



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0011274  
(43) 공개일자 2008년02월01일

(51) Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7022211

(22) 출원일자 2007년09월28일

심사청구일자 2008년01월21일

변역문제출일자 2007년09월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/007153

국제출원일자 2006년02월28일

(87) 국제공개번호 WO 2006/093998

국제공개일자 2006년09월08일

(30) 우선권주장

60/656,957 2005년02월28일 미국(US)

(71) 출원인

미드웨스트 리서치 인스티튜트

미합중국 64110 미주리 캔사스시티 볼커블레바드 425

(72) 발명자

시버트, 마이클

미국, 콜로라도 80228,레이크우드,더블유. 예일 플레이스 13134

기라디, 마리아, 루시아

미국 콜로라도 80228 레이크우드 에스. 지니아웨이 221

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

허성원, 서동현

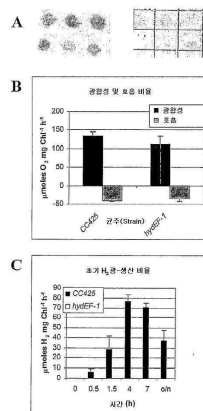
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현 및 과발현 유전자 및 그 방법

(57) 요약

본 발명은, [FeFe]-수소화효소의 구조 유전자 및/또는 상속 유전자 HydE, HydF 및 HydG의 동종 유전자를 포함하고 있지 않은 숙주 유기체에서 활성 [FeFe]-수소화효소를 발현하는 방법에 관한 것으로, 상기 구조 유전자 및/또는 상기 상속 유전자 HydE, HydF 및 HydG를 포함하는 유기체로부터 상기 유전자들을 발현 플라스미드에 클로닝하는 단계와; 상기 플라스미드를 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여되거나, 또는 붕괴된 [FeFe]-수소화효소를 갖는 유기체에 이식하고, 호기적으로 배양하는 단계와; [FeFe]-수소화효소의 생합성 및 H<sub>2</sub> 생산이 이루어지도록 혐기성 상태를 유도하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**킹, 폴, 더블유**

미국 콜로라도 80401 골든 아파트 1228 덴버 웨스트 드라이브 1919

**포세비츠, 매튜, 씨**

미국 콜로라도 80401 골든 12 스트리트 1011

**스몰린스키, 샤론, 엘**

미국 콜로라도 80127 리틀톤 엘크헤드 랜지 로드 11876

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

[FeFe]-수소화효소의 구조 유전자 및/또는 성숙 유전자 HydE, HydF 및 HydG의 동종 유전자를 포함하고 있지 않은 숙주 유기체에서 활성 [FeFe]-수소화효소를 발현하는 방법에 있어서,

상기 구조 유전자 및/또는 상기 성숙 유전자 HydE, HydF 및 HydG를 포함하는 유기체로부터 상기 유전자들을 발현 플라스미드에 클로닝하는 단계;

상기 플라스미드를 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여되거나, 또는 붕괴된 [FeFe]-수소화효소를 갖는 유기체에 이식하고, 호기적으로 배양하는 단계; 및

[FeFe]-수소화효소의 생합성 및 H<sub>2</sub> 생산이 이루어지도록 혐기성 상태를 유도하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [FeFe]-수소화효소를 포함하는 유기체는, 녹조류인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유기체는, [FeFe]-수소화효소를 포함하는 진핵생물 또는 원핵생물인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유기체는, *C. reinhardtii* HydEF 및 HydG 유전자의 동종 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 *C. reinhardtii* HydEF 및 HydG 유전자의 동종 유전자를 포함하는 동종 유전자는, *T. maritima*, *T. neapolitana*, *C. thermocellum*, *C. pasteurianum*, *B. thetaiodaomicron*, *T. tengcongensis*, *D. vulgaris*, *C. acetobutylicum*, *C. perfringens*, *D. desulfuricans*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *S. oneidensis*, 및 *C. tetani*를 포함하는 군에서 선택하는 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여된 유기체는, *E. coli*인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여된 유기체는, 붕괴된 비활성 [FeFe]-수소화효소를 포함하는 유기체인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여된 유기체는, [NiFe]-수소화효소를 포함하는 유기체인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 혐기성 상태를 유도하는 단계는, 암조건에서 중성 기체의 분산, 또는 환원제의 첨가에 의하는 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 중성 기체는, 아르곤인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 혐기성 상태를 유도하는 단계는, 황-제거 배양물을 빛에 노출하는 것에 의하는 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

#### 청구항 12

제5항에 있어서,

상기 HydE, HydF 및 HydG 유전자는 *C. acetobutylicum*으로 선택하고, 상기 수소화효소 구조 유전자, 상기 HydE, HydF 및 HydG 유전자가 발현되는 숙주 유기체는 *E. coli*인 것을 특징으로 하는 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현방법.

#### 청구항 13

*C. reinhardtii* HydE, HydF, HydG의 동종 유전자 및 수소화효소 구조 유전자를 동시에 발현시키는 *E. coli*.

#### 청구항 14

고유의 수소화효소([FeFe] 또는 [NiFe]) 유전자가 붕괴되어, HydE, HydF, HydG 및 [FeFe]-수소화효소 구조 유전자를 동시에 발현시키고, 활성 [FeFe] 수소화효소를 합성하는 숙주 유기체.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 유기체는 *E. coli*에 한정되지 않는 숙주 유기체.

### 명세서

#### 기술분야

<1> 본 발명은, 적합한 유기체로부터 얻은 유전자의 [FeFe]-수소화효소 조립체를 이용하여, 적합한 숙주에서 발현시킨, 활성 [FeFe]-수소화효소의 발현 및 과발현을 제공하는 유전자의 이용에 관한 것이다.

#### 배경기술

<2> 수소는 바이오연료로서 무한한 잠재력을 지니고 있으며, 화석 에너지 이용과 관련된 환경 및 정치적 문제를 완화할 수 있을 것으로 기대된다.

<3> 가장 효율적인 H<sub>2</sub>-생성 촉매 중에서, 광합성 녹조류(green alga), *Chlamydomonas reinhardtii*,를 포함하는 수많은 미생물에서 발견되는 [FeFe]-수소화효소(hydrogenase)는 잘 알려진 물질이다. 물로부터 수소를 생산하기 위하여, *Chlamydomonas reinhardtii*(녹조류로 알려지기도 함)를 이용하는 것은 60년 이상 동안 알려져 온 사실이다. 수소를 생산하는 반응은 가역적인 수소화효소에 의해 촉매되며, 수소화효소는 짧은 기간 동안 혐기성 상태

에 노출된 후 세포 내에서 유도되는 효소이다. 이러한 활성은 빛에 노출되면 급속히 손실되는데, 이는 광합성으로 생성된  $O_2$ 에 의하여 가역적인 수소화효소가 즉시 비활성화되기 때문이다.

<4> Ghirardi et al.은 Biological Systems For Hydrogen Photoproduction(FY 2004 Progress Report)에서, 호기성  $H_2$  생산 시스템과 작용할 수 있도록, 보다 높은  $O_2$  내성을 갖는 조류 수소화효소 변이를 생성하는 방법을 개시하고 있으며, 이는 조류 생산 시스템을 이용하여  $H_2$  광생산을 보다 최적화한 것이다. 전술한 방법은  $O_2$ 가 효소의 촉매 부위에 접근하는 경로를 차단함으로써,  $O_2$ 에 대하여 증가된 내성을 보이는 [FeFe]수소화효소를 발현하는 재조합 조류를 생성하는 것이다.

<5> T. Happe et al.은 Differential Regulation Of The Fe-hydrogenase During Anaerobic Adaptation In The Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* Eur. J. Biochem. 269, 1022-1032 (2002)에서, suppression subtractive hybridization(SSH) 접근법을 이용하는 것에 관하여 개시하고 있으며, 이 접근법에서는 혐기성 상태에서 유전자의 차별되는 발현이 분석되었다. 박테리아 Fe-수소화효소의 유전자와 유사성을 갖는 PCR 단편을 분리하고, *C. reinhardtii*의 혐기성 cDNA 발현 라이브러리를 스크리닝하는데 이용하였다. *HydA*의 cDNA 서열은 53.1kDa의 외관상 분자량을 갖는 단백질을 암호화하는 1494-bp ORF를 포함하고 있다. 수소화효소 유전자의 전사는 세포가 혐기성 상태에 적응하는 동안 매우 급속하게 유도된다. 추론된 아미노산 서열은 분리된 고유 단백질의 서열 분석에 의해 결정된 2 개의 폴리펩타이드 서열에 상응한다. Fe-수소화효소는 수소화효소를 엽록체 기질(chloroplast stroma)로 안내하는, 56 아미노산의 짧은 운반 펩타이드를 포함하고 있다. 분리된 단백질은 Fe-수소화효소의 클래스에 속한다. Fe-수소화효소의 활성 부위(H-클러스터)에서 엄격하게 보존되는 4개의 cysteine 잔류물과 12개의 다른 마니노산들이 식별되었다. 다른 비 조류 Fe-수소화효소와 비교할 때, *C. reinhardtii* 단백질의 N-말단은 현저하게 절단된다. 다른 Fe-수소화효소에서 추가적인 Fe-S-클러스터에 배위결합하는 보존된 cysteine은 손실된다. 천연의 전자공여체인 페레독신(ferredoxin) PetF는 *C. reinhardtii*의 수소화효소를 광합성 전자 수송 체인에 연결한다. 수소화효소는 환원되는 등량물(equivalents)로부터 효소로 전자를 전달함으로써, 호기성 조건 하에서 녹조류의 생존이 가능하도록 한다.

<6> 녹조류, *Chlamydomonas reinhardtii*,로부터 또 다른 두 번째 [FeFe]-수소화효소 유전자인 *HydA2* 유전자가 분리되어 특성이 규명되었으며, *HydA2* 유전자는 알려진 *C. reinhardtii*의 *HydA1* 수소화효소와 74%의 유사성 및 68%의 동일성을 갖는 505 아미노산의 단백질을 암호화하고 있다. *HydA2*는, Forestier et al이 Expression Of Two [Fe]-Hydrogenases In *Chlamydomonas reinhardtii* Under Anaerobic Condition, Eur. J. Biochem. 270, 2750-2758 (2003)에서 개시한, [FeFe]-수소화효소 중(family)의 촉매 핵심에서 발견되는 모든 보존된 잔류물 및 모티프(motifs)를 포함하고 있다. *HydA1* 및 *HydA2* 전사물은 모두, 중성 기체를 분산하거나, 또는 배양물에서 황(sulfur)을 제거함으로써 얻어지는 혐기성 유도하에서 발현되는 것으로 알려졌다. 더 나아가, 두 전사물 모두의 발현 수준은, 혐기성 상태의 길이,  $O_2$ 의 재첨가, acetate의 존재, 및/또는 배양 동안 sulfate와 같은 영양소의 결핍과 같은 배양 조건에 의해 조절된다. *HydA2*에 특이성을 갖는 항체는 혐기성으로 유도된 *C. reinhardtii* 세포의 추출물에서 약 49kDa의 단백질을 인식하였으며, 이는 *HydA2*가 발현된 단백질을 암호화하고 있다는 것을 강력하게 암시하는 것이다. *HydA2* 수소화효소의 Homology-based 3D modeling은 촉매 부위가,  $H_2$ -기체 채널을 포함하는, *Chlamydomonas reinhardtii* CpI의 알려진 구조를 잘 모형화하고 있음을 보여준다. *HydA1*, *HydA2* 및 CpI 사이의 주요한 차이점은 N-말단 Fe-S 중심이 결여되어 있고, 조류 효소에는 여분의 서열이 존재한다는 것이다.

