

명세서

발명의 명칭: 3-하이드록시프로피온산에 의해 발현이 유도되는 프로모터 시스템 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 생물학적 생산방법

기술분야

- [1] 본 발명은 3-하이드록시프로피온산에 의해 발현이 유도되는 프로모터 시스템 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 생물학적 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)은 여러 화학공정에 사용되는 중요한 합성 중간체로, 아크릴산, 아크릴아마이드, 1,3-프로판디올, 말로닉산 등을 생산하는데 원료로 사용된다. 또한 생분해성 고분자 합성에도 사용된다. 글리세롤을 이용한 3-HP의 생물학적 생산은 여러 가지 박테리아에 3-HP 생산 경로에 필요한 주요 효소들의 유전자 조작을 통해 성공적으로 이루어졌다. 구체적으로 대장균(*Escherichia coli*), 크렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 슈도모나스 데니트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*) 등의 박테리아에 유전자 조작을 통한 코엔자임 B₁₂ 의존성 효소인 글리세롤 디하이드라테이즈, 글리세롤 디하이드라테이즈 재활성화 효소인 DhaB reactivase 및 NAD⁺ 의존성 효소인 알데하이드 디하이드라지네이즈 등의 (과)발현을 통해 3-HP 생산이 확인되었다. *E. coli* W DUBGK와 같은 몇몇 재조합 균주의 경우 48시간 동안 40g/L 이상의 3-HP를 생산할 수 있었으나, 그 이상으로 3-HP 생산량을 증가시키는 데에 어려움이 있었다. 특히, 3-HP 생산을 위한 발효 시간이 지속됨에 따라 글리세롤 디하이드라테이즈, 알데하이드 디하이드라지네이즈와 같은 효소들이 불안정해지거나 활성을 잃어버리는 문제점들이 관찰되었다. 글리세롤 디하이드라테이즈의 활성이 소실되는 한 가지 중요한 원인은 자살 비활성화(suicidal inactivation)라는 메커니즘 때문이다. 이는 글리세롤에서 3-하이드록시프로피온알데하이드(3-HPA)로의 탈수화 반응 동안 글리세롤 디하이드라테이즈의 조효소인 코엔자임 B₁₂가 비가역적으로 손상되는 것으로, 이와 같은 비활성화 반응은 산소가 존재할 때 촉진된다. 최근에는 이 메커니즘에 기반한 비활성화를 완화하기 위해 부위특이적돌연변이(site-directed mutagenesis)를 이용하여 돌연변이 글리세롤 디하이드라테이즈를 개발하였다. 몇몇 돌연변이 효소들이 향상된 효소 안정성을 가지는 것으로 확인되었으나 기존의 효소와 비교하였을 때 효소 활성이 상당히 감소되는 것으로 관찰되었다.
- [3] 두 번째 원인은 반응성이 높은 중간체인 3-HPA의 독성 때문이다. 글리세롤 디하이드라테이즈 혹은 알데하이드 디하이드라지네이즈는 3-HPA와 함께 존재할 때 3-HPA의 농도에 따라 그 활성이 감소한다. 알데하이드는 라이신,

시스테인, 히스티딘에 각각 존재하는 ϵ -아미노기 (NH_3^+), 설프하이드릴기 ($-\text{C}-\text{SH}$), 이미다졸기와 같은 아미노산 잔기들과 반응하는 것으로 알려져 있다. 부위특이적돌연변이 및 임의돌연변이 유발를 이용하여 알데하이드의 존재하에 많은 효소들의 안정성을 향상시키기 위한 노력이 이루어졌으나, 제한적인 성공에 그쳤다.

- [4] 이와 같은 효소 불안정성 문제를 해결하기 위한 흥미로운 대안은 세포 배양이 이루어지는 전기간 동안 활성을 가지는 새로운 효소를 계속적으로 합성하는 것이다. 비활성화되는 효소의 양만큼 새로운 효소를 공급할 수 있다면 이론적으로 세포 내 이들 효소 활성은 일정하게 유지할 수 있다. 특히 발효 후반 세포의 성장이 느려지거나 정체되고 3-HP의 농도가 높아서 세포의 전체적 대사 활성이 저하된 시점에서 이들 효소를 지속적으로 발현시키는 것이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 이의 유사체에 반응하는 LysR 단백질과의 결합 부위를 포함하는 3-HP 또는 이의 유사체 유도성 프로모터를 제공하는 데에 있다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 이의 유사체에 반응하는 LysR 단백질을 코딩하는 lysR 유전자, 상기 LysR 단백질과의 결합 부위를 포함하는 프로모터 및 발현 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 이의 유사체에 반응하는 LysR 단백질과의 결합 부위를 포함하는 3-HP 또는 이의 유사체 유도성 프로모터를 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 3-HP 또는 이의 유사체 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 3-HP 생산방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 이의 유사체에 반응하는 LysR 단백질을 코딩하는 lysR 유전자, 상기 LysR 단백질과의 결합 부위를 포함하는 프로모터 및 발현 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물, 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트가

숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 발현 목적 단백질 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 3-하이드록시프로피온산에 의해 발현이 유도되는 프로모터 시스템 및 이를 이용한 3-하이드록시프로피온산의 생물학적 생산방법에 관한 것으로서, 생물학적으로 3-HP 생산을 향상시키려면 효소활성을 가지는 새로운 효소들을 계속적으로 생산해내는 것이 필요한데, 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)를 비롯한 여러 미생물에서 3-HP에 반응하는 전사 조절자들과 프로모터들을 스크리닝한 결과, LysR 단백질과 이 단백질에 결합하는 특정 유전자 염기서열로 이루어져 있음을 밝혀냈다. 따라서, 본 발명에 따른 3-HP 유도성 시스템은 3-HP 대사 경로를 조절하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 증식세포에서의 3-HP 동화(A)와 휴지세포에서의 3-HP 분해(B)를 나타낸다. 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)의 3-HP 동화 실험을 위해 균주는 25 ± 2 mmol/L의 3-HP를 단독 탄소원 및 에너지원으로 공급하는 M9 배지에서 배양되었다. 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)의 3-HP 분해 실험을 위해 휴지세포는 25 ± 2 mmol/L의 3-HP를 포함하는 M9 배지에서 배양하여 준비되었다. 3-HP농도 측정에 대한 표준편차는 10% 이하로 계산되었다. 기호: closed circle, 3-HP; semi-circle left, cell mass; cross, pH.
- [13] 도 2는 3-HP의 두 가지 대사경로를 나타낸다(산화 및 환원 경로). 약어: 3-HPDH, 3-하이드록시프로피오네이트 디하이드로게나아제(3-hydroxypropionate dehydrogenase); 3-HIBDH, 3-하이드록시이소부티레이트 디하이드로게나아제(3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase); MMSADH, 메틸말로네이트 세미알데히드 디하이드로게나아제(methylmalonate semialdehyde dehydrogenase); HPCS, 3-하이드록시프로피오닐-CoA 합성효소(3-hydroxypropionyl-CoA synthetase).
- [14] 도 3은 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) ATCC13867에서 3-하이드록시프로피오네이트 이화 유전자에 대한 상대적인 mRNA 수준(A) 및 증가 배수(B)를 나타낸다. (A) 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)를 25 mmol/L 3-HP가 공급된 M9 배지에서 배양하였을 때 결과(grey bar) 및 3-HP 공급 없이 M9 배지에서 배양하였을 때 결과(black bar)를 나타낸다. (B) 3-HP 공급에 따른 mRNA 수준의 차이를 증가 배수로 나타낸 결과(grey bar)를 나타낸다. mRNA 수준 측정에 대한 표준 편차는 10%이하로 계산되었다. mRNA 수준은 *rpoD* 유전자를 참조 유전자로 사용하여 비교되었다.
- [15] 도 4는 *mmsadh* (검정) 및 *3hibdhIV* (회색) 유전자의 발현을 나타낸다. 3-HP 이외 3-하이드록시이소부티레이트(3-hydroxyisobutyrate; 3HIB),

- 3-하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyrate; 3-HB), L-발린(L-valine) 등도 유도체(inducer)로 작용하였다.
- [16] 도 5는 *3hpdH* 유전자의 발현을 나타낸다. 3-HP 이외 3-하이드록시이소뷰티레이트(3-hydroxyisobutyrate; 3HIB), 3-하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyrate; 3-HB), L-발린(L-valine) 등도 유도체(inducer)로 작용하였다.
- [17] 도 6은 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서 3-HP에 의해 유도되는 프로모터 시스템 유전자 서열 및 구조를 나타낸다. A. *mmsadh* 및 *3hibdh* 유전자 그리고 이 유전자의 전사를 조절하는 LysR 단백질 (C4-LysR) 유전자 배치. B. *3hpdh* 유전자와 이 유전자 전사를 조절하는 LysR 단백질 (C3-LysR) 유전자의 배치.
- [18] 도 7은 C4 LysR 유도 프로모터에 대한 분석 결과이다. C4-LysR (*mmsR*로 표기) *mmsadh* (*mmsA*로 표기) 유전자 사이에 존재하는 O1 및 O2 operator는 각각 *mmsadh* 전사 개시 사이트(transcription start site) 기준으로 -58 및 -9 위치에 존재하였고 역반복(inverted repeat) 서열을 가지고 있었다. O1, O2를 구성하는 역반복(inverted repeat)에 대한 분석결과 TACGTGTAA 서열이 보존되어 있었다.
- [19] 도 8은 LysR 패밀리 전사 조절자의 조절기작을 나타낸다.
- [20] 도 9는 LysR 단백질에 높게 보존된 아미노산 서열을 나타낸다. 아미노산 위치는 C4-LysR을 중심으로 매겨졌다. 그러나 DNA 결합 도메인(DNA binding domain)이나 기질 결합 도메인(substrate binding domain)에서 보존된 아미노산 서열은 본 발명에서 사용된 균주 유래 모든 LysR 단백질에 동일하게 나타났다.
- [21] 도 10은 C-his tag C4-LysR의 용해도(solubility) 분석을 위한 SDS-PAGE 결과를 나타낸다. 샤페론 플라스미드(Chaperon plasmid) *pG-KJE8* (A), *pGro7* (B), *pKJE7* (C), *pG-Tf2* (D), *pTf16* (E)을 사용하였다. 유전자 재조합 *E. coli* BL21 균주는 LB 배지, 25°C에서 배양되었고 0.1 mM IPTG로 유도(induction)한 후 4시간 혹은 12시간째 수확(harvest)하였다. 푸른색 화살표는 C4-LysR 단백질로 34.4 kDa의 크기를 보여준다.
- [22] 도 11은 정제된 C4-LysR 단백질의 SDS- 및 Native-PAGE 분석결과를 나타낸다. (A) denaturing SDS-PAGE를 통한 정제과정. Lane 1 야생형(wild-type, crude); lane 2, (-)IPTG; lane 3, 4, 5, 7 은 각각 무-세포(cell-free), 수용성(soluble), 불용성(insoluble) 및 정제 분획(purified fraction)을 보여준다. Lane 6은 단백질 마커(marker) (B) Native PAGE 분석. Lane 8, 10, 12은 단백질 마커(marker); Lane 9, 11, 13 은 정제 C4-LysR 단백질로 각각 65, 220, 550 nM 농도로 로딩(loading)되었다.
- [23] 도 12는 C4-LysR 농도 및 3-HP가 C4-LysR 단백질과 프로모터 부위의 DNA 단편(fragment) 간 결합에 미치는 영향을 나타낸다. (A) 실험에 사용된 프로모터 부위의 DNA 단편 서열. F12는 O1, O2를 모두 포함하는 단편(fragment) 이고 F12M은 O1 operator, 그리고 F1M2는 O2 operator만 포함하는 단편(fragment)이다.

또한 F1M2M은 O1, O2가 모두 제거된 단편이다. 실험에 사용된 DNA 단편의 길이는 모두 135 bp로 동일하였다. (B) C4-LysR 단백질과 프로모터 부위 DNA 단편간의 결합을 in vitro에서 조사한 전기영동 이동거리 변화분석 (Electromobility Shift Assay, EMSA) 결과. 상단 패널(upper panel)은 3-HP가 없는 조건에서, 그리고 하단 패널(lower panel)은 25 mM의 3-HP가 존재하는 조건에서 전기영동이 진행되었다. Lane 1-9: C4-LysR 단백질의 농도를 점차 증가시켰다(0, 0.36, 0.73, 1.45, 2.9, 5.8, 11.6, 14.5, 24.2 nM). Lane 10-15: C4-LysR 단백질의 농도를 다음과 같이 점차 증가시켰다 (0, 2.9, 5.8, 11.6, 14.5, 24.2 nM). Lane 16-21: C4-LysR 단백질의 농도를 다음과 같이 점차 증가시켰다 (0, 2.9, 11.6, 24.2, 72.7 nM). (C) C4-LysR 단백질과 프로모터 부위 DNA 단편간의 결합 affinity 분석의 정량적 결과. Affinity는 분리상수 (dissociation constant, K_D), 즉 절반의 DNA 단편이 C4-LysR 단백질과 결합하는데 필요한 단백질의 농도로 표시하였다.

