

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052102 (43) 공개일자 2016년05월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 13/00 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0151907 (22) 출원일자 2014년11월04일 심사청구일자 2014년11월04일		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 이정국 서울특별시 마포구 송문길 58 염리삼성래미안아파트 105동 1504 김현준 서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 곤자가 국제학사 B1060 김의진 서울특별시 마포구 신수로6길 18, 3층 (74) 대리인 최규환

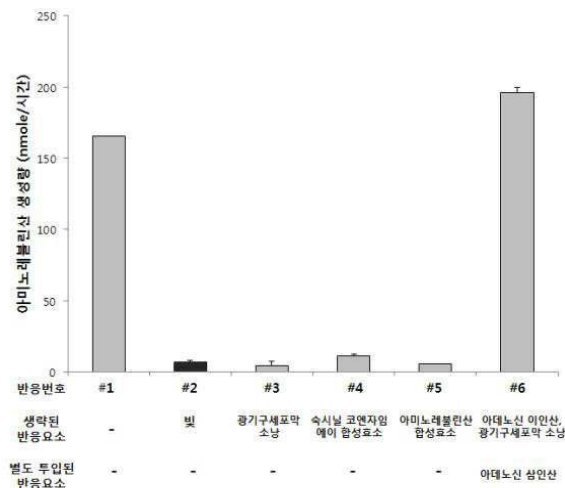
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 광합성 세포막 소낭을 이용한 아미노레불린산의 지속적 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 광합성 세균 유래의 광합성 세포막 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 이용하여 아미노레불린산을 지속적으로 생산하는 방법에 관한 것이다. 효소를 이용한 아미노레불린산의 합성은 구조가 간단한 숙신산 및 글리신으로부터 바로 아미노레불린산을 합성할 수가 있기 때문에 반응이 간소화 된다는 장점이 있으나, 효소를 이용할 경우 조효소의 높은 단가가 현실적인 문제가 될 수 있다. 본 발명은 광합성 세포막 소낭의 기능을 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소의 작용에 접목함으로써 아데노신 이인산이나 코엔자임 에이 같은 값비싼 반응물들을 반응액 내에서 재사용함으로써, 저렴한 숙신산 및 글리신으로부터 상대적으로 값비싼 아미노레불린산을 보다 낮은 생산단가로 생산할 수 있는 장점을 갖는다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201332018.01

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술 파이오니어 사업

연구과제명 광합성 생체소재 활용 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2014.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle), 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase) 및 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase)를 이용한 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)의 생산방법에 있어서, 상기 방법은 상기 소낭에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산(inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 2

다음의 단계를 포함하는 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)의 생산방법:

- a) 광합성 세포막 소낭(vesicle)에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산(inorganic phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 단계;
- b) 상기 단계 a)에서 형성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 변환되는 에너지를 이용하여 숙신산(succinic acid) 및 코엔자임 에이(coenzyme A)로부터 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)를 제조하는 단계;
- c) 상기 단계 b)에서 제조된 숙시닐 코엔자임 에이로부터 아미노레불린산을 제조하는 단계; 및
- d) 상기 단계 b)에서 변환된 아데노신 이인산과 무기인산이 단계 a)의 아데노신 삼인산 형성을 위해 재사용되는 단계.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 광합성 세포막 소낭은 자색비유황세균(purple nonsulfur bacteria)으로부터 분리된 광기구 세포막 소낭(chromatophore membrane vesicle)과 조류(Algae) 및 남세균(cyanobacteria)으로부터 분리된 틸라코이드 세포막 소낭(thylakoid membrane vesicle)으로 구성된 군으로부터 선택되는 소낭을 포함하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 단계 b)는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase)를 촉매로 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 숙신산과 코엔자임 에이로부터 숙시닐 코엔자임 에이를 합성하는 과정 및 아데노신 삼인산으로부터 아데노신 이인산과 무기인산으로 변환되는 과정을 촉매하는 효소인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 상기 단계 c)는 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase)를 촉매로 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 아미노레불린산 합성효소는 숙시닐 코엔자임 에이와 글리신(glycine)으로부터 아미노레불린산을 합성하는 과정 및 이산화탄소와 코엔자임 에이를 발생시키는 과정을 촉매하는 효소인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 아데노신 이인산은 상기 광합성 세포막 소낭의 광합성 과정에 재사용되어 추가적인 투입이 필요하지 않은 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 코엔자임 에이는 상기 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소가 촉매하는 반응에서 숙시닐 코엔자임 에이를 합성하는데 재사용되어 추가적인 투입이 필요하지 않은 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 광합성 세균 세포막의 소낭 : 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 : 아미노레불린산 합성효소의 특이활성의 비는 1:1:1 내지 20:1:1인 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 11

a) 광합성에 의한 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)의 공급 수단으로서 광합성 세포막의 소낭(vesicle); 및

b) 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid) 합성반응 촉매 수단으로서 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase) 및 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase);

를 포함하는 아미노레불린산의 지속 생산용 시스템.

청구항 12

제 11 항에 따른 시스템에 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)을 합성하기 위한 기질로서 숙신산(succinic acid) 및 글리신(glycine)을 첨가하는 단계를 포함하는 아미노레불린산의 지속 생산방법.

청구항 13

광합성 세포막 소낭(photosynthetic membrane vesicle), 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase) 및 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase)를 포함하는 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid) 생산용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광합성 세균으로부터 분리된 광합성 세포막 소낭을 이용한 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)의 지속적 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대의 화석연료의 고갈은 기술개발의 필요성을 증가시켰다. 이러한 대체에너지 후보 중 하나로 활발히 연구되고 있는 것이 빛에너지이다. 빛에너지의 원천은 태양이며, 이 때문에 앞으로 수십억년 동안은 고갈될 걱정이 없다. 또한, 그 작용과정에서 공해를 발생하지 않아 청정에너지로서 각광받고 있다.

[0003] 빛에너지를 이용하는 방법으로 많이 연구되고 있는 태양전지(photovoltaic cell) 장치는 빛에너지를 전기에너지로 바로 전환하는 기술이다. 그리고 이에 발맞추어 생명과학 분야에서는 광합성 세균에 대한 연구가 활발하게 진행되어, 광합성세균을 제어하고 이용하려는 시도가 계속되고 있다. 광합성 세균은 빛에너지를 화학에너지로 전환하기 때문에 태양전지와는 다른 유형의 빛에너지 이용방법이며, 이렇게 전환된 화학에너지는 고분자 유기물의 생합성에 사용된다. 또한, 이렇게 생성된 고분자 유기물은 광합성 세균의 세포내에 축적되거나 세포 외부로 분비된다. 따라서 유전적 변이를 이용하여 이런 유기물의 생성량을 증진하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Wang *et al.* 2012. *Frontiers in Microbiology* 3: 344). 이런 유기물에는 지방산, 알코올, 수소와 같은 생체 연료(biofuel), 및 이소프렌(isoprene), 폴리 베타 히드록시 뷰티레이트(poly-β-hydroxybutyrate) 등과 같은 산업적으로 유용한 화합물들이 포함된다.

[0004] 광합성은 크게 식물, 조류 및 남세균(cyanobacteria)에서 나타나는 산소발생(oxygenic) 광합성과 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria), 자색유황세균(purple sulfur bacteria), 녹색비유황세균(green non-sulfur

bacteria), 녹색유황세균(green sulfur bacteria) 및 헬리오박테리아(Heliobacteria)에서 나타나는 비산소발생(anoxigenic) 광합성으로 나눌 수 있다. 세균의 광합성은 광합성 세포막(photosynthetic membrane)이라는 세포 구조에서 수행되며, 그 종류에는 틸라코이드 세포막(thylakoid membrane, TM)과 광기구 세포막(chromatophore membrane, ICM)이 있다.

[0005] 산소발생 광합성은 세균 내부의 틸라코이드 세포막(thylakoid membrane, TM)에서 수행된다. 광합성 과정에서 물을 전자공여체(electron donor)로 사용하여 산소가 형성되며, 빛 에너지에 의해 물에서 빠져나온 전자는 일련의 전자전달과정을 거치면서 최종적으로 니코틴 아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADP^+)을 환원시켜 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)가 생성된다. 또한 전자전달과정에서 전자가 단백질 복합체(complex)를 거치면서 양성자 농도구배(Proton motive force)를 형성하는데 이는 아데노신 삼인산 합성효소(ATP synthase)에 의해 아데노신 이인산(Adenosine dinucleotide, ADP)과 무기인산(inorganic phosphate)이 아데노신 삼인산(Adenosine triphosphate, ATP)으로 전환되는 동력으로 쓰인다. 생성된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)은 피리딘 뉴클레오타이드 수소전이효소(pyridine nucleotide transhydrogenase)에 의해서 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)로 전환될 수 있다.

