(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0129725
(43) 공개일자 2014년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0048369
(22) 출원일자 2013년04월30일
심사청구일자 2013년04월30일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

전체 청구항 수 : 총 16 항

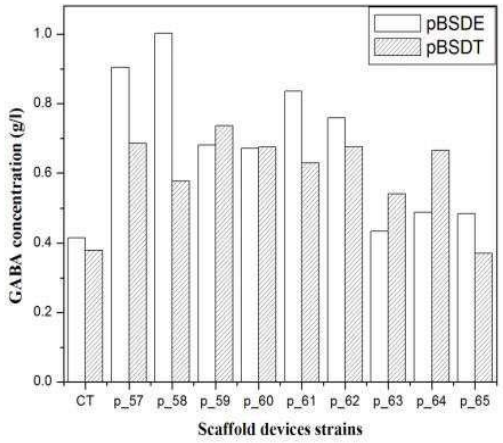
(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
홍순호
부산광역시 기장군 정관면 정관5로 75, 108동 102호(정관 신동아파밀리에APT)
(74) 대리인
위병갑

(54) 발명의 명칭 **모듈식 스캐폴드를 이용한 감마 아미노부틸산 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 감마 아미노부틸산 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체 없이, 모듈식 합성의 스캐폴드를 이용하여 특정 효소들을 함께 위치시킴으로써 2개의 합성경로를 수립하여 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 효과적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ00954904
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 바이오부품화와 모듈화 및 lego-like 조립을 통한 유용산물 생산용 숙주 개발
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교
연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

유전자 SdhA, GabD, GABA-AT; 및 상기 유전자들이 발현하는 효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드를 함유하는 스캐폴드를 포함하는 재조합 미생물를 배양하는 것을 특징으로 하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 GABA-AT 유전자는 GabT 및 PuuE 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 GABA-AT 유전자로서 GabT 및 PuuE을 함께 사용함으로써 2가지의 합성 경로를 수립하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유전자 SdhA, GabD, 및 GABA-AT가 발현하는 효소는 각각 숙시네이트 디하이드로지나아제(Succinate dehydrogenase,SDH), 숙시네이트-세미알데히드 디하이드로지나아제(succinate-semialdehyde dehydrogenase, SSADH) 및 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제(4-aminobutyrate aminotransferase, GABA-AT)인 것을 특징으로 하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

SDH, SSADH 및 GABA-AT 효소와 특이적으로 결합하는 리간드는 각각 GDB, SH3 및 PDZ인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 SdhA, GabD, 및 GABA-AT가 발현하는 효소는 스캐폴드 내에서 함께 위치하여 각각 독립적으로 대사활동을 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

SdhA, GabD, 및 GABA-AT가 발현하는 효소인 SDH, SSADH 및 GABA-AT 효소의 비율은 1:1:1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 배양은 글루코스, 수크로스, 셀룰로스 및 글리세롤로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 탄소원을 기질로 하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 기질은 글루코스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 GabT 및 PuuE을 모두 함유하고 있는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

효소 SDH, SSADH, GABA-AT; 또는 이들을 코딩하는 유전자 SdhA, GabD, GABA-AT를 함유하고, 상기 효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드 GDB, SH3 및 PDZ를 함유하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산용 스캐폴드.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 GABA-AT 유전자는 GabT 및 PuuE 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산용 스캐폴드.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 SdhA, GabD, 및 GABA-AT가 발현하는 각 효소 SDH, SSADH, GABA-AT는 스캐폴드 내에서 함께 위치(co-localized)하는 것을 특징으로 하는 스캐폴드.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 스캐폴드를 함유하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산용 재조합 미생물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감마 아미노부틸산 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체 없이, 모듈식 합성의 스캐폴드를 이용하여 특정 효소들을 함께 위치시킴으로써 2개의 합성경로를 수립하여 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 효과적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 전세계적인 석유수급 불안과 석유자원 고갈에 대한 위기의식으로 최근에 산업 바이오 기술을 이용하여 바이오매스에서 유래한 대체 생산 방법이나 대체 화합물을 생산하기 위한 전 인류적인 노력이 바이오에너지,바이오플라스틱, 바이오화합물 등의 다양한 분야에서 가시화되고 있다. 바이오매스를 활용하여 생산되는 바이오 플라스틱 시장의 경우 2002년 Natureworks사에 의해 상업화된 폴리유산 (Poly Lactic acid)이 연 14 만톤 규모로 생산되어 최근 시장이 급속히 확대되고 있다.

[0003] 4-아미노부틸산의 경우 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid, GABA)이라고도 하는데, 체내에서는 신경전달물질 억제효과에 의한 저혈압 및 진통효과가 있다고 알려져, 현재 식품 및 의약품 소재로 활용되고 있다

(Erlander et al., Neurochem Res. 16: 215-226, 1991). 이러한 GABA는 글루타메이트를 원료로 글루타메이트 디카르복실라아제(Glutamate decarboxylase)에 의해 제조될 수 있는데, 현재까지 다양한 글루타메이트 디카르복실라아제가 보고되어 있으며(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8491-8495, 1990; Protein Expression and Purification 8: 430-438, 1996; Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(12): 2600-2605, 2002), 글루타메이트 디카르복실라아제를 이용하여 GABA를 생산하는 공정이 개발된바 있다. 하지만, 효소반응의 경우 고가의 효소를 이용하기 때문에 GABA의 저가의 대량생산공정에는 적합하지 않을 수 있다.

[0004] 효소반응의 문제점을 해결하기 위하여, 락토바실러스 등을 이용하여 바이오매스에서 생산된 글루탐산나트륨을 이용하여 GABA를 고농도로 전환하는 공정이 개발되어 나일론 4의 모노머로 이용될 수 있는 GABA의 경제적인 제조 공정 기술이 개발된 바 있다. 하지만, 글루탐산나트륨으로부터 GABA를 생산하기 위해서는 기질인 글루탐산나트륨을 코리네박테리움 같은 미생물의 발효공정을 통해 슈가로부터 생산하여야 하며, 글루탐산나트륨이 GABA로 전환될 때 이산화탄소가 방출되기 때문에 탄소 수율이 낮아지는 단점이 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 SdhA(Succinate dehydrogenase), GabD(succinate-semialdehyde dehydrogenase) 및 GABA-AT(GabT 및 PuuE)(4-aminobutyrate aminotransferase) 효소가 함께 위치토록 하는 특이적 리간드와 결합할 수 있는 도메인을 가지는 모듈식 합성의 스캐폴드를 이용하여 2개의 합성경로를 수립함으로써, 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체 없이도 글루코스(glucose)로부터 GABA를 고효율로 직접 생산할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8491-8495, 1990.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 주된 목적은 스캐폴드 디바이스를 이용하여 특정 효소들을 함께 위치시킴으로써 글로코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)을 생산하는 방법을 제공하는 데에 있다

[0008] 본 발명의 상기 방법에 사용될 수 있는 GABA 생산용 재조합 미생물 및 재조합벡터를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 수율이 높은 GABA 생합성경로를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 유전자 SdhA, GabD, GABA-AT(GabT 및 PuuE); 및 상기 유전자들이 발현하는 효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드를 함유하는 스캐폴드를 포함하는 재조합 균주를 배양하는 것을 특징으로 하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산방법을 제공한다.

[0011] 이 때, 바람직하게는 GABA-AT(4-aminobutyrate aminotransferase) 유전자로서 GabT 및 PuuE을 모두 사용함으로써 2가지의 GABA 합성 경로를 수립하는 것이 좋다.

[0012] 상기 유전자 SdhA, GabD, 및 GABA-AT(GabT 및 PuuE)가 발현하는 효소는 각각 숙시네이트 디하이드로지나아제(Succinate dehydrogenase,SDH), 숙시네이트-세미알데히드 디하이드로지나아제(succinate-semialdehyde dehydrogenase, SDH) 및 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제(4-aminobutyrate aminotransferase, GABA-AT)로서, 상기 SDH, SSADH 및 GABA-AT(GabT 및 PuuE) 효소와 특이적으로 결합하는 리간드는 각각 GDB, SH3 및 PDZ인 것이 바람직하다.

