



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0123088
(43) 공개일자 2016년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/0059 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0053189
(22) 출원일자 2015년04월15일
심사청구일자 2015년04월15일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최유성
대전광역시 대덕구 대전로1020번길 86, 1동 1108호 (오정동, 영진로알아파트)
김혜린
대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 1607호 (복수동, 삼익목화아파트)
연영주
서울특별시 동대문구 이문로8길 33 (회경동)
(74) 대리인
김순웅

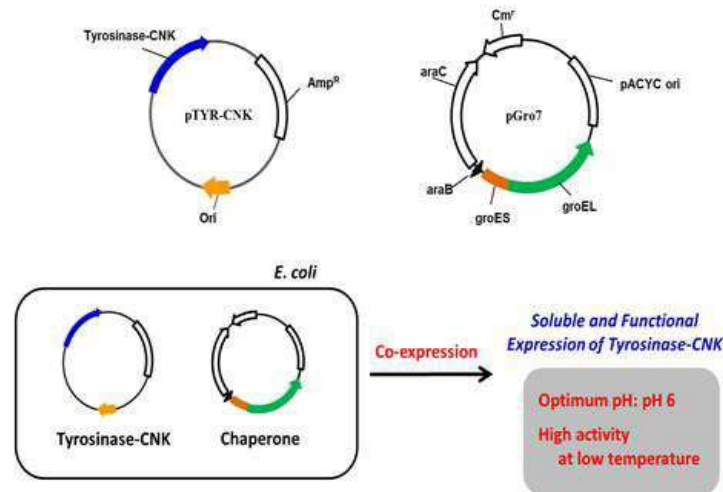
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 재조합 티로시나아제

(57) 요약

본 발명은 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 재조합 티로시나아제에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 재조합 티로시나아제는 기존의 티로시나아제와 달리 저온 내지 상온 및 약산성 pH 에서도 높은 활성을 나타내는 새로운 생화학적 물성을 나타내므로, 기존 티로시나아제가 활성을 나타내지 못하는 환경에서 새로운 효소로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Y 110/03001 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 재조합 티로시나아제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화 서열인, 재조합 티로시나아제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 캔디다투스 니트로소푸밀루스 코렌시스(*Candidatus Nitrosopumilus Koreensis*) 유래인, 재조합 티로시나아제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 티로시나아제는 0 내지 25℃의 저온 또는 상온에서 활성인 것을 특징으로 하는, 재조합 티로시나아제.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 티로시나아제는 pH 4 내지 pH 9에서 활성인 것을 특징으로 하는, 재조합 티로시나아제.

청구항 6

서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 아미노산을 포함하는 티로시나아제 기질 분해용 조성물.

청구항 7

0 내지 25℃의 저온에서 제1항의 재조합 티로시나아제를 처리하는 단계; 를 포함하는 저온 환경 티로시나아제 기질 분해 방법.

청구항 8

서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 10

제9항의 벡터로 형질 전환된 형질전환체.

청구항 11

- 1) 제10항의 형질전환체를 배양하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 형질전환체로부터 티로시나아제를 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 재조합 티로시나아제의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 재조합 티로시나아제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 티로시나아제 (Tyrosinase)는 리그닌의 분해에 관여하는 락케이즈(laccase) 및 무척추동물의 호흡에 필요한 헤모시아닌(hemocyanin) 등과 비슷하게 분류되며, 활성 부위(active site)에 구리를 함유하고 있는 type-3 구리 효소(monophenol monooxygenase, EC. 1.14.18.1)로 알려져 있다. 티로시나아제는 멜라닌 생합성의 초기단계인 L-티로신(L-Tyr)을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)로 전환하고 L-DOPA를 도파퀴논(Dopaquinone)으로 변환하는 촉매로, 멜라닌의 생합성 초기 단계에 중요하게 관여하고 있다. 기본적으로 멜라닌은 세포를 자외선과 활성 산소 그리고 독성을 띄는 중금속으로부터 보호하는 역할을 한다. 티로시나아제에 기반을 둔 멜라닌화 반응은 사과, 감자, 바나나와 같은 식물이 절단되어 공기 중에 노출되었을 때 절단면의 갈변 현상을 일으키는 등의 방식으로 상처 치료 및 1차 면역 반응에 관여한다. 동물의 경우, 피부, 털, 눈동자의 색깔에 영향을 주고 피부의 갈색 색소침착 또는 상처 부위의 경화에 관여하기도 한다. 또한, 티로시나아제는 다양한 형태의 일페놀형(monophenolic) 또는 이페놀형(diphenolic) 화합물을 반응 기질로 사용하여 퀴논(quinone)으로 전환하는 데 사용할 수 있다.