<7> *Entamoeba histolytica*와 *Spironucleus barkhanus*는, 비록 이들 원생생물들은 *Entamoeba histolytica*와 *Giardia lamblia*의 철-의존 수소화효소에 수소발생소포(hydrogenosomes)가 결여되어 있기는 하지만, 짧은 철-의존 수소화효소(Fe-수소화효소)를 암호화하고 있는 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있다: Activity of the Recombinant Entamoebic Enzyme and Evidence for Lateral Gene Transfer Biol. Bull. 204: 1-9. (February 2003). 재조합 *E. histolytica* Fe-수소화효소를 준비하여, 생체 외 활성을 측정하였다. 짧은 Fe-수소화효소를 암호화하고 있는 *Giardia lamblia* 유전자를 샷건(shotgun) 게놈 서열을 통해 식별하였으며, RT-PCR을 수행하여 배양된 entamoebas 및 giardias가 짧은 Fe-수소화효소의 mRNA를 전사하는 것을 확인하였다. 긴 Fe-수소화효소를 암호화하고 있는 두 번째 *E. histolytica* 유전자를 샷건 게놈 서열을 통해 식별하였다. 계통발생 분석의 결과, entamoeba 및 diplomonads의 짧은 Fe-수소화효소 유전자는 공통된 원형(ancestor)를 공유하고 있음을 알 수 있었다. 반면에, entamoeba의 긴 Fe-수소화효소 유전자는 박테리아로부터 측생적으로 전이되었던 것으로 보여진다. 이러한 결과들은 이들 원생생물의 발효 효소를 암호화하고 있는 유전자의 기원에 관한 경합된 아이디어의 관계에서 논의되어 진다.

- <8> 미국 특허출원 공개번호 2004/02009256호는, 수소를 생성하는 미생물(microbes)을 처리하는 조성 및 방법에 관하여 개시하고 있다. 이 발명의 일부 방법들은 수소화효소 유전자를 재암호화하고, 재암호화된 유전자를 어닐링-기반 재조합 방법(annealing-based recombinant method)에 적용하는 것을 포함하고 있다. 더 나아가, 재암호화 및 재조합된 수소화효소 유전자를 다른 게놈 서열을 포함하는 다른 유기체에 형질전환하는 방법을 제공하고 있다.
- <9> 수많은 미생물(*C. reinhardtii*를 포함)에서 발견되는 [FeFe]-수소화효소의 H<sub>2</sub>-생성 촉매 분야에 있어서, 활성 조류 [FeFe]-수소화효소의 생성에 필수적인 유전자를 규명하여, 비활성 [FeFe]-수소화효소의 축적을 야기하는 *C. reinhardtii* 유전자가 함께 발현되지 않도록 하면서, 조류 [FeFe]-수소화효소의 구조 유전자를 발현시킬 필요가 있다.
- <10> 더 나아가, [FeFe]-수소화효소의 H<sub>2</sub>-생성 촉매 분야에 있어서, *C. reinhardtii* 유전자와 조류 [FeFe]-수소화효소의 구조 유전자가 *E. coli*에서 함께 발현되도록 하여, 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여되어 있는 *E. coli*에서 활성 [FeFe]-수소화효소가 합성되도록 할 필요가 있다.
- <11> 더 나아가, [FeFe]-수소화효소의 H<sub>2</sub>-생성 촉매 분야에 있어서, 안정한 재조합 *E. coli* 시스템에서 활성 [FeFe]-수소화효소를 과발현시킬 필요가 있으며, 기원이 다른 [FeFe]-수소화효소의 활성이 달성되도록, *C. acetobutylicum* HydE, HydF 및 HydG 단백질을 이용하여 *C. reinhardtii* [Fe]-수소화효소에 H-클러스터를 조립 및 삽입할 필요가 있다. - *C. acetobutylicum*으로부터의 [FeFe]-수소화효소 조립체 유전자, *C. acetobutylicum* 또는 *C. reinhardtii*로부터의 구조 유전자, 또는 발현 숙주로서 *E. coli*의 이용에 한정되지 않으며, 적합한 유기체로부터 얻은 [FeFe]-수소화효소 조립체 유전자를 이용하여, 적합한 숙주에서 발현시켜, [FeFe]-수소화효소의 발현을 달성할 필요가 있다.

### 발명의 상세한 설명

- <12> 본 발명의 목적은, 비활성 [FeFe]-수소화효소의 축적을 야기하는 *C. reinhardtii* 유전자가 함께 발현되지 않도록 하면서, 조류 [FeFe]-수소화효소의 구조 유전자가 발현되도록, 활성 조류 [FeFe]-수소화효소의 생성에 필수적인 유전자를 규명하는 것이다.
- <13> 본 발명의 또 다른 목적은, *C. reinhardtii*에서 활성 조류 [FeFe]-수소화효소의 조립체에, *C. reinhardtii* 유전자와 조류 [FeFe]-수소화효소 구조 유전자의 동시 발현이 이용될 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 또 다른 목적은, *C. reinhardtii* 유전자와 조류 [FeFe]-수소화효소 구조 유전자가 *E. coli*에서 함께 발현되도록 하여, 고유의 [Fe]-수소화효소가 결여되어 있는 *E. coli*에서 활성 [FeFe]-수소화효소를 합성하는 방법을 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명의 또 다른 목적은, 안정한 재조합 *E. coli* 시스템에서 활성 [FeFe]-수소화효소를 과발현시키고, 기원이 다른 [FeFe]-수소화효소의 활성이 달성되도록, *C. acetobutylicum* HydE, HydF 및 HydG 단백질을 이용하여 *C. reinhardtii* [Fe]-수소화효소에 H-클러스터를 조립 및 삽입하는 방법을 제공하는 것이다. - *C. acetobutylicum* 으로부터의 [FeFe]-수소화효소 조립체 유전자, *C. acetobutylicum* 또는 *C. reinhardtii*로부터의 구조 유전자, 또는 발현 숙주로서 *E. coli*의 이용에 한정되지 않으며, 적합한 유기체로부터 얻은 [FeFe]-수소화효소 조립체 유전자를 이용하여, 적합한 숙주에서 발현시켜, [FeFe]-수소화효소의 발현을 달성하는 방법이 제공된다.

### 실시예

- <25> 실험 절차 스트레인(Experimental Procedures Strains)
- <26> 아나스타시오스 멜리스(Anastasios Melis, University of California, Berkeley, CA)교수로부터 제공받은 pJD67 플라스미드(Davies, J.P. et al. [1999] Plant Cell 11, 1179-1190)에 *C. reinhardtii* 균주 CC425(*cw15*, *sr-u-60*, *arg7-8*, *mt+*)를 형질 변환하여, 삽입형 돌연변이 유발 라이브러리를 생성하였다.
- <27> 수소 및 산소 분석
- <28> Tris-acetate-phosphate(TAP) 배지에서 배양한 콜로니(colony)를 이용하여 케모크로믹 스크리닝(chemochromic screening)을 수행하였다. 암조건에서 혐기적으로 수소화효소(hydrogenase)의 활성을 유도하였고, 다음 날 H<sub>2</sub> 광-생산을 모니터링하였다. 배양액 내에서의 광합성, 호흡 및 H<sub>2</sub> 광생산의 비율을 판단하였다(M. Forestier et

al. [2003] *Eur J. Biochem.* 270, 2750-2758).

- <29> Varian model 3700 gas chromatograph(GC)를 이용하여, 혐기적으로 밀봉된 배양용기의 상부 공간부분의 수소를 분석하였다. 수소화효소 활성의 methyl viologen(MV) 분석을 위해, 세포를 제거하고, 같은 부피의 혐기성 2X MV(100mM MV(oxidized), 50mM Tris, pH 8.0 and 02% Triton X-100)용액을 혐기적으로 밀봉된 바이알(vial)에 첨가하였다.
- <30> 기체를 제거한 sodium dithionite를 최종 농도가 4mM이 되도록 첨가하여, 환원된 MV로부터 H<sub>2</sub> 생산이 개시되도록 하였다.
- <31> **세포 현탁액의 혐기성 유도**
- <32> *C. reinhardtii* 배양균을 TAP 배지에서 ~20μg/ml 총 엽록소로 배양하였고, 2500g에서 5분간 원심분리하였으며, 50mM potassium phosphate(pH 7.0)와 3mM MgCl<sub>2</sub>[27]을 포함하는 1/10 부피의 유도 버퍼(AIB)에서 재현탁하였다. 샘플을 바이알에 넣고, 빛을 차단하기 위해 알루미늄 호일로 감쌌으며, 고무막으로 밀봉하고, 아르곤으로 15분간 평활(flush)하였으며, 상온 및 암조건에서 혐기적으로 배양하였다.
- <33> **서던 및 노던 블롯(Southern and Northern blot) 분석**
- <34> 표준적인 방법을 이용하여 서던 블롯을 수행하였다. DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하고, 정제하였다. 전술한 샘플 각각에 대하여, 10μg 총RNA를 이용하여 노던 블롯 분석을 수행하였다. α-<sup>32</sup>dCTP(ICN) 및 rediprime II DNA random-prime labeling system(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 프로브를 라벨링하였다.
- <35> **웨스턴 블롯(Western blot) 분석**
- <36> 혐기성 유도가 4시간이 경과한 후에, 혐기성 조건 하에 세포를 용해하였다. 호기성 대조 샘플은 AIB에 재현탁한 후 즉시 용해하였다. 용해 버퍼(50mM Tris, pH 8.5, and 0.25% Triton X-100)에서 gentle rocking을 이용하여 세포를 분쇄하였고, 세포 추출물을 10,000g에서 10분간 원심분리하였다. 수소화효소 활성을 포함하는 용해된 상청액을 Q-sepharose fast-flow column(Pharmacia)에 로딩하여, 엄격한 혐기 조건 하에, 수소화효소 단백질을 유도 및 비유도된 세포로부터 부분적으로 정제하였다. 상기 칼럼을 2 칼럼 부피의 세척 버퍼(50mM Tris, pH 8.5, 100mM KCl)로 한 번 세척하였고, 2 칼럼 부피의 희석 버퍼(50mM Tris, pH 8.5, 250mM KCl)로 희석하였다. 유도된 WT 배양액으로부터 얻은 정제되지 않은 용해물에서 관찰된 수소화효소 활성의 약 85%가 부분적으로 정제된 단편에서 회복되었다. BioRad Mini-Protein electrophoresis 및 blotting 장치를 이용하여 단백질 샘플을 농축하였다. 표준적인 SDS-PAGE 방법을 이용하여 동량의 단백질을(A<sub>280</sub>)을 로딩하고 분리하였다. 1차 수소화효소 항체는 HydA1 및 HydA2 모두에 공통되는 서열을 포함하는 합성 펩타이드(DKAKRQAALYNL)로부터 유래되었고, 토끼에서 상업적으로 입수되었다(Sigma GenoSys). 2차 수소화효소 항체는 alkaline phosphatase conjugate(BioRad)로 상업적으로 입수되었으며, 표준적인 케모코로믹 검출 기술을 이용하여 수소화효소를 검출하였다.
- <37> **유전자 식별**
- <38> genome walking을 이용하여 pJD67 삽입 부위 측면의 DNA 영역을 판별하였다. Clontech의 Universal Genome Walker Kit 및 Advantage-GC Genomic PCR mix에 설명된 PCR 방법을 이용하여, 삽입 부위의 DNA 다운스트림(downstream)을 증폭하였다. 대응되는 cDNA를 서열분석(sequencing)하여 HydEF 및 HydG 단백질의 암호화된 서열을 얻었다. cDNA의 구조는 Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/>)로부터 입수하였다. 모든 DNA 산물은 University of California, Davis에서 서열분석하였다.
- <39> **상보성**
- <40> *HydEF* 및 *HydG*를 포함하는 BAC 클론을 Clemson University Genetics 센터로부터 입수하였다. 게놈 *HydEF* 유전자를 BAC 클론의 *KpnI* 소화로부터 입수하였으며, 개시 및 종결 서열을 갖는 전체 길이의 *HygEF* 유전자를 포함하는 삽입물을 pSP124S(from Saul Purton, University College, London)의 *KpnI* 부위에 클로닝하였다. 결과 플라스미드인 pMP101은 *HydEF* 유전자와 항생 선택(antibiotic selection)에 이용된 *Ble<sup>r</sup>* 유전자를 포함하였다. pMP101 플라스미드를 *SwaI*로 소화시켜 선형화하였으며, Kindle(K.L. Kindle [1990] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1228-1232)의 glass bead 방법을 이용하여 *hydEF-1* 변이로 형질변환하였다. 세포 또는 1μg의 pSP124S(V. Lumberras et al. [1998] *Plant j.*, 441-448)를 이용한 조절 또한 사용되었다.

