



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109306
(43) 공개일자 2024년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/18 (2006.01) C08J 11/10 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/18 (2013.01)
C08J 11/105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0000475
(22) 출원일자 2023년01월03일
심사청구일자 2023년01월03일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조병훈
경상남도 진주시 대밭골로 92, 205동 1702호(충무
공동, 진주혁신도시 라온프라이빗 아파트)
황인성
경상남도 밀양시 수월2길 11-11(삼문동)
(74) 대리인
최규환

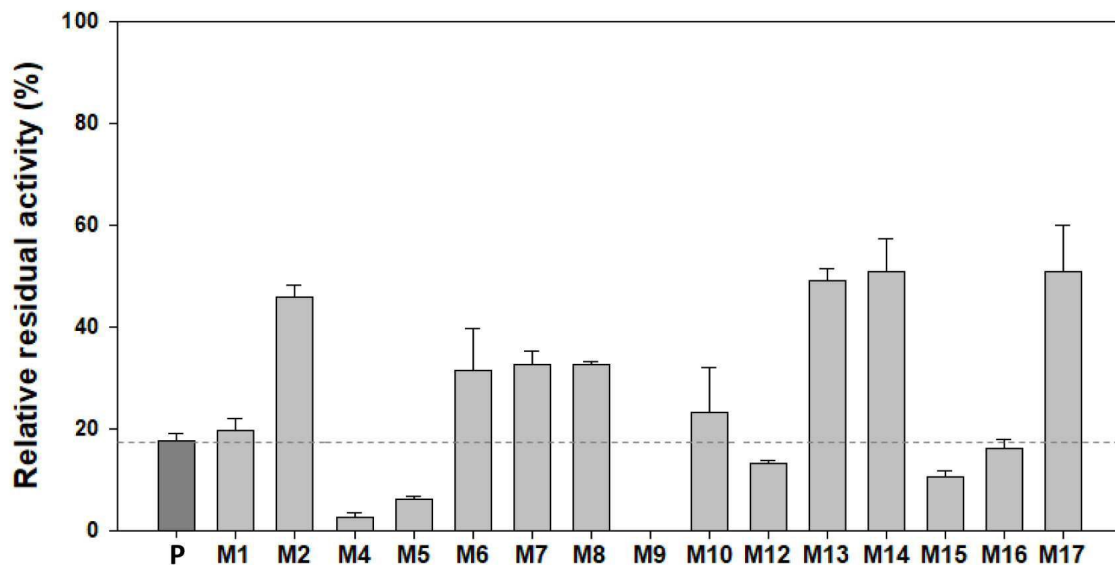
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 열 안정성이 증가된 PETase 변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 열 안정성이 증가된 PETase 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 PETase(polyethylene terephthalate hydrolase) 변이체는 고온에서 안정성이 우수하므로, 폐PET를 생분해하는데 유용하게 활용될 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12Y 301/01 (2013.01)

(72) 발명자

김가은

전라남도 순천시 삼산로 92-50, 110동 1302호(용당동, 용당피오레)

조언지

경상남도 진주시 남강로 1407, 1동 5층 E502호(하대동, 럭키강변아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711159838

과제번호 2020M3A9I5037641

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발

연구과제명 합성유전자회로 기반 PET의 생분해 생물자원 고속 탐색 및 발굴(위탁과제명: PET 분

해 효소의 고정화 기반 기술 개발)

기 여 율 2/10

과제수행기관명 한국생명공학연구원(위탁과제 수행기관: 경상국립대학교)

연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711154912

과제번호 2021R1F1A1057310

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 높은 예측 정확도를 지닌 이황화결합 엔지니어링을 통한 환경 정화용 친환경 생촉매

의 안정성 강화

기 여 율 5/10

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711156606

과제번호 2021R1A5A8029490

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터

기 여 율 3/10

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 특정 위치의 2개 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환시켜 이황화결합(disulfide bond)이 추가된 PETase (polyethylene terephthalate hydrolase) 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PETase 변이체는 서열번호 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 PETase 변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PETase 변이체에 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그(fusion tag)가 결합된 것을 특징으로 하는 PETase 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항의 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 5' 상류(upstream)에 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 GS 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 헥사히스티딘 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 9

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 PETase 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, 열 안정성이 증가된 PETase 변이체의 생산방법.