[0006] 비산소발생 광합성을 수행하는 자색비유황세균은 원형질막(plasma membrane) 안쪽으로 광기구 세포막(chromatophore membrane, ICM)이라는 특이적인 구조를 가지고 있는데, 이곳에는 광합성 기구(photosynthetic apparatus)들이 밀집되어 있는 것으로 알려져 있다. 자색비유황세균의 광합성은 순환적 전자전달(cyclic electron flow)에 의해 이루어진다. 광반응 중심체(reaction center)내의 박테리오클로로필 에이(bacteriochlorophyll a)는 빛을 받아서 전자를 방출하게 되는데 이 전자는 일련의 전자 운반체(electron carrier) 및 단백질 복합체를 거치면서 다시 광반응중심체 내의 박테리오클로로필 에이에 도착한다. 이 과정을 거치면서 양성자 농도구배를 형성하게 되며, 이를 이용하여 아데노신 삼인산 합성효소가 아데노신 이인산과 무기인산을 아데노신 삼인산으로 전환한다. 한편, 광기구 세포막에 존재하는 복합체 I (complex I), 복합체 II (complex II)를 통해 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NAD^+)가 환원된 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)로 전환되는 역전자전달(reverse electron flow) 과정도 존재한다. 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NADH)는 피리딘 뉴클레오타이드 수소전이효소(pyridine nucleotide transhydrogenase)에 의해서 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 인산(NADPH)으로 전환될 수 있다.

[0007] 성숙한 광기구 세포막은 소낭(vesicle) 형태를 취하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 소낭은 세포 파쇄 후 원심분리를 이용하여 쉽게 분리할 수 있다(Tucker *et al.* 2010. Mol. Microbiol. 76: 833-847). 광기구 세포막에 대한 연구는 관련 유전자들의 발현부터 광기구 세포막의 형성 및 성숙까지 다방면에 걸쳐 많은 연구가 진행되어 왔지만, 광기구 세포막 자체를 산업적인 용도로 이용하려는 시도는 전무한 상태다. 따라서 본 발명에서 제시하는 광기구 세포막의 실제적 이용방법은 그 자체만으로 광기구 세포막의 활용가능성에 대해 새로운 시각을 제공할 수 있다.

[0008] 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid)은 생체 내에서 헴(heme) 또는 박테리오클로로필(bacteriochlorophyll) 같은 테트라피롤(tetrapyrrole)의 합성단계 중 가장 처음 생성되는 전구물질(precursor)이다. 아미노레불린산은 생체에 과량 투여 시 포르피린(porphyrin) 계열 물질의 합성을 증가시키는데 이런 물질들은 대부분 광민감성(photosensitivity)이 있어서 빛을 받을 경우, 생체에 치명적인 산화스트레스(일명, 광독성)를 유발한다. 이 때문에 아미노레불린산은 제초제 및 살충제로 많이 사용되고 있다(Rebeiz *et al.* 1984. Enzyme Microbiol Technol. 6: 390). 특히 아미노레불린산은 생분해성이 탁월하여, 환경친화적 제초제로 알려져 있다.

[0009] 의약품 산업에서는 아미노레불린산이 피부질환 치료제 및 화장품의 첨가물로 사용된다. 또한 암세포에 아미노레불린산을 첨가한 후 빛을 조사하여 암세포를 사멸시키는 광역학적 치료(photodynamic therapy)에도 쓰인다(Wachowska *et al.* 2011. Molecules 16: 4140-4164). 또한 최근에는 아미노레불린산의 항균, 살균효과를 이용하여 양식업에서 어류의 바이러스, 세균감염을 예방하기 위해 아미노레불린산을 투여하는 방법이 발명되기도 하였다(대한민국특허 출원번호 제10-2000-0024382호).

[0010] 아미노레불린산의 합성에 대해서는 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 및 대장균(*Escherichia coli*)의 대사공학적 조절을 통해 균체의 아미노레불린산 생산량을 증진시키려는 연구가 많이 진행되어왔다(Kang *et al.* 2011. Bioengineered bugs 2: 6). 또한 아미노레불린산 합성능력이 향상된 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*)를 이용하는 것에 대한 방법이 제안되기도 하였다(대한민국특허 출원번호 제 10-2011-0143640호). 하지만 실제로는 대부분의 아미노레불린산 생산은 반응이 복잡하고 단가가 높은 유기합성법에 의존하고 있는 현실이다(Beale *et al.* 1979. Phytochemistry 18: 441).

[0011] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 효소를 이용한 아미노레불린산의 합성은 구조가 간단한 숙신산 및 글리신으로부터 바로 아미노레불린산을 합성할 수가 있기 때문에 반응이 간소화 된다는 장점이 있으나, 효소를 이용할 경우 조효소의 높은 단가가 현실적인 문제가 될 수 있다. 이에 따라 본 발명자들은 남세균 또는 자색비유황세균과 같은 광합성 세균을 이용하여 아미노레불린산을 지속적으로 생산할 수 있는 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 상기 세균의 광합성 세포막 소낭을 분리하여 광합성 명반응 수행 기구를 구성하고 이에 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase) 및 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase)를 조합하여 조성물을 구성할 경우 단가가 매우 높은 아데노신 삼인산의 추가 투입 없이 지속적으로 아미노레불린산을 합성할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 따라서, 본 발명의 목적은 광합성 세포막 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 이용한 아미노레불린산의 생산방법을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 광합성 세포막 소낭에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(ADP)과 무기인산으로부터 아데노신 삼인산(ATP)을 형성하는 단계를 포함하는 아미노레불린산의 생산방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 광합성 세균 세포막의 소낭을 포함하는 아미노레불린산의 지속 생산용 시스템을 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 시스템에 숙신산(succinic acid) 및 글리신(glycine)을 첨가하는 단계를 포함하는 아미노레불린산의 지속 생산방법을 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 광합성 세포막 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 포함하는 아미노레불린산 생산용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 광합성 세포막 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 이용한 아미노레불린산의 생산방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 광합성 세균 세포막의 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 포함하는 아미노레불린산 생산용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명자들은 남세균 또는 자색비유황세균과 같은 광합성 세균을 이용하여 아미노레불린산을 지속적으로 생산할 수 있는 방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 상기 세균의 세포막에 존재하는 소낭을 분리하여 광합성 명반응 수행 기구를 구성하고 이에 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 조합하여 조성물을 구성할 경우 단가가 매우 높은 아데노신 삼인산의 추가 투입 없이 지속적으로 아미노레불린산을 합성할 수 있음을 확인하였다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 "광합성 세균(photosynthetic bacteria)"은 빛에너지를 이용하여 광합성을 수행할 수 있는 세균을 의미하며, 전자공여체의 종류에 따라 크게 산소발생 광합성 세균 및 비산소발생 광합성 세균으로 구분할 수 있다. 산소발생 광합성은 전자공여체가 물(H_2O)로서 산소를 발생하는 것을 그 특징으로 하며, 대표적으로는 남세균(Cyanobacteria)이 상기 산소발생 광합성 세균에 해당한다. 남세균은 상기 광합성을 수행하는 특이적인 세포막 구조인 틸라코이드 세포막(thylakoid membrane, TM)을 갖고 있다.
- [0023] 본 발명에서 사용된 용어 "틸라코이드 세포막의 소낭(vesicle)"은 상기 틸라코이드 세포막에 포함된 것으로, 두 종류의 광계(photosystem)와 전자전달 기능을 갖는 다수의 단백질들이 포함된 세포막 단위체를 말한다. 상기 틸라코이드 세포막의 소낭은 일반 세포막 소낭과는 달리 빛에너지를 이용하여 ATP 및 NADPH를 생산하는 능력을 갖는다.
- [0024] 본 발명에서 상기 틸라코이드 세포막 소낭을 수득할 수 있는 남세균은 제한되지 않으며, 바람직하게는 시네코시

스티스 속(*Synechocystis* sp.), 시네코코쿠스 속(*Synechococcus* sp.), 노스톡 속(*Nostoc* sp.), 아나베나 속(*Anabaena* sp.), 글로이오박터 속(*Gloeobacter* sp.) 및 시아노박테리움 속(*Cyanobacterium* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 남세균인 것이다.