<41> 이종 발현 및 정제

<42> *HydEF* 및 *HydG* cDNA 구성체(constructs)를 T7에 의해 개시된 *E. coli* 발현 플라스미드에 클로닝하여, 활성 *C. reinhardtii* HydA1을 발현시켰다. 상기 두 유전자는 pACYC 듀엣 발현 플라스미드(Novagen)에 클로닝하였다. *HydEF* 및 *HydG* 유전자만을 포함하는 추가적인 조절 플라스미드 또한 pACYV 플라스미드에 클로닝하였다. *C. reinhardtii* HydA1 유전자를 pETBlue-1에 클로닝하였으며, HydA1의 친화성 정제를 위해 C-말단에 *Strep-Tactin* affinity tag(*Strep-Tag II*)를 첨가하였다. 제한 분석 및 서열 분석을 통해 적합한 플라스미드의 존재를 확인하였다. tagged HydA1의 발현 및 정제는 다음과 같이 수행하였다: 형질변환된 BL21(DE3)를 밤새 배양한 배양물로부터 얻은 접종원(inoculum)을 적합한 항생물질을 포함하는 L-broth에서 배양하였다. OD<sub>600</sub>이 0.5-0.7에 도달할 때까지 세포를 배양하였으며, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG) (Novagen)을 1.0mM까지 첨가하였다. 1시간의 호기성 유도 후에, 5시간 동안 아르곤으로 세척하여 배양물을 혐기성 조건에 두었다. 세포를 채취한 후, 초음파분해(sonication)를 통해 얼음에서 분쇄하였다. HydA1-*StrepTag II*를 *Strep-Tactin* Sepharose(IBA)를 이용하여 정제하였으며, MV를 이용하여 수소화효소 활성을 분석하였다.

<43> *C. acetobutylicum* HydA, HydE, HydF 및 HydG의 발현 클로닝

<44> *C. acetobutylicum* Hyd 유전자를 PCR 증폭을 통해 정제된 게놈 DNA(strain ATCC 824)로부터 분리하였다. 유전자 특이 프라이머는 *HydA*(Genbank accession no. AAB03723) (19,20)의 공지된 서열과, *C. reinhardtii* HydEF, HydG 및 HydA2 펩타이드 서열을 이용하여 NCBI에서 연구한 *C. acetobutylicum* 게놈의 tBLASrN homology search에 의해 식별된 *HydE*(Genbank accession no. CAC1631), *HydF*(Genbank accession no. CAC1651), *HydG*(Genbank accession no. CAC1356) 및 *HydB*(Genbank accession no. CAC3230)의 서열에 기초하였다. 유전자 특이 프라이머는 각각의 *Hyd* 유전자(IDT Technologies)의 말단에 맞춰지도록, 아울러, 발현 클로닝을 위하여 적합한 제한 부위를 포함하도록 디자인하였다. 게놈 DNA의 약 20μg은 BamHI로 밤새 소화시켰으며, 200ng는 KOD 중합효소(Novagen)를 이용한 PCR 증폭을 위하여 주형(template)으로 사용하였다. PCR 단편은 겔정제하고, 제한효소로 밤새 소화시키고, pCaFG를 형성하는 pCDFDuet-1 플라스미드 (Novagen) (*HydF* 및 *HydG*) 또는 pCaAE 및 8pCaBE를 형성하는 pCDFDuet-1 플라스미드 (Novagen) (*HydA*, *HydB* 및 *HydE*) 중 어느 하나의 다중 클로닝 부위(MCS)에 클로닝하였다. *StrepII*-tag 서열 WHPQFEK를 PCR 증폭 과정에서 [FeFe]-수소화효소 구조 유전자, *HydA* 및 *HydB*의 C-말단에 추가하였다. 각각의 유전자의 서열 및 해독영역은 DNA 서열분석(Davis Sequencing, LLC)을 통해 확인하였다.

<45> 다른 [FeFe]-수소화효소 유전자의 발현 클로닝

<46> *C. reinhardtii* 및 *C. Clostridium pasteurianum*의 [FeFe]-수소화효소 구조 유전자는 정제된 게놈 DNA로부터 다음과 같이 클로닝하였다. *C. pasteurianum*의 클로닝을 위해, ATCC 균주 6013을 강화된 클로스트리디움(clostridium) 배지에서 혐기 조건으로 배양하였고, Qiagen DNAeasy Tissue Kit(Quigen)을 이용하여 게놈 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA(500ng)은 BamHI로 밤새 소화시켰으며, 100ng은 영역 내 클로닝을 위한 5'-NcoI 및 3'-BamHI 부위를 포함하는 *HydA* 특이 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides)의 PCR 반응에 사용하였다. 유전자 단편은 겔정제하고, NcoI 및 BamHI로 소화시키고, pCpIE를 생성하는 pCaE2의 MCS1에 클로닝하였다.

<47> *C. reinhardtii* HydA1 및 HydA2 cDN의 클론을 전술한 5'- 및 3'- 말단 제한 부위를 갖도록 디자인된 올리고뉴클레오티드의 PCR 증폭에 사용하였다. *StrepII*-tag 서열 WHPQFEK를 *HydA1*의 5'-말단 올리고뉴클레오티드 및 *HydA2*의 3'-말단 올리고뉴클레오티드에 추가하였다. 유전자 단편을 겔영동으로 분리하고, 소화시키고, pECr1(*HydA1*) 및 pECr2(*HydA2*)를 형성하는 pCaE1(pETDuet-1 with *HydE* at MCS site 1)의 MCS 부위 2에 클로닝하였다. 해독영역 및 유전자 서열은 DNA 서열분석을 통해 확인하였다.

<48> *E. coli*에서의 [FeFe]-수소화효소 발현

<49> 구성체(constructs)의 발현 테스트를 위하여, *Hyd* 유전자를 조절하는 T7 셋을 포함하는 플라스미드를 Ap<sub>r</sub>(pETDuet-1 클론) 및 Sm<sub>r</sub>(pCDFDuet 클론)dml 선택과 함께 *E. coli* 균주 BL21(DE3) (Novagen)에 함께 형질전환하였다. 형질전환된 세포는 항생물질을 추가한 LB 배지(Sigma)에서 밤새 배양하였고, 다음날 항생물질 및 100 μM의 Fe-Citrate를 추가한 115ml의 새로운 LB 배지로 옮겨 배양(1:50 희석)하였다. 배양물은 250rpm의 회전식 진탕기(rotary shaker)에서 0.5-0.7의 OD<sub>600</sub>까지 37°C, 호기 조건으로 배양하였다. 최종 농도가 1.5mM이 되도록 Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG(Novagen)을 첨가하였으며, 상온에서 ~100 rpm으로 교반하여, 혐기성 유도 이전에 *Hyd* 발현의 사전유도(pre-induction)이 가능하도록 하였다. 한 시간 후에, 배양물을 120ml의

혈청 바이얼로 옮기고, 고무막으로 밀봉하고, 3-5 시간동안 상온에서 아르곤을 살포하여 혐기성 조건을 만들어 [FeFe]-수소화효소의 생합성을 유도하였다. 친화성 정제를 위한 [FeFe]-수소화효소의 발현은 최소 배지에서 수행하였다. 형질전환된 세포는 0.5% glucose, 0.4% casein-hydrolysate, 100 $\mu$ M Fe-citrate, 300 $\mu$ g/ml ampicillin, 및 50 $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가한 5ml의 M63에서 밤새 배양하였다. 밤새 배양한 배양물은 25ml의 새로운 배지에 옮겨 1:50으로 희석하였으며, OD<sub>600</sub>이 0.5에 도달할 때까지 37°C에서 배양하고, 1L의 M63(Fe-citrate 제외)을 접종하는데 사용하였다. 1L의 배양물은 OD<sub>600</sub>이 0.5가 되도록 37°C에서 배양하였다. Fe-citrate 1M 용액을 최종 농도 100  $\mu$ M까지 추가하였고, 배양물을 37°C에서 10분 동안 추가 배양하였다. IPTG(1.5mM)을 추가하고, 배양물을 상온에서 100rpm으로 교반하였다. 초기 유도 기간에 이어, 배양물을 1L의 봉인된 플라스크에 옮기고, 상온에서 밤새 아르곤을 살포하여 [FeFe]-수소화효소의 생합성을 유도하였다.

<50> **제조합유전자의 정제, Strep II-Tagged [FeFe]-수소화효소**

<51> 정제 단계는 혐기성 조건 하에서 수행하였다. 6000 x g에서 10분간 원심분리하여, Strep II-tagged [FeFe]-수소화효소를 발현하는 세포를 수집하였다. 세포시료는 break buffer(BB)(150mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM Na-dithionite, 100  $\mu$ M PMSF, 5% glycerol)에서 재현탁하였고, French press에서 분쇄하였다. 3nM에서 아비딘(Avidin)을 첨가하여, 비오틴(biotin)과 비오틴닐레이트(biotinylated) 단백질의 결합을 차단하였다. 분쇄된 세포 현탁액은 19,000 x g에서 30분간 원심분리하였다. 정제된 추출물은 BB 버퍼로 미리 평형을 맞춘 Streptactin-Sepharose(IBA) 친화성 칼럼에 옮겨졌다. 칼럼은 3-5 칼럼 부피의 냉각된(ice-cold) BB로 세척하였고, Strep II-tagged 수소화효소는 2.5mM desthiobiotin을 포함하는 BB에서 희석하였다.

<52> **이중-발현 단백질의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯**

<53> SDS-PAGE를 위하여, 단백질 샘플은 1x SDS-PAGE loading buffer(Novagen)에서 희석하고, 10분간 중탕하고, 얼음으로 냉각하였다. 샘플은 12% SDS 겔에 로딩하였고, 45mA에서 2시간 동안 구동하였다. 전기영동에 이어서, 단백질을 PVDF 막에 블롯하고, streptactin-alkaline phosphatase conjugate detection kit(IBA)을 이용하여 검출하였다.

<54> **[FeFe]-수소화효소의 활성 분석**

<55> 정제된 [FeFe]-수소화효소 또는 전체 세포 추출물의 활성은 통상과 같이 환원된 methyl viologen(MV)으로부터의 H<sub>2</sub> 기체 생산으로 측정되었다. 전체 세포의 활성 분석은, 아르곤의 살포 하에, 혐기적으로 준비된 1ml의 2x whole cell reaction buffer(50mM potassium phosphate, pH 7; 10mM methyl viologen; 20mM sodium dithionite; 6mM NaOH; 0.2% Triton X-100) 및 1ml의 세포를 포함하는 13.5ml의 봉인된 혈청 바이얼에서 수행하였다. 정제된 효소의 분석은, 마찬가지로 혐기적으로 준비된 1ml의 2x whole cell reaction buffer(50mM potassium phosphate, pH 7; 10mM methyl viologen; 20mM sodium dithionite; 6mM NaOH)를 포함하고, 아르곤이 살포되는 바이얼에서, 혐기적으로 준비된 BB 버퍼에 1ml로 희석된 시료(25-50ml)에서 수행하였다. 모든 반응물은 37°C에서 배양하였다. 배양 후, 기체-막음 주사기(gas-tight syringe)를 이용하여 상층 부분의 기체 400ml을 추출하고, 기체 크로마토그래피(Hewlett Packard, 5820)를 이용하여 H<sub>2</sub> 레벨을 측정하였다.

<56> **결과**

<57> **변이 특징**

<58> *C. reinhardtii*에서, 두 가지 [FeFe]-수소화효소인 HydA1 및 HydA2는 알려져 있다. 이들 효소의 특성 및 발현에 요구되는 유전자를 식별하기 위하여, 케모크로믹 H<sub>2</sub> 센서<sup>4</sup>를 이용하여, 요구되는 혐기성 유도 후에 H<sub>2</sub>를 광생산할 수 없는 클론의 무작위 삽입 변이유도성 라이브러리를 스크리닝하였다. 아르기닌 영양요구체(auxotroph)인 *C. reinhardtii* 균주 CC425에 *Arg7* 유전자를 형질전환하여 변이를 생성하였다. *Arg7* 유전자는 무작위로 *C. reinhardtii* 게놈에 결합되고, 와일드 타입(wild-type, WT) 게놈 DNA의 작은 부분을 분쇄한다. *HydEF-1* 변이는 도1A에 도시된 바와 같이 검출될만한 양의 H<sub>2</sub> 생산이 없다는 점으로 식별되었다. 동일한 라이브러리의 다른 다섯 가지 콜로니에서 관찰되는 암청색 점은 WT H<sub>2</sub> 생산 능력을 보여주는 것이다.

