(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0083172
(43) 공개일자 2017년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/67 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/67 (2013.01)
C12N 9/0073 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0001809
(22) 출원일자 2016년01월07일
심사청구일자 2016년01월07일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박진병
서울 영등포구 여의도동 여의동로 3길 10 여의도자이아파트 401동 902호
송지원
서울특별시 영등포구 여의나루로 7 6동 509호 (여의도동,광장아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

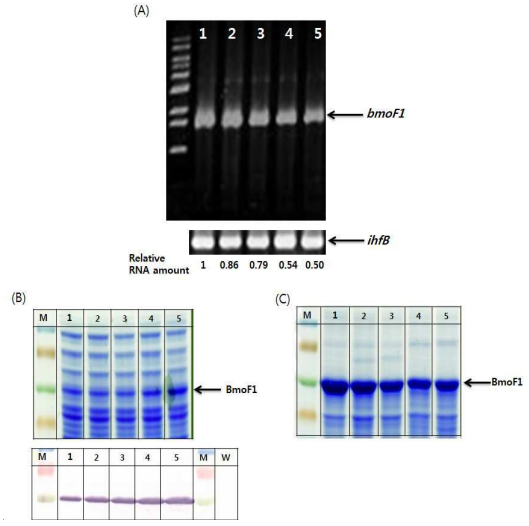
(54) 발명의 명칭 **3'UTR 엔지니어링을 통한 외래 단백질의 미생물 세포 내 수용성 발현 향상방법**

(57) 요 약

본 발명은 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시키는 방법, 목적 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율 증가용 발현벡터 및 상기 발현벡터 도입되어 목적단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시킬 수 있는 형질전환체에 관한 것이다.

본 발명의 수용성 단백질의 발현비율을 증가시키는 방법을 통해 효소의 활성을 조절할 수 있고, 전세포 생물전환을 이용하여 다양한 화학물질의 생산성을 증가시킬 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 2330/51 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 목적하는 수용성 단백질을 코딩하는 유전자의 3'말단에 mRNA 안정성을 증가시키는 UTR(untranslated region)이 결합된 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하고,

상기 UTR의 염기서열 내에는 mRNA의 안정성을 저하시키는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열이 삽입된 것을 특징으로 하는, 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 목적하는 수용성 단백질은 과발현 되었을 때, 과발현된 단백질이 세포내에서 상호 응집하여 봉입체를 형성함으로써, 상기 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율이 50% 이하인 단백질인 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서 상기 목적하는 수용성 단백질은 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 또는 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO(Bayer-Villiger monooxygenase)인 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO는 BmoF1인 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO는 MO16인 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 RNase E 절단 부위 수의 조정에 따라 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율이 변화되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, BmoF1 발현하는 경우, 상기 RNase E 절단 부위의 수가 증가할수록 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현 비율을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 UTR에 삽입된 RNase E 절단부위의 개수는 10 내지 100개인 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 RNase E 절단부위를 포함하는 염기서열은 *hilD* 염기서열, CAT 염기서열의 전체 또는 일부인 것인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 *hilD* 염기서열에 포함되는 RNase E 절단 부위의 수는 12 내지 16 개인 것인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 CAT 염기서열에 포함되는 RNase E 절단부위의 수는 13 내지 30개인 것인, 방법.

청구항 12

목적하는 수용성 단백질을 코딩하는 유전자의 3'말단에 mRNA 안정성을 증가시키는 UTR(untranslated region)이 결합된 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있도록, 상기 유전자가 도입될 수 있는 다중 클로닝 부위(multicloning site) 및 상기 다중 클로닝부위의 3'말단에 결합되고, mRNA의 안정성을 저하시키는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열이 삽입된 UTR(untranslated region)을 포함하는, 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율 증가용 발현벡터.

청구항 13

제12항의 발현벡터가 도입되어, 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현수준을 증가시킬 수 있는 형질전환체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시키는 방법, 목적 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율 증가용 발현벡터 및 상기 발현벡터를 도입되어, 목적 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시킬 수 있는 형질전환체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 합성 생물학 및 시스템 생물학은 전세포 생물 촉매 및 미생물 발효를 통해 다양한 화학물질의 개발을 가능케 한다. 작은 물질 뿐만 아니라 크고 복잡한 대사물질(예를 들어, 폴리케놀, 카로테노이드, 테르페노이드, 식물 옥시리핀스) 또한, 시스템 대사 공학의 도움으로 합성될 수 있다.

[0004] 그러나, 상기 화학물질은 미생물 촉매에서 효소의 낮은 발현 수준 등 많은 요소들에 의해 생산성이 그리 높지 않은 상황이다. 무엇보다도, 산소첨가효소(P450 모노산소첨가효소 및 Bayer-Villiger monooxygneases(BVMO))는 재생가능한 바이오메스 뿐만 아니라 탄화수소의 산화관능화, 지방산에서 크고 복잡한 대사물질을 제조하는 데에 있어 핵심 효소 중 하나이지만, 박테리아 세포에서 상기 효소들이 기능적 형태(즉, 수용성 형태)의 과발현은 어렵다.

[0005] 박테리아 세포에서 산소첨가효소와 같은 이종 단백질의 기능적 발현은 다양한 방법에 의해 개선될 수 있다. 유

전자 발현에 대한 유도조건(예를 들어, 배양 온도(Chalmers 등, 1990, Appl. Environ. Microbiol., 56, 104-111), 유도물질의 농도 뿐만 아니라, 프로모터, 리보좀 결합 자리, 5'-비해석 부위(5'- UTR), 및 코돈 사용을 포함하는 유전자 발현 시스템 또한, 효소 및 단백질의 수용성 발현을 증진시키기 위해, 널리 연구가 이루어지고 있다. 이외에도, 분자적 샤페론을 도입하거나, 수용성 펩티드 및 단백질과 융합된 단백질 발현 및 기타 다른 단백질 엔지니어링(예를 들어, 유도진화)은 종종 박테리아 세포에서 외부 단백질 및 효소의 기능적 발현을 가능케 한다(Ario de Marco 등, 2007, BMC Biotechnology, 7:32).

[0006] 3'UTR은 원핵생물에서 mRNA의 안정성에 기여하는 전사 터미네이터의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 의하여, 3'UTR로서 특정서열(예를 들어, REP 서열)을 삽입하여 전사적으로 활성화된 mRNA의 안정성을 증가시키는 데에 사용되고 있다. 예를 들어, 3'UTR로서 REP 서열을 삽입하여, mRNA의 안정성을 증가시키고 이에 의해 대장균에서 MalE 단백질의 발현 수준을 상당히 증가시킨 보고가 있다. 그러나, 3'UTR에 RNase E 절단 부위 포함하는 염기서열을 삽입하여 mRNA 안정성을 감소시키고 이에 따른 단백질의 기능적 발현(수용성 발현)을 증가시키는 연구는 아직 이루어지지 않고 있다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 대장균에서 효소의 수용성을 증가시키기 위한 새로운 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 목적하는 수용성 단백질을 코딩하는 유전자의 3'말단 UTR에 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열을 삽입하여 제조된 폴리뉴클레오티드를 수득 및 발현시켜 목적하는 단백질의 발현 수준 대비 수용성 발현비율이 증가함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현수준 증가용 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 발현벡터가 도입되어 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시킬 수 있는 형질전환체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 산업에 이용되는 효소의 활성을 개선시킬 목적으로 수용성 단백질 발현수준을 증가시키는 새로운 방법을 개발하고자, 다양한 연구를 수행하던 중, RNase E 절단 부위를 3'UTR에 삽입하여 mRNA의 안정성에 영향을 주어 수용성 단백질의 발현비율을 증가시키는 방법을 개발하였다. 즉, 효소 중에서 수용성 단백질이 적게 발현되는, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래의 BVMO(Bayer-Villiger monooxygenase)인 BmoF1 또는 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO인 MO16을 재조합 방법으로 과발현시킴에 있어서, 상기 효소를 코딩하는 유전자의 3'말단에, mRNA의 안정성을 감소시키는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열(예를 들어, CAT 서열 등)이 삽입된 UTR을 결합시킨 형태의 폴리뉴클레오티드를 수득하고, 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키면, 상기 BmoF1 또는 MO16의 전체 발현수준 대비 수용성 단백질 형태의 발현 비율이 증가됨을 확인하였다. 목적하는 유전자의 5' 또는 3'말단에 UTR에 결합시켜서 mRNA의 안정성을 향상시킴으로써, 결과적으로 단백질의 발현수준을 증가시키는 기술은 공지되어 있으나, 본 발명에서 제공하는 RNase E 절단부위가 mRNA의 안정성을 조절하여 수용성 단백질의 발현비율을 증가시키는 방법은 지금까지 전혀 알려져 있지 않고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0015] 상술한 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 하나의 양태는 (a) 목적하는 수용성 단백질을 코딩하는 유전자의 3'말단에 mRNA 안정성을 증가시키는 UTR(untranslated region)이 결합된 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하고, 상기 UTR의 염기서열 내에는 mRNA의 안정성을 저하시키는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열이 삽입된 것을 특징으로 하는, 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대

비 수용성 발현비율을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0017] 일반적으로 수용성 단백질을 발현시킬 때 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 또는 3'말단에 UTR을 결합시켜서 상기 폴리뉴클레오티드로부터 전사되는 mRNA의 안정성을 향상시키면, 이에 의하여 폴리펩타이드의 합성 수준이 증가하는 반면, 이에 의해, 단백질의 폴딩이 일어나기 전 폴리펩타이드의 local concentration이 증가하게 된다. 이처럼 local concentration이 증가하면, 상기 폴리펩타이드끼리 서로 응집되어 봉입체(inclusion body)를 형성하게 하게 되고 결국 정상적인 폴딩에 의해 생성되는 수용성 형태로 발현되는 단백질의 수준이 감소되는 문제점이 있다. 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명에서는 3'UTR에 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열을 삽입하여 mRNA 안정성을 감소시키고 이에 합성되는 폴리펩타이드 수를 감소시켜 local concentration을 감소시키고 이는 결국 정상적인 폴딩에 의해 생성되는 수용성 단백질의 발현수준을 증가시켜 수용성 단백질의 발현을 증가시켰다.

[0019] 본 발명은 3'UTR에 RNase E 절단부위를 포함하는 염기서열을 삽입하여 mRNA 안정성을 감소시켜 단백질의 발현양을 조절한다는 점에서 프로모터의 유도(induction)정도를 조절하여 단백질 발현량을 감소시킴으로써 응집체 생성을 억제하는 방법, 5'UTR 또는 RBS(ribosome binding site)를 이용하여 mRNA의 번역수준에서 속도감소하는 방법과 구별된다.

[0020] 대장균에서 수용성 단백질의 생성을 촉진하기 위한 방법으로, 재조합 단백질 발현 벡터 구성 시 목적 단백질을 수용성이 높은 아미노산과 결합시켜 발현시키거나 시그날 시퀀스(signal sequence)와 연결하여 페리플라즘(periplasm)으로 분비(secretion)시키는 등의 방법과 단백질 폴딩에 관여하는 샤프론(chaperone)들을 동시에 발현시키는 방법이 알려져 있고 단백질의 수용성 발현을 위해 낮은 배양온도가 일반적으로 유리하다고 알려져 있다. 필러 등(Pilon 등, 1996, Biotechnol. Prog., 12, 331-337)은 유비퀴틴(ubiquitin)의 C-말단 17개 아미노산 서열을 융합 파트너로 이용하여 8 내지 53개의 아미노산으로 구성된 15개의 펩타이드(peptide)를 발현시키면서 열 충격을 가하여 모두 수용성으로 발현시킨 바 있다. 그러나 상기 방법과 비교하여 본 발명은 다수의 RNase E 절단 부위를 포함하는 특정 염기서열을 3'UTR에 삽입하여, mRNA 안정성을 감소시켜 폴리펩티드의 정상적인 폴딩을 유도하여 수용성 단백질의 발현을 증가시키는 점에서 구별된다.