- [24] 도 13은 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) ATCC13861과 다양한 미생물들 사이의 3-HP 분해 경로에 포함된 유전자 집단의 구조 비교 결과를 나타낸다.
- [25] 도 14 및 도 15는 LysR 영역에 포함된 N-terminal HTH의 다중서열배치를 나타낸다. C4-LysR(도 14), C3-LysR(도 15).
- [26] 도 16은 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에 글리세롤 탈수효소 및 KGSADH를 발현을 위해 개발된 pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH 플라스미드를 나타낸다.
- [27] 도 17은 Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH) 균주 (O1, O2 & O3)와 Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH) 균주(S1, S2 & S3)에 의한 글루코스와 글리세롤 소모, 세포성장, 3-HP 생산, pH 변화 비교 결과를 나타낸다(O1 & S1), 글리세롤 없음; (O2 & S2), 25mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 가 배양 배지에 추가됨; (O3 & S3), 12 $\mu mol/L$ 코엔자임 B12가 배양배지로 추가됨. 3h에 100mM의 글리세롤이 추가됨.
- [28] 도 18은 Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH)와 Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)의 세포 파쇄액을 이용한 시간에 따른 글리세롤 탈수효소 및 KGSADH의 비활성 비교 결과를 나타낸다.
- [29] 도 19는 유가식 바이오리액터 운전 전에 있어 글리세롤, 글루코스의 소모, 바이오매스 및 3-HP 생산의 시간에 따른 변화 결과를 나타낸다. (A) 제조합 Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH) (B) Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH).
발명의 실시를 위한 최선의 형태
- [30] 이에, 본 발명자들은 3-HP 생산효소의 발현을 효율적으로 유지하기 위하여 3-HP에 의해 발현이 유도(induction)되는 특이한 유전자 전사 프로모터 시스템을

다양한 미생물에서 발견하고 이들의 유전적, 생화학적 특징을 조사하였다. 이 프로모터 시스템은 아직 문헌에 한 번도 보고된 적이 없는 특이한 시스템으로 3-HP와 결합하는 전사촉진 단백질과 이 단백질이 특이적으로 결합하는 DNA 서열로 이루어져 있었다. 본 발명자들은 이 프로모터 시스템을 사용하여 DhaB, GdrAB 및 KGSADH를 과발현함으로써 글리세롤로부터 3-하이드록시프로피온산을 고농도로 생산할 수 있는 재조합 균주로 개발하고 본 발명을 완성하였다.

[31]

[32] 본 발명은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 이의 유사체에 반응하는 LysR 단백질과의 결합 부위를 포함하는 3-HP 또는 이의 유사체 유도성 프로모터를 제공한다.

[33] 또한, 본 발명은 3-HP 또는 이의 유사체 유도성 프로모터를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다. 바람직하게는, 상기 3-HP 또는 이의 유사체 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 외래 단백질을 코딩하는 유전자를 더 포함할 수도 있다. 보다 바람직하게는, 상기 외래 단백질은 글리세롤 디하이드라테이즈(glycerol dehydratase; DhaB), 글리세롤 디하이드라테이즈 재활성화 효소(DhaB reactivase; GdrAB) 또는 α -케토글루타릭 세미알데하이드 디하이드라지네이즈(α -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase; KGSADH)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는 상기 미생물은 3-HP 생산능을 가진 미생물일 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 미생물은 슈도모나스 데니트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*)일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 미생물은 슈도모나스 데니트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*) 균주에서 3-HP 분해에 관련된 *3hpdh*, *3hibdh* 및 *mmsadh* 유전자가 결실된 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ 균주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 3-HP 생산방법을 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 또는 이의 유사체에 반응하는 LysR 단백질을 코딩하는 *lysR* 유전자, 상기 LysR 단백질과의 결합 부위를 포함하는 프로모터 및 발현 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트를 제공한다.

[37] 또한, 본 발명은 상기 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 발현백터 및 상기 재조합 백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 3-HP 또는 이의 유사체 반응성 재조합 유전자 발현 카세트가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다. 본

발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 재조합 유전자 발현 카세트를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

- [39] 본 발명에서 상기 재조합 유전자 발현 카세트를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.
- [40] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 발현 목적 단백질 생산방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계는 3-HP를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [41] 바람직하게는, 상기 LysR 단백질 또는 상기 프로모터는 3-HP 분해능을 가진 미생물로부터 유래한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 아크로모박터 테니트리피칸스(*Achromobacter denitrificans*), 아시도보락스 아베네(*Acidovorax avenae* subsp., 아시도보락스(*Acidovorax* sp.), 아시네토박터 바우만니(*Acinetobacter baumannii*), 에로모나스 하이드로필리아(*Aeromonas hydrophilia*), 아그로박테리움(*Agrobacterium* sp.), 알칼리제네스 패칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 알칸니보락스 홍덴젠시스(*Alcanivorax hongdengensis*), 알리시클리필러스 테니트리피칸스(*Alicyclophilus denitrificans*), 알테로모나스 마리나(*Alteromonas marina*), 아미코라톱시스(*Amycolatopsis* sp.), 안에로믹소박터 디할로제난스(*Anaeromyxobacter dehalogenans*), 아조스피릴럼 브라질렌스(*Azospirillum brasilense*), 아조토박터 비네란디(*Azotobacter vinelandii*), 바이예린키아 인디카(*Beijerinckia indica*), 보르데텔라 아비움(*Bordetella avium*), 브라디라조비움 자포니쿰(*Bradyrhizobium japonicum*), 버크홀데리아 암비파리아(*Burkholderia ambifaria*), 카테눌리스포라 애시디필리아(*Catenulisporea acidiphilia*), 카울로박터(*Caulobacter* sp.), 카스텔라니엘라 디프로그란스(*Castellaniella defragrans*), 크로모박테리움 비오라세움(*Chromobacterium violaceum*), 콜리모나스 아레네(*Collimonas arenae*), 코마모나스 테스트스테로니(*Comamonas testosteroni*), 코리네박테리움 비타에러미니스(*Corynebacterium vitae*), 쿠프리아비더스 네카터(*Cupriavidus necator*), 커비박터 그라실러스(*Curvibacter gracilis*), 델프트리아 액시도보란스(*Delftia acidovorans*), 페리모나스 바레아리카(*Ferrimonas balearica*), 글라시에코라 니트라티레듀센스(*Glaciecola nitratreducens*), 고르도니아 브론치알리스(*Gordonia bronchialis*), 하헬라 치유엔시스(*Hahella chijuensis*), 할로모나스 에롱가타(*Halomonas elongata*), 히르치아 리토레아(*Hirschia litorea*), 이디오마리나(*Idiomarina* sp.), 잔티노박테리움 리비덤(*Janthinobacterium lividum*), 기타사토스포라 세타에(*Kitasatospora setae*), 쿠츠네리아 알비다(*Kutzneria albidia*), 메틸로박테리움(*Methylobacterium* sp.), 메틸로시스티스(*Methylocystis* sp.), 노보스핑고비움(*Novosphingobium* sp.), 오셔니모나스 스미르노비(*Oceanimonas*

smirnovii), 파라코커스(*Paracoccus* sp.), 파비바쿨럼 라바멘티보란스(*Parvibaculum lavamentivorans*), 페닐로박테리움 쿤샤넨시스(*Phenylobacterium kunshanensis*), 포토박테리움 가에트불레다(*Photobacterium gaetbuleda*), 폴리뉴클레오박터 네세사리우스 아심비오틱스(*Polynucleobacter necessarius asymbioticus*), 슈도알테로모나스 카라지노보라(*Pseudoalteromonas carrageenovora*), 슈도굴벤키아니아(*Pseudogulbenkianiasp.*), 슈도모나스 테니트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*) ATCC13867, 슈도모나스 크낙뮤시(*Pseudomonas knackmussii*), 슈도모나스 프로테젠스(*Pseudomonas protegens*), 슈도모나스 플루오레젠스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도잔토모나스 스파딕스(*Pseudoxanthomonas spadix*), 사이크로박스 페닐피루비커스(*Psychrobacter phenylpyruvicus*), 랄스토니아 옥살라티카(*Ralstonia oxalatica*), 로도마이크로비움 반니엘리(*Rhodocrobium vannielli*), 세그닐리파루스 로턴더스(*Segniliparus rotundus*), 셰와넬라 원이텐시스(*Shewanella oneidensis*), 시미두이아 아가로보란스(*Simiduia agarovorans*), 시노리조비움 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*), 스펅고비움 클로로페놀리컴(*Sphingobium chlorophenolicum*), 스펅고모나스 위티치(*Sphingomonas wittichii*), 스펅고픽시스 알라스켄시스(*Sphingopyxis alaskensis*), 스테노트로포모나스 말토펴리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 스트렙토마이세스 노도서스(*Streptomyces nodosus*), 타틀록키아 믹다데이(*Tatlockia micdadei*), 타라소스피라 시아메넨시스(*Thalassospira xiamenensis*), 배리오보락스 파라독서스(*Variovorax paradoxus*), 버미네프로박터 에이세니에(*Verminephrobacter eiseniae*), 비브리오 퍼니시(*Vibrio furnissii*), 잔토박터 오토트로피커스(*Xanthobacter autotrophicus*), 잔토모나스 캄페스트리(*Xanthomonas campestris*) 및 잔토모나스 오리제(*Xanthomonas oryzae*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [42] 바람직하게는, 상기 LysR 단백질은 헬릭스-턴-헬릭스(helix-turn-helix) 구조로 이루어져 DNA와 결합하는 N-말단 도메인, 3-HP 또는 이의 유사체와 결합하는 C-말단 도메인 및 LysR 단백질 이합체 안정화에 기여하는 C-말단 도메인을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [43] 보다 바람직하게는, 상기 헬릭스-턴-헬릭스(helix-turn-helix) 구조로 이루어져 DNA와 결합하는 N-말단 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 상기 3-HP 또는 이의 유사체와 결합하는 C-말단 도메인은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 LysR 단백질 이합체 안정화에 기여하는 C-말단 도메인은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 상기 서열번호 1 내지 서열번호 4에 기재된 "X" 또는 "Xaa"는 특정 아미노산이 아니라, 어떠한 아미노산도 포함될 수 있음을 의미한다. 보다 더 바람직하게는, 상기 LysR 단백질은 표 4 및 표 5에 기재된 Genebank ID를 가진 LysR 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [45] 바람직하게는, 상기 LysR 단백질과의 결합 부위는 LysR 단백질 이량체(dimer)가 2개 결합할 수 있으며, 서열번호 5 내지 서열번호 43으로 이루어진 군에 선택된 어느 하나로 표시된 염기서열을 포함할 수 있고, 상기 서열번호 5 내지 서열번호 43으로 이루어진 군에 선택된 어느 하나로 표시된 염기서열로 이루어진 역반복(Inverted Repeat) 서열 및 이와 쌍을 이루는 역반복 서열이 2번 반복될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 보다 바람직하게는, 상기 LysR 단백질과의 결합 부위는 서열번호 44 또는 서열번호 45로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [47] 상기 서열번호 5 내지 서열번호 43에 기재된 "n"은 특정 염기가 아니라, 어떠한 염기도 포함될 수 있음을 의미한다.
- [48] 상기 서열번호 44 또는 서열번호 45는 슈도모나스 데니트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*) ATCC13867에서 유래한 프로모터 염기 서열이다.
- [49] 바람직하게는, 상기 유사체는 3-하이드록시이소뷰티레이트(3-hydroxyisobutyrate; 3HIB) 또는 3-하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyrate; 3-HB) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [51] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [52]
- [53] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [54]
- [55] <실시예 1> 3-하이드록시프로피온산에 의한 유전자 발현 시스템 규명
- [56]
- [57] 1. 재료
- [58] 아크로모박터 데니트리피칸스(*Achromobacter denitrificans*), 아시네토박터

바우만니(*Acinetobacter baumannii*)을 포함한 다수의 균주는 한국미생물보존센터 KCCM으로부터 획득하였다. 아시도보락스 아베네(*Acidovorax avenae*) subsp., 아그로박테리움(*Agrobacterium* sp.)을 포함한 다수 균주에 대해서는 한국 미생물 자원센터 KCTC에서 구매하였다. 알리시클리필러스 데니트리피칸스(*Alicyclophilus denitrificans*), 아에로믹소박터 디할로제난스(*Anaeromyxobacter dehalogenans*)를 포함한 다수의 균주는 독일의 DSM에서 획득하였다. 에어로모나스 하이드로필리아(*Aeromonas hydrophilia*), 슈도모나스 데니트리피칸스(*Pseudomonas denitrificans*) ATCC13867를 포함한 다수의 균주는 미국의 ATCC에서 구매하였다. 프라이머는 코스모진텍(서울, 한국)에서 합성하였다. 3-HP는 일본에 도쿄 카세이 코교 (TCI America, Portland, OR)에서 구입하였다. 효모추출물 (Cat. 212750), 트립톤 (Cat. 211705)은 Difco에서 구입하였다 (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ). 언급하지 않은 모든 화학물질 및 효소는 시그마 알드리치에서 구입하였다 (St. Louis, MO).