<59> *HydEF-1* 변이는 CO<sub>2</sub>를 유일한 탄소 공급원으로 하여 최소 배지에서 배양하였으며, 이에 의하여 세포들이 광합성 능력이 있었다는 것을 알 수 있다. 더 나아가, 모체 및 *HydEF-1* 균주의 광합성 및 호흡 비율을 Clark-type electrode를 이용하여 액체 배지에서 측정하였다(도1B). WT와 비교하여 볼 때, *HydEF-1* 변이는 보통의 호흡 및

광합성  $O_2$  발생 비율을 나타내었다. 이는 *HydEF-1* 에서  $H_2$  광생산 활성이 결여된 것은, 2차적인 대사 또는 광합성의 전자 수송 결합의 결과가 아니라, 수소화효소에 대한 특이성의 결과인 것을 보여준다.

<60> *C. reinhardtii*의 수소화효소 활성은, 밀봉된 배양물로부터  $O_2$ 를 제거하는 불활성 기체(또는 외인성 환원제(exogenous reductant))를 이용한 암조건, 또는 광합성으로 인한  $O_2$  발생을 억제시키도록 밀봉된 배양물에서 황(sulfur)을 제거하는 명조건 중 어느 하나에 의해 얻어지는 혐기성 상태에서 유도된다. WT 및 *hydEF-1* 변이 배양물로부터, 암조건 혐기성 유도에 따른 수소 생산을 몇 가지 기술을 이용하여 모니터링하였다: (1) Clark-type electrode를 이용하여,  $H_2$  광-생산의 초기 비율(도1C)을 분석하였다, (2) GC를 이용하여, 환원된 MV에 의하여 증대된 수소화효소 활성을 검출하였다, 및 (3) GC 분석을 이용하여, 발효성  $H_2$  생산을 분석하였다. WT 배양물과는 대조적으로, 이들 분석을 이용한 방법에서는 *hydEF-1* 변이 배양물로부터의  $H_2$  생산은 검출되지 않았다. 더구나, 황이 제거된 명조건에서 혐기적으로 유도된 *hydEF-1* 변이 배양물은 검출될만한  $H_2$ 를 생산하지 못하였다. 1 리터의 CC425 WT 배양물은, 동일한 조건 하에서, 몇 일간의 과정 동안, 적어도 70ml의  $H_2$ 를 지속적으로 생산하였다. 따라서, 우리가 시도한 모든 유도 및 분석 조건하에서 *hydEF-1* 변이는 활성 [Fe]-수소화효소를 합성할 수 없다는 결론에 도달하였다.

#### <61> HydEF 및 HydG 유전자의 식별

<62> 관찰된 *hydEF-1* 변이의 표현형(phenotype)에 관한 유전적 변이를 결정하기 위해서, genome walking strategy를 이용하여 변이를 일으키는 *Arg7* 삽입물에 이웃한 게놈 DNA를 클로닝하고, 서열분석하였다. *Arg7* 삽입에 의해 붕괴된 유전자는 이웃한 WT 서열을 최근에 서열분석한 *C.reinhardtii* 게놈과 비교하여 판단하였다. *hydEF-1*에서 삭제된 유전자는 *HydEF*를 의미하였으며, 단백질을 암호화하는 두 개의 고유한 영역을 나타내었다. HydEF 단백질의 N-말단 부위는 현재까지 [FeFe]-수소화효소를 포함하는 원핵생물(prokaryotes)에서만 발견되는 독특한 그룹의 단백질과 일치하는 것이며, Radical SAM protein superfamily(H. J. Sofia et al [2001] *Nucleic Acids Res.* 1097-1106)의 특징화되지 않은 하부집합에 속하는 것이다. HydEF 단백질의 C-말단 부위는 예견되는 GTPase 활성에 관한 영역을 포함한다. 이 영역은 마찬가지로 [FeFe]-수소화효소를 포함하는 유기체에 독특한 또 다른 두 번째 그룹의 원핵생물 단백질과 일치하는 것이다. *C.reinhardtii*에서 붕괴된 *HydEF* 유전자에 바로 이웃한 두 번째 유전자는 동일한 프로모터 영역으로부터 분기된 발현을 암시하도록 배열된 *HydG*이다. BLAST 연구에 따르면, HydG와 일치하는 단백질은 마찬가지로 Radical SAM protein superfamily에 속하는 독특한 세 번째 그룹의 단백질을 포함한다. HydE 및 HydF와 마찬가지로, HydG 상동체는 [FeFe]-수소화효소를 갖는 원핵생물에서만 발견된다. *C.reinhardtii*의 *HydEF* 및 *HydG*에 상응하는 cDNA를 얻었으며, 이를 서열분석하여 두 유전자의 서열을 암호화하는 단백질을 확인하였다. *C.reinhardtii* 유전자의 게놈 구조 및 *HydEF* 붕괴 부위를 도2A에 도식화하여 나타내었다.

<63> 독특하게도, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio desulfuricans* 및 *Shewanella oneidensis*의 게놈에서, *HydE*, *HydF* 및 *HydG* 유전자는 [FeFe]-수소화효소의 구조적 유전자를 갖는 추정상의 오페론을 형성한다(도3). 그러나, *HydE*, *HydF* 및 *HydG*의 기능은 아직까지 정해진 바 없다. 후술하는 바와 같이, 우리의 데이터는 이들 단백질이 활성 [FeFe]-수소화효소의 집합체에 요구되는 것임을 보여주며, 따라서, 우리는 제안된 수소화효소 명명법(P.M. Vignais et al. [2001] *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455-501)에 따라, *C.reinhardtii* 유전자 *HydEF* 및 *HydG*를 명명하였다. *C.reinhardtii*에서, *HydEF* 유전자에는 원핵생물 유기체에서 관찰되는 두 가지 독특한 유전자에 상응하는 두 가지 문자 E 및 F를 할당한다. 도3은 *C.reinhardtii* *HydEF* 및 *HydG* 단백질 상동체를 [FeFe]-수소화효소를 포함하는 원핵생물 유기체에 비교한 것이다. 또한, 도3은 이들 유기체 내에 포함된 추정상의 [FeFe]-수소화효소와 관련하여, *HydE*, *HydF* 및 *HydG* 개방 해독 프레임의 구조를 보여준다. 비록 진술한 유기체에서 관찰된 [FeFe]-수소화효소 집합체 유전자가 [Fe]-수소화효소 구조 유전자와 함께 추정상의 오페론에서 발견된 것이기는 하지만, 도3에 도시된 대다수의 유기체 내의 이들 집합체 단백질은 구조 유전자로부터 별도로 발견된 것이다.

#### <64> HydEF 유전자의 상보성

<65> *C.reinhardtii* *HydEF-1* 변이에서 관찰된  $H_2$  생산의 손실을 *HydEF*의 붕괴와 관련짓기 위해서, 유전자 상보성을 이용하였다. *C.reinhardtii* 게놈 DNA의 라이브러리에서 발견되는 단일 BAC 클론으로부터, WT *HydEF* 유전자를 포함하는 게놈 DNA를 입수하였다. *HydEF* 유전자를 포함하는 BAC 플라스미드를 적정한 제한효소로 소화시켜, 총 길이의 *HydEF* 게놈 유전자와 추정상의 프로모터만을 포함할 것으로 예상되는 단편을 생성하였다. 이 삽입체를

antibiotic zeocin에 내성을 갖도록 하는 *Ble* 유전자를 포함하는 플라스미드 SP124S에 클로닝하였다. *hydEF-1* 변이를 이러한 구성체로 형질전환하였고, zeocin을 포함하는 TAP 배지에서 배양하였고, 도2B에 도시된 바와 같이 회복된  $H_2$ -생산 능력을 갖는 클론을 얻었다. 상보성 유전자의 통합 및 변이 배경의 확인은 서던 블롯을 이용하였다(도2C). CC425 샘플은 변이 및 상보적 클론 모두에서 WT 밴드가 관찰되지 않는다. 상보적 클론은 변이 게놈에 형질전환한 *HydEF* 게놈 단편을 다중으로 통합한 것에 대응되는 두 개의 강한 밴드가 관찰되며, 아울러, *HydEF* 유전자 부분만을 통합한 것을 나타내는 약한 밴드가 관찰된다.

#### <66> 유전자 발현 및 [FeFe]-수소화효소 축적의 분석

<67> 이후 노던 블롯 분석을 수행하여, (a) *hydEF-1* 변이에서 관찰된 수소화효소 활성의 손실이 *HydA1*의 붕괴 및/또는 *HydA2* 유전자 전사에 기인한 것인지, 및 (b) *HydEF* 및 *HydG*가 수소화효소 유전자와 함께 협기적으로 발현되는지를 판단하였다. 호기성 WT 및 *hydEF-1* 변이 배양물과, 암조건에서 0.5 및 4시간동안 협기적으로 유도한 WT 및 *hydEF-1* 변이 배양물로부터, RNA 시료를 수집하였다. 도4A-D는 각각, CC425 모체 WT 및 *hydEF-1* 변이 배양물로부터의 *HydA1*, *HydA2*, *HydG* 및 *HydEF* 유전자의 발현 프로필을 비교한 도면이다. 이와 같은 데이터는 *HydEF* 및 *HydG*가 WT 배양물에서 *HydA1* 및 *HydA2* 유전자와 수반하여 협기적으로 유도된다는 것을 보여준다. 마찬가지로, *HydA1*, *HydA2* 및 *2HydG* 전사 또한 *hydEF-1* 변이에서 협기적으로 유도되며, 예상했던 바와 같이, *HydEF*의 전사는 없다. 협기적으로 유도된 *hydEF-1* 배양물에서 *HydA1* 및 *HydA2*가 전사된다는 사실은, *HydEF* 유전자의 붕괴는 수소화효소 전사에 중요한 방식으로 영향을 주는 것이 아니라는 것을 나타내며, *hydEF-1* 배양물에서  $H_2$  생산이 손실되는 것은 수소화효소 유전자 전사의 결함 때문이 아니라는 것을 나타낸다.

<68> 이후 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 수소화효소 단백질 수준에서 *HydEF* 유전자 붕괴의 결과를 판단하였다(도4E). *C.reinhardtii* *HydA1* 및 *HydA2* 모두를 인식하도록 디자인된 항체를 이용하여, 수소화효소 단백질의 존재를 조사하였다. 예상한 바와 같이, 부분적으로 정제된 WT 샘플(실험 절차 참조)은 약 47-48kd의 전기영동 이동을 갖는 협기적으로 유도된 하나의 밴드만을 나타내며, 이는 두 가지 수소화효소가 함께 이동한 것에 기인하는 것이다. 비록, *C.reinhardtii*의 총 길이 *HydA1* 및 *HydA2* 수소화효소가 각각 53.1kd 및 53.7kd의 예상된 크기를 가졌지만, *HydA1*은 엽록체 운반 펩타이드 서열의 N-말단 단백질 가수분해 과정을 거쳐, 엽록체에 존재하는 47.5kd 숙성 단백질이 야기된다(T. Happe et al. [1993] *Eur. J. Biochem.* 214, 475-481). *HydA2* 단백질은 유사한 과정을 거쳐, 47.3kd 숙성 단백질이 야기될 것으로 예상된다(M. Forestier et al. [2003] *Eur. J. Biochem.* 270, 2750-2758). 협기적으로 유도된 *hydEF-1* 배양물에 관한 웨스턴 블롯 데이터는, 검출될만한 효소 활성이 결여되었음에도 불구하고, *hydEF-1* 변이 배양물에서 면역학적으로 검출될만한 효소 또한 발견된다는 것을 보여준다. *hydEF-1* 변이 배양물의 수소화효소 밴드의 전기영동상의 이동은 WT 밴드에 비례하여 다소 낮게 전환되며, 처리하지 않는 *C.reinhardtii* 수소화효소의 전기영동상의 이동과 일치한다. [NiFe]-수소화효소의 경우에, 단백질 가수분해 과정은 Ni의 삽입 후에 발생하며, 처리하지 않은 [NiFe]-효소에 비례하여 전환된 웨스턴 블롯이 야기된다(N. K. Menon et al. [1991] *J. Bacteriol.* 173, 4851-4861) (A Jacobi et al. [1992] *Arch. Microbiol.* 158, 444-451). 협기적으로 유도된 *hydEF-1* 단백질 추출물에 전환된 밴드가 존재한다는 것은, 완전히 조립된 활성 부위가 결여된 *C.reinhardtii* [Fe]-수소화효소의 경우에도 이러한 경우가 발생할 수 있다는 것을 나타낸다.