[0022] 본 발명에서 사용된 용어 "목적하는 수용성 단백질"은 비수용성 및 수용성 모두 발현하는 단백질을 의미하는 것으로, 특히 단백질이 과발현되었을 때 전제 발현 수준 대비 수용성 발현이 현저히 적은 단백질을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 목적하는 수용성 단백질은 목적하는 단백질과 동일한 의미로, 혼용되어 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 목적하는 수용성 단백질은 과발현되었을 때 과발현된 단백질이 세포내에서 상호 응집하여 봉입체를 형성함으로써, 상기 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율이 50% 이하인 단백질일 수 있고, 일 예로 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 또는 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO(Bayer-Villiger monooxygenase)일 수 있고, 보다 구체적으로, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1 또는 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO인 MO16일 수 있다.

[0025] 본 발명에서 사용된 용어 "수용성 단백질"은 해당유전자의 발현에 의하여 전사 및 해독된 후, 폴딩과정에 의하여 수용성을 나타나게 되는 단백질을 의미한다. 또한, 상기 수용성 단백질의 발현 수준은 단백질의 수용성 발현과 동일한 의미로, 혼용되어 사용될 수 있다.

[0026]

[0027] 본 발명에서 사용된 용어 "UTR(untranslated region)은 비해석부위라고도 하며, mRNA 사슬 중 단백질 유전자의 주형이 되지 않는 부분, 즉 번역되지 않는 부분을 의미한다. 일반적으로 상기 UTR은 5'UTR(5'비해석부위), 3'UTR(3'비해석부위)이 존재한다. 3'UTR은 원핵생물에서 mRNA의 안정성에 기여하는 전사 터미네이터를 의미한다. 예를 들어, 3'UTR로 특정서열(예를 들어, REP 서열)을 삽입하여 전사적으로 활성화된 mRNA의 안정성을 증가시키는데에 사용되고 있다. 본 발명에서는 목적하는 단백질의 전체 발현 수준 대비 수용성 발현비율을

증가시키기 위하여, 3'UTR을 이용하였다.

[0029] 본 발명에서 사용된 용어 "RNase E 절단 부위"는 박테리아 세포에서 RNA의 처리 및 분해 관여하는 RNase E에 의해 절단이 일어나는 부분을 의미하며, 주로 단일 가닥의 AU-rich 영역에서 절단이 일어난다. 상기 RNase E 절단 부위는 본 발명의 목적하는 수용성 단백질인 BmoF1 또는 MO16의 3'UTR에 존재하고 있는데, BmoF1의 3'UTR에는 5개, MO16의 3'UTR에는 10개의 RNase E 절단 부위가 포함되어 있다. 본 발명에서는 RNase E 절단 부위를 3'UTR에 삽입하기 위하여, *hilD* 염기서열 또는 CAT 염기서열을 이용하였다. 또한, 상기 RNase E 절단 부위 수가 증가할수록 mRNA 안정성이 감소하고, 수용성 단백질의 발현수준이 증가하며, 생물전환활성을 증가시킨다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 RNase E 절단 부위는 UTR에 삽입되어 mRNA의 안정성을 저하시키기 위한 수단으로서 사용되는데, 구체적으로, 3'UTR로 삽입되는 상기 RNase E 절단 부위의 수는 10 내지 100개가 삽입될 수 있고, 보다 구체적으로, 12 내지 30개가 삽입될 수 있다. 보다 더 구체적으로, 모델 시스템인 *hilD* 염기서열에 포함되는 RNase E 절단 부위의 수는 12 내지 16개 일 수 있고, 모델 시스템인 CAT 염기서열에 포함되는 RNase E 절단 부위의 수는 13 내지 30개 일 수 있고, 가장 구체적으로 *hilD* 염기서열에는 14개, 257개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT257 염기서열에는 15개, 357개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT357 염기서열에는 18개, 557개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT557 염기서열에는 26개, CAT657 염기서열에는 28개의 RNase E 절단 부위가 포함될 수 있다.

[0031] 또한, RNase E 절단 부위 수가 다른 CAT 염기서열 단편을 증폭시키기 위하여, 서열번호 7 및 서열번호 8에 해당하는 CAT_F 및 CAT_R 프라이머를 이용하여 657개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT657 서열을 PCR을 통해 증폭시켜 얻었다. 또한, 서열번호 7 및 서열 번호 9에 해당하는 CAT_F 및 CAT257_R 프라이머를 이용하여 257개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT257 서열을, 서열번호 7 및 서열번호 10에 해당하는 CAT_F 및 CAT357_R 프라이머를 이용하여 357개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT357 서열을, 서열번호 7 및 서열번호 11에 해당하는 CAT_F 및 CAT557_R 프라이머를 이용하여 557개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT557 서열을 PCR을 통해 증폭시켜 얻었다.

[0033] 또한, 상기 RNase E 절단 부위의 수가 조정됨에 따라 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현 비율을 변화시킬 수 있고, 구체적으로, 상기 BmoF1 발현하는 경우, RNase E 절단 부위 수가 증가할수록 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현 비율을 증가시키는 것 일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서 다른 RNase E 절단 부위 수를 포함하는 CAT 염기서열(CAT257, CAT357, CAT557, CAT657)을 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입하여 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT257}$, pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT357}$, pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT557}$ 및 pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$를 제작하여 RNase E 절단 부위 수에 따른 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ mRNA 수준을 확인한 결과, 상기 CAT 염기서열의 뉴클레오티드에 존재하는 RNase E 절단 부위 수가 증가할수록 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ mRNA 수준이 감소함을 확인하였다. 또한 RNase E 절단 부위 수에 따른 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 단백질 발현수준을 확인한 결과, 상기 RNase E 절단 부위 수가 증가할수록 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 총 단백질 발현수준은 감소하였지만, BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 수용성 단백질 발현수준은 증가함을 확인하였다. 이를 통해서 RNase E 절단 부위 수가 mRNA 안정성 및 수용성 단백질 발현수준에 영향을 주는 것을 알 수 있었다(도 5).

[0036] 상기 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열은 RNase E 절단 부위를 포함하는 한 특별히 제한되지 않는데, *hilD* 염기서열, 또는 CAT 염기서열의 전체 또는 일부가 사용될 수 있다. 구체적으로 상기 CAT 염기서열은 서열번호 18 내지 21일 수 있고, 보다 구체적으로 CAT 염기서열의 일부(CAT257, CAT357, CAT557)는 서열번호 18 내지 20, CAT 염기서열의 전체(CAT657)는 서열번호 21 일 수 있다.

[0037] 상기 *hilD* 염기서열은 SPI1 유전자의 전사 조절자로 14개의 RNase E 절단 부위를 포함하고 있고, 본 발명에서는 *hilD* 염기서열에 포함되어 있는 RNase E 절단 부위를 목적하는 수용성 단백질의 3'말단 UTR에 삽입하여 mRNA 안정성을 감소시켜, 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 단백질의 발현정도를 증가시킬 목적으로 사용되었다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 *hilD* 염기서열 단편을 증폭시키기 위하여, 서열번호 1 및 서열번호 2에 해당하는 hilD_F 및 hilD_R 프라이머를 이용하여 *hilD* 염기서열(서열번호 17)을 PCR을 통해 증폭시켜 얻었다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 *hilD* 염기서열이 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$은 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 *hilD* 염기서열을 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입되지 않은 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$과 비교하여, BmoF1-3'UTR$_{hilD}$ mRNA 수준이 낮아짐을 확인하여 대장균의 3'UTR에 RNase E 절단 부위를 포함하는 *hilD* 염기서열의 삽입이 목적하는 수용성 단백질인 BmoF1의 안정성을 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(도 3의 A).

[0040] 본 발명의 다른 일 실시예에서는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 *hilD* 염기서열이 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$은 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 *hilD* 염기서열을 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입되지 않은 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$과 비교하여, BmoF1-3'UTR$_{hilD}$ 총 단백질 발현수준은 감소하였지만, BmoF1-3'UTR$_{hilD}$ 수용성 단백질의 발현수준이 증가함을 확인하여, 대장균의 3'UTR에 RNase E 절단 부위를 포함하는 *hilD* 염기서열의 삽입이 목적하는 수용성 단백질인 BmoF1의 수용성 단백질 발현수준을 개선시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 3의 B).

[0042] 상기 CAT(Chloramphenicol acetyltransferase) 염기서열은 대장균으로부터 분리되는 항생물질로 클로람페니콜을 아세틸화하는 효소를 암호화하는 서열을 의미한다. 상기 클로람페니콜은 50S 리보솜에 선택적으로 결합하여 펩티드 전이반응을 저해하여 원핵생물의 단백질 합성을 저해하는데 CAT 효소에 의해 아세틸화된 클로람페니콜은 50S 리보솜과 결합할 수 없게 하여, 클로람페니콜의 단백질 합성 저해 활성이 감소된다. 이런 이유로 CAT 서열은 유전자 도입에 의한 발현활성 검출에 사용되는 리포터 유전자로 주로 사용된다. 그러나, 본 발명에서 CAT 염기서열은 CAT 염기서열에 포함되어 있는 RNase E 절단 부위을 목적하는 수용성 단백질의 3'말단 UTR에 삽입하여 mRNA 안정성을 감소시켜, 목적하는 단백질의 수용성 발현정도를 증가시킬 목적으로 사용되었다.

[0043] 본 발명에 있어서, CAT 염기서열의 길이가 증가할수록, 염기서열 내에 포함되는 RNase E 절단 부위의 수는 증가하였다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에서는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 CAT 서열이 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$은 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 CAT 서열이 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입되지 않은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$과 비교하여 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ mRNA 수준은 약 절반 정도 감소하는 것을 확인하여, RNase E 절단 부위를 포함하는 CAT 염기서열의 삽입이 mRNA 안정성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(도 5의 A).

[0045] 본 발명의 다른 일 실시예에서는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 CAT 염기서열이 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$은 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열인 CAT 염기서열이 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1의 3'UTR에 삽입되지 않은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$과 비교하여, BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 총 단백질 발현수준은 감소하지만, BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 수용성 단백질의 발현수준은 증가함을 확인하여, 3'UTR로 RNase E 절단부위를 포함하는 CAT 염기서열을 삽입하여 BmoF1의 수용성 단백질 발현수준을 개선시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 5의 B 및 C).

[0047] 본 발명에서 사용된 용어 "BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)"란, 케톤을 산화시켜서 락톤이나 에스터화합물을 생성하는 Baeyer-Villiger 산화반응을 포함하는 다양한 산화반응을 촉매할 수 있는 효소인 monooxygenase의 일종을 의미한다. 본 발명의 목적상, 형질전환체에서 발현되어 키토 지방산(10-키토스테아르산 등)으로부터 사슬 내에 에스터기가 도입된 지방산 유도체를 생산하는 반응을 촉매하는 활성을 나타내는 한, 상기 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 슈도모나스속 균주(*Pseudomonas sp.*), 로도코커스속 균주(*Rhodococcus sp*). 브레비박테리움속 균주(*Brevibacterium sp.*), 코마노나스속 균주(*Comanonas sp.*), 아시네토박터속 균주(*Acinetobacter sp.*), 아트로박터속 균주(*Arthrobacter*

sp.), 브라키모나스속 균주(*Brachymonas sp.*) 등의 미생물로부터 유래된 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase) 등이 될 수 있고, 보다 구체적으로 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 또는 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1으로부터 유래된 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)가 될 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1 유전자를 증폭시키 위하여, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머로 PCR을 수행하여 BmoF1 유전자를 증폭시켰다.

[0049] 본 발명에서 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위를 삽입하여 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1 유전자의 3'UTR 말단에 삽입하여 상기 BmoF1 단백질의 수용성 단백질 발현을 증가시키는 것을 확인하였으므로, 상기 BmoF1과 상동성이 23.3%(도 8)로 상당히 낮은 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1으로부터 유래된 BVMO(Baeyer-Villiger monooxygenase)인 MO16 유전자의 3'UTR 말단에 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위를 삽입하여 MO16 단백질의 발현 수준을 확인하였다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 MO16 유전자를 증폭시키기 위하여, 서열번호 12 및 서열번호 13에 해당하는 MO16_F 및 MO16_R 프라이머로 PCR을 수행하여 MO16 유전자를 증폭시켜 얻었다.

[0051] 또한, 상기 MO16의 3'UTR에 삽입될 RNase E 절단 부위가 포함된 CAT 염기서열을 증폭시키기 위하여, 서열번호 14 및 서열번호 15에 해당하는 MO16_CAT_F 및 MO16_CAT_R 프라이머를 이용하여 657개의 뉴클레오티드를 포함하는 MO16_CAT657 염기서열을 PCR을 이용하여 증폭시켜 얻었고, 서열번호 14 및 서열번호 16에 해당하는 MO16_CAT_F 및 MO16_CAT257_R 프라이머를 이용하여 257개의 뉴클레오티드를 포함하는 MO16_CAT257 염기서열을 증폭시켜 얻었다.