- [0025] 비산소발생 광합성은 광합성 과정 중에 산소를 발생시키지 않는 것을 그 특징으로 하며, 대표적으로는 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria), 자색유황세균(purple sulfur bacteria), 녹색비유황세균(green non-sulfur bacteria), 녹색유황세균(green sulfur bacteria) 및 헬리오박테리아(*Helio bacteria*) 등에서 상기 비산소발생 광합성이 수행된다. 특히 자색비유황세균에서는 이러한 광합성 기전이 세포막의 내부 방향으로 만입되는 광기구 세포막(chromatophore membrane, ICM)에서 일어난다.
- [0026] 본 발명에서 사용된 용어 "광기구 세포막 소낭(vesicle)"은 상기 광기구 세포막에 포함된 것으로, 광반응 중심체와 광흡수체(light harvesting complex) 그리고 전자전달 기능을 갖는 다수의 단백질들이 포함된 세포막 단위를 말한다. 상기 광기구 세포막의 소낭은 일반 세포막 소낭과는 달리 빛에너지를 이용하여 ATP 및 NADH를 생산하는 능력을 갖는다.
- [0027] 본 발명에서 상기 광기구 세포막 소낭을 수득할 수 있는 자색비유황세균은 제한되지 않으며, 바람직하게는 로도박터 속(*Rhodobacter* sp.), 로도스피릴룸 속(*Rhodospirillum* sp.), 로도수도모나스 속(*Rhodopseudomonas* sp.), 로지오박터 속(*Roseobacter* sp.), 브래디리조비움 속(*Bradyrhizobium* sp.) 및 루비리박스 속(*Rubrivivax* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 자색비유황세균인 것이다.
- [0028] 상기 로도박터 속 자색비유황세균에는 로도박터 스페로이테스(*Rhodobacter sphaeroides*)를 비롯하여 로도박터 캡슐라투스(*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 아피그멘툼(*Rhodobacter apigmentum*), 로도박터 애스투아리(*Rhodobacter aestuarii*), 로도박터 블라스티쿠스(*Rhodobacter blasticus*), 로도박터 창렌시스(*Rhodobacter changlensis*), 로도박터 아조토포르만스(*Rhodobacter azotoformans*), 로도박터 오바투스(*Rhodobacter ovatus*), 로도박터 글루코니쿰(*Rhodobacter gluconicum*), 로도박터 조리(*Rhodobacter johrii*), 로도박터 리토랄리스(*Rhodobacter litoralis*), 로도박터 마리스(*Rhodobacter maris*), 로도박터 메갈로필루스(*Rhodobacter megalophilus*), 로도박터 비나이쿠마리(*Rhodobacter vinaykumarii*), 로도박터 비리디스(*Rhodobacter viridis*), 로도박터 마실리엔시스(*Rhodobacter massiliensis*), 로도박터 데니트리피칸스(*Rhodobacter denitrificans*), 로도박터 벨트캄피(*Rhodobacter veldkampii*) 등이 있다.
- [0029] 상기 로도스피릴룸 속 자색비유황세균에는 로도스피릴룸 루브룸(*Rhodospirillum rubrum*)을 비롯하여 로도스피릴룸 센테눔(*Rhodospirillum centenum*), 로도스피릴룸 인디엔시스(*Rhodospirillum indiensis*), 로도스피릴룸 오리제(*Rhodospirillum oryzae*), 로도스피릴룸 포토메트리쿰(*Rhodospirillum photometricum*), 로도스피릴룸 몰리쉬아눔(*Rhodospirillum molischianum*), 로도스피릴룸 숄푸렉시젠스(*Rhodospirillum sulfurexigens*) 등이 있다.
- [0030] 상기 로도수도모나스 속 자색비유황세균에는 로도수도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*)를 비롯하여 로도수도모나스 아시도필리아(*Rhodopseudomonas acidophila*), 로도수도모나스 분케르디(*Rhodopseudomonas boonkerdii*), 로도수도모나스 패칼리스(*Rhodopseudomonas faecalis*), 로도수도모나스 하우디아(*Rhodopseudomonas harwoodiae*), 로도수도모나스 줄리아리첸(*Rhodopseudomonas julialichen*), 로도수도모나스 오리제(*Rhodopseudomonas oryzae*), 로도수도모나스 판곤젠시스(*Rhodopseudomonas pangongensis*), 로도수도모나스 펜토세나텍시젠(*Rhodopseudomonas pentothentexigens*), 로도수도모나스 레노바켄시스(*Rhodopseudomonas rhenobacensis*), 로도수도모나스 셰르모톨레란스(*Rhodopseudomonas thermotolerans*) 등이 있다.
- [0031] 상기 로지오박터 속 자색비유황세균에는 로지오박터 디나이트리피칸스 (*Roseobacter denitrificans*)를 비롯하여 로지오박터 리토랄리스(*Roseobacter litoralis*), 로지오박터 프리오니티스(*Roseobacter prionitis*) 등이 있다.
- [0032] 또한, 상기 브래디리조비움 자색비유황세균에는 브래디리조비움 속(*Bradyrhizobium* sp.) 등이 있으며, 상기 루비리박스 속 자색비유황세균에는 루비리박스 젤라티노수스(*Rubrivivax gelatinosus*) 등이 있다.
- [0033] 본 발명은 틸라코이드 세포막 및 광기구 세포막 등에서 소낭을 수득하고, 상기 분리된 광합성 특이적 세포막 소낭을 이용한 아미노레불린산의 합성을 균체 외부에서 이루어지도록 하여, 다양한 생화학 반응을 진행할 수 있는 ATP를 이용하여 아미노레불린산을 지속적으로 생산하고자 고안된 것이다.
- [0034] 본 발명에서 광합성이 일어나는 조건이란, 광합성 세균의 명반응을 유도하기 위한 조건으로 적절한 빛(파장과 광도), 온도, 공기 조성을 필요로 하며, 당업자라면 광합성 세균의 구체적 종류에 따라 최적의 조건을 결정할 수 있을 것이다. 예를 들면, 남세균의 광합성은 약 20 내지 37℃, 혐기 또는 호기 조건, 약 5-500 micro

Einstein/m² · s (μmole photons/m² · s)의 광도 그리고 바람직하게는 400-700 nm 파장의 빛이 주어지는 조건에서 수행될 수 있다. 이러한 파장 영역을 충족시키기 위해 형광등과 LED 등을 광원으로 사용할 수 있다. 또한 자색 비유향 세균의 광합성은 약 20 내지 37℃, 혐기 조건이나 호기 또는 미세호기 조건, 약 3-300 Watts/m²의 광도 그리고 바람직하게는 350-1000 nm 파장의 빛이 주어지는 조건에서 수행될 수 있다. 여기서 미세호기 조건이란 산소의 분압이 5% 이내의 농도인 조건으로 정의할 수 있다. 이러한 파장 영역을 충족시키기 위해 백열등과 할로겐등(hallogen lamp) 등을 광원으로 사용할 수 있다.

[0035] 남세균의 명반응 기구를 포함하는 틸라코이드 세포막 소낭은 빛에너지를 이용하여 전자를 전달하는 과정에서 막 내외에서의 양성자 농도 구배를 만들고, 이러한 농도 구배에 의한 운동에너지를 동력으로 하여 아데노신 삼인산 합성효소의 작용을 통해 ADP 및 무기인산을 ATP로 전환시키는 능력을 갖는다. 또한 자색 비유향 세균의 광반응 중심체에서는 빛에너지에 의한 광화학 반응이 유도되어 순환식 전자 전달을 유도하게 되며, 역시 이 과정에서 발생하는 양성자의 농도 구배를 그 동력으로 하여 아데노신 삼인산 합성효소가 ATP를 합성하게 된다.

[0036] 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소에 의한 아미노레불린산의 합성반응에는 기질로서 아데노신 삼인산이 필요하다. 아데노신 삼인산은 숙신산이나 글리신 같은 다른 기질에 비해 단가가 매우 높기 때문에 아데노신 삼인산을 과량으로 넣고 아미노레불린산을 얻는 것은 경제적으로 이익이 없다. 아데노신 삼인산은 기질로써 이용될 때 아데노신 이인산으로 전환된다. 광합성 세균의 세포막 소낭은 광합성의 명반응을 통해 아데노신 이인산을 아데노신 삼인산으로 전환할 수 있다. 본 발명의 큰 특징 중 하나는 상기 광합성 세포막 소낭을 이용하면 아데노신 이인산이 상기 광합성 세포막 소낭의 광합성 과정에 재사용되어 추가적인 아데노신 삼인산의 투입 없이 지속적으로 아미노레불린산을 합성할 수 있다는 것이다.

[0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 광합성 세포막 소낭(vesicle)에 빛을 조사하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate, ADP)과 무기인산(phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 형성하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 형성된 아데노신 삼인산이 아데노신 이인산과 무기인산으로 변환되는 에너지를 이용하여 숙신산(succinic acid) 및 코엔자임 에이(coenzyme A)로부터 숙시닐 코엔자임 에이(succinyl-CoA)를 제조하는 단계; c) 상기 단계 b)에서 제조된 숙시닐 코엔자임 에이로부터 아미노레불린산을 제조하는 단계; 및 d) 상기 단계 b)에서 변환된 아데노신 이인산과 무기인산이 단계 a)의 아데노신 삼인산 형성을 위해 재사용되는 단계를 포함하는 아미노레불린산의 생산방법을 제공한다.

[0038] 아데노신 삼인산으로부터 아데노신 이인산과 무기인산으로 변환되는 과정 및 숙신산과 코엔자임 에이로부터 숙시닐 코엔자임 에이를 제조하는 과정은 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소에 의해 수행될 수 있다.

[0039] 또한, 상기 숙시닐 코엔자임 에이로부터 아미노레불린산을 제조하는 단계, 바람직하게는 숙시닐 코엔자임 에이와 글리신(glycine)으로부터 아미노레불린산을 합성하는 과정 및 이산화탄소와 코엔자임 에이를 발생하는 과정은 아미노레불린산 합성효소에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 큰 특징 중 또 다른 하나는 상기 코엔자임 에이가 숙시닐 코엔자임 에이를 합성하는데 재사용되어 추가적인 투입이 필요하지 않다는 것이다.

[0040] 본 발명에서 이용되는 광기구 세포막 소낭 : 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소의 특이활성(specific activity)의 비(Unit ratio)는 제한되지 않으며, 바람직하게는 1:1 내지 20:1이며, 보다 바람직하게는 3:1 내지 10:1, 가장 바람직하게는 8:1인 것이다. 광기구 세포막 소낭 : 효소의 비율을 8:1로 사용할 경우 효소의 특이활성으로 산출된 최대 속도에 근접한 속도로 아미노레불린산을 생산할 수 있다. 본 명세서에서 효소의 특이활성(specific activity)은 시료에 존재하는 단백질 중량 당 각 효소의 산물생산속도로 정의되며, 단위 단백질 중량 당 효소의 실제 산물생산능력을 의미한다.