청구항 10

제9항의 생산방법에 의해 생산된, 열 안정성이 증가된 PETase 변이체.

청구항 11

서열번호 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체를 유효성분으로 포함하는 PET 분해용 조성물.

청구항 12

제11항의 PET 분해용 조성물을 PET에 처리하는 단계를 포함하는 PET 분해 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 열 안정성이 증가된 PETase 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플라스틱은 가벼움, 내구성, 저렴한 가격, 다양한 형태로의 용이한 가공성 및 비분해성과 같은 바람직한 특성으로 인해 생활에서 필수적인 재료이다. 그러나, 플라스틱을 사용하는 것의 큰 이점으로 여겨지던 비분해성으로 인해 폐플라스틱이 매립지 및 해양에 축적되어 환경 문제의 주요 원인으로 고려되고 있다. 대부분의 플라스틱은 생분해에 강하고 분해 시간이 오래 걸리기 때문에 2050년까지 플라스틱 폐기물의 양은 축적되어 330억 톤에 달할 것으로 예상된다. 따라서 플라스틱 폐기물을 줄이기 위한 많은 노력이 이루어지고 있다. 플라스틱 폐기물을 제거하고 플라스틱-기반 물질을 재활용하기 위해 당분해(glycolysis), 메탄올분해(methanolysis), 가수분해(hydrolysis), 아미노분해(aminolysis) 및 암모니아분해(ammonolysis)와 같은 다양한 화학적 분해 방법이 개발되고 있다. 그러나 이러한 방법은 일반적으로 고온 조건을 필요로 하고 종종 추가적인 환경 오염물질을 생성한다.

[0003] 플라스틱 분자구조의 핵심이 되는 탄소는 화석연료 혹은 바이오매스로부터 원료를 조달하며, 분자의 결합구조 및 성형가능성에 따라 열가소성 플라스틱과 열경화성 플라스틱으로 구분된다. 열가소성 플라스틱은 선형 혹은 가지형 구조로 결합력이 약하기 때문에 열을 가하면 분자구조가 변하면서 쉽게 변형이 가능한 반면, 열경화성 수지는 고분자 사슬이 교차하면서 그물구조를 이루기 때문에 열을 가해도 변형이 일어나지 않는다. 열가소성 플라스틱은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate, PET), 폴리에틸렌(Polyethylene), 폴리프로필렌(Polypropylene), 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리카보네이트(Polycarbonate) 등으로써 전 세계에서 생산된 플라스틱의 91%를 차지하고 있다. 섬유 및 로프용으로 사용되는 합성섬유는 대부분 폴리에스테르(Polyester)가 차지하지만, 그 외 폴리아크릴로니트릴(Polyacrylonitrile), 폴리아미드(Polyamide), 폴리프로필렌(Polypropylene) 등이 있다. 대부분의 합성섬유는 화석연료를 원료로 만들며, PET 섬유(폴리에스테르 섬유의 한 종류)의 경우에는 PET 수지로 만들고 있다. 전 세계 합성섬유 시장에서 폴리에스테르 섬유의 시장점유율이 83%를 차지하여 압도적이며, 면섬유를 대체하여 생산량이 증가하고 있다.