[0003] 따라서 티로시나아제는 멜라닌화를 위한 페놀형(phenolic) 화합물의 산화 반응을 촉매할 뿐만 아니라, 페놀을 함유하는 폐수나 오염수의 정화, 린코마이신(lincomycin)과 같은 항생제의 생합성, 파킨슨 질환 치료제 등의 의약품 재료로 활용될 수 있는 L-DOPA의 생산, 페놀형(phenolic) 화합물의 양을 측정하기 위한 바이오센서 단백질 및 당의 가교(cross-linking) 등 다양한 분야에서 널리 활용되고 있다.

[0004] 티로시나아제는 다양한 생명체에서 생산될 수 있는 것으로 알려져 있으며 대체적으로 박테리아의 경우 모노머 단백질로 분자량이 약 20~60 kDa 정도이고, 약 7.5의 최적 pH와 40℃에서 반응 최적 온도를 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 그러나 티로시나아제가 매우 다양한 분야에서 활용되어 다양한 환경 조건에서 효과적으로 그 활성을 발현할 수 있는 새로운 티로시나아제에 관한 필요성이 있음에도 불구하고 아직까지 새로운 활성 조건 및 특징으로 갖는 새로운 티로시나아제에 대한 연구가 많이 보고되지 않아 이와 같은 티로시나아제에 대한 필요성이 있다.

[0006] 또한 이와 같은 티로시나아제를 생산하기 위한 다양한 방법이 연구되었으나, 제조된 티로시나아제가 상대적으로 낮은 온도 안정성과 용해도를 나타내거나 다른 형태의 이형으로 존재하는 등의 보고가 있었다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 재조합 방법을 이용하여 티로시나아제를 생산하기 위한 시도 역시 있었으나 인간 티로시나아제를 대장균에서 재조합하여 생산하는 경우 inclusion body를 형성하고 불용성 형태로 대부분 생산되는 등의 문제점이 있어 유용한 티로시나아제를 재조합 방법으로 효과적으로 생산하는 방법에 대한 필요성 역시 높은 상태이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 새로운 재조합 티로시나아제를 생산하기 위한 연구를 수행하던 중, 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아를 이용하여 기존 티로시나아제와 달리 약산성 pH 및 저온에서 높은 활성을 갖는 새로운 재조합 티로시나아제 및 이의 생산방법을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서 본 발명의 목적은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 재조합 티로시나아제 및 이의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 재조합 티로시나아제를 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 아미노산을 포함하는 티로시나아제 기질 분해용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 0 내지 25℃ 의 저온 또는 상온에서 상기 재조합 티로시나아제를 처리하는 단계; 를 포함하는 저온 환경 티로시나아제 기질 분해 방법을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 상기 형질전환체로부터 티로시나아제를 분리 및 정제하는 단계; 를 포함하는 재조합 티로시나아제의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 신규한 재조합 티로시나아제는 기존의 티로시나아제와 달리 저온 내지 상온 및 약산성 pH 에서도 높은 활성을 나타내는 새로운 생화학적 물성을 나타내므로, 기존 티로시나아제가 활성을 나타내지 못하는 환경에서 새로운 효소로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1 은 티로시나아제 발현 벡터 pTYR-CNK의 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 2는 벡터 pTYR-CNK 및 샤페론 단백질을 동시에 발현할 수 있는 벡터 pGro7을 공동 발현할 수 있는 대장균의 제조 및 이에 의한 단백질 발현 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 3은 정제된 재조합 티로시나아제 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 pH 변화에 따른 재조합 티로시나아제의 상대적 L-DOPA 분해 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 pH 변화에 따른 재조합 티로시나아제의 상대적 L-티로신 분해 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 0 내지 60℃ 온도 변화에 따른 재조합 티로시나아제의 활성 변화를 MBTH 방법을 통해 특정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 재조합 티로시나아제를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 재조합 티로시나아제는 기존의 티로시나아제와 달리 저온 내지 상온 및 약산성 pH 에서도 높은 활성

을 나타내는 새로운 생화학적 물성을 나타내는 신규한 티로시나아제이다.