[0013] 특히 본 발명의 방법에서는 상기 SdhA, GabD, 및 GABA-AT(GabT 및 PuuE)가 발현하는 효소들이 스캐폴드 내에서 함께 위치하여(co-localized) 각각 독립적으로 대사활동을 하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 이때, 상기 SDH, SSADH 및 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제 효소의 비율은 약 1:1:1인 것이 바람직한

데, 이러한 리간드의 갯수는 GABA 생산 효율에 큰 영향은 미치지 않는다.

[0015] 또한, 본 발명에서 사용할 수 있는 재조합 미생물(균주)은 GabT 및 PuuE을 모두 함유하고 있는 균주인 것이 바람직한데, 예를 들어, 대장균을 사용할 수 있다.

[0016] 그리고, 기질로서 탄소원을 사용할 수 있는데, 바람직하게는 글루코스를 사용한다. 일 실시예에서는 D-글루코스를 사용하였다. 본 발명은 특히 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체 없이 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 효과적으로 생산할 수 있다.

[0017] 한편, 본 발명은 다른 태양으로, 효소 SDH, SSADH, GABA-AT; 또는 이들을 코딩하는 유전자 SdhA, GabD, GABA-AT를 함유하고, 상기 효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드 GDB, SH3 및 PDZ를 함유하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산용 스캐폴드를 제공한다. 자세한 설명은 앞서 기재한 바와 같다.

[0018] 또한, 본 발명은 또다른 태양으로 이러한 스캐폴드를 함유하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산용 재조합 미생물(균주) 또한 제공한다.

[0019] 이처럼, 본 발명은 모듈식 합성의 스캐폴드를 이용하여 특정 효소들을 함께 위치시킴으로써 2개의 합성경로를 수립하여 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 효과적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 방법은 모듈식 합성의 스캐폴드를 이용하여 특정 효소들을 함께 위치시킴으로써 2개의 합성경로를 수립함으로써, 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 높은 수율로 수득할 수 있게 함과 동시에, 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체의 사용이 필요치 않으므로 보다 간단하고 효과적으로 GABA를 생산할 수 있으므로 GABA 대량 생산을 통한 상업화 기술에 매우 유용할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 발현 플라스미드로서 pBad30의 사용에 따른 본 발명의 스캐폴드 디바이스의 디자인 모식도이다.

도 2는 프리-스캐폴드의 경우와 비교한 GABA 농도의 시간 프로파일을 나타낸 것으로, a) XB(pBSDE_57) ; b) XB(pBSDT_57)을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 균주에 의한 GABA 생산에 있어서 D-글루코스의 소비량을 나타낸 것이다.

도 4는 1mM 아라비노스 및 108 nM aTc 농도에서의 GABA 생산에 대한 다양한 스캐폴드 구조물(pJD757-pID765)의 영향을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0023] "~에 의해 코딩되는" 또는 "~를 코딩하는"이란 핵산 서열이 폴리펩티드 서열을 코딩하는 것을 말하며, 여기서 상기 폴리펩티드 서열은 상기 핵산 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드인 적어도 3~5개 아미노산, 더 바람직하게는 적어도 8~10개 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 적어도 15~20개 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다. 상기 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드를 사용하여 면역학적으로 확인할 수 있는 폴리펩티드 서열도 포함된다. 따라서, 항원 "폴리펩티드", "단백질" 또는 "아미노산" 서열은 항원의 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 대해 70% 이상의 유사성, 바람직하게는 약 80% 이상의 유사성, 더 바람직하게는 약 90~95%의 유사성, 가장 바람직하게는 약 99%의 유사성을 가질 수 있다.

[0024] "유전자"는 유전적 기능이 관련되어 있는 핵산 분자(염색체, 플라스미드 등)의 뉴클레오티드 서열이다. 유전자는, 예를 들어, 유기체의 게놈 내의 특정 물리적 위치("유전자좌")를 차지하는 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 포유동물의 DNA 서열)을 포함하는, 유기체의 유전 단위이다. 유전자는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 발현 생산물을 코딩할 수 있다. 일반적으로, 유전자는 폴리펩티드 코딩 서열과 같은 코딩 서열 및 프로모터 서열, 폴리아데닐화 서열, 전사 조절 서열(예를 들어, 인핸서 서열)과 같은 비코딩 서열을 포함한다. 다수의

진핵생물 유전자가 "인트론"(비코딩 서열)이 개재되어 있는 "엑손"(코딩 서열)을 갖는다.

[0025] "형질전환 또는 트랜스펙션"은 세포외부 DNA가, 수반물질이 있고 없는 상태로 숙주 세포로 들어가는 과정을 말한다. "트랜스펙션된 세포"란 세포 외부 DNA가 세포 내로 도입되어 세포 외부 DNA를 가지고 있는 세포를 가리킨다. DNA는 세포로 도입되어 핵산이 염색체에 삽입되거나 혹은 염색체 외 물질로 복제될 수 있다.

[0026] "벡터" 또는 "플라스미드"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내 및/또는 사이로 전달하는 핵산 분자, 바람직하게는 자가-복제성 핵산 분자이다. 이 용어는 1차적으로 DNA 또는 RNA의 세포 내로의 삽입을 위해 기능하는 벡터,1차적으로 DNA 또는 RNA의 복제를 위해 기능하는 벡터의 복제물, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역을 위해 기능하는 발현 벡터를 포함한다. 또한, 하나 초과의 상기 기능을 제공하는 벡터도 포함된다. "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 때 폴리펩티드(들)로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드이다. "발현 시스템"은 대체로 요구되는 발현 생산물을 생산하도록 기능할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 의미한다.

[0027] "효소 반응 조건"이란 효소가 기능하도록 허용하는 환경에서 이용가능한 임의의 필수적인 조건(즉, 온도, pH, 물질 비저해)과 같은 요인을 의미한다. 효소 반응 조건은 시험관에서와 같은 시험관내, 또는 세포내와 같은 생체내일 수 있다.

[0028] "대사 조작(metabolic engineering)"은 미생물에서 원하는 대사산물의 생산을 위하여, 생합성 유전자, 오페론과 연관된 유전자, 그리고 이들 폴리뉴클레오티드의 제어 요소(control elements)의 합리적 경로 디자인과 어셈블리를 수반한다. "대사 조작된"은 원하는 경로를 유도하는 중간생성물과 경쟁하는 경쟁 대사 경로(competing metabolic pathway)의 감소, 파괴 또는 적중을 비롯한, 유전자 조작과 적절한 배양 조건을 이용한 전사(transcription), 전이(translation), 단백질 안정성(protein stability)과 단백질 기능성(protein functionality)의 조절과 최적화에 의한 대사 흐름(metabolic flux)의 최적화를 더욱 포함할 수 있다. 생합성 유전자는 호스트에 외래성이거나, 또는 돌연변이유발(mutagenesis), 재조합(recombination) 및/또는 내인성 숙주 세포에서 이종 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주 미생물에 이종성일 수 있다. 일 견지에서, 폴리뉴클레오티드가 숙주 생물체에 이종 발생성인 경우에, 폴리뉴클레오티드는 코돈(codon) 최적화될 수 있다.

[0029] "기질"은 효소의 작용에 의해 다른 화합물로 전환되거나 전환되게 되어있는 임의의 물질 또는 화합물을 지칭한다. 상기 용어는 단일 화합물뿐만 아니라 용제, 혼합물 및 최소한 하나의 기질을 포함하는 다른 재료와 같은 화합물의 조합 및 이들의 유도체를 포괄한다. 게다가, 용어 "기질"은 바이오매스(biomass) 유도된 설탕과 같은 출발 재료로서 사용하기 적합한 탄소 공급원을 제공하는 화합물뿐만 아니라 본 명세서에 기재된 대사 조작 미생물과 연관된 경로에서 사용되는 중간생성물과 최종 대사산물을 포괄한다. 미생물에 의해 통상적으로 사용되는 적합한 탄소 기질을 포괄한다.

