(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월14일
(11) 등록번호 10-1394467
(24) 등록일자 2014년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/90 (2006.01) *C12N 15/61* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0154907
(22) 출원일자 2012년12월27일
심사청구일자 2012년12월27일
(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession No. 052216: Hydroxylaminobenzene mutase (2012.10.31.)

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
송재광
대전 유성구 배울1로 35, 405동 1701호 (관평동, 쌍용스윗닷홈)
이혁
서울 강남구 압구정로 113, 24동 1008호 (압구정동, 미성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인

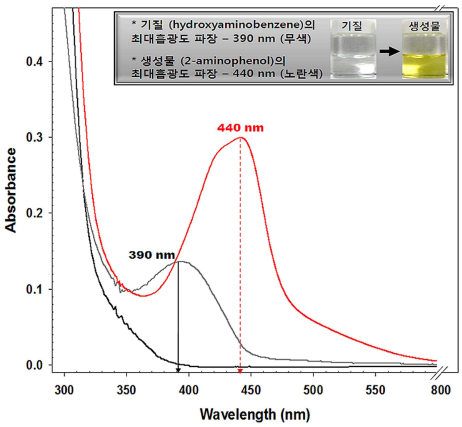
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **메타게놈 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제**

(57) 요 약

본 발명은 신규 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하며, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 하이드록실아미노 화합물에서 하이드록실기를 자리옮김하는 반응을 촉매하는 바, 의약 중간체, 각종 기능성 화학 물질 또는 중간 물질의 제조에 유용할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

권민아

세종 장군면 전원마을1길 35-11,

박아름

경남 창원시 진해구 진해대로874번길 5-22, (석동)

이지영

대전 서구 대덕대로 150, 115동 1201호 (갈마동, 큰마을아파트)

최지은

대전광역시 유성구 신성동 엘림빌라 202호

허정녕

대전 서구 둔산북로 160, 7동 1106호 (둔산동, 한마루삼성아파트)

송봉근

대전 유성구 가정로 43, 103동 1203호 (신성동, 삼성한울아파트)

김범태

대전 유성구 계룡로 92, 102동 1502호 (봉명동, 유성CJ나인파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120005995

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래기반기술개발사업

연구과제명 메타게놈 라이브러리로부터 유용 효소 발굴과 이용 기술 확립을 통한 효소 탐색 통합시스템의 유효성 검증

기 여 율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.06.01 ~ 2013.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SI-1101

부처명 기획예산처

연구사업명 정부출연 일반사업

연구과제명 화학산업용 바이오촉매 활용기술 기반구축

기 여 율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydroxylaminobenzene mutase).

청구항 2

제1항의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자가 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자.

청구항 4

제3항의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

명 세 서

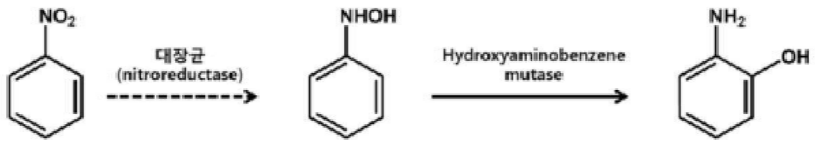
기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메타게놈으로부터 분리한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제, 이를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.

배 경 기 술

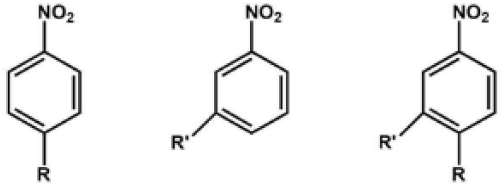
[0002] 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(Hydroxylaminobenzene mutase)는 하기 반응식 1과 같이 하이드록실아미노벤젠(hydroxylaminobenzene)이 2-아미노페놀(2-aminophenol)로 전환되는 과정을 촉매하는 역할을 할 뿐만 아니라, 다수의 하이드록실아미노 화합물에서 하이드록실기의 자리를 바꾸어주는 역할을 하는 자리옮김효소(mutase)이다.

[0003] <반응식 1>

[0004] 

[0005] 상기 반응식에서 보는 바와 같이, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제에 의하여 벤젠 고리의 하이드록실아미노 관능기로부터 산소 원자가 벤젠 고리 내 옆자리로 옮겨져 새로운 하이드록실기가 생성되며, 본래 자리에는 아미노기가 남게 된다. 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 가장 간단한 기질인 하이드록실아미노벤젠 이외에도, 하기와 같은 다양하게 치환된 고리형 탄소 화합물을 기질로 하여 그에 상응하는 아미노페놀류의 화합물을 생성할 수 있

다.

[0006] 

[0007] 상기 식에서, R 및 R'는 각각 독립적으로 할로겐(예: F, Br, Cl, I), 알킬(예: 메틸, 에틸, 이소프로필 등), 에테르(예: 페닐에테르, 알킬에테르 등) 등을 포함하는 다양한 관능기이다.

[0008] 전술한 바와 같은 하이드록실아미노 화합물에서 하이드록실기를 자리옮김하는 효소 반응은 의약 중간체, 각종 기능성 화학 물질 또는 중간 물질의 제조에 유용할 것으로 기대된다.

[0009] 식품, 의약, 화장품 등의 중간체 또는 최종 목표물질을 제조함에 있어서, 종래 자리옮김 반응들은 여러 단계를 거쳐야 하므로 경제적 또는 환경적으로 높은 비용이 소모되나, 효소 또는 효소를 포함한 미생물을 촉매로 이용하는 경우 상기 반응을 보다 경제적이고 친환경적으로 개선할 수 있다. 특히 복잡한 화학반응 단계를 거쳐야만 제조 가능한 물질의 경우, 고비용과 최종 수율 저하의 문제로 산업적 고려 대상에서 아예 제외되기도 한다. 생명체에서 유래한 효소는 초정밀성, 반응 특이성, 우수한 선택성을 포함하는 고효율의 촉매 특성을 가지고 있기 때문에 다양한 산업에 이용이 확대되고 있을 뿐 아니라, 기능면에서는 산화환원, 전이, 가수분해, 이탈 및 부가, 이성화 반응 등을 촉매하는 일반적인 기능은 물론이고 고온, 고압, 유기용매 하의 반응 등 기존의 특수한 조건에서 전환반응을 수행하지 않아도 되므로 산업적 적용범위와 활용가치가 무한하다 할 수 있다.