- [0020] 상기 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화 서열인, 재조합 티로시나아제이다.
- [0021] 용어 "코돈 최적화"란, 숙주 세포에서 이중 재조합 단백질을 보다 효과적으로 제조하기 위하여, 드물게 존재하는 코돈을 숙주세포에서 이중 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 중 자주 존재하는 코돈으로 변형시키고, 상기 숙주세포를 재조합 단백질을 암호화하는 핵산으로 형질전환시킨 후 재조합 뉴클레오티드를 발현시키는 것을 말한다. 이중발현 시스템에서 이와 같은 최적화는 외래 단백질을 생성시킬 수 있는 숙주의 능력을 개선시킬 수 있다.
- [0022] 용어 "재조합"이란 폴리뉴클레오티드에 사용되는 경우에 있어서, 시험관내 클로닝, 제한효소 절단 및/또는 결찰 단계, 그리고 숙주 세포 내에서 잠재적으로 발현될 수 있는 구조체를 야기하는 다른 과정의 다양한 조합을 의미한다.
- [0023] 상기 서열번호 1의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래일 수 있으며, 바람직하게는 캔디다투스 니트로소푸밀루스 코렌시스(*Candidatus Nitrosopumilus Koreensis*) 유래일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 재조합 티로시나아제는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 및 이와 기능적 동등성이 있는 상동성 폴리뉴클레오티드에 의하여 제조되는 모든 티로시나아제를 제한없이 포함할 수 있다. 상기 상동성 폴리뉴클레오티드란, 두 개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 유사한 또는 상호 교환 가능한 서열을 지칭한다. 바람직하게는, 상동성인 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열에 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 95%, 더 바람직하게는 97%, 더 바람직하게는 98%, 더더욱 바람직하게는 99%의 서열 동일성을 갖는 것을 말하며, 이와 같은 상동성 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 코돈 최적화 서열에 의해 상기 조건을 만족하게 되는 폴리뉴클레오티드 서열 역시 모두 제한없이 포함할 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명의 재조합 티로시나아제는 저온 또는 상온에서 활성인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 -10 내지 35℃, 더욱 바람직하게는 0 내지 25℃, 더더욱 바람직하게는 20℃ 부근의 상온에서 높은 활성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0026] 또한 본 발명의 재조합 티로시나아제는 최적 pH 에서 가장 높은 활성을 나타낼 수 있고, 이와 같은 최적 pH는 pH 4 내지 pH 10, 더욱 바람직하게는 pH 5 내지 pH 8, 더욱 바람직하게는 pH 6 내지 7일 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 암호화되는 아미노산을 포함하는 티로시나아제 기질 분해용 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 아미노산은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 이의 기능적 동등성이 있는 상동성 폴리뉴클레오티드에 의하여 제조되는 모든 아미노산을 제한없이 포함할 수 있다.
- [0029] 또한 상기 아미노산은 재조합 티로시나아제의 구조 또는 기능에 유의한 영향이 없는 한, 이의 일부 서열이 변형된 것일 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명은 0 내지 25℃의 저온에서 상기 재조합 티로시나아제를 처리하는 단계; 를 포함하는 저온 환경 티로시나아제 기질 분해 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에 따른 저온 환경 티로시나아제 기질 분해 방법은 보다 구체적으로 -10 내지 35℃, 더욱 바람직하게는 0 내지 25℃, 더더욱 바람직하게는 20℃ 부근의 상온에서 높은 활성을 나타내는 티로시나아제를 저온 환경에 존재하는 기질에 처리함으로써 그 활성을 이용하여 목적하는 효소의 기능을 달성하도록 하는 방법을 말한다. 본 방법에 의하면 기존의 티로시나아제 효소들이 효소 활성을 나타내지 못했던 저온 또는 상온의 환경에서도 티로시나아제를 이용한 목적을 달성할 수 있으므로 다양한 유용성이 있는 티로시나아제의 적용 가능 환경을 확장할 수 있는 장점이 있다.
- [0032] 본 발명의 저온 환경 티로시나아제 기질 분해 방법이 적용될 수 있는 기질은, 티로시나아제의 활성을 이용하여 분해될 수 있는 당 분야에 알려진 기질이 제한없이 포함될 수 있고, 예컨대 monophenol, diphenol, 바람직하게는 티로신 또는 DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine), 더욱 바람직하게는 L-티로신 또는 L-DOPA 일 수 있다.
- [0033] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 앞서 언급한 서

열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드와 등가물을 말한다.