[59]

[60] **2. 증식세포에서의 3-HP 동화 및 휴지세포에서의 3-HP 분해**

[61] Shake flask 실험은 250mL non-baffled 삼각플라스크에 30mL의 부피로 진탕배양기에서 온도 37°C, 교반속도 200rpm 조건으로 수행하였다. 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에 의한 3-HP 동화에 대한 실험은 250mL non-baffled 삼각플라스크에 30mL의 부피로 개량된 M9 배지를 넣고 진탕배양기에서 온도 37°C, 교반속도 200rpm 조건으로 수행하였다. 균주를 배양하기 위해 사용한 개량된 M9 배지의 조성은 100mM 인산염 완충용액 (pH 7.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, NaCl 1.0 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, 3-HP 25 mM 으로 하였다.

[62] 휴지세포 실험은 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)를 포함 총 69종의 미생물에서 3-HP 분해에 대해 알아보기 위해 수행되었으며, 이 실험에 사용된 박테리아들은 표 1에 나타내었다. 활성 세포를 준비하기 위해 각 균주에 따라 명시된 영양강화 배지에 3-HP를 포함하여 250mL non-baffled 삼각플라스크에 50mL의 부피로 배양하였다. 균주 배양은 37°C에서 이루어졌으며, 세포의 OD_{600} 가 1-1.5 정도 되었을 때 5000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 수득하였다. 침전된 세포는 100mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)을 이용하여 세척한 후, 동일한 완충용액 안에 3-HP 25 ± 2 mmol/L를 넣고 재현탁하였다. 앞서 언급한 세포 수득, 세척 및 재현탁 과정은 3-HP 분해 실험 전에 이루어졌다. 시료는 3-HP 농도를 조사하기 위해 주기적으로 채취되었다.

[63]

[64] [표1]

본 발명에 사용된 균주

Genus No.	균주	배지	배양 온도	호기 조건	구입처
1	<i>Achromobacter denitrificans</i>	Nutrient medium	26°C	Aerobic	KCCM
2	<i>Acidovorax avenaesubsp.</i>	Nutrient medium	25°C	Aerobic	KCTC
	<i>Acidovorax sp</i>	Tryptone soya broth	28°C	Aerobic	DSM
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCCM
4	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	ATCC
5	<i>Agrobacterium sp.</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCCM
7	<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	Nutrient medium	26°C	Aerobic	KCTC
8	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	Nutrient medium	26°C	Aerobic	DSM
9	<i>Alteromonas marina</i>	Marine broth 2216 (DIFCO 0791)	30°C	Aerobic	KCCM
10	<i>Amycolatopsis sp.</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
11	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	R2A medium	28°C	Microaerobic	DSM
12	<i>Azospirillum brasilense</i>	Azospirillum medium	30°C	Aerobic	KCCM
13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Azotobacter medium	30°C	Aerobic	KCCM
14	<i>Beijerinckia indica</i>	Beijerinckia medium	30°C	Aerobic	KCTC
15	<i>Bordetella avium</i>	Trypticase soy broth	37°C	Aerobic	KCCM
16	<i>Bradyrhizobium</i>	Rhizobium medium	26°C	Aerobic	KCCM

	japonicum				
17	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Trypticase soy broth	28°C	Aerobic	KCCM
18	<i>Catenulispora acidiphilia</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
19	<i>Caulobacter</i> sp.	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
20	<i>Castellaniella defragrans</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
21	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Nutrient medium	26°C	Aerobic	ATCC
22	<i>Collimonas arenae</i>	Nutrient medium with 5g/L NaCl	28°C	Aerobic	DSM
23	<i>Comamonas testosteroni</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCCM
24	<i>Corynebacterium vitaeruminis</i>	Corynebacterium broth	30°C	Aerobic	KCCM
25	<i>Cupriavidus necator</i>	Nutrient medium	26°C	Aerobic	KCCM
26	<i>Curvibacter gracilis</i>	Peptone, yeast extract with magnesium sulfate	30°C	Aerobic	ATCC
27	<i>Delfia acidovorans</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
28	<i>Ferrimonas balearica</i>	Triple-sugar-iron medium(Difco)	28°C	Aerobic	KCTC
29	<i>Glaciecola nitratireducens</i>	Broth Medium Marine Broth 2216 (BD 279110)	25°C	Aerobic	KCTC
30	<i>Gordonia bronchialis</i>	Trypticase soy broth	28°C	Aerobic	KCCM
31	<i>Hahella chijuensis</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
32	<i>Halomonas elongata</i>	Halomonas medium	30°C	Aerobic	KCCM
33	<i>Hirschia litorea</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
34	<i>Idiomarina</i> sp.	Bactomarine broth(Difco)	30°C	Aerobic	KCTC

		2216)			
35	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Nutrient medium	25°C	Aerobic	KCTC
36	<i>Kitasatospora setae</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
37	<i>Kutzneria albida</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
38	<i>Methylobacterium</i> sp.	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
39	<i>Methylocystis</i> sp.	NMS medium for Methanotrophs with 20% methane(v/v) in the air head space	28°C	Aerobic	ATCC
40	<i>Novosphingobium</i> sp.	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
41	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	Marine Broth 2216 (BD 279110)	23°C	Aerobic	ATCC
42	<i>Paracoccus</i> sp.	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
43	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	Peptone 10.0 g /L; NaCl 5.0 g/L; CaCl ₂ H ₂ O 0.1 g/L; Tween 80 10.0 g/L	30°C	Aerobic	KCTC
44	<i>Phenylobacterium kunshanensis</i>	R2A medium	30°C	Aerobic	KCTC
45	<i>Photobacterium gaetbuleda</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
46	<i>Polynucleobacter necessarius</i> asymbioticus	R2A medium	28°C	Aerobic	DSM
47	<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	Sea water yeast peptone broth	20°C	Aerobic	KCCM
48	<i>Pseudogulbenkiana</i> sp.	Nutrient medium	37°C	Aerobic	DSM
49	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC13867	Minimal medium	37°C	Aerobic	ATCC

	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	DSM
	<i>Pseudomonas protegens</i>	Nutrient medium	28°C	Aerobic	DSM
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1213 King medium B	28°C	Aerobic	ATCC
50	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	R2A medium	35°C	Microaerobic	KCTC
51	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	Trypticase soy broth	30°C	Aerobic	ATCC
52	<i>Ralstonia oxalatica</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCCM
53	<i>Rhodococcus vannielli</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
54	<i>Segniliparus rotundus</i>	Bacto Middlebrook 7H10 medium (Difco 262710)	28°C	Aerobic	DSM
55	<i>Shewanella oneidensis</i>	Trypticase soy broth	30°C	Aerobic	ATCC
56	<i>Simiduia agarovorans</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
57	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Rhizobium medium	26°C	Aerobic	KCCM
58	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
59	<i>Sphingomonas wittichii</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
60	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
61	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCCM
62	<i>Streptomyces nodosus</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
63	<i>Tatlockia micdadei</i>	BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) medium	37°C	Microaerophilic	DSM

64	<i>Thalassospira xiamenensis</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
65	<i>Variovorax paradoxus</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCTC
66	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	R2A medium	28°C	Aerobic	DSM
67	<i>Vibrio furnissii</i>	Bactomarine broth(Difco 2216)	28°C	Aerobic	KCCM
68	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Nutrient medium	30°C	Aerobic	KCCM
69	<i>Xanthomonas campestris</i>	Nutrient medium	26°C	Aerobic	KCCM
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	IFO medium 802	30°C	Aerobic	KCCM

[65]

[66] **3. RNA 추출 및 역전사 중합효소 연쇄반응**

[67] 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) ATCC 13567 균주 배양에는 M9 배지가 사용되었으며, 표 1에 나타낸 다른 미생물들의 배양에는 각 균주에 따라 명시된 영양 배지가 사용되었다. 3-HP에 따른 영향을 조사할 때는 제시된 배지 안에 25mM의 3-HP가 첨가되었다. 모든 균주는 진탕배양기에서 온도 37°C, 교반속도 200rpm으로 호기성 조건이 되도록 하여 배양되었으며, 배양세포가 지수성장기에 도달하였을 때 세포를 수득하였다. 세포의 양이 대략 5×10^8 이 되도록 채취한 뒤 5000g에서 10분 동안 원심분리를 수행하였다. 침전된 세포에 즉시 RNA later 용액 (Ambion, UK) 500 μ l 넣고 재현탁하였다. RNA는 total RNA isolation kit (Macherey-Nagel, Germany)로 추출하였다. 20 μ l first-strand cDNA 합성을 위해 1 μ g의 total RNA가 사용되었으며, cDNA 합성을 위해 Invitrogen에서 제공하는 SuperScript III first-strand synthesis system이 이용되었다.

[68] 역전사 중합효소 연쇄 반응은 SYBR green step를 이용하여 One Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA) 장비로 수행되었다. 역전사 중합효소 연쇄반응을 위한 반응액 20 μ L에는 300ng cDNA, 10 μ L 2xPower SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK), 5pmol of forward and reverse primers, DEPC treated water가 포함되었다. 역전사 중합효소 연쇄반응을 위한 조건은 다음과 같이 결정하였다: denaturation, 1 cycle of 95°C for 30 s; amplification, 40 cycles of 95°C for 15 s, 62°C for 30 s, and 72°C for 30 s. 역전사 중합효소 연쇄 반응을 수행하기 전 정확한 mRNA 수준 측정을 위해 실험에 사용된 프라이머 효율 확인은 PCR을 통해 이루어졌으며, mRNA 수준에 대한 relative quantification은

$\Delta\Delta\text{CT}$ 방법을 사용해 계산되었다.

[69]

[70] **4. LysR 단백질의 유전자 클로닝, 단백질 생산, 분리 정제**

[71] 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)의 경우 3-HP를 분해하는데 관여하는 2개의 operon, 즉 3HPDH (이하 C3 시스템) 및 3HIBDH-IV (이하 C4 시스템)이 존재하였고 이들의 전사를 조절하는 LysR 단백질, C3-LysR 과 C4-LysR이 존재하였다. 이 중 C4-LysR에 대하여 단백질 생산을 시도하였다. *E. coli* BL21 (DE3)를 숙주(host)로 그리고 플라스미드 클로닝, 유지 등을 위해서는 *E. coli* Top10을 사용하였다. C4 LysR 유전자를 *P. denitrificans* genome 에서 PCR로 증폭하여 pET30b(+) 플라스미드에 클로닝한 후 *E. coli* Top10에 넣어 염기서열(sequence)을 확인하고 *E. coli* BL21 (DE3)에 넣어주었다. 단백질 정제를 위해 C-말단(C-terminus) 부위에 His tag를 붙여주었다. LysR 단백질을 활성이 있는 수용성(soluble) 형태로 발현하기 위해 pG-KJE8, pGRO7, pG-TF2, pTF-16 등 여러 샤페론 플라스미드(chaperone plasmid)와 함께 co-expression 시켰다. 배지로는 카나마이신(kanamycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), L-아라비노오스(L-arabinose) 등이 적절히 포함된 LB 배지를 사용하였고 호기적 조건에서 배양하였다. 세포농도가 0.6 OD에 이르렀을 때 0.1 mM의 IPTG를 추가하여 LysR 단백질의 생산을 유도하였다. 단백질의 수용성 발현을 위해 여러 배양 조건을 검토한 후 최종적으로 25°C, 150 rpm 에서 10시간 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리하여 얻고 100 mM (pH 7) 인산 완충액(buffer)으로로 세척한 후 결합 완충액(binding buffer)에 재현탁시키고 French Press로 파쇄하였다. 이후 다시 원심분리하여 고형분과 미파쇄 세포를 제거하고 용액부분을 Ni-affinity column을 이용하여 정제하였다. 이후 20% 글리세롤(glycerol) 용액에서 80°C에 보관하였다.