[0030] "스캐폴드"는 맞춤 기능 및 특징을 갖는 새로운 생성물, 예를 들어 단백질 의 조작을 위한 폴리펩티드 플랫폼을 의미한다. 그러한 스캐폴드는 단백질 라이브러리의 제작에 유용하다. 스캐폴드는 전형적으로 서열-관련 단백질 패밀리의 정렬에서 관찰되는 보존된 잔기에 의해 규정된다. 고정된 잔기는 특히 정렬된 단백질의 기능이 상이할 경우에 폴딩 또는 구조에 필요할 수 있다. 따라서, 스캐폴드로부터 단백질을 설계할 때, 프레임워크의 유리한 특성에 중요한 아미노산 잔기는 유지되고, 다른 잔기는 무작위로 선발되거나 돌연변이될 수 있다. 단백질 스캐폴드의 상세한 설명은 시스테인의 수, 위치 또는 간격 및 결합 패턴, 및 루프내의 임의의 고정된 잔기의 위치 및 종류를 포함할 수 있다

[0031] "기능" 및 "기능성" 등은 생물학적 또는 효소적 기능을 의미한다.

[0032] "증가된" 또는 "증가"라는 것은 비변형 미생물 또는 상이하게 변형된 미생물과 같은 대조 미생물에 비해 주어진 산물 또는 분자(예를 들면, 범용 화학물질, 바이오연료 또는 이들의 중간체 산물)를 더 많은 양으로 생산할 수 있는 하나 이상의 재조합 미생물의 능력을 의미한다.

[0033] "~로부터 얻은" 또는 "~유래의" 이란 예를 들어, 소정 유기체, 전형적으로 미생물과 같은 특정 공급원으로부터 단리되거나, 이로부터 유도된 폴리뉴클레오티드 추출물 또는 폴리펩티드 추출물 등과 같은 샘플을 의미한다. 또한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 특정 유기체 또는 미생물로부터 단리되거나, 이로부터 유도된 상황도 의미할 수 있다.

[0034] "재조합" 미생물은 전형적으로, 예컨대 플라스미드 또는 벡터에 하나 이상의 외래 뉴클레오티드 서열을 포함한

다.

[0035] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0036] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0039] 본 발명은 재조합 미생물을 이용하여 감마 아미노부틸산(GABA)을 생산하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 유전자 SdhA, GabD, GABA-AT(GabT 및 PuuE); 및 상기 유전자들이 발현하는 효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드를 함유하는 스캐폴드를 이용하여 2가지 합성 경로를 수립함으로써 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 효과적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0040] 특히, 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체 없이도 우수한 효율로 감마 아미노부틸산을 수득할 수 있다.

[0041] 본 발명은 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 표준 클로닝 기술 및 통상적인 방법을 이용하여, 특정 효소를 코딩하는 유전자를 기본 벡터에 삽입하여 형질전환시킨 재조합미생물을 배양함으로써 구현할 수 있다. 따라서, 본 발명은 감마 아미노부틸산과 같은 범용 화학물질로 전환시키는 방법, 효소, 재조합 미생물 및 미생물 시스템을 포함한다.

[0042] 아미노부틸산(amino butyric acid, amino butyrate, 4-amino butyric acid, gamma-amino butyric acid, 2-amino butyric acid)은 아민기와 카르복시기가 있는 탄소수 4개의 아미노산의 일종이며 아민기의 위치에 따라 2, 3, 4-아미노부틸산으로 불린다.

[0043] 4-아미노부틸산의 경우 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid, GABA)이라고도 하는데, 체내에서는 신경전달물질 억제효과에 의한 저혈압 및 진통효과가 있다고 알려져, 현재 식품 및 의약품 소재로 활용되고 있다(Erlander et al., Neurochem Res. 16: 215-226, 1991).

[0044] 이러한 GABA는 글루타메이트를 원료로 글루타메이트 디카르복실라아제(Glutamate decarboxylase)에 의해 제조될 수 있는데, 현재까지 다양한 글루타메이트 디카르복실라아제가 보고되어 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8491-8495, 1990; Protein Expression and Purification 8: 430-438, 1996; Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(12): 2600-2605, 2002).

[0045] 이처럼, 종래에는 글루타메이트(글루탐산) 또는 MSG(Monosodium Glutamate)와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체를 이용하여 감마-아미노부틸산(gamma-aminobutyric acid, GABA)을 생산하는 방법이 일반적이었다.

[0046] 그러나, 본 발명은 글루탐산 또는 MSG와 같은 감마 아미노부틸산(γ-aminobutiric acid, GABA)의 전구체 없이, 모듈식 합성의 스캐폴드를 이용하여 특정 효소들을 함께 위치시키고, 바람직하게는 GABA-AT 효소를 코딩하는 GabT 및 PuuE의 2개의 유전자를 이용하여 2개의 GABA 합성경로를 수립하여 글루코스로부터 직접적으로 감마 아미노부틸산을 효과적으로 생산하는 것을 특징으로 한다.

[0047] 본 발명의 방법은 스캐폴드 디바이스를 이용하여 특정 효소들을 동일한 위치에 위치시켜 독립적으로 대사토록 하는데, 이를 위해, 유전자 SdhA, GabD, GABA-AT; 및 상기 유전자들이 발현하는 효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드를 함유하는 스캐폴드를 이용한다.

[0048] 이 때, 구별되는 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제를 코딩하는 GABA-AT 유전자로서 GabT 및 PuuE을 동시에 사용하여 2가지의 대사 경로(합성 경로)를 수립하는 것이 가장 바람직하다.

[0049] "대사 경로"로도 지칭되는 용어 "(생)합성 경로"는 하나의 화학종을 다른 종으로 전환(transmuting)시키기 위한 동화(anabolic) 또는 이화(catabolic) 생화학 작용의 세트를 지시한다. 유전자 산물은 병렬로 또는 직렬로 동일 기질에 작용하여 동일 산물을 생산하거나, 또는 동일 기질과 대사 최종 산물 사이의 대사 중간생성물(즉, 대사 산물)에 작용하거나 또는 이를 생산하면, 동일한 "대사 경로"에 속한다.

[0050] 본 발명에는 숙시네이트 디하이드로지나아제(Succinate dehydrogenase,SDH), 숙시네이트-세미알데히드 디하이드로지나아제(succinate-semialdehyde dehydrogenase, SSADH) 및 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제(4-aminobutyrate aminotransferase, GABA-AT)의 효소가 사용된다.

[0051] 이들을 각각 코딩하는 대표적인 유전자들은 SdhA, GabD 및 GABA-AT이다.

[0052] 특히, 상기 GABA-AT 유전자는 GabT 및 PuuE의 2종류를 사용할 수 있고, 각각 다른 종류의 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제(4-aminobutyrate aminotransferase, GABA-AT)를 발현하기 때문에, 이들을 이용하여 GABA 합성의 2가지 경로를 수립할 수 있다. 바람직하게는 사용하는 재조합 미생물(균주)이 상기 유전자들을 함유하고 있는 것이 좋다.

[0053] 본 발명에 사용되는 효소를 인코딩하는 적합한 폴리뉴클레오티드는 이를 제공하는 임의의 생물학적 공급원으로부터 유래될 수 있고, 이의 동족체는 다양한 자료베이스를 참조하여 확인될 수 있다.