[0052] 본 발명의 일실시예에서는 RNase E 절단부위를 포함하는 CAT 염기서열(MO16_CAT257 및 MO16_CAT657)이 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO인 MO16 유전자 3'UTR에 삽입된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257} 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}의 MO16-3'UTR_{CAT257} 및 MO16-3'UTR_{CAT657} 단백질 발현 수준을 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{native}의 MO16-3'UTR_{native} 단백질 발현 수준과 비교한 결과, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}에서 단백질 발현은 나타나지 않고, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257}에서 MO16-3'UTR_{CAT257} 수용성 단백질 발현이 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}의 MO16-3'UTR_{CAT257} 보다 증가함을 확인하여 MO16 효소에서도 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위의 수를 조정하여 수용성 단백질 발현을 개선시킬 수 있고 MO16 단백질의 수용성 발현은 BmoF1의 수용성 발현보다 민감한 것을 알 수 있었다(도 9).

[0054] 본 발명의 다른 하나의 양태로서 목적하는 수용성 단백질을 코딩하는 유전자의 3'말단에 mRNA 안정성을 증가시키는 UTR이 결합된 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있도록, 상기 유전자가 도입될 수 있는 다중 클로닝 부위(multicloning site) 및 상기 다중 클로닝부위의 3'말단에 결합되고, mRNA의 안정성을 저하시키는 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열이 삽입된 UTR을 포함하는, 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율 증가용 발현벡터를 제공한다.

[0056] 본 발명에서 사용된 용어 "발현벡터"는 적절한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 유전자 삽입물을 포함하고, 상기 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0057] 상기 발현벡터는 목적하는 수용성 단백질을 코딩하는 유전자의 3'말단에 RNase E 절단부위를 포함하는 염기서열이 삽입된 UTR이 결합된 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 한 특별히 제한되지 않는데, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 구체적으로 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있으며, 보다 구체적으로

상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50), λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus), 배큘로바이러스(baculovirus) 등이 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

[0059] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 발현벡터가 도입되어 목적하는 단백질의 전제 발현수준 대비 수용성 발현 비율을 증가시킬 수 있는 형질전환체를 제공한다.

[0061] 본 발명에서 사용된 용어 "형질전환체"는, 목적하는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주의 내부로 도입된 후, 상기 목적하는 단백질을 발현시키도록 변이된 세포 또는 미생물을 의미한다. 이때, 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다.

[0062] 본 발명에서 제공하는 상기 형질전환체는 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106 유래 BVMO인 BmoF1 또는 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO인 MO16을 코딩하는 유전자의 3'말단에 RNase E 절단 부위를 포함하는 염기서열이 삽입된 UTR이 결합된 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 제작될 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 숙주세포로는 특별히 제한되지는 않으나, 일 예로서 생물전환 공정에 적용하기에 적합한 배양가능한 단세포성 원핵생물 또는 진핵생물의 세포를 사용할 수 있고, 다른 예로서 대장균, 효모 등을 사용할 수 있으며, 또 다른 예로서 대장균 BL21(DE3) 세포를 사용할 수 있다.

[0063] 또한, 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 수용성 단백질의 발현 수준을 향상시킬 수 있는 효과를 나타내는 형질전환체를 제조할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, $CaCl_2$ 침전법, $CaCl_2$ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명에서 제공하는 형질전환체를 배양과정을 통해 목적하는 단백질의 전체 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시킬 수 있다.

[0066] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 과정을 의미한다.

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 상기 형질전환체를 생육시켜서 생물전환 공정을 수행하기 위한 과정으로 이해될 수 있는데, 구체적으로 배치 공정, 주입식 배치 공정 또는 반복 주입 배치 공정 등을 통하여 회분식 또는 연속식으로 수행될 수 있다.

[0068] 상기 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈, 수크로즈, 락토즈와 같은 당, 지방, 지방산, 글리세롤이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산과 같은 아미노산 및 펩톤, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다.

[0069] 또한, 배양시에 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 배양물의 온도는 통상적인 배양온도인 27℃ 내지 37℃를 유지할 수 있으며, 배양시간은 10 내지 100 시간이 될 수 있다.

[0071] 본 발명에서 제공하는 목적하는 단백질의 발현수준 대비 수용성 발현비율을 증가시키는 방법은 수용성 단백질을 이용하는 다양한 산업분야에 응용될 수 있는데, 상기 산업분야에서 사용되는 수용성 단백질의 생산수율을 증가시키면, 전체적인 생산비용을 절감시켜서, 산업적인 경쟁력을 향상시킬 수 있다.

[0072] 이같은 산업분야에 대한 응용방법의 일 예로서, 한국등록특허 제1500827호 또는 한국등록특허 제 1534910호에 개시된 형질전환 미생물을 이용한 생물전환공정을 들 수 있다.

[0073] 본 발명의 일실시예에서는 전세포 생물전환을 통해 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)에서 상기 BmoF1의 에스터 생성물은 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)보다 상당히 높음을 확인하여 3'UTR로 RNase E 절단 부위를 포함하는 *hilD* 염기서열의 삽입이 BmoF1 효소의 수용성 발현과 생물전환 활성에도 영향을 미침을 알 수 있었다(도 3의 C).

[0074] 본 발명의 다른 일실시예에서는 전세포 생물전환을 통해서 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{CAT} 변이체들을 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)에서 RNase E 절단 부위 수가 증가함에 따라서 순차적으로 생물전환 활성, 생성률 및 에스터 생성물이 증가함을 확인하여 RNase E 절단 부위의 수가 BmoF1 효소의 수용성 발현과 생물전환 활성에도 영향을 미침을 알 수 있었다(도 6 및 7).

[0075] 본 발명의 또 다른 일실시예에서는 전세포 생물전환을 통해 촉매활성을 비교한 결과, pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)는 pET22b-MO16-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)보다 35 % 더 높은 비율로 에스터 생성물를 형성함을 확인하여, 상기 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위의 삽입 및 RNase E 절단 부위 수 조정을 통해 미생물에서 M16 효소의 수용성 발현과 생물전환 활성을 개선시킴을 알 수 있었다(도 11의 A 및 B).

[0077] 본 발명에서 사용된 용어 "생물전환 활성"은 전세포 생물전환시에 나타나는 생물전환 속도 및 반응물의 생성률 또는 수득률을 포함하는 개념을 의미한다.

발명의 효과

[0079] 본 발명의 수용성 단백질의 발현비율을 증가시키는 방법을 통해 효소의 활성을 조절할 수 있고, 전세포 생물전환을 이용하여 다양한 화학물질의 생산성을 증가시킬 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1은 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 배양액으로부터 분리한 세포 추출물의 SDS-PAGE 분석을 나타낸 도이다. Lane M은 마커, Lane S는 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 수용성 분획물, Lane I는 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 비수용성 분획물을 나타내었다.

도 2는 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)의 *hilD* 염기서열과, 657개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT657 염기서열을 나타낸 도이다.

도 2의 A는 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)의 *hilD* 염기서열을 나타낸 도이다.

도 2의 B는 657개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT657 염기서열을 나타낸 도이다. CAT 657 뉴클레오티드 내에서 257개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT257 염기서열은 노랑색(yellow), 357개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT357 염기서열은 노랑색+회색, 557개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT557 염기서열은 노랑색+회색+암녹색으로 나타내었다. RNase E 절단 부위는 빨강색으로 나타내었다.

도 3은 대장균에서 BmoF1의 mRNA 수준 및 단백질 발현 수준, BmoF1 효소를 이용한 리시놀레산의 생물전환을 나타낸 도이다.

도 3의 A는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR_{native} 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-

3'UTR$_{hilD}$의 Bmof1-3'UTR$_{native}$(lane 1) 및 Bmof1-3'UTR$_{hilD}$(lane 2)의 mRNA 수준을 나타낸 도이다. 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$ 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$ 배양액으로부터 분리하였고, *ihfB*의 mRNA 수준은 대조군으로 사용하였다.

도 3의 B는 야생형 대장균 BL21(DE3)(lane WS 및 WI), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$(lane 1 및 2), 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$(lane 3 및 4) 세포 추출물에 대한 SDS-PAGE 분석을 나타낸 도이다. Lane M은 마커, Lane WS, 1 및 3은 수용성 분획, Lane WI, 2 및 4는 비수용성 분획을 나타내었다.

도 3의 C는 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)(왼쪽 패널), pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)(하위 패널)을 이용한, 리시놀레산에서 에스터로 전세포 생물전환을 나타낸 도이다. 실험은 세 번 수행하였고 에러 바는 표준편차로 나타내었다. 기호는 각각 리시놀레산(△), 12-케토올레산(12-ketooleic acid, ▼), 에스터(ester, ■) 및 11-히드록시운덱-9-이노익(11-hydroxyundec-9-enoic acid, ▲)의 농도를 나타내었다.

도 4는 257 내지 657개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT 염기서열을 삽입한 3'UTR$_{CAT}$ 변이체의 RNase E 절단 부위의 수를 나타내는 도이다. BmoF1 유전자의 기존 UTR에는 5개, CAT257은 15개, CAT357은 18개, CAT557은 26개, CAT657(부분 삭제되지 않은 CAT 서열과 동일)은 28개의 RNase E 절단 부위를 포함하고 있다. 또한, *hilD* 염기서열은 19개, MO16 유전자의 기존 UTR에는 10개의 RNase E 절단 부위를 포함하고 있다.

도 5는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 변이체(CAT257, CAT357, CAT557, CAT657)에서 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ mRNA 수준 및 단백질 발현 수준을 분석한 도이다.

도 5의 A는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 변이체에서 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ mRNA 수준을 나타낸 도이다. 샘플은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$ (lane 1), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-257}$ (lane 2), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-357}$ (lane 3), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-557}$ (lane 4) 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-657}$ (lane 5)의 배양액으로부터 분리하였다. *ihfB* 의 mRNA 수준은 대조군으로 사용하였다.

도 5의 B는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$의 변이체에서 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 수용성 분획물에 대한 SDS-PAGE(상위 패널) 및 웨스턴 블럿(하위 패널) 분석을 나타낸 도이다. 샘플은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$ (lane 1), 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-257}$ (lane 2), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-357}$ (lane 3), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-557}$ (lane 4), 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-657}$ (lane 5)의 배양액으로부터 분리된 세포 추출물의 수용성 분획물을 이용하였고, Lane M은 마커를 나타낸다.

도 5의 C는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$의 변이체에서 BmoF1-3'UTR$_{CAT}$ 비수용성 분획물에 대한 SDS-PAGE(상위 패널) 분석을 나타낸 도이다. 샘플은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$ (lane 1), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-257}$ (lane 2), 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-357}$ (lane 3), 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-557}$ (lane 4), 및 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-657}$ (lane 5)의 배양액으로부터 분리된 세포 추출물의 비수용성 분획물을 사용하였고, Lane M은 마커를 나타낸다.

도 6은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$의 변이체를 이용한, 리시놀레산에서 에스터로의 생물전환을 나타내는 도이다.

도 6의 A는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{native}$, 도 6의 B는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-257}$, 도 6의 C는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-357}$, 도 6의 D는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-557}$, 및 도 6의 E는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT-657}$을 이용

한, 리시놀레산에서 에스터로의 생물전환을 나타내는 도이다. 실험은 세번 수행하였고 에러 바는 표준편차로 나타내었다. 기호는 각각 리시놀레산(△), 12-케토올레산(12-ketooleic acid, ▼), 에스터(ester, ■) 및 11-히드록시운덱-9-이노익(11-hydroxyundec-9-enoic acid, ▲)의 농도를 나타내었다.

도 7은 3'UTR에 삽입된 CAT 서열(3'UTR_{CAT})의 길이 및 RNase E 절단 부위 수와의 초기 생물전환 활성간의 관계을 나타낸 도이다.

도 7의 A는 3'UTR에 삽입된 CAT 서열의 길이와 초기 생물전환 속도 간의 관계를 나타낸 도이다. GC/MS에 의해 30분마다(t=0.5h) 측정한 생성물의 농도를 근거로 하여 계산하였다. X-축의 제로는 5개의 RNase E 절단 부위를 포함하고 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 초기 생물전환 속도를 나타낸다.