[72]

[73] **5. in vitro 조건에서 단백질-DNA 결합 조사를 위한 전기영동 이동거리 변화 측정(Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA)**

[74] 분리한 C4-LysR 과 프로모터 부위의 결합을 in vitro 에서 연구하기 위하여 프로모터 부위의 DNA 단편(fragment)를 합성하였다(도 7). 3 가지 종류의 단편(fragment)을 합성하였는데 첫째, C4-LysR 유전자와 mmsadh 유전자 사이 전체 DNA 단편(fragment)으로 전사조절 단백질이 결합(binding) 한다고 예상되는 O1 및 O2 operator 2개가 모두 포함된 것 (F12로 명명), 둘째, O1 operator 부분만 포함하는 단편(fragment) (F12M으로 명명), 셋째, O2 operator 부분만 포함하는 단편(fragment) (F1M2로 명명) 등이었다. EMSA 실험은 Invitrogen 사의 Molecular Probes Fluorescence-based Mobility Shift Assay kit (fluorescence-EMSA)를 사용하여 진행되었다. 먼저 프로모터 부위 DNA 단편(fragment)을 glass fiber column 으로 정제한 후 결합 완충액(binding buffer)에서 정제한 LysR 단백질과 혼합하여 30분간 상온에서 반응시켰다. 이후 6% non-denaturing polyacrylamide

gel에 로딩(loading) 한 후 30분간 220 V에서 pH 8의 TBE 완충액(buffer)에서 전개하였다. 이 후 gel을 fixing 한 후 DNA band를 확인하기 위해 SYBR Green EMSA로 염색(staining) 하고 gel documentation system (Bio-Rad)로 band intensity를 정량하였다. 단백질을 관찰할 경우 DNA-protein band를 SYPRO Ruby EMSA 용액으로 염색(staining) 하였다.

[75]

[76] **6. 분석 방법**

[77] 세포 농도는 10mm 길이를 가지는 큐벳을 이용하여 양선 분광광도계 (Lambda 20, Perkin-Elmer, Norwalk, CT)로 측정하였다. 3-HP 농도는 고성능액체크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 측정하였다(Raj et al, 2008). HPLC 분석을 위해 채취한 시료는 10,000×g로 10분 동안 원심분리를 통해 세포 침전물을 제거하고, tuffryn 멤브레인 필터 (Acrodisc; Pall Life Sciences, Port Washington, NY)를 사용하여 시료 안에 남아 있는 세포를 제거하여 준비되었다. HPLC 분석에 사용된 컬럼은 300 mm × 7.8 mm Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA)로 65°C에서 2.5mmol/L의 H₂SO₄를 이동상으로 사용하였다.

[78]

[79] **7. 결과**

[80] **(1) 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서 3-HP 유도성 프로모터의 스크리닝**

[81] 3-하이드록시프로피온산은 자연환경에서 거의 존재하지 않는 탄소 화합물로, 탄소기질로서의 사용이나 생물학적 분해에 관한 보고가 거의 없다. 최근, 본 발명자들은 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)가 성장 및 비성장 상태에서 3-HP를 빠르게 분해하는 것을 발견하였다. 세포 성장 동안 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)는 3-HP를 단독 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있었다 (도 1A). 세포가 성장하지 않는 동안에도 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)는 3-HP를 산소 존재 하에 분해하는 특성을 보여주었다(도 1B). 생물학적으로 3-HP의 분해는 환원성 경로 혹은 산화성 경로를 이용한다고 알려져 있다(도 2). 유전체 분석과 기체 크로마토그래피-질량분석법에 의한 대사체 분석을 통해 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서 3-HP의 분해는 산화경로를 이용하는 것으로 추정되었다. 이 경로에 따르면 3-하이드록시프로피오네이트 디하이드로지네이즈(3HPDH)와 (메틸) 말로네이트-세미알데하이드 디하이드로지네이즈 (MMSADH)로 추정되는 두 효소가 연속적으로 3-HP를 메틸말로네이트 세미알데하이드로, 그리고 메틸 말로네이트 세미알데하이드를 아세틸-CoA로 전환시킨다(도 2). 3HPDH 외에도 3-HP 및 비슷한 3-하이드록시산을 분해할 수 있는 것으로 추정되는 여러 가지 3-하이드록시부틸레이트 디하이드로지네이즈가 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서 확인되었다. 3-HP에 대해 활성을 가지는 여러 가지 효소들의 발현이 3-HP로 인해 유도되어 질 수 있을 가능성이 있었다. 3-HP 이화 작용

유전자들로 추정된 세 가지 유전자 (*3hpdh*, *3hibdhIV*, *mmsadh*)의 mRNA 수준을 RT-PCR을 통하여 비교하였다(도 3). 이때 시그마 인자 70을 암호화하며 항존 유전자로 알려진 *rpoD*를 참조 유전자로 사용하였다. 그 결과 흥미롭게도 3-HP 분해에 관련한다고 추정된 이들 유전자들의 발현이 3-HP에 의하여 상당히 증가하는 것으로 관찰되었다. 세포가 3-HP에 노출되었을 때 *3hpdh*의 경우 46배 증가하였으며, *3hibdhIV*는 146배, *mmsadh*는 137배까지 증가하였다. 이와 같은 유전자들의 상향 조절은 3-HP에 의해 유전자들의 프로모터가 유도되는 성질로 설명될 수 있다.

- [82] *3hpdh*, *3hibdhIV*, *mmsadh* 유전자의 발현이 3-HP와 비슷한 크기를 갖는 그러나 구조적으로 다른 화합물에 의해 증폭될 가능성에 대하여 조사하였다(도 4 및 도 5). 이들 유전자는 모두 3-HP, 3-하이드록시이소뷰티레이트(3-hydroxyisobutyrate; 3HIB), 3-하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyrate; 3-HB)에 의해 증폭이 유도되었다. 그러나 젖산(lactic acid), 아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid), 1,3-프로판디올(1,3-propanediol), 2,3-부탄디올(2,3-butanediol) 등에 의해서는 증폭이 유도되지 않았다. 특이하게도 L-발린(L-valine)에 의해 증폭이 유도되었는데 이는 L-발린(L-valine)이 대사되는 과정에 3-HIB로 전환되기 때문인 것으로 추정되었다. 이로 미루어 전사 조절 단백질은 3-HP, 3-HIB, 3-HB 등에 특이적으로 반응하는 것으로 판단되었다.

[83]

[84] **(2) 3-HP 유도성 유전자 발현 시스템 분석**

- [85] LysR 패밀리에 속한 전사조절자(LysR-type transcriptional regulators; LTTRs)는 방향족 화합물의 분해 경로와 같은 이화 과정을 조절하는 전사 활성인자로 알려져 있다. 일반적으로 LTTRs를 암호화하는 유전자는 방향족 화합물 분해에 관련된 유전자 집단의 앞부분에 존재하면서 화합물 분해 작용을 조절한다. 3-HP 분해 경로를 규명하기 위해서 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)의 3HPDH 및 3HIBDH-IV에 관련된 오페론의 유전자 구조 분석이 이루어졌다. 그 결과 3-HP 분해 유전자들의 앞쪽 부분에 LTTRs가 비슷한 유전자 배열로 위치하고 있음을 확인하였다(도 6). 이는 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서 3-HP 분해 유전자들의 발현이 LysR 단백질에 관련되어 있을 가능성을 나타낸다. 특징적으로 *lysR* 유전자와 LysR 단백질(이하, C4 화합물인 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase 유전자와 결합하는 LysR을 C4-LysR, 그리고 C3 화합물인 3-HP dehydrogenase의 유전자와 결합하는 LysR을 C3-LysR 이라고 칭함)에 의해 전사가 조절되는 유전자 (*mmsadh*, *3hibdh4*, *3hpdh*)는 서로 반대되는 orientation으로 위치하였고, 두 가지 특정 결합 부위 즉, 보존적 T-N11-A 모티프를 가지는 조절결합위치(regulatory binding site; RS)와 35 RNA 중합효소 결합 위치 (-35 RNA polymerase binding site) 근처에 있는 활성결합위치(activation binding site; AS)가 확인되었다(도 6). 또한 이들 RS 및 AS는 LysR 단백질을 coding 하는 유전자의 10, -35 부위와 서로 overlap 되는 것이 확인되었다. 이로

미루어 *lysR* 유전자의 발현은 산물인 LysR에 의해 억제(repression) 되는 것으로 추정되었다.

- [86] *P. denitrificans*에 존재하는 C4 LysR 유도 프로모터에 대하여 보다 자세한 분석을 실시하였다. LysR 유전자와 *mmsadh* 유전자 사이에 존재하는 O1 및 O2 operator는 각각 *mmsadh* 전사 개시 사이트(transcription start site) 기준으로 -58 및 -9 위치에 존재하였고 역반복(inverted repeat) 서열을 가지고 있었다(도 7). 역반복(inverted repeat) 서열 혹은 palindromic 구조는 원핵세포의 operator 부위에 종종 나타나며 전사조절 단백질의 결합부위가 된다고 알려져 있다. O1 및 O2 site의 거리는 약 50 bp 정도이며 나선형 DNA 5바퀴에 해당하므로 LysR 단백질이 O1, O2 부위에 결합할 때 같은 방향에서 결합할 수 있을 것으로 추정되었다. O1 site의 한 쌍(dyad)은 15 bp 거리를 두고 9개의 염기로 구성되는데 단지 1개의 mismatch 만이 있어서 고도로 대칭적(symmetrical)이라는 것을 알 수 있었다. 반면 O2 site의 역반복(inverted repeat) 서열은 역시 9 bp 씩 반복되어 구성되었고 그 사이 간격은 11 bp로 다소 짧았다. 9개 중 6개가 mismatch 일 정도로 대칭(symmetry) 정도는 약하였다. 한편 O1, O2 operator에 존재하는 4개의 palindromic fragment의 상동성을 조사한 결과 TΔCGTGTΔA로 나타났으며 3, 4, 5번 위치의 염기(굵은 글씨)는 모든 fragment에서 보존되어 있었고 2, 8 번 위치의 염기(밑줄)는 3개의 fragment에서 보존되어 있어서 이들 염기가 C4 LysR 단백질과의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다.
- [87] O1, O2 operator가 C4-LysR 단백질 생합성과 *mmsadh* 발현에 미치는 영향을 녹색형광단백질(green fluorescent Protein; GFP)을 리포터(reporter)로 사용하여 조사하였다(표 2). 표 2에서는 C4-LysR 단백질 및 O1, O2 operator가 C4-LysR 및 *mmsadh* 발현에 미치는 영향을 나타냈다. GFP의 상대적 크기를 3-HP 부재시 야생형(wildtype)과 비교하여 표시하였다. C4-LysR 단백질은 아예 존재하지 않거나 항시적 프로모터(constitutive promoter)에 의하여 생산되도록 하였고 GFP의 발현은 O1, O2 operator를 갖는 원래의 프로모터(promoter)에 의해 조절되도록 플라스미드(plasmid)를 만들고 이 플라스미드(plasmid)를 C4-LysR과 *mmsadh* 사이의 유전자가 결실된 *P. denitrificans* 숙주에 삽입하여 실험을 진행하였다. GFP의 발현은 C4-LysR 단백질 자신에 의해 억제되었다. 즉 C4-LysR이 발현될 때 GFP 발현은 10배 이상 감소되었다. 또한 이 발현 조절은 3-HP의 존재 유무와 관계없이 일정하게 나타났다. 이를 통하여 C4-LysR mRNA의 전사는 C4-LysR 단백질에 의해 음성적으로(negative) 조절된다는 것을 알 수 있었다. 이 실험은 O1, O2 operator를 임의추출(randomize) 하여 대칭 쌍(symmetrical dyad)이 없어지도록 한 프로모터(promoter)를 이용하여 반복되었다. 그 결과 O1이나 O2 operator 부위가 임의추출(randomize) 되었을 경우 GFP의 발현이 C4-LysR 단백질에 의해 조절되지 않는 것으로 나타났다. 이 결과는 *P. denitrificans* 균주 내에서 C4-LysR 단백질은 자기 자신에 의해 음성적으로(negative) 제어된다는 것을 보여준다.

[88] 한편 mmsadh 유전자 발현에 미치는 O1, O2 operator의 영향을 비슷한 방법으로 조사하였다. 즉 C4-LysR 단백질은 항상적으로(constitutive) 발현되도록 하고 O1, O2 프로모터를 갖는 프로모터 뒤에 GFP가 위치하도록 플라스미드를 제작하였다. 그리고 이때 O1 혹은 O2 site의 대칭 쌍(symmetrical dyad)이 임의추출(randomize) 되도록 O1 혹은 O2 operator를 돌연변이(mutation) 시켰다. 그 결과 O1, 혹은 O2 부위가 돌연변이(mutation)된 경우 3-HP에 의해 전사(transcription)가 상향조절(upregulation) 되는 현상이 없어졌다. 즉 O1, O2 operator 모두 3-HP에 의해 발현이 상향조절(upregulation) 되도록 하는데 필수적인 부위라는 뜻이다. 이로써 본 프로모터(promoter)는 O1, O2 operator 존재가 반드시 필요한 프로모터(promoter) 라는 것이 밝혀졌다.

