

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호	10-2017-0004646
		(43) 공개일자	2017년01월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	<i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12P 7/04</i> (2006.01) <i>C12Q 1/02</i> (2006.01)	(71) 출원인	울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(52) CPC특허분류	<i>C12N 15/63</i> (2013.01) <i>C12N 15/70</i> (2013.01)	(72) 발명자	홍순호 부산광역시 기장군 정관면 정관5로 75, 108동 10 2호(정관 신동아파밀리에APT)
(21) 출원번호	10-2015-0095291	(74) 대리인	위병갑
(22) 출원일자	2015년07월03일		
심사청구일자	2015년07월03일		

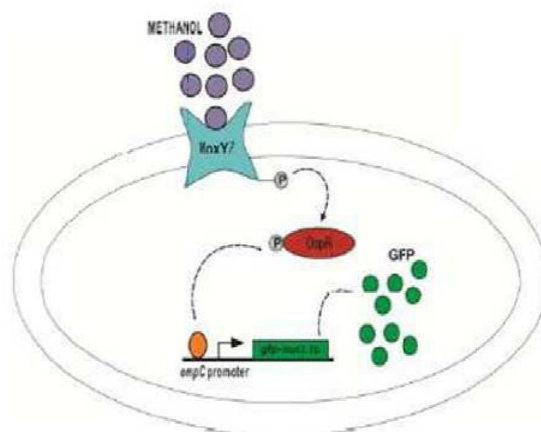
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 메탄올 감지 재조합 미생물 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 메탄올 감지 재조합 미생물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 신규한 키메라 TCS(two-component system) 유전자 시스템을 이용하여 바이오 메탄올 생산을 감지할 수 있는 재조합 플라스미드 및 이를 이용한 재조합 균주제작, 그리고 상기 재조합 균주를 이용한 메탄올 생산 스크리닝 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 7/04 (2013.01)

C12Q 1/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A2054726

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 감마아미노부틸산 대사네트워크 합성단백질 스캐폴드 및 과량생산 재조합대장균 제작

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 메탄올 감지용 키메릭 TCS(two-component system) 유전자 시스템:

- (i) 메탄올을 인지하는 MoxYZ(MoxY 및 EnvZ 융합 단백질) 단백질을 코딩하는 MoxYZ 유전자;
- (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및
- (iii) 리포터 유전자의 발현을 유도하는 OmpC 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메탄올 감지용 키메릭 TCS(two-component system)는 MoxY/X 조절자에 EnvZ/OmpR을 도입하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전자 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 MoxY 유전자는 파라코커스 데니트리피칸스(Paracoccus denitrificans) 유래인 것을 특징으로 하는 유전자 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 EnvZ 유전자는 에스케리키아 콜리(E. coli, 대장균) 유래인 것을 특징으로 하는 유전자 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 형광단백질은 GFP, GFPuv, sfGFP 및 RFP로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항생제 저항성 유전자는 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 메탄올은 농도가 0.01%가 될 때까지 리포터 유전자의 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 유전자 시스템.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 메탄올 감지용 키메릭 TCS(two-component system) 유전자 시스템을 함유하는 메탄올 감지용 재조합 미생물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 에스케리키아 콜리(E. coli, 대장균)인 것을 특징으로 하는 메탄올 감지용 재조합 미생물.

청구항 10

제8항의 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메탄올 함유가능성 있는 샘플을 접촉시키는 단계; 및 메탄올을 감지하

여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하는 단계를 포함하는, 메탄올을 감지하거나 정량하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 리포터 단백질의 활성 측정은 미생물 콜로니 이미지 분석, 형광스펙트럼 분석, 형광유세 포분석 (FACS) 및 항생제 내성 측정법으로 구성된 군에서 선택되는 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 메탄올 생산균주의 스크리닝 방법:

- (a) 제17항의 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메타게놈 라이브러리 샘플을 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 샘플 내에 존재하는 메탄올에 의해 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하여, 샘플 내에 메탄올을 정량하는 단계; 및
- (c) 메탄올이 함유된 샘플에 함유된 균주를 메탄올 생산균주로 선별하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 메탄올 감지 재조합 미생물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 신규한 키메릭 TCS(two-component system) 유전자 시스템을 이용하여 바이오 메탄올 생산을 감지할 수 있는 재조합 플라스미드 및 이를 이용한 재조합 균주제작, 그리고 상기 재조합 균주를 이용한 메탄올 생산 스크리닝 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 전 세계적인 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] 바이오 연료(biofuel)는 살아있는 바이오매스(biomass)로부터 유기체뿐만 아니라 대사활동에 의한 부산물을 포함하는 생산물을 이용한 신재생에너지의 종류이다. 바이오 연료의 대표적인 예로는 현재 수송연료로 사용이 되고 있는 바이오에탄올(bioethanol), 바이오디젤(biodiesel), 메탄올(methanol), 바이오가스(biogas) 및 고형연료 등이 있으며, 이들 모두 전력생산이나 수송연료로서의 가능성이 있다.
- [0004] 이와 관련하여, 합성생물학 기술의 발달로 기존 대사공학 기술로 구현이 힘들었던 대사경로 흐름의 역동적 조절(dynamic regulation)이 가능해졌다. 대사흐름의 다양한 역동적 조절은 일련의 대사중간체 감지기와 유도인자(metabolite sensors and inducers)들에 의해서 전사, 번역, 번역후 수식단계(transcriptional, translational and posttranslational levels)에서 진행된다. 이들 각 단계에서의 역동적 대사조절은 상이한 반응시간척도(different dynamic time-scales)를 갖는 다양한 대사조절 장치들에 의해서 이루어지고, 다양한 돌발변수들이 공존하는 산업현장에서의 적용을 위해서는 이들 대사조절회로의 견고성(robustness)이 중요한 특성이 된다.
- [0005] 최근 합성생물학의 진보로 대사흐름을 다이내믹하게 조절하는 능동적 대사공학(dynamic metabolic engineering)이 주목을 받고 있다. 이를 통해서 발효공정의 3대 핵심인자인 생산수율(yield), 산물농도(titer), 생산성(productivity)을 획기적으로 향상시킬 수 있다. 대사흐름을 조절하기 위해서 동적피드백조절(dynamic feedback control)에 기반을 둔 대사물질 감지(metabolite sensor) 연속조절과 이단계생육조건(two-stage growth conditions)에 기반을 둔 이단계 능동적 대사조절(two-stage dynamic control strategy)은 능동적 대사공학의 중요한 핵심기술이다.
- [0006] 상기 두 핵심 기술은 목적산물의 생산성(productivity) 뿐만 아니라, 수율(yield)과 농도(titers)도 더불어 향상시킬 수 있다. 동적대사조절전략(dynamic control strategies)이 더 효율적이고 광범위하게 이용되기 위해서는 두가지 중요한 발전이 요구된다. 첫째는 유전자회로가 견고해서 균주와 발효조건에 상관없이 일정한 성능을 나타내야 한다. 두 번째는 연속조절에서 감지(sensing)와 구동(actuation)의 역동성(dynamics)이 대사흐름을 효율적으로 조절할 수 있을 정도로 충분히 빨라야 한다. 향후에 합성생물학의 발전은 이런 문제들을 해결하고 대