도 7의 B는 3'UTR에 삽입된 CAT 서열의 RNase E 절단 부위 수와 초기 생물전환 활성 간의 관계를 나타내는 도이다. X축의 5는 5개의 RNase E 절단 부위를 포함하고 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 초기 생물전환 활성을 나타낸다. 빨간색 별 모양은 19개의 잠재적인 RNase E 절단 부위를 포함하고 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 초기 생물전환 활성을 나타낸다.

도 8은 MO16과 BmoF1의 서열 상동성에 대한 개략도와 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-MO16를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)에 대한 SDS-PAGE 분석을 나타내는 도이다.

도 8의 A는 MO16과 BmoF1의 서열 상동성이 23.3 %임을 나타내는 개략도이다. 도 8의 B는 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-MO16를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 SDS-PAGE 분석을 나타내는 도이다. Lane M은 마커, Lane S는 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-MO16를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 수용성 분획물, 및 Lane I는 pCOLADuet-ADH 및 pET22b-MO16를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 비수용성 분획물을 나타낸다.

도 9는 재조합 대장균 BL21(DE3) (lane WS 및 WI), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{native} (lane 1 및 2), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'$UTR_{CAT-257}$ (lane 3 및 4), 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'$UTR_{CAT-657}$ (lane 5 및 6)의 배양액으로부터 분리한 세포 추출물에 대한 SDS-PAGE 분석을 나타내는 도이다. Lanes WS, 1, 3, 및 5는 세포 추출물의 수용성 분획물을 나타낸다. Lanes WI, 2, 4, 및 6은 세포 추출물의 비수용성 분획물을 나타낸다. Lane M은 마커를 나타낸다.

도 10은 리시놀레산의 생물전환 과정을 나타내는 도이다. 리시놀레산(1)은 여러 단계 효소 반응을 거쳐 ω-히드록시운덱-9-이노익산(ω-hydroxyundec-9-enoic acid, 5)과 n-헵탄산(*n*-heptanoic acid, 4)으로 전환된다.

도 11은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT}에 대한 리시놀레산에서 에스터로의 생물전환 결과를 나타내는 도이다.

도 11의 A는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{native}, 도 11의 B는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'$UTR_{CAT-257}$, 도 11의 C는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'$UTR_{CAT-657}$을 이용한, 리시놀레산에서 에스터로의 생물전환결과를 나타낸 도이다.

도 12는 리놀레산의 생물전환 과정을 나타내는 도이다. 리놀레산(6)은 여러 단계 효소 반응을 거쳐 ω-히드록시도덱-9-이노익산(ω-hydroxydodec-9-enoic acid, 11)과 n-헥산산(*n*-hexanoic acid, 10)으로 전환된다.

도 13은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT}에 대한 13-히드록시올레산(13-hydroxyoleic acid)에서 에스터로의 생물전환을 나타내는 도이다.

도 13의 A는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{native}, 도13의 B는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'$UTR_{CAT-257}$, 도 13의 C는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'$UTR_{CAT-657}$을 이용한, 13-히드록시 올레산에서 에스터로의 생물전환 결과를 나타내는 도이다. 실험은 세번 수행하였고 에러 바는 표준편차로 나타내었다. 기호는 각각 13-히드록시올레산(△), 13-케토올레산(13-ketooleic acid, ▼), 에스터(ester, ■) 및 11-히드록시도덱-9-이노익(11-hydroxydodec-9-enoic acid, ▲)의 농도를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0084] **실시예 1. *hilD* 염기서열을 이용한 대장균에서 단백질 BmoF1의 수용성 발현**

[0086] 원하는 다양한 화합물의 케토그룹에 인접한 탄소 골격으로 위치특이적인 산소삽입하여 산화반응을 촉매한다고 알려진 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106의 BVMO(Bayer-Villiger monooxygenase)인 BmoF1는 대장균 균주에서 수용성 형태로 발현하기 어렵다(도 1).

[0087] 최근 연구에 따르면, 대장균에서 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) *hilD* mRNA의 안정성은 14개의 RNase E 절단 부위를 포함하는 310개의 뉴클레오티드로 구성된 3'UTR(3'untranslated reigion)의 유무에 의해 현저하게 영향받음이 보고되었다(도 2의 A). 예를 들어, 3'UTR의 제거는 *hilD* mRNA 수준을 증가시키고 이에 의하여, 대장균에서 유전자 발현은 강화된다.

[0088] 본 발명에서는 상기와 같은 3'UTR 엔지니어링을 통해 BmoF1 mRNA 안정성의 변화가 세포질에서 새롭게 합성되는 BmoF1 폴리펩타이드의 국소농도(local concentration)에 영향을 줄 수 있고, 이에 의해 BmoF1 수용성 단백질의 발현이 증가하는지 알아보고자, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0090] **실시예 1.1: 3'UTR으로 *hilD* 염기서열의 삽입(*hilD* 3'UTR, 3'UTR$_{hilD}$)에 따른 BmoF1 mRNA 수준 분석**

[0092] **실시예 1.1.1: *hilD* 염기서열의 유전자 클로닝**

[0094] *hilD* 염기서열을 BmoF1 유전자의 3'UTR에 삽입하기 위하여, 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) *hilD* mRNA는 코스모진 텍에서 합성하였고, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로써 hilD_F(5'-AAGCTTCATTTTTTGTATCTGTCACTTAAG-3', 서열번호 1) 및 hilD_R(5'-CTCGAGAATAAAATGCCGGCCTTAATCC-3', 서열번호 2)을 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 통해 증폭시켜 *hilD* 염기서열(서열번호 17)을 분리하였다. 상기 증폭된 *hilD* 서열 단편은 BmoF1 유전자의 3'UTR에 해당하고 pET22b-BmoF1의 HindIII-XhoI의 제한효소부위에 삽입하여 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$를 제조하였다.

[0096] **실시예 1.1.2: RNA 추출 및 역전사 PCR(reverse transcription PCR)에 따른 mRNA 수준 분석**

[0098] 상기 제조된 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$의 BmoF1-3'UTR$_{hilD}$ mRNA 수준을 확인하기 위하여, 상기 대장균을 키운 세포를 이용하여 RNA 추출 및 역전사 PCR을 수행하여 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{hilD}$의 BmoF1-3'UTR$_{hilD}$ mRNA 수준을 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$의 BmoF1-3'UTR$_{native}$ mRNA 수준과 비교분석하였다.

[0099] 먼저, 정지기상의 배양 세포로부터 얻은 1 mL 분주는 5분 동안 13,000 rpm, 4°C로 원심분리하였고 상기 원심분리한 것은 RNeasy 추출 키트(Qiagen)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA는 50 ㎕의 RNase-free water에 현탁시켰고, 상기 현탁시킨 용액의 RNA 농도는 ND-1000 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 확인하였다.

[0100] 역전사 중합효소 연쇄 반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)은 제조자의 지시에 따라서 HiPi™ One-step 5X RT-PCR 프리믹스를 사용하여, 10 nmol의 RNA 주형 및 5 pmol의 프라이머는 RT-PCR 프리믹스 튜브에 혼합하고 RNase-프리 증류수(distilled water)를 20 ㎕까지 될 때까지 첨가하였다.

[0101] RT-PCR 반응은 다음과 같이 수행하였다.

[0102] cDNA 합성은 30분 동안 42℃에서 1 사이클을 수행하였고 94℃로 5분 동안 두었다. 증폭은 30초 동안 94℃, 30초 동안 60℃ 및 45초 동안 72℃로 50 사이클을 수행하였다. BmoF1에 해당하는 부분을 증폭하기 위한 프라이머 서열은 5'-ATGAATGCCCACAGTGATTCCATCGACATCGCCATCATCGGTTCGGGTTTTGCCG-3'(정방향 프라이머, 서열번호 3) 및 5'-TGAGAGGCTGCCTTCTGCCGTGGAGTGGGGCGCCGTGGCCGGACGGGGCGGCGCA-3' (역방향 프라이머, 서열번호 4)이었다. 대조군 유전자인 *ihfB* 증폭을 위한 PCR 프라이머 서열은 5'-ATGACCAAGTCAGAATTGATAGAAAGACTTGCCACCCAGCAATCGCACATTCCCG-3' (정방향 프라이머, 서열번호 5) 및 5'-TTAACCGTAAATATTGGCGCGATCGCGCAGTTCTTTACCAGGTTTAAAGTGAGGA-3' (역방향 프라이머, 서열번호 6)이었다. 상기 프라이머로 RT-PCR를 수행하여 얻어진 PCR 생성물은 1% 아가로스 겔 전기영동을 통해서 분석하였다.

[0103] 그 결과, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{hilD}의 BmoF1-3'UTR_{hilD} mRNA 수준은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{native}의 BmoF1-3'UTR_{native} mRNA 수준보다 약간 낮아짐을 확인하였다(도 3의 A).

[0104] 이를 통해, 대장균에서 3'UTR로 삽입된, RNase E 절단 부위를 포함하는 *hilD* 염기서열에 의해 mRNA 안정성에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

[0106] **실시예 1.2: 3'UTR으로 *hilD* 염기서열의 삽입(*hilD* 3'UTR, 3'UTR_{hilD})에 따른 단백질 발현 수준 분석**

[0108] 상기 제조된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{hilD}의 BmoF1-3'UTR_{hilD} 단백질 발현 수준을 확인하기 위하여, SDS-PAGE 분석을 수행하여 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{hilD}의 BmoF1-3'UTR_{hilD} 단백질 발현 수준을 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{native}의 BmoF1-3'UTR_{native} 단백질 발현 수준과 비교분석하였다.

[0109] 먼저, 단백질 샘플을 제작하기 위하여, 세포들은 25%의 진폭으로, 각각 초음파 처리할 때마다 5초 동안 정지시키면서 15초 동안 6번 초음파 처리하였다. 수용성 단백질 용해물(lysate)은 4℃에서 10분 동안 13000 rpm으로 원심분리를 수행하여 분리하였고, 나머지 비수용성 단백질에 대해서는 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)을 수용성 단백질 용해물과 동일한 양을 첨가하였다. 상기 수용성 및 비수용성 단백질은 열로 변성시켰고(100 ℃에서 5분) 각각 5X 샘플 완충용액(엘피스 바이오텍, 한국)으로 혼합하였다. 상기 방법으로 제조된 수용성 및 비수용성 단백질 샘플은 10% 도데실 황산나트륨 폴리아크릴아미드 겔(10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)에서 로딩한 후 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie Brilliant Blue R-250)로 염색하였다.

[0110] 그 결과, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{hilD}의 BmoF1-3'UTR_{hilD} 총 단백질 발현수준은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR_{native}의 BmoF1-3'UTR_{native} 총 단백질 발현수준보다 낮았고, 반면에 BmoF1-3'UTR_{hilD} 수용성 단백질 발현수준은 BmoF1-3'UTR_{native}의 수용성 단백질 발현수준보다 현저히 높음을 확인하였다(도 3의 B).

[0111] 이를 통해, 3'UTR에 RNase E 절단 부위를 포함하는 *hilD* 염기서열을 삽입하여 BmoF1 mRNA 안정성을 감소시키고 이를 통해서 BmoF1의 수용성 단백질 발현수준은 개선됨을 알 수 있다.

[0113] **실시예 1.3: 3'UTR으로 *hilD* 염기서열의 삽입(*hilD* 3'UTR, 3'UTR_{hilD})에 따른 BmoF1의 촉매활성 비교분석**

[0115] **실시예 1.3.1: 전세포 생물전환**

[0117] BmoF1는 세포 외에서 순수형태로 분리하기에 너무 불안정하다고 알려져 있으므로, BmoF1의 촉매활성은 전세포 생물전환을 통해 확인하고자 하였다. BmoF1 발현 뿐만 아니라 BmoF1의 기질을 만드는 *Micrococcus luteus* NCTC2665의 장쇄 2차 알코올 분해효소(long chain secondary alcohol dehydrogenase)를 발현시키는 재조합 대장균(*E. Coli*) BL21(DE3) pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 제조하여 전세포 생물전환을 수행하였다.