[0004] 기존 플라스틱의 환경오염 문제점을 해결하기 위한 대책 중 하나로 생분해성 플라스틱이 주목을 받고 있으며, 이들 생분해성 플라스틱의 분해를 더욱 촉진시킬 수 있는 미생물들에 대한 연구가 진행되고 있다. 플라스틱을 생분해할 수 있는 효소에는 PHA 분해효소(Polyhydroxyalkanoates depolymerase), PHB(Polyhydroxybutyrate) 분해효소, PLA(Poly lactic acid) 분해효소, PCL(Polycaprolactone) 분해효소, 에스테라아제(esterase), 프로테이나아제(proteinase), 큐틴 분해효소(cutinase), 우레아제(urease) 및 디하이드라타아제(dehydratase) 등이 있다. 이들 효소가 분해하는 플라스틱은 대부분 생분해성 합성수지이지만, 이데오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 균주는 합성 플라스틱 분해도 가능하다. 이데오넬라 사카이엔시스는 PET를 분해하여 에너지원 및 탄소원으로 사용할 수 있는 균주로서, 이데오넬라 사카이엔시스에서 분리된 PET 가수분해효소(PETase)가 물질에 닿으면 TPA (terephthalic acid), BHET (bis(2-hydroxyethyl)-TPA) 또는 MHET (mono-(2-hydroxyethyl)terephthalic acid)의 구조로 분해된다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제2298651호에는 이데오넬라 사카이엔시스 유래 PETase의 아미노산 서열에서 233번째 아미노산이 아스파라긴에서 시스테인으로 치환(N233C)되고, 282번째 아미노산이 세린에서 시스테인으로 치환(S282C)된 '고온에서 PET 분해 활성을 갖는 PETase 변이체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 열 안정성이 증가된 PETase 변이체 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 NEXT 태그(등록특허 10-2106773)가 결합된 이데오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 유래 PETase (polyethylene terephthalate hydrolase)의 아미

노산 서열에서 특정 위치의 2개 아미노산 잔기를 시스테인(cysteine, C)으로 치환시켜 이황화결합(disulfide bond)이 추가된 PETase 변이체를 다수 제작하였고, 상기 PETase 변이체의 일부가 모체 PETase(대조군)에 비해 고온(50℃)에서 안정성이 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 특정 위치의 2개 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환시켜 이황화결합(disulfide bond)이 추가된 PETase (polyethylene terephthalate hydrolase) 변이체를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 이데오넬라 사카이엔시스 유래 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 박터를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 박터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 박터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 PETase 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, 열 안정성이 증가된 PETase 변이체의 생산방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 생산방법에 의해 생산된, 열 안정성이 증가된 PETase 변이체를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 서열번호 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체를 유효성분으로 포함하는 PET 분해용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 PET 분해용 조성물을 PET에 처리하는 단계를 포함하는 PET 분해 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 이데오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 유래 PETase 변이체는 고온에서 안정성이 우수하므로, 대량의 PET를 완전히 생분해하는데 유용하게 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 NEXT 태그가 결합된, 이데오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*)에서 유래된 모체 PETase (polyethylene terephthalate hydrolase, P)와 본 발명의 PETase 변이체 M1(서열번호 2), M2(서열번호 3), M4(서열번호 4), M5(서열번호 5), M6(서열번호 6), M7(서열번호 7), M8(서열번호 8), M9(서열번호 9), M10(서열번호 10), M12(서열번호 11), M13(서열번호 12), M14(서열번호 13), M15(서열번호 14), M16(서열번호 15) 및 M17(서열번호 16)에 열을 가한 후 잔여활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 특정 위치의 2개 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환시켜 이황화결합(disulfide bond)이 추가된 PETase (polyethylene terephthalate hydrolase) 변이체를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 PETase 변이체는 바람직하게는 서열번호 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 PETase는 이데오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 유래 야생형 isPETase(NCBI GenBank PDB: 6EQD_A)의 N-말단에 존재하는 27개의 아미노산으로 이루어진 시그널 펩타이드(signal peptide)가 결실된 아미노산 서열에서, 132번째 아미노산인 트립토판(Tryptophan, W)이 히스티딘(Histidine, H)으로 치환되고, 211번째 아미노산인 세린(Serine, S)이 페닐알라닌(Phenylalanine, F)으로 치환된 단백질로, 본 발명에서 모체 PETase로 명명하였다. 상기 모체 PETase는 야생형 PETase에 비해 PET 분해 활성이 우수한 특징이 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2018, 115(19), E4350-E4357).
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 PETase 변이체에 있어서, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 17번째 아미노산인 글루탐산(Glutamic acid, E)이 시스테인으로, 221번째 아미노산인 알라닌(Alanine, A)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어

