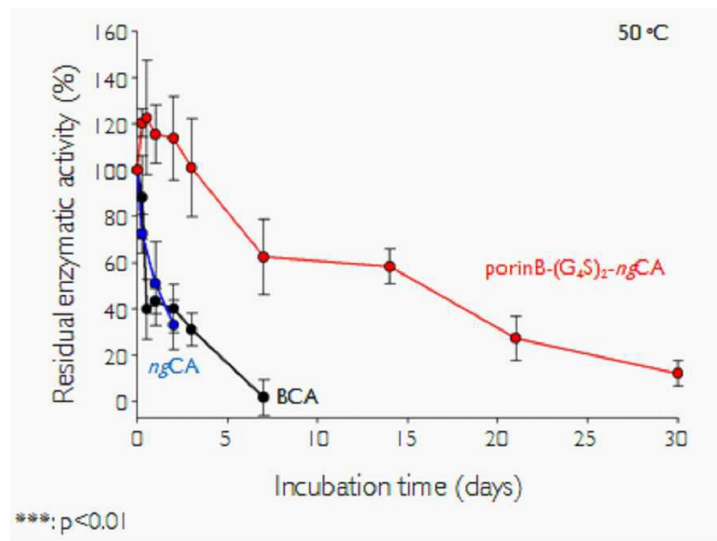
도면7



도면8



도면9a



도면9b