[0054] 생합성 효소를 인코딩하는 고유 DNA서열은 본 발명의 구체예를 단순히 예시하기 위하여 본 명세서에서 언급되고, 본 발명은 본 발명의 방법에 활용되는 효소의 폴리펩티드 및 단백질의 아미노산 서열을 인코딩하는 임의의 서열의 DNA 화합물을 포함한다. 유사한 방식으로, 폴리펩티드는 전형적으로, 원하는 활성의 손실이나 중대한 손실 없이, 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및 삽입을 허용할 수 있다. 본 발명은 본 명세서에 기술된 특정 단백질의 효소적 동화 또는 이화 활성을 갖는다면, 상기 기준 폴리펩티드(reference polypeptide)와 상이한 아미노산 서열을 갖는 변형되거나 변이된 폴리펩티드 역시 포함한다. 더 나아가, 본 명세서에 도시된 DNA 서열에 의해 인코딩된 아미노산 서열은 단지 본 발명의 구체예를 예시한다.

[0055] 본 명세서에 열거된 각 유전자와 폴리펩티드/효소에 대한 서열은 인터넷에서 이용 가능한 자료베이스를 사용하여 용이하게 확인할 수 있다(http:(//)eecoli.kaist.ac.kr/main.html). 이에 더하여, 이들 아미노산 서열과 핵산 서열은 당분야에서 통상적으로 이용되는 알고리즘(BLAST 등)을 이용하여 동일성에 대하여 용이하게 비교할 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명에서 사용되는 스캐폴드는 상기 숙시네이트 디하이드로지나아제(Succinate dehydrogenase,SDH), 숙시네이트-세미알데히드 디하이드로지나아제(succinate-semialdehyde dehydrogenase, SSADH) 및 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제(4-aminobutyrate aminotransferase, GABA-AT)효소들과 각각 특이적으로 결합하는 리간드를 함유하는 것을 특징으로 한다. 이는 상기 스캐폴드에서 3가지 효소들이 함께 위치할 수 있게 하기 위함이다. SDH, SSADH 및 GABA-AT 효소와 특이적으로 결합하는 리간드는 각각 GDB, SH3 및 PDZ을 대표적인 예로 들 수 있다.

[0057] 즉, 상기 SdhA, GabD, 및 GABA-AT(GabT 및 PuuE)가 발현하는 효소는 스캐폴드 내에서 함께 위치하여 각각 독립적으로 대사활동을 하고, 앞서 설명한 바와 같이, GabT 및 PuuE의 2종류 유전자에 의해 2가지의 합성 경로가 수립되는 것이다.

[0058] 이 때, 상기 SDH, SSADH 및 GABA-AT 효소의 비율은 약 1:1:1을 이루는 것이 가장 바람직하다. 실시예를 통해 알 수 있는 것처럼 리간드의 수에 따라 GABA의 생산율에 영향을 미치는 것은 아니기 때문이다.

[0059] **재조합벡터**

[0060] 본 발명에서 벡터(vector)는 적합한 미생물 내에서 상기 유전자들의 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다.

[0061] 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주 미생물로 형질전환되면 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로 본 발명에서 플라스미드(plasmid)와 벡터(vector)는 때로 상호 교환적으로 사용된다.

[0062] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 도입된 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0063] "작동 가능하게 연결된"이란 언급된 구성요소들이 그 일반적 기능을 수행하도록 구성되어 있는 요소들의 배열을 말한다. 따라서, 코딩 서열(예를 들어, 관심있는 항원을 코딩하는 서열)에 작동 가능하게 연결된 특정 프로모터는 조절 단백질 및 적절한 효소가 존재할 경우 코딩 서열의 발현을 가능하게 할 수 있다. 일부 경우, 특정 조절 요소가 이들이 코딩 서열의 발현을 지시하는 기능을 할 수 있는 한 코딩 서열에 인접할 필요는 없다.

[0064] 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질 전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0065] 통상적으로, 하나 이상의 제한 효소로 DNA 서열 및 벡터를 절단하고 단편들을 함께 결찰하여 최종적으로 발현될 DNA 서열을 벡터에 결합시킨다. 제한 효소 소화처리 및 결찰은 당업자들에게 익히 알려졌다.

[0066] **재조합 미생물**

[0067] 본 발명은 다른 태양으로, 상기 감마 아미노부틸산(GABA) 생산을 위한 생화학 경로를 포함하는 대사 조작 미생물(재조합 미생물 또는 재조합 균주)에 관한 것이다.

[0068] 본 발명의 대사 조작 미생물은 생물의 게놈 내에서 또는 생물 내에서 게놈 외부에 하나 이상의 재조합 폴리뉴클레오티드를포함한다. 이러한 미생물은 야생형 생물체에서 발견되는 유전자의 감소(reduction), 파괴(disruption) 또는 적중(knockout) 및/또는 이종(heterologous) 폴리뉴클레오티드의 도입(introduction)을 포함한다.

[0069] 본 발명은 일 구체예로서, 유전자 SdhA, GabD, GABA-AT; 및 상기 유전자들이 발현하는 효소들, 즉 숙시네이트 디하이드로지나아제(Succinate dehydrogenase,SDH), 숙시네이트-세미알데히드 디하이드로지나아제(succinate-semialdehyde dehydrogenase, SSADH) 및 4-아미노부틸레이트 아미노트랜스퍼라아제(4-aminobutyrate aminotransferase, GABA-AT)와 각각 특이적으로 결합하는 리간드를 함유하는 스캐폴드를 포함하는 재조합 미생물에 관한 것이다. SDH, SSADH 및 GABA-AT 효소와 특이적으로 결합하는 리간드는 각각 GDB, SH3 및 PDZ을 대표적인 예로 들 수 있다.

[0070] 적합한 미생물 숙주는, 이에 제한되지는 않지만, 자이모모나스(Zymomonas), 에스케리키아(Escherichia), 슈도모나스(Pseudomonas), 알칼리제네스(Alcaligenes), 살모넬라(Salmonella), 시겔라(Shigella), 버크홀데리아(Burkholderia), 올리고트로파(Oligotropha), 클렙시엘라(Klebsiella), 피치아(Pichia), 칸디아(Candida), 한세눌라(Hansenula), 사카로마이세스(Saccharomyces) 및 클루이베로마이세스(Kluyveromyces)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 속에 속하는 미생물을 사용할 수 있다. 이 중, 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 클루이베로마이세스 마시아누스(Kluyveromyces marxianus) 또는 사카로마이세스 세레비시아에(Sccharomyces cerevisiae)가 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 에스케리키아 콜리(E. coli, 대장균)를 사용하였다.

[0071] 특히, 본 발명의 바람직한 미생물은 GabT 및 PuuE의 구별되는 유전자를 모두 함유하고 있는 것이 좋다. 따라서, 가장 바람직한 미생물로서 대장균을 들 수 있다.

[0072] 본 발명의 탄소 기질의 GABA 전환을 위한 효소 경로를 코딩할 필요한 유전자를 포함하는 재조합 유기체를 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 제작할 수 있다.

[0073] 박테리아 게놈으로부터 원하는 유전자를 얻는 방법은 분자 생물학 분야에서 일반적이며 잘 알려져 있다. 예를 들어, 당해 유전자의 서열이 공지되어 있는 경우, 적합한 게놈 라이브러리가 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생성될 수 있으며, 원하는 유전자 서열에 상보적인 프로브를 이용하여 스크리닝될 수 있다. 일단 당해 서열이 단리되면, 그 DNA는 표준 프라이머-유도 증폭 방법, 예를 들어 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용하여 증폭되어 적절한 벡터를 이용한 형질전환에 적합한 양의 DNA가 얻어질 수 있다. 이종 숙주에서의 발현을 위한 코돈 최적화 도구는 쉽게 이용가능하다. 코돈 최적화를 위한 일부 도구는 숙주 유기체의 GC 함량을 기반으로 하여 이용가능하다. 일단 관련 경로 유전자가 동정되어 단리되면, 이 유전자는 당업계에 잘 알려진 수단에 의해 적합한 발현 숙주를 형질전환시킬 수 있다. 형질전환(transformation), 형질도입(transduction), 또는 형질감염(transfection))은 전기천공(electroporation), 극미 주입(microinjection), 유전자총(biolistics)(또는 입자 폭격 매개된 전달), 또는 아그로박테리움 매개된 형질전환 등을 비롯한 다수의 수단 중에서 하나에 의해 달성될 수 있다

[0074] "재조합 미생물" 및 "재조합 균주"라는 용어는 본 명세서에서 동의어로 사용되며, 본 발명의 특정 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 과다 발현하기 위하여 유전적으로 변형된 미생물을 지칭한다.