사공학과 생물공정에서 동적조절의 활용의 폭을 넓힐 것이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 메탄올 생산을 감지 및 정량할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, MoxF 유전자를 조절하는 'MoxY/X 조절자'에 추가적으로 EnvZ/OmpR 시스템을 채용함으로써 메탄올을 감지하는 유전자적 시스템을 제작하고, 상기 유전자적 시스템을 포함하는 미생물을 이용할 경우, 메탄올을 효율적으로 감지 및 정량할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1.Biochem Biophys Res Commun. 2013 Aug 23;438(2):306-11

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 주된 목적은 메탄올을 감지하기 위한 키메릭(chimeric) 유전자 시스템을 제공하는데 있 생산하는 방법을 제공하는 데에 있다

[0010] 본 발명의 다른 목적은 메탄올을 감지하기 위한 재설계 키메릭 유전자 시스템을 포함하는 메탄올 감지용 재조합 미생물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 메탄올 감지용 재조합 미생물을 이용한 메탄올 감지 및 정량방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Two-component 신호전달 시스템(TCS)을 기반으로 하는, 키메릭(chimeric) 유전자 시스템[MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS] 및 이에 따른 메탄올 감지 용도를 제공한다.

[0013] 일 구체예로서, 다음을 포함하는 메탄올 감지용 키메릭 TCS(two-component system) 유전자 시스템을 제공한다.

[0014] (i) 메탄올을 인지하는 MoxYZ(MoxY 및 EnvZ 융합 단백질) 단백질을 코딩하는 MoxYZ 유전자;

[0015] (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; 및

[0016] (iii) 리포터 유전자의 발현을 유도하는 OmpC 프로모터.

[0017] 상기 메탄올 감지용 키메릭 TCS(two-component system)는 MoxY/X 조절자에 EnvZ/OmpR을 도입하여 이루어지는 것으로, 특히 MoxYZ는 MoxY 및 EnvZ 융합 단백질로 구성될 수 있다.

[0018] 이 때, 상기 MoxY 유전자는 파라코커스 데니트리피칸스(Paracoccus denitrificans) 유래인 것이 바람직하고, 상기 EnvZ 유전자는 에스케리키아 콜리(E. coli, 대장균) 유래인 것이 바람직하다.

[0019] 상기 형광단백질은 GFP, GFPuv, sfGFP 및 RFP로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 항생제 저항성 유전자는 카나마이신 저항성 유전자, 클로람페니콜 저항성 유전자 및 테트라사이클린 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 특히, 상기 메탄올은 농도가 0.01%가 될 때까지 리포터 유전자의 발현이 증가하는 것을 특징으로 하며, 이를 이용하여 메탄올 감지에 유용하게 이용될 수 있다.

[0021] 다른 구체예로서, 상기 메탄올 감지용 키메릭 TCS(two-component system) 유전자 시스템을 함유하는 메탄올 감지용 재조합 미생물을 제공한다.

- [0022] 가장 바람직한 재조합 미생물은 에스케리키아 콜리(E. coli, 대장균)이지만, 본 발명의 목적이 달성되는 한 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또 다른 구체예로서,
- [0024] 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메탄올 함유가능성 있는 샘플을 접촉시키는 단계; 및 메탄올을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하는 단계를 포함하는, 메탄올을 감지하거나 정량하는 방법을 제공한다.
- [0025] 이 때, 상기 리포터 단백질의 활성 측정은 미생물 콜로니 이미지 분석, 형광스펙트럼 분석, 형광유세포분석(FACS) 및 항생제 내성 측정법으로 구성된 군에서 선택되는 방법을 이용할 수 있다.
- [0026] 또 다른 구체예로서,
- [0027] (a) 제17항의 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메타게놈 라이브러리 샘플을 접촉시키는 단계;
- [0028] (b) 상기 샘플 내에 존재하는 메탄올에 의해 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하여, 샘플 내에 메탄올을 정량하는 단계; 및
- [0029] (c) 메탄올이 함유된 샘플에 함유된 균주를 메탄올 생산균주로 선별하는 단계를 포함하는 메탄올 생산균주의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0030] 이처럼, 본 발명은 MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS 유전자 시스템을 이용하여 메탄올 생산을 효과적으로 감지할 수 있는 모든 이용을 포함한다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 따른 메탄올을 인지하는 키메릭 유전자 시스템은 메탄올의 양에 비례하여 형광단백질의 발현을 유도하도록 함으로써, 메탄올을 빠르게 감지 및 정량화할 수 있어, 메탄올의 정량적 분석 및 메탄올 생산 감지 등의 목적에 이용할 수 있는 효과가 있다. 본 발명을 통해 0.01% 정도의 저농도의 메탄올도 고감도로 감지 가능하며, 고속 탐색을 통해 미생물 메타게놈 라이브러리로부터 신규 메탄올 생산 균주 및 유전자를 탐색하는 과정에도 본 발명의 효율적 이용이 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS를 이용한 키메릭 시스템의 모식도이다.
- 도 2는 메탄올을 감지하는 플라스미드 pMoxYZ1(a) 및 플라스미드 pOGFP1 리포터 (b)의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 MoxY-EnvZ 융합 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과이다.
- 도 4는 메탄올에 4.5h 노출 후 M9 배지에서 ompC 유전자의 전사 수준에 대한 비교분석 결과(a) 및 다양한 메탄올 농도에 대한 mpC 유전자의 상대적 전사 수준에 따른 선형 관계(b)를 나타낸 것이다.
- 도 5는 다양한 메탄올 농도에 대한 대장균 균주에서의 GEP 형광분석의 시간 경과에 따른 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0034] "∼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.