[0118] 먼저, 재조합 세포는 30℃에서 리젠버그 배지에서 배양하였고, 0.6의 OD600에서 0.1 mM IPTG로 타겟 유전자의

발현을 유도하였다. 그 후에, 배양온도는 20℃로 감소시켰다. 배양이 정지기에 도달할 때, 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus* NCTC2665, *M. luteus* NCTC2665) 유래 알코올탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)와 슈도모나스 플루오레센스 DSM50106(*Pseudomonas fluorescens* DSM50106, *P. fluorescens* DSM 50106) 유래 BVMO를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3) pCOLADuet-ADH 및 pET22b-BmoF1를 4℃에서 20분 동안 3500 g로 원심분리하여 수득하였고, 50 mM Tris-HC 완충용액(pH 8.0)에 7.2 g 건조 세포(dry cell)/L를 현탁하였다. 생물전환은 5 mM의 리시놀레산 및 0.5 g/L 트윈 80을 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 첨가하여 시작하였고 진탕배양기에서 35℃, 200 rpm으로 수행하였다.

[0120] **실시예 1.3.2: GC/MS 분석**

[0122] 상기 실시예 1.3.1과 같은 방법으로 전세포 생물전환을 수행한 후 상기 전세포 생물전환에 따른 반응물의 변화를 확인하기 위하여, GC/MS 분석을 수행하였다.

[0123] 반응배지는 내부표준으로써, 5 g/L 팔미트산을 포함하는 에틸 아세테이트의 3배에 해당하는 양을 혼합하였다. 유기상(organic phase)은 격렬히 볼텍싱한 후 수득하였고 그리고 나서 N-메틸-N-(트리메틸실릴)트리플루오로아세트아마이드(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, TMS)로 유도체화하였다. TMS 유도체는 이온 트랩 메스 검출기(ion trap mass detector)가 연결된 Thermo Ultra Trace GC system을 사용하여 분석하였다. 유도체는 비극성 캐필러리 컬럼(capillary column, 30-m 길이, 0.25-㎛ 필름 두께, HP-5MS, Aligent)에서 분리하였다. 일직선의 온도 변화는 다음과 같이 프로그램하였다(90℃, 5℃/min to 280℃). 주입 포트(injection port) 온도는 230℃였다.

[0124] 질량스펙트럼(Mass spectra)은 70 eV로 전자 충격 이온화(electron impact ionization)에 의해 얻었다. 스캔 스펙트럼은 100 내지 600m/z의 범위내에서 얻었다. 선택 이온 모니터링(Selected ion monitoring, SIM)은 반응 생성물의 탐지 및 단편화를 위해 사용하였다. 반응 기질 및 생성물의 농도는 실험실에서 분리된 생성물 또는 상업적으로 이용가능한 생성물을 사용하여 결정된 보정 곡선(calibration curves)에 근거하여 결정하였다.

[0126] **실시예 1.3.3: 전세포 생물전환을 통한 촉매활성 비교분석**

[0128] 상기 실시예 1.3.1 및 1.3.2에서 개시된 방법으로 전세포 생물전환을 수행하고 얻어진 생성물을 GC/MS로 측정하여, pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 촉매활성 결과를 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)과 비교분석하였다.

[0129] 리시놀레산을 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 발현하는 정지기의 재조합 대장균 BL21(DE3)의 배양 배지에 추가하면, pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)에서 상기 BmoF1에 의한 에스터 생성물은 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)보다 상당히 높았다(도 3의 C).

[0130] 상기 결과를 통해, 3'UTR로 RNase E 절단 부위를 포함하는 *hilD* 염기서열의 삽입이 BmoF1 mRNA의 안정성을 감소시키고, 이는 결국 BmoF1 총 단백질 발현 수준을 감소시키지만, 대장균(BL21(DE3))에서 BmoF1 수용성 단백질의 발현을 증가시켜 BmoF1 효소의 수용성 발현과 생물전환 활성에도 영향을 미침을 알 수 있었다.

[0132] **실시예 2. CAT 염기서열을 이용한 단백질 BmoF1의 수용성 발현**

[0134] 상기 실시예 1을 통해서 RNase E 절단부위를 포함하는 *hilD* 염기서열을 3'UTR로 삽입을 통해서 BmoF1 mRNA의 안정성을 감소시키고 이를 통해 대장균에서 BmoF1의 수용성 단백질의 발현을 증가시킴을 확인하였으므로, 이와 같은 3'UTR 엔지니어링의 영향을 보다 더 조사하기 위하여, 대장균의 클로람페니콜 아세틸전달효소(Chloramphenicol acetyltransferase)를 암호화하고, 28개로 추정되는 RNase E 절단 부위를 포함하는 CAT 염기

서열(도 2의 B)을 이용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0136] **실시예 2.1: 3'UTR로 CAT 염기서열의 삽입(3'UTR$_{CAT}$)에 따른 mRNA 수준 및 단백질 발현수준 분석**

[0138] **실시예 2.1.1: CAT 염기서열의 유전자 클로닝**

[0140] CAT 염기서열은 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로써 CAT657_F(5'-AAGCTTATGGAGAAAAAAATCACTGGATAT-3', 서열번호 7) 및 CAT657_R(5'-CTCGAGGGCATCAGCACCTTGTCG-3', 서열번호 8) 프라이머로 PCR을 통해 pACYCDuet-1 벡터로부터 증폭하였다. 상기 증폭된 CAT 염기서열 단편은 657개의 뉴클레오티드를 포함하는 CAT657 염기서열(서열번호 21)이고, BmoF1 유전자의 3'UTR에 pET22b-BmoF1의 HindIII-XhoI 제한효소부위로 삽입하여 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT}$를 제작하였다.

[0142] **실시예 2.2.2: mRNA 수준 및 단백질 발현 수준 분석**

[0144] 상기 제조된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$ mRNA 수준을 확인하기 위하여, 상기 재조합 대장균을 키운 세포를 이용하여 RNA 추출 및 역전사 PCR을 수행하여 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$ mRNA 수준을 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$의 BmoF1-3'UTR$_{native}$ mRNA 수준과 비교분석하였다.

[0145] mRNA 수준 분석을 위한 RNA 추출 및 역전사 PCR은 실시예 1.1.2에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0146] 그 결과, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$ mRNA 수준은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$의 BmoF1-3'UTR$_{native}$ mRNA 수준과 비교하여 약 절반 정도까지 감소하는 것을 확인하였다(도 5의 A).

[0147] 이를 통해, RNase E 절단부위를 포함하는 CAT 염기서열이 mRNA 안정성에 영향을 미치는 것을 확인하였고, 상기 서열이 활성화된 3'UTR로 사용될 수 있음을 보여주었다.

[0149] 다음으로, 상기 제조된 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$ 단백질 발현 수준을 확인하기 위하여, SDS-PAGE 분석 및 웨스턴 블럿을 수행하여 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$ 단백질 발현 수준을 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$의 BmoF1-3'UTR$_{native}$ 단백질 발현수준과 비교분석하였다.

[0150] SDS-PAGE 분석은 실시예 1.2에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행하였고 웨스턴 블럿은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0151] 멤브레인은 5% 탈지유 및 0.5% 트윈 20을 포함하는 PBS에서 밤새도록 차단시켰고, PBST-5% 탈지유에서 1:5000로 희석시킨 항-His 일차 항체(IG Therapy Co., Ltd. Tokyo, Japan)를 함께 1 시간 동안 상온에서 배양시켰다. 0.5% 트윈 20을 포함한 PBS을 이용하여 세척한 후, 멤브레인은 PBST-5% 탈지유로 1:500으로 희석한, 알카라인 포스파타아제가 컨쥬게이팅된 염소 항-마우스 IgG(Abcam, Cambridge, UK)과 함께 상온에서 1시간 동안 배양시켰다. 블럿은 BCIP/NBT solution substrate(Abcam)을 이용하여 발생시켰다(develop).

[0152] SDS-PAGE 및 웨스턴 블럿을 수행한 결과, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$ 총 단백질 발현 수준은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET-BmoF1-3'UTR$_{native}$의 BmoF1-3'UTR$_{native}$ 총 단백질 발현 수준보다 낮았지만(도 5의 C) BmoF1-3'UTR$_{CAT657}$의 수용성 단백질 발현 수준은 BmoF1-3'UTR$_{native}$의 수용성 단백질 발현 수준

은 현저히 높아졌다(도 5의 B).

[0153] 이를 통해, RNase E 절단 부위를 포함하는 CAT 염기서열의 삽입에 의해 BmoF1 mRNA 안정성의 감소되고 BmoF1의 수용성 단백질 발현이 증가함을 알 수 있었다.

[0155] **실시예 2.2: 3'UTR로 삽입되는 RNase E 절단 부위의 수에 따른 mRNA 수준 및 단백질 발현수준 분석**

[0157] **실시예 2.2.1: 유전자 클로닝**

[0159] CAT 염기서열에서 존재하는 RNase E 절단 부위 수가 mRNA 안정성과 연관이 있는지 알아보기 위하여, 3'UTR에 삽입되는 CAT 염기서열($3'UTR_{CAT}$)의 부분적인 삭제를 포함하는 변이체들의 세트를 제작하였다.

[0160] 3'UTR에 삽입되는 CAT 염기서열의 부분 삭제된 단편들은 정방향 프라이머 CAT_F 및 다른 역방향 프라이머 CAT257_R(5'-CTCGAGCGCCCCGCCCTGCCACTCATCG-3', 서열번호 9), CAT357_R(5'-CTCGAGTCCCATATCACCAGCTCA-3', 서열번호 10) 및 CAT557_R(5'-CTCGAGTATGTGTAGAAACTGCCG-3', 서열번호 11)를 이용하여 PCR을 통해 CAT 257(서열번호 18), CAT357(서열번호 19), CAT557(서열번호 20) 염기서열을 증폭하였고, pET22b-BmoF1로 삽입하였다.

[0161] 그 결과, CAT 염기서열의 5'영역에서부터 257, 357, 557개의 뉴클레오티드를 포함하는 변이체(3'UTR에 삽입되는 CAT 염기서열의 부분 삭제된 단편들)는 CAT 서열의 길이가 증가할수록(뉴클레오티드의 수가 증가할수록) 단계적으로 RNase E 절단 부위가 증가함을 보여주었다(도 2의 B 및 도 4).

[0163] **실시예 2.2.2: mRNA 수준 및 단백질 발현수준 분석**

[0165] CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수에 따른 mRNA 안정성의 변화를 확인하기 위하여, RNA 추출 및 역전사 PCR을 수행하여 RNase E 절단 부위 수가 다른 CAT 서열을 포함하는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 변이체들의 BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ mRNA 수준을 비교분석하였다.

[0166] 그 결과, CAT 염기서열의 길이가 257개의 뉴클레오티드에서부터 657개의 뉴클레오티드로 증가함에 따라, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 변이체들의 BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ mRNA 수준은 점차 감소하였다(도 5의 A)

[0167] 이를 통해, CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수가 증가할수록 mRNA 안정성이 감소함을 알 수 있었다.

[0169] 다음으로, CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수에 따른 단백질 발현 수준의 변화를 확인하기 위하여, SDS-PAGE 분석을 수행하여 RNase E 절단 부위 수가 다른 CAT 염기서열을 포함하는 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 변이체들의 BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 단백질 발현 수준을 비교분석하였다.

[0170] 그 결과, CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위의 수가 증가함에 따라, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 변이체들의 BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 총 단백질 발현 수준은 감소하였지만(도 5의 C), 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 변이체들의 BmoF1-$3'UTR_{CAT}$ 수용성 단백질 발현 수준은 증가하였다(도 5의 B).

[0171] 이를 통해, CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수가 증가할수록, 수용성 단백질의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다.

[0173] **실시예 2.3: RNase E 절단 부위 수의 따른 생촉매 활성의 변화 비교 분석**

[0175] 대장균에서 BmoF1의 생촉매 활성에 있어서 3'UTR에 삽입되는 RNase E 절단 부위 수에 따른 효과를 알아보기 위하여, pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-UTR_{native}, 또는 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-UTR_{CAT} 변이체들을 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3) 변이체는 리시놀레산과 반응시켜 전세포 생물전환을 수행하였다.

[0176] 반응 조건은 도 3의 C에서 보여준 조건과 동일하였고, 전세포 생물전환 및 반응 생성물 측정은 실시예 1.3.1 및 1.3.2에서 보여주는 방법과 동일하게 수행하였다.