#### <69> E. coli.에서 C. reinhardtii HydA1의 이중 발현

<70> *HydEF* 및 *HydG* 단백질이 활성 [Fe]-수소화효소의 형성에 요구된다는 결론을 뒷받침할 만한 추가적인 증거를, 고유의 [FeFe]-수소화효소가 결여된 박테리아인 *E. coli*.에서 활성 *C. reinhardtii* *HydA1* 단백질을 이중 발현하여 보여줄 수 있다. *HydA1* 단백질은 *Strep-Tag II* 친화성 서열을 포함하고 *E. coli*.추출물로부터 정제된 융합단백질(fusion protein)로 발현되었다. *HydA1*의 발현은 *E.coli*에서 단독 또는 *HydA1*과 *HydEF*, 또는 *HydA1*과 *HydG* 유전자의 공동 발현으로 구성되며, 모두 도5에 도시한 바와 같이 정제 후 비기능적 *HydA1* 단백질의 발현을 야기한다. 그러나, 혐기성 *E.coli* 배양물에서 *HydEF* 및 *HydG* 모두와 함께 발현된 *C. reinhardtii* *HydA1*은 활성 *HydA1* 효소의 결과를 나타내었다(도5). 발현 시스템을 아직 최적화한 것이 아니기 때문에, 독립적인 실험에서 얻어진 활성 *HydA1*의 양은 소량이며 상당히 다양하다. 그럼에도 불구하고, 기능적 [FeFe]-수소화효소는 세 가지 발현된 유전자가 모두 존재하는 경우에만 얻어졌다. 일부 Radical SAM 단백질들은 대단히 낮은 턴오버수(turnover numbers)로 반응하며, 촉매가 아닌 반응물이 될 수 있다는 점에 주목하여야 한다(H. J. Sofia et al. [2001] *Nucleic Acids Res.* 293 1097-1106).

#### <71> Radical SAM 상동관계

- <72> HydEF 및 HydG 단백질은 Radical SAM(AdoMet radical이라고도 함) superfamily에 속한다. 이들 단백질은, 황 삽입, 라디칼 생성, 유기 링 합성, 및 혐기성 산화를 포함하는(그러나, 이에 국한되는 것은 아니다) 수많은 생화학적 반응에 관여한다. HydG 단백질 및 *C. reinhardtii* HydEF 단백질의 HydE 영역은 모두 Radical SAM protein superfamily 내에서 전형적으로 나타나는 Cys-X<sub>3</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys의 모티프(motif)를 포함하고 있다(도6). 이 모티프는 환원 조건 하에서 산화환원반응 활성 [4Fe4S] 클러스터와 배위결합한다. Radical SAM 단백질에 의한 이러한 반응은 전형적으로 [4Fe4S] 클러스터에서 S-adenosylmethionine(SAM)의 환원적 분열 후에 생성되는 자유 라디칼에 의해 개시되며, 환원적 분열 결과, methionine과 5'-deoxyadenosyl 라디칼이 생성된다. 이러한 고-에너지 유기 라디칼은 이후 각각의 Radical SAM 단백질에 고유한 기질로부터 수소 원자를 추출한다.
- <73> **H-클러스터 조립체에서 HydEF 및 HydG의 역할**
- <74> Radical SAM 단백질은 복잡한 생체분자의 혐기성 합성에 자주 관련되며, 불안정한 [FeS] 클러스터와 배위결합한다. 이러한 특성은 H-클러스터의 고유한 리간드를 합성하고, [FeFe]-수소화효소의 촉매 클러스터를 조립하는데 필요한 타입의 화학적 성질과 일치하는 것이다. Radical SAM superfamily의 최근 분류에 따르면, biotin synthase(BioB) 및 nitrogenase accessory protein NifB를 포함하는 대부분의 명백하게 관련된 단백질은 S transfer에 포함되는 것으로 보여진다. 특히, NifB, NifB-cofactor의 대사 산물로부터 발생된 Fe 및 S는, H<sub>2</sub>를 생산할 수 있는 또 다른 효소인, dinitrogenase(R. M. Allen [1995] *J. Biol. Chem.* 270, 26890-26896)의 [FeMo]-cofactor에 궁극적으로 포함된다. 따라서, Radical SAM 단백질을 [Fe]-금속효소(metalloenzyme)의 금속 촉매 클러스터에 Fe를 공여하는 것과 연관시키는 선례가 있으며, 우리는 HydE 및/또는 HydG 단백질 또한 [FeFe]-수소화효소의 H-클러스터 조립에서 Fe의 이동에 있어 유사한 역할을 한다는 것을 제안한다.
- <75> H-클러스터 또한 CN, CO 및 추정상의 di(thiomethyl)amine 리간드를 필요로 한다. 조 단백질(accessory protein) HydEF 및/또는 HydG 또한 Fe에 배위결합된 이들 산물의 생합성 및 조립에 필요하다는 것을 생각해 볼 수 있다. CN 및 CO는 생체에서 가장 독성이 있는 화합물 중 하나이며, 세포 내에서 자유롭게 존재할 수 없기 때문에, 이들 리간드를 H-클러스터 조립체에서 합성할 필요가 있다. [NiFe]-수소화효소의 경우에는, carbamoyl phosphate를 전구체로 이용하여 thiocarbamate를 생성하는 HypE 및 HypF 단백질에 의하여 CN 및 CO를 합성하는 강력한 증거가 있다. 그러나, *C. reinhardtii*, 또는 [FeFe]-수소화효소만을 포함하는 다른 유기체에서는 HypE 및 HypF 단백질의 동종 유전자가 발견된 바 없다. 이는 CN 및 CO 합성 또는 thiocarbamate를 생성하는 다른 방법이 존재한다는 것을 의미한다. Radical SAM 단백질은 유기 라디칼 생성, persulfide 생성, pyroxidal phosphate 활성화, thiocarbonyl 생성, 및 amine 이동을 포함하는 화합물질을 이용하며, 이들 모두 또는 일부는 H-클러스터 유기 리간드의 합성과 관련될 수 있다.
- <76> 도6은 원핵 동종 유전자와 관련하여 *C. reinhardtii* HydEF 및 HydG 사이의 동종 계열을 도시한 것이다. Radical SAM 모티프에 덧붙여, HydG 및 HydF 단백질에는 금속 이온과 배위결합할 수 있는 다른 서열이 포함되어 있다. 이러한 서열에는 HydF 영역의 C-말단 부근의 E(A/G)CXH와 (L/V)HC(G/A)(G/A) 모티프, 및 HydG 단백질의 C-말단 부근의 CT(A/G)CYR 모티프가 포함된다. 이들 세 가지 모티프는 [FeFe]-수소화효소 조립체 단백질 내에서 엄격히 보존되며, 다른 Radical SAM 단백질에는 없는 것들이다. 즉, 이들 모티프는 [FeFe]-수소화효소 조립체 단백질에 고유하다는 것을 알 수 있다. 몇몇 보존되는 다른 아미노산들이 HydEF 및 HydG 단백질에서 발견되나, 이들 결정소(determinants)의 역할에 관한 설명과 [FeFe]-수소화효소 조립체에서 잠재적인 금속-결합 모티프는 추가적인 연구가 필요하다. HydEF 단백질의 HydF 영역에는 추정상의 GTPase 영역이 포함되며, 마찬가지로 GTPase 활성을 갖는 HypB 단백질은 [NiFe]-수소화효소의 활성부위에 Ni이 결합되도록 촉진한다는 점도 주목해야 한다. 흥미롭게도, HydEF와 HydG 단백질은 모두 *T. maritima*(G. Pan et al. [2003] *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 469-474)로부터 특징이 부여된 TM1420 단백질과는 동종성이 없다. 후자는 8.5kD의 길이만을 가지며, 특징적인 Radical SAM 모티프를 포함하고 있지 않다. 이로부터, TM1420은 현재까지 특정된 가장 복잡한 [FeFe]-수소화효소를 갖는 *T. maritima*에 고유한 것임을 알 수 있다.
- <77> **Chlamydomonas [FeFe]-수소화효소의 이중 발현**
- <78> *E. coli*에서의 *C. reinhardtii* HydA1의 이중 발현에서는, 오직 두 가지 *C. reinhardtii* 유전자 산물, HydEF 및 HydG (세 가지 원핵 유전자에 상응)가 HydA1의 조립체에 요구된다는 것을 알 수 있다. 그러나, 활성 [NiFe]-수소화효소의 생성에는 최소한 7 개의 조 유전자 산물(accessory gene products)이 요구된다(L. Casalot et al. [2001] *Trends Microbiol.* 9, 228-237). 이러한 사실은 [FeFe]-수소화효소는 Ni가 결여된 것이기 때문에 보다 적은 성숙 유전자가 필요할 것이라는 예상과 일치하는 것이다(P.M. Vignais et al. [2001] *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455-501). [FeFe]-수소화효소의 조립체에만 요구되는 고유한 성숙 단백질이 존재한다는 것은 [NiFe]

및 [FeFe]-수소화효소 사이에는 계통 발생상의 관계가 없다는 것을 의미한다.

<79> *E. coli*에서 CpI 또는 DdH [FeFe]-수소화효소를 발현시키려던 종전의 시도에서는, H<sub>2</sub> 기체를 생성할 수 없는 비활성 단백질의 합성이 야기되었다(G. Voordouw et al. [1987] *Eur J. Biochem.* 162, 31-36) (Y. Asada et al. [2000] *Biochim. Biophys. Acta.* 1490, 269-278). 그러나, CpI [FeFe]-수소화효소 구조 유전자로 cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7942,를 형질전환하여, 활성 [FeFe]-수소화효소가 발현된 균주를 생산하였다. *Synechococcus* PCC7942에는 [FeFe]-수소화효소의 존재에 관한 생화학적 또는 유전적 증거가 없다는 점을 고려할 때, *Synechococcus* [NiFe]-수소화효소의 조립에 요구되는 조 단백질은 CpI [FeFe]-수소화효소 또한 활성화시킬 수 있을 정도의 유연성이 있는 보여진다. 이러한 현상이 *Synechococcus*에서는 가능하고, *E. coli*에서는 가능하지 않은 이유는 명확하지 않다. 그러나, 이러한 결과는 서로 다른 미생물에서 수소화효소의 발현 및 활성의 복잡한 속성을 강조하는 것이다.