[0010] 한편, 메타게놈(metagenome)은 자연계에 존재하는 모든 미생물로부터 회수한 유전체를 통칭한다. 메타게놈은 특정한 미생물이 아니라, 토양미생물로부터 직접 추출하는 유전자원이기 때문에, 실험실에서 배양가능한 미생물에서 얻을 수 있는 유전자원보다도 월등하게 다양한 유전자원을 수득할 수 있고, 이러한 다양한 유전자원으로부터 종래의 단백질보다 우수한 특성을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 검출할 수도 있다는 장점이 있다. 따라서, 메타게놈으로부터 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 같은 효소를 암호화하는 유전자를 스크리닝할 경우, 종래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 구별되는 특성을 나타내는 신규한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 암호화하는 유전자를 검출할 수도 있을 것으로 예상되고 있으나, 아직까지는 별다른 연구성과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0011] 본 발명자들은 다양한 미생물이 존재하는 환경에 구축된 메타게놈 라이브러리부터 신규 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 분리하였고, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 특성을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 메타게놈으로부터 분리한 신규 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적에 따라, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 제공한다.

[0017] 상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 제공한다.

[0018] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0019] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 종래 보고되지 않은 신규한 서열로 구성되며, 의약 중간체, 각종 기능성 화학 물질 또는 중간 물질의 제조 등에 생물촉매로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 하이드록실아미노벤젠에서 2-아미노페놀로 전환되는 화학반응용액의 흡광도 변화를 이용한 고속 탐색법을 예시한 것이다.

도 2는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(*habM*) 유전자가 삽입된 pET21a/HabM 발현벡터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)가 삽입된 pET21a/NBNR 발현벡터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 *habM* 유전자와 *nbnr* 유전자가 삽입된 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터의 개열 지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 제공한다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 다양한 자연환경에서 채취한 토양 시료를 이용하여 구축한 메타게놈 라이브러리(metagenome library)로부터 얻어진 것이다. 구체적으로, 메타게놈 라이브러리를 구축하는 방법은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 Epicentre사의 게놈 DNA 라이브러리 생산 방법 등을 참조하여 수행될 수 있으며, 상기 구축된 메타게놈 라이브러리로부터 고속탐색법(high throughput screening; HTS), 즉, 96-웰 플레이트를 기반으로 하는 활성 탐색법을 통해 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발굴할 수 있다. 이후, 상기 유전자 부위의 염기서열 분석 및 종래 알려진 서열과의 상동성 분석을 통해, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩하는 유전자를 확인할 수 있다.

[0025] 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 종래 알려진 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 매우 낮은 서열 상동성을 나타낸다. 구체적으로, 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 기존에 알려진 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 효소들과 최대 47%의 상동성을 나타내며, 낮게는 35% 정도의 상동성을 보인다. 예컨대, 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) JS45 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 47%, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) HS12/pNB2, 노보스핑고븀 아로마티시보란스(*Novosphingobium aromaticivorans*) DSM 12444 및 마이코박테리움 투버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 46%, 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*) ATCC 12478 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 43%, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) ZWL73 및 코마모나스 종(*Comamonas* sp.) CNB-1 유래의 p-하이드록실아

미노클로로벤젠 뮤타아제와 42%, 및 마이코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis* str.) MC2 155 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제와 35%의 상동성을 나타낸다.

[0026] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 숙주 내에서 복제가능하여야 하며, 바람직하게는 프로모터 및 전사종결서열 등의 발현에 필요한 구성을 가질 수 있다. 재조합 벡터의 제조에 사용될 수 있는 벡터의 예로는, pET21a(+), pET22b(+), pET28b(+), pETDuet(+), pHCE19T(II), pQE30, pKK223-3, pColdIV 벡터 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 또한, 프로모터는, 숙주에서 발현할 수 있는 것이면 어느 것이나 사용가능하고, 예를 들면, HCE 프로모터, T5 프로모터, T7 프로모터, Tac 프로모터, araBAD 프로모터, lac O cspA 프로모터 등을 사용할 수 있다. 또한, 재조합 벡터는, 발현의 억제 또는 증폭, 또는 유도를 위한 기능을 가진 발현억제용의 단편이나, 형질전환체의 선택을 위한 마커나 항생물질에 대한 내성유전자, 또는, 균체 밖으로의 분비를 목적으로 한 분비 신호 등을 코딩하는 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 니트로벤젠을 하이드록실아미노벤젠으로 전환시키는 과정을 촉매하는 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 코딩하는 유전자(*nbnr*)를 포함할 수 있다. 상기 유전자를 포함함으로써 니트로벤젠으로부터 하이드록실아미노벤젠을 거쳐 2-아미노페놀을 제조할 수 있다.

[0029] 나아가, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다. 상기 형질전환체는 재조합 벡터를 적합한 숙주에 도입함으로써 제조된다. 상기 숙주의 예로는 에셰리키아(*Escherichia*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 랄스토니아(*Ralstonia*)속, 알칼리게네스(*Alcaligenes*)속, 코마모나스(*Comamonas*)속, 버크홀데리아(*Burkholderia*)속, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)속, 플라보박테리움(*Flabobacterium*)속, 비브리오(*Vibrio*)속, 엔테로박터(*Enterobacter*)속, 리조비움(*Rhizobium*)속, 글루코노박터(*Gluconobacter*)속, 아시네토박터(*Acinetobacter*)속, 모라셀라(*Moraxella*)속, 니트로조모나스(*Nitrosomonas*)속, 아에로모나스(*Aeromonas*)속, 파라코커스(*Paracoccus*)속, 바실루스(*Bacillus*)속, 클로스트리디움(*Clostridium*)속, 락토바실루스(*Lactobacillus*)속, 코리네박테리움(*Corynebacterium*)속, 아르트로박터(*Arthrobacter*)속, 아크로모박터(*Achromobacter*)속, 미크로코커스(*Micrococcus*)속, 마이코박테리움(*Mycobacterium*)속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속, 악티노마이세스(*Actinomyces*)속, 노카르디아(*Nocardia*)속, 메틸로박테리움(*Methylobacterium*)속 등의 각종 세균을 들 수 있다. 또한, 상기 세균 이외에, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 칸디다(*Candida*)속 등의 효모와 각종 곰팡이 등을 들 수 있다.

[0030] 한편, 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 1) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 2) 상기 배양물로부터 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 분리하는 단계를 포함하는 과정을 통해 생산될 수 있다.

[0031] 상기 과정은 전술한 형질전환체를 배양하고, 배양물(배양균체 또는 배양상등액) 속에 유전자 산물인 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 축적시켜, 배양물로부터 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 취득함으로써 행하여진다. 상기 형질전환체의 배양은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다. 또한 상기 배양은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양 등 통상의 미생물의 배양에 사용되는 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 형질전환체가 대장균인 경우 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB 배지, M9 배지 등에서 25~37 ℃의 범위에서 호기적으로 8~72시간 배양함으로써 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 균체 내에 축적시킨 다음 회수할 수 있다. 배양 배지에 사용될 수 있는 탄소원의 예로는 글루코스, 프럭토스, 슈크로스, 말토스, 갈락토스, 전분 등의 당류; 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급알콜류; 글리세롤 등의 다가알콜류; 아세트산, 시트르산, 숙신산, 타르타르산, 락트산, 글루콘산 등의 유기산; 프로피온산, 부탄산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산 등의 지방산 등을 들 수 있으며, 질소원의 예로는 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물 유래의 것을 들 수 있다. 또한, 무기물의 예로는 인산제1칼륨, 인산제2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가할 수 있다. 또한, 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 벡터가 사용되는 경우, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가할 수 있다. 예를 들면, 이소프로필-β-D-티

오갈락토피라노시드(IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다.