[0075] **[GABA 생산방법]**

[0076] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 재조합 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 감마 아미노부틸산(GABA) 생산 방법을 제공한다.

[0077] 구체적으로, 상기 재조합 미생물을 탄소원을 함유하는 배지에서 배양한 다음, 상기 배양된 미생물로부터 GABA를 회수하는 것을 특징으로 하는, GABA 생산 방법을 제공한다. 이때 재조합 미생물의 배양 및 GABA 수득과정은 종래 발효공업에서 통상적으로 알려진 배양방법 및 GABA 분리정제방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0078] 발효 배지

[0079] 본 발명에서 발효 배지는 적합한 탄소 기질을 포함하여야 한다. 적합한 기질은 단당류, 올리고당류, 다당류, 및 C1 기질 또는 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 탄소 공급원을 사용할 수 있다.

[0080] 단당류, 예를 들어 글루코스 및 프룩토스, 올리고당류, 예를 들어 락토스 또는 수크로스, 다당류, 예를 들어 전분 또는 셀룰로오스 또는 그 혼합물과, 재생가능한 공급재료로부터의 비정제된 혼합물을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 탄소 기질은 글루코스, 수크로스, 셀룰로스, 글리세롤 등이다. 가장 바람직하게는 글루코스를 사용할 수 있다.

[0081] 적절한 탄소 공급원 외에, 발효 배지는 적합한 미네랄, 염, 보조 인자, 완충액 및 GABA 생성에 필요한 효소 경로의 촉진 및 배양물의 성장에 적합한, 당업자에게 공지된 기타 성분을 포함할 수 있다.

[0082] 배양 조건

[0083] 전형적으로, 세포는 적절한 배지에서 약 25℃ 내지 약 40℃ 범위의 온도에서 성장시킨다. 본 발명에서 적합한 성장 배지는 루리아 베르타니(Luria Bertani, LB) 액체 배지, 사부로 덱스트로스(Sabouraud Dextrose, SD) 액체 배지 또는 효모 배지(Yeast Medium, YM) 액체 배지와 같이 일반적으로 상업적으로 제조된 배지이다. 일 실시예에서는 LB 브로스(액체 배지)를 사용하였다.

[0084] 발효에 적합한 pH 범위는 pH 5.0 내지 pH 9.0이며, 여기서 pH 6.0 내지 pH 8.0이 초기 조건에 바람직하다. 발효는 호기 조건 또는 혐기 조건 하에 실시될 수 있으며, 여기서 혐기 또는 미세호기 조건이 바람직하다.

[0085] 산업적 배치 및 연속 발효

[0086] 본 발명은 배치식 발효 방법을 이용한다. 고전적인 배치 발효는 배지의 조성이 발효 시작시에 정해지며, 발효 동안 인공적으로 변경되지 않는 폐쇄 시스템이다. 따라서, 발효의 시작시에 배지에 원하는 유기체 또는 유기체들이 접종되며, 상기 시스템에 어떠한 것도 첨가하지 않고서 발효가 일어나는 것을 가능케 한다. 그러나, 전형적으로 "배치" 발효는 탄소 공급원의 첨가와 관련하여 배치식이며, pH 및 산소 농도와 같은 인자를 제어하려는 시도가 흔히 이루어진다. 배치 시스템에서, 이 시스템의 대사 산물 및 생물질 조성물은 발효가 중단되는 시점까지 끊임없이 변화한다. 배치 배양 내에서 세포는 정적 유도기(static lag phase)를 통하여 고 성장기로, 그리고 마지막으로 성장 속도가 감소되거나 정지되는 정상기로 완화된다. 미처리될 경우, 정상기의 세포는 결국 죽을 것이다. 로그기의 세포는 일반적으로 최종 생성물 또는 중간체의 벌크 생성에 책임이 있다.

[0087] 표준 배치 시스템이 변화된 것은 유가식(Fed-Batch) 시스템이다. 또한, 유가식 발효 공정이 본 발명에서 적합하며, 이는 발효가 진행됨에 따라 기질이 증분식으로 첨가된다는 것을 제외하고는 전형적인 배치 시스템을 포함한다. 유가식 시스템은 이화 대사 산물 억제가 세포의 대사 작용을 저해하는 경향이 있을 때 그리고 배지 중에 한정된 양의 기질이 있는 것이 바람직한 경우 유용하다. 유가식 시스템 중 실제 기질 농도의 측정은 어려우며,따라서 pH, 용존 산소 및 CO2와 같은 폐기 가스의 분압과 같은 측정가능한 인자의 변화를 기반으로 하여 계산된다.

[0088] 본 발명은 배치식으로 실시될 수 있지만, 본 방법은 연속식 발효 방법에 적용가능한 것으로 생각된다. 연속식 발효는 규정된 발효 배지가 계속하여 생물 반응기에 첨가되고, 동일한 양의 조절 배지가 프로세싱을 위하여 동시에 제거되는 개방 시스템이다. 연속식 발효에서는 일반적으로 배양물이 일정한 고밀도로 유지되는데, 여기서 세포는 주로 대수기 성장 상태에 있다.

[0089] 연속식 발효는 세포 성장 또는 최종 생성물 농도에 영향을 주는 하나의 인자 또는 임의의 개수의 인자의 조정을 허용한다. 예를 들어, 한 가지 방법은 제한 영양소, 예를 들어 탄소 공급원 또는 질소의 수준을 고정된 비율로 유지하고 모든 다른 파라미터는 조정되게 할 것이다. 다른 시스템에서, 배지 탁도로 측정되는 세포 농도는 일정하게 유지하면서 성장에 영향을 주는 많은 인자는 계속하여 변경시킬 수 있다. 연속식 시스템은 정상 상태 성장 조건을 유지하도록 노력하며, 따라서 배출되는 배지로 인한 세포 손실은 발효에서 세포 성장 속도에 대하여 균형이 맞추어져야 한다. 연속식 발효 공정에 있어서 영양소 및 성장 인자를 조정하는 방법뿐만 아니라, 생성물 형성 속도를 최대화하는 기술도 산업 미생물학 분야에서 잘 알려져 있다.

[0090] 본 발명은 배치식, 유가식 또는 연속식 공정 중 어느 하나를 이용하여 실시될 수 있다.

[0091] 상기와 같은 방법에 의해 본 발명의 재조합미생물을 이용하여 생산된 감마 아미노부틸산(GABA)은 2가지 경로에 의해 현저히 높은 수율로 수득가능하므로, GABA 생산성이 매우 향상되어 산업적으로 대량생산이 가능하게 한다.

[0092] <실시예>

[0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0094] 특히, 하기 실시예에서는 본 발명에 따른 유전자를 발현시키기 위하여 특정 발현벡터와 대장균(Escherichia coli) 숙주세포만을 예시하였으나, 다른 종류의 적절한 발현벡터와 숙주세포를 사용하는 것 역시 당업자에게 자명한 사항이라 할 것이다.

[0095] **박테리아, 균주 및 배지**

[0096] 실험에 사용한 모든 박테리아 균주 및 플라스미드를 표 1에 기재하였다.