[0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 광합성에 의한 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)의 공급 수단으로서 광합성 세포막 소낭(vesicle); 및 b) 아미노레불린산(5-aminolevulinic acid) 합성반응 촉매 수단으로서 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase) 및 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase);를 포함하는 아미노레불린산의 지속 생산용 시스템을 제공한다.

[0042] 본 발명에서 사용된 용어 "아미노레불린산의 지속 생산용 시스템"은 상기 광합성 세포막 소낭을 이용하여 추가적인 아데노신 삼인산의 투입 없이도 지속적으로 아미노레불린산을 생산할 수 있는 시스템으로써, 반응기, 키트, 장치, 설비 등을 포함하는 의미이다. 상기 시스템을 이용하면 아미노레불린산을 합성하기 위한 기질로서 숙신산 및 글리신의 첨가만으로도 아미노레불린산을 지속적으로 생산할 수 있다.

[0043] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명은 남세균의 틸라코이드 세포막으로부터 분리된 소낭 및 자색비

유황세균의 광기구 세포막으로부터 분리된 소낭을 동시에 포함하는 것이다.

[0044] 틸라코이드 세포막 소낭과 광기구 세포막 소낭은 흡수파장이 서로 달라 한 종류의 소낭이 흡수하지 않는 영역의 빛에너지를 다른 종류의 소낭이 흡수하므로, 두 종류의 광합성 세포막 소낭을 동시에 이용할 경우 보다 높은 효율로 ATP를 합성하여 아미노레불린산의 합성에 이용될 수 있다. 즉, 본 발명이 남세균의 틸라코이드 세포막으로부터 분리된 소낭 및 자색비유황세균의 광기구 세포막으로부터 분리된 소낭을 동시에 포함할 경우, 서로 다른 파장대의 빛, 예를 들어, 가시광선 파장대 및 적외선 파장대의 빛을 동시에 흡수하여 아미노레불린산의 합성의 효율을 높일 수 있다.

[0045] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명은 광합성 세포막 소낭으로 자색비유황세균의 광기구 세포막으로부터 분리된 소낭만을 이용하는 것이다. 이와 같은 구성은 아미노레불린산의 합성을 무산소 조건에서 수행할 경우보다 바람직한 구성이 될 수 있다.

[0046] 결과적으로 본 발명의 전체 알짜 반응(total net reaction)은 1당량의 숙신산 및 1당량의 글리신을 투입하여, 1당량의 아미노레불린산을 생성하고, 1당량의 이산화탄소를 방출하는 것이다. 이 때 아데노신 이인산, 무기인산 및 코엔자임 에이는 초기 투입량 이외의 추가적인 재투입이 없어도, 전체 반응이 진행되면서 반응 조성물 내에서 계속 재사용 될 수 있다. 따라서 단가가 상대적으로 비싼 아데노신 이인산 및 코엔자임 에이의 추가적인 투입 없이, 단가가 상대적으로 저렴한 숙신산과 글리신으로부터 지속적으로 아미노레불린산을 생산할 수 있게 된다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0048] (i) 본 발명은 광합성 세포막 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 이용한 아미노레불린산의 생산방법을 제공한다.

[0049] (ii) 또한, 본 발명은 광합성 세포막 소낭을 포함하는 아미노레불린산의 지속 생산용 시스템을 제공한다.

[0050] (iii) 본 발명에 따르면 광합성 세포막 소낭의 기능을 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소의 작용에 접목함으로써 아데노신 이인산이나 코엔자임 에이 같은 값비싼 반응물들을 반응액 내에서 재사용함으로써, 저렴한 숙신산 및 글리신으로부터 상대적으로 값비싼 아미노레불린산을 보다 낮은 생산단가로 생산할 수 있는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 광기구 세포막 소낭과 아미노레불린산 합성경로를 조합하여 아미노레불린산(ALA)을 합성하는 방법의 모식도이다. 아미노레불린산 합성경로는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase)와 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase)로 구성된다.

도 2는 실시예 1의 방법을 이용하여 광기구 세포막 소낭을 분리할 때 초고속 원심분리기(ultracentrifuge)와 서당밀도구배를 이용하여 광기구 세포막 소낭을 분리한 사진이다.

도 3a와 도 3b는 아미노레불린산 합성경로를 구성하는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소를 각각 정제하여 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS PAGE)을 통해 확인한 것이다.

도 4a는 광기구 세포막 소낭에 의한 아데노신삼인산 생성량을 시간에 따라 측정한 그래프이며, 빛(15 Watts/m²)의 존재 유무 및 광기구 세포막 소낭의 농도를 달리하여 시험하였다. 도 4b는 무산소조건과 유산소조건에서의 광기구 세포막 소낭에 의한 아데노신 삼인산 생성량을 비교한 그래프이다.

도 5는 숙신산 코엔자임 에이 합성효소에 의한 숙시닐 코엔자임 에이 합성을 시간에 따른 230 nm에서의 흡광도 변화량을 측정하여 확인한 것이다.

도 6은 아미노레불린산 합성효소에 의한 아미노레불린산의 생성량을 시간에 따라 측정한 그래프이다.

도 7은 15 Watts/m² 광도의 빛이 조사될 때 광기구 세포막 소낭 및 아미노레불린산 합성경로의 효소들을 조합하여 숙신산과 글리신으로부터 아미노레불린산이 생성되는 속도를 확인한 것이다. 반응번호 #1은 모든 구성요소를 반응액에 포함시켜 반응한 것이고, 반응번호 #2-#5는 각각 하나의 구성요소를 반응액에서 제외한 것이다. 반응번호 #6은 광기구 세포막 소낭을 반응액에서 제외하고, 아데노신 이인산 대신 아데노신 삼인산을 투입한

것이다.

도 8a는 15 Watts/m² 광도의 빛이 조사될 때 광기구 세포막 소낭과 아미노레불린산 합성경로의 효소들의 반응에 의한 아미노레불린산의 생성을 시간에 따라 측정한 것이다. 이때 광기구 세포막 소낭(ICM)과 아미노레불린산 합성경로의 효소(Enzyme)의 특이활성(specific activity)의 비율을 3:1, 5:1, 8:1 로 조절하여 시간에 따른 아미노레불린산의 생성량을 확인하였다.

도 8b는 15 Watts/m² 광도의 빛이 조사될 때 아미노레불린산 합성경로의 효소의 특이활성을 상대비 1로 고정시킨 후, 광기구 세포막 소낭의 특이활성 상대비를 0~12로 조절하면서 각 비율에서의 아미노레불린산 생산속도를 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0053] 실시예

[0054] 실시예 1: 광기구 세포막 소낭의 분리

[0055] 본 실시예에서는 광기구 세포막 소낭(chromatophore membrane vesicle)의 분리를 위해 자색비유황세균에 속하는 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphearoides* 2.4.1, ATCC BAA-808, Cohen-Bazire *et al.* 1956. J. Cell. Comp. Physiol. 49: 25-68)를 이용하였다. 로도박터 스페로이데스의 성장에는 시스트롬 최소배지(Sistrom. 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616)를 사용하였고, 그 조성은 표 1에 제시하였다. 먼저 로도박터 스페로이데스 균주를 5 ml의 시스트롬 배지가 담긴 시험관에 접종하고, 30℃, 250 rpm에서 진탕배양을 한다. 660 nm에서의 흡광도가 1.0 정도를 나타내는 세포농도가 되었을 때 18 ml 용량의 스크류 캡(screw cap) 시험관에 660 nm에서의 흡광도가 0.05 가 되도록 계대배양한다. 이 때, 시험관 내에 공기가 들어가지 않도록 시험관을 배지로 가득 채운 후 스크류 캡을 닫는다. 이를 15 Watts/m²의 광도로 조사되는 백열등 앞에서 온도를 30℃ 유지하며 18시간 혐기배양한다. 이렇게 배양한 균주를 260 ml 용량의 투명한 유리병에 8 내지 9 ml 접종하고, 산소가 들어가지 않도록 병에 배지를 가득 채우고, 마개를 닫은 뒤 15 Watts/m²의 광도로 조사되는 백열등 앞에서 온도를 30℃ 유지하며 18시간 혐기배양한다. 이후의 모든 분리과정은 내부 기체조성이 90%의 질소, 5%의 수소, 5%의 이산화탄소로 이루어진 혐기상자(anaerobic chamber, model 10, Coy laboratory product)안에서 수행하였다. 260 ml의 유리병에서 배양한 로도박터 스페로이데스 배양액을 4℃, 7,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 균체(cell pellet)를 수득하고, 수득한 균체는 4 ml의 트리스 버퍼(20 mM Tris, 1 mM EDTA)로 용해시킨 후 프로테아제 억제제 혼합액(protease inhibitor cocktail, Roche)을 제조사의 지시량만큼 첨가해 주었다. 이 후의 과정에서는 샘플을 얼음물에 넣어 온도를 낮게 유지하였다. 수득한 균체를 파쇄하기 위해 초음파파쇄기(sonicator, model VCX130, Sonics & Materials)를 이용하여, 100% 증폭(amplification)으로 2분간 초음파를 조사하고 2분간 얼음물에서 냉각시켰다. 이 과정을 4회 반복 후 샘플을 4℃, 7,000 g에서 10분간 원심분리하고, 그 상층액을 분리하였다. 상층액은 초고속원심분리기(Optima XE-90, Beckman Coulter)를 이용하여 4℃, 200,000 g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 이 후 상층액은 버리고, 광기구 세포막 소낭을 포함하는 침전물(pellet)을 트리스 버퍼 1 ml에 용해시킨 후 서당 밀도구배 원심분리(sucrose-density gradient ultracentrifuge)를 수행하였다. 서당 밀도구배의 각 층(layer) 구성은 아래에서부터 60%(w/v) 서당용액 8 ml, 40% 서당용액 1 ml, 20% 서당용액 1 ml로 이루어져 있으며 20%의 서당층 위에 샘플 1 ml를 올리고, 4℃, 200,000 g에서 4시간 동안 초고속원심분리를 하였다. 원심분리가 끝나면 40%의 서당용액 층과 20%의 서당용액 층 사이에 위치한 적갈색의 광기구 세포막 소낭(도 2)만을 분리하여, 인산 버퍼(10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)를 이용하여 1:1로 희석 후 일반 오염균의 증식을 막기 위해 카나마이신(Kanamycin)을 100 µg/ml로 첨가하고, 프로테아제 억제제 혼합액(Roche)을 제조사의 지시량에 따라 첨가 후, 반응에 사용하였다.