[0177] 그 결과, pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{CAT257}/, pET22b-BmoF1-3'UTR_{CAT357}/pET22b-BmoF1-3'UTR_{CAT557}/pET22b-BmoF1-3'UTR_{CAT657} 변이체들을 발현하는 재조합 대장균 BL21 (DE3)의 리시놀레산에 대한 생물전환 활성은 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21 (DE3)과 비교하여 순차적으로 생물전환 활성이 증가함을 보여주었다(도 6 및 표 1).

표 1

[0178]

	상대적인 mRNA 수준 [a]	초기 생물전환 활성 ($U\ g\ CDW^{-1}$) [b]	생성률(product yield, %) (%) [c]
bmoF1-3'UTR_{native}	1.0	2.26	31.2
bmoF1-3'$UTR_{CAT-257}$	0.86	3.59	61.4
bmoF1-3'$UTR_{CAT-357}$	0.79	4.23	76.8
bmoF1-3'$UTR_{CAT-557}$	0.54	5.05	78.0
bmoF1-3'$UTR_{CAT-657}$	0.50	5.32	82.6

[0179] [a] 상대적인 mRNA 수준은 도 5에서 보여준 것과 같이 덴시토미터(densitometer)를 전기영동 결과로부터 측정하였다.

[0180] [b] 초기 생물전환 활성은 생성물 농도에 근거하여 계산하였고, 이는 GC/MS에 의해 30분 마다 측정하였으며, 모든 실험은 3번 수행하였다.

[0181] [c] 생성률은 기질 소모 및 생성물 농도를 근거로 하여 측정하였고 이는 GC/MS에 의해 측정하였고, 모든 실험은 3번 수행하였다.

[0183] 또한, 30분마다 에스터(ester) 농도를 측정하여 에스터 생성물이 증가하는 것을 확인하여 초기 생물전환 활성과 RNase E 절단 부위의 수 사이에 매우 연관성이 있음을 확인하였다(도 7). 따라서, RNase E 절단 부위의 수가 증가할수록 초기 생물전환 활성이 증가함을 확인하였다.

[0184]

[0185] 실시예 1.3에서도 pCOLA-ADH 및 pET22b-BmoF1-3'UTR_{hilD}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)의 초기 생물전환 활성이 RNase E 절단 부위 수와 관련이 있음을 나타내고 있으므로, 상기 결과를 종합하여 볼 때, 3'UTR 서열보다 RNase E 절단 부위의 수가 생물전환 활성에 중요하고, BmoF1 수용성 단백질 발현 수준은 또한 3'UTR에서 RNase E 절단 부위의 수에 따라 달라지는 것으로 결론지을 수 있다.

[0187] **실시예 3. CAT 염기서열을 이용한 *Rhodococcus jostii* RHA1 유래 BVMO의 수용성 발현**

[0189] 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) DSM50106의 BVMO(Bayer-Villiger monooxygenase)인 BmoF1와 마찬가지로, 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*) RHA1 유래 BVMO(즉, MO16, BmoF1과 서열 상동성: 23.3%, 도 8의 A)인 MO16는 대장균 세포에서 수용성 형태의 발현이 매우 어렵다(도 8의 B). 그러므로, 대장균에서 MO16의 수용성 단백질 발현에 있어서, 3'UTR에 CAT 서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수에 따른 효과를 알

아보기 위하여, SDS-PAGE 분석 및 전세포 생물전환을 수행하였다.

[0191] **실시예 3.1: 유전자 클로닝**

[0193] pET22b-MO16를 제작하기 위하여, 로도코커스 조스티(*Rhodococcus jostii*)의 MO16 유전자는 정방향 및 역방향 프라이머로써 MO16_F(5'-CATATGTCACACACCGAGACCGCCGCCGA-3', 서열번호 12) 및 MO16_R(5'-GGATCCCGGGCGGCTGAAGGTCATGGCGTCGTCC-3', 서열번호 13)로 PCR을 수행하여 pET-MO16 벡터부터 증폭시켰다. MO16_CAT 염기서열은 MO16_CAT657_F(5'-AAGCTTATGGAGAAAAAAATCACTGGATAT-3', 서열번호 14), 및 MO16_CAT657_R(5'-CTCGAGCGCCCCGCCCTGCCACTCATCG-3', 서열번호 15) 또는 MO16_CAT257_R(5'-CTCGAGCGCCCCCTGCCACTCATCG-3', 서열번호 16)를 사용하여 pACYCDuet-1 벡터로부터 증폭시켰다. 상기 MO16_CAT 서열 단편은 pET22b-MO16의 HindIII-XhoI 제한효소 부위로 서브클로닝하여 각각 pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657} 및 pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257}을 제작하였다. 모든 제작된 플라스미드 서열은 마크로젠(서울, 한국)을 통해 확인하였다.

[0195] **실시예 3.2: 단백질 발현 수준 분석**

[0197] CAT 서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수에 따른 단백질 발현 수준을 확인하기 위하여, SDS-PAGE 분석을 수행하여, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257} 및 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}의 단백질 발현 수준을 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{native}의 MO16-3'UTR_{native} 단백질 발현 수준과 비교하였다.

[0198] 그 결과, MO16-3'UTR_{CAT657}은 대장균에서 어떠한 발현도 나타나지 않았고, SDS-PAGE 분석에서 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}의 MO16-3'UTR_{CAT657} 단백질 발현도 거의 나타나지 않음을 확인하였다(도 9). 대조적으로, 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257}의 MO16-3'UTR_{CAT257} 단백질 발현은 재조합 대장균 BL21(DE3) pET22b-MO16-3'UTR_{native}의 MO16-3'UTR_{native} 단백질 발현 수준과 비교하여 주로 수용성 단백질 발현이 나타나는 것을 확인하였다(도 9).

[0199] 이를 통해, MO16 효소에서도 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위 수를 이용하여 수용성 단백질의 발현을 개선시킬 수 있음을 알 수 있었고, 또한, 3'UTR로 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위의 삽입에 따른 MO16의 수용성 단백질 발현은 BVMO 수용성 단백질의 발현보다 민감하게 작용하는 것을 알 수 있었다.

[0201] **실시예 3.3: 전세포 생물전환**

[0203] 대장균에서 BmoF1의 생촉매 활성에 있어서 3'UTR에 삽입되는 RNase E 절단 부위 수에 따른 효과를 알아보기 위하여, pET22b-MO16-3'UTR_{native}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3), pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3) 및 pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)는 리시놀레산과 반응시켜 생물전환을 수행하였다.

[0204] 전세포 생물전환 및 반응 생성물 측정은 실시예 1.3.1 및 1.3.2에서 보여주는 방법과 동일하게 수영하였다.

[0205] 그 결과, pET22b-MO16-3'UTR_{CAT657}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)는 배양배지에서 MO16에 대한 반응 생성물 중 에스터(ester)의 생성이 없고(도 10의 3에 해당하는 화합물), 12-케토올레산(도 10의 2에 해당하는 화합물)이 축적되는 것을 통해서 MO16가 거의 대장균에서 발현되지 않음을 확인하였다(도 11).

[0206] 그러나, pET22b-MO16-3'UTR_{CAT257}를 발현하는 재조합 대장균 BL21(DE3)는 pET22b-MO16-3'UTR_{native}를 발현하는 재조

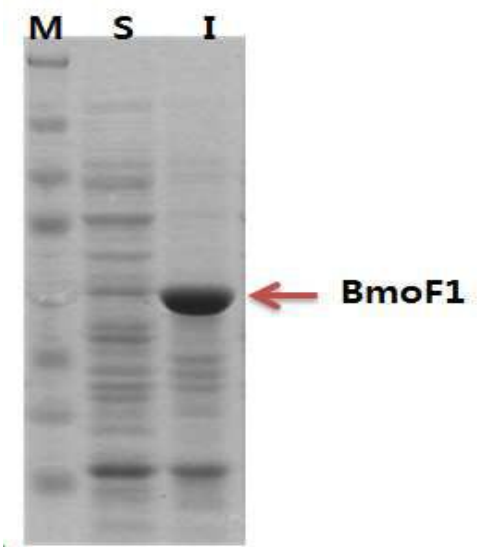
합 대장균 BL21(DE3)보다 35% 더 높은 비율로 에스터 생성물을 형성함을 통해서 MO16의 촉매활성이 개선됨을 확인하였다(도 11).

[0207] 이러한 경향은 13-히드록시올레산의 전세포 생물전환에서도 동일하게 관찰되었다 (도 12 및 13).

[0208] 따라서, 상기 결과들을 통해 상기 CAT 염기서열에 존재하는 RNase E 절단 부위의 삽입 및 RNase E 절단 부위 수의 조정을 통해 MO16 수용성 단백질을 증가시켜 미생물에서 MO16 효소의 수용성 발현과 생물전환 활성을 개선시킴을 알 수 있었다.

도면

도면1



도면2

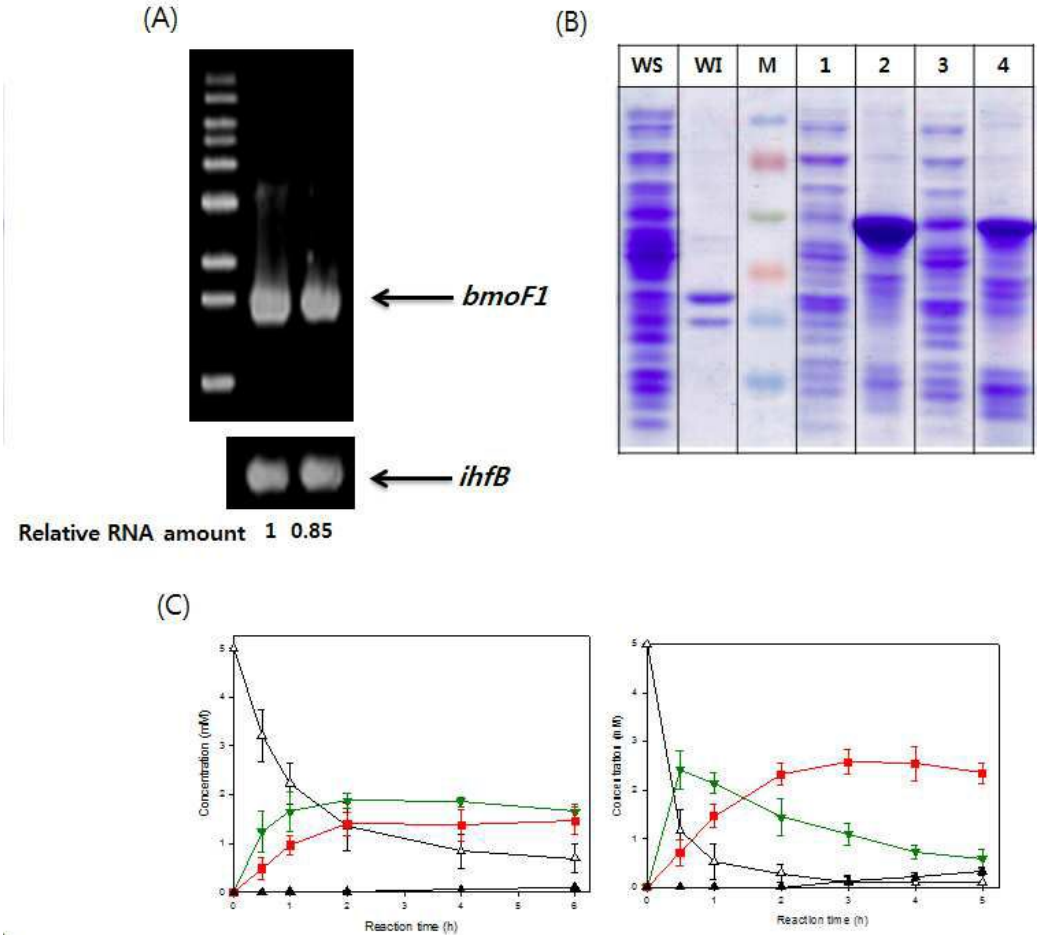
(A)

CATTTTTTGTATCTGTCACTTAAGTAAAGATTTTTATTAAAATTGTAATAATTTAAAATTCAGACTGCGC
ATTAACACGCTCTATCAGGATGGGAGGCTATTCAATATCATTGTTCTGTCCGGAAGACAGCTTATACTGA
TATCTATGGTAATTTAAAGTAAGGCTGATTATATAACACGATTTTTGTGAACTTGTCATCGCTATGATGA
CTGGTAAAACGATATTGCCTTATTCACAGCGTAAGAATTCGTCCAGATGACACTATCTCCTTCCGGCTTT
AACCCTGTGGATTAAGGCCGGCATTTTATT