표 1

Strain/Plasmid	Relevant genotype/property	Reference source
	Escherichia coli strains	
XLB 1	SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F'(proAB$^+$lacI^q lacZΔM15 Tn10 (tet^R))	Laboratory stock
	Plasmids	
pBad30	Amp^r & Cmp^r	New England Biolabs[a]
pBSDE	pBad30 containing SdhA::GDB-GabD::SH3-PuuE::PDZ, Cmp^r	This work
pBSDT	pBad30 containing ShdA::GDB-GabD::SH3-GabT::PDZ, Cmp^r	This work
pJD757	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:1:1, Amp^r	2
pJD758	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:1:2, Amp^r	2
pJD759	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:1:4, Amp^r	2
pJD760	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:2:1, Amp^r	2
pJD761	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:2:2, Amp^r	2
pJD762	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:2:4, Amp^r	2
pJD763	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:4:1, Amp^r	2
pJD764	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:4:2, Amp^r	2
pJD765	Containing ratio of domains GDB:SH3:PDZ is 1:4:4, Amp^r	2

[a]*New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.*

[0097]

[0098]

[0099] 모든 경우에, XL1-Blue E. coli 균주를 플라스미드 제작에 사용하였다.

[0100] E. coli 균주를, 재조합 플라스미드가 잠복해있는 형질전환체의 선별을 위해 100 μg/ml 암피실린 및/또는 30 μg/ml 클로람페니콜(chloramphenicol)이 보충된 Luria-Bertani (LB) 브로스 (10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l bacto-yeast extract, 및 5 g/l 소듐 클로라이드)에서 37℃ 및 250 rpm 하 배양하였다.

[0101] **플라스미드 제작**

[0102] GBD, SH3 및 PDZ 단백질 상호작용 도메인 (Dueber et al.,2009)으로 구성되어 있는, 9개의 스캐폴드 구조물 플라스미드를 저자 문태석 (표 1)으로부터 받아 사용하였다.

[0103] SdhA 유전자를 E. coli W3110 게놈으로부터 프라이머 SdhA_F_SacI 및 SdhA_R를 이용하여 증폭시켰다. 다음으로, GDB 리간드 서열을 GDB_FL 및 GDB_RL 프라이머를 이용하여 합성하고, SdhA 유전자 및 GDB 리간드를 SdhA_F_SacI 및 GDB-KpnI-R 프라이머로 오버랩 PCR에 의해 라이게이션하였다(표 1).

[0104] GabD-KpnI-F 및 GabD-XmaI-R프라이머를 이용하여 E. coli W3110 게놈으로부터 GabD 를 증폭시켰다. SH3 및 PZD 리간드의 서열들이 리버스 프라이머(표 1)에 부착되어 있는 GabT_XmaI_F, GabT_SbfI_R, PuuE_XmaI_F, 및 PuuE_SbfI_R 프라이머들을 이용하여 GabT 및 PuuE 유전자들을 E. coli 염색체로부터 증폭시켰다. 모든 유전자들을 클론화하고 효소의 정확한 다이제스트 위치에서 다이제스트시켰다.

[0105] 최종적으로, SdhA::GDB-GabD::SH3-GabT::PDZ; 및 SdhA::GDB-GabD::SH3-PuuE::PDZ의 2개의 결과물을 수득하고, SacI/SbfI 다중-클로닝 사이트의 마라비노스-유도능의 업스트림을 수행하는 pBad30 발현 플라스미드(New England Biolabs, Ipswich, Massachutsetts, USA)내로 서브-클론화시켰다(도 1).

[0106] 사용한 프라이머들을 이하 표 2에 기재하였다.

표 2

[0107]

올리고뉴클레오티드 프라이머	
프라이머 명	서열(5'-3')
ShdA-F-SacI	**GAGCTC**AAGAAGGAGATATACCATGAAATTGCCAGTCAGAGA
ShdA-R	CCAGAGCCAGAGCCACGCGGGTAAGTACGAATCTTCGGC
GBD-F-L	ACGCGATCATCGAAAACATGCCGCGTGGCTCTGGCTCTGGCCTGGTGGGCGCGCTGATGCATGTGATGCAGAAACGTTCTGCGATTC
GBD-R -L	AGGGATTTATCGTACAACATATCTTCATCTTCATCGCCCGCCTGATCTTCGCCTTCATCAGAAGAATGAATCGCAGAACGTTTCTGC
GDB-KpnI-R	**GGTACC**TCAATCTTCATCTTCATCGCCCG
GabD-KpnI-F	**GGTACC**AAGAAGGAGATATACCATGAAACTTAACGACAG
GabD-Xmal-R	**CCCGGG**TCAGCCCGGACGACGACGTTTCGGCGGCAGCGCCGGCGGCGGGCCAGAGCCAGAGCCAGAGCCAGAGCCTTCCAGAAGACCGATGCACATATA
PuuE-XmaI-F	**CCCGGG**AAGAAGGAGATATACCATGAGCAACAATGAATTCCATCAGCG
PuuE-SbfI-R	**CCTGCAGG**TCATCACACCAGAGATTCTTTCACGCCAGAGCCCGGCGCGCCATCGCTCAGCGCATCCTGCA
GabT-XmaI-F	CCCGGGAAGAAGGAGATATACCATGAACAGCAATAAAGAGTT
GabT-SbfI-R	**CCTGCAGG**TCATCACACCAGAGATTCTTTCACGCCAGAGCCCGGCGCGCCCTGCTTCGCCTCATCAAAAC

[0108] **GABA 전환**

[0109] 모든 재조합 균주들을 10 g/l of D-글루코스을 함유하고 암피실린 (100 μg/ml) 및 클로람페니콜 (30 μg/ml)을 가지는 LB에서 37℃, 250 rpm 하 배양하였다.

[0110] OD_{600} 값이 1.2에 도달하였을 때, 유전자 발현이 1 mM of 아라비노스 및 108 nM aTc로 유도되었고, 상기 배양은 pH 4.5로 조정되었으며, 48시간 동안 30℃ 및 250 rpm에서 배양되었다. 발효 동안, 샘플들을 빼내서 이어지는 분석을 위해 -20 ℃에 보관하였다..

[0111] **글루코스 모니터링**

[0112] Aminex HPX-87H 칼럼 (300 × 7.8 mm, Bio-rad)을 이용하여 HPLC에 의해 글루코스를 분석하였다. 샘플들을 Eppendorf 튜브에 넣고 5분동안 12,000 rpm에서 원심분리하였다

[0113] 다음으로, 1 ml 상청액을 0.2 μm 밀리포어 필터를 통해 여과하였고 RI 검출기를 이용하여 Agilent system 상에서 분석하였다. H_2SO_4 0.008N을 이용하여 유도된 샘플들의 분리를 이동상(mobile phase)으로 이루었다. 칼럼 온도를 50℃로 세팅하였다. 이동상의 유속은 0.6 ml/min였고, 샘플들은 RI 286 nm에서 검출되었다. 5개의 표준용액 : 1, 2, 3, 5, 및 10 g/l 의 글루코스 (Sigma, Missouri, USA)에 대한 동일 절차를 이용하여 글루코스에

대한 표준 곡선을 결정하였다.

[0114] **GABA 분석**

[0115] GABA 생물학적 전환(bioconversions)을 OptimaPak C18 컬럼 (4.6 x 150 mm) (RS tech Corporation, Daejeon, Korea)을 이용하여 HPLC에 의해 정량적으로 분석하였다. 샘플들을 5분동안 12,000 rpm에서 원심분리하고, 100 μl 상청액을 Eppendorf 튜브에 넣었다.

[0116] 그리고, 200 μl의 1 M 소듐 바이카보네이트 버퍼 pH 9.8, 아세토니트릴 중 100 μl의 80 g/l 단실 클로라이드 (dansyl chloride) 및 600 μl 이중-증류수를 첨가하여 1-ml 반응 혼합물을 제작하였다.

[0117] 상기 혼합물을 40분 동안 80℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 100 μl의 20 μl/ml 아세트산을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 상기 혼합물을 5분 동안 12,000 rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 0.2 μm 밀리포어 필터를 통해 여과시키고 UV 검출기를 이용하여 Agilent system 상에서 HPLC에 의해 분석하였다.