[0032] 상기 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 수득 및 정제는, 배양물을 원심분리하여 균체 또는 상등액을 회수한 후, 균체파쇄, 추출, 친화성 크로마토그래피, 양이온 또는 음이온교환크로마토그래피, 겔여과 등을 단독으로 또는 적당히 조합함으로써 행할 수 있다. 상기 수득한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 통상의 방법, 예를 들면 SDS-PAGE, 웨스턴블로팅 등에 의해 확인될 수 있다. 또한, 균체로부터의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 회수는, 통상 행하여지고 있는 클로로포름 등의 유기용매에 의한 추출이 가장 간편하기는 하나, 유기 용매를 사용하기 어려운 환경에서는 SDS 등의 계면활성제에 의한 처리, 리소자임 등의 효소에 의한 처리, EDTA, 차아염소산나트륨, 암모니아 등의 약제에 의한 처리에 의해서 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 이외의 균체 성분을 제거하여 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 회수하는 방법을 사용할 수도 있다.

[0033] 이하 본 발명을 실시예를 들어 설명하고자 하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0034] **실시예 1: 메타게놈 라이브러리의 제작**

[0035] 국내외의 다양한 지역에서 채취한 토양으로부터 메타게놈 라이브러리를 하기와 같이 제조하였다.

[0036] <1-1> 메타게놈 DNA의 분리 및 정제

[0037] 하기 표 1에 열거된 다양한 지역으로부터 채취한 토양을 1.4 ㎜ 직경의 메쉬를 통과시켜 토양 내에 함유된 불필요한 입자와 불순물을 제거하였다. 상기 토양 시료 5 g을 15 mL 완충용액[100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM 인산염 나트륨(sodium-phosphate), pH 8.0, 1.5 M NaCl 및 1% CTAB(hexadecyl trimethyl ammonium bromide)]에 현탁하였다. 상기 현탁액에 단백질 분해효소(proteinase K; 100 mg/mL) 100 μL를 첨가하고 37℃ 진탕 배양기에서 100 rpm의 속도로 20분간 진탕하였다. 여기에 1.5 mL의 20% SDS를 첨가하고 잘 흔들어 섞어준 후, 이 혼합물을 65℃ 항온 수조에서 30분마다 한번씩 섞어주면서 2시간 동안 유지하였다. 이후 7,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상기 분리한 상등액에 상등액과 동일한 부피의 클로로포름/이소아밀알콜(24:1)을 첨가하여 섞어준 후 7,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA가 포함된 상등액을 새로운 용기로 옮겼다. 여기에 상등액 부피의 0.6배에 해당하는 이소프로판올을 첨가하여 섞어준 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었다. 상기 DNA 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 원심분리로 에탄올을 제거하는 과정을 2회 반복하였다. 상기 침전물을 공기 중에서 건조시킨 다음, TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) 1.0 mL에 용해시켰다. 상기 수득한 메타게놈 DNA를 4℃에서 200 rpm으로 10시간 진탕배양한 후 보관하였다. 상기 메타게놈 DNA의 크기 분포를 PFGE(pulsed field gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였다. 채취 지역에 따라 토양 시료 1 g 당 약 0.8 내지 2.0 ㎍의 메타게놈 DNA가 회수되었으며, 분리된 DNA는 20 내지 100 kb 정도의 크기 분포를 갖는 것으로 나타났다.

[0038] <1-2> 메타게놈 라이브러리의 제작

[0039] 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989)]에 기재된 통상적인 분자생물학적 방법과 시약 제조사의 지침에 따라 하기와 같이 메타게놈 라이브러리를 제작하였다.

[0040] 구체적으로, 실시예 <1-1>에서 수득한 메타게놈 DNA를 저융점 아가로스 겔(low melting point agarose gel)에서 전기영동하여, 20 kb 이상의 DNA를 포함하는 아가로스 겔 조각을 회수하였다. 회수된 겔 조각에 겔레이즈(GeLase, Epicentre, 미국)를 처리하여 DNA를 정제함으로써 추후 과정에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있는 휴믹산(humic acid) 등의 불순물을 제거하였다. DNA 조각의 양 말단을 DNA 말단 보수효소(end-repair enzyme)로 처리하여 평활성 말단(blunt end)을 갖는 20 kb 이상의 메타게놈 DNA를 얻은 다음, 이를 *Eco72*I로 처리한 포스미드 벡터 pEpiFOS-5(Epicentre, 미국)에 라이게이션하였다. 상기 라이게이션 혼합물을 상업적인 패키징 시스템(packagene extract, Epicentre. USA)을 이용하여 대장균에 도입한 후, 50 μg/mL의 클로람페니콜이 첨가된 LB

한천 배지에서 형질전환체들을 선별하였다.

[0041] 상기 선별된 형질전환된 대장균을 배양하여 메타게놈(metagenome) 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리의 질을 검사하기 위해, 무작위로 선택한 형질전환체들로부터 재조합 플라스미드를 추출하고 제한효소 *Bam*HI으로 처리한 후 전기영동으로 확인한 결과, 모두 재조합 플라스미드가 포함되어 있었으며, 삽입된 메타게놈의 평균 크기는 약 30 kb로 분석되었다.

[0042] 한편, 상기 실험실에서 제작한 메타게놈 라이브러리 외에 공시된 국내 자원 센터의 메타게놈 라이브러리를 분양받아 메타게놈 라이브러리를 제작하는데 사용하였다.