표 1

[0056]

로도박터 스페로이데스 배양용 시스트럼 최소배지 조성

첨가물	최종농도
KH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	8.5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.78 mM
L-Glutamic acid	0.67 mM
L-Aspartic acid	0.25 mM
Succinic acid	34 mM
Nitrilotriacetic acid	1.05 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.2 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.23 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	7 μM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.16 μM
EDTA	4.7 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	38 μM
MnSO ₄ ·H ₂ O	9.1 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6 μM
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.85 μM
H ₃ BO ₃	1.8 μM
니코틴산	8.1 μM
티아민염산염	1.5 μM
Biotin	41 nM

[0057]

실시예 2: 아미노레불린산 합성경로를 구성하는 효소를 암호화하는 유전자 확보

[0058]

아미노레불린산(5-aminolevulinic acid) 합성경로를 구성하는 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소(succinyl-CoA synthetase) 및 아미노레불린산 합성효소(ALA synthase)를 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현 및 정제하기 위해 두 효소를 암호화(coding)하는 유전자를 클로닝(cloning)하였다. 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 대장균(*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655)의 염색체 DNA(chromosomal DNA)를 주형(template)으로 하고, 서열번호 1을 전방 프라이머(forward primer), 서열번호 2를 후방 프라이머(reverse primer)로 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행함으로써 유전자 서열을 확보하였다(표 2). 동시에, 발현벡터(expression vector)인 pASK-IBA3plus(IBA)에 유전자를 접합하기 위해 유전자 양쪽 말단에 제한효소(restriction enzyme) *Bsa*I의 인식서열과 제조사(IBA)에서 권장하는 추가서열을 삽입하였다. 또한 유전자의 C-말단(C-terminus)에 스트렙 태그(Strep-tag)를 결합하기 위해 원래 유전자의 종결코돈(stop codon)을 제거하였다. 중합효소연쇄반응으로 얻어진 유전자는 pASK-IBA3plus 벡터와 접합하였다. 대장균의 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 두 개의 알파 단량체(α-subunit)와 두 개의 베타 단량체(β-subunit)으로 이루어진 테트라머(tetramer)이며, 알파 단량체와 베타 단량체는 각각 *sucD*와 *sucC*라는 유전자에 의해 암호화된다(Fraser *et al.* 1999, J. Mol. Biol. 285: 1633-1653). 두 유전자는 *sucC*, *sucD* 순으로 배치되어 있으며, *sucC*의 종결코돈이 *sucD*의 개시코돈(start codon)과 겹쳐져 있는 구조(pentanucleotide translational coupling, TAATG)이다. 서열번호 1과 2를 통해 획득한 유전자 절편(fragment)은 *sucC*, *sucD* 유전자를 모두 포함한다. 따라서 획득한 유전자 절편의 C-말단에 스트렙 태그를 결합 후 하나의 프로모터(promoter)를 통해 발현을 시키면, 알파 단량체(*sucD*)의 C-말단에 스트렙 태그가 붙어서 발현이 되고, 스트렙 태그가 없는 베타 단량체(*sucC*)는 알파단량체와 테트라머를 이루며 발현되기 때문에 결과적으로 두 단량체를 동시정제(copurify)할 수 있게 된다(도 3b).

표 2

[0059]

숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 유전자 서열 확보용 프라이머

서열번호	방향	서열
1	SCS-F	5'-AAAAAAGGTCTCGAATGAAGTACATGAATATCAG-3'
2	SCS-R	5'-AAAAAAGGTCTCTGCGCTTTTCAGAACAGTTTTCAGTG-3'

[0060] 아미노레불린산 합성효소는 자색 비유황세균의 일종인 로도박터 스페로이데스의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 3, 서열번호 4를 각각 전방, 후방 프라이머로 하여 중합효소연쇄반응을 통해 유전자서열을 확보하였다(표 3). 이 때, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소와 유사하게 제한효소 *Bsa* I 인식서열과 제조사(IBA)에서 권장하는 추가서열을 삽입하였고, 이를 pASK-IBA3plus 발현벡터에 접합하여, 결과적으로 C-말단에 스트랩 태그가 결합된 아미노레불린산 합성효소를 발현하는 구조물을 완성하였다.

표 3

[0061] 아미노레불린산 합성효소 유전자 서열 확보용 프라이머

서열번호	방향	서열
3	ALAS-F	5'-ACTAGTGGTCTCGAATGGACTACAATCTGGCACT-3'
4	ALAS-R	5'-AAGCTTGGTCTCAGCGCTGGCAACGACCTCGGCGCGAT-3'

[0062] 실시예 3: 아미노레불린산 합성경로를 구성하는 효소의 정제

[0063] 상기 실시예 2에서 제작한, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 유전자와 아미노레불린산 합성효소의 유전자가 각각 접합된 발현벡터를 이용하여 대장균 BL21(DE3)을 형질전환(transformation)하여 각각의 효소를 과발현하는 형질전환 BL21(DE3)균주를 얻었다. 효소의 정제를 위해 먼저 형질전환 된 균주를 먼저 5 ml의 LB(Luria-Bertani) 배지가 담긴 시험관에 접종하고 37℃, 250 rpm에서 12시간 동안 진탕배양하였다. 이 때 발현벡터를 가진 균주만을 선별해서 배양하기 위해 발현벡터의 마커(marker)인 앰피실린(ampicillin)을 50 µg/ml 농도로 배지에 첨가하였다. 12시간 후, 시험관의 배양액을 앰피실린 50 µg/ml이 첨가된 300 ml LB 배지가 담긴 1 L 용량의 플라스크(flask)에 접종하였다. 접종 시 600 nm에서의 최적흡광도가 0.05가 되도록 접종하고, 37℃, 250 rpm에서 600 nm의 흡광도가 0.4가 될 때까지 진탕배양하였다. 600 nm에서의 흡광도가 0.4에 도달하면, 효소의 발현을 유도하기 위해 무수테트라사이클린(anhydrotetracycline)을 0.2 µg/ml가 되도록 첨가한 후, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소를 발현하는 형질전환 균주는 37℃, 250 rpm에서, 아미노레불린산 합성효소를 발현하는 형질전환 균주는 30℃, 250 rpm에서 3시간 동안 진탕배양하고, 4,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체를 수득하였다. 수득한 균체는 5 ml의 버퍼W(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 용해하고, 프로테아제 억제제 혼합액(Roche)을 제조사의 권장량만큼 첨가하였다. 수득한 균체를 과쇄하기 위해 초음파과쇄기(Branson sonifier 250)를 이용하여, 아웃풋(output) 3으로 5분간 샘플에 초음파를 조사한 후 5분간 얼음물에서 냉각하는 과정을 3회 반복하였다. 4,000 g, 4℃에서 10분간 원심분리 후 수용성 효소들이 포함되어 있는 상층액을 분리하여 스트랩 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)수행하였다. 스트랩 태그를 이용한 정제는 제조사인 IBA의 권장방법으로 실시하여 최종적으로 상기 두 개의 효소를 수득할 수 있었다. 수득한 효소는 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)을 통해 도 3a 및 도 3b와 같이 확인할 수 있었다. 아미노산 서열을 기반으로 계산한 두 효소의 예상분자량은 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 알파 단량체가 약 32 kDa, 베타 단량체가 약 42 kDa 이며, 아미노레불린산 합성효소는 약 45 kDa 이다.