- [0035] "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.
- [0036] "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.
- [0037] "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 초과와 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.
- [0038] "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.
- [0039] "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(competiting 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 이중 발현 제어 서열과의 연관에 의해 변형됨으로써, 숙주 미생물에 이중성일 수 있다. 일 견지에서, 폴리뉴클레오티드가 숙주 생물체에 이중 발생성인 경우에, 폴리뉴클레오티드는 코돈(codon) 최적화될 수 있다.
- [0040] "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다.
- [0041] "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.
- [0042] "기능" 및 "기능성" 등은 생물학적 또는 효소적 기능을 의미한다.
- [0043] "증가된" 또는 "증가"라는 것은 비변형 미생물 또는 상이하게 변형된 미생물과 같은 대조 미생물에 비해 주어진 산물 또는 분자(예를 들면, 범용 화합물질, 바이오연료 또는 이들의 중간체 산물)를 더 많은 양으로 생산할 수 있는 하나 이상의 재조합 미생물의 능력을 의미한다.
- [0044] "~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.

[0045] "재조합" 미생물은 전형적으로, 예컨대 플라스미드 또는 벡터에 하나 이상의 외래 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0046] "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.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0050] 본 발명은 신규한 키메릭 TCS(two-component system) 유전자 시스템을 이용하여 바이오 메탄을 생산을 감지할 수 있는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 MoxY/X 조절자에 EnvZ/OmpR 시스템을 도입함으로써, 메탄올의 생산을 감지할 수 있는 재조합 미생물을 제조하는 방법 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

[0051] 특히, 대량의 메탄올을 생산할 수 있는 미생물을 스크리닝하기 위한 고속 대량 스크리닝 시스템에 활용할 수 있는, 메탄올 감지 대장균(*Escherichia coli*)을 최초로 구축하였다.

[0052] 본 발명은 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 표준 클로닝 기술 및 통상적인 방법을 이용하여, 두 개의 상이한 유전자적 시스템을 함께 적용시킨 재조합미생물을 배양함으로써 구현할 수 있다. 따라서, 본 발명은 TCS(two-component system) 기반의 메탄올 바이오센서를 구축하는 방법, 재조합 미생물 및 미생물 시스템을 모두 포함한다.

[0053] [TCS를 이용한 키메릭 유전자 시스템의 구축]

[0054] 본 발명은 일 관점에서, Two-component 신호전달 시스템(TCS)을 기반으로 하는, 키메릭(chimeric) 유전자 시스템[MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS] 및 이의 구축 방법에 관한 것이다.

[0055] 구체적으로는, MoxF 유전자를 조절하는 'MoxY/X 조절자'와 EnvZ-OmpR의 두 요소를 재조합시킨 키메릭(chimeric) 유전자 시스템[MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS]에 관한 것으로, 본 발명의 TCS를 이용한 키메릭 시스템의 모식도를 도 1에 도시하였다.

[0056] MoxY/X 조절자가 메탄올을 인지하여 OmpR을 활성화시키면 이에 의해 OmpC 프로모터가 작동하면서 리포터 단백질을 발현시키는 기작으로 작동한다. 즉, MoxY의 센서 히스티딘 키나아제를 EnvZ의 세포질 측막 영역에 융합시키고, OmpR 조절자를 통해 OmpC 프로모터가 작동되도록 TCS 기반으로 설계하였다.

[0057] **MoxY 컴포넌트**

[0058] 상기 MoxY/X 조절자는 인공적으로 합성 또는 이를 함유하는 미생물 유래일 수 있다.

[0059] 글라이세롤(glycerol)을 에너지원으로 이용할 수 있고 메탄올 대사에 관련 있는 메탄올 옥시다제(methanol

oxidase, MOX) 유전자를 조절하는 MoxY/X 조절자는 이를 함유하는 임의의 미생물로부터 수득할 수 있다.

[0060] 예를 들어, 티오미세오스피라 데니트리피칸스(Thiomiceospora denitrificans), 티오바실러스 베르서투스(Thiobacillus versutus), 티오바실러스 타이아시리스(Thiobacillus thiasiris), 티오스페라 팬토티로프(Thiosphaera pantotrophs), 파라코커스 데니트리피칸스(Paracoccus denitrificans), 티오바실러스 데니트리피칸스(Thiobacillus denitrificans) 등으로부터 유래한 MoxY/X 조절자를 이용할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 실시예에서는 파라코커스 데니트리피칸스(Paracoccus denitrificans)에서 유래한, 메탄올이 포름알데히드로 전환되는 과정에 관여하는 MoxF 유전자를 조절하는 MoxY/X 조절자를 이용하였다.

[0062] EnvZ 컴포넌트

[0063] 본 발명에서는 상기 메탄올 대사 관련 Mox 유전자 시스템에 EnvZ-OmpR를 도입한 MoxY/EnvZ(MoxYZ) TCS 구성을 특징으로 한다.