진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 97번째 아미노산인 세린(Serine, S)이 시스테인으로, 141번째 아미노산인 이소류신(Isoleucine, I)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 55번째 아미노산인 알라닌이 시스테인으로, 104번째 아미노산인 류신(Leucine, L)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 97번째 및 142번째 아미노산인 세린이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 54번째 아미노산인 이소류신이 시스테인으로, 128번째 아미노산인 글라이신(Glycine, G)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 150번째 아미노산인 라이신(Lysine, K)이 시스테인으로, 235번째 아미노산인 메티오닌(Methionine, M)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있고; 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 201번째 아미노산인 글루타민(Glutamine, Q)이 시스테인으로, 259번째 아미노산인 트레오닌(Threonine, T)이 시스테인으로 치환된 것일 수 있으며; 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 57번째 아미노산인 발린(Valine, V)이 시스테인으로, 100번째 아미노산인 글루타민이 시스테인으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 PETase 변이체는 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그(fusion tag)가 결합될 수 있으며, 바람직하게는 NEXT 융합 태그가 PETase 변이체의 N-말단에 결합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0023] 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 18 내지 25의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로는, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 18 내지 25의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 서열번호 18의 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 19의 염기서열은 서열번호 6의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 20의 염기서열은 서열번호 7의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 21의 염기서열은 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 22의 염기서열은 서열번호 10의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 23의 염기서열은 서열번호 12의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이고, 서열번호 24의 염기서열은 서열번호 13의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이며, 서열번호 25의 염기서열은 서열번호 16의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0025] 본 발명은 또한, 상기 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0026] 본 발명에서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 단편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0027] 본 발명에서, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0028] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는, 바람직하게는 상기 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 상류(upstream)에 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 NEXT 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 상기 NEXT 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 26의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다.

- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 NEXT 융합 태그는 한국등록특허 제2106773호에 개시된 태그로, 목적 단백질의 고유한 특성에 영향을 미치지 않으면서 목적 단백질의 발현량 및 수용성을 향상시킬 수 있는 특징이 있다.
- [0031] 본 발명의 재조합 벡터는, 바람직하게는 NEXT 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, GS 링커(GS linker: GGGGSGGGGS, 서열번호 27) 코딩 서열 및 PETase 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 순차적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다. 상기 GS 링커는 NEXT 융합 태그와 PETase를 기능적·구조적으로 분리시키기 위한 것이다. 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 재조합 단백질의 분리·정제 편의성을 위한 태그 코딩 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 태그는 His₆일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. His₆-tag는 PETase 변이체를 숙주세포에서 발현시킨 후 분리 정제를 용이하게 하기 위한 것일 뿐, 단백질의 활성에는 어떠한 영향도 미치지 않는다. 또한, 재조합 벡터 내 NEXT 융합 태그, GS 링커 및 PETase의 연결을 위한 유전자 클로닝을 위해서 단백질 활성에 영향을 주지 않는 범위 내에서 제한효소 인식서열과 이에 해당하는 아미노산을 추가할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현 또는 클로닝을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들면, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL λ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0035] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 벡터를 원핵 세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* BL21, *E. coli* JM109, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(예컨대, *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia pastoris*; *Kluyveromyces lactis*; *Kluyveromyces marxianus*; *Yarrowia lipolytica*; *Hansenula polymorpha* 등), 곤충세포(예컨대, *Spodoptera frugiperda* Sf9, Sf21, High FiveTM), 동물세포 (예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물 세포 등이 이용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한,
- [0040] 본 발명의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0041] 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 PETase 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, 열 안정성이 증가된 PETase 변이체의 생산방법을 제공한다.

- [0042] 본 발명의 PETase 변이체의 생산방법에 있어서, 상기 PETase 변이체의 범위는 전술한 것과 같다.
- [0043] 본 발명의 PETase 변이체의 생산방법에 있어서, 상기 형질전환된 숙주세포의 배양은 공지된 기술을 이용하여 목적 단백질 즉, PETase 변이체의 생산에 적합한 배지에서 이루어질 수 있다. 적합한 배양 배지는 상업적으로 입수하시거나 예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 또한, 본 발명의 PETase 변이체의 생산방법은 PETase 변이체가 발현된 숙주세포로부터 PETase 변이체를 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분리 방법은 예를 들어 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 분리된 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 투석, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하는 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.
- [0045] 본 발명은 또한, 상기 생산방법에 의해 생산된, 열 안정성이 증가된 PETase 변이체를 제공한다.
- [0046] 본 발명의 상기 PETase 변이체는 40~60℃의 고온에서 모체 PETase 단백질(서열번호 1)에 비해 안정성이 증가된 것이 특징이다.
- [0047] 본 발명은 또한, 상기 서열번호 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 PETase 변이체를 유효성분으로 포함하는 PET 분해용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 PET 분해용 조성물에 있어서, 상기 PETase 변이체는 전술한 바와 같다.
- [0048] 본 발명은 또한, 상기 PET 분해용 조성물을 PET에 처리하는 단계를 포함하는 PET 분해 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 PET 분해 방법에 있어서, 상기 PETase 변이체는 전술한 바와 같다.
- [0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 재료 및 방법