[0034] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0035] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩서열과 특정 숙주생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 이와 같은 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비 형질전환 세포와 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 카나마이신, 블레오마이신, 클로로앰피니콜, 앰피실린과 같은 항생제 유전자가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0037] 용어 "형질전환체"는 숙주세포에 새로운 목적 폴리뉴클레오티드가 도입된 것을 말하며, 숙주세포는 대장균, 효모, 동물, 식물 세포 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0038] 또한 본 발명은 1) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 상기 1) 단계의 형질전환체로부터 티로시나아제를 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 재조합 티로시나아제의 생산 방법을 제공한다.

[0039] 보다 구체적으로, 상기 생산방법은 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드를 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 티로시나아제 발현벡터를 제조하고 이를 샤페론 단백질을 동시에 발현할 수 있는 벡터와 함께 공동발현되도록 대장균에 함께 형질전환시키고, 형질전환된 대장균을 50 µg/mL 앰피실린, 34 µg/mL 클로로앰피니콜, 0.5 mg/mL L-아라비노스(Arabinose)가 첨가된 통상의 37°C, LB 배지에서 진탕 배양하고, IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 1 mM)를 첨가하여 상기 재조합 티로시나아제 단백질의 발현을 유도하는 단계, 이를 다시 배양한 후 파쇄하고 이를 수용성 분액과 불용성 분액으로 나눠 컬럼을 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하여 이루어질 수 있다. 상기 샤페론 단백질을 동시에 발현할 수 있는 벡터는 숙주세포에서 티로시나아제와 동시에 발현될 수 있도록 설계된 통상의 샤페론 단백질을 제한없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 groES-groEL 샤페론 단백질을 포함하는 pGro7 벡터일 수 있다.

[0040] 상기 생산방법에 따르면, 유용물질인 재조합 티로시나아제가 대장균에서 inclusion body를 형성하지 않으며 수용성으로 과량 발현되어 검출될 수 있으므로 대량 생산이 가능하다는 장점이 있다.

[0041] 상기와 같이 생산된 재조합 티로시나아제는 페놀성 화합물이 포함되어 있는 기능성 의약품 및 생체 재료의 생산에 다양하게 활용될 수 있으며, 환경에 유해한 독성을 띄는 페놀성 화합물의 환경 정화 공정에 특화되어 이용될 수 있다. 또한 바이오소재 제조에 활용될 수 있을 뿐만 아니라 특히 산성 pH 및 저온, 상온 조건에서 활성을 가지는 새로운 특징을 가지고 있어 자연적인 산화를 방지하며 원하는 반응만을 진행할 수 있다.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0043] 실시예 1. 재조합 티로시나아제 발현 벡터의 제조

[0044] 해양 극지 암모니아 산화 관련 박테리아 유래의 재조합 티로시나아제를 제조하기 위하여 이의 유전자를 코돈 최적화하여 합성하고 이를 포함하는 발현 벡터를 제조하였다. 보다 구체적으로 다음과 같이 제조하였다.

[0045] 티로시나아제 서열은 Genebank AFS80363로 등록된 서열번호 1의 서열을 사용하였다. 이를 대장균에서 대량 발현하기 위하여 mRNA 서열의 일부를 코돈 최적화한 DNA 서열(서열번호 2)를 화학 합성하였다. 최적화된 DNA의 양 말단에는 NdeI, XhoI의 제한효소 사이트를 첨가하고 발현용 프로모터 T7을 포함하는 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 티로시나아제 발현 벡터를 제조하였다. 발현 벡터에는 재조합 단백질의 정제를 위하여 C-말단에 6개의 히스티딘 서열로 이루어진 히스티딘 태그(histidine tag, HHHHHH)가 포함되도록 하였으며, 유전자 도입을 확인하기 위하여 앰피실린 저항성 유전자가 포함되도록 하였다. 제조된 티로시나아제 발현 벡터 pTYR-CNK의 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0046] 실시예 2. 재조합 티로시나아제 발현 벡터를 포함하는 형질전환체의 제조

[0047] 상기 벡터에 포함된 티로시나아제를 효과적으로 발현하기 위하여 실시예 1에서 제조한 벡터 pTYR-CNK 및 샤페론 단백질을 동시에 발현할 수 있는 벡터 pGro7을 공동 발현할 수 있는 대장균을 제조하였으며, 이의 모식도를 도 2에 나타내었다.