[89]

[90] [표2]

Genes tested ¹	3-HP addition ²	wildtype	Δ C4-LysR	O1 mutation ³	O2 mutation ³	O1 & O2 mutation ³
C4-LysR	w/o 3-HP	1	10	10	1	10
	w 3-HP	1	10	10	1	10
mmsadh	w/o 3-HP	1	3	3	3	3
	w 3-HP	55	3	3	3	3

[91] ¹리포트 단백질로 GFP가 사용되었다. 즉 C4-LysR 이나 mmsadh 위치에 GFP 유전자를 삽입한 플라스미드를 사용하였다.

[92] ²3-HP는 25 mM 농도로 넣어 주었다.

[93] ³O1, O2를 임의추출(randomize)한 경우 C4-LysR은 약하지만 항상적으로(constitutive) 발현되는 프로모터를 사용하였다.

[94]

[95] 한편 LTTRs 단백질은 DNA 결합 도메인 (helix-turn-helix motif)인 N-terminal, 기질 결합 도메인인 C-terminal, 그리고 이들을 연결하는 링커(linker)로 이루어져 있는 것으로 알려져 있다. LysR 단백질은 homodimer를 형성하여 각각 RS와 AS에 결합하며, 작동 분자(effector molecule) (본 발명의 경우 3-HP)이 각각의 LysR 단백질이 결합할 경우 두 개의 LTTR 이합체 (dimer) 사이에 단백질-단백질 상호 작용에 의해 LTTR이 사합체 (tetramer)를 형성하게 되고 이 때 LysR과 결합한 DNA에 구조적 변화를 일으킨다. LTTR 사합체에 특정적으로 결합하는 유도체는 LysR 단백질의 구조적 변화를 야기시키고 이어 promoter region DNA의 구조를 변화시켜 궁극적으로 RNA 중합효소가 프로모터(promoter)에 결합하는 것을 돕는다고 알려지고 있다(도 8).

[96] 본 발명에서 중점적으로 다루어지고 있는 C4-LysR 단백질에 대해 구조를 조사한 결과 역시 DNA 결합 도메인 (helix-turn-helix motif)인 N-말단(terminal),

기질 결합 도메인인 C-말단(terminal), 그리고 이들을 연결하는 링커(linker)를 확인할 수 있었다(도 9). DNA 결합 도메인에는 Thr-31, Arg-34, Glu-40, 그리고 Leu-47 등 4개의 아미노산이 핵심적인 역할을 하는 것으로 파악되었고, 기질 결합 도메인(substrate binding domain)에서는 3-HP와 결합하는데 중요한 아미노산과 이합체 형성 등에 중요한 역할을 하는 아미노산 등이 확인되었다. 이중 3-HP와 결합하는데 중요한 역할을 하는 아미노산은 Asp-159, Thr-160, Pro-237 그리고 Phe-239 등이었고 이합체 형성 등에 중요한 역할을 하는 아미노산은 Ala-60, Gly-91, Arg-94, Pro-118, Glu-137 등이었다. 특히 이합체 형성 등에 중요한 역할을 하는 아미노산들은 Pro-118을 제외하고 모두 단백질 표면에 위치하였다.

- [97] LysR 단백질이 전사조절 인자인지 확인하기 위해 C3 및 C4 LysR 단백질을 암호화하는 유전자를 *P. denitrificans* 염색체에서 제거하고 전사가 조절되는 유전자 (*mmsadh*, *3hibdhIV*, *3hpdh*)의 전사 유도 여부를 조사하였다. 먼저 C4 LysR 유전자가 제거되었을 경우 3-HP의 존재 여부에 관계없이 *mmsadh*, *3hibdhIV* 유전자의 발현은 낮았고 3-HP를 넣어주어도 발현이 증대되지 않았다. 또한 C3 LysR 유전자가 제거되었을 경우 *3hpdh* 유전자의 발현이 3-HP의 첨가에 의해 증폭되지 않았다. 반면 C3 LysR 혹은 C4 LysR 유전자가 제거된 균주에 이들 유전자를 플라스미드를 이용하여 다시 발현시켜주었을 때(보상 실험; complementation experiment), 야생균주와 같은 수준으로 3-HP에 의한 발현 증폭 현상이 다시 회복되었다. 이를 통해 C3 LysR 및 C4 LysR 단백질이 세포내에서 각각 *mmsadh*, *3hibdhIV* 및 *3hpdh* 유전자의 발현을 제어하는 전사조절 단백질임을 확인할 수 있었다.

[98]

- [99] (3) C4-LysR 단백질과 O1, O2 operator 부위의 결합특성에 대한 in vitro 조사

- [100] C4-LysR 단백질의 in vitro 특성 조사를 위해 C 말단에 히스티딘 태그(histidine tag)를 갖는 C4-LysR 단백질을 대장균에서 생산하고 정제하였다. 먼저 C 말단과 N 말단에 His Tag을 달고 앞서 언급한 보상(complementation) 실험을 진행하였다. 그 결과 두 경우 모두 His tag을 갖지 않는 야생형(wildtype) LysR 과 동일한 성능을 보여주었다. 따라서 두 가지 재조합(recombinant) LysR 중에서 C-His tag LysR 만을 대상으로 생화학적(biochemical) 실험을 진행하게 되었다. 재조합(recombinant) LysR은 대장균 내에서 대부분 불용성(insoluble) 형태로 발현되었다. 발현조건(온도, pH, 배지 조성, IPTG 농도)에 대하여 세밀한 최적화(optimization) 실험이 진행되었다. 또한 각종 샤페론 단백질(chaperon protein)의 영향도 조사되었다. 그 결과 비교적 낮은 온도인 25°C, 그리고 0.1 M IPTG, LB 배지, GroEL-ES 샤페론(chaperon) 공동 발현 조건에서 실험에 필요한 정도의 수용성(soluble) C4-LysR을 대장균으로부터 생산할 수 있었다(도 10). 순수 분리된 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. C4-LysR의 크기는 약 33 kDa 으로 추정되었고 이는 유전자 크기로부터 예측된 크기와 잘 일치하는

것이였다. 한편 native gel electrophoresis를 실시한 결과 단백질의 농도가 높을 때 완충용액 내에서 이량체(dimer)를 형성하는 것을 알 수 있었다(도 11).

- [101] 유전자 재조합 C4-LysR과 프로모터 DNA의 결합을 EMSA 실험을 통하여 조사하였다(도 12). 이를 위하여 3가지 DNA 단편(fragment)을 합성하였다. F12 (135 bp)는 C4-Lys와 mmsadh 유전자 사이 전체 프로모터 부위(promoter region)로 O1, O2 operator를 모두 포함하는 DNA 단편(fragment); F12M (135 bp)은 O1 operator 부위(region)만 포함하는 DNA 단편(fragment); 그리고 F1M2 (135 bp)는 O2 operator 부위(region)만 포함하는 DNA 단편(fragment)이었다. 대조군(control)으로 1개의 단편(fragment)을 합성하여 사용하였는데 이들은 F12와 동일한 크기를 가지고 있으나 O1, O2 부위(region)가 모두 임의추출(randomize) 되어 palindrome 구조를 갖지 않도록 제작된 단편(fragment)이었다. C4-LysR 단백질을 DNA 단편(fragment) (F12, F12M, F1M2)와 반응시켜 전기영동을 실시한 결과 DNA 단편(fragment)의 이동성(mobility)이 감소하는 것이 관찰되었다(도 12). 이는 C4-LysR 단백질이 in vitro 조건에서 이들 DNA 단편(fragment)과 결합한다는 뜻이다. 이러한 이동성(mobility)의 감소는 대조군 단편(control fragment)에서는 관찰되지 않았다. 즉 C4-LysR 과 DNA 단편(fragment)과의 결합은 DNA 단편(fragment)의 염기서열, 보다 정확하게는 O1, O2 operator 서열(sequence)이 있어야 가능하다는 뜻이다. 3종류 단편(fragment) 중에서 F12가 가장 LysR 단백질에 대하여 친화도(affinity)가 높았고, 다음이 F12M, F1M2 순이었다. EMSA 실험을 3-HP가 존재하는 조건에서 반복하였다. 3-HP의 존재는 친화도(affinity)를 변화시켰다. F12에 대해서는 친화도(affinity)를 향상시켰고, F1의 경우에는 거의 변화가 없었고, 반면 F2는 친화도(affinity)가 오히려 다소 감소하는 것으로 나타났다.

- [102] F12가 F12M 혹은 F1M2 단편(fragment)에 비해 높은 친화도(affinity)를 갖는다는 것은 LysR 단백질의 O1, O2 결합이 서로 상호 협조적(cooperative)이라는 것을 의미한다. 즉, 친화도(affinity)가 높은 O1 site에 LysR 단백질이 결합하면 O2 site 결합을 촉진한다는 뜻이다. EMSA 실험 결과 F12는 F12M 혹은 F1M2 단편(fragment)에 비해 항상 낮은 이동성(mobility)을 보여주었다. 그리고 낮은 LysR 농도에서도 단지 한 개의 shift 된 band만을 보여주었다. 이는 F12 단편(fragment)에 항상 더 많은 LysR 단백질이 결합되어 있음을 의미한다. 즉 LysR 단백질이 F12 단편(fragment)에 결합할 때는 항상 O1, O2 site 두 개 모두에 결합한다는 뜻이다. F12 단편(fragment)이 F12M 혹은 F1M2 보다 높은 친화도(affinity)를 갖고 또한 F12M이나 F1M2 보다 낮은 이동성(mobility)을 갖는다는 것은 F12 단편(fragment) 내 O1, O2 site에 대한 LysR 단백질의 결합이 상호협조적(cooperative)이라는 사실을 보여준다. 이러한 EMSA 실험 결과로부터 3-HP 유도성 프로모터의 중요한 성질을 다음과 정리할 수 있었다. (i) 프로모터는 각각 9개의 염기로 이루어지는 역반복(Inverted Repeat) 서열 쌍을 2개 혹은 그 이상 갖는 것을 특징으로 하고 LysR 단백질의 결합부위를 제공한다. (ii) LysR

단백질은 유도성 분자(inducer molecule)와의 결합 여부에 관계없이 프로모터에 결합할 수 있으나, 전사효율의 향상은 유도성 분자(inducer molecule)와 결합한 LysR 단백질에 의해서만 나타나며 유도성 분자(inducer molecule)로는 3-HP 외에도 3-HP와 구조적으로 유사한 3-HIB, 3-HB 등이 사용될 수 있다. (iii) 프로모터는 LysR 단백질 이량체가 2개 결합하는 부위를 제공하며 이 결합은 서로 상호협동적(cooperative)이다. (iv) 프로모터는 RNA 중합효소가 결합할 경우 LysR 단백질과 상호작용(interaction) 할 수 있는 구조를 제공한다. (v) 프로모터에는 O1, O2 operator가 존재하며 각각의 operator는 9개의 염기로 이루어지는 역반복(Inverted Repeat) 내 염기서열이 잘 보존되어 있다.

[103]

[104] **(4) 3-HP 유도성 유전자 발현 시스템의 가상 탐색 및 발현 시스템의 특성 분석**

[105] 새로운 3-HP 유도성 유전자 발현 시스템을 찾기 위해 슈도모나스

테니트리피칸스(*P. denitrificans*) 유전자 상동성에 기초하여 추정적 LysR 조절 유전자 및 *mmsadh*, *3hipdh*, *3hpdh* 등을 여러 미생물에서 스크리닝하였다. BlastP 유사성 조사결과 다른 여러 미생물들에서도 비슷한 3-HP 유도성 유전자 발현 시스템이 존재하는 것으로 나타났으며, 잘 알려진 미생물들 중에서 3HIBDH(C4 시스템)와 3HPDH(C3 시스템)으로 추정되는 유전자 집단이 있는 것으로 밝혀졌다(도 13, 표 4 및 표 5). 유전자들의 구조 분석 및 비교 결과 미생물들마다 다양한 유전적 구조를 가지는 것으로 확인되었다.

[106] 총 150여 종 이상의 미생물에서 3-HP 유도성 유전자 발현 시스템이 발견되었고 이들은 C3-LysR 과 C4-LysR의 존재 유무와 유전자 배열 특징에 따라 총 16개의 그룹으로 나눌 수 있었다. 이 중 9개의 그룹은 C4 및 C3 시스템을 모두 가지고 있었고 7개의 그룹은 C4 시스템만 가지고 있었다. C3 시스템만 가지는 그룹은 전혀 발견되지 않았다. 또한 C3 시스템의 경우 LysR 단백질을 암호화하는 유전자와 LysR 단백질에 의해 발현이 조절되는 유전자는 모두 전사 방향이 반대라는 특징이 있었다. C4 시스템의 경우에도 LysR 단백질을 암호화하는 유전자 LysR 단백질에 의해 발현이 조절되는 유전자는 대부분 전사 방향이 반대라는 특징이 있었으나 Group 15과 Group 16에 속하는 미생물에서는 이 방향이 서로 동일하였다.