[0064] 실시예 4: 빛의 조사에 의한 광기구 세포막 소낭의 아데노신 삼인산 생성능 확인

[0065] 자색비유황세균인 로도박터 스페로이데스의 광기구 세포막 소낭은 광합성의 명반응에 필요한 광기구(photosynthetic apparatus)들을 모두 포함하고 있다. 따라서 이론적으로는 분리된 광기구 세포막 소낭에 빛을 조사하면 시험관 내(*in vitro*)에서 광합성의 명반응을 수행할 수 있다. 로도박터 스페로이데스의 명반응은 순환적 전자전달(cyclic electron flow)에 의해 이루어지며, 빛에너지에 의해 순환전 전자전달이 이루어지면 소낭 내부에 양성자농도구배(proton motive force)가 형성된다. 아데노신 삼인산 합성효소(ATP synthase)는 이러한 양성자농도구배를 이용하여 아데노신 이인산(adenosine diphosphate)과 무기인산(phosphate)으로부터 아데노신 삼인산(ATP)을 합성한다. 따라서 광기구 세포막 소낭에 의한 명반응의 최종산물은 아데노신 삼인산이다. 본 실시예에서는 빛의 조사에 의해 광기구 세포막의 명반응이 가능함을 실험적으로 확인하기 위해 분리된 광기구 세포막 소낭에 빛을 조사하여 최종산물인 아데노신 삼인산의 형성 여부를 확인하였다. 아데노신 삼인산의 검출은 아데노신 삼인산 검출 키트(Sigma-Aldrich)를 이용하였다. 자색비유황세균의 광기구 세포막 소낭은 광합성에 필요한 색소인 박테리오클로로필 에이(bacteriochlorophyll *a*, bch *a*)를 포함하고 있기 때문에, 광기구 세포막 소낭의 정량은 박테리오클로로필 에이의 양을 측정하는 방법을 이용하였다. 먼저 광기구 세포막 소낭에서 색소를

추출하기 위해 490 μL 의 색소추출용액[아세톤(Acetone) : 메탄올(Methanol) = 7 : 2]에 10 μL 의 광기구 세포막 소낭을 넣고, 잘 섞어준 후 6,000 g에서 1분간 원심분리하여 얻은 상층액의 770 nm에서의 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도와 83.9 mM^{-1} (Kim and Lee, 2010, J Bacteriol. 192: 198-207)의 몰흡광계수(molar extinction coefficient)를 이용하여 박테리오클로로필 에이의 농도($\mu\text{g bch a/ml}$)를 계산한 후 이를 광기구 세포막의 박테리오클로로필 에이 당량농도(bch a-equivalent concentration)로 하였다. 실시예 1과 같은 방법으로 분리 시 최종적으로 박테리오클로로필 에이의 당량농도가 0.15-0.20 mg bch a/ml 인 광기구 세포막 소낭 용액을 얻을 수 있었다. 반응에는 0.25-1.0 $\mu\text{g bch a/ml}$ 의 광기구 세포막 소낭을 사용하였다. 반응 시 사용한 반응액은 10 mM 인산나트륨(Na_2HPO_4), 2 mM 인산칼륨(KH_2PO_4), 10 mM 염화마그네슘(MgCl_2), 200 μM 아데노신 이인산으로 구성되었다. 광기구 세포막 소낭은 광흡수색소로 박테리오클로로필을 사용하는데 이는 주로 적외선영역(700-1,000 nm)의 빛을 흡수하기 때문에 조명은 적외선 파장대의 빛을 방출하는 백열전구를 사용하였고, 조사된 빛 세기는 15 Watts/m^2 였으며, 반응온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 하였다.

[0066] 반응 결과는 도 4a에 제시하였다. 빛을 조사하였을 때(도 4a, Light)만 아데노신 삼인산이 생성되었고, 빛을 조사하지 않았을 경우(도 4a, No Light) 아데노신 삼인산이 생성되지 않는 것으로 보아 광기구 세포막 소낭의 아데노신 삼인산 생성 반응이 빛에 의존적인 반응임을 확인할 수 있었다. 또한 사용한 광기구 세포막 소낭의 양을 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시켰을 때 아데노신삼인산의 생성량 역시 증가하는 것으로 보아 아데노신 삼인산의 생성이 광기구 세포막 소낭의 명반응에 의한 결과임을 알 수 있다.

[0067] 상기 모든 반응은 무산소조건에서 진행하였는데 이는 로도박터 스페로이데스가 혐기조건에서만 광기구를 생성하고, 광합성을 수행하기 때문이다. 따라서 광기구 세포막 소낭의 정상적인 생리조건이 아닌 유산소조건(aerobic condition)에서 아데노신 삼인산 생성량에 변화가 있을 것이라 유추할 수 있었다. 도 4b는 0.25 $\mu\text{g bch a/ml}$ 의 광기구 세포막 소낭을 이용하여 유산소조건과 무산소조건에서 아데노신 삼인산의 생성량을 비교한 것이다. 유산소조건에서의 아데노신 삼인산 생성량이 무산소조건보다 더 적게 나타났고, 이를 통해 광기구 세포막 소낭을 산소에 노출된 환경에서 사용할 경우 아데노신 삼인산 생성능이 감소한다는 것을 확인하였다. 하지만 산소에 노출된 환경에서도 약 70% 정도의 아데노신 삼인산 생성능을 유지하기 때문에 당업자의 재량에 따라 조건을 선택하여 사용할 수 있을 것이다.

[0068] 실시예 1에서 분리된 광기구 세포막 소낭은 분리 즉시 측정된 특이활성(specific activity)은 4.98 ± 0.59 nmole ATP/min/ $\mu\text{g bch a}$ 였다. 당업자는 광기구 세포막 소낭에 의한 아데노신 삼인산 생성의 특이활성을 기반으로 당업에 필요한 광기구 세포막의 사용량을 조절할 수 있을 것이다.

[0069] 실시예 5: 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 효소활성 확인

[0070] 아미노레불린산 합성경로의 첫 번째 효소인 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소는 숙신산(succinic acid), 코엔자임 에이(CoA), 아데노신 삼인산을 반응물로 하여, 숙시닐 코엔자임에이(succinyl-CoA) 및 아데노신 이인산을 생성하는 반응을 촉매한다(도 1). 또한, 상기 반응의 역반응 역시 촉매한다. 본 실시예에서는 두 번째 효소인 아미노레불린산 합성효소의 기질인 숙시닐 코엔자임 에이가 실시예 3에서 정제한 숙시닐 코엔자임 합성효소에 의해 형성되는 것을 확인하였다. 형성된 숙시닐코엔자임 에이의 검출은 분광광도법(spectrophotometry)를 이용하였다. 숙시닐 코엔자임 에이는 230 nm에서 흡광도를 나타내기 때문에 반응 시작 후 반응액의 230 nm에서의 흡광도변화를 측정하여 숙시닐 코엔자임 에이의 형성을 확인할 수 있었다. 또한, 4500 M^{-1} 의 몰흡광계수(Bridger *et al.* 1969, Methods Enzymol. 13: 70-75)를 이용하여 숙시닐 코엔자임에이의 농도를 결정하였다. 반응액은 10 mM 인산나트륨, 2 mM 인산칼륨, 10 mM 염화마그네슘, 10 mM 숙신산나트륨(disodium succinic acid), 200 μM 아데노신 삼인산, 200 μM 코엔자임 에이로 구성하였고, 반응온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 하였다. 도 5는 각각 다른 양의 코엔자임 에이 합성효소를 반응액에 첨가하였을 때 230 nm에서의 흡광도 변화를 시간에 따라 나타낸 것이다. 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소를 넣지 않았을 경우(도 5, 0 $\mu\text{g/ml}$)에는 흡광도 변화가 없는 반면 효소가 첨가되었을 때는 흡광도가 증가하였으며, 반응에 사용한 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소의 양이 증가할수록 숙시닐 코엔자임 에이의 합성속도도 비례하여 증가하였다(도 5, 2.15, 4.3, 8.6 $\mu\text{g/ml}$). 이로써 실시예 3에서 정제한 효소가 숙신산과 코엔자임 에이, 그리고 아데노신 삼인산으로부터 숙시닐 코엔자임 에이를 합성하는 효소임을 확인하였다.

[0071] 실시예 6: 아미노레불린산 합성효소의 효소활성 확인

[0072] 아미노레불린산 합성경로의 두 번째 효소인 아미노레불린산 합성효소는 숙시닐 코엔자임 에이와 글리신(glycine)을 반응기질로 하여, 아미노레불린산 및 이산화탄소와 코엔자임 에이를 생성하는 반응을 촉매한다(도 1). 본 실시예에서는 실시예 3에서 정제한 아미노레불린산 효소가 상기 효소반응을 진행하여 아미노레불린산을 형성할 수 있는지 확인하였다. 아미노레불린산의 검출은 기존에 알려진 방법(Burnham, 1970. Methods in Enzymology 17: 195-200)을 사용하였다. 도 6은 10 mM 인산나트륨, 2 mM 인산칼륨, 10 mM 염화마그네슘, 10 mM 글리신, 200 μ M 숙시닐 코엔자임 에이, 10 μ M 피리독살인산(pyridoxal phosphate)이 첨가된 반응액에 각각 다른 양의 아미노레불린산 합성효소를 투입 후 30°C에서 시간에 따른 아미노레불린산 생성을 확인한 것이다. 아미노레불린산 합성효소를 투입하지 않은 반응액에서는 시간에 따른 아미노레불린산의 생성이 없었지만, 아미노레불린산 합성효소를 투입한 경우 시간에 따라 아미노레불린산의 생선이 확인되었고, 그 생산속도는 아미노레불린산 합성효소의 양에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. 이로써 실시예 3에서 정제한 효소가 숙시닐 코엔자임 에이, 글리신으로부터 아미노레불린산을 합성하는 효소임을 확인하였다.

