

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0149318

(43) 공개일자 2022년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) C12P 7/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/0073 (2013.01)

C07K 14/47 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0056793

(22) 출원일자 2021년04월30일

심사청구일자 2021년04월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이지원

서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)

유연화

서울특별시 은평구 서오릉로20길 4-2, 102호(갈현동, 스위트빌)

최유빈

경기도 파주시 한울로 100, 609동 2701호(동패동, 한울마을 6단지)

(74) 대리인

특허법인리체

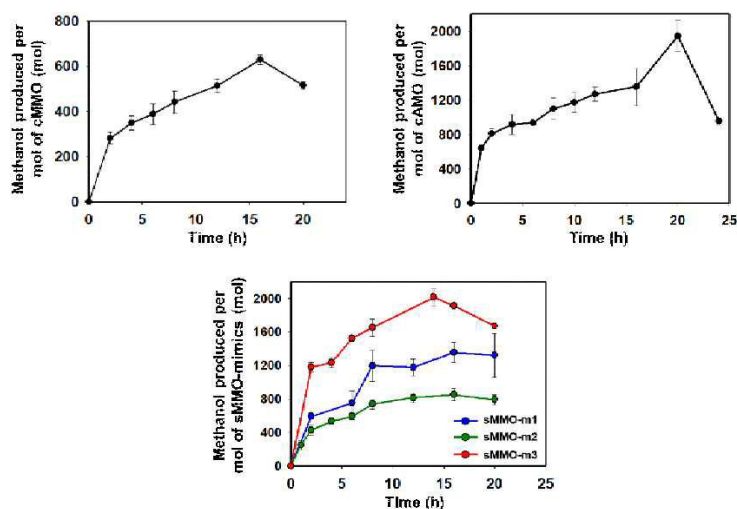
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 메탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질

(57) 요약

본 발명은 메탄산화 활성 도메인; 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단백질체가 자기 조립된 단백질에 관한 것으로서, 생체 내 NADH를 환원제로 사용하여 메탄을 산화시킬 수 있으므로, 별도의 환원제 사용 없이도 메탄을 메탄올로 산화시킬 수 있는 단백질, 이를 발현하는 미생물, 이를 활용한 메탄을 제조용 조성물, 메탄을 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12N 9/0071 (2013.01)

C12P 7/04 (2013.01)

C12Y 114/13025 (2013.01)

C12Y 114/18003 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711126652
과제번호	2020M3D3A1A01080557
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	메탄산화효소 기능성 기반의 실용적 생물전환 기술 및 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메탄산화 활성 도메인 및 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 pmoB1(Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1), MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase) 또는 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1)인 단백질.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 pmoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, MMOH는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 amoB1은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 단백질.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 메탄산화 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것인 단백질.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 MMOB(Methane monooxygenase regulatory protein B)가 더 융합된 것인 단백질.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOB는 MMOH가 융합된 페리틴 단량체에 융합된 것인 단백질.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOH 및 상기 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 MMOB가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 인간 페리틴 중쇄 단량체인 단백질.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 각 도메인은 페리틴 단량체의 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것인 단백질.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질을 발현하는 미생물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자, 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 것인 미생물.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것인 미생물.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.

청구항 19

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질 또는 청구항 15 내지 18 중 어느 한 항의 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물.

청구항 20

청구항 19의 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄 산화 활성을 갖는 신규 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 메탄산화세균(methanotrophs) 유래의 메탄산화효소(Methane monooxygenase, MMO)는 상온 상압의 온화한 조건에서 메탄가스를 포함한 다양한 탄화수소(C1-C8)의 산화 반응을 촉매하여 고부가가치의 산물을 생산할 수 있는 매우 유용한 바이오촉매로서 이를 활용하는 바이오공정 개발에 세계적인 관심이 집중되고 있다.

[0004] 또한, 유사 계열 효소로 Nitrosomonas europaea 유래의 암모니아산화효소(Ammonia monooxygenase, AMO)등이 메탄산화효소와 비슷한 기작으로 넓은 범위의 탄화수소(C1 - C10 사슬형/할로겐화 탄화수소, 단/다고리형 방향족 탄화수소)에 대해 산화반응을 촉매할 수 있는 유용한 바이오 촉매이나 현재까지 3D 구조, 활성 도메인의 규명, 반응 메커니즘, 기질 특이성 등에 대한 기초 연구가 매우 미비하다.

[0005] 현재 메탄가스의 화학 공정에 의한 메탄올 생산은 단계가 복잡하고 부산물(이산화탄소, syngas 등)에 의한 환경 오염 유발, 낮은 반응 전환율, 고온, 고압의 반응 조건으로 인한 고에너지 소비 등, 기술적, 환경적, 경제적 측면의 많은 문제점을 안고 있다. 또한, 메탄가스는 고가의 수송, 저장 비용에 기인하는 경제성 저하 및 유출 시 심각한 온실효과 유발 등의 문제로 인해 현지 가스전에 쉽게 연계될 수 있는 소규모 바이오 플랜트를 이용한 메탄올 생산이 기술적, 경제적 측면에서 매우 유리하다.

[0006] 바이오 공정의 개발 노력으로 메탄올 외 다른 고부가산물 생산을 위한 메탄산화세균의 대사공학적 균주 개량이 시도되고 있으나 유전공학적 도구 활용의 한계, 균주의 난배양성으로 인한 어려움 등이 있으며 메탄산화효소의 대량생산을 위해 산업용 균주를 이용한 이중 발현은 수용성 단백질의 발현이 어렵고 효소 복합체의 정밀한 상호작용이 요구되는 등의 높은 기술적 난이도로 산업적 활용의 성공사례가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 우수한 메탄 산화능을 갖는 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 상기 단백질을 발현하는 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 상기 단백질 또는 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 상기 단백질을 또는 미생물을 이용한 메탄올 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 1. 메탄산화 활성 도메인 및 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질.
- [0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 pmoB1(Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1), MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase) 또는 amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1)인 단백질.
- [0015] 3. 위 2에 있어서, 상기 pmoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, MMOH는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0016] 4. 위 2에 있어서, 상기 amoB1은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0017] 5. 위 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 단백질.
- [0018] 6. 위 1에 있어서, 상기 전자 전달 도메인은 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0019] 7. 위 1에 있어서, 메탄산화 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것인 단백질.
- [0020] 8. 위 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 MMOB(Methane monooxygenase regulatory protein B)가 더 융합된 것인 단백질.
- [0021] 9. 위 8에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0022] 10. 위 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOB는 MMOH가 융합된 페리틴 단량체에 융합된 것인 단백질.
- [0023] 11. 위 8에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인은 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)이고, 상기 MMOH 및 상기 전자 전달 도메인이 융합된 페리틴 단량체 및 MMOB가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 단백질.
- [0024] 12. 위 11에 있어서, 상기 MMOB는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 것인 단백질.
- [0025] 13. 위 1에 있어서, 상기 페리틴 단량체는 인간 페리틴 중쇄 단량체인 단백질.
- [0026] 14. 위 1에 있어서, 상기 각 도메인은 페리틴 단량체의 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것인 단백질.
- [0027] 15. 위 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질을 발현하는 미생물.
- [0028] 16. 위 15에 있어서, 상기 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입된 것인 미생물.
- [0029] 17. 위 16에 있어서, 상기 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것인 미생물.
- [0030] 18. 위 15에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 미생물.
- [0031] 19. 위 1 내지 14 중 어느 한 항의 단백질 또는 청구항 15 내지 18 중 어느 한 항의 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물.
- [0032] 20. 위 19의 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법.

발명의 효과

- [0034] 본 발명의 단백질은 메탄 산화 활성을 가지며, 생체 내의 NADH를 메탄 산화에 필요한 환원제로서 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 단백질을 활용한 in vivo 메탄을 제조시에, 별도의 환원제 도입이 불필요하다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 각 실시예에서 사용된 벡터의 개략도이다.

도 2는 각 실시예에서 제조된 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 나타낸 것이다.

도 3은 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질이 자기조립체를 형성함을 확인한 것이다.

도 4 내지 6은 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-m3를 포함하는 재조합 단백질의 Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS), EPR 및 XANES 분석 결과이다.

도 7은 실시예에서 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

도 8은 실시예에서 제조된 sMMO-m3의 ¹³C-메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

도 9는 메탄산화 활성 도메인 및 [2Fe-2S]과 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자전달 도메인이 융합된 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

도 10은 cMMO, cAMO, sMMO-m3 단백질을 발현하는 대장균의 메탄 가스 산화 활성을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0040] 본 발명은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 및 전자 전달 활성을 나타낼 수 있다.

[0042] 메탄은 하기 수학적 1의 반응에 따라 산화되어 메탄올이 형성될 수 있는데, 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 것으로서, 환원제인 NADH를 이용하여 메탄 산화 반응을 수행할 수 있으며, 특히, in vivo에서 반응 진행시에 체내의 NADH를 활용할 수 있다. 이에, 별도의 환원제의 사용이 불필요하다.