[0048] 도 2에 나타낸 바와 같이, 티로시나아제 유전자를 포함하고 있는 벡터 pTYR-CNK와 샤페론 벡터 pGro7을 함께 도입하기 위하여, 두 개의 벡터를 동시에 42℃에서 1분 30초간 열충격을 가하여 대장균 BL21(DE3)에 도입하였다. pTYR-CNK는 앰피실린 항생제에서 저항 내성을 지니는 벡터이고, pGro7은 클로로앰피니콜 항생제에서 저항 내성을 지니는 벡터이므로, 앰피실린과 클로로앰피니콜이 모두 첨가되어 있는 LB-한천 배지에서 배양하여 벡터가 도입된 형질전환 대장균을 선별하였다.

[0049] 실시예 3. 재조합 티로시나아제 단백질의 대량발현 및 정제

[0050] 상기 실시예 2에서 제조하고 선별된 형질전환체를 50 µg/mL 앰피실린, 34 µg/mL 클로로앰피니콜, 0.5 mg/mL L-아라비노오스(Arabinose)가 첨가된 통상의 37℃, LB 배지에서 진탕 배양하여 배양액의 흡광도(OD600)가 0.8~0.9 정도에 도달했을 때 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 1 mM)를 첨가하여 상기 재조합 티로시나아제 단백질의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 추가로 20시간 동안 20℃에서 배양한 후, 배양된 세포를 4000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 세포 파쇄를 위한 용액 (50 mM 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer), pH 7, 8M 요소(urea), 10 mM 이미다졸(imidazole))에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 수용성 분액과 불용성 분액으로 나누어 각각을 통상의 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 또한, 상기 단백질의 수용성 분액을 니켈 레진에 충전된 컬럼에 적용하여 단백질과 컬럼이 결합하도록 하고, 세척 버퍼(50 mM 인산 나트륨 완충액, 30 mM 이미다졸, pH 7.0)로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 씻어 냈다. 컬럼으로부터 단백질의 용출은 용출 버퍼(50 mM 인산나트륨 완충액, 300 mM 이미다졸, pH 7.0)를 이용하여 진행하였고, 상기 정제된 용액은 물을 이용한 투석을 통해 단백질 수용액에 남아 있는 물과 단백질 성분 이외의 성분을 제거하고 최종적으로 정제된 단백질을 생산하였다. 재조합 티로시나아제가 발현된 대장균의 수용성 분액과 니켈 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된 재조합 티로시나아제 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0051] 도 3에 나타낸 바와 같이, 재조합 티로시나아제 단백질이 수용성으로 과량 발현되어 검출되었으며, 이를 통해 재조합 티로시나아제 단백질이 수용성 형태로 대량 생산될 수 있음을 확인하였다. 숙주세포를 이용하였음에도 inclusion body 생성 및 불용성 형태의 단백질이 제조되는 것이 아니라 수용성 형태의 티로시나아제 단백질이 생산되었다는 사실을 통해 실시예 2에서 제조된 형질전환체를 이용한 재조합 티로시나아제 생산 방법이 티로시나아제를 효과적으로 과발현하여 대량 생산할 수 있는 방법임을 확인하였다.

[0052] 실시예 4. 재조합 티로시나아제 단백질 분석

[0053] 4.1 최적 pH 분석

[0054] 실시예 3에서 제조된 재조합 티로시나아제 단백질의 성질을 분석하기 위하여 최적 pH를 분석하였다. L-DOPA와 L-티로신(tyrosine)을 반응물로 각각 이용하였고, 효소의 활성은 MBTH 방법을 통해 상온에서 측정하였고 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0055] 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, pH 변화에 따른 재조합 티로시나아제의 상대적 활성은 L-DOPA (도 4) 및 L-티로신(도 5)을 기질로 사용하였을 때 pH 4 이상 pH 9 이하 범위에서 높은 것으로 나타났으며, 특히 pH 6에서 상대적으로 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이는 재조합 티로시나아제가 기존에 알려진 티로시나아제가 약 pH 7.5에서 최적 pH를 갖는 것과 비교하여 더 산성인 조건에서도 활성을 우수하게 나타내는 특성을 갖는다는 것을 보여준다.