[0043] 상기 실험실에서 제작한 라이브러리 및 분양받은 라이브러리의 정보를 각각 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

[0044]

제조한 메타게놈 DNA분리 시료	벡터 정보		메타게놈 삽입 DNA (평균 kb)
강화도 장화리 갯벌	pEPI-FOS5	8.1 kb (Cm^R)	31 kb
대천 용두해수욕장			30~40 kb
전남 부안군 새만금 간척지 갯벌			35 kb
북극기지 연안 퇴적물			35 kb
충북 괴산, 음성 밭토양			35 kb
충남 아산, 공주 전남 순천 논토양			35 kb
제주도 오름 토양			35 kb
제주도 한림항 토양			35Kb
제주도 용두암, 마라도 토양			
제주도 천지연 폭포 토양			
제주도 한라산 영실 토양			
대전 매립장 (목재 폐기물)			
주유소			35Kb
유류 오염지 (서해안)			30~40 kb
한국화학연구원 토양			1.6~4 kb
대전 계룡산 수통골 토양			40 kb
상주 낙동강 유역 토양			40 kb
총 31 Gb 메타게놈 유전정보			

표 2

[0045]

분양받은 메타게놈 DNA분리 시료	벡터 정보		메타게놈 삽입 DNA (평균 kb)
군산 하천흙	pUC19	2.7 kb (Amp^R)	3~6 kb
관악산 소나무 뿌리토양	pBluelysis	5.4 kb (Tet^R)	3~7 kb
시화호 Soil	pCC1BAC	8.1 kb (Cm^R)	10~20 kb
충주시 충주호	pBACe3.6	11.6 kb (Cm^R)	13~15 kb
아산시 둔포호	pBACe3.6		15 kb
청주시 대청호	pBACe3.6		12~14 kb

퇴비	pCC2FOS		40 kb
경북 청송 밭토양			
경북 청송 밭토양			
경북 영양 식물근권-억제토양			
인제군 점봉산 진동계곡 초지 및 산림 토양			
인제군 점봉산 진동계곡 초지 및 산림 토양			
부산 강서구 대저동 식물근권 토양			
중국 북경시 혐기성 암모니아 산화반응조 슬러지			
중국 북경시 혐기성 암모니아 산화반응조 슬러지			
낙동강 을숙도 유역 오염토양			
낙동강 을숙도 유역 오염토양			
총 6.8 Gb 메타게놈 유전정보			

[0046]

[0047] **실시예 2: 고속 탐색법(high throughput screening)을 이용한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자의 탐색**

[0048] 실시예 1에서 수득한 메타게놈 라이브러리로부터 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 하기와 같이 탐색하였다.

[0049] 구체적으로, 메타게놈 라이브러리를 구성하는 대장균 형질전환체들을 LB 한천 배지 상에서 수백 개에서 수천 개 단위의 묶음 형태로 모아서 TE 완충용액 또는 증류수 1 mL에 현탁하여 수집하였다. 각각의 묶음을 LB 배양액에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 10시간 진탕배양한 후, 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포 침전물을 회수하였다. 상기 침전물을 50 mM Tris-Cl완충용액(pH 8.0)에 현탁하였다.

[0050] 이후, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 갖는 대장균을 하이드록실아미노벤젠(기질)으로부터 2-아미노페놀(생성물)로 전환되는 화학 반응용액의 흡광도 변화를 이용한 고효율 스크리닝에 의해 확인하였다. 50 mM 4-플루오로니트로벤젠, 4-클로로니트로벤젠, 4-브로모니트로벤젠, 4-플루오로니트로벤젠 및 니트로벤젠의 총 5종의 화합물을 최종 0.5 mM이 되도록 100% 에탄올, 50 mM Tris 완충용액(pH 8.0)과 1:1:88의 비율로 혼합하여 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 탐색용 반응용액을 제조하였다. 상기 반응용액을 200 μL씩 96-웰 플레이트의 웰에 분주하고, 여기에 상기 현탁된 세포 침전물 50 μL를 첨가하였다. 상기 96-웰 플레이트를 37℃에서 3시간 정치한 후, 60℃에서 3시간 정도 정치하면서 간헐적으로 흔들어 섞어주었다. 상기 반응용액의 최대흡광도 파장을 300~800 nm 범위에서 UV-VIS 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 상기 측정 결과를 도 1에 나타내었다.

[0051] 상기 측정 결과, 하이드록실아미노벤젠(기질)은 390 nm에서 최대 흡광도를 나타내었고(무색), 2-아미노페놀(생성물)은 440 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다(노란색). 한편, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 갖는 대장균의 경우, 대장균 내에 내재되어 있는 니트로리덕타아제(nitroreductase) 효소군에 의해 니트로기가 하이드록시아미노기로 환원되고, 대장균 내에서 발현된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제에 의해 하이드록시아미노기에서 하이드록시기가 옆자리로 자리옮김하여 2-아미노페놀로 전환됨으로써 반응 용액이 무색에서 노란색으로 변화된다. 따라서, 반응용액이 440 nm에서 흡광도가 높아지는 것을 통해 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 갖는 대장균을 검출할 수 있다. 이러한 과정을 통해 노란색을 나타내는 웰의 대장균 수집시료(코드 M9_P97)를 수득하였다.

[0052] 위와 같은 결과의 재현성을 확인하기 위해 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 함유하고 있을 것으로 예상되는 상기 대장균 시료를 LB 한천 배지에 도말하여 37℃에서 16시간 배양하여 콜로니를 형성시킨 후, 최초 수집한 개수 이상의 대장균 콜로니에 대하여 전술한 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 탐색 반응을 반복 수행하였다

[0053] 그 결과 메타게놈 유래의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)를 발현하고 있는 대장균(*E. coli* M9_P97_26)을 확보하였다.

[0054] **실시예 3: 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자의 염기서열 및 상동성 분석**

[0055] 실시예 2에서 수득한 대장균으로부터 하기와 같이 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자의 서열을 결정하였다.

[0056] 구체적으로, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 활성을 나타내는 클론(코드 M9_P97_26)을 LB 배지에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 12시간 진탕배양한 후, 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포를 침전시켰다. 세포 침전물에 제1용액[50 mM 글루코스, 25 mM Tris-Cl(ph8.0), 10 mM EDTA] 200 μL를 넣고 완전히 풀어질 때까지 섞어주었다. 그리고 여기에 제2용액[0.2N NaOH, 1% SDS] 400 μL을 더 넣고 섞어준 후, 제3용액[5M 아세트산칼륨] 300 μL을 넣어 4℃에 15분 방치하였다. 상기 혼합물을 원심분리(14,000rpm, 4℃, 15분)한 후, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 상기 상층액에 이소프로판올 540 μL를 넣어 섞은 후, 4℃에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 상등액을 완전히 제거한 후, 침전물을 상온에서 건조하였다. 그 DNA 침전물에 TE 완충용액 500 μL을 넣어 녹인 후, EtOH 1 mL를 추가하여 4℃에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세척된 포스미드 DNA를 상온에서 충분히 건조하였다. 상기 DNA를 TE 완충액 25 μL를 이용하여 상온에서 10분간 녹인 후, 희석한 RiboShredder Rnase Blend(RiboShredder™) 1 μL를 첨가하여 37℃에서 30분간 방치함으로써 DNA 분해물질을 제거하고, 이를 -20℃에 보관하였다.

[0057] 상기 분리한 포스미드 DNA를 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 시료의 순도를 확인하고, 포스미드 DNA에 삽입된 메타게놈 유래의 DNA의 염기서열을 샷건법(shotgun sequencing)으로 결정하였다. 메타게놈 유래의 DNA는 대략 33,600 여개의 염기쌍 정보로 이루어져 있었으며, 이 정보로부터 DNA 분석 소프트웨어(DNASTAR, GeneDoc) 및 유전자 데이터베이스(NCBI GenBank, EMBL)를 이용하여 목적하는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자 서열을 확인하였다.