[0064] EnvZ는 용질 농도 변화에 대한 수용체 단백질로서, 원형질막을 관통하며 외막을 향해 주변 세포질로 뻗어나와 있는 막 관통 단백질이다. 리간드가 주변 세포질면에서 결합하면 세포막 안쪽의 구조의 키나아제 부위가 드러나고, ATP를 분해하여 자신의 히스티딘 잔기에 붙이는 자가 인산화를 촉매한다. 그리고, 이러한 인산화로 인한 구조변화로 OmpR과 결합하고 인산화한다.

[0065] 상기 OmpR는 전사인자로 ompC전사를 촉진하는데, OmpC는 세균의 외막에 투입되어 포어들을 차단하고 막 사이 공간으로 용질들이 들어가는 것을 막는다. 상기 ompC 유전자의 발현은 ompR에 의하여 조절된다.

[0066] 본 발명의 방법은 상기 2가지의 컴포넌트를 융합하여 키메릭 MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS를 구축하여 메탄올의 생성 농도에 반응하여 OmpC 프로모터가 작동하면서 리포터 단백질을 발현시키는 기작으로 작동한다

[0067] 즉, (i) 메탄올을 인지하는 MoxYZ 단백질을 코딩하는 MoxYZ 유전자; (ii) 형광 단백질을 코딩하는 유전자 및 항생제 저항성 유전자로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 리포터 유전자; (iii) 하류의 리포터 유전자의 발현을 유도하는 OmpC 프로모터를 포함하는 메탄올 감지용 재설계 유전자 시스템에 관한 것이다.

[0068] 본 발명의 키메릭 유전자 시스템은 메탄올의 양에 비례하여 이와 반응한 MoxYZ 단백질이 OmpC 프로모터의 전사 조절을 매개하여 리포터 단백질의 발현을 유도하도록 함으로써, 최종적으로 메탄올을 정량적으로 분석 가능한 재설계 유전자 시스템라고 할 수 있다.

[0069] 상기 리포터는 형광단백질 및 항생제 저항성 유전자로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0070] 형광단백질로는 바람직하게 GFP, GFPuv, sfGFP 또는 RFP를 사용할 수 있고, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한 본 발명에 사용할 수 있는 형광단백질은 이러한 예에 한정되지 않는다. 항생제 저항성 유전자는 카나마이신, 클로람페니콜, 테트라사이클린 등 항생제에 저항성인 유전자 등 통상의 항생제 저항성 유전자를 사용할 수 있다.

[0071] 일 구체 예로써, 리포터는 형광단백질과 항생제 저항성 유전자 둘 모두로 구성된 이중리포터(dual reporter), 둘 이상의 리포터로 구성된 다중 리포터일 수 있다

[0072] 상기 리포터 단백질의 활성 측정은 미생물 콜로니 이미지 분석, 형광스펙트럼 분석, 형광유세포분석 (FACS), 항생제 내성 측정법을 이용하여 측정할 수 있다.

[0073] [재조합 미생물]

[0074] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 키메릭 MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS을 미생물에 적용한 재조합 미생물(균주) 및 이를 위한 재조합 벡터(플라스미드)에 관한 것이다.

[0075] 본 발명의 MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS을 포함하는 미생물 제작을 위해 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 제작할

수 있다.

- [0076] 박테리아 계놈으로부터 원하는 유전자를 얻는 방법은 분자 생물학 분야에서 일반적이며 잘 알려져 있다. 예를 들어, 당해 유전자의 서열이 공지되어 있는 경우, 적합한 계놈 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. 이중 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.
- [0077] 형질전환(transformation), 형질도입(transduction), 또는 형질감염(transfection))은 전기천공(electroporation), 극미 주입(microinjection), 유전자총(biolistics)(또는 입자 폭격 매개된 전달), 또는 아 그로박테리움 매개된 형질전환 등을 비롯한 다수의 수단 중에서 하나에 의해 달성될 수 있다
- [0078] "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.
- [0079] 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.
- [0080] 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 계놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주 미생물로 형질전환 되면 벡터는 숙주 계놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 계놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로 본 발명에서 플라스미드(plasmid)와 벡터(vector)는 때로 상호 교환적으로 사용된다.
- [0081] 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. 바람직 하게는 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.
- [0082] "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.
- [0083] 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.
- [0084] 통상적으로, 하나 이상의 제한 효소로 DNA 서열 및 벡터를 절단하고 단편들을 함께 결합하여 최종적으로 발현될 DNA 서열을 벡터에 결합시킨다. 제한 효소 소화처리 및 결합은 당업자들에게 익히 알려졌다.
- [0085] 본 발명에 사용되는 단백질을 인코딩하는 적합한 폴리뉴클레오티드는 이를 제공하는 임의의 생물학적 공급원로부터 유래될 수 있고, 이의 동족체는 다양한 자료베이스를 참조하여 확인될 수 있다.
- [0086] 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 단

백질의 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.

[0087] 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.

[0088] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다.

[0089] 본 발명은 다른 태양으로, 상기 MoxY/EnvZ (MoxYZ) TCS를 포함하는 재조합 미생물 또는 재조합 균주에 관한 것이다.

[0090] 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.

[0091] 특히, EnvZ-OmpR 작동 회로를 포함하는 임의의 미생물을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0092] 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), 한세룰라(Hansenula), 사카로마이세스(Saccharomyces) 및 클루이베로마이세스(Kluyveromyces)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 속에 속하는 미생물을 사용할 수 있다.

[0093] 이 중, 가장 바람직하게는 주위 환경의 용질 농도 증가 신호에 대한 반응에 있어서 앞서 설명한 EnvZ, OmpR, 및 OmpC가 관여하는 반응 회로를 함유하고 있는 에스케리키아 콜리(E. coli, 대장균)를 사용한다..

[0094] 상기 대장균 균주로는 예를 들어, K-12 균주들(C600, DH5 α, ER2925, JM110, MG1655, S17-1, T1R(One shot(R) ccdB SurvivalTM2 T1R, Invitrogen), TG1, TOP10, W3110, XL1-Blue), B 균주(BL21(DE3), W 균주, K-12와 B 균주의 하이브리드 (HB101)) 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 XL1-Blue 및 BL21을 이용하였다.