[0056] 4.2 최적 온도 분석

[0057] 실시예 3의 재조합 티로시나아제의 반응 온도를 0 내지 60℃ 범위에서 변화시키며 이의 활성 변화를 생성된 도파퀴논(Dopaquinone)과 반응하여 붉은빛을 내는 MBTH(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine hydrochloride hydrate) 시약을 이용한 방법을 통해 특정하고 결과를 도 6에 나타내었다.

[0058] 도 6에 나타난 바와 같이, 재조합 티로시나아제는 통상의 티로시나아제와 달리 저온 조건인 0 내지 10℃ 에서도 높은 활성을 나타내었고, 일반적인 활성 온도인 37℃가 아닌 20℃ 부근의 상온에서 최고의 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과에 따라 재조합 티로시나아제가 기존의 티로시나아제와 달리 저온 및 상온에서도 높은 활성을 나타낼 수 있는 새로운 성질을 갖는 효소임을 확인하였다.

[0059] 4.3 반응 속도 상수 결정

[0060] 실시예 3에서 제조된 재조합 티로시나아제 단백질의 반응 속도 상수인 k_{cat} 과 K_m 을 결정하기 위하여 통상의 반응 속도 상수 측정법 중 하나로, L-티로신과 L-DOPA를 각각 사용하여 생성물인 L-도파크롬(dopachrome)의 양을 측정하는 방법을 이용하였다. 반응은 25℃, 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.0), 0.01 M CuSO_4 용액에서 다양한 농도의 반응기질에 대한 생성물의 생성 정도를 475 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였으며 결과를 표 1에 나타내었다.

[0061] [표 1]

[0062] 재조합 티로시나아제의 반응속도 상수

기질	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
L-티로신*	9.2±2.4	258.2±64.54	28.2±0.39
L-DOPA**	2.6±0.56	133.4±28.12	50.4±0.01

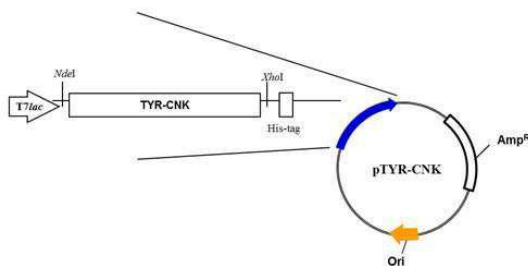
* L-티로신과 모노페놀라아제의 활성
** L-DOPA와 디페놀라아제의 활성

[0063]

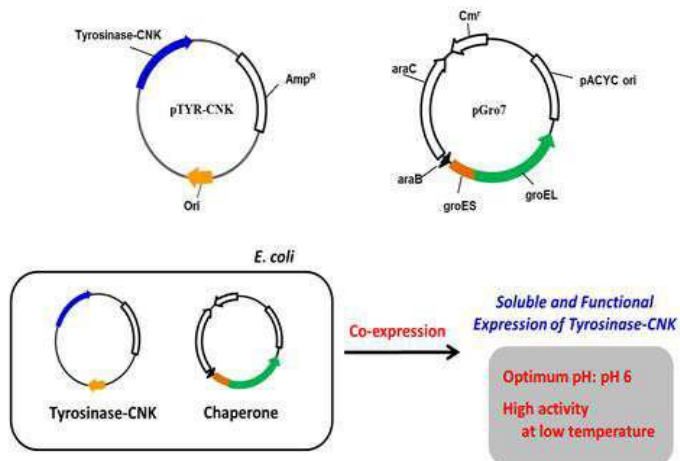
[0064] 상기 확인한 바와 같이, 본 발명의 재조합 티로시나아제는 높은 활성을 가지고 있어 산업적으로 활용 가능성이 매우 높은 것을 확인하였다.