[0043] [수학적 1]

[0044] $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$

[0045] 메탄산화 활성 도메인은 메탄을 산화시키는 활성을 갖는 도메인으로서, 메탄산화 효소에서의 활성 부위를 포함하는 도메인이거나, 메탄 산화 효소 유래가 아니더라도, 서열 또는 구조적 유사성 등에 의해 메탄 산화능을 가지는 효소의 활성 부위를 포함하는 도메인이라면 모두 사용 가능하다.

[0046] 본 발명에서 메탄산화 활성 도메인으로는 예를 들면 pmoB1(Particulate methane monooxygenase alpha subunit_domain 1), MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase), amoB1(Ammonia monooxygenase beta subunit_domain 1) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. MMOH는 MMOH α일 수 있다. 보다 구체적인 예를 들면, pmoB1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다. MMOH는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다. amoB1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.

[0047] 전자 전달 도메인은 예를 들면 FAD(flavin adenine dinucleotide) 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0048] FAD 결합 도메인은 sMMO(soluble MMO(Methane monooxygenase)) 유래일 수 있고, 구체적으로는 그 구성요소 중 하나인 MMOR의 FAD 결합 도메인(MMOR_F)일 수 있다.

- [0049] 전자 전달 도메인은 FAD 결합 도메인을 포함할 수 있고, 이는 FAD 결합 도메인만으로 이루어진 것일 수도 있고, MMOH에서 FAD 결합 도메인 외에 추가 부분을 더 포함할 수도 있고, FAD 결합 도메인 외에 2Fe-2S 도메인의 적어도 일부를 더 포함할 수 있으며, FAD 결합 도메인 및 2Fe-2S 도메인을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 전자 전달 도메인은 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질로서, 상기 각 도메인은 1개의 페리틴 단량체 내에 모두 융합된 것일 수도 있고, 각 페리틴 단량체에 각각 융합된 것일 수도 있고, 이들이 혼합된 것일 수도 있다.
- [0051] 즉, 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인이 융합된 페리틴 단량체; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것일 수도 있고, 이들 도메인 모두가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것일 수도 있고, 이들 도메인 모두가 융합된 페리틴 단량체 및 각 도메인 중 하나가 융합된 페리틴 단량체가 자기조립된 것일 수도 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 페리틴 단량체는 MMOB(Methane monooxygenase regulatory protein B)가 더 융합된 것일 수 있다.
- [0053] MMOB는 sMMO의 구성 성분인 MMOB일 수 있고, 예를 들면 MMOB는 서열번호 7의 아미노산 서열 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 예를 들면, MMOB는 메탄산화 활성 도메인인 MMOH(Soluble methane monooxygenase hydroxylase)과 함께 사용될 수 있다. 이 경우의 구체적인 예를 들자면, MMOH, MMOB, 전자 전달 도메인이 1개의 페리틴 단량체에 융합될 수도 있고, 2개의 페리틴 단량체에 나누어서 융합될 수도 있다. 2개의 페리틴 단량체로 나누어지는 경우, MMOH와 MMOB가 1개의 페리틴 단량체에 융합되고, 전자 전달 도메인이 나머지 페리틴 단량체에 융합될 수도 있고, MMOH와 전자 전달 도메인이 1개의 페리틴 단량체에 융합되고, MMOB가 나머지 페리틴 단량체에 융합될 수도 있다.
- [0055] 본 발명의 단백질은 메탄산화 활성 도메인; 및 전자 전달 도메인;이 융합된 페리틴 단량체가 자기 조립된 단백질로서, 페리틴 단량체로는 다양한 생물 유래 페리틴을 사용할 수 있고, 척추 동물의 경우 중쇄 또는 경쇄 단량체를 사용할 수 있다. 예를 들면 인간 페리틴 중쇄를 사용할 수 있다.
- [0056] 페리틴 단량체에서 자가조립된 단백질에서 그 기능을 할 수 있는 것이라면 각 도메인의 결합 위치는 제한되지 않으며, 예를 들면 α -헬릭스 내부, 인접한 α -헬릭스들 사이, N-말단, C-말단, A-B루프, B-C루프, C-D루프, D-E루프, N-말단과 A 헬릭스 사이 및 E 헬릭스와 C-말단 사이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 곳에 융합된 것일 수 있고, 단백질에서 외부에 표출되어 그 기능을 용이하게 발휘한다는 측면에서 바람직하게는 C-말단에 융합된 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 단백질에서, 페리틴 단량체와 각 도메인의 사이에는 링커가 더 포함될 수 있다.
- [0058] 링커로는 당 분야에 공지된 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면 S1(G3SG3TG3SG3), S2(GKLGGG) 등을 사용할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 단백질은 예를 들면 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자, 및 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 생물체에 형질전환시켜 그 생물체로부터 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 단백질은 미생물 내에서 soluble form으로의 발현율이 높아, 생합성시의 제조 수율이 높다.
- [0062] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 발현하는 미생물에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명의 미생물은 페리틴 단량체를 코딩하는 유전자, 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자, 및 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입되어, 상기 단백질을 발현하는 것일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 단백질에서 각 도메인은 1개의 페리틴 단량체 내에 모두 융합된 것일 수도 있고, 각 페리틴 단량체에 각각 융합된 것일 수도 있고, 이들이 혼합된 것일 수도 있는 바, 상기 메탄산화 활성 도메인을 코딩하는 유전자 및 전자 전달 도메인을 코딩하는 유전자는 1개의 벡터에 포함되거나, 2개의 벡터에 각각 포함된 것일 수 있다.
- [0065] 벡터로는 당 분야에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있고, 예를 들면 들어 BLUESCRIPT 벡터(Stratagene), T7 발현 벡터(Invitrogen), pET 벡터(Novagen) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0066] 벡터는 단백질 발현을 위한 프로모터, 분리/정제를 위한 태그, 형질전환 마커 등 당 분야에 공지된 추가 구성요소를 더 포함할 수 있다.
- [0067] 미생물은 상기 벡터가 도입되어 상기 단백질을 발현할 수 있는 것이라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 대장균을 사용할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 미생물은 상기 단백질을 발현하므로, 메탄의 산화에 의해 메탄올을 제조하는데 활용될 수 있다. 본 발명의 미생물 사용시에 메탄올 생성을 위한 별도의 환원제의 첨가가 불필요하다.
- [0070] 또한, 본 발명은 전술한 단백질 또는 전술한 미생물을 포함하는 메탄올 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [0071] 전술한 단백질은 메탄 산화 및 전자 전달 활성을 가지는 것이고, 전술한 미생물은 상기 단백질을 발현하는 것이므로, 본 발명의 조성물은 이를 포함하여 메탄을 산화시켜 메탄올을 제조할 수 있다.
- [0072] 메탄 제조는 상기 조성물에 메탄 가스를 처리하여 수행될 수 있고, 상기 단백질의 사용시에는 추가 환원제를 처리해야 하고, 상기 미생물의 사용시에는 환원제의 사용이 불필요하다. 추가 환원제로는 NADH를 더 포함할 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명은 전술한 조성물을 메탄 가스와 반응시키는 단계를 포함하는 메탄올 제조 방법에 관한 것이다.
- [0075] 본 발명에 따른 조성물을 메탄 가스와 반응시켜 메탄이 산화됨에 따라 메탄올이 제조될 수 있고, 이는 전술한 조성물에 메탄 가스를 주입시키고 효소 반응을 진행시킴으로써 수행될 수 있다.
- [0076] 메탄올 제조 조건은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 전술한 단백질 또는 미생물이 적정 활성을 나타내는 온도, pH 등의 조건에서 수행될 수 있다.
- [0078] **실시예**
- [0079] **1. 단백질 생합성을 위한 발현 벡터 제조**
- [0080] 하기 표 1에 기재된 벡터 모식도에 따라 PCR을 통하여 chimeric MMO (pMMO(pmoB1) + sMMO(MMOR_F)), chimeric AMO (AMO(amoB1) + sMMO(MMOR_F)), sMMO-mimics (sMMO-m1 ~ sMMO-m3), cMMO(Full reductase, FR)(pMMO(pmoB1) + sMMO(MMOR)), cAMO(FR)(AMO(amoB1) + sMMO(MMOR)), sMMO-m2(FR)를 제작하였다. 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 겔에서 정제한 다음, 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.
- [0081] 이렇게 만들어진 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7, pET28a 발현용 벡터에 삽입하여 각각의 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다.
- [0082] 각각의 단백질들의 발현용 벡터들은 pT7-cMMO-B1, pET28a-cMMO-B2, pT7-cAMO-B1, pET28a-cAMO-B2, pT7-sMMO-m1-B1, pET28a-sMMO-m1-B2, pT7-sMMO-m2-B1, pET28a-sMMO-m2-B2, pT7-sMMO-m3-B1, pET28a-sMMO-m3-B2, pT7-cMMO(FR)-B1, pET28a-cMMO(FR)-B2, pT7-cAMO(FR)-B1, pET28a-cAMO(FR)-B2, pT7-sMMO-m2(FR)-B1, pET28a-sMMO-m2(FR)-B2로 진행하였다. (도 1)