[0095] 본 발명에 따르면 메탄올 감지 재설계 유전자시스템을 적합한 미생물 숙주내로 형질전환(transformation)시키는 데, 형질전환의 효율을 높이기 위해서, 바람직하게 전기천공법(electroporation)을 사용할 수 있다.

[0096] [메탄올 감지]

[0097] 상기 유전자 시스템로 형질전환된 미생물은 메탄올을 감지할 수 있는 감지 미생물(sensing microorganism)이 된다. 바람직하게는, 감지 반응을 최적화하기 위하여 세포생장-재설계 유전자회로의 활성화 단계가 분리되도록 기질 첨가시기를 조절할 수 있다. 예를 들어, 기질 처리 단계는 영양배지에서 성장된 건강한 미생물을 회수하는 단계 및 회수된 미생물을 최소배지에서 기질로 처리하는 단계로 이루어질 수 있다.

[0098] 메탄올을 감지하는 재설계 유전자 시스템을 함유한 재조합 미생물에 임의의 메탄올을 처리하면 세포내 효소유전자의 기능 및 활성도에 따라서 상기 화합물의 농도가 변화하게 된다. 따라서 메탄올의 발현유도 기능에 의한 형광, 항생제저항성 등 리포터의 정량적 증가를 형광분석기, 항생제저항성 등 다양한 측정기술을 이용하여 탐색하면 세포내외의 메탄올을 고감도로 감지 및 정량할 수 있는 새로운 측정방법을 제공하게 된다

- [0099] 배지
- [0100] 본 발명에서 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.
- [0101] 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.
- [0102] 적절한 탄소 공급원 외에, 배지는 적합한 미네랄, 염, 보조 인자, 완충액 및 메탄을 생성에 필요한 효소 경로의 촉진 및 배양물의 성장에 적합한, 당업자에게 공지된 기타 성분을 포함할 수 있다.
- [0103] 배양 조건
- [0104] 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 텍스트로스(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.
- [0105] 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, 특히, 호기 조건이 바람직하다.
- [0106] 산업적 배치 및 연속 발효
- [0107] 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.
- [0108] 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 억제제가 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.
- [0109] 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.
- [0110] 연속식 발효는 세포 성장 또는 최종 생성물 농도에 영향을 주는 하나의 인자 또는 임의의 개수의 인자의 조절을 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, 배치 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.

[0111] 본 발명은 배치식, 유가식 또는 연속식 공정 중 어느 하나를 이용하여 실시될 수 있다.

[0112] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 재조합 미생물을 이용하는 것을 특징으로 하는 메탄올 감지 방법을 제공한다.

[0113] 일 구체예로서, 본 발명은 (a) 상기 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메탄올 함유가능성 있는 샘플을 접촉시키는 단계; 및 (b) 메탄올을 감지하여 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하여 메탄올의 존재 여부를 감지하는 단계를 포함하는 메탄올의 감지 방법에 관한 것이다.

[0114] 다른 구체예로서 본 발명은 (a) 상기 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메탄올을 함유하는 샘플을 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 샘플 내에 존재하는 메탄올에 의해 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하여, 샘플 내에 존재하는 메탄올을 정량하는 단계를 포함하는 메탄올의 정량 방법에 관한 것이다.

[0115] 특히, 세포의 메탄올 농도의 0.01%까지 ompC 유전자의 전사 수준은 점차적으로 증가하고, 메탄올 농도 및 상대적 전사 수준 간의 상관관계는 0.001% 내지 4.0% 유도 범위의 메탄올 농도에서 음성적(negative)으로 나타난다.

[0116] 또한, 본 발명은 또 다른 구체예로서, 다음 단계를 포함하는 메탄올 생산균주의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0117] (a) 제17항의 메탄올 감지용 재조합 미생물과 메타게놈 라이브러리 샘플을 접촉시키는 단계;

[0118] (b) 상기 샘플 내에 존재하는 메탄올에 의해 발현이 유도된 리포터 단백질의 활성을 분석하여, 샘플 내에 메탄올을 정량하는 단계; 및

[0119] (c) 메탄올이 함유된 샘플에 함유된 균주를 메탄올 생산균주로 선별하는 단계.

[0120] 상기 메탄올 감지용 재조합 미생물과 상기 메타게놈 라이브러리 샘플을 접촉시키는 단계는 메타게놈 라이브러리의 균주와 메탄올 감지용 재조합 미생물을 공배양하거나, 상기 메탄올 감지용 재조합 미생물에 상기 메타게놈 라이브러리에 포함된 균주의 배양액을 처리하여 수행할 수 있다.

[0121] 이와 같이, 본 발명은 메탄올을 생물학적 방법으로 생산하는데 있어서의 메탄올 생산균을 고효율로 탐색할 수 있는 메탄올 바이오센서에 관한 기술로서, 고속 대량 스크리닝 시스템에 매우 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

[0122] <실시예>

[0123] 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.

[0124] 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.

[0125] 재료 및 방법

[0126] 1. 박테리아 균주 및 배양 조건

[0127] *E. coli* XL-Blue 및 BL21 (DE3) 균주를 재조합 DNA 조작 및 재조합 단백질의 발현을 위한 숙주 균주로서 사용하였다. 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드를 표 1에 기재하였다. *E. coli* 균주를 LB(Luria-Bertani) 브로스 (10 g/L 박토-트립톤, 5 g/L bacto-yeast extract, 5 g/L NaCl) 및 4 g/L of 글루코오스, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂ 와 1% 티아민 HCl로 보충된 M9 최소 염 배지(Sigma)에 37°C에서 강하게 흔들어 호기성 조건에서 성장시켰다.