<80> *E. coli*에서 *C. acetobutylicum* [FeFe]-수소화효소의 발현 및 생합성

<81> 비록 전술한 바와 같은 *E. coli*에서 발현된 정제된 조류 [FeFe]-수소화효소는 활성이 있었으나, 발현 플라스미드의 불안정성은 형질전환물질의 증식을 어렵게 만들고, 이는 낮은 HydA1 발현 레벨을 야기하였다. 조류 유전자의 DNA 구성은 GC에 편중되어 전체적으로 64%에 이르며, 세 번째 코돈 위치에서는 90%에 이른다. 유전자 안정성 및 발현에 대한 코돈 편중의 효과를 조정하기 위해서, 조류 유전자를 대체하여 이용할 수 있도록 HydEF 및 HydG와 동종성이 있는 다양한 혐기성 미생물의 서열분석된 게놈을 조사하였다. *C. acetobutylicum*에서의 용해성, 단량체 [FeFe]-수소화효소(CaHydA)의 특성에 관한 이전 연구에 따르면, *C. acetobutylicum*의 게놈에는 *HydE*, *HydF* 및 *HydG* 동종 유전자가 포함되어 있다는 것이 알려져 있다. *C. reinhardtii* *HydEF*(70%) 및 *HydG*(65%) 유전자의 높은 GC 함유와는 달리, *C. acetobutylicum* 유전자에는 AT가 보다 많다(GC 함유; *HydE*, 32%; *HydF*, 33%; *HydG*, 35%). 따라서, *C. acetobutylicum*은 보다 안정적이며, *E. coli*에서 보다 발현이 잘 될 것으로 기대되었다. *C. acetobutylicum* *HydE*, *HydF* 및 *HydG* 유전자를 PCR 증폭하고, [FeFe]-수소화효소 I을 암호화하는 *HydA* 유전자와 함께 T7 발현 플라스미드에 클로닝하였다(도7). *C. acetobutylicum* 성숙 및 구조 유전자를 포함하는 플라스미드를 IPTG-유도성 발현을 위해 *E. coli* 균주 BL21(DE3)에 형질전환하였다. *E. coli*에서의 증식에서 일부 재배열 현상(공개되지 않은 결과)이 관찰되었던 *C. reinhardtii* *HydEF* 및 *HydG* 유전자를 암호화한 플라스미드와 비교하여볼 때, *C. acetobutylicum* *HydE*, *HydF* 및 *HydG* 유전자를 암호화한 플라스미드에서는 서열의 변경이 관찰되지 않았다. *C. acetobutylicum* 유전자의 보다 높은 안정성으로 인하여, 보다 많은 수의 형질전환 세포를 얻을 수 있었으며, 발현 조건에서 성숙 비율도 보다 높았다(데이터 생략).

<82> 발효될 만한 당이 없는 상태에서 *E. coli*를 혐기적으로 배양하면, formate가 결여되어 있기 때문에 내생의 [NiFe]-수소화효소, Hyd1, Hyd2 및 Hyd3가 유도되지 않는다. formate는 성숙을 암호화하고 있는 *hyp*와 *hyc* 오페론 및 Hyd3 구조 유전자 각각의 전사 활성화에 요구되는 발효성 대사물질이다. 그 결과, formate가 없는 상태에서 *E. coli*를 혐기적으로 배양하게 되면, 표1에 나타난 바와 같이 전-세포(whole-cell) 추출물에서 기본적 수준의 [NiFe]-수소화효소 활성이 야기된다.

표 1

유기체	[FeFe]수소화효소	전-세포 추출물 <sup>a</sup> (nmol H <sub>2</sub> ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	정제된 친화성 (μmol H <sub>2</sub> mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
<i>E. coli</i>		0.35 <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>
<i>C. reinhardtii</i>	HydA1	61	150
<i>C. reinhardtii</i>	HydA2	108	116.1
<i>C. acetobutylicum</i>	HydA	96	75.2
	HydA Δ N	6	31.6
	HydB	13	8.6
<i>C. pasteurianum</i>	HydA	150	ND
	HydA Δ N	15	ND

<sup>a</sup> 0.1% Triton X-100에 용해된 전 세포

- <85> <sup>b</sup> [FeFe]-수소화효소 구조 및 성숙 유전자가 결여된 상태에서의 전 세포 활성
- <86> <sup>c</sup> ND, 판단되지 않음(not determined)
- <87> 이러한 배양 조건에서의 기본적 [NiFe]-수소화효소 활성은 재조합 방식으로 발현된 [FeFe]-수소화효소의 성숙 및 생합성에 관한 연구를 가능하게 한다. 표1에 나타낸 바와 같이, CaHydA 구조 단백질과 함께 *C. acetobutylicum* 성숙 시스템을 발현하는 혐기적으로 배양한 *E. coli* 세포의 추출물은, 형질전환되지 않은 세포의 추출물보다 배 이상의, 환원된-MV-촉매의, H<sub>2</sub>-방출 활성을 나타내었다. 이와 같이 증가된 수소화효소의 활성은 높은 수준의 플라스미드-암호화 *C. acetobutylicum* 유전자 발현과 CaHydA [FeFe]-수소화효소의 생합성에 기인한 것이다.
- <88> *C. acetobutylicum* 성숙 시스템은 mg-per-liter의 CaHydA를 생산하였다. 반면에, *C. reinhardtii* 성숙 시스템은  $\mu$ g-per-liter의 *C. reinhardtii* HydA1만을 생산하였다. 표1에 나타낸 바와 같이, 친화성이 정제된 StrepII-tagged CaHydA에 의한, 환원된-MV-촉매의, H<sub>2</sub>-방출의 특정 활성은 75  $\mu$ mol H<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>이었으며, 이는 Girbal et al.이 *C. acetobutylicum*으로부터 CaI 정제에 관하여 보고한 수치보다 7.5배 높은 것이다(L. Girbal et al. *Appl. Env Microbiol.* 71, 2777-2781).
- <89> ***C. acetobutylicum* 성숙 시스템에 의한 이중 [FeFe]-수소화효소의 생합성**
- <90> 녹조류 *C. reinhardtii*에서 발견되는 [FeFe]-수소화효소의 생화학적 및 구조적 특성을 연구하면서, 우리는 *C. acetobutylicum*의 조류 효소 생합성 능력에 관한 실험에 관심을 두게 되었다. 조류 [FeFe]-수소화효소의 펩타이드 서열의 특징은 강하게 보존되는 H-클러스터/촉매 영역을 보조하는 accessory iron-sulfur-cluster 영역이 결여되어 있다는 것이다(도9). 이와 같이 감소된 구조적 복잡성은 조류 수소화효소를 가장 간단하게 그러나 특징이 규정되도록 분류한다. *C. reinhardtii*에서, CrHydA1 [FeFe]-수소화효소는 세포질(cytoplasm)로부터 엽록체 기질(chloroplast stroma)로의 전좌(translocation)의 결과로서 N-말단 과정을 겪는다. CrHydA1과 유사하게, CrHydA2의 N-말단 서열 또한 아미노산 위치 61 근처의 예상되는 붕괴 위치로 특징되는 신호 서열을 포함한다. *E. coli*에서의 발현을 위하여, 절단된 *HydA2*를 발현 플라스미드 pCaE에 클로닝하여, 예상되는 처리 산물에 대응하는 위치 62에서 N-말단이 생성되도록 하였다. 표1에 나타낸 바와 같이, CrHydA1 및 CrHydA2 모두의 성숙 형태는 *E. coli*에서 활성 효소로 생합성되었다. 친화성 정제 후에, 이들 단백질의 수율은 0.8 내지 1.0 mg-per-liter-of-culture의 범위였다. 정제된 CrHydA1 및 CrHydA2의 환원된-MV로부터의 H<sub>2</sub>-생산 활성은 각각 150 및 116  $\mu$ mol H<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> 이었다. 본 실험의 *E. coli* 발현 시스템에서 정제된 CrHydA1의 이와 같이 측정된 활성은 재조합으로부터 정제한 효소, 또는 고유의 효소에 관하여 이전에 발표된 활성보다 5-6배 낮은 것이다. 혐기적 조건하에서, *C. reinhardtii*는 생체 내 H<sub>2</sub>-생산에 있어서 [FeFe]-수소화효소에 대한 전자-공여체로서 환원된 [2Fe2S]-페레독신(ferredoxin)을 이용한다는 점이 알려져 있다. 부분적으로 정제된 *C. reinhardtii* 수소화효소와 환원된 *C. reinhardtii* [2Fe2S]-페레독신의 H<sub>2</sub>-방출 역학에 관한 종전의 측정은 10  $\mu$ M의 K<sub>m</sub>을 나타내었다. 본 실험에서 정제된 HydA2의 환원된 시금치 [2Fe2S]-페레독신의 K<sub>m</sub>은 31  $\mu$ M에서 측정되었다. 이러한 값은 이전에 보고된 정제된 HydA1 및 환원된 시금치 페레독신의 35  $\mu$ M 값과 유사한 것이며, HydA2가 *C. reinhardtii*에서 생체 내 H<sub>2</sub>-생산을 촉매할 수 있는 능력이 있다는 것을 보여준다.
- <91> 요약하면, *C. reinhardtii*에서 발견되는 두 가지 새로운 유전자 *HydEF* 및 *HydG*는 [Fe]-수소화효소를 포함하는 유기체에서 엄격하게 보존된다. *HydEF* 및 *HydG* 유전자는 *C. reinhardtii*에서 *HydA1* 및 *HydA2* [Fe]-수소화효소 유전자와 나란히 혐기적으로 전사된다. *HydEF*의 붕괴는 모든 H<sub>2</sub> 생산을 파괴하며, 웨스턴 블롯 분석을 통해 총길이 수소화효소 단백질이 검출될지라도, 효소 활성이 관찰되지 않는다. 수소 생산은 *HydEF* 유전자를 포함하는 WT 게놈 DNA로 *hydEF-1* 변이를 보완한 후에 회복된다. 더구나, 우리의 보고는 *E. coli*에서 *C. reinhardtii* *HydEF*, *HydG* 및 *HydA1* 유전자를 성공적으로 동시에 발현시키고, 활성 [FeFe]-수소화효소를 합성한 최초의 사례이다. 본 연구는 또한 새로운 클래스의 금속-효소 조 단백질을 규명하고 있으며, Radical SAM superfamily에 속하는 두 가지 단백질에 조립체 기능을 할당하고 있다. 이러한 [FeFe]-수소화효소 조립체 단백질의 특성은 자연 상태에서 [Fe]-수소화효소가 합성되는 메커니즘에 관한 추가적인 연구를 크게 촉진할 것이다.
- <92> 본 연구는 H-클러스터 생합성이 매우 잘 보존되는 과정이라는 점을 명백히 보여주는 것이다. [FeFe]-수소화효소 CpI(본 연구에서로 CpHydA로 표시함) 및 DdH에 관한 최근의 구조적 데이터와 함께, 본 연구는 다양한 [FeFe]-수소화효소는 실질적으로 동일한 H-클러스터를 포함한다는 초기의 관찰을 뒷받침하는 것이다. 이는 CaHydA(~19%)

와 낮은 서열상의 동일성을 갖지만, 동일한 *C. acetobutylicum* 단백질들에 의한 숙성을 겪는 CaHydB의 경우에서 아마도 보다 명확할 것이다.