표 1

재조합 단백질	발현 벡터
cMMO	1. $NH_2-NdeI-H_6-huHF-S_1(G_3SG_3TG_3SG_3)-BamHI-pmoB1(H33-T172)-HindIII-COOH$ 2. $NH_2-NdeI-huHF-S_1-BamHI-MMOR_F(C99-A348)-HindIII-COOH$
cAMO	1. $NH_2-NdeI-H_6-huHF-S_1-BamHI-amoB1(H38-L177)-HindIII-COOH$. $NH_2-NdeI-huHF-S_1-BamHI-MMOR_F-HindIII-COOH$
sMMO-m1	1. $NH_2-NdeI-H_6-huHF-S_1-XhoI-MMOH_a(A64-L321)-BamHI-MMOB-HindIII-COOH$. $NH_2-NdeI-huHF-S_1-BamHI-MMOR_F-HindIII-COOH$

sMMO-m2	1. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-MMOH _α (V93-K295)-HindIII-COOH2. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR _F -HindIII-COOH
sMMO-m3	1. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -XhoI-MMOR _F -BamHI-MMOH _α (A64-L321)-HindIII-COOH2. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOB(retro)-HindIII-COOH
cMMO (FR)	1. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-pmoB1-HindIII-COOH 2. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR-HindIII-COOH
cAMO(FR)	1. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-amoB1-HindIII-COOH 2. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR-HindIII-COOH
sMMO-m2 (FR)	1. NH_2 -NdeI-H ₆ -huHF-S ₁ -BamHI-MMOH _α (V93-K295)-HindIII-COOH 2. NH_2 -NdeI-huHF-S ₁ -BamHI-MMOR-HindIII-COOH

[0085] 사용된 각 단백질의 아미노산 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

도메인	서열	서열 번호
pmoB1 (33-172)	HGEKSQAAMRMRTIHWDLSWSKEKVKINETVEIKGKFHVFEWGPETVDEPDVAFLNVGMPGPVFIKESYI GGQLVPRSVRLIEGKTYDFRVVLKARRPGDWHVHTMMNVQGGPIIGPGKWITVEGSMSEFRNPVTT	1
MMOH _α (64-321)	AKEYARMEAVKDERQFGSLQDALTRLNAGVRVHPKWNETMKVVSNNFLEVGEYNAIAATGMLWDSAAAEQKNG YLAQVLDEIRHTHQCAVYNYFAKNGQDPAGHNDARRTRTIGPLWKGMRVFSDFISGDAVECSLNLQVGE ACFTNPLIVAVTEWAAAANGDEITPTVFLSIETDELHRMANGYQTVVSIANDPASAKYLNTDLNNAFWTQQKYF TPVLGMLFEYGSKFKEPVPVKTWDRWYEDWGGIWIIGRL	2
MMOH _α (93-295)	VRVHPKWNETMKVVSNNFLEVGEYNAIAATGMLWDSAAAEQKNGYLAQVLDEIRHTHQCAVYNYFAKNGQDP AGHNDARRTRTIGPLWKGMRVFSDFISGDAVECSLNLQVGEACFTNPLIVAVTEWAAAANGDEITPTVFLS IETDELHRMANGYQTVVSIANDPASAKYLNTDLNNAFWTQQKYFTPVLGMLFEYGSK	3
amoB1 (38-177)	HGERSQEPFLRMRTVQWYDIKWGPEVTKVNENAKITGKFHLAEDWPRAAAQPDFSFFNVGSPSPVFVRLSTKI NGHPWFISGPLQIGRDYEFVNLRLRIPGRHHMHAMLVKDGAPIAGPGAWMNTGSWDDFTNPLKL	4
MMOR _F (99-348)	CRI SFGEVGSFEAEVVGLNWSVNTVQFLLQKRPDECNGRGVKFEPGQFMDLTIPGTDVSRYSYPANLPNPEG RLEFLIRVLPEGRFSDYLRNDARVGQVLSVGKPLGVFGLKERGMAPRYFVAGGTGLAPVSMVRQMGEWTAPN ETRIYFGVNTEPELFYIDELKSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEQEQQSPIDALREDLESSDANPDIYLCGPP GMIDAACELVRSRGIPGEQVFFFEKFLPSGAA	5
MMOR(FR)	MQRVHTITAVTEDGESLRFECRSEDVITAAALRQNI FLMSCREGGCATCKALCSEG DYDLKGCSVQALPPEE EEGLVLLCRTYPKTDLEIELPYTHCRI SFGEVGSFEAEVVGLNWSVNTVQFLLQKRPDECNGRGVKFEPGQ FMDLTIPGTDVSRYSYPANLPNPEGRLEFLIRVLPEGRFSDYLRNDARVGQVLSVGKPLGVFGLKERGMAPRY FVAGGTGLAPVSMVRQMGEWTAPNETRIYFGVNTEPELFYIDELKSLERSMRNLTVKACVWHPSGDWEQEQQ SPIDALREDLESSDANPDIYLCGPPGMIDAACELVRSRGIPGEQVFFFEKFLPSGAA	6
MMOB	SVNSNAYDAGIMGLKGKDFADQFFADENQVHESD TVVLVLKKSDEINTFIEEILLTDYKKNVNPTVNVEDRA GYWWIKANGKIEVDCDEISELLGRQFNVDFLVDVSVSTIGRAYTLGNKFTITSELMGLDRKLEDYHA	7
MMOB (retro)	AHYDELKRD LGMLESTITFKNGLTYARGITSSVDVLF DYVNFQRGLLESIEDCDVEIKGNAKIWWYGARDEVN VTPNVNKKYDTLLIEEIFTNIEDSKKLVLVTDSEHVQVQNE DAFFQDAFDKGLGMIGADYANSNVS	8

[0089] 2. 재조합 단백질의 생합성 및 정제

[0090] 대장균 균주 BL21(DE3)[F⁻ompThsdS_B(rB⁻mB⁻)]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질 전환하였다. cMMO, cAMO, sMMO-m1 ~ m3, cMMO(FR), cAMO(FR), sMMO-m2(FR)는 대장균 균주 BL21에 두 개의 발현 벡터를 동시에 형질 전환 하였으며, 앰피실린과 카나마이신에 저항성이 있는 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린과 100 mg L⁻¹ 카나마이신, 0.4 mM CuSO₄ 또는 FeSO₄ 함유)를 함유 하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다.

[0091] 배지 탁도(O.D.₆₀₀)가 약 0.6에 도달할 때, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM)을 첨가하여 유

전자의 발현을 유도하였다. 20℃에서 14시간 배양 후, 배양한 대장균을 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 균 체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 먼저 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 재조합 단백질을 농축하고 버퍼 교환을 진행하여 정제된 재조합 단백질을 얻을 수 있었다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[0092] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[0093] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 파쇄 용액(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(QuiaGen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다. (세척 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0 / 용출 버퍼: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0).

[0094] 2) 농축과 버퍼교환

[0095] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 2 mL의 재조합 단백질을 ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)에 담아 컬럼 위에 1mL의 용액이 남을 때까지 5,000 rpm으로 원심 분리를 진행하였다. 그 후에 Tris 버퍼(20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8.0)로 버퍼 교환을 해주었다.

[0097] 3. 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도 분석

[0098] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 SDS-PAGE로 분석하였다. 재조합 단백질의 파쇄된 세포액을 원심분리하여 얻은 상등액(soluble fraction, sol)과 불용성 응집체 (insoluble fraction, insol), 정제된 재조합 단백질을 12 % Tris-glycine precast gel(Invitrogen, California, U.S.A.)을 사용하여 SDS-PAGE를 진행하였다. 그리고 젤을 코마시블루 염색 용액으로 염색하고, 염색된 단백질 밴드를 densitometer(GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, California, U.S.A.)를 통해 각 재조합 단백질의 발현을 및 세포질 용해도를 분석하였다. (도 2)

[0100] 4. 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 구조 분석

[0101] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM) 촬영을 하였다. 단백질의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2 % (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 단백질 이미지를 200 kV에서 작동하는 Tecnai 20(FEI, Hillsboro, Oregon, U.S.A.) 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과 구형 자가조립체가 형성된 것을 확인하였다. 추가적으로 DLS(dynamic light scattering) 분석을 통하여 cMMO는 21.9±3.3 nm, cAMO는 27.9±4.7 nm, sMMO-m1은 26.3±3.1 nm, sMMO-m2는 20.8±3.3 nm, sMMO-m3는 23.9±3.3 nm의 크기를 지니는 자가조립체를 형성함을 확인하였다. (도 3)