[0053] 1. 대장균 균주 및 배양 조건

[0054] 유전자 클로닝을 위해 대장균(*Escherichia coli*) TOP10 균주를 이용하였고, 제조합 단백질 발현은 *E. coli* SHuffle T7 Express 균주를 이용했다. 대장균은 LB (Luria-Bertani) 배지에서 37℃, 180 rpm 조건하에서 배양하였으며, 필요에 따라 50 µg/ml의 암피실린(ampicillin)이 첨가하였다.

[0056] 2. 변이체 설계 및 발현 벡터 제작

[0057] 야생형 PETase의 구조 정보(PDB ID: 5XJH)를 이용하여 Disulfide by Design 2(<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>) 및 Bridged(<http://biodev.cea.fr/bridged/>), SSBond(<http://hazeslab.med.ualberta.ca/forms/ssbond.html>)를 통해 이황화결합(disulfide bond) 형성이 가능한 후보 잔기쌍을 얻었다. 이들 중 Consurf (<https://consurf.tau.ac.il/>) 상에서 score가 9인 잔기, 즉 highly conserved 잔기를 포함하는 잔기쌍은 제외하였다. 또한, loop length가 25 미만인 잔기는 모두 제외하였다. 이러한 과정을 통해 최종적으로 15개의 잔기쌍 후보를 선별하였다. 상기 선별된 후보 잔기쌍 위치를 대상으로 이황화결합 변이체를 제작하기 위해, pET-NEXT-PETase 벡터(Appl. Environ. Microbiol., 2022, 88(7), 1-14)를 주형으로 하여 PCR을 통한 SDM (site directed mutagenesis)을 진행하였다. SDM PCR에 이용된 프라이머 서열과 PETase 변이체 종류는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다. NEXT 융합 태그와 PETase 변이체 사이에 유연성 있는 GS 링커가 추가적으로 연결되고, 모든 PETase의 C 말단에 His₆-tag를 가지도록 디자인되었다.

표 1

Disulfide bond 도입을 위한 SDM primer (1)