[0058] 상기 분석 결과, 본 발명에 따른 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 서열번호 2의 염기서열(459 bp)을 가지며, 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산(152개)을 갖는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 코딩함을 알 수 있었다

[0059] 또한 그 외의 신규 단백질 및 효소 50여개를 코딩하는 것으로 예측되는 신규 유전자를 포함하여 다양한 프로모터 부위가 존재하였으며, 포스미드에 삽입된 전체 DNA 염기서열은 서열번호 3에 나타내었다.

[0060] 상기 결정된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제의 아미노산 서열을 GenBank의 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) 프로그램 등을 이용하여 분석하였다. 상기 분석 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0061]

미생물	단백질 데이터베이스 ID	유전자의 예상 산물 (데이터베이스 등록 내용에 따름.)	분자량 Da (아미노산 잔기의 개수)	유사도M9_P97 HabM 기준)[a]
새만금 간척지 갯벌 Metagenome M9_P97			16149 (152)	-
Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45	AAB94123	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	16955 (164)	47
Pseudomonas putida HS12/pNB2	AAK26516	하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	16879 (164)	46
Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444	ABD25862	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	14653 (141)	46
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	ABQ74893	하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	14080 (133)	46
Mycobacterium kansasii ATCC 12478	ZP04747333	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	13923 (133)	43
Pseudomonas putida ZWL73	ABA55816	p-하이드록실아미노클로로벤젠 뮤타아제	15952 (150)	42
Comamonas sp. CNB-1	YP001967718	p-하이드록실아미노클로로벤젠 뮤타아제	15952 (150)	42

Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45	AAB94122	하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	14610 (135)	40
Mycobacterium smegmatis str. MC2 155	ABK70538	추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제	15870 (147)	35

[0062] [a] 유사도 스코어(%)는 EMBL-EBI 웹사이트(http://www.ebi.ac.uk) 상의 ClustalW 프로그램을 이용하여 계산되었음.

[0063] 상기 표에서 보는 바와 같이, 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제는 기존에 밝혀진 서열 정보들 중에서 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) JS45 유래의 추정되는 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(AAB94123)와 서열상으로 가장 유사하였지만 그 유사성이 47%에 불과하였다. 상기 결과는 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제가 아미노산 서열 측면에서 매우 독특하다는 것을 보여준다.

[0064] **실시예 4: 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)가 삽입된 다양한 발현벡터 및 이를 포함하는 형질전환체의 제조**

[0065] <4-1> 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)가 삽입된 다양한 발현벡터의 제조

[0066] 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 포함하는 발현벡터를 하기와 같이 제작하였다.

[0067] 먼저, 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자를 증폭시키기 위하여, 실시예 3에서 분리한 포스미드 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 4 및 5의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 구체적으로, PCR은 LA Taq DNA 중합효소(5 U /μL), 10x 완충액(PCR 완충액), dNTP Mix (2.5 mM), 각 프라이머(10 pmol) 및 증류수를 혼합하여 수행하였고, 94℃에서 최초 1분간 DNA를 변성시킨 후, 주형 DNA 변성(denaturation; 94℃에서 30초), 프라이머 결합(annealing; 58℃에서 40초), DNA 중합 신장(polymerization; 68℃에서 2분)의 3단계 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 정치하여 DNA 중합을 완료하고, 온도를 4℃로 내려 반응을 종결시켰다.

[0068] 상기 PCR 산물 4 μL에 Topo 벡터(Invitrogen) 1 μL 및 제조사에서 제공된 라이게이션(ligation) 반응용액 1 μL를 넣고 상온에서 20분간 반응시켰다. 그리고 나서, 컴피턴트 세포(competent cell)로서 대장균 TOP10 세포(Invitrogen)를 넣고 4℃에 20분 동안 방치한 다음, 42℃에서 열 충격(Heat shock)을 가하고, 얼음 위에서 30초간 반응시킨 후, 250 μL의 SOC 배지를 넣고 37℃에서 200 rpm으로 1시간 동안 진탕 배양하였다. 그 후 항생제와 LacZ를 이용한 선별을 위해 상기 세포를 X-Gal(40 μL)이 도말된 LB 아가 배지에 도말하여 37℃에서 16시간 배양하였다. 생성된 콜로니를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 10시간 진탕배양한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포침전물을 회수하였다. 상기 세포침전물로부터 DNA 정제 키트(Promega)를 이용하여 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자가 삽입된 Topo 벡터를 수득하였다.

[0069] 이후, *habM* 유전자를 클로닝하기 위하여, 상기 Topo 벡터를 *Eco*RI 및 *Sal*I으로 37℃에서 2시간 동안 처리하여 절단하였다. 상기 절단된 유전자를 동일한 제한효소로 처리한 pET21a+ 벡터(Novagen)에 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 16℃에서 3~6시간 동안 라이게이션(ligation)시켜 pET21a/HabM 발현벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pET21a/HabM 발현 벡터의 개열지도를 도 2에 나타내었다.

[0070] 한편, 대장균 이외의 세균에서 니트로벤젠으로부터 N-하이드록시벤젠아민으로 전환하는 활성을 보유한 효소를 확보하여 반응 특성을 조사하고자, 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) JS45의 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 선정하였다. 이 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)를 포함하는 DNA를 확보하기 위하여, DNA 합성서비스 회사에 해당 유전자의 정보를 제공 및 의뢰하였다(Bioneer사의 유전자 합성 서비스). 상기 합성된 *nbnr* 유전자를 함유한 DNA를 주형으로 서열번호 6 및 7의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용한 PCR 과정에 의해 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)을 증폭시켰다.

[0071] 상기 PCR 산물을 전술한 pET21a/HabM 발현 벡터의 제조 방법과 동일하게 Topo 벡터에 삽입하고, 대장균에 형질전환시킨 후 이로부터 Topo 벡터에 삽입된 *nbnr* 유전자를 얻었다. 그리고 나서, pET21a 벡터와 라이게이션시켜 pET21a/NBNR 발현 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pET21a/NBNR 발현 벡터의 개열지도를 도 3에 나타내었다.