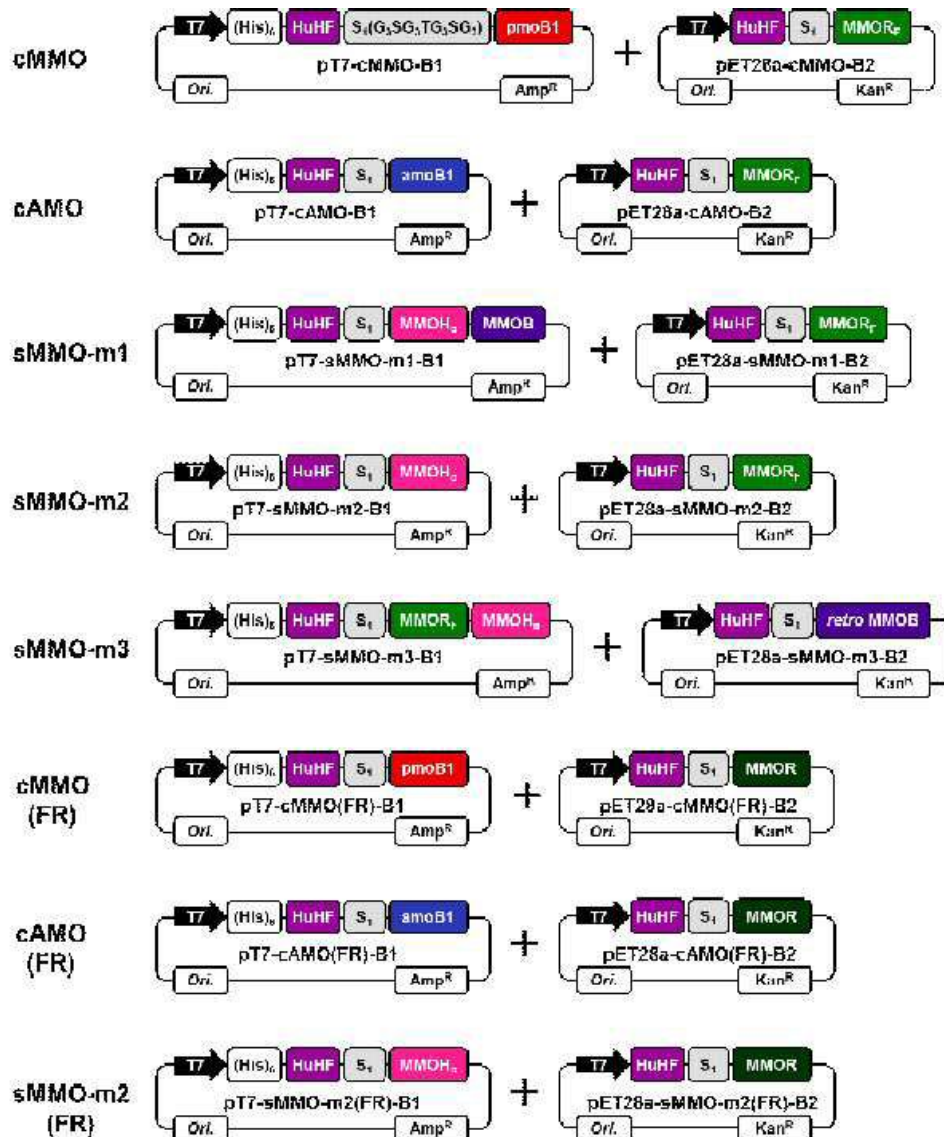
[0102] 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-m3를 포함하는 재조합 단백질의 구조 분석을 위하여 X-ray absorption spectroscopy (XAS) 분석을 하였고 cMMO, sMMO-m3를 포함하는 재조합 단백질은 Electron paramagnetic resonance (EPR) spectra 분석도 추가적으로 진행하였다. 단백질의 X-ray absorption near-edge structure (XANES), Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) 및 EPR 분석을 위해, Tris 버퍼로 용매 교환된 샘플을 -80 ℃에서 3 시간동안 사전 냉동하고, 사전 냉동된 샘플은 동결 건조기(FDU-2100, DRC-1000, EYELA)를 사용하여 -110 ℃에서 동결 건조되었다. XAS 분석은 Aichi Synchrontron Radiation Center (Aichi)의 XAFS beam line (BL11S2)에 의해 측정되었으며, EPR spectrometer (JES-FA200)으로 측정되었다. cMMO EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 구리 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였으며, XANES 분석 결과 1, 2가 구리이온(Cu(I), Cu(II))이 혼재되어 있음을 확인하였다. 추가적으로 EPR 분석을 통하여 2가 구리 이온이 valence-scrambled state로 존재함을 확인하였다. (도 4)

- [0103] cAMO EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 구리 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였으며, 메탄 산화 반응이 진행된 샘플의 경우에는 반응을 하지 않은 샘플과 비교하여 리간드의 거리가 달라진 것을 확인하였으며 한 개의 피크($\sim 2.2 \text{ \AA}$)가 추가적으로 관찰되는 것을 확인하였다. XANES 분석 결과 1, 2가 구리이온(Cu(I)), Cu(II))이 혼재되어 있음을 확인하였다. (도 5)
- [0104] sMMO-m3 EXAFS 분석 결과 활성 부위에 존재하는 철 이온과 주변 리간드의 거리 정보를 확인하였다. 또한 XANES 분석결과 2, 3가 철 이온(Fe(II)), Fe(III))이 혼재되어 있으며 메탄 산화 반응이 진행된 샘플의 경우에는 반응을 하지 않은 샘플에 비해 $\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)}$ 비율이 증가하였음을 확인하였다. 추가적으로 EPR 분석을 통하여 3가 철 이온의 존재를 확인하였다. (도 6)
- [0106] **5. 제조된 cMMO, cAMO, sMMO-mimics를 포함하는 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성 증명**
- [0107] 정제된 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 20 mL의 septa-sealed vial(catalogue no. 5182-0837, Agilent)에 환원제인 NADH($0.2 \sim 0.3 \text{ mM}$)를 포함하는 1 mL의 재조합 단백질 용액을 주입하였다. 재조합 단백질을 통한 메탄 산화 반응을 위해 19 mL의 headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 15 mL의 메탄 가스와 4 mL의 공기를 주입함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 30°C 의 인큐베이터에서 최대 24시간까지 효소 반응을 진행하였다. 그리고 효소 반응에 의해 발생하는 산화 생성물인 메탄올의 양을 가스 크로마토그래피(7890B GC, Agilent)를 통해 측정하여 누적 생산량을 계산하였다. (도 7)
- [0108] sMMO-m3의 ^{13}C -메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 상기 명시된 메탄 산화 반응과 동일한 방법으로 효소 반응을 진행하되, 메탄 가스를 ^{13}C -메탄 가스로 치환하여 진행하였다. Nuclear magnetic resonance (NMR)분석을 위해 반응이 끝난 vial 5개를 80°C 에서 15분 가열한 뒤 headspace 기체 19 mL를 충분히 냉각된 에탄올 600 μl 에 주사기를 이용하여 직접 주사하였다. 그 후 ethanol- d_6 를 60 μl 추가하여 NMR tube(NORS55007, Sigma Aldrich)로 옮겨 sMMO-m3 효소 반응에 의해 생성된(발생하는 산화 생성물인) ^{13}C -메탄올을 NMR 분석을 통해 확인하였다. (도 8)
- [0110] **6. 메탄산화 활성 도메인 및 [2Fe-2S]과 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자전달 도메인이 융합된 재조합 단백질의 메탄 가스 산화 활성 증명**
- [0111] cMMO, cAMO, sMMO-m2에 대해 전자전달 도메인이 [2Fe-2S] 및 FAD 결합 도메인을 포함하는 전자전달 도메인으로 치환된 cMMO(FR), cAMO(FR), sMMO-m2(FR) 재조합 단백질을 상기 명시된 방법으로 제조하여 메탄 가스 산화 반응 16시간 후 메탄올 생산량을 가스 크로마토그래피를 통해 확인하였다. (cMMO(FR): N.D., cMMO: $629.28(\pm 21.23)$ mol methanol/mol enzyme, cAMO(FR): $427.03(\pm 50.2)$ mol methanol/mol enzyme, cAMO: $1355.16(\pm 213.06)$ mol methanol/mol enzyme, sMMO-m2(FR): $570.60(\pm 50.96)$ mol methanol/mol enzyme, sMMO-m2: $886.62(\pm 46.86)$ mol methanol/mol enzyme). 메탄올 생산량의 비교를 통해 [2Fe-2S] 및 FAD 결합 도메인 모두를 포함하는 전자전달 도메인(MMOR(FR))이 융합된 재조합 단백질보다 FAD 결합 도메인만을 포함하는 전자전달 도메인(MMOR_F)이 융합된 재조합 단백질의 경우 메탄 산화 활성이 더 높은 것을 확인하였다. (도 9)
- [0113] **7. 재조합 단백질을 활용한 *in vivo* 메탄 가스 산화 활성 증명**
- [0114] cMMO, cAMO, sMMO-m3 단백질을 발현하는 대장균을 이용한 메탄 가스 산화 활성을 검증하기 위해 대장균 세포 내 NAD(H)의 전구체를 합성해주는 효소(nicotinic acid phosphoribosyltransferase)가 과발현 될 수 있도록 해당 효소의 유전정보를 담고 있는 *pncB* 유전자가 도입된 균주 BL21(DE3)[$\Delta yrfE \Delta yjaD::pncB$](*Eng. Life Sci.*, 7, 343-353, 2007)를 사용하였다. 본 균주에 cMMO, cAMO, sMMO-m3 단백질들의 발현용 벡터들로 각각 형질 전환하여 상기 명시된 배양방법을 통해 단백질 발현을 진행하였다. 추가적으로 IPTG 1 mM을 첨가하는 과정에서 균주 내 환원력 지속을 위해 Sodium formate 100 mM를 첨가하여 20°C 에서 14시간 배양하였다. 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 메탄 가스가 퍼징된 LB 배지(100 mg L^{-1} 엠포실린, 100 mg L^{-1} 카나마이신, 0.4 mM CuSO_4 또는 FeSO_4 , 1 mM IPTG, 100 mM Sodium formate)에 대장균 탁도(O.D._{600}) 1.5