mutant	site	sequence (5'-3') (서열번호)	
M1	A199C	Forward	ATTTATGATAGCATGTCCCGCAACTGCAAAACAGTTTCTGGAAATTAACGGC (28)
		Reverse	GCCGTTAATTTCCAGAAACTGTTTGCAAGTTCGGGACATGCTATCATAAAT (29)
	N261C	Forward	GGATTTTCGCACCGCGTGCTGTTCCCTCGAGCAC (30)
		Reverse	GTGCTCGAGGGAACAGCAGCGGTGCGAAAATCC (31)
M2	E17C	Forward	CCGCCGCTCGTTGTGCGCCAGCGCGGACC (32)
		Reverse	GGTCCCGCTGCGCACAACGAGGCGGCGG (33)
	A221C	Forward	CTCTGGGAACAGCAACCAGTGCCTGATCGGAAAAAAGGGG (34)
		Reverse	CCCTTTTTCGATCAGGCACTGGTTGCTGTTCCAGAG (35)
M4	A53C	Forward	GGCGCACCGTTGGCTGCATTGCAATCGTCCCC (36)
		Reverse	GGGACGATTGCAATGCACCAACGGTGCCGCC (37)
	V122C	Forward	GCCGATTTACGGAAGTGCATATGCCCGCATGG (38)
		Reverse	CCATGCGGGCAGTATCGCACTTTCCGTAATCGGGC (39)
M5	S34C	Forward	TACCGTTAGCCGTCGCGATATGGTG (40)
		Reverse	CACCATATCCGCACGGACGGCTAACGGTA (41)
	Q106C	Forward	AGATGGCCGCGCTTCGTGCGTTGCGAGCTTGAACGG (42)
		Reverse	CCGTTCAAGCTCGCAACGCAACGAAGCGGCCATCT (43)
M6	S97C	Forward	GCCCAGCAGCCGTTGCTCGCAACAG (44)
		Reverse	CTGTTGCGAGCAACGGCTGCTGGGC (45)
	I141C	Forward	GGGGCGCGGTTCACTTTGTAGCGCCGCG (46)
		Reverse	CGCGCGCTACAAAGTGAACCGCCGCCCC (47)
M7	A55C	Forward	GCACCGTTGGCGGATTTGCATCGTCCCGGGTAC (48)
		Reverse	GTACCCGGGACGATGCAATCGCGCAACGGTGC (49)
	L104C	Forward	GCAACAGATGGCCGCTGTCGTCAAGTTGCGAGC (50)
		Reverse	GCTCGCACTTGACGACGCGGCCATCTGTTGC (51)
M8	S97C	Forward	GCCCAGCAGCCGTTGCTCGCAACAG (52)
		Reverse	CTGTTGCGAGCAACGGCTGCTGGGC (53)
	S142C	Forward	GCGCGGTTCACTTATTGCGCCGCA (54)
		Reverse	TCGCGGCGCAATAAGTGAACCGCCGC (55)
M9	Y42C	Forward	GTGCAGGACCGTCGTACCCAACCAATGC (56)
		Reverse	GCATTGGTTGGGTAACAGACGGTCCCTGCAC (57)
	V81C	Forward	AGCTAGCCACGGCTTGTGTATTACCATCGATACGAAC (58)
		Reverse	GTTCTATCGATGGTAATACACAAAGCGTGGCTAGCT (59)

밑줄: 변이 위치(Cys codon)

[0058]

표 2

Disulfide bond 도입을 위한 SDM primer (2)

mutant	site	sequence (5'-3') (서열번호)	
M10	I54C	Forward	GCACCGTGGCGCGTGTGCAATCGTCCCG (60)
		Reverse	CGGGGACGATTGCACACGCGCCAACGGTGC (61)
	G128C	Forward	ATACTGCCCCGATGTGTGTGATGGGCCAC (62)
		Reverse	GTGGCCCATCACACATGCGGGCAGTAT (63)
M12	G128C	Forward	ATACTGCCCCGATGTGTGTGATGGGCCAC (64)
		Reverse	GTGGCCCATCACACATGCGGGCAGTAT (65)
	M235C	Forward	GTTGCATGGATGAAACGATTCTGCGATAATGACCCGCTACTCA (66)
		Reverse	TGAGTAGCGGTGTCATTATCGCAGAATCGTTTCATCCATGCAAC (67)
M13	K150C	Forward	GCCGCGAACAACCGAGTTTATGCGCAGCGGCACC (68)
		Reverse	GGTGCCGTGCGCATAACTCGGGTTGTGCGCGC (69)
	M235C	Forward	GTTGCATGGATGAAACGATTCTGCGATAATGACCCGCTACTCA (70)
		Reverse	TGAGTAGCGGTGTCATTATCGCAGAATCGTTTCATCCATGCAAC (71)
M14	Q201C	Forward	GCATGTCCCGCAACGCAAAATGCTTTCTGGAATTAACGGCGG (72)
		Reverse	CCGCCGTTAATTTCCAGAAAGCATTTTGCGTTCGGGACATGC (73)
	T259C	Forward	CGTGTGCGATTTCGCTGCGCGAACTGTCCCTC (74)
		Reverse	GAGGGAACAGTTCGCGCAGCGAAAATCCGACACG (75)
M15	A55C	Forward	GCACCGTTGGCGCGATTTCATCGTCCCGGGTAC (76)
		Reverse	GTACCCGGGACGATGCAATCGCGCCAACGGTGC (77)
	Q100C	Forward	CCAGCAGCGTAGCTCGCAATGCATGCGCGCGCT (78)
		Reverse	AGCGCGCCATGCATTGCGAGCTACGGCTGCTGG (79)
M16	I56C	Forward	ACCGTTGGCGCGATTGCAATGCGTCCCGGG (80)
		Reverse	CCCGGGACGCATGCAATCGCGCCAACGGT (81)
	M130C	Forward	GCCCGCATGGGTGTGTGCGGCCACTCAATGGGG (82)
		Reverse	CCCCATTGAGTGGCCGCACACCCATGCGGGC (83)
M17	V57C	Forward	CGTTGGCGGATTGCAATCTGCCCGGGTACAC (84)
		Reverse	GTGTACCCGGGCAGATTGCAATCGCGCCAACG (85)
	Q100C	Forward	CCAGCAGCGTAGCTCGCAATGCATGCGCGCGCT (86)
		Reverse	AGCGCGCCATGCATTGCGAGCTACGGCTGCTGG (87)