[107] C3 및 C4 LysR 단백질에 반응하는 프로모터 시퀀스 특징을 분석하였다. *P. denitrificans*의 경우와 마찬가지로 두 개의 tandem operator sites (O1 및 O2로 명명)가 모두 존재하였다. 두 개의 operator 는 한 쌍의 대칭(dyad symmetry) 구조를 가지고 있었고 각각의 역반복(inverted repeat) 서열은 9개의 염기로 구성되어 있었다. 한 쌍의 대칭(dyad symmetry) 중심 간의 거리는 50개 염기거리를 가지고 있어서 LysR 단백질이 O1 및 O2 operator site에 결합할 때 동일한 방향에서 결합하도록 간격을 유지하였다. 또한 역반복(inverted repeat) 서열 내 9개 염기는 많은 미생물에서 잘 보존되어 있었다.

[108] 3-HP에 반응하는 LysR과의 결합 부위(Palindromic)는 다양한 미생물에서

보존되어 있었는데, 각각의 종에 따라서, O1 operator 즉 1차/억제 결합 사이트(Primary/Repression Binding Site; PBS/RBS)만이 보존되어 있었다(표 3). 또한, 모든 종에 있어서, 보존된 T-N_{11/12}-A motif를 포함하는 높은 친화도를 보이는 PBS는 전사 개시 사이트(transcription start site; TSS)로부터 -65 내지 -75 부위 근처에 존재하였다. O2 operator 즉 2차/활성 결합 사이트(Secondary/Activation Binding Site; SBS/ABS) motif에서는 서열 보존성이 낮기 때문에, ABS motif의 *in silico* 예측은 복잡하고 어렵다. RBS 및 ABS 사이트는 각각 자가-억제 및 활성화에 있어 핵심적인 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다. 3-HP에 반응하는 단백질들로서 공통적인 기능을 갖는 데도 불구하고, 3-HP-LysR 단백질은 다른 속(genus) 간에는 낮은 서열 유사성을 갖고, 동일 속 내에서는 높은 서열 유사성을 갖는다. 따라서, LysR 단백질과 결합하는 operator 부위 DNA 시퀀스가 다른 속(genus) 간에 서로 다르다는 것이 논리적으로 틀리지 않는 것으로 판단된다. 전사 인자(Promoters; -10 and -35 regions)는 BPROM 및 BDGP tools을 사용하여 예측하였다.

[109] 아래 표 3에 기재한 9개의 염기서열은 각각의 종(genus)에서 3-HP에 반응하는 LysR과의 결합 부위에 해당하는 보존 영역으로서, 대문자는 확인 대상 모두에서 보존된 것으로 나타나는 염기이다.

[110]

[111] [표 3]

Genus	Repressive Binding Site(T-N _{11/12} -A motif)	# Representatives
<i>Achromobacter</i>	CACAcATct	4
<i>Acidovorax</i>	TcGCAcAcC	3
<i>Acinetobacter</i>	GTcaAaGAT	7
<i>Advenella</i>	TTGCAaATT	4
<i>Aeromonas</i>	GGGcAaaCA	2
<i>Alcaligenes</i>	CACAcATct	5
<i>Alcanivorax</i>	AgCAGCATG	2
<i>Alicyclophilus</i>	TGCaAAGcc	2
<i>Anaeromyxobacter</i>	GGGaCGacG	3
<i>Azospirillum</i>	gTGCCcGCG	4
<i>Azotobacter</i>	gTatcGAGC	4
<i>Beijerinckia</i>	ATTgcCgTG	3
<i>Bordetella</i>	gTTtCGTtG	6
<i>Bradyrhizobium</i>	AtATATcaG	3
<i>Brucella</i>	AaaAAtGCa	3
<i>Burkholderia</i>	GCCTACacT	16
<i>Corynebacterium</i>	CACCTtTgC	6
<i>Cupriavidus</i>	AGTtCAgcG	3
<i>Delftia</i>	GCAAAAacg	3
<i>Ferrimonas</i>	GCGGTTTTa	2
<i>Glaciecola</i>	TgAaTtGAC	3
<i>Gordonia</i>	GAaaCCGGC	2
<i>Halomonas</i>	tACACacAA	3
<i>Janthinobacterium</i>	TtCGcATTa	3
<i>Marinobacter</i>	CAgaAgGcT	2
<i>Methylocystis</i>	CGAtCgACC	2
<i>Phenylobaculum</i>	GTcCCGCtC	2
<i>Pseudomonas</i>	TTGCAcatC	24

<i>Ralstonia</i>	GCCTACacT	5
<i>Shewanella</i>	gTTcGcgTA	6
<i>Sinorhizobium</i>	TcGgAAaTT	2
<i>Sphingobium</i>	CgcACaAcC	2
<i>Stenotrophomonas</i>	GgcCaGATT	2
<i>Tistrella</i>	CCGGcgGcG	3
<i>Variovorax</i>	gTcTATTgT	2
<i>Verminephrobacter</i>	CgTGgcCGA	2
<i>Vibrio</i>	TGcaCcgTT	6
<i>Xanthobacter</i>	CTgtGCACa	2
<i>Xanthomonas</i>	GcgGTGGgC	6

[112] #Representitives: Genus 내에서 동일한 Repressive Binding Site (RBS)를 가지는 것으로 확인된 종의 숫자.

[113]

[114] [표4]

C4-LysR, MMSADH, 3HIBDH에 대한 효소 단백질 서열 상동성 비교

Enzyme Source	C4-LysR		MMSADH		3HIBDH		Genbank ID
	Size(AA)	Identity (%)	Size(AA)	Identity (%)	Size(AA)	Identity (%)	C4-LysRMMSADH3HIBDH
<i>Achromobacter sp.</i>	306	47	497	67	296	56	WP_013392250.1 WP_020924676.1 WP_046807163.1
<i>Acidovorax avenae</i> subsp.	295	59	507	82	299	54	WP_019701544.1 WP_019701545.1 WP_019701549.1
<i>Acidovorax sp.</i>	301	60	507	82	296	55	WP_005799303.1 WP_008905850.1 WP_026437393.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	293	49	505	70	296	59	WP_005014261.1 WP_039237888.1 WP_005025914.1
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	304	36	503	58	306	55	WP_029302009.1 WP_042863805.1 WP_017784754.1
<i>Agrobacterium sp.</i>	293	37	518	47	294	45	NA
<i>Alcaligenes faecalis</i>	297	45	497	60	298	55	WP_026483089.1 WP_045930222.1 WP_026483274.1
<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	302	39	498	56	287	48	WP_008927645.1 WP_008929937.1 WP_0402972

							29.1
<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	304	58	505	81	298	53	WP_013519376.1 WP_013519377.1 WP_013519381.1
<i>Alteromonas marina</i>	294	35	496	48	291	62	WP_039223538.1 WP_039216373.1 WP_039223543.1
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	313	31	491	53	293	29	WP_012631783.1 ABC82015.1 P_011419642.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	291	33	499	51	296	53	EZQ04117.1 WP_014241748.1 P_035679372.1
<i>Azotobacter vinelandii</i>	296	72	501	92	297	79	WP_012699721.1 WP_012699726.1 WP_012699724.1
<i>Beijerinckia indica</i>	301	43	509	50	295	52	WP_012383627.1 WP_012383190.1 WP_012383623.1
<i>Bordetella avium</i>	307	48	497	66	294	58	WP_012416822.1 WP_012416824.1 WP_012417430.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	302	42	498	49	296	50	WP_024338218.1 WP_024338217.1 WP_028153398.1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	319	47	509	74	300	65	WP_012365776.1 WP_012366631.1 WP_006761413.1

<i>Catenulispora acidiphila</i>	296	35	504	42	301	41	NA
<i>Caulobacter</i> sp.	295	31	498	45	295	43	NA
<i>Castellaniella defragrans</i>	303	46	497	64	297	59	WP_043685951.1 WP_043680927.1 WP_043682533.1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	305	41	500	79	296	58	WP_043617011.1 WP_045051895.1 WP_043613761.1
<i>Collimonas arenae</i>	319	47	502	67	297	54	AIY40998.1 WP_038487725.1 WP_038487728.1
<i>Comamonas testosteroni</i>	300	54	507	83	298	52	WP_034389635.1 WP_003075837.1 WP_043003783.1
<i>Corynebacterium vitæruminis</i>	304	28	504	51	291	42	WP_025251982.1 WP_025251535.1 WP_025251536.1
<i>Cupriavidus necator</i>	308	40	507	73	296	66	WP_042881289.1 WP_042878263.1 WP_042878261.1
<i>Carvibacter gracilis</i>	296	60	505	82	294	54	WP_027474562.1 WP_027474565.1 WP_027474567.1
<i>Delftia acidovorans</i>	300	54	507	82	298	53	WP_034393435.1 WP_01220552

							3.1WP_0164534 78.1
<i>Ferrimonas balearica</i>	284	25	497	55	296	51	ADN76259.1WP _013344534.1W P_013344538.1
<i>Glaciecola nitratreducens</i>	281	28	496	56	295	47	WP_014109619. 1WP_01410898 2.1WP_0141089 79.1
<i>Gordonia bronchialis</i>	298	32	513	48	289	46	WP_041920477. 1WP_01283558 1.1WP_0128355 79.1
<i>Hahella chejuensis</i>	302	28	498	51	296	51	NA
<i>Halomonas elongata</i>	315	44	499	67	300	53	WP_013331269. 1WP_01333127 0.1WP_0133321 81.1
<i>Hirschia</i> sp.	294	37	498	43	293	45	NA
<i>Idiomarina</i> sp.	312	28	499	57	297	52	WP_007420015. 1WP_03472901 2.1WP_0074196 52.1
<i>Janthinobacteriu m lividum</i>	305	46	502	75	297	53	WP_034757572. 1WP_03477880 5.1WP_0347575 84.1
<i>Kitasatospora setae</i>	304	31	508	43	298	40	NA
<i>Kutzneria albida</i>	300	35	501	45	284	44	NA
<i>Methylobacterium sp.</i>	302	41	499	47	297	47	NA
<i>Methylocystis</i> sp.	294	30	498	48	295	46	WP_036241816. 1WP_03628600

							1.1WP_0362891 18.1
<i>Novosphingobium</i> sp.	316	39	499	45	289	45	NA
<i>Oceanimonas</i> smirnovii	288	28	497	58	297	47	WP_019933245. 1WP_01993316 8.1WP_0199331 71.1
<i>Paracoccus</i> sp.	297	38	533	46	302	45	NA
<i>Parvibaculum</i> lavamentivorans	304	30	500	52	296	57	WP_041536697. 1WP_04153646 3.1WP_0121118 23.1
<i>Phenylobacterium</i> koreense	282	32	498	52	298	49	WP_041374440. 1WP_01252076 8.1WP_0125222 31.1
<i>Photobacterium</i> gaetbuleda	303	26	502	53	303	44	NA
<i>Polynucleobacter</i> necessarius asymbioticus	291	49	500	79	298	66	ABP34774.1AB P34773.1ABP34 771.1
<i>Pseudoalteromonas</i> carrageenovora	299	29	496	55	299	52	WP_009840151. 1WP_01038150 6.1WP_0331034 66.1
<i>Pseudogulbenkian</i> ia sp.	320	46	500	79	298	59	WP_008953966. 1WP_00895451 5.1WP_0140869 32.1
<i>Pseudomonas</i> denitrificans ATCC13867	298	100	501	100	291	100	WP_015477414. 1WP_01547741 5.1WP_0154774 16.1
<i>Pseudomonas</i>	298	95%	504	93	291	92	WP_043252263.

knackmussii							1WP_04325226 1.1WP_0432522 59.1
<i>Pseudomonas</i> protegens	316	45	508	73	295	62	WP_041751937. 1WP_01105911 1.1WP_0156340 46.1
<i>Pseudomonas</i> fluorescens	315	45	505	73	295	60	WP_034128788. 1WP_04605558 8.1WP_0341287 86.1
<i>Pseudoxanthomon</i> <i>as spadix</i>	297	27	501	79	297	57	WP_014159583. 1WP_01415974 9.1WP_0141597 53.1
<i>Psychrobacter</i> phenylpyruvicus	302	27	495	71	314	52	WP_028859590. 1WP_02885916 6.1WP_0288591 70.1
<i>Ralstonia</i> oxalatica	298	30	515	73	301	65	NA
<i>Rhodomicrobium</i> vannielli	296	30	496	48	296	48	NA
<i>Segniliparus</i> rotundus	300	25	509	51	300	46	WP_013137524. 1WP_01313761 1.1WP_0131376 10.1
<i>Shewanella</i> oneidensis	291	24	499	55	300	51	WP_011072126. 1WP_01107182 8.1WP_0110718 32.1
<i>Simiduia</i> agarivorans	297	29	505	55	296	47	NA
<i>Sinorhizobium</i> meliloti	315	40	498	50	298	52	WP_018099720. 1WP_02799046