[0128] [표 1]

<i>Escherichia coli</i> strains		
BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT gal dem lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen
XL1- Blue	<i>SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gvrA96 thi relA1 lac F'(proAB⁺ lacF^R lacZΔM15 Tn10 (tet^R))</i>	Stratagene
Plasmids		
pUC19	Amp ^R	New England Biolabs ^a
pOGFP1	<i>ompC</i> 프로모터 및 <i>gfp</i> 유전자, Amp ^R 함유하는 pUC19,	This work
pACYCDuet-1	Cm ^R	Novagen
pMoxYZ1	키메라 <i>moxY-envZ</i> 유전자, Cm ^R 함유하는 pACYCDuet-1	This work

^aNew England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.

[0129]

[0130] 2. 키메라 MoxYZ TCS 플라스미드 구축 및 *ompC* 유전자 프로모터 하 *gfp* 유전자의 발현

[0131] 플라스미드 pMoxYZ1 및 pOGFP1는 T7 프로모터 하 MoxYZ 키메라 HK 및 *ompC* 유전자 프로모터 하 *gfp* 유전자를 각각 발현한다. *moxY* (720 bp)의 상기 주변 세포질(periplasmic) 센서 도메인 및 *envZ* (687 bp)의 세포질 촉매 도메인을 *P. denitrificans* 및 *E. coli* XL1-Blue 염색체 DNA로부터 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0132] PCR 산물을 낮은 카피 수의 플라스미드 pACYCDuet-1 내로 SacI 및 HindIII 제한효소 부위를 이용하여 클로닝하여 pMoxYZ1 플라스미드를 구축하였다(Fig. 2B).

[0133] pMoxYZ1의 발현을 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(thiogalactopyranoside) (IPTG)의 첨가에 의해 T7 프로모터 조절 하 유도하였다.

[0134] 250 bp의 *ompC* 프로모터 유전자를 함유하는 게놈 영역을 올리고뉴클레오타이드 OmpC_F_EcoRI 및 OmpC_R_BamHI로 *E. coli* XL1-Blue 염색체 DNA로부터 증폭시켰다 (표 2).

[0135] 상기 프로모터의 이러한 부분은 OmpR-P (Nara et al. 1986)에 대한 모든 3개의 공지된 결합부위 및 전체-길이의 염색체 프로모터에 존재하는 4개의 nine LRP-결합 부위를 포함한다(Ferrario et al. 1995). GFP-mut3.1b 를 인 코딩하는 상기 *gfp* 유전자도, 올리고뉴클레오타이드 GFPm_F_BamHI 및 GFPm_R_SalI로 pET21a 플라스미드로부터 (Ayyadurai et al. 2009) 동시에 증폭시켰다 (표 2). 그 후, *ompC* 프로모터를 OmpC_F_EcoRI 및 OmpC_R_SalI를 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰다.

[0136] [표 2]

Name	Sequence
OmpC_F_EcoRI	5'-GAATTCCTTGAATTATTATTGCTTGATG-3' (서열번호 1)
OmpC_R_BamHI	5'-GGATCCGTTATTAACCCCTCTGTTATAT-3' (서열번호 2)
GFPm_F_BamHI	5'-GGATCCCATATGCAGTCTAAAGGAGAA-3' (서열번호 3)
GFPm_R_SalI	5'-GTCGACCTCGAGTTATTAATGGTGAT-3' (서열번호 4)
MoxY_F_SacI	5'-GAGCTCATGGGGCTGGCCTGCGCC-3' (서열번호 5)
MoxY_R_PstI	5'-CTGCAGCGCGATGCGCGAGCGCTC-3' (서열번호 6)
EnvZ_F_PstI	5'-CTGCAGATGGCGGCTGGTGTAAAGCAA-3' (서열번호 7)
EnvZ_R_HindIII	5'-AAGCTTTTACCCCTCTTTTGTCTGCGCC-3' (서열번호 8)
OmpC_RT_Fwd	5'-CTTCAAAGGTGAAACTCAGGTTACTG-3' (서열번호 9)
OmpC_RT_Rev	5'-GTTGCCCTGGATCTGATAATCC-3' (서열번호 10)

^aRestriction enzyme sites are shown in bold.

[0137]

[0138] 그리고, ompC 프로모터를 gfp 유전자와 라이게이션시키고, ompC 프로모터 pUC19 플라스미드에 클로닝하여(NEB, USA) (Sambrook and Russell, 2001) pOGFP1 (도 2C)를 구축하였다.

[0139] 3. qRT-PCR에 의한 ompC 유전자 발현의 모니터링

[0140] 메탄올에 대한 반응에서 ompC 유전자의 전사적 활성을 pMoxYZ1을 수득하는 E. coli 세포에서 qRT-PCR에 의해 측정하였다. 단일 콜로니의 E. coli BL21 (DE3) (pMoxYZ1)를 LB 배지에서 37℃ 하 밤새 성장시켰다. 그리고 나서, 신선한 M9 배지에서 100-배로 희석시키고 600 nm (OD600)에서의 광학 농도(optical density)가 0.5에 도달할 때까지 250 rpm에서 오르비탈 셰이커(orbital shaker)에서 37℃ 하 배양하였다.

[0141] 그 후, 10 μM IPTG를 배양물에 첨가하고 세포들을 메탄올의 다양한 농도 조건에서 30℃ 하 추가로 4.5 시간 동안 호기성 조건에서 성장시켜 새롭게 구축된 키메라 MoxYZ/OmpR TCS의 역학 관계를 평가하였다.

[0142] 4.5 시간 후, 세포들을 RNeasy Mini kit(Qiagen)를 이용하여 전체 RNA 준비를 위해 원심분리에 의해 수거하고 DNase 처리를 이어서 수행하였다. cDNA 합성 키트(Applied Biosystems, USA)로 임의의 헥사머 믹스를 이용하여 역전사를 수행하였다. OLIGO 소프트웨어 (version 5.0; Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA)로 특이적 프라이머를 디자인하여 ompC 유전자 및 16sRNA의 정량적 발현에 사용하였다(표 2).