밑줄: 변이 위치(Cys codon)

[0059]

[0061]

3. 단백질 발현

[0062]

제조합 *E. coli* Shuffle T7 Express 균주를 암피실린이 첨가된 LB 배지에서 37℃, 180 rpm 조건으로 배양하였다. 세포의 농도가 OD₆₀₀ = 0.6~0.8에 도달하였을 때 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 이후 25℃, 180 rpm에서 20시간 추가 배양하였다. 이후 배양액을 4℃, 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하였다.

[0064]

4. 세포 분획

[0065]

회수된 세포는 35 mL의 용해 버퍼(lysis buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 재현탁하였다. 상기 부유된 세포들은 차가운 상태(ice-water)에서 초음파 처리(ultrasonication)를 통해 파쇄하였고, 파쇄액을 4℃, 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 수용성 분획물(soluble fraction, S)로 명명하였다.

[0067]

5. 단백질 정제

[0068] 수용성 분획물은 Ni-NTA agarose bead(Qiagen)와 혼합한 후 30분 동안 차가운 상태에서 반응시켰다. 이후 혼합물을 정제용 컬럼에 넣어 비드는 컬럼에 남겼고 나머지 과채액은 흘려보냈다. 그 다음, 비드 부피의 30배 정도의 세척 버퍼(wash buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 세척 과정을 진행한 후 용출 버퍼(elution buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 비드에 붙은 단백질을 용출하여 순수 분리하였다. 이후 정제된 단백질을 Dialysis Tubing(Spectra/Por[®])에 담아 투석 버퍼(dialysis buffer; 20 mM sodium phosphate, pH 7.5)를 이용하여 투석 과정을 수행함으로써 최종적으로 테스트에 사용할 효소를 획득하였다.

[0070] 6. 단백질 정량

[0071] 투석을 마친 정제된 단백질을 변성 버퍼(denaturation buffer; 8 M GuHCl/20 mM sodium phosphate, pH 7.5)와 1:3의 부피비로 혼합하고 가열하여 변성시킨 후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도와 단백질 아미노산 서열을 통해 계산된 흡광 계수(extinction coefficient)와 비교하여 단백질의 농도를 계산하였다. 흡광 계수의 계산은 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 수행하였다.

[0073] 7. 효소의 활성 및 안정성 측정

[0074] 효소의 활성 측정은 분광기(spectrophotometer)를 이용한 에스테라아제 어세이를 이용하였다. 25℃로 맞춰진 분광기에 일회용 큐벳을 꽂고, 상온에서 준비된 투석 버퍼 800 μ l와 차가운 상태에서 준비된 효소 샘플 100 μ l를 넣어 잘 섞어주었다. 이후 차가운 상태에서 준비된 30 mM p-NPA (paranitrophenyl acetate) 100 μ l를 첨가하고 405 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 자연적인 p-NPA의 분해 속도(blank)를 측정하기 위해 효소 샘플 대신 차가운 상태에 준비된 투석 버퍼를 이용하였다. 효소 활성은 각 샘플의 흡광도 변화 속도에서 blank의 흡광도 변화 속도를 뺀 값으로 계산하였다.