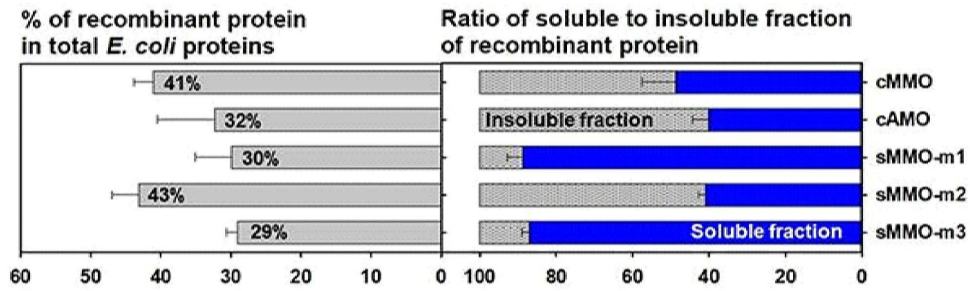
가 되도록 현탁하여 3 mL씩 GC vial에 50개씩 분주하였다. 재조합 단백질이 발현된 대장균을 통한 메탄 산화 반응을 위해 19 mL의 vial headspace의 공기를 주사기를 통해 제거하고 6 mL의 메탄 가스와 10 mL의 공기를 주입 함으로써 시작되었으며, 그 후 즉시 vial을 30℃의 인큐베이터에서 16시간 *in vivo* 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 vial은 초음파 파쇄기(catalogue no. WUC-A06H, DAIHAN-brand)를 이용하여 vial 내 대장균을 파쇄한 후 80℃에서 1시간 가열하여 대장균 내 생성된 메탄올이 기화되도록 하였다. 가열한 vial에서 headspace의 기체를 빈 vial로 주사기를 통해 주입한 후 즉시 액화 질소에 5분씩 보관하여 가열된 기상에 존재하는 메탄올이 빈 vial 내로 농축되도록 50개 vial을 반복 농축하였다. *In vivo* 반응에 의해 발생하는 산화 생성물인 메탄올의 양을 측정하기 위해 농축시킨 vial을 80℃, 15분 가열 후 headspace의 기체 1 mL을 가스 크로마토그래피를 통해 분석하였다.(도 10)