### 산업상 이용 가능성

- <93> 화석 연료를 대신할 생물학적 대체물질을 개발하려는 노력은 수많은 에너지 매개체를 위한 생산 근원으로서 미생물을 이용하고자 하는 관심을 촉진하는데 도움이 되어 왔다.  $H_2$ -생산 유기체의 생리학 및  $H_2$  대사를 증대하는 수소화효소는 광범위한  $H_2$ -생산의 근원으로 이용하기 위하여 집중적으로 연구되어 왔다. 수소화효소가 생합성되는 방식, 및 수소화효소의 독특한 구조가 생화학적 및 대사적 기능에 기여하는 방식에 관한 보다 많은 이해는, 생물학적 및 생체-호흡적  $H_2$ -생산 시스템의 지속적인 발전에 도움이 될 것이다.
- <94> 바람직한 실시예를 참조하여 본 발명을 상세히 설명하였으나, 이는 하나의 예로서 기재된 것이며, 이에 한정하여 해석되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서 수많은 변형 및 당업자에 의한 추가적인 실시예는 후술하는 청구범위에 기재된 본 발명의 사상 내에서 명백해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- <16> 도1은, *C. reinhardtii* hydEF-1 변이의 초기 특성을 나타낸 것으로, (A)는 TAP 배지에서 배양한 *C. reinhardtii* 삼입 변이의 콜로니(좌측) 및 혐기성 유도 후, 케모크로믹 센서 상에서 암청색 점으로 시각적으로 검출된  $H_2$ 의 광-생산(우측)을 나타내며(콜로니 4(하단, 좌측)는 충분한  $H_2$ 의 생산이 검출되지 않음); (B)는 조류 광합성 및 호흡의 비율을 나타내며; (C)는 암조건에서 혐기적으로 유도된 배양물로부터  $H_2$  광-생산의 초기 비율을 나타낸 것이다(WT만이  $H_2$ 를 생산하였다).
- <17> 도2는, hydEF-1 변이에서의 유전자 붕괴 및 변이 표현형의 상보성을 나타낸 것으로, (A)는 *C. reinhardtii* 게놈에서 HydEF 및 HydG 유전자의 구성을 도식화하여 나타낸 것이며(상측), 엑손은 직사각형으로 표시하고, HydG 및 HydEF를 각각 회색 또는 검은색으로 칠하였다. 5' URTs는 각각의 ATG 개시 코돈에서 끝나는 검은색 화살표로 표시하였다. 종결 코돈은 3' URTs에 뒤에 별표로 표시하였다. HydEF에서 arg7 유전자의 삼입 위치는 역삼각형으로 표시하였다. 삼각형의 오른쪽에 이르는 HydEF 유전자 부분은 HydEF-1 변이에서 삭제되었다. 추정상의 프로모터 영역은 흰색 직사각형으로 표시하였다. 처음 두 엑손이 이어지는 프로모터 영역을 확대, 도식화하여 하단에 나타내었다; (B)는 (1-r) 모체 균주(CC425), hydEF-1 변이 및 HydEF 유전자로 보완된 hydEF-1 변이에서 측정된  $H_2$  광-생산을 나타낸 것이며(암조건 혐기성 유도 4시간 후에 분석), 평균으로부터의 평균 편차를 표시한다; (C)는 (B)에서 나타난 동일한 클론의 서던 블롯을 나타낸 것이다. 게놈 DNA를 NcoI로 소화시켜, 블롯하고, hydEF-1 변이에서 삭제된 DNA 서열을 이용하여 탐침하였다.
- <18> 도3은, 유기체에서 발견되는 *C. reinhardtii* HydA1, HydEF(HydE 및 HydF 영역) 및 HydG의 추정상의 동종 유전자를 서열분석된 게놈과 함께 나타낸 것이다. *C. reinhardtii* 단백질에 대한 유전자 식별, 동일한 아미노산 퍼센트(%I), E 값, 동종관계 길이, 및 동종관계 랭크를 나타낸다. 유기체의 게놈 내의 각각의 유전자의 구성 또한 포함한다.
- <19> 도4는, CC425 또는 hydEF-1 배양물로부터 분리한 (A) HydA1, (B) HydA2, (C) HydG 및 (D) HydEF 전사물의 노던 블롯을 나타낸 것이다. 0, 0.5, 또는 4 시간의 혐기성 유도 시간을 표시한다. WT 및 hydEF-1 배양물로부터 얻은 RNA를 전기영동하고, 블롯하고, 노던 블롯 실험에서 함께 탐침하였다. 각각의 노던 블롯 하단에는 로딩 대조구로서 ribosomal 23S RNA 밴드를 표시하였다. (E)에서, 웨스턴 블롯은 호기적 및 혐기적으로 유도된 샘플로부터 얻은 부분적으로 정제된 단백질 추출물이다. 블롯은 *C. reinhardtii* HydA1 및 HydA2 모두를 인식하도록 디자인된 항체를 이용하여 탐침하였다.
- <20> 도5는, *E. coli*에서 단독 또는 표시된 Hyd 단백질과 함께 이중적으로 발현된 정제 HydA1의 수소-생산 비율을 나타낸 것이다. 수소 생산은 methyl viologen-based assay를 이용하여 측정하였다. 4가지 독립된 실험의 평균, 평균으로부터의 평균 편차를 나타낸다.
- <21> 도6은, 다른 유기체에서 발견되는 추정상의 동종 유전자와 함께 *C. reinhardtii* (A) HydEF 및 (B)HydG 아미노산 서열의 배열을 나타낸 것이다. 아미노산 서열은 *C. reinhardtii* cDNA로부터 유래된 것이다. 동일한 아미노산 영역은 검은색으로 표시하고, 유사한 아미노산 영역은 회색으로 표시하였다. *C. reinhardtii* 링커 영역에 이어 HydE 동종 유전자, 마지막에는 HydF 동종 유전자를 (A)에 나타내었다. 배열이 표시된 유기체는 다음과 같다:

*Thermotoga maritima*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium tetani*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Shewanella oneidensis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium perfringens* 및 *Clostridium acetobutylicum*.

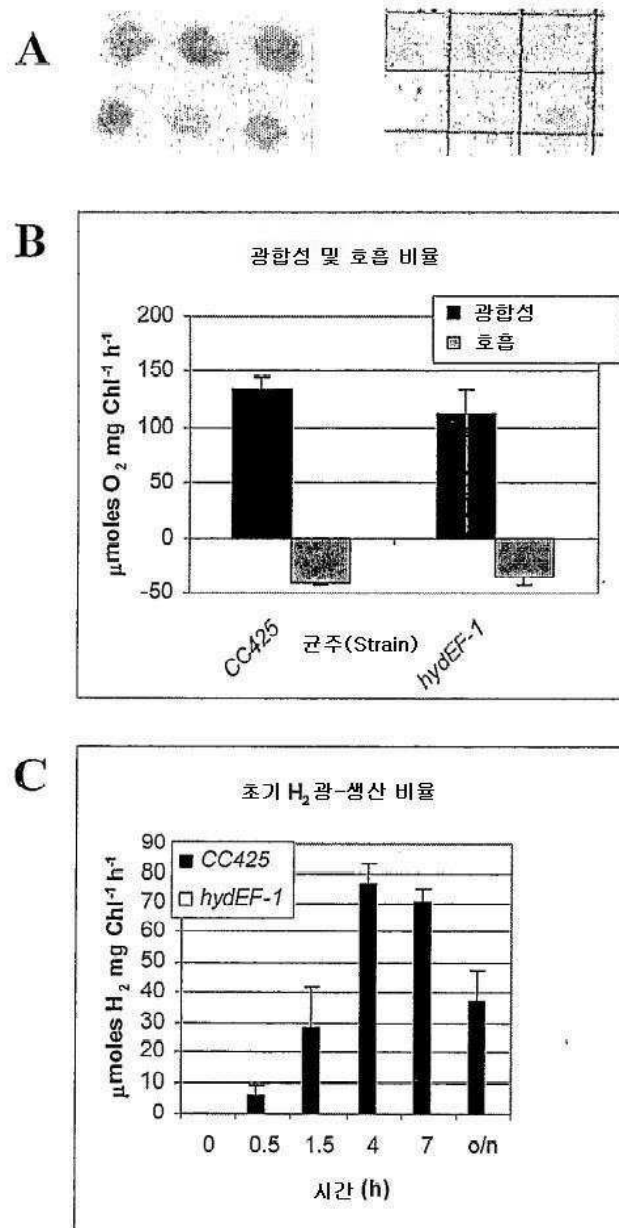
<22> 도7은, [FeFe]-수소화효소 성숙 및 구조 유전자의 T7-프로모터 발현의 플라스미드 구성을 나타낸 것이다. (A) *HydE*와 *C. acetobutylicum*으로부터의 *CaHydA*(pCaAE)(도면에 표시된), *CaHydB*(pCaBE) 또는 *CaHydA*Δ*N*(pCaAΔNE); 또는 *C. pasteurianum*으로부터의 *CpHydA*(pCpAE) 또는 *CpHydA*Δ*N*(pCpAΔNE)를 함께 발현시키는데 pCaE2를 기골로 이용하였다. (B) *HydE*와 *C. reinhardtii* *CrHydA1*(pECr1)(도면에 표시된) 또는 *CrHydA2*(pECr2)를 함께 발현시키는데 pCaE1을 기골로 이용하였다. (C) pCaFG가 *C. acetobutylicum* *HydF* 및 *HydG*를 함께 발현. (D) pCaHydA가 *C. acetobutylicum* *HydA*를 발현. (E) pCaE1(MCS1의 NcoIBamHI 부위에서 *HydE*) 및 pCaE2(MCS2의 NcoIBamHI 부위에서 *HydE*). (F) pCaF가 *C. acetobutylicum* *HydF*를 발현. (G) pCaG가 *C. acetobutylicum* *HydG*를 발현.

<23> 도8은, 정제된 StrepII-tagged [FeFe]-수소화효소의 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다. 1레인, *C. acetobutylicum* *HydA*(1.5μg, 65Kd); 2레인, *C. acetobutylicum* *HydA*Δ*N*(2μg, 43Kd); 3레인, *C. acetobutylicum* *HydB*(5μg, 50Kd); 4레인, *C. reinhardtii* *HydA1*(2.25μg, 49Kd); 5레인, *C. reinhardtii* *HydA2*(1μg, 49Kd); 6레인, 분자량 마커, 75, 50 및 35Kd.

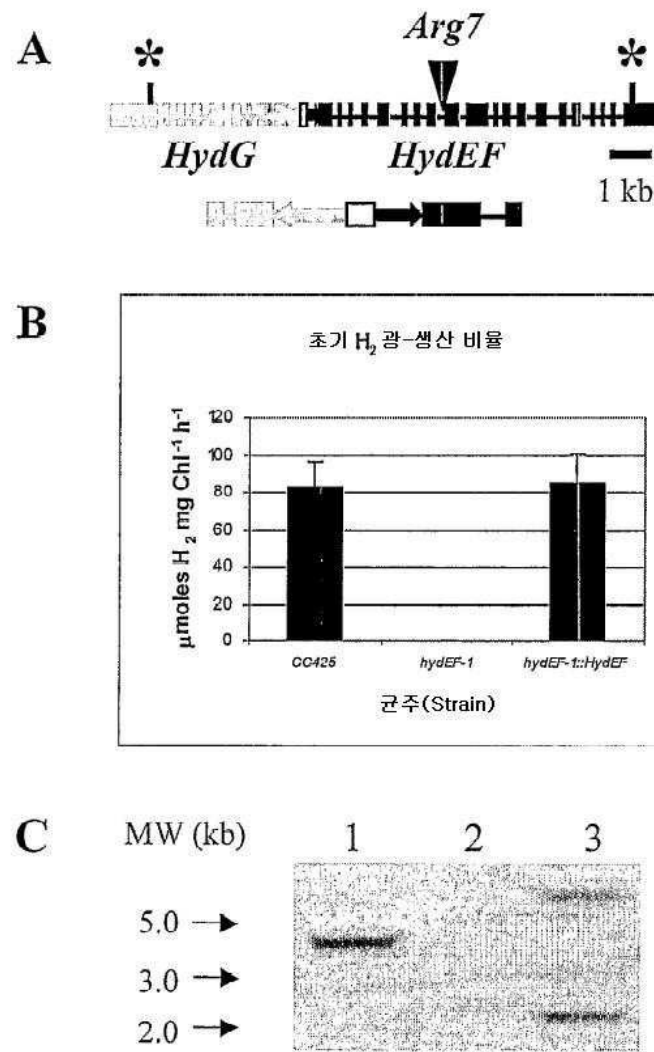
<24> 도9는, 본 연구에 이용된 [FeFe]-수소화효소의 서열을 도식화하여 나타낸 것이다(Ca=*C. acetobutylicum*, Cp=*C. pasteurianum*, Cr=*C. reinhardtii*). 상단의 도식은 용해성 [FeFe]-수소화효소에서 발견되는, 보존된 F-클러스터 결합 영역(빗살무늬)과, H-클러스터 결합 모티프 HC1(TSCCP) 및 HC2(MACPGGC)(검은색 바)의 상대적인 위치를 나타낸 것이다. 화살표 머리는 *C. acetobutylicum* 및 *C. pasteurianum*에서 삭제된 보존된 F-클러스터 결합 영역의 N-말단을 표시한 것이다.