[0072] 본 발명의 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 유전자(*habM*)와 니트로벤젠 니트로리덕타아제 유전자(*nbnr*)을 동시에 발현할 수 있는 발현 벡터를 제조하기 위하여, 전술한 방법과 유사하게 *habM* 및 *nbnr* 유전자를 pETDuet 벡터(Novagen)에 삽입하였다. *nbnr* 유전자를 pETDuet 벡터의 MCS1 자리에 클로닝하기 위해 *nbnr* 유전자를 *EcoR*I 및 *Sal*I을 이용하여 37℃에서 2시간 동안 절단시킨 후 젤 정제(Gel purification)를 실시하였다. 동시에 *habM* 유전자를 pETDuet 벡터의 MCS2 자리에 클로닝하기 위해 *habM* 유전자를 *Nde*I 및 *Kpn*I을 이용하여 37℃에서 2시간 동안 절단시킨 후 젤 정제(Gel purification)를 실시하였다. 상기 절단된 유전자들을 동일한 제한효소로 처리한 pETDuet 벡터에 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 16℃에서 3~6시간 동안 라이게이션(ligation)시켜 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터를 제작하였다. 상기 제작된 pETDuet/NBNR-HabM 발현 벡터의 개열지도를 도 4에 나타내었다.

[0073] <4-2> HabM 효소를 발현하는 균주의 제조

[0074] 본 발명의 HabM을 발현시키기 위해, 실시예 <4-1>에서 제조된 pET21a/HabM 발현 벡터 1μL를 BL21(DE3) 세포(RBC)와 1초간 섞어준 후 10분간 4℃에서 방치하여 상기 세포를 형질전환시켰다. 이후, 상기 형질전환된 세포를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 배양한 균주를 200 mL의 LB 액체 배지에서 37℃에서 OD_{600} = 0.6까지 배양한 다음, IPTG 0.1 mM이 첨가된 LB 액체 배지에서 4시간 더 배양하였다. 이러한 과정으로 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제 효소를 발현하는 균주를 제조하였다.

[0075] 또한, 실시예 <4-1>에서 제조된 pET21a/NBNR 발현 벡터 및 pETDuet/NBNR-HabM 발현 벡터의 형질전환체를 전술한 방법과 같이 제조하였다. 구체적으로, 각 E-튜브에 담긴 BL21(DE3) 세포(RBC)에 pET21a/NBNR 발현벡터 DNA와 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터 DNA를 각각 1μL씩 넣고 1초간 섞어준 후 10분간 4℃에서 방치하여 각 세포를 형질전환시킨 다음, 상기 형질전환된 세포를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37℃에서 16시간 동안 배양하였다. 배양한 균주를 200 mL의 LB 액체 배지에서 37℃에서 OD_{600} = 0.6까지 배양한 다음, IPTG 0.1 mM이 첨가된 LB 액체 배지에서 4시간 더 배양하였다. 이러한 과정으로 pET21a/NBNR 발현벡터 DNA로 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 발현하는 균주와 pETDuet/NBNR-HabM 발현벡터 DNA로 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)와 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydrowylaminobenzene mutase) 효소를 동시에 발현하는 균주를 제조하였다.

[0076] **실시예 5: HabM의 발현 확인**

[0077] <5-1> pET21a/HabM 발현 벡터의 형질전환체를 이용한 발현 확인

[0078] 실시예 4에서 제조된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발현하는 형질전환체로부터의 HabM 효소의 발현을 세포와 기질 간의 반응을 통해 확인하였다. 세포와 기질 간의 반응을 위해 각각의 세포 침전물을 20 mM Tris-Hcl(pH 8.0) 완충액에 OD_{600} 60 또는 100으로 현탁하여 준비하였다. 기질로서 니트로벤젠(sigma)을 100 mM이 되도록 아세토니트릴에 녹여 준비한 후 기질의 최종 농도를 1 mM이 되도록 넣어 반응시켰다.

[0079] 기질, 100% EtOH 및 50 mM Tris-Hcl[pH 8.0]의 순으로 넣은 후 실시예 5에서 제조된 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제를 발현하는 형질전환체(OD_{600} 60 또는 100)를 최종 OD_{600}이 8 또는 10이 되도록 넣어 37℃ 진탕 배양기에서 24시간 동안 반응시켰다. 세포로부터 발현된 HabM과 기질 간의 반응 결과를 색 변화로서 스캔(Scan), UV-VIS 분광광도계(spectophotometer) 및 LC 분석을 이용하여 확인하였다.

[0080] 스캔을 이용한 반응 확인 결과, HabM과 기질이 반응하기 전보다 반응한 후에 갈색이 강해진 것으로 나타났다.

[0081] 또한, HabM과 하이드록실아민(NHOH) 기질의 반응으로 생성되는 갈색을 정량화하기 위해 UV-VIS 분광광도계를 이용하였다. 스펙트럼은 230~800 nm 범위에서 측정하였다. 상기 측정 결과, 세포와 기질이 반응 후 pET21a/HabM 벡터를 갖는 세포에서 434 nm에서 피크가 확인되었다. 상기 피크는 기질인 니트로벤젠이 대장균에 존재하는 니트로리덕타아제와 반응하여 하이드록실아민(NHOH)을 생성하고, 상기 하이드록실아민이 HabM과 반응하여 2-아미노페놀을 생성하기 때문에 나타나는 것으로 판단되었다.

[0082] 나아가, 벤젠을 검출할 수 있는 스페리솝(spherisorb) C8 컬럼(waters사)이 장착된 LC 크로마토그래피(FUTECS사)를 이용하여 HabM과 기질의 반응을 분석하였다. 기질과 세포를 24시간 동안 반응시킨 다음, 원심분리하여 얻은 반응 상등액을 0.2 μm 필터로 여과한 다음 LC에 의해 분석하였다. 반응 샘플의 경우 pET21a/HabM을 갖는 세포를 1 mM 니트로벤젠(NB) 및 1 mM 하이드록실아미노벤젠(NHOH)과 각각 반응시켜 분석하였고, 대조군의 경우 상기 세포를 사용하지 않았다.

[0083] 상기 분석 결과, 니트로벤젠(NB), 하이드록실아미노벤젠(NHOH) 및 2-아미노페놀(2-AP)이 동일 시간대에 검출되는 것을 알 수 있었다. 니트로벤젠은 4분에 검출되었고, 2-아미노페놀은 3.6분에서 검출되었다. 세포와 반응한 샘플을 분석하여 감소된 니트로벤젠의 양으로부터 HabM의 전환율을 측정할 수 있었다. 측정 결과, pET21a/HabM을 갖는 세포에서 니트로벤젠의 잔량이 상당히 적음을 알 수 있었고, HabM과 하이드록실아미노벤젠(NHOH)이 반응하여 2-아미노페놀을 생성함으로 확인할 수 있었다.

[0084] <5-2> pET21a/NBNR 발현 벡터 및 pETDuet/NBNR-HabM의 형질전환체를 이용한 발현 확인

[0085] 실시예 4에서 제조된 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 발현하는 형질전환체와 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)와 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydrowylaminobenzene mutase) 효소를 동시에 발현하는 형질전환체로부터의 HabM 효소의 발현을 세포와 기질 간의 반응을 통해 확인하였다.