도면

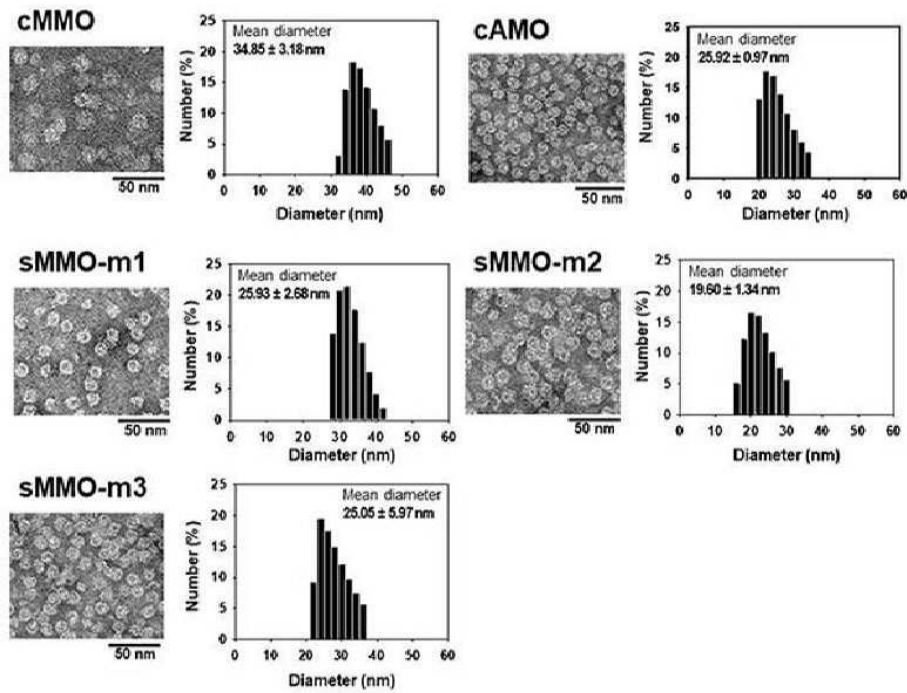
도면1



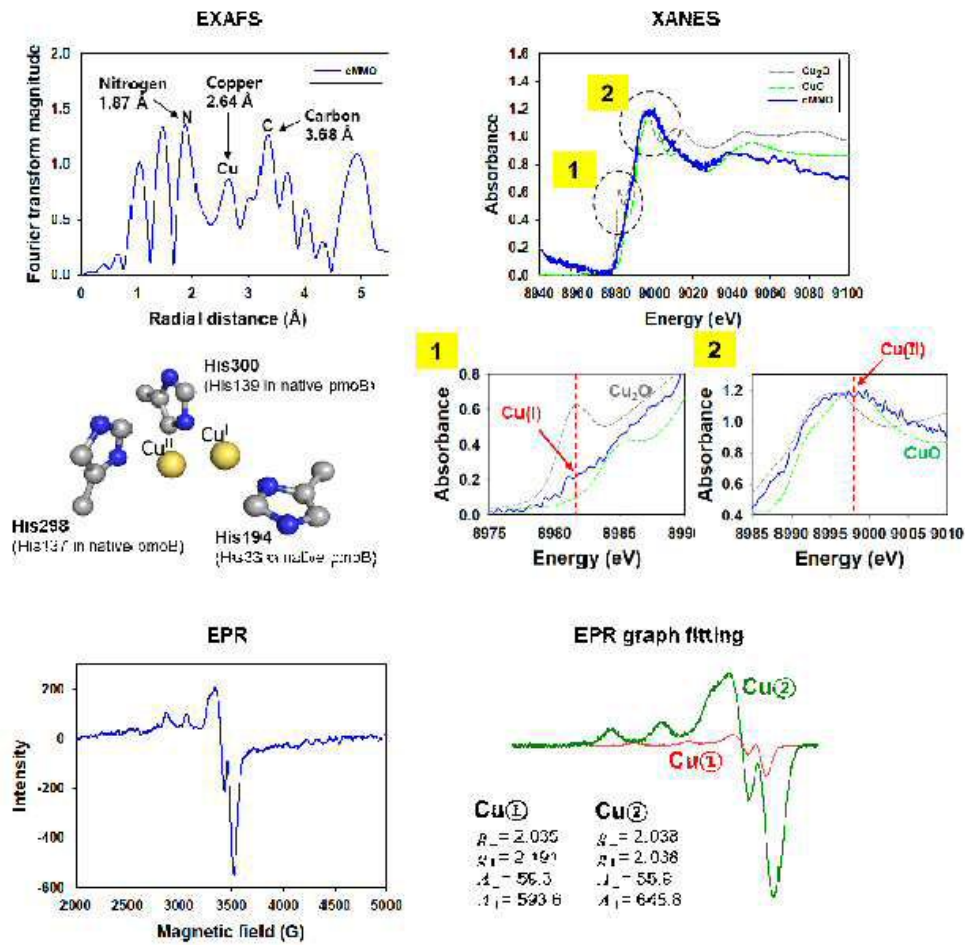
도면2



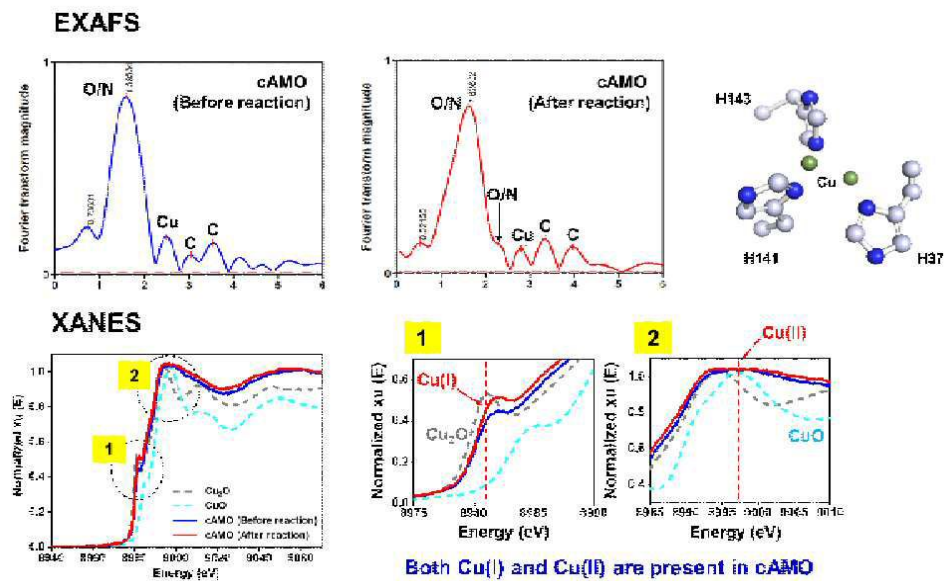
도면3



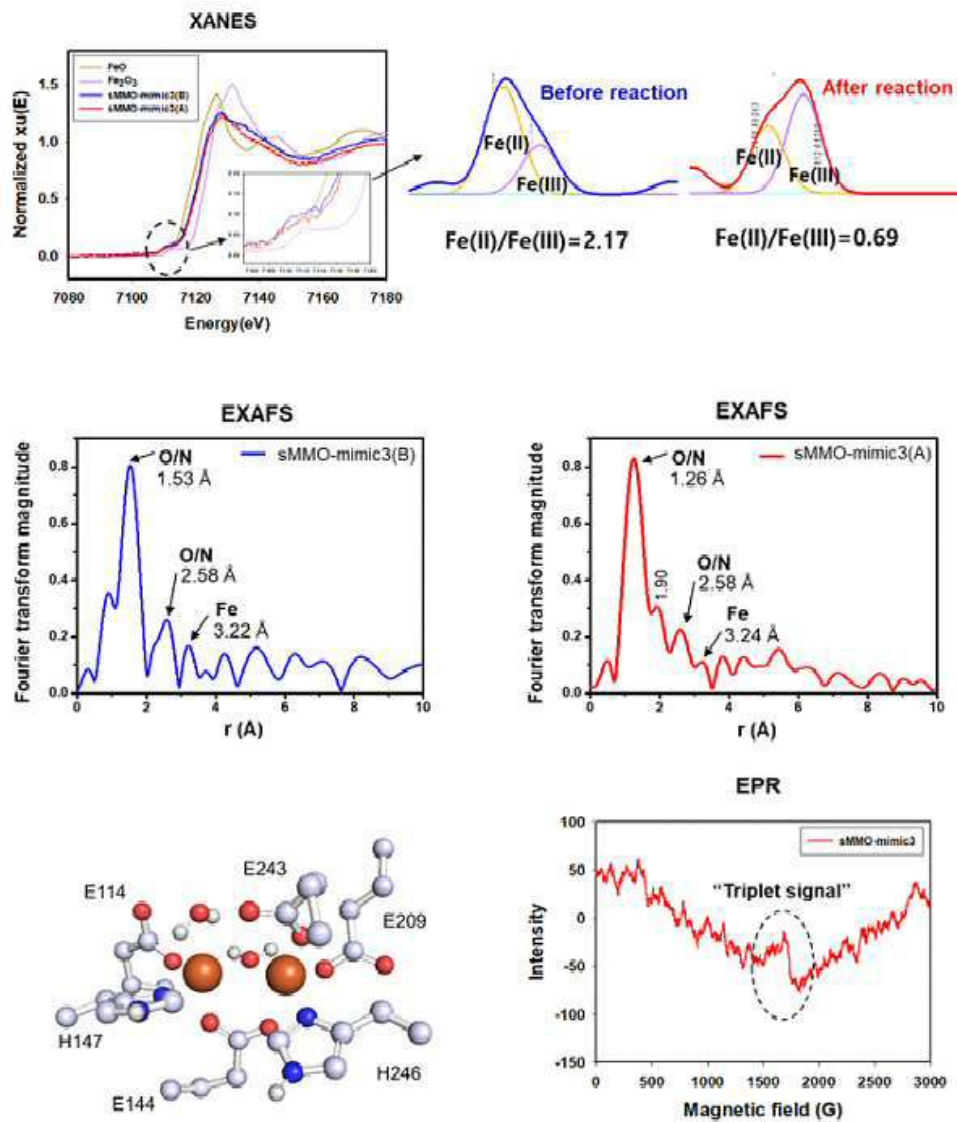
도면4



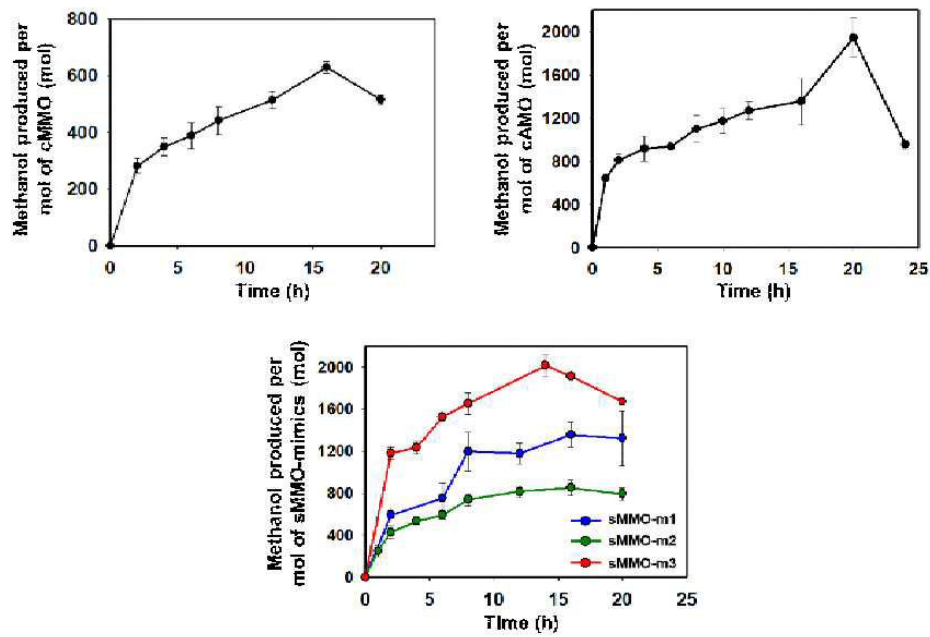
도면5



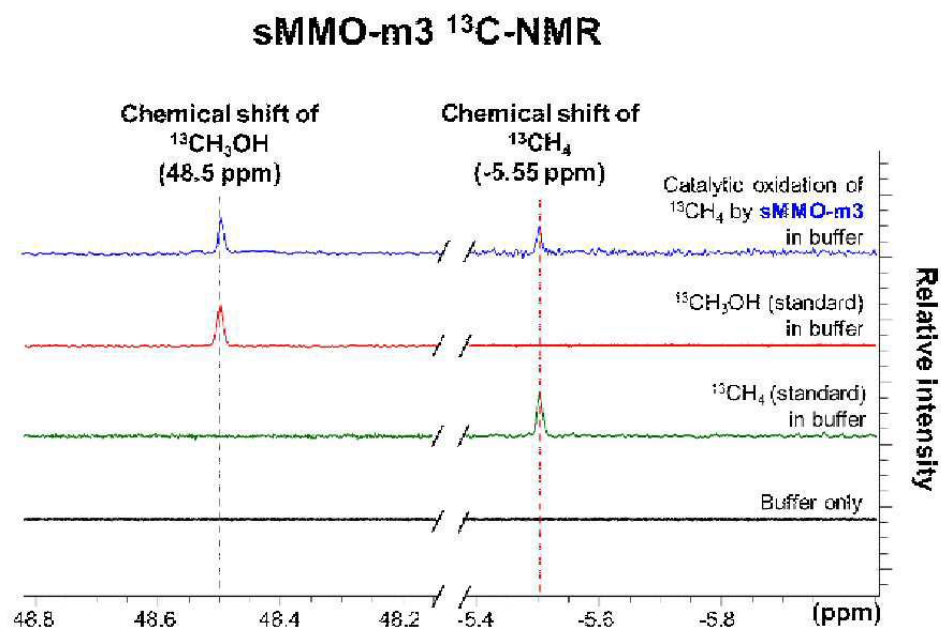
도면6



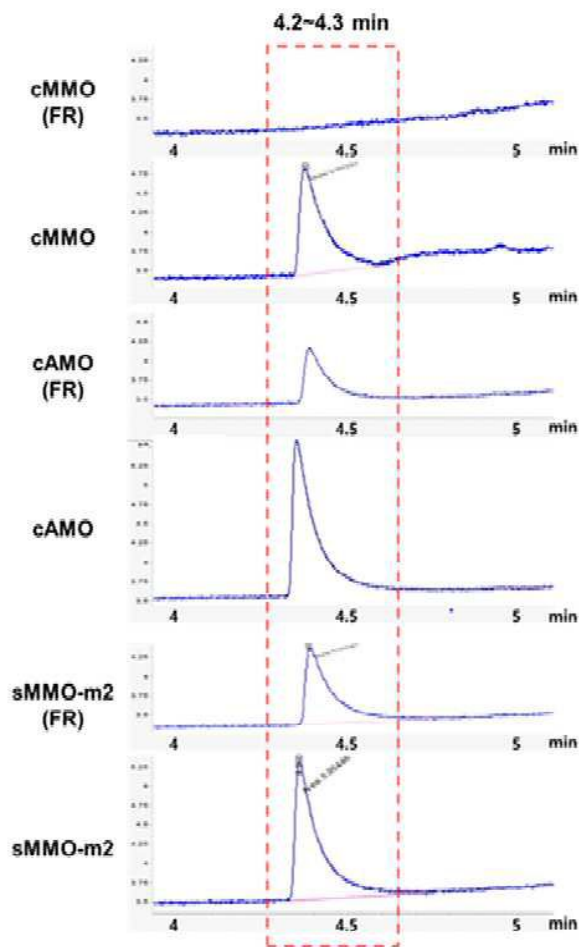
도면7



도면8



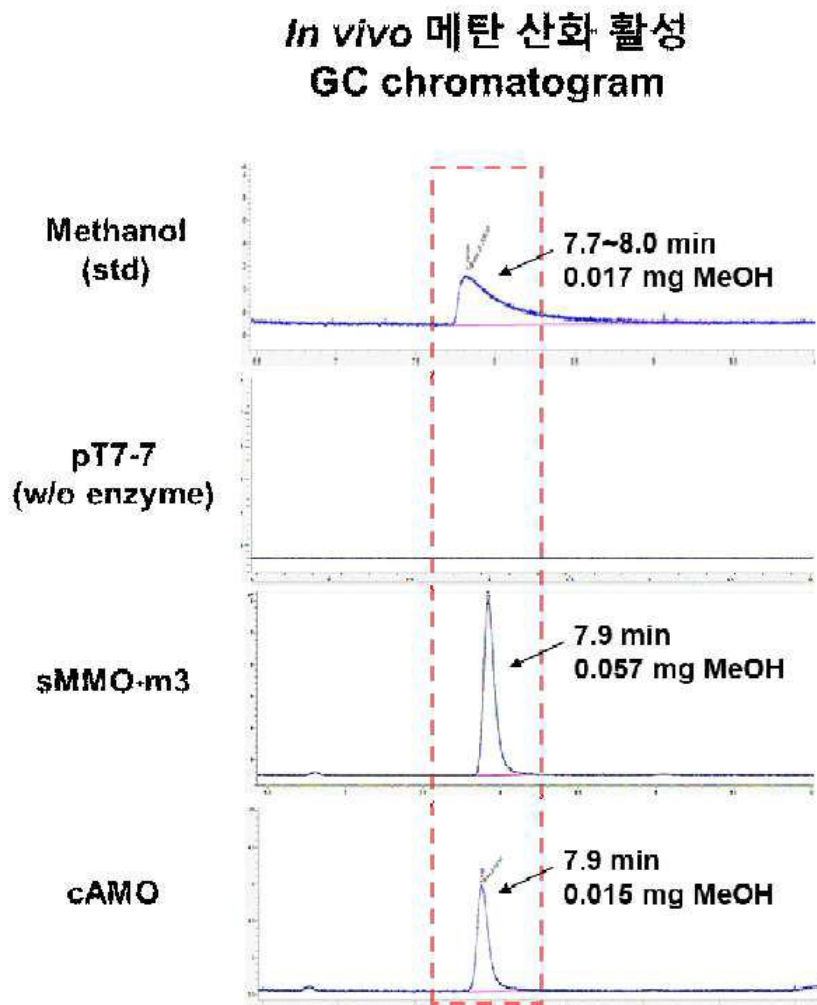
도면9



mol Methanol produced per mol enzyme
(mol methanol/mol enzyme)

Enzyme \ Reductase	Full reductase (FR)	FAD-binding domain only (R_F)
cMMO	N.D.	629.28 $\pm$ 21.23
cAMO	427.03 $\pm$ 50.2	1355.16 $\pm$ 213.06
sMMO-m2	570.60 $\pm$ 50.96	886.62 $\pm$ 46.86

도면10



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> NEW PROTEIN CAPABLE WITH METHANE OXIDATION ACTIVITY
- <130> 01035
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Methylococcus capsulatus
- <400> 1

His Gly Glu Lys Ser Gln Ala Ala Phe Met Arg Met Arg Thr Ile His

1 5 10 15

Trp Tyr Asp Leu Ser Trp Ser Lys Glu Lys Val Lys Ile Asn Glu Thr

20 25 30

Val Glu Ile Lys Gly Lys Phe His Val Phe Glu Gly Trp Pro Glu Thr
35 40 45

Val Asp Glu Pro Asp Val Ala Phe Leu Asn Val Gly Met Pro Gly Pro
50 55 60

Val Phe Ile Arg Lys Glu Ser Tyr Ile Gly Gly Gln Leu Val Pro Arg
65 70 75 80

Ser Val Arg Leu Glu Ile Gly Lys Thr Tyr Asp Phe Arg Val Val Leu
85 90 95

Lys Ala Arg Arg Pro Gly Asp Trp His Val His Thr Met Met Asn Val

100 105 110

Gln Gly Gly Gly Pro Ile Ile Gly Pro Gly Lys Trp Ile Thr Val Glu
115 120 125

Gly Ser Met Ser Glu Phe Arg Asn Pro Val Thr Thr
130 135 140

<210> 2

<211> 258

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> methanotrophs

<400> 2

Ala Lys Glu Tyr Ala Arg Met Glu Ala Val Lys Asp Glu Arg Gln Phe
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Asp Ala Leu Thr Arg Leu Asn Ala Gly Val Arg Val

20 25 30

His Pro Lys Trp Asn Glu Thr Met Lys Val Val Ser Asn Phe Leu Glu
35 40 45

Val Gly Glu Tyr Asn Ala Ile Ala Ala Thr Gly Met Leu Trp Asp Ser
50 55 60