[0143] RT 단계 생략을 위한 샘플을 음성 대조군으로 사용하여 추출된 RNA가 DNA로 오염되지 않았음을 명확히 하였다. qRT-PCR 반응을 SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 Mini Opticon 검출 시스템 상에서 수행하였다. 각 qRT-PCR 실험을 샘플에 대해 3회씩 수행하고(n=3) 내부 대조군으로서 16sRNA를 이용하는 Mini-Opticon software에 의해 자동적으로 계산하였다 (Eleaume and Jabbouri 2004).

[0144] 4. 형광법에 의한, ompC 유전자 프로모터 하 gfp 발현의 모니터링

[0145] 단일 콜로니의 E. coli BL21 (DE3) (pMoxYZ1 and pOGFP1)를 37℃ 하 LB 배지에서 밤새 성장시켰다. 배양물을 적절한 항생제[100 μg/mL 암피실린 및 25 μg/mL 클로람페니콜 E. coli BL21 (DE3) (pMoxYZ1 and pOGFP1)]로 보충된 신선한 M9 배지에서 100-배 희석시키고 250 rpm에서의 광학 농도가 600 nm (OD600)에서 0.5에 도달할 때까지 오르비탈 셰이커에서 37℃ 하 호기성 조건에서 배양하였다.

[0146] 그 후, E. coli BL21 (DE3) (pMoxYZ1 및 pOGFP1)를 호기성으로 30℃에서 각각 배양하였다. 10 μM IPTG를 E. coli BL21 (DE3) 배양 배지에 첨가하여 키메라 HK의 발현을 유도하였다.

[0147] 8시간의 배양 동안 세포 밀도 및 형광을 다양한 농도의 메탄올에서 측정하였다. 세포 밀도를, 600 nm에서 분광

광도계(Shimadzu, Japan)로 광학 밀도를 측정함으로써 모니터링하였다.

[0148] GFP 형광은 RF-5301PC 분광 형광계(Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다. 분광형광계의 여기 파장(excitation wavelength)은 485/10 nm으로 세팅하였고 방출 파장(emission wavelength)은 515/10nm로 하였다. SFI (specific fluorescence intensity)를, 각 시점에서 측정되는 600nm에서의 광학 밀도에 의해 나누어지는 상대적 형광 유닛(relative fluorescence units)에서 발현되는 원 형광 강도(raw fluorescence intensity)로서 정의하였다. 최소한, 3회의 측정치를 각 샘플로부터 획득하였다.

[0149] **실시예 1 : 키메라 MoxY/EnvZ TCS의 구축 및 발현**

[0150] *Paracoccus denitrificans*에서, *moxY/moxX*는 세포의 메탄올을 인지하였고 *moxZ* 유전자의 발현을 유도하였다. *E. coli* 에서 메탄올의 센서를 가지고 호기성 바이오센서(aerobic biosensor)로 사용하기 위해, 보다 강화된 출력 신호를 획득하여 키메라 TCS 전략법을 적용하였다(도 1).

[0151] *moxY*의 주변세포질 센서 도메인 및 *EnvZ* 의 세포질 촉매 도메인을 통합하여 MoxYZ 키메라 HK를 구축하였다. 더 높은 출력 신호가 요구되지만, 멤브레인 결합 MoxYZ 키메라 HK의 높은 수준 발현은 결과적으로 세포 멤브레인의 불안정 또는 세포 활성의 감소를 가져온다. 그러므로, MoxYZ 를 매우 낮은 카피 수 백터, pACYCDuet-1내로 클로닝하였다.

[0152] 상기 p MoxYZ 1의 발현 (도 2A)을 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 그 결과, MoxYZ가 다양한 농도의 IPTG에 의해 호기성 조건 하 발현함을 보여주었다 (도 3).

[0153] **실시예 2 : qRT-PCR 을 이용하는, 키메라 MoxY /EnvZ TCS에 의해 조절된 ompC 유전자 발현의 모니터링**

[0154] *EnvZ/OmpR* TCS에 의해 유도된 *ompC* 유전자 발현을 평가하기 위하여, 다양한 농도의 메탄올로 보충된 최소 배지에서 MoxYZ 키메라 HK를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다

[0155] qRT-PCR의 결과는 점차적으로 *ompC* 유전자의 전사 수준이 점차적으로 세포의 메탄올 농도의 0.01%까지 증가하였고, 추가로 메탄올 농도의 증가에 의해 감소하기 시작하는 것을 보여주었다. 메탄올 농도 및 상대적 전사 수준 간의 상관관계는 0.001% 내지 4.0% 유도 범위의 메탄올 농도에서 음성적(negative)으로 평가되었다 (도 4).

[0156] 이는 *ompC* 유전자 발현이 키메라 MoxYZ에 의해 세포의 메탄올의 낮은 농도에 반응하여 꽤 정확히 조절됨을 시사한다. 호기적으로, *E. coli*에서 키메라 MoxYZ /*OmpR* TCS는 *ompC* 유전자의 발현을 유도하기에 충분히 강한 출력 신호를 생성한다.

[0157] 이는 *ompC* 유전자 발현이 호기적 조건에서 세포의 메탄올 농도에 반응하여 키메라 MoxYZ에 의해 정확하게 조절됨을 의미한다.

[0158] **실시예 3: 형광분석법에 의한, 키메라 MoxY/EnvZ TCS에 기반한 gfp 유전자 발현의 모니터링**

[0159] qRT-PCR 결과는 메탄올 존재에 반응하는 정확한 *ompC* 발현을 보여주었다; 형광법-기초의 메탄올 바이오센서 시스템을 *ompC* 프로모터를 이용하여 구축하였다.

[0160] pOGFP1 리포터 플라스미드를 구축하기 위해, *gfp* 유전자를 *ompC* 프로모터의 다운스트림에 클로닝하고, GFP를 *ompC* 프로모터의 조절 하 발현시켰다 (도 2B).