[0073] 실시예 7: 광기구 세포막 소낭과 아미노레불린산 합성경로의 조합을 통한 아미노레불린산의 합성

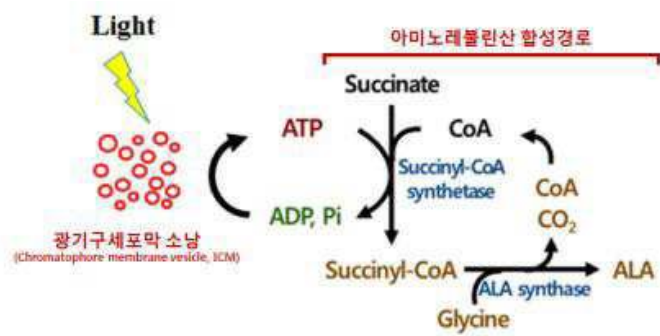
[0074] 본 실시예에서는 실시예 4, 실시예 5 및 실시예 6의 반응들을 조합하여 도 1에 명시된 전체반응을 수행하였다. 표준반응액은 10 mM 인산나트륨, 2 mM 인산칼륨, 10 mM 염화마그네슘, 10 mM 글리신, 10 mM 숙신산나트륨, 10 μ M 피리독살인산, 100 μ M 코엔자임 에이, 200 μ M 아데노신 이인산으로 구성되고 반응은 15 Watts/m²의 빛이 조사되는 30°C 배양기(incubator)에서 수행되었다. 반응에 사용된 광기구 세포막 소낭의 농도는 3 μ g bch a/ml였고, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소와 아미노레불린산 합성효소는 특이활성(specific activity)이 각각 8 nmole/min/ml이 되도록 사용하였다. 도 7은 표준반응액(반응번호 #1)과, 표준반응액에서 반응요소들을 하나씩 생략한 반응액(반응번호 #2 내지 #6)에서의 아미노레불린산 생성량을 비교한 것이다. 그 결과 표준반응액(반응번호 #1)에서 아미노레불린산의 생성되는 것으로 보아 도 1의 전체 반응이 성공적으로 수행되었다고 볼 수 있다. 또한, 반응번호 #2 내지 #5에서 아미노레불린산이 생성되지 않은 것으로 보아 전체 반응에 빛, 광기구 세포막 소낭, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소 각각이 반드시 필요한 요소임을 확인할 수 있었다. 반응번호 #6은 표준반응액에 광기구 세포막 소낭을 투입하지 않고, 아데노신 이인산 대신에 100 μ M의 아데노신 삼인산을 투입한 것인데, 이 반응에서 아미노레불린산이 생성되는 것으로 보아 전체 반응에서 광기구 세포막 소낭의 역할이 아데노신 삼인산의 제공하는 것임을 확인하였다.

[0075] 도 8a와 도 8b는 광기구 세포막 소낭(ICM)과 아미노레불린산 합성경로 효소(Enzyme, 숙시닐 코엔자임 에이 합성효소 및 아미노레불린산 합성효소)의 상대비에 따른 아미노레불린산의 생성량을 확인한 것이다. 상대비는 합성경로 효소의 특이활성을 8 nmole/min으로 고정시켰을 때, 이에 대한 광기구 세포막 소낭의 특이활성의 비를 의미한다. 도 8b에서 아미노레불린산 합성경로 효소의 특이활성에 비해 광기구 세포막 소낭의 특이활성을 약 8배로 쓸 때 최대의 아미노레불린산 생산량을 보였다. 또한, 도 8a에서 상대비를 8:1로 사용하였을 때 아미노레불린산 생산속도가 8.27 nmole/min 인데 이는 투입된 효소의 특이활성으로 산출된 최대 속도인 8 nmole/min에 근접한 속도이다. 따라서 광기구 세포막 소낭과 아미노레불린산 합성경로 효소의 상대비가 8 이상일 때 전체 반응이 포화됨을 확인하였다.

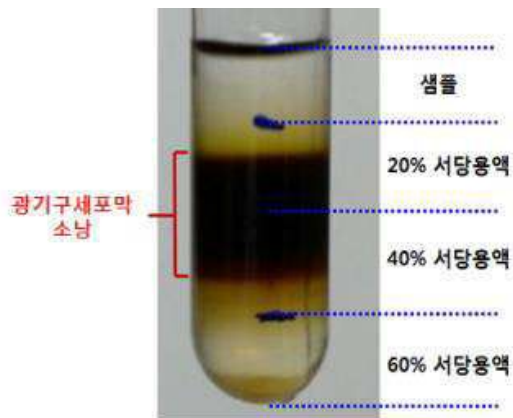
[0076] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