							5.1 WP_027991426. 1
<i>Sphingobium</i> <i>chlorophenolicum</i>	292	43	499	49	294	48	WP_037446180. 1WP_03745663 5.1WP_0374461 74.1
<i>Sphingomonas</i> <i>wittichi</i>	325	43	503	44	296	46	NA
<i>Sphingopyxis</i> <i>alaskensis</i>	310	36	497	45	291	44	NA
<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	289	32	501	80	296	57	WP_044569661. 1WP_01918550 4.1WP_0054076 87.1
<i>Tatlockia</i> <i>micdadei</i>	293	22	499	45	295	47	WP_045099921. 1WP_04509808 2.1WP_0450980 81.1
<i>Thalassospira</i> <i>xiamenensis</i>	295	38	499	45	296	48	NA
<i>Variovorax</i> <i>paradoxus</i>	298	60	507	82	300	55	WP_018905631. 1WP_01274835 5.1WP_0127483 51.1
<i>Verminephrobacte</i> <i>r eiseniae</i>	298	26	507	78	299	51	WP_011807819. 1WP_01181124 3.1WP_0118112 50.1
<i>Vibrio furnissii</i>	304	25	520	57	300	49	WP_014257826. 1 WP_041943477. 1WP_00472784 5.1
<i>Xanthobacter</i>	307	44	498	50	299	51	WP_012114222.

autotrophicus							1WP_01211422 1.1WP_0415754 20.1
<i>Xanthomonas</i> campestris	301	29	501	77	295	58	WP_044099340. 1WP_00348824 4.1 WP_003488236. 1
<i>Xanthomonas</i> oryzae	304	27	501	77	300	57	WP_024711534. 1WP_04475011 3.1 WP_024744051. 1

[115]

[116] [표5]

C3-LysR, 3HPDH에 대한 효소 단백질 서열 상동성 비교

Enzyme Source	C3-LysR		3HPDH		Genbank accession no
	Size(AA)	Identity (%)	Size (AA)	Identity (%)	C3-LysR3HPD H
<i>Achromobacter sp.</i>	306	45	547	65	WP_00622384 9.1WP_006225 226.1
<i>Acidovorax avenae</i>	295	45	564	59	WP_01359500 9.1WP_013592 873.1
<i>Acidovorax sp.</i>	301	44	556	61	WP_02022964 6.1WP_020229 941.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	293	40	534	39	WP_00086180 3.1WP_032868 291.1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	297	42	555	64	WP_02648308 9.1ADT64694. 1
<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	290	27	531	42	WP_00892946 8.1WP_008927 596.1
<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	304	44	560	60	WP_01351937 6.1WP_013721 241.1
<i>Alteromonas marina</i>	294	36	550	43	WP_03922353 8.1WP_039222 748.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	391	35	537	36	WP_04013727 3.1WP_035676 856.1
<i>Bordetella avium</i>	307	45	540	66	WP_01241682 2.1WP_012415

					815.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	302	41	539	57	WP_02433821 8.1WP_028143 201.1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	323	38	567	60	WP_00675436 9.1WP_011659 279.1
<i>Castellaniella defragrans</i>	303	42	537	63	WP_04368595 1.1WP_043679 553.1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	305	54	556	68	WP_04361701 1.1WP_043617 013.1
<i>Collimonas arenae</i>	319	44	541	61	AIY40998.1W P_038494339.1
<i>Comamonas testosteroni</i>	300	39	555	69	WP_04300377 1.1WP_012836 757.1
<i>Cupriavidus necator</i>	308	38	554	61	WP_04288128 9.1WP_042883 575.1
<i>Carvibacter gracilis</i>	296	45	575	57	WP_02747456 2.1WP_027477 384.1
<i>Delftia acidovorans</i>	300	41	575	59	WP_03439343 5.1WP_043780 341.1
<i>Glaciecola nitratreducens</i>	310	23	533	41	WP_01411021 7.1WP_014110 368.1
<i>Gordonia bronchialis</i>	298	24	443	42	WP_04192047 7.1WP_012835 455.1
<i>Halomonas elongata</i>	315	42	551	61	WP_01333126

					9.1WP_013332 997.1
<i>Idiomarina</i> sp.	303	25	564	37	WP_00848742 5.1WP_034821 838.1
<i>Janthinobacterium lividum</i>	305	44	541	62	WP_03478889 9.1WP_010393 822.1
<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	304	28	548	40	WP_04153669 7.1WP_041536 013.1
<i>Polynucleobacter necessarius</i> asymbioticus	291	41	539	58	ABP34774.1A BP33573.1
<i>Pseudogulbenkiania</i> sp.	320	42	547	42	WP_01408692 7.1WP_014087 291.1
<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC13867	304	100	554	100	WP_01547842 4.1WP_015478 425.1
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	301	89	552	85	WP_04324975 5.1WP_043249 752.1
<i>Pseudomonas protegens</i>	297	71	548	75	WP_04111757 4.1WP_011060 785.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	294	72	548	76	WP_04604894 6.1WP_038984 218.1
<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	307	28	545	43	WP_04329047 6.1WP_014160 845.1
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	302	25	565	40	WP_02885981 0.1WP_028859 590.1
<i>Segniliparus rotundus</i>	300	26	516	37	WP_01313936

					8.1WP_013137 524.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	315	37	531	77	WP_01809427 7.1WP_010970 328.1
<i>Sphingobium chlorophenicum</i>	292	38	544	40	WP_03744618 0.1WP_037446 228.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	289	29	534	44	WP_03759074 8.1WP_044569 661.1
<i>Variovorax paradoxus</i>	298	44	544	61	WP_01890563 1.1WP_042580 440.1
<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	306	28	556	59	WP_01181225 8.1 WP_01180870 3.1
<i>Vibrio furnissii</i>	295	27	573	39	WP_00472924 5.1WP_004724 290.1
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	307	43	556	56	ABS68474.1W P_012114222.1
<i>Xanthomonas campestris</i>	304	30	556	53	WP_03348487 4.1WP_011038 502.1

[117]

[118] LysR 단백질에 대한 분석도 동일하게 실시하였다. non-redundant NCBI 데이터베이스로부터 C4 LysR과 C3 LysR 시퀀스에 대해 BLAST 검색 결과, DNA 결합 Helix-turn-Helix 영역과 상동성을 갖는 시퀀스가 각각 126개, 132개로 존재하는 것을 확인하였다. 도 14 및 도 15에 이 시퀀스들에 대한 다중서열배치(multiple sequence alignment)를 나타내었다. 시퀀스 얼라이먼트(sequence alignment) 결과 LysR 시퀀스의 상당 부분이 높게 보존되어 있는 것으로 확인되었으며, 이 분석에 사용된 다른 미생물들에서도 LysR

시퀀스가 높은 수준으로 보존되어 있는 것으로 나타났다. 이는 대부분의 미생물들이 세포 내에서 LysR을 이용하고 있음을 말해준다. 또한 모든 C4 LysR과 C3 LysR 시퀀스에서 프로모터 3-HP 발현 프로모터 내 operator 부위(region)의 역반복 서열(Inverted Repeat sequence)과 강하게 결합하는 것으로 추정되는 Helix-turn-Helix 영역이 발견되었고 이 영역에서는 Thr-31, Arg-34, Glu-40, 그리고 Leu-47 등 4개의 잔기들이 잘 보존되어 있었다. 보존된 아미노산 잔기들은 LysR 단백질이 DNA와 결합할 때 강하게 상호작용하는데 중요한 부분일 것으로 생각된다(도 9).

- [119] LysR과 3-HP간의 상호 작용 (protein-ligand interaction)을 좀 더 자세히 알아보기 위해서 homology model과 docking 실험을 수행하였다. 먼저, PDB 데이터베이스에서 이용가능 한 구조를 이용하여 슈도모나스 테니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서의 C4-LysR과 C3-LysR의 시퀀스 유사성을 비교한 결과 35% 이하의 낮은 유사성을 보였다 (PDB ID: 3SZP, 24 % identical). 따라서 C4-LysR과 C3-LysR의 모델링은 MUSTER과 LOMET server를 이용한 threading 방법으로 수행하였다. 그 결과 예측된 C4-LysR과 C3-LysR의 모델을 RAMPAGE를 이용하여 정제 및 검증하고, 이 모델의 아미노산 잔기 98%가 적합한 영역에 있음을 Ramachandran plot을 통해 확인하였다. C4-LysR과 C3-LysR에서 3-HP가 결합하는 활성부위가 COACH를 이용하여 예측되었다. 유효한 모델과 예측된 활성부위 잔기들은 SCHRODINGERTM에 있는 Maestro 프로그램에서 docking 실험을 수행하는데 사용되었다. 목표 단백질 (C4-LysR, C3-LysR)과 리간드 (3-HP)는 각각 Protein Preparation Wizard와 LigPrep Wizard를 사용하여 조사되었다. Grid box를 생성하기 위해 Receptor Grid Generation틀을 사용하였으며, 생성된 grid box안에서 SP (Standard Precision) 및 XP (eXtra Precision) docking setting을 이용하여 리간드 docking을 수행하였다. docking 결과, C4-LysR에 대해서는 5.01, C3-LysR에 대해서는 3.74의 docking 점수를 가질 때 가장 우수한 docking pose를 보여주었다. C4-LysR 및 C3-LysR이 3-HP와 여러 가지 분자 간의 상호작용을 가지는 것으로 확인되었다. C4-LysR의 아미노산 잔기들 중 Asp-159, Thr-160, Pro-237 및 Phe-239 등은 3-HP와 수소결합을 이루며, ARG24은 3-HP와 소수성 상호작용을 이루는 것으로 조사되었다(도 9). C3-LysR의 아미노산 잔기들 중 LEU74, THR190, THR28은 수소 결합을 이루며, THR73, VAL150, PRO167, PHE127, PHE169의 경우 소수성 상호작용을 이루는 것으로 조사되었다. 3-HP와 LysR 간의 상호작용이 없을 것이라는 예측과 달리, docking 결과 흥미롭게 3-HP가 C4-LysR에 존재하는 기질 결합 도메인(substrate binding domain) (ARG94, LYS96, GLU137)과 helix-turn-helix domain (ARG24) 사이에서 강한 상호작용하는 것을 보여주었다. 이와 비슷하게 C3-LysR의 THR28 (helix-turn-helix domain)이 3-HP와 강하게 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. 특히 기질 결합 도메인(substrate binding domain)에서는 3-HP와 결합 외에도 이합체 형성 등에 중요한 역할을 하는 아미노산이 확인되었다. 이들은 아미노산은

Ala-60, Gly-91, Arg-94, Pro-118, Glu-137 등이었다. 특히 이합체 형성 등에 중요한 역할을 하는 아미노산들은 Pro-118을 제외하고 모두 단백질 표면에 위치하였다. 이로 미루어, 3-HP가 LysR에 직접적으로 영향을 미쳐 LysR을 이합체화반응이 일어나도록 하면, 이합체반응이 일어난 LysR은 DNA와 결합하여 LysR 유전자 아래쪽에 위치하는 3-HP 분해 유전자들의 전사를 높은 수준으로 조절하는 것이다.

[120]

[121] **(5) 3-HP 유도성 유전자를 갖는 미생물에 의한 3-HP 분해 및 3-HP 유도성 유전자의 발현**

[122] 유전자 구조 분석에서 3-HP 분해 경로가 다양한 미생물에서 존재하는 것으로 밝혀졌다. 다양한 미생물들의 3-HP 분해 능력을 평가하기 위해서 25mmol/L의 3-HP가 포함된 100mM 인산염 용액에 세포를 현탁하였고 24시간 동안 3-HP가 분해되도록 하였다(표 6). 그 결과 미생물에 따라 3-HP 분해 속도는 차이가 있었으나 모두 효과적으로 3-HP를 분해하는 것으로 나타났다. 3-HP 분해 유전자 (*3hpdh*, *3hibdh*, *mmsadh*)의 전사수준을 3-HP 존재 유무에 따라 평가하였다(표 7). 표 7에서 보는 바와 같이, 3-HP는 이들 미생물에서 *3hpdh*, *3hibdh*, *mmsadh* 유전자의 발현을 각각 6배, 14배, 16배 이상으로 높게 향상시켰다. 이 결과는 다양한 미생물 내에 3-HP 유도성 시스템이 공통적으로 존재한다는 것을 의미한다. 한편 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)와 비교하여 다른 미생물에서는 전사 증가 비율이 10배 정도 상대적으로 낮았는데 이는 배양 조건의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 즉 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)를 제외하고 다른 미생물에서는 성장을 좋게 하기 위하여 복합 질소원이 다량 함유된 배지에서 미생물을 배양하였는데 이 경우 3-HP 이외에 복합 질소원에 포함된 아미노산이나 이들 아미노산 분해 산물이 3-HP가 존재하지 않는 조건에서도 일정 부분 *3hpdh*, *3hibdh*, *mmsadh*의 전사를 활성화시켜 3-HP가 존재하지 않는 조건에서 전사량을 높게 유지시켰기 때문이다.