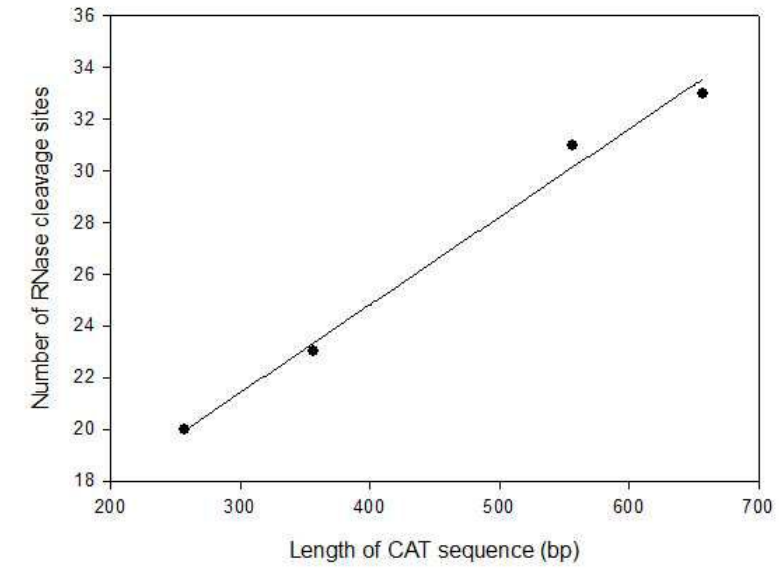
(B)

ATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACA
TTTTGAGGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTA
CGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATT
CTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGT
GATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTCAT
CGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTG
GCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGT
CTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACT
TCTTCGCCCCCGTTTTCACTATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCG
CTGGCGATTCAGGTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGA
ATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCG

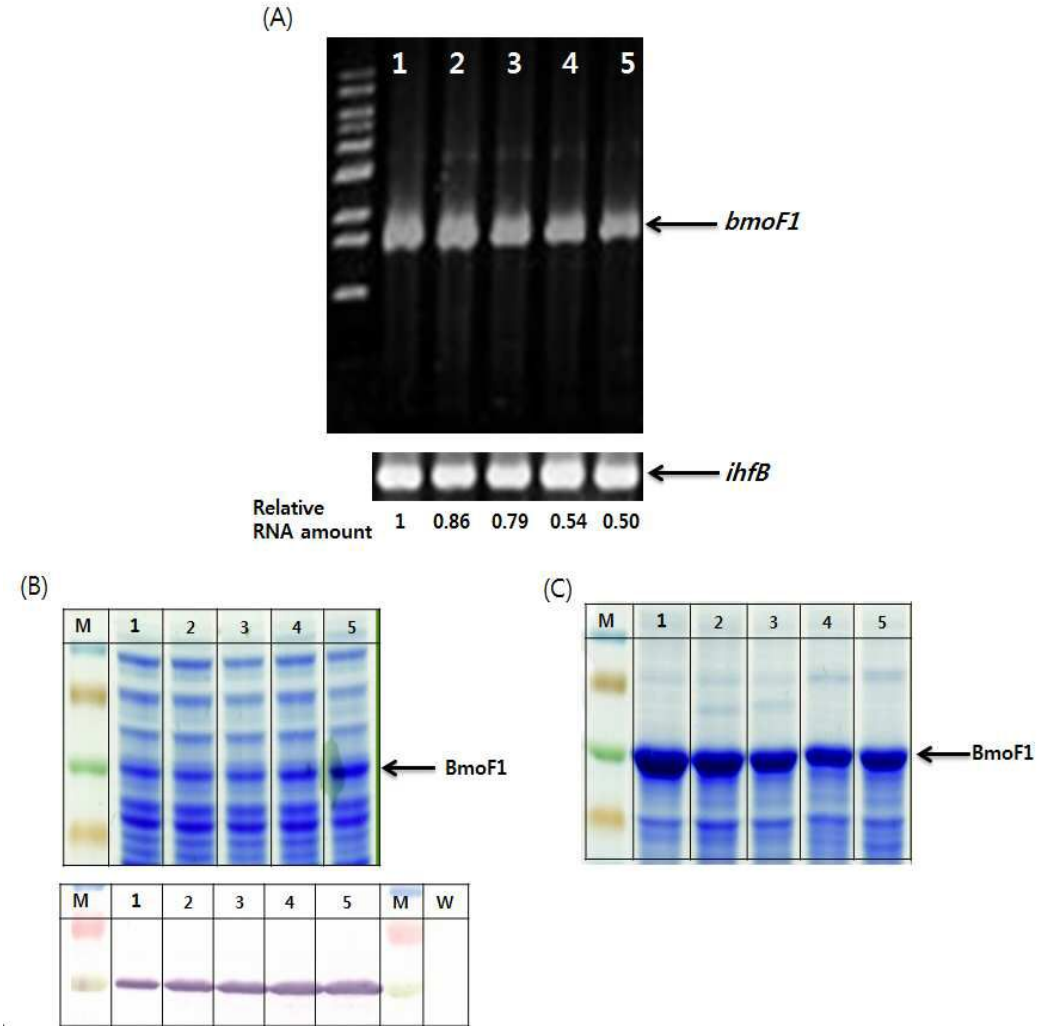
도면3


(A)
bmoF1
ihfB
Relative RNA amount 1 0.85
(B)
WS
WI
M
1
2
3
4
(C)
Concentration (mM)
Reaction time (h)
Reaction time (h)

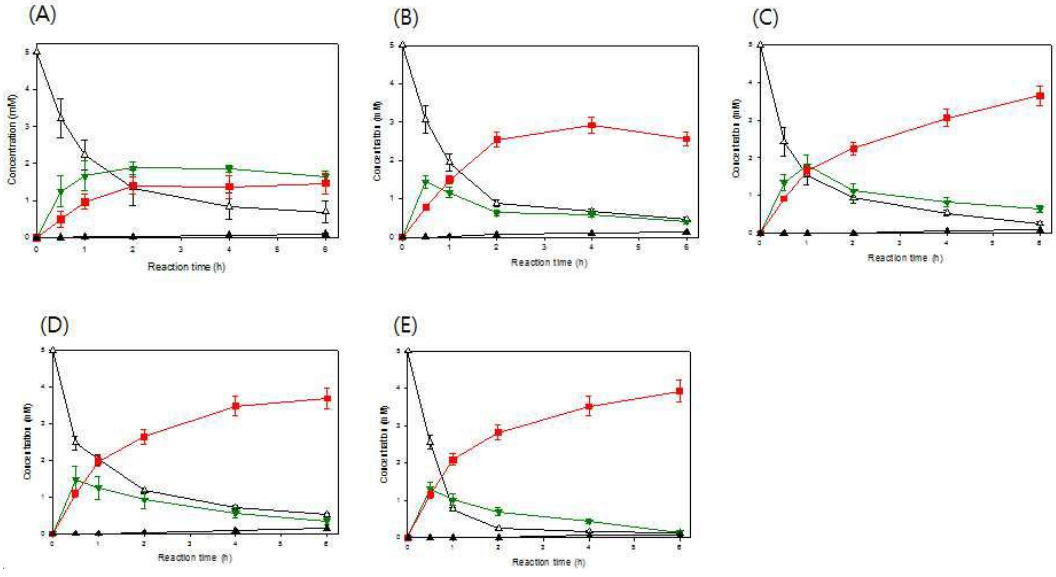
도면4


Number of RNase cleavage sites
Length of CAT sequence (bp)
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
200
300
400
500
600
700

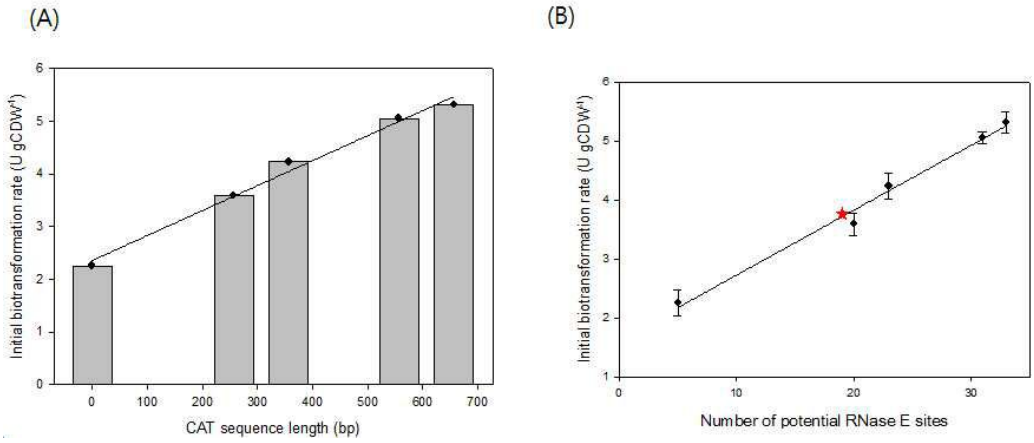
도면5


(A)
1 2 3 4 5
bmoF1
ihfB
Relative RNA amount
1 0.86 0.79 0.54 0.50
(B)
M 1 2 3 4 5
BmoF1
M 1 2 3 4 5 M W
(C)
M 1 2 3 4 5
BmoF1

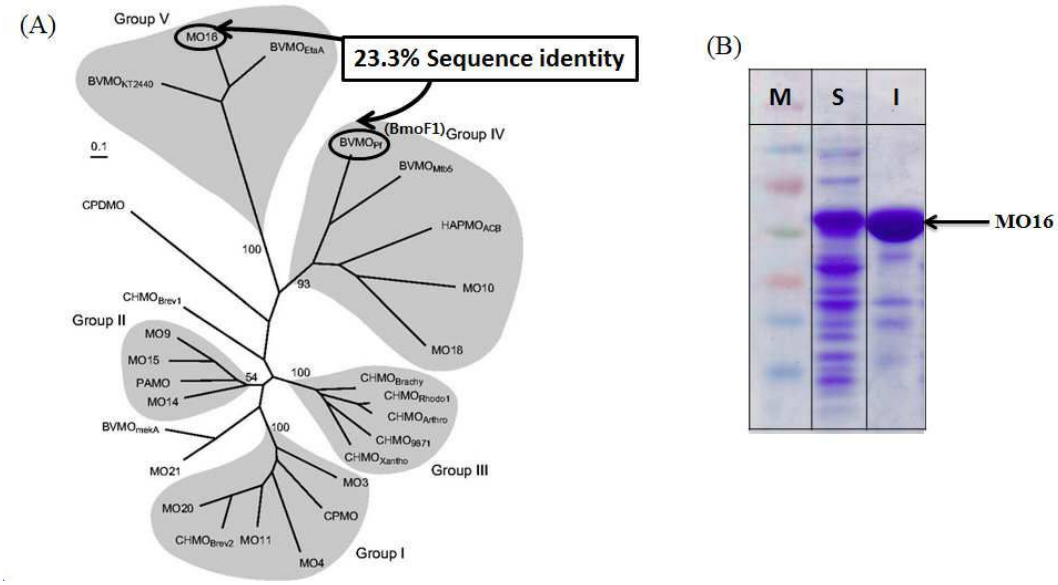
도면6


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
Reaction time (h)