Ala Gln Ala Ala Glu Gln Lys Asn Gly Tyr Leu Ala Gln Val Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg His Thr His Gln Cys Ala Tyr Val Asn Tyr Tyr Phe Ala

85 90 95

Lys Asn Gly Gln Asp Pro Ala Gly His Asn Asp Ala Arg Arg Thr Arg

100 105 110

Thr Ile Gly Pro Leu Trp Lys Gly Met Lys Arg Val Phe Ser Asp Gly

115 120 125

Phe Ile Ser Gly Asp Ala Val Glu Cys Ser Leu Asn Leu Gln Leu Val

130 135 140

Gly Glu Ala Cys Phe Thr Asn Pro Leu Ile Val Ala Val Thr Glu Trp

145 150 155 160

Ala Ala Ala Asn Gly Asp Glu Ile Thr Pro Thr Val Phe Leu Ser Ile

165 170 175

Glu Thr Asp Glu Leu Arg His Met Ala Asn Gly Tyr Gln Thr Val Val

180 185 190

Ser Ile Ala Asn Asp Pro Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Asn Thr Asp Leu

195 200 205

Asn Asn Ala Phe Trp Thr Gln Gln Lys Tyr Phe Thr Pro Val Leu Gly

210 215 220

Met Leu Phe Glu Tyr Gly Ser Lys Phe Lys Val Glu Pro Trp Val Lys

225 230 235 240

Thr Trp Asp Arg Trp Val Tyr Glu Asp Trp Gly Gly Ile Trp Ile Gly

245 250 255

Arg Leu

<210> 3

<211> 203

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> methanotrophs

<400> 3

Val Arg Val His Pro Lys Trp Asn Glu Thr Met Lys Val Val Ser Asn

1 5 10 15

Phe Leu Glu Val Gly Glu Tyr Asn Ala Ile Ala Ala Thr Gly Met Leu

20 25 30
Trp Asp Ser Ala Gln Ala Ala Glu Gln Lys Asn Gly Tyr Leu Ala Gln

35 40 45
Val Leu Asp Glu Ile Arg His Thr His Gln Cys Ala Tyr Val Asn Tyr

50 55 60
Tyr Phe Ala Lys Asn Gly Gln Asp Pro Ala Gly His Asn Asp Ala Arg

65 70 75 80
Arg Thr Arg Thr Ile Gly Pro Leu Trp Lys Gly Met Lys Arg Val Phe

85 90 95
Ser Asp Gly Phe Ile Ser Gly Asp Ala Val Glu Cys Ser Leu Asn Leu

100 105 110

Gln Leu Val Gly Glu Ala Cys Phe Thr Asn Pro Leu Ile Val Ala Val

115 120 125
Thr Glu Trp Ala Ala Ala Asn Gly Asp Glu Ile Thr Pro Thr Val Phe

130 135 140
Leu Ser Ile Glu Thr Asp Glu Leu Arg His Met Ala Asn Gly Tyr Gln

145 150 155 160
Thr Val Val Ser Ile Ala Asn Asp Pro Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Asn