도면

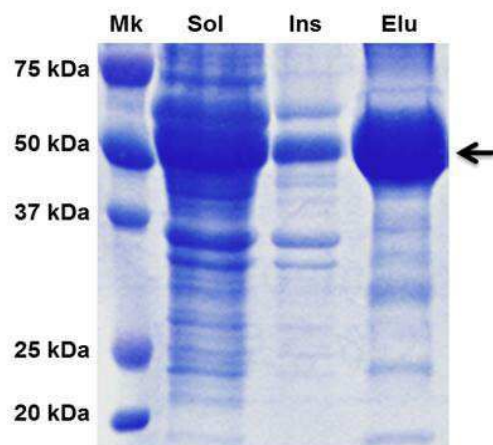
도면1



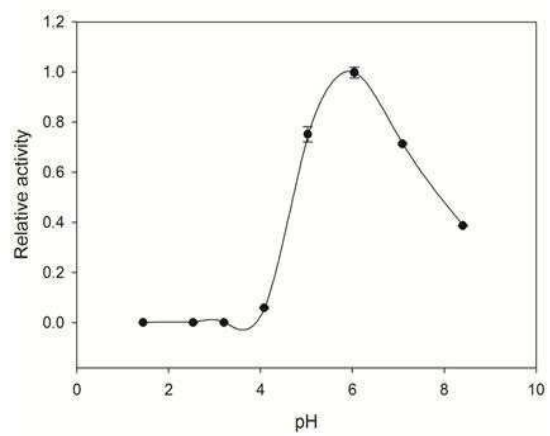
도면2



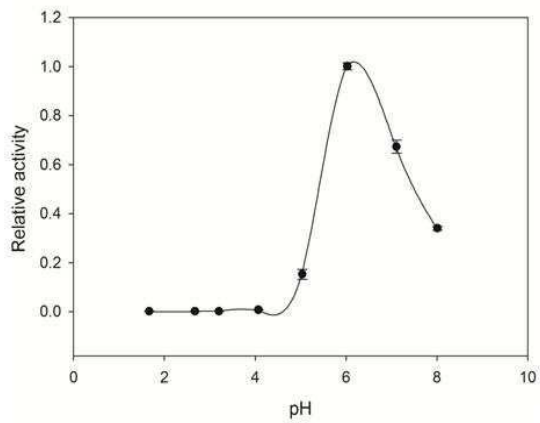
도면3



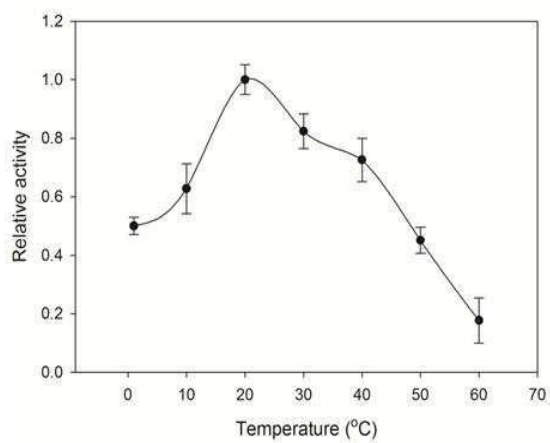
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> A recombinant tyrosinase originated from polar ocean ammonia
oxidizing bacteria

<130> P1-25

<160> 2

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 415

<212> PRT

<213> Candidatus Nitrosopumilus Koreensis

<400> 1

Met Thr Arg Lys Asn Ala Lys Asp Phe Leu Pro Asp Glu Arg Gln Arg

1

5

10

15

Tyr Cys Asn Ala Leu Leu Thr Leu Lys Gln Thr Ile Glu Pro Gly His

20 25 30

Thr Leu Ser Lys Tyr Asp Glu Phe Val Ala Ile His Tyr Gly Val Thr

35 40 45

Arg Arg Leu Arg Asn Gly Ile Pro Ile Gly Asp Gly Ala His Phe Val

50 55 60

Pro Gly Phe Leu Ala Trp His Arg Glu Tyr Leu Asn Arg Phe Glu Lys

65 70 75 80

Ala Ile Arg Thr Val Asp Ser Thr Leu Ser Leu Pro Tyr Trp Asn Trp

85 90 95

Ser Ser Gly Asp Asp Thr Asp Thr Thr Glu Ile Phe Thr Asp Asp Phe

100 105 110

Met Gly Pro Pro Gly Asp Pro Asn Asn Gly Asn Lys Ile Thr Ser Gly

115 120 125

Tyr Phe Val Glu Asn Asn Trp Glu Val His Ser Glu Leu Asp Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Leu Ser Gln Val Ser Gly Tyr Gly Glu Leu Ala Met Asp Ala Val