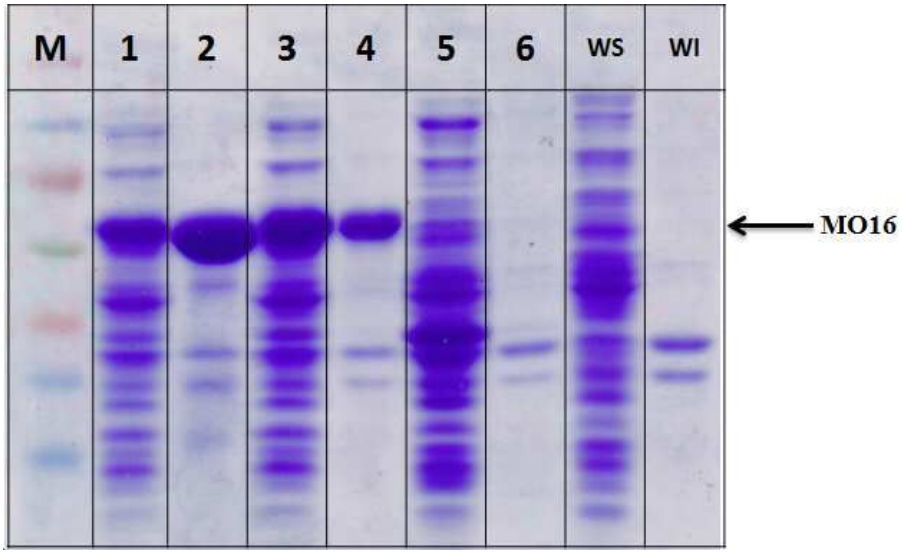
도면7


(A)
Initial biotransformation rate (U gCDW-1)
CAT sequence length (bp)
(B)
Initial biotransformation rate (U gCDW-1)
Number of potential RNase E sites

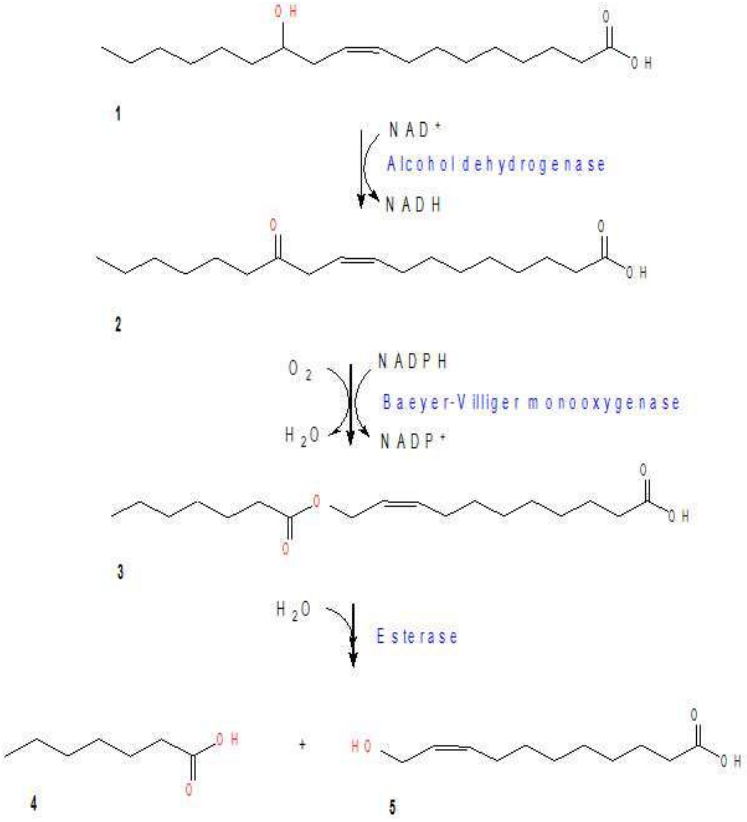
도면8


(A)
Group V
MO16
BVMOEtaA
23.3% Sequence identity
BVMOKT2440
(BmoF1)
BVMOPH
Group IV
BVMOMB6
0.1
CPDMO
HAPMOACB
100
93
MO10
CHMOBrev1
Group II
MO18
MO9
MO15
PAMO
MO14
54
100
CHMOBrachy
CHMORhodo1
CHMOArthro
BVMOmekA
100
CHMO9871
CHMOXantho
MO21
Group III
MO3
MO20
CPMO
CHMOBrev2
MO11
MO4
Group I
(B)
M
S
I
MO16

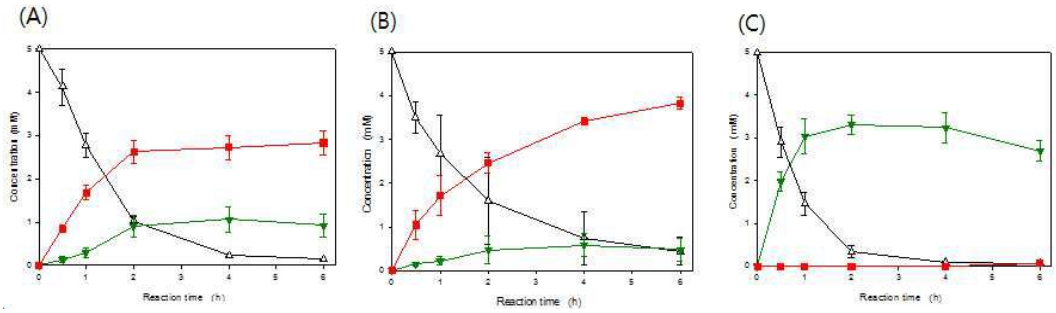
도면9


M
1
2
3
4
5
6
WS
WI
MO16

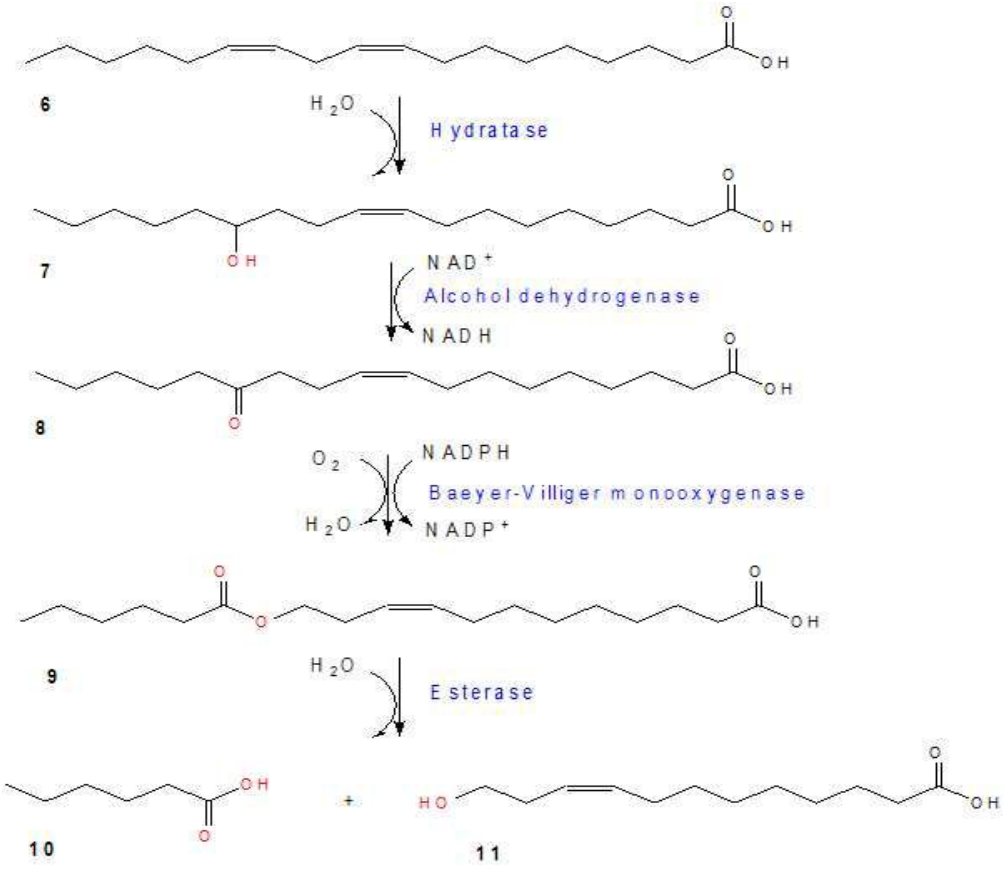
도면10


OH
O
OH
1
NAD+
Alcohol dehydrogenase
NADH
O
O
OH
2
O2
H2O
NADPH
Baeyer-Villiger monooxygenase
NADP+
O
O
OH
3
H2O
Esterase
OH
O
4
+
HO
O
OH
5

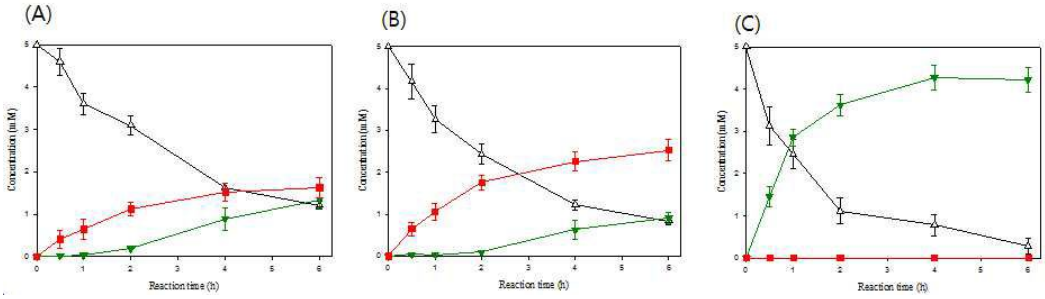
도면11


(A)
(B)
(C)
Concentration (mM)
Reaction time (h)

도면12



도면13



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> 3'UTR engineering to improve soluble expression of foreign proteins in microbial cells

<130> KPA151267-KR

<160> 21

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hilD_F primer

<400> 1

aagcttcatt ttttgtatct gtcacttaag 30

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> hilD_R primer

<400> 2

ctcgagaata aaatgccggc cttaatcc 28

<210> 3

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BmoF1 forward primer

<400> 3

atgaatgccc acagtgattc catcgacatc gccatcatcg gttcgggttt tgccg 55

<210> 4

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BmoF1 reverse primer

<400> 4

tgagaggctg ccttctgccg tggagtgggg cgccgtggcc ggacggggcg gcgca 55

<210> 5

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ihfB forward primer

<400> 5

atgaccaagt cagaattgat agaaagactt gccacccagc aatcgcacat tcccg 55

<210> 6

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ihfB reverse primer

<400> 6

ttaaccgtaa atattggcgc gatcgcgcag ttctttacca ggtttaaagt gagga 55

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAT657_F primer

<400> 7

aagcttatgg agaaaaaaat cactggatat 30

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAT657_R primer

<400> 8

ctcgagggca tcagcacctt gtcg 24

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAT257_R primer

<400> 9

ctcgagcgcc ccgccctgcc actcatcg 28

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAT357_R primer

<400> 10

ctcgagtccc atatcaccag ctca 24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAT557_R primer

<400> 11

ctcgagtatg tgtagaaact gccg 24

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MO16 forward primer

<400> 12

catatgtcac acaccgagac cgccgccga 29

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MO16 reverse primer

<400> 13

ggatcccggg cggctgaagg tcatggcgtc gtcc 34

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MO16_CAT657_F primer

<400> 14

aagcttatgg agaaaaaaat cactggatat 30

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MO16_CAT657_R primer

<400> 15

ctcgagcgcc ccgccctgcc actcatcg 28

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MO16_CAT257_R primer

<400> 16

ctcgagcgcc ccctgccact catcg 25

<210> 17

<211> 310

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant hilD sequence

<400> 17

catttttgt atctgtcact taagtaaaga tttttattaa aattgtaata atttaaaatt 60

cagactgcgc attaacacgc tctatcagga tgggaggcta ttcaatatca ttgttctgtc 120

cggaagacag cttatactga tatctatggt aatttaaagt aaggctgatt atataacacg 180

atttttgtga acttgtcatc gctatgatga ctggtaaaac gatattgcct tattcacagc 240

gtaagaattc gtccagatga cactatctcc ttccggcttt aaccctgtgg attaaggccg 300

gcattttatt 310

<210> 18

<211> 257

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant CAT257 sequence

<400> 18

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggagttcc gtatggcaat gaaagacggt 240

gagctggtga tatggga 257

<210> 19

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant CAT357 sequence

<400> 19

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggagttcc gtatggcaat gaaagacggt 240

gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa 300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacata 357

<210> 20

<211> 557

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant CAT557 sequence

<400> 20

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggagttcc gtatggcaat gaaagacggt 240

gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa 300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 420

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcactatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540

gacaaggtgc tgatgcc 557

<210> 21

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant CAT657 sequence

<400> 21

atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60

cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120

attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 180

cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggagttcc gtatggcaat gaaagacggt 240

gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa 300

acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360

tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 420

aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480

gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcactatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540

gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggcttccat 600

gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcg 657