[0161] pMoxYZ1 및 pOGFP1가 잠복하는(harboring) *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 메탄올의 다양한 농도로 호기적으로 배양하고 형광을 측정하였다.

[0162] 그 결과, pMoxYZ1 및 pOGFP1 대신 pACYCDuet-1 및 pUC19를 함유하는 대조군 균주에서 무시할 수 있을 정도의 양의 형광을 획득하였다 (도 5).

[0163] IPTG 유도자가 첨가되지 않더라도, 낮은 수준의 형광이 관찰되었고, 이는 *ompC* 프로모터 발현의 기저 수준때문일 것으로 보인다. 시간 프로파일은 배양 시간이 증가함에 따라 형광도 증가하는 것을 보여주었다(도 5).

[0164] 최대 형광은 오직 0.01% 의 메탄올 유도일 때 획득되었고 더 높은 유도 농도에서는 감소되었다. 8h의 끝부분

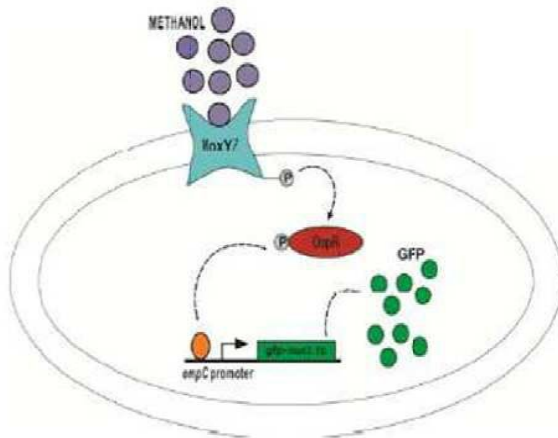
에, 최대 형광이 오직 0.01% 메탄올 유도에서 나타났다.

[0165] 이와 같이, 본 발명은 메탄올 감지 방법으로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

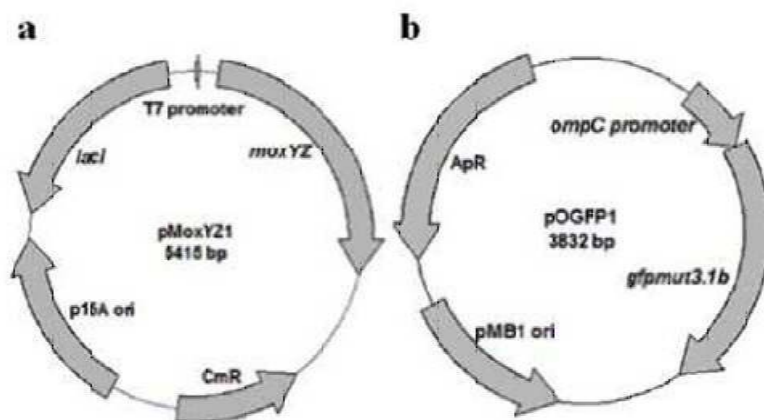
[0166] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

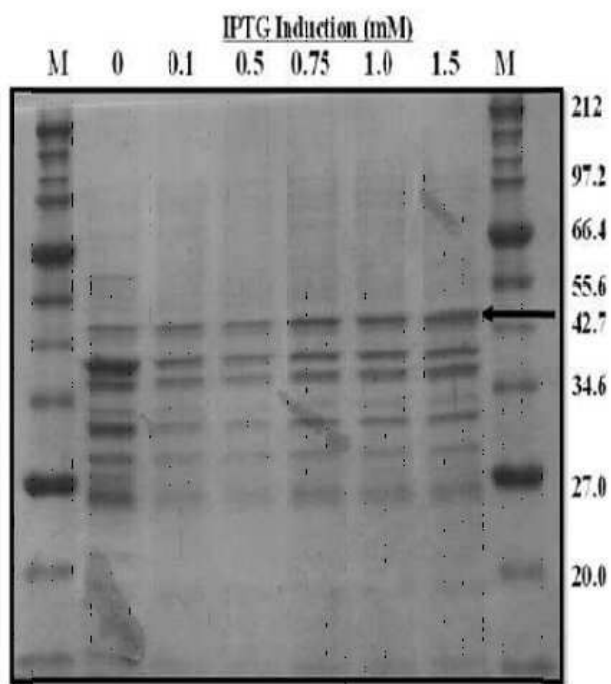
도면1



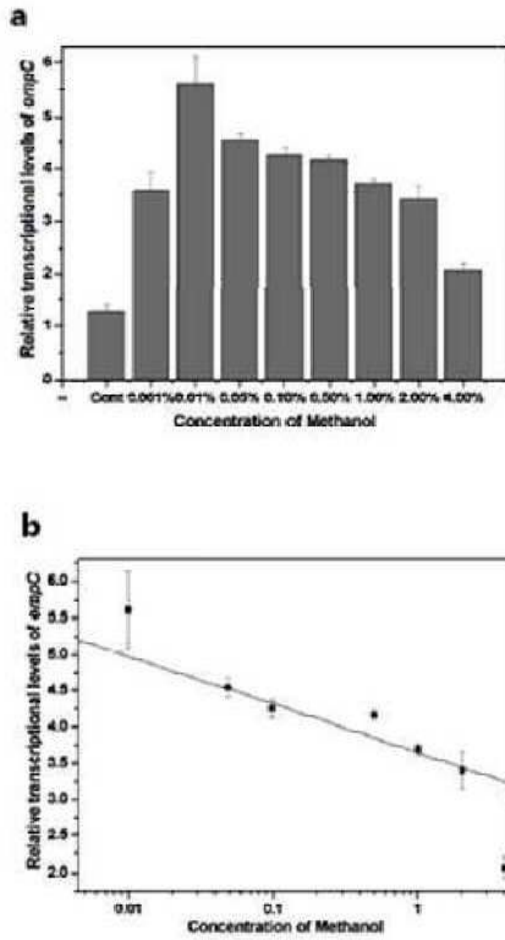
도면2



도면3



도면4



도면5