165 170 175
Thr Asp Leu Asn Asn Ala Phe Trp Thr Gln Gln Lys Tyr Phe Thr Pro

180 185 190

Val Leu Gly Met Leu Phe Glu Tyr Gly Ser Lys

195 200

<210> 4

<211> 140

<212> PRT

<213> Nitrosomonas europaea

<400> 4

His Gly Glu Arg Ser Gln Glu Pro Phe Leu Arg Met Arg Thr Val Gln

1 5 10 15
Trp Tyr Asp Ile Lys Trp Gly Pro Glu Val Thr Lys Val Asn Glu Asn

20 25 30

Ala Lys Ile Thr Gly Lys Phe His Leu Ala Glu Asp Trp Pro Arg Ala

35 40 45

Ala Ala Gln Pro Asp Phe Ser Phe Phe Asn Val Gly Ser Pro Ser Pro

50 55 60

Val Phe Val Arg Leu Ser Thr Lys Ile Asn Gly His Pro Trp Phe Ile

65 70 75 80

Ser Gly Pro Leu Gln Ile Gly Arg Asp Tyr Glu Phe Glu Val Asn Leu

85 90 95

Arg Ala Arg Ile Pro Gly Arg His His Met His Ala Met Leu Asn Val

100 105 110

Lys Asp Ala Gly Pro Ile Ala Gly Pro Gly Ala Trp Met Asn Ile Thr

115 120 125

Gly Ser Trp Asp Asp Phe Thr Asn Pro Leu Lys Leu

130 135 140

<210> 5

<211> 250

<212> PRT

<213> Methylococcus capsulatus

<400> 5

Cys Arg Ile Ser Phe Gly Glu Val Gly Ser Phe Glu Ala Glu Val Val

1 5 10 15

Gly Leu Asn Trp Val Ser Ser Asn Thr Val Gln Phe Leu Leu Gln Lys

20 25 30

Arg Pro Asp Glu Cys Gly Asn Arg Gly Val Lys Phe Glu Pro Gly Gln

35 40 45

Phe Met Asp Leu Thr Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Arg Ser Tyr Ser

50 55 60

Pro Ala Asn Leu Pro Asn Pro Glu Gly Arg Leu Glu Phe Leu Ile Arg

65 70 75 80

Val Leu Pro Glu Gly Arg Phe Ser Asp Tyr Leu Arg Asn Asp Ala Arg

85 90 95

Val Gly Gln Val Leu Ser Val Lys Gly Pro Leu Gly Val Phe Gly Leu

100 105 110
Lys Glu Arg Gly Met Ala Pro Arg Tyr Phe Val Ala Gly Gly Thr Gly
115 120 125
Leu Ala Pro Val Val Ser Met Val Arg Gln Met Gln Glu Trp Thr Ala
130 135 140
Pro Asn Glu Thr Arg Ile Tyr Phe Gly Val Asn Thr Glu Pro Glu Leu
145 150 155 160
Phe Tyr Ile Asp Glu Leu Lys Ser Leu Glu Arg Ser Met Arg Asn Leu
165 170 175

Thr Val Lys Ala Cys Val Trp His Pro Ser Gly Asp Trp Glu Gly Glu
180 185 190
Gln Gly Ser Pro Ile Asp Ala Leu Arg Glu Asp Leu Glu Ser Ser Asp
195 200 205
Ala Asn Pro Asp Ile Tyr Leu Cys Gly Pro Pro Gly Met Ile Asp Ala
210 215 220
Ala Cys Glu Leu Val Arg Ser Arg Gly Ile Pro Gly Glu Gln Val Phe
225 230 235 240
Phe Glu Lys Phe Leu Pro Ser Gly Ala Ala

245 250

<210> 6
<211> 348
<212> PRT
<213> Methylococcus capsulatus
<400> 6

Met Gln Arg Val His Thr Ile Thr Ala Val Thr Glu Asp Gly Glu Ser
1 5 10 15
Leu Arg Phe Glu Cys Arg Ser Asp Glu Asp Val Ile Thr Ala Ala Leu
20 25 30
Arg Gln Asn Ile Phe Leu Met Ser Ser Cys Arg Glu Gly Gly Cys Ala
35 40 45

Thr Cys Lys Ala Leu Cys Ser Glu Gly Asp Tyr Asp Leu Lys Gly Cys

50

55

60

Ser Val Gln Ala Leu Pro Pro Glu Glu Glu Glu Glu Gly Leu Val Leu

65

70

75

80

Leu Cys Arg Thr Tyr Pro Lys Thr Asp Leu Glu Ile Glu Leu Pro Tyr

85

90

95

Thr His Cys Arg Ile Ser Phe Gly Glu Val Gly Ser Phe Glu Ala Glu

100

105

110

Val Val Gly Leu Asn Trp Val Ser Ser Asn Thr Val Gln Phe Leu Leu

115

120

125

Gln Lys Arg Pro Asp Glu Cys Gly Asn Arg Gly Val Lys Phe Glu Pro

130

135

140

Gly Gln Phe Met Asp Leu Thr Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Arg Ser

145

150

155

160

Tyr Ser Pro Ala Asn Leu Pro Asn Pro Glu Gly Arg Leu Glu Phe Leu

165

170

175

Ile Arg Val Leu Pro Glu Gly Arg Phe Ser Asp Tyr Leu Arg Asn Asp

180

185

190

Ala Arg Val Gly Gln Val Leu Ser Val Lys Gly Pro Leu Gly Val Phe

195

200

205

Gly Leu Lys Glu Arg Gly Met Ala Pro Arg Tyr Phe Val Ala Gly Gly

210

215

220

Thr Gly Leu Ala Pro Val Val Ser Met Val Arg Gln Met Gln Glu Trp

225

230

235

240

Thr Ala Pro Asn Glu Thr Arg Ile Tyr Phe Gly Val Asn Thr Glu Pro

245

250

255

Glu Leu Phe Tyr Ile Asp Glu Leu Lys Ser Leu Glu Arg Ser Met Arg

260

265

270

Asn Leu Thr Val Lys Ala Cys Val Trp His Pro Ser Gly Asp Trp Glu

275

280

285

Gly Glu Gln Gly Ser Pro Ile Asp Ala Leu Arg Glu Asp Leu Glu Ser

290 295 300
 Ser Asp Ala Asn Pro Asp Ile Tyr Leu Cys Gly Pro Pro Gly Met Ile
 305 310 315 320
 Asp Ala Ala Cys Glu Leu Val Arg Ser Arg Gly Ile Pro Gly Glu Gln
 325 330 335
 Val Phe Phe Glu Lys Phe Leu Pro Ser Gly Ala Ala

340 345

<210> 7
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> methanotrophs
 <400> 7

Ser Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asp Ala Gly Ile Met Gly Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Lys Asp Phe Ala Asp Gln Phe Phe Ala Asp Glu Asn Gln Val Val His
 20 25 30
 Glu Ser Asp Thr Val Val Leu Val Leu Lys Lys Ser Asp Glu Ile Asn
 35 40 45

Thr Phe Ile Glu Glu Ile Leu Leu Thr Asp Tyr Lys Lys Asn Val Asn
 50 55 60
 Pro Thr Val Asn Val Glu Asp Arg Ala Gly Tyr Trp Trp Ile Lys Ala
 65 70 75 80
 Asn Gly Lys Ile Glu Val Asp Cys Asp Glu Ile Ser Glu Leu Leu Gly
 85 90 95
 Arg Gln Phe Asn Val Tyr Asp Phe Leu Val Asp Val Ser Ser Thr Ile
 100 105 110
 Gly Arg Ala Tyr Thr Leu Gly Asn Lys Phe Thr Ile Thr Ser Glu Leu

115 120 125
 Met Gly Leu Asp Arg Lys Leu Glu Asp Tyr His Ala
 130 135 140
 <210> 8

<211> 140

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> methanotrophs

<400> 8

Ala His Tyr Asp Glu Leu Lys Arg Asp Leu Gly Met Leu Glu Ser Thr

1 5 10 15

Ile Thr Phe Lys Asn Gly Leu Thr Tyr Ala Arg Gly Ile Thr Ser Ser

20 25 30

Val Asp Val Leu Phe Asp Tyr Val Asn Phe Gln Arg Gly Leu Leu Glu

35 40 45

Ser Ile Glu Asp Cys Asp Val Glu Ile Lys Gly Asn Ala Lys Ile Trp

50 55 60

Trp Tyr Gly Ala Arg Asp Glu Val Asn Val Thr Pro Asn Val Asn Lys

65 70 75 80

Lys Tyr Asp Thr Leu Leu Ile Glu Glu Ile Phe Thr Asn Ile Glu Asp

85 90 95

Ser Lys Lys Leu Val Leu Val Val Thr Asp Ser Glu His Val Val Gln

100 105 110

Asn Glu Asp Ala Phe Phe Gln Asp Ala Phe Asp Lys Gly Lys Leu Gly

115 120 125

Met Ile Gly Ala Asp Tyr Ala Asn Ser Asn Val Ser

130 135 140