[0118] 용매(eluent) A [tetrahydrofuran/methanol/ 50 mM sodium acetate pH 6.2 (5:75:420, by vol.)] 및 용매(eluent) B (methanol)로 2진법의 비선형의 변화도(binary nonlinear gradient)를 이용하여 유도화된 샘플의 분리를 수행하였다. 상기 컬럼 온도는 30℃로 설정하였다. 용리 조건은 다음과 같다: 평형 (6 min, 20% B), 그레디언트 (20 min, 20?80% B) 및 클리닝 (3 min, 100% B).

[0119] 이동상의 유속은 1 ml/min 이고 샘플은 UV 286 nm에서 검출되었다. 8개의 표준 용액 : 0.1, 0.2, 0.3, 1, 2, 3, 5, 및 10 g/l GABA (Sigma, Missouri, USA)에 대한 동일 절차를 이용하여 GABA 에 대한 표준 곡선을 결정하였다.

[0120] **실시예 1 : 재조합 균주 제작**

[0121] 2개의 GABA 합성 경로 및 스캐폴드가 직각의 아라비노스-유도능 및 테트라사이클린-유도능 프로모터에 사용되어 독립적인 발현을 가져왔다.

[0122] 3개의 효소 SDH, SSADH, 및 GABA-AT 를 리간드 GDB, SH3, 및 PDZ 와 각각 결합시키고 p15A-기초 배지-카피 플라스미드로 클로닝하여 pBSDT 및 pBSDE를 제작하였다 (표 1).

[0123] E. coli 염색체는 글루탐산 디카르복시라아제의 2개의 생화학적으로 일치하는 동형단백질(isoforms)을 코딩하는 구별되는 유전자를 함유하고 있기 때문에, GabT 및 PuuE, 각각이 코딩하는 2개 의 동위효소(isoenzyme) 글루탐산 디카르복시라아제의 역할을 교환함으로써 2개의 시스템이 상이하게 수립된다. 스캐폴드 부분은, GDB, SH3, 및 PDZ 도메인을 결합하는 GTPase을 포함하는, ColE1-기초한 고카피(high-copy) 플라스미드 내로 클로닝되었다 (표 1).

[0124] 이러한 각 도메인은 SDH, SSADH, 및 GABA-AT 각각을 타켓팅하는데 사용되었다. 그리고, 각 SDH-SSADH-GABA-AT-발현 플라스미드를 XL1-Blue E. coli내로 도입하여 XB(pBSDT) 및 XB(pBSDE) 균주를 수득하였다

[0125] 이어서, 각 XB (pBSDT) 및 XB (pBSDE) 를, 각각 표준 프로토콜 및 9 스캐폴드 구조물 플라스미드(pJD575-pJD765)로서 컴피턴트 세포로 만들었다.

[0126] 전체적으로, GABA 합성 경로에 대한 20개의 다른 균주를 다음과 같이 명명하였다: XB(pBSDE), XB(pBSDE_57),XB(pBSDE_58), XB(pBSDE_59), XB(pBSDE_60), XB(pBSDE_61), XB(pBSDE_62),XB(pBSDE_63), XB(pBSDE_64), XB(pBSDE_65), XB(pBSDT), XB(pBSDT_57), XB(pBSDT_58), XB(pBSDT_59), XB(pBSDT_60), XB(pBSDT_61), XB(pBSDT_62),XB(pBSDT_63), XB(pBSDT_64), XB(pBSDT_65).

[0127] **실시예 2 : GABA 전환 및 검출**

[0128] 상기 20 재조합 균주로 GABA 전환의 결과들을 표 3에 요약하여 기재하였다. 3개의 효소 SDH, SSADH 및 GABA-AT이 과발현되지 않으면 GABA가 검출되지 않았다.

표 3

Strains	Plasmids		
	No	pBSDE	pBSDT
XB	0±0	0.41 ± 0.021	0.38 ± 0.018
XB(pJD757)	0±0	0.9 ± 0.025	0.68 ± 0.022
XB(pJD758)	0±0	1 ± 0.019	0.58 ± 0.001
XB(pJD759)	0±0	0.68 ± 0.016	0.73 ± 0.019
XB(pJD760)	0±0	0.67 ± 0.018	0.67 ± 0.016
XB(pJD761)	0±0	0.83 ± 0.015	0.63 ± 0.019
XB(pJD762)	0±0	0.76 ± 0.009	0.68 ± 0.019
XB(pJD763)	0±0	0.43 ± 0.017	0.54 ± 0.017
XB(pJD764)	0±0	0.49 ± 0.026	0.66 ± 0.016
XB(pJD765)	0±0	0.48 ± 0.025	0.37 ± 0.015

[0129]

[0130] 우선, 2개의 프리-스캐폴드 디바이스 균주를 대조군으로 하여 GABA 생산을 테스트하였다.

[0131] 2개의 시스템 사이에서 현저한 차이를 확인할 수 있듯이, 약 0.41 g/l GABA 이 XB(pBSDE)로, XB(pBSDT)로 0.38 g/l 생성된 이후, pBSDE 및 pBSDT는 관찰되지 않았다(표 3).

[0132] 다음으로, SDH, SSADH 및 GABA-AT이 1:1:1 비율로 함께 위치화하는 $GDB_1SH3_1PDZ_1$ 스캐폴드의 매트릭스를 가지는 균주 XB(pBSDE_57) 및 XB(pBSDT_57)가, 대조군과 비교하여 GABA 농도가 더 높이 나타났다(도 2).

[0133] 48 시간 후, XB(pBSDE_57)보다 2.2배, XB(pBSDT_57)보다 1.8배 향상된 0.9 g/l 및 0.68 g/l로 GABA 농도가 수득되었다. 이러한 결과는 두 경로를 통한 대사흐름이, 자유롭게 확산하는 대사 효소와 비교하여 다중 단백질 복합체 내로 스캐폴딩하는 것이 효과적으로 향상됨을 보여준다.

[0134] 효소들이 리간드에 의해 도메인에 위치하고 있으면, 상기 2개의 시스템 사이에 GABA 생산의 현저한 차이는 나타나지 않았다(도 3). 그리고 GABA 농도의 시간 프로파일은 재조합 균주의 활성이 48시간 후에도 유지되고 GABA 농도는 계속해서 증가함을 보여주었다 (도 3).

[0135] 이전에, 대부분의 연구들은 박테리아가 직접적으로 글루탐산 또는 모노소듐 글루탐산(MSG)을 대사하여 GABA를 형성하는, GABA 고생성 균주로부터 GabT 및 PuuE 유전자의 과발현을 통해 GABA의 합성에 초점을 맞추고 있었다.

[0136] 이러한 기작들은 , Lactobacillus sakei B2-16 중 락토바실러스 플란타럼 ATCC 14917 의 글루탐산 디카르복시라아제 과발현에 의해 70 g/l MSG로부터 수득되는 27.4 g/l GABA 또는 E. coli 균주 변이체에서 GABA-ATBC의 과발현에 의해 10 g/l MSG로부터 수득되는 5.46 g/l GABA 같이 발효 동안 수득할 수 있는 GABA의 고농도를 보여주었다.

[0137] 본 실험에서, XB(pBSDT_57) 및 XB(pBSDE_57)에 의해 생성된 세포외기질 GABA의 농도가 동시에 증가하면서, 발효 시작부터 배지 내 글루코스 농도가 일정하게 감소하였다.

[0138] 특히, 2개의 균주 XB(pBSDE_57) 및 XB(pBSDT_57)에 의해 생산된 GABA는 48시간 후 0.9 g/L 및 0.68 g/L의 최대값에 도달하였고, 반면, 48시간 후 글루코스 소비량은 각각 6.01± 0.18 g/l 및 5.74 ± 0.33 g/l였다

(도 3).

[0139] 이러한 결과들은 스캐폴드 디바이스 균주를 사용하여, GABA 전구체로서 글루탐산 또는 MSG 첨가 없이 성공적으로 글루코스로부터 GABA를 생산할 수 있음을 보여준다.