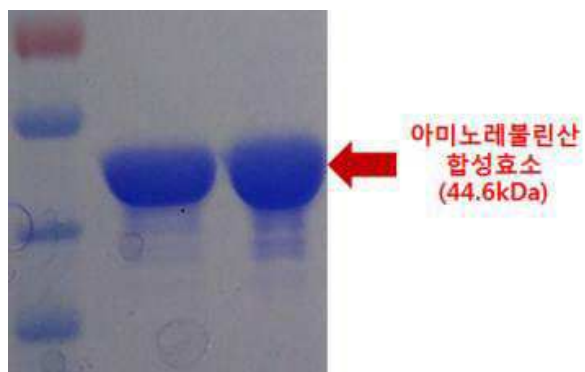
도면1



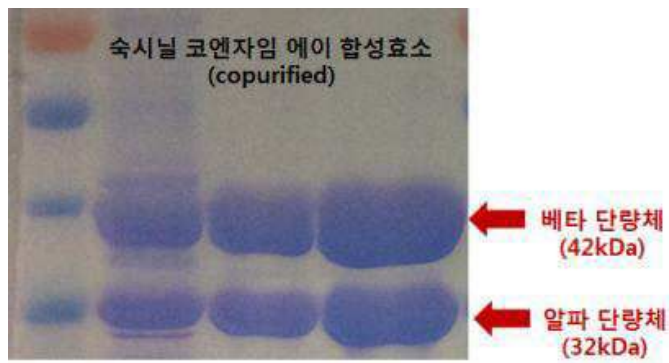
도면2



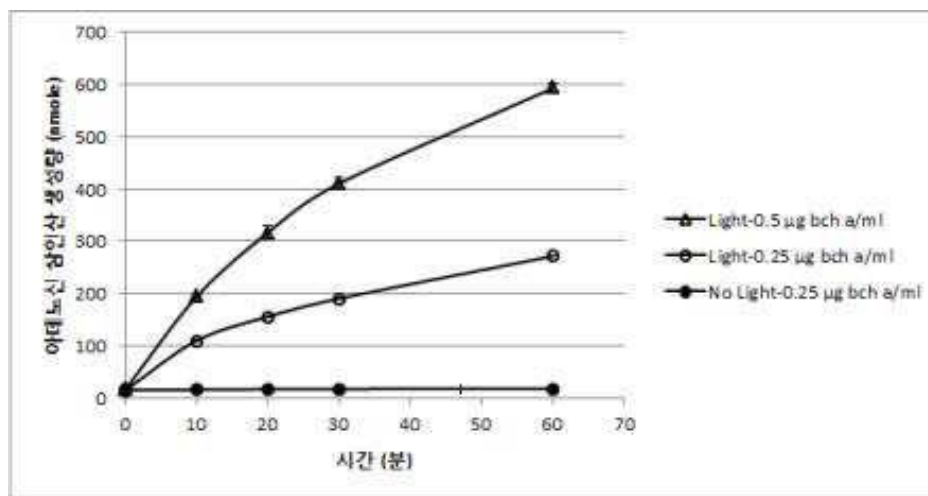
도면3a



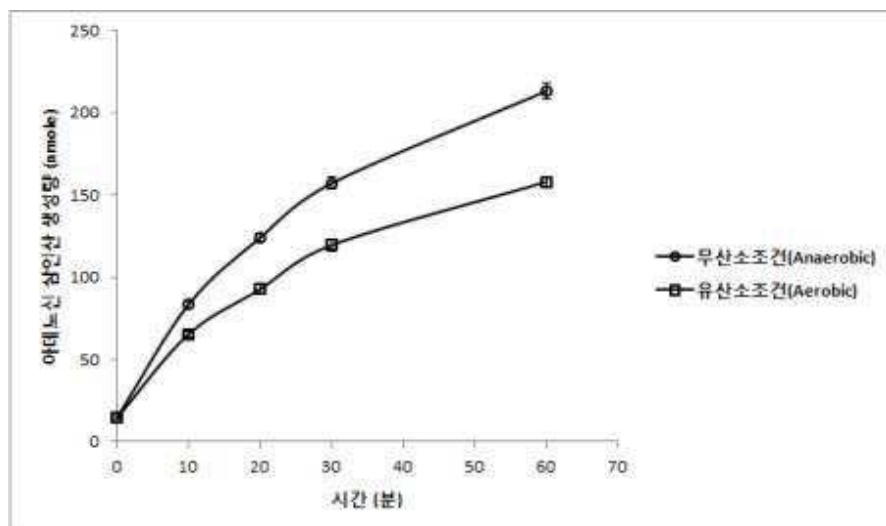
도면3b



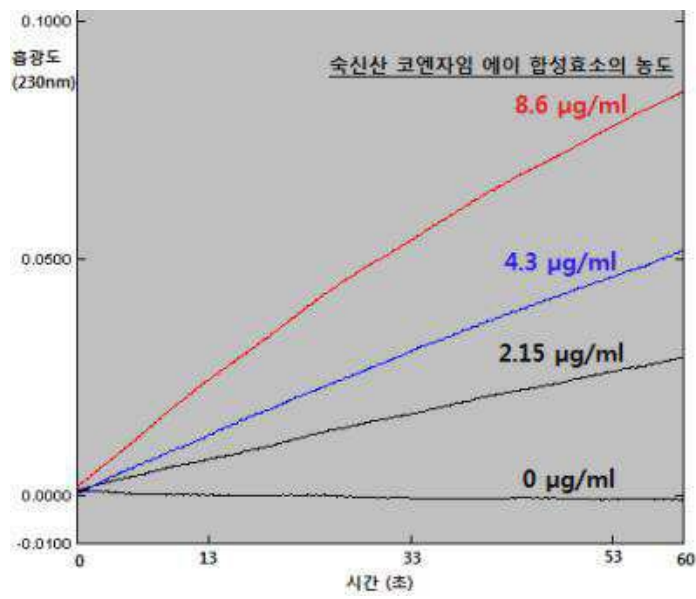
도면4a



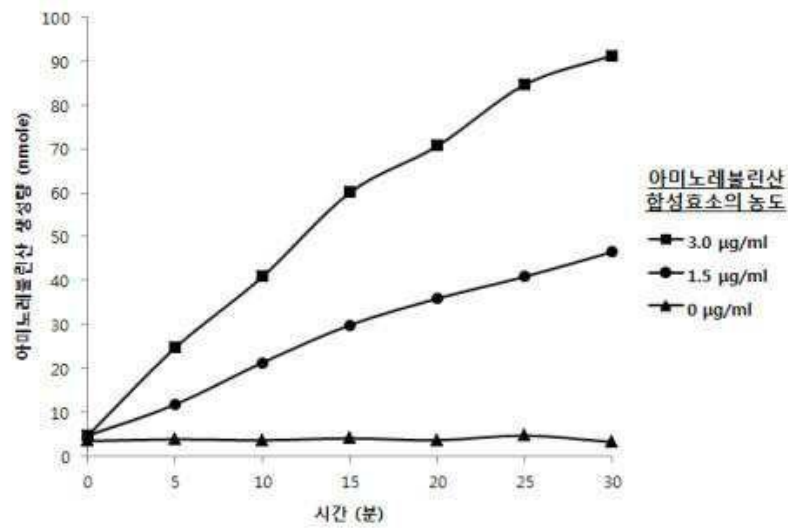
도면4b



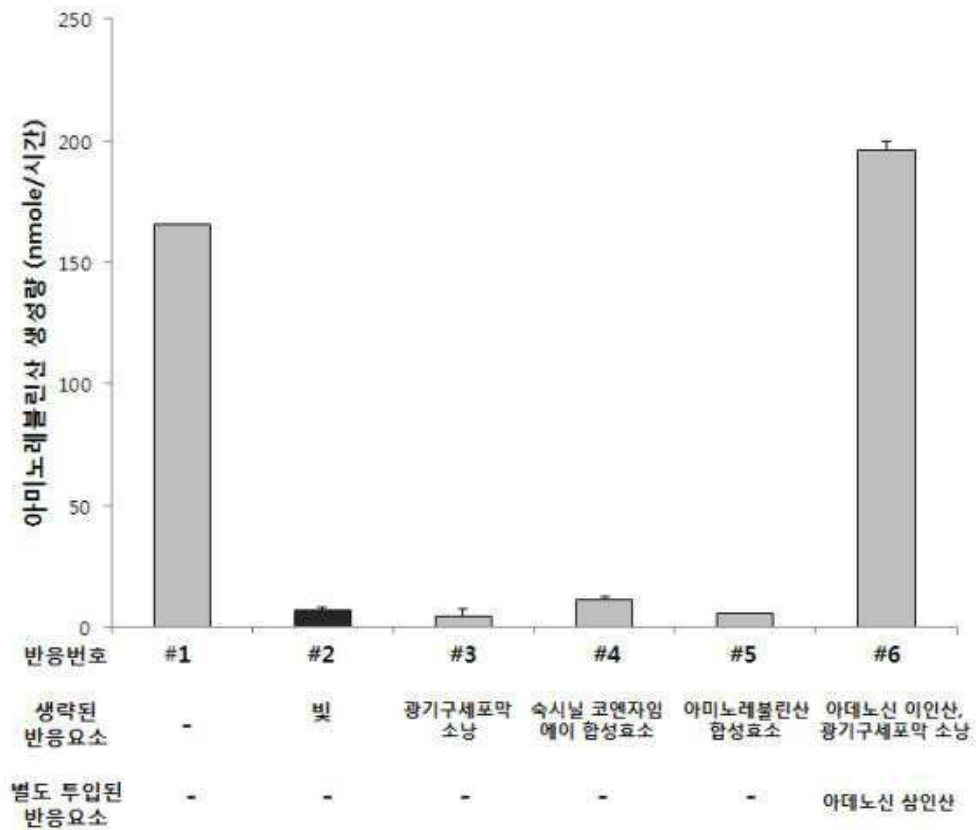
도면5



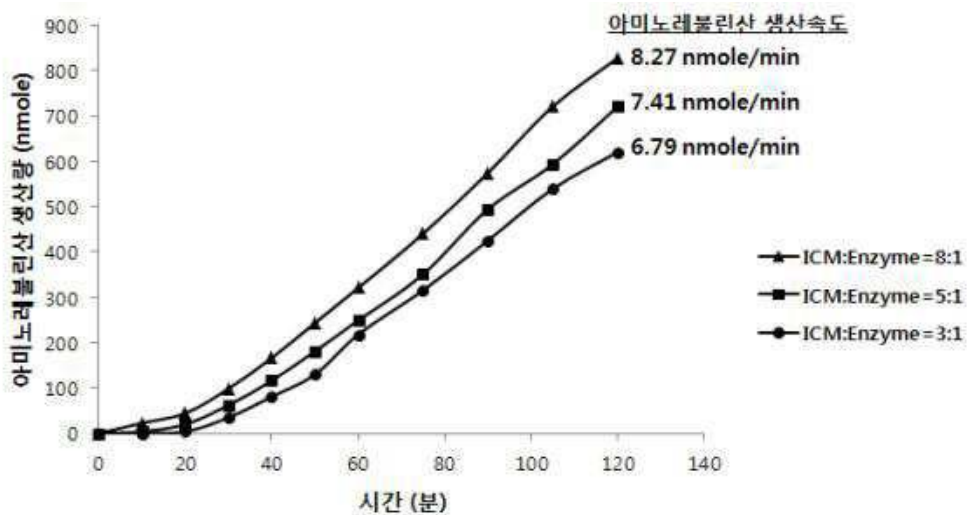
도면6



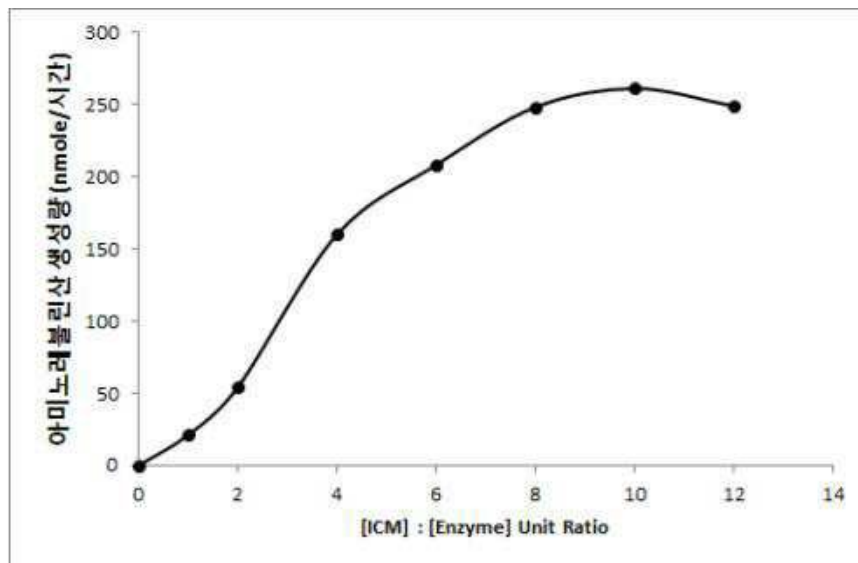
도면7



도면8a



도면8b



서열 목록

- <110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
- <120> A method for continuous production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic membrane vesicle
- <130> PN14327
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Succinyl coenzyme A synthetase forward primer (SCS-F)
- <400> 1
- aaaaaagggtc tcgaatgaac ttacatgaat atcag 35
- <210> 2
- <211> 38
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Succinyl coenzyme A synthetase reverse primer (SCS-R)
- <400> 2
- aaaaaagggtc tctgcgcttt tcagaacagt tttagtg 38
- <210> 3

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5-Aminolevulinic acid synthase forward primer (ALAS-F)
 <400> 3
 actagtgggc tcgaatggac tacaatctgg cact 34
 <210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5-Aminolevulinic acid synthase reverse primer (ALAS-R)
 <400> 4
 aagcttggtc tcagcgctgg caacgacctc ggcgcgat 38