도면

도면1



도면2

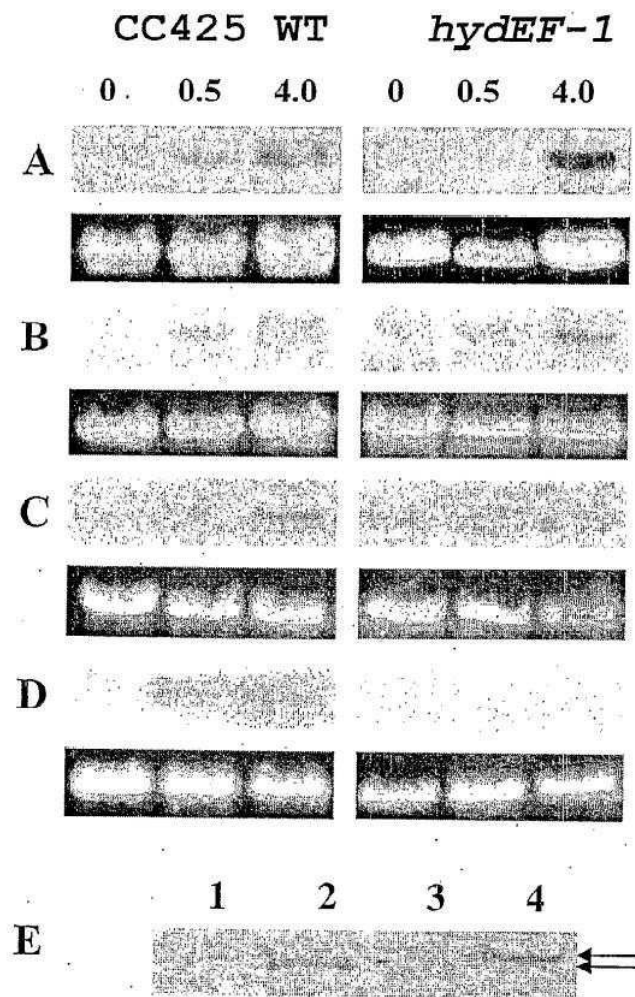


도면3

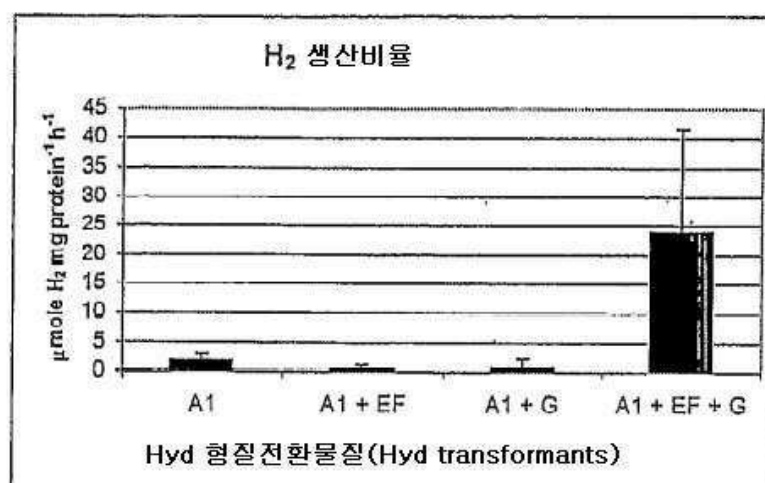
C.reinhardtii 추정상의 [Fe]-수소화효소 성숙 단백질의 동종유전자

Organism	Orf	% I	E value	Homology Length	Rank	Genome Organization
<i>T. maritima</i>	<i>HydG</i>	45	-122	75-565	2	Putative genes/operon: <i>HydG</i> , unknown, <i>HydE</i> , Cystathionine $\gamma$ -synthetase. Putative homologue to algal [Fe]-Hydrogenase gene ungrouped.
	<i>HydE</i>	35	-57	104-483	4	
	<i>HydF</i>	29	-35	12-404	10	
	<i>HydA1</i>	48	-104	66-497	1	
<i>C. thermocellum</i>	<i>HydG</i>	46	-122	74-566	3	Putative homologues to algal [Fe]-Hydrogenase and maturation-protein genes are ungrouped.
	<i>HydE</i>	35	-53	122-474	5	
	<i>HydF</i>	30	-42	5-384	12	
	<i>HydA1</i>	45	-93	86-485	3	
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>HydG</i>	46	-112	122-564	7	Putative genes/operon: [Fe]-Hydrogenase, <i>HydE</i> , <i>HydG</i> , <i>HydF</i> , Alanine dipeptidyl peptidase, Poly-Hydroxybutyrate depolymerase.
	<i>HydE</i>	32	-47	124-474	6	
	<i>HydF</i>	27	-39	12-447	3	
	<i>HydA1</i>	42	-89	67-485	5	
<i>T. tengcongensis</i>	<i>HydG</i>	38	-93	61-566	11	Putative homologues to algal [Fe]-Hydrogenase and maturation-protein genes are ungrouped.
	<i>HydE</i>	35	-59	100-480	3	
	<i>HydF</i>	29	-39	12-468	5	
	<i>HydA1</i>	44	-96	84-485	2	
<i>D. vulgaris</i>	<i>HydG</i>	47	-124	73-567	1	Putative operon: <i>HydA</i> ([Fe]-Hydrogenase large sub-unit), <i>HydB</i> ([Fe]-Hydrogenase sub-unit), <i>HydF</i> , <i>HydE</i> , Putative aspartate-ammonia lyase, <i>HydG</i> .
	<i>HydE</i>	31	-37	123-452	10	
	<i>HydF</i>	30	-39	12-465	4	
	<i>HydA1</i>	41	-81	90-485	8	
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>HydG</i>	41	-105	74-564	9	Putative homologues to algal [Fe]-Hydrogenase and maturation-protein genes are ungrouped.
	<i>HydE</i>	35	-62	126-479	1	
	<i>HydF</i>	28	-39	12-398	11	
	<i>HydA1</i>	37	-72	66-485	9	
<i>C. perfringens</i>	<i>HydG</i>	41	-108	71-565	8	Putative homologues to algal [Fe]-Hydrogenase and maturation-protein genes are ungrouped.
	<i>HydE</i>	34	-60	99-480	2	
	<i>HydF</i>	28	-38	12-464	8	
	<i>HydA1</i>	37	-71	66-485	10	
<i>D. desulfuricans</i>	<i>HydG</i>	44	-116	73-567	5	Putative operon: <i>HydL</i> ([Fe]-Hydrogenase large sub-unit), <i>HydS</i> ([Fe]-Hydrogenase small sub-unit), unknown, <i>HydG</i> , <i>HydE</i> , <i>HydF</i> .
	<i>HydE</i>	30	-34	126-479	12	
	<i>HydF</i>	29	-38	56-467	9	
	<i>HydA1</i>	45	-88	86-485	6	
<i>C. botulinum</i>	<i>HydG</i>	41	-101	129-566	12	Putative genes/operon: <i>HydE</i> , <i>HydG</i> , <i>HydF</i> . Putative homologue to algal [Fe]-Hydrogenase gene ungrouped.
	<i>HydE</i>	44	-43	272-474	8	
	<i>HydF</i>	28	-40	1-468	1	
	<i>HydA1</i>	46	-91	85-485	4	
<i>C. difficile</i>	<i>HydG</i>	42	-102	75-567	10	Putative genes/operon: <i>HydG</i> , <i>HydE</i> , <i>HydF</i> . Putative homologue to algal [Fe]-Hydrogenase gene ungrouped.
	<i>HydE</i>	29	-45	121-474	7	
	<i>HydF</i>	28	-40	12-430	2	
	<i>HydA1</i>	40	-82	85-485	7	
<i>S. oneidensis</i>	<i>HydG</i>	41	-112	50-567	6	Putative genes/operon: <i>HydA</i> ([Fe]-Hydrogenase large sub-unit), <i>HydB</i> ([Fe]-Hydrogenase small sub-unit), Cytochrome B-type, unknown, <i>HydG</i> , <i>HydE</i> , <i>HydF</i> .
	<i>HydE</i>	32	-37	43-318	11	
	<i>HydF</i>	28	-38	12-469	7	
	<i>HydA1</i>	35	-62	91-486	11	
<i>C. tetani</i>	<i>HydG</i>	43	-118	28-477	4	Putative genes/operon: <i>HydG</i> , <i>HydE</i> , <i>HydF</i> , HymD-type ( <i>E. acidaminophilum</i> [Fe]-Hydrogenase operon) putative membrane spanning protein. Putative homologue to algal [Fe]-Hydrogenase gene ungrouped.
	<i>HydE</i>	30	-40	100-449	9	
	<i>HydF</i>	27	-38	12-451	6	
	<i>HydA1</i>	30	-13	72-333	12	

도면4



도면5

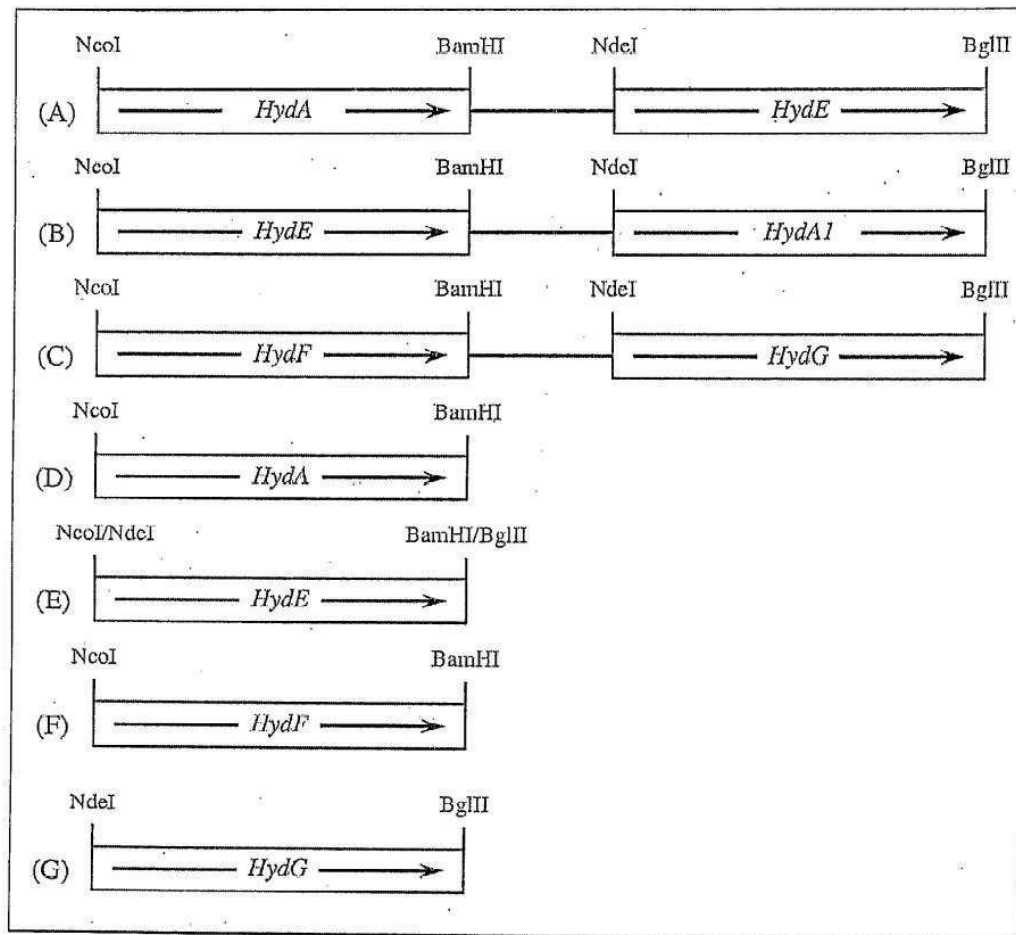


도면6

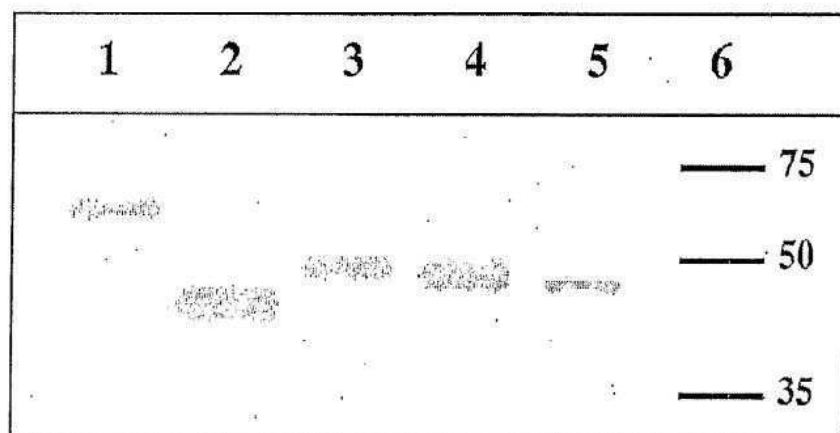
**HydF** **Domain** **Domain**

**B HydG**

도면7



도면8



도면9