165 170 175

Asn Gly Asp Asn Asp Phe Asp Ser Phe Leu Pro Gly Leu Glu Gly Pro

180 185 190

His Gly Ser Ile His Met Trp Ile Gly Gly His Met Thr Ser Met Thr

195 200 205

Ser Pro Asn Asp Pro Ile Phe Phe Leu His His Ala Asn Ile Asp Arg

210 215 220

Leu Trp Ser Lys Trp Gln Glu Leu His Pro Gly Pro Glu Asn Tyr Asn

225 230 235 240

Pro Asn Asn Asp Gly Ser Tyr Gly Ser Arg Leu Asn Asp Arg Met Trp

245 250 255

Pro Trp Asp Gly Ser Glu Asp Thr Thr Thr Thr Arg Thr Gly Thr Ala

260 265 270
 Thr Gly Ile Ser Leu Gln Gly Leu Leu Pro Thr Phe Ser Asp Tyr Asp
 275 280 285
 Ile Val Thr Pro Arg His Val Leu Asp Asn Asn Leu Thr Ile Pro Ile
 290 295 300
 Pro Val Arg Gln Phe Leu Ala Asn Thr Leu Gln Ile Arg Asn Gln Thr

 305 310 315 320
 Thr Gly Glu Ile Leu Ser Arg Tyr Lys Ile Ile Gly Ser Val Pro Asp
 325 330 335
 Lys Phe Ala Ala Asn Asn Gly Ile Leu Asn Gln Ile Leu Thr Thr Ile
 340 345 350
 Gly Tyr Glu Asp Arg Ile Gly Arg Thr Glu Ser Asp Asn Asp Phe Val
 355 360 365
 Asp Val Ile Leu Glu Ile Ser His Thr Asp Asn His Val Asn Ser Ala
 370 375 380

Arg Gly Val Gln Leu Gly Gly Asp Asp Ile Glu Val Phe Val Asn Gly
 385 390 395 400
 Thr Ser Thr Gly Thr Leu Ala Lys Thr Gln Glu Ile Pro Leu Pro
 405 410 415

<210> 2

<211> 1245

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant tyrosinase

<400> 2

atgacccgta aaaatgcgaa agacttcctg ccggacgaac gccaacgcta ttgtaatgcc 60

ctgctgacgc tgaacagac gattgaaccg ggtcataccc tgtctaaata tgatgaattt 120

gtcgcgatcc actacgggtg gaccgctgc ctgcgcaacg gcattccgat cggcgatggt 180

gcgcattttg tgccgggttt cctggcctgg caccgtgaat atctgaaccg cttcgaaaaa 240

gccattcgta ccgttgattc gacgtgagc ctgccgtact ggaattggag cagcggcgat 300

gacaccgaca ccacggaaat ctttacggat gacttcatgg gtccgccggg tgatccgaac 360

aatggaata aaattacctc gggctatttt gttgaaaaca attgggaagt ccatagcgaa 420

ctggacggcg gtaacaatgg ttctgtgctg gttcgcgata gtaccctgct gagttcctca	480
aaactgtctc aagtcagtgg ctacggtgaa ctggcaatgg atgctgttaa cggcgataat	540
gactttgatt ccttcctgcc gggcctggaa ggtccgcatg gctcaattca catgtggatc	600
ggcggtcaca tgaccagcat gacgtcaccg aacgacccga tctttttcct gcatcacgcg	660
aatattgata gtctgtggtc taaatggcaa gaactgcacc cgggtccgga aaactataat	720
ccgaacaatg acggttcgta cggcagccgt ctgaacgata gcatgtggcc gtgggacggt	780
agtgaagata ccacgaccac gcgtaccggt acggcaaccg gcattagcct gcaaggcctg	840
ctgccgacct ttagtgacta tgatattgtg acgccgcgtc atgttctgga taacaatctg	900
accattccga tcccggtgcg tcaattcctg gcgaacacgc tgcaaatccg caatcaaacc	960
acgggtgaaa ttctgtcccg ttataaaatt atcggctcag tgccggataa atttgcgcc	1020
aacaatgga ttctgaacca gatcctgacc acgattggtt acgaagatcg tattggccgc	1080
accgaaagcg acaatgattt cgtggatgtg attctggaaa tctcgcatc cgataaccac	1140
gtgaatagcg cagcggcgt tcagctgggc ggtgatgaca tcgaagtttt tgtcaatggt	1200
acgtccaccg gcacgtggc taaaacccaa gaaattccgc tgccg	1245