[0086] 세포와 기질 간의 반응을 위해 각각의 세포 침전물을 20 mM Tris-Hcl(pH 8.0) 완충액에 OD_{600} 60 또는 100으로 현탁하여 준비하였다. 기질로서 니트로벤젠(sigma)을 100 mM이 되도록 아세토니트릴에 녹여 준비한 후 기질의 최종 농도를 1 mM이 되도록 넣어 반응하였다. 기질, 100% EtOH 및 50 mM Tris-Hcl[pH 8.0]의 순으로 넣은 후 실시예 4에서 제조된 형질전환체(OD_{600} 60 또는 100)를 최종 OD_{600}이 8 또는 10이 되도록 넣어 37℃ 진탕 배양기에서 24시간 동안 반응시켰다.

[0087] 세포로부터 발현된 HabM과 기질 간의 반응 결과를 색 변화로서 스캔(Scan), UV-VIS 분광광도계(spectophotometer) 및 LC 분석을 이용하여 확인하였다.

[0088] 스캔을 이용한 반응 확인 결과, 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)를 발현하는 균주(pET21a/NBNR)로 반응한 경우 색의 변화가 없고, 니트로벤젠 니트로리덕타아제(nitrobenzene nitroreductase)와 하이드록실아미노벤젠 뮤타아제(hydrowylaminobenzene mutase) 효소를 동시에 발현하는 균주 형질전환체로 반응한 경우 HabM의 발현으로 인해 기질과 반응하기 전보다 반응한 후에 갈색이 강해진 것으로 나타났다.

[0089] 또한, HabM과 하이드록실아민(NHOH) 기질의 반응으로 생성되는 갈색을 정량화하기 위해 UV-VIS 분광광도계를 이용하였다. 스펙트럼은 230~800 nm 범위에서 측정하였다. 상기 측정 결과, 세포와 기질이 반응 후 pET21a/NBNR-HabM 벡터를 갖는 세포에서 434 nm에서 피크가 확인되었다. 상기 피크는 기질인 니트로벤젠이 대장균에 존재하는 니트로리덕타아제와 반응하여 하이드록실아민(NHOH)을 생성하고, 상기 하이드록실아민이 HabM과 반응하여 2-아미노페놀을 생성하기 때문에 나타나는 것으로 판단되었다.

[0090] 나아가, 벤젠을 검출할 수 있는 스페리솝(spherisorb) C8 컬럼(waters사)이 장착된 LC 크로마토그래피(FUTECS사)를 이용하여 HabM과 기질의 반응을 분석하였다. 기질과 세포를 24시간 동안 반응시킨

다음, 원심분리하여 얻은 반응 상등액을 0.2 μm 필터로 여과한 다음 LC에 의해 분석하였다. 반응 샘플의 경우 pET21a/NBNR-HabM을 갖는 세포를 1 mM 니트로벤젠(NB) 및 1 mM 하이드록실아미노벤젠(NHOH)과 각각 반응시켜 분석하였고, 대조군의 경우 상기 세포를 사용하지 않았다.

[0091] 상기 분석 결과, 니트로벤젠(NB), 하이드록실아미노벤젠(NHOH) 및 2-아미노페놀(2-AP)이 동일 시간대에 검출되는 것을 알 수 있었다. 니트로벤젠은 4분에 검출되었고, 2-아미노페놀은 3.6분에서 검출되었다. 세포와 반응한 샘플을 분석하여 감소된 니트로벤젠의 양으로부터 HabM의 전환율을 측정할 수 있었다. 측정 결과, pET21a/NBNR-HabM을 갖는 세포에서 니트로벤젠의 잔량이 상당히 적음을 알 수 있었고, HabM과 하이드록실아미노벤젠(NHOH)이 반응하여 2-아미노페놀을 생성함으로 확인할 수 있었다.

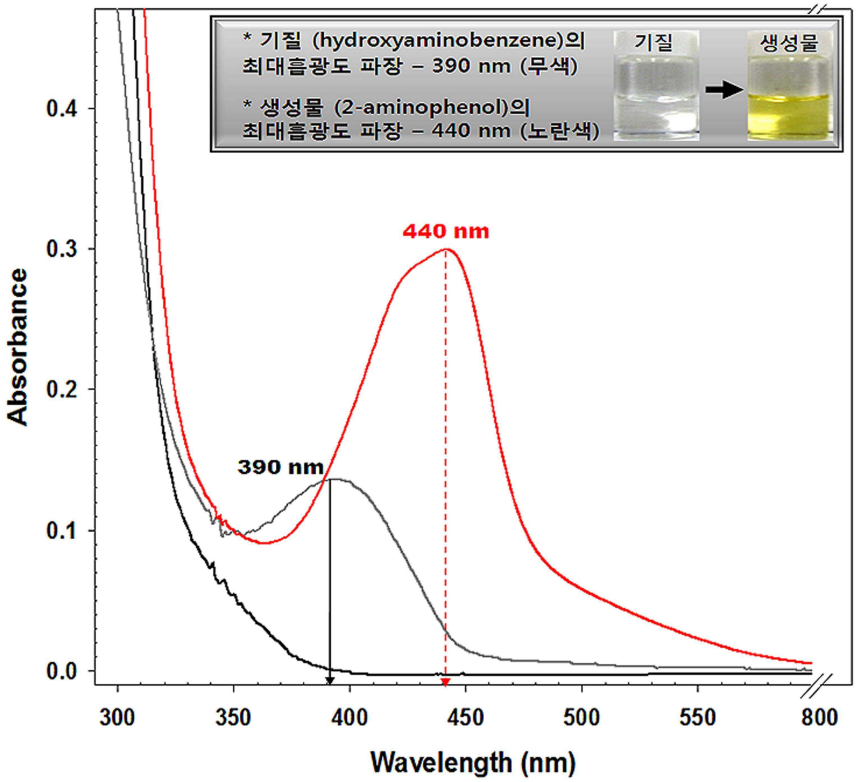
[0092] **실시예 6: HabM의 활성 측정**

[0093] 본 발명의 HabM의 활성을 측정하기 위해, 하이드록실아미노벤젠으로부터 2-아미노페놀로의 물질 전환 반응을 수행하였다. 실시예 4에서 제조된 형질전환체를 50 μg/mL의 암피실린이 함유된 LB 액체 배지에 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 12시간 진탕배양한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 대장균 세포침전물을 회수하였다. 이를 세포침전물의 농도가 OD_{600}에서 20이 되도록 50 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 현탁하여 물질전환반응 효소를 준비하였다.