[0075] 또한, 효소의 안정성 측정을 위해 동일한 농도로 맞춘 효소 샘플들을 50℃에서 1시간 동안 가열한 후, 즉시 얼음에 넣어 차갑게 유지했다. 이들의 활성을 곧바로 측정하고, 열처리하지 않은 샘플의 활성과 비교하여 하기와 같은 계산식을 이용하여 상대 잔여 활성(Residual activity %)을 구하였다.

$$\text{Residual activity (\%)} = \frac{\text{Activity of heat treated sample}}{\text{Activity of untreated sample}} \times 100$$

[0078] 실시예 1. PETase 변이체의 열 안정성 분석

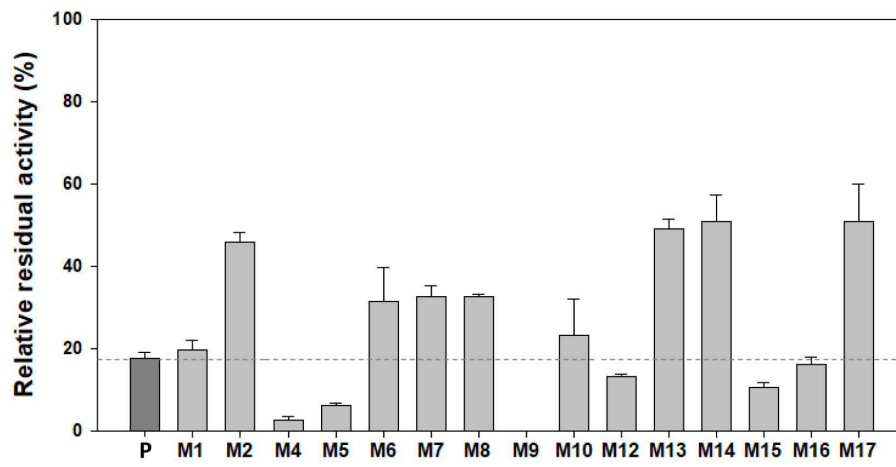
[0079] 본 발명에서는 모체 PETase(대조군)의 아미노산 서열(서열번호 1)에서 특정 위치의 아미노산 잔기가 시스테인으로 치환된 PETase 변이체 M1(A199C, N261C; 서열번호 2), M2(E17C, A221C; 서열번호 3), M4(A53C, V122C; 서열번호 4), M5(S34C, Q106C; 서열번호 5), M6(S97C, I141C; 서열번호 6), M7(A55C, L104C; 서열번호 7), M8(S97C, S142C; 서열번호 8), M9(Y42C, V81C; 서열번호 9), M10(I54C, G128C; 서열번호 10), M12(G128C, M235C; 서열번호 11), M13(K150C, M235C; 서열번호 12), M14(Q201C, T259C; 서열번호 13), M15(A55C, Q100C; 서열번호 14), M16(I56C, M130C; 서열번호 15) 및 M17(V57C, Q100C; 서열번호 16)를 제작하였다.

[0080] 그 다음, NEXT 태그가 결합된 모체 PETase(이하, NEXT-PETase)와 NEXT 태그가 결합된 PETase 변이체(이하, NEXT-PETase var)를 50℃에서 1시간 동안 가열한 후 잔여활성을 측정한 결과, NEXT-PETase의 잔여활성은 17.5% 이고, NEXT-PETase var M1, M2, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M12, M13, M14, M15, M16 및 M17의 잔여활성은 각각 19.6%, 45.9%, 2.6%, 6.3%, 31.4%, 32.8%, 32.6%, 0.0%, 23.3%, 13.1%, 49.2%, 50.9%, 10.7%, 16.2%, 51.0%로, 모체 NEXT-PETase에 비해 NEXT-PETase var M2, M6, M7, M8, M10, M13, M14 및 M17의 잔여활성이 증가하였고, 나머지 NEXT-PETase var M1, M4, M5, M9, M12, M15 및 M16은 NEXT-PETase와 열 안정성이 유사하거나 오히려 감소된 것을 확인하였다(도 1).

[0081] 상기 결과를 통해, 본 발명의 PETase 변이체 M2, M6, M7, M8, M10, M13, M14 및 M17은 열 안정성이 우수한 PETase 변이체임을 알 수 있었다.

도면

도면1



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.