[0140] **실시예 3 : GABA 생산**

[0141] 다음으로, 스캐폴드 구조물(XB(pBSDE_58) - XB(pBSDE_65) 및 XB(pBSDT_58) - XB(pBSDT_65))의 매트릭스를 이용하여 도메인의 개수 차이가 포함되어 있는 다양한 균주를 사용하여 GABA 생산을 테스트하였다.

[0142] 모든 스캐폴드 구조물 GDBaSH3bPDZc 에서, GDB 도메인은 ratio a=1에서 안정적으로 유지되었다. SH3 및 PDZ 도메인 1, 2, 및 4 의 비율에서 각각 다양화되었다(표 1). 스캐폴드 디바이스를 포함하는 모든 균주들은 대조군 균주와 비교하여 보다 높은 GABA 합성을 보여주었지만, 수득된 스캐폴드 디바이스 사이에서 생산된 GABA는 큰 차이가 나타나지 않았다 (도 4).

[0143] 이러한 결과들은 효소의 농도가 GABA 합성에 영향을 미치지 않음을 보여준다. 즉, GABA 역가(titer)는 SH3 도메인의 수에 의존하지 않고 PDZ 도메인의 수에도 역시 의존하지 않는다.

[0144] 조합될 수 있는 SDH, SSADH 및 GABA-AT의 모듈식 부분을 제작하는 합성적 생물전략을 이용하여 고가의 GABA를 생산하였다.

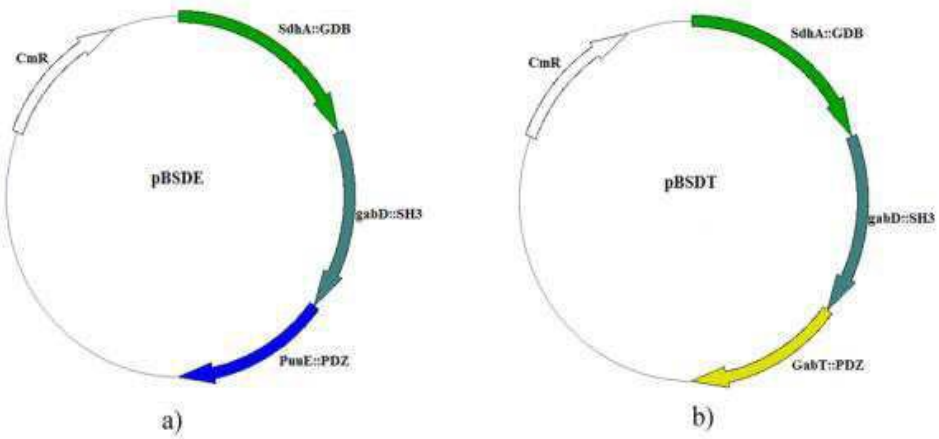
[0145]

[0146] 이와 같이, 본 발명은 합성적 스캐폴드의 후생동물 단백질 상호작용 도메인을 이용하고 기질로서 D-글루코스를 사용함으로써 GABA를 생산하는 방법을 제공한다. 특히, 각 복합체에서 효소의 수에 의존하는 상대적 생성물 역가를 바꿈으로써, 동일한 벡터로부터 발현하는 프리-스캐폴드 효소로 3배의 향상을 보여주는 1.2 g/l GABA의 최대치 역가가 관찰되었다. 또한, 효소의 농도는 GABA 형성에 큰 영향을 끼치지 않았다. 본 발명은 크게 향상된 생성능을 가지는 GABA 생산방법으로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

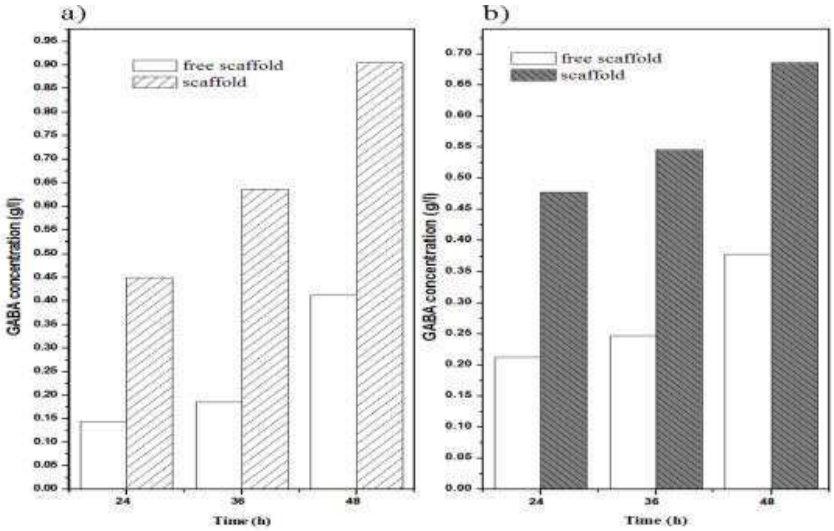
[0147] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

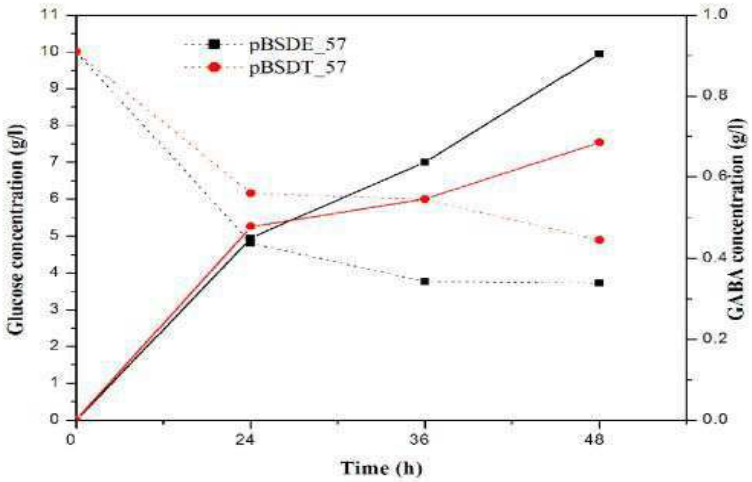
도면1



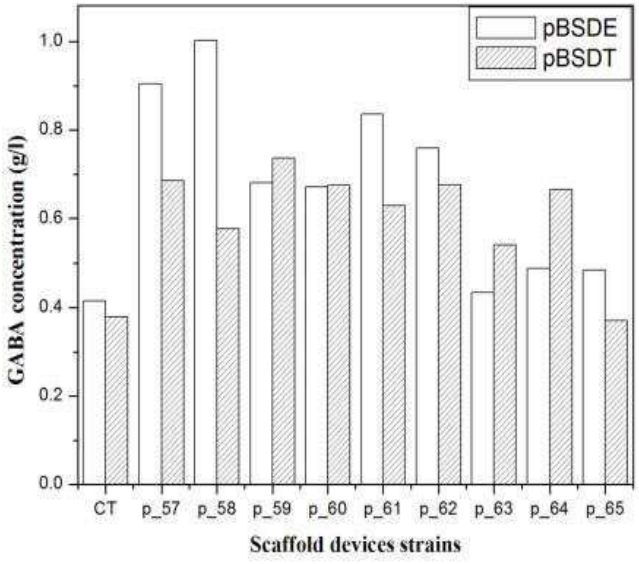
도면2


a)
b)
free scaffold
scaffold
GABA concentration (g/l)
Time (h)
24
36
48

도면3


pBSDE_57
pBSDT_57
Glucose concentration (g/l)
GABA concentration (g/l)
Time (h)

도면4


pBSDE
pBSDT
GABA concentration (g/l)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CT
p_57
p_58
p_59
p_60
p_61
p_62
p_63
p_64
p_65
Scaffold devices strains