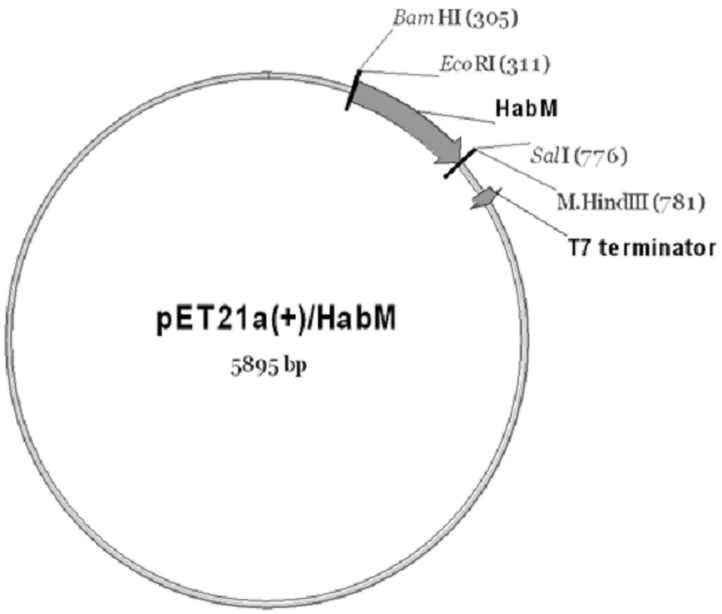
[0094] 물질전환 반응용액은 50 mM 니트로벤젠(또는 하이드록실아미노벤젠, 4-플로로나이트로벤젠)을 최종 0.5 mM이 되도록 100% 에탄올, 50 mM Tris 완충용액 (pH 8.0)과 1 대 1 대 88의 비율로 혼합하여 4.5 mL을 제조하였다. 여기에 상기 대장균 세포침전물 0.5 mL을 첨가하여 총 5 mL의 부피로 물질전환반응을 시작하였다. 37℃에서 3시간 정치반응함으로써 대장균의 세포 안에 내재되어 있는 니트로리덕타아제 효소군에 의해 니트로기가 하이드록시아미노기로 환원되는 1차 전환이 일어나고, 연이어 60℃에서 3시간 정치반응 하면 대장균내에서 단독발현된 HabM에 의해 하이드록시아미노기에서 하이드록시기가 옆자리로 자리옮김하여 2-아미노페놀로 전환됨으로써 반응용액이 무색에서 노란색으로 바뀌었다. 이 반응 상등액을 벤젠을 검출할 수 있는 스페리솝(spherisorb) C8 컬럼(waters사)이 장착된 액체 크로마토그래피(LC; FUTECS사)를 이용하여 HabM과 기질의 반응을 분석하였다. 기질과 세포를 24시간 동안 반응시키고 나서, 원심분리하여 얻은 반응 상등액을 0.2 μm 필터로 여과한 다음 LC에 의해 분석하였다. 상기 분석 결과, 생성된 2-아미노페놀의 양을 기준으로 니트로벤젠으로부터 2-아미노페놀로의 전환율은 pET21a+/HabM 재조합 대장균 세포가 3시간동안 56 %의 전환율을 보였으며, 다른 부산물은 전혀 관찰되지 않았다.

도면

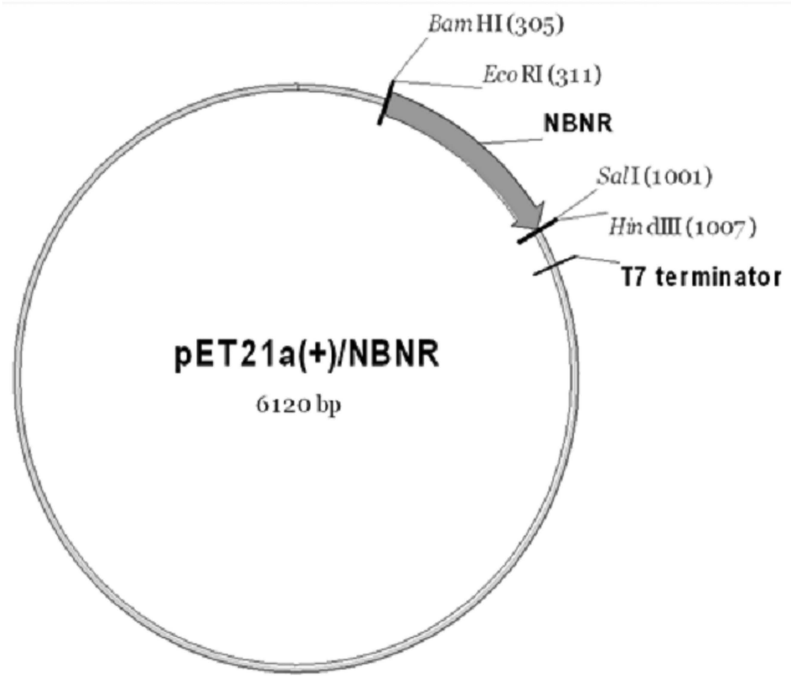
도면1


* 기질 (hydroxyaminobenzene)의
최대흡광도 파장 – 390 nm (무색)
* 생성물 (2-aminophenol)의
최대흡광도 파장 – 440 nm (노란색)
기질
생성물
440 nm
390 nm
Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
300
350
400
450
500
550
800
Wavelength (nm)

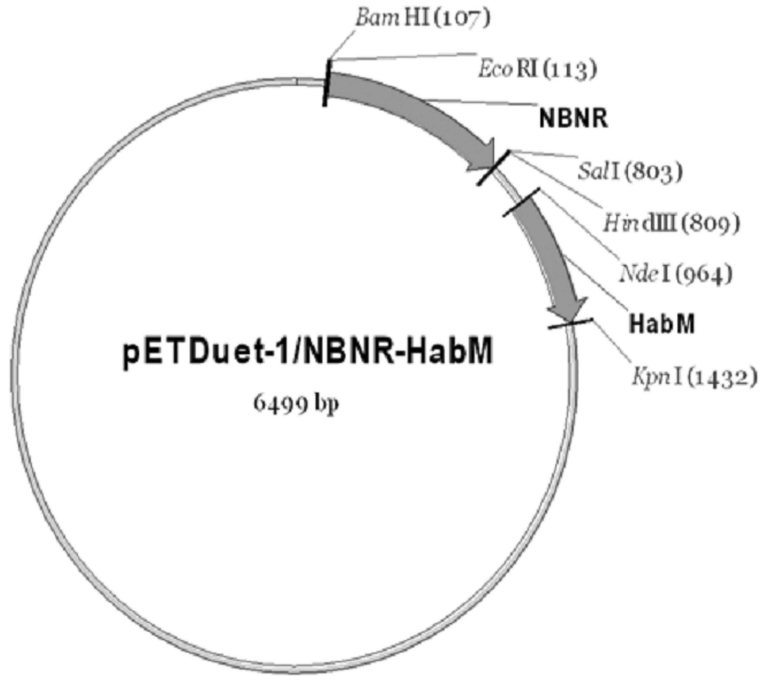
도면2


BamHI (305)
EcoRI (311)
HabM
SalI (776)
M.HindIII (781)
T7 terminator
pET21a(+)/HabM
5895 bp

도면3



도면4



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부