[123]

[124] [표6]

휴지기 세포의 3-HP 분해

Genus No •	Strains	3-HP degraded (mM) ^a
1	<i>Achromobacter denitrificans</i>	18.40
2	<i>Acidovorax avenae</i> subsp.	20.43
	<i>Acidovorax</i> sp.	16.60
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	18.76
4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	17.88
5	<i>Agrobacterium</i> sp.	20.54
6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	19.32
7	<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	24.51
8	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	20.62
9	<i>Alteromonas marina</i>	20.42
10	<i>Amycolatopsis</i> sp.	21.13
11	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	23.14
12	<i>Azospirillum brasilense</i>	17.96
13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	19.44
14	<i>Beijerinckia indica</i>	23.13
15	<i>Bordetella avium</i>	23.87
16	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	21.67
17	<i>Burkholderia ambifaria</i>	18.33
18	<i>Catenulispora acidiphilia</i>	19.45
19	<i>Caulobacter</i> sp.	22.34
20	<i>Castellaniella defragrans</i>	13.97
21	<i>Chromobacterium violaceum</i>	14.56
22	<i>Collimonas arenae</i>	16.11
23	<i>Comamonas testosteroni</i>	15.96
24	<i>Corynebacterium vitae</i>	17.35
25	<i>Cupriavidus necator</i>	18.46
26	<i>Curvibacter gracilis</i>	19.12

27	<i>Delftia acidovorans</i>	15.89
28	<i>Ferrimonas balearica</i>	17.32
29	<i>Glaciecola nitratreducens</i>	16.57
30	<i>Gordonia bronchialis</i>	18.41
31	<i>Hahella chijuensis</i>	17.59
32	<i>Halomonas elongata</i>	19.14
33	<i>Hirschia litorea</i>	18.47
34	<i>Idiomarina</i> sp.	17.86
35	<i>Janthinobacterium lividum</i>	18.02
36	<i>Kitasatospora setae</i>	19.05
37	<i>Kutzneria albida</i>	21.14
38	<i>Methylobacterium</i> sp.	23.04
39	<i>Methylocystis</i> sp.	16.97
40	<i>Novosphingobium</i> sp.	15.87
41	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	15.91
42	<i>Paracoccus</i> sp.	17.96
43	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	18.02
44	<i>Phenylobacterium kunshanensis</i>	17.56
45	<i>Photobacterium gaetbuleda</i>	19.04
46	<i>Polynucleobacter necessarius asymbioticus</i>	16.97
47	<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	19.03
48	<i>Pseudogulbenkiania</i> sp.	7.36
49	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC13867	20.53
	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	7.42
	<i>Pseudomonas protegens</i>	25.24
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24.41
50	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	23.01
51	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	20.17
52	<i>Ralstonia oxalatica</i>	18.09
53	<i>Rhodocyclidium vannielli</i>	19.42
54	<i>Segniliparus rotundus</i>	8.96

55	<i>Shewanella oneidensis</i>	10.14
56	<i>Simiduia agarovorans</i>	23.78
57	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	13.87
58	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	14.76
59	<i>Sphingomonas wittichii</i>	21.04
60	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	23.56
61	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	15.34
62	<i>Streptomyces nodosus</i>	21.13
63	<i>Tatlockia micdadei</i>	17.81
64	<i>Thalassospira xiamenensis</i>	18.88
65	<i>Variovorax paradoxus</i>	19.34
66	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	17.04
67	<i>Vibrio furnissii</i>	16.98
68	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	15.92
69	<i>Xanthomonas campestris</i>	14.37
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	13.88

[125] ^a The amount of 3-HP degraded was calculated between 0 and 24h.

[126]

[127] [표7]

3-HP 분해 유전자들의 상대적 mRNA 수준

Genus No.	Strains	3hpdh		3hibdh		mmsadh	
		-3-HP	+3-H P	-3-HP	+3-H P	-3-HP	+3-H P
1	<i>Achromobacter denitrificans</i>	0.04	0.24	0.31	6.40	0.24	6.34
2	<i>Acidovorax avenae subsp.</i>	0.05	0.28	0.34	5.97	0.21	5.98
	<i>Acidovorax</i> sp.	0.02	0.31	0.33	6.76	0.36	6.04
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.01	0.19	0.35	6.02	0.27	5.76
4	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	-	-	0.37	6.17	0.32	6.14
5	<i>Agrobacterium</i> sp.	0.01	0.27	0.36	6.27	0.41	6.56
6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.04	0.26	0.39	5.87	0.28	5.73
7	<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	0.03	0.27	0.33	6.74	0.37	6.58
8	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	0.07	0.30	0.31	7.01	0.25	6.01
9	<i>Alteromonas marina</i>	0.06	0.34	0.34	6.09	0.22	5.73
10	<i>Amycolatopsis</i> sp.	-	-	0.32	5.96	0.24	6.05
11	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	-	-	0.37	6.43	0.28	5.44
12	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.05	0.41	0.36	6.54	0.33	6.05
13	<i>Azotobacter vinelandii</i>	-	-	0.38	6.73	0.31	5.87
14	<i>Beijerinckia indica</i>	-	-	0.34	6.59	0.29	5.01
15	<i>Bordetella avium</i>	0.08	0.45	0.31	6.04	0.24	4.98
16	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0.07	0.52	0.41	7.21	0.34	5.49
17	<i>Burkholderia ambifaria</i>	0.03	0.31	0.29	5.94	0.21	5.13
18	<i>Catenulisporea acidiphilia</i>	0.05	0.41	0.32	5.84	0.25	5.24
19	<i>Caulobacter</i> sp.	0.04	0.45	0.35	5.96	0.24	5.96
20	<i>Castellaniella defragrans</i>	-	-	0.45	7.43	0.37	5.98
21	<i>Chromobacterium violaceum</i>	0.02	0.25	0.38	7.02	0.32	6.31
22	<i>Collimonas arenae</i>	-	-	0.37	7.20	0.30	5.87
23	<i>Comamonas testosteroni</i>	0.04	0.24	0.28	5.88	0.21	4.96
24	<i>Corynebacterium vitacruminis</i>	0.03	0.28	0.47	6.99	0.34	5.89
25	<i>Cupriavidus necator</i>	0.02	0.21	0.42	6.84	0.33	6.05

26	<i>Curvibacter gracilis</i>	-	-	0.29	5.76	0.19	3.99
27	<i>Delftia acidovorans</i>	-	-	0.33	6.34	0.26	4.03
28	<i>Ferrimonas balearica</i>	-	-	0.41	7.04	0.34	5.17
29	<i>Glaciecola nitratireducens</i>	0.05	0.30	0.36	7.11	0.29	4.81
30	<i>Gordonia bronchialis</i>	0.04	0.29	0.45	6.99	0.33	5.21
31	<i>Hahella chijuensis</i>	0.03	0.28	0.42	6.81	0.34	5.97
32	<i>Halomonas elongata</i>	0.06	0.32	0.27	5.41	0.19	4.34
33	<i>Hirschia litorea</i>	0.05	0.34	0.29	6.19	0.18	4.56
34	<i>Idiomarina</i> sp.	0.08	0.42	0.47	7.21	0.32	5.43
35	<i>Janthinobacterium lividum</i>	0.03	0.33	0.41	6.98	0.29	5.01
36	<i>Kitasatospora setae</i>	0.04	0.36	0.39	6.46	0.25	5.25
37	<i>Kutzneria albida</i>	0.03	0.41	0.35	5.96	0.24	5.61
38	<i>Methylobacterium</i> sp.	0.05	0.45	0.33	6.02	0.23	5.98
39	<i>Methylocystis</i> sp.	-	-	0.32	6.51	0.21	4.91
40	<i>Novosphingobium</i> sp.	0.04	0.39	0.29	5.98	0.25	6.04
41	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	0.02	0.24	0.36	6.44	0.28	4.88
42	<i>Paracoccus</i> sp.	0.03	0.25	0.34	6.32	0.27	4.96
43	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	0.04	0.28	0.46	7.31	0.32	4.99
44	<i>Phenylobacterium kunshanensis</i>	0.06	0.33	0.41	7.43	0.33	5.02
45	<i>Photobacterium gaetbuloda</i>	-	-	0.36	7.02	0.29	5.06
46	<i>Polynucleobacter necessarius</i> asymbioticus	0.09	0.45	0.39	6.99	0.27	5.37
47	<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	-	-	0.29	5.76	0.21	5.03
48	<i>Pseudogulbenkiania</i> sp.	0.04	0.26	0.32	5.98	0.23	5.36
49	<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC13867	0.03	0.23	0.39	6.20	0.26	5.43
	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	0.03	0.25	0.41	6.81	0.35	5.96
	<i>Pseudomonas protegens</i>	0.02	0.19	0.28	5.62	0.21	5.01
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.04	0.27	0.26	5.81	0.18	4.70
50	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	-	-	0.31	5.99	0.27	4.96

51	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	0.08	0.37	0.43	7.04	0.31	5.03
52	<i>Ralstonia oxalatica</i>	-	-	0.40	7.21	0.34	5.21
53	<i>Rhodocrobium vannielli</i>	0.05	0.41	0.39	7.01	0.32	6.02
54	<i>Segniliparus rotundus</i>	0.07	0.27	0.25	5.81	0.19	4.32
55	<i>Shewanella oneidensis</i>	0.05	0.28	0.25	5.81	0.19	4.07
56	<i>Simiduia agarovorans</i>	0.03	0.29	0.23	5.76	0.21	4.87
57	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	-	-	0.24	5.79	0.16	4.07
58	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	0.06	0.33	0.33	5.99	0.23	4.86
59	<i>Sphingomonas wittichii</i>	0.03	0.45	0.31	7.02	0.32	6.42
60	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	-	-	0.35	7.00	0.35	6.94
61	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.04	0.31	0.29	6.02	0.24	5.21
62	<i>Streptomyces nodosus</i>	0.07	0.39	0.43	6.72	0.34	5.14
63	<i>Tatlockia micdadei</i>	-	-	0.47	6.61	0.36	5.65
64	<i>Thalassospira xiamenensis</i>	-	-	0.32	7.02	0.33	6.10
65	<i>Variovorax paradoxus</i>	-	-	0.38	6.59	0.28	4.97
66	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	0.08	0.43	0.42	6.43	0.30	5.14
67	<i>Vibrio furnissii</i>	0.05	0.39	0.39	6.03	0.27	4.91
68	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	0.04	0.27	0.27	6.23	0.21	5.41
69	<i>Xanthomonas campestris</i>	0.03	0.25	0.24	5.81	0.18	5.09
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	0.02	0.19	0.45	6.43	0.34	5.19

[128]

[129] 이들 미생물에서 3-HP 유도성 프로모터에 대한 분석을 실시하였다. 앞서 *P. denitrificans*의 경우와 마찬가지로 모든 프로모터는 O1, O2 operator sequence를 가지고 있었다. 이 서열의 존재는 각각 9개의 염기로 이루어진 palindromic structure로 확인되었다. 이들 서열에 대한 추가적인 연구가 진행되지는 않았지만 이들 모두 *P. denitrificans*의 경우와 같이 LysR 단백질과 결합할 것으로 예상되었다.

[130]

결론적으로, 생물학적으로 3-HP 생산을 향상시키려면 효소활성을 가지는 새로운 효소들을 계속적으로 생산해내는 것이 필요하다. 본 발명에서는 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)를 비롯한 여러 미생물에서 3-HP에 반응하는 전사 조절자들과 프로모터들을 스크리닝하였다. 이들은 LysR 단백질과 이 단백질에 결합하는 특정 유전자 염기서열로 이루어져 있었다. 또한 LysR family transcriptional regulator는 3-HP가 존재할 때 해당 유전자의 발현을

상향조절하는 것으로 확인되었다. 분자 모델링과 docking 실험은 C4-LysR (ARG94, LYS96, GLU137, ARG24)과 C3-LysR(LEU74, THR190, THR28, THR73, VAL150, PRO167, PHE127, PHE169)에 중요한 잔기들이 존재함을 보여주었다. 3-HP 유도성 시스템은 3-HP 대사 경로를 조절하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[131]

[132] <실시예 2> 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)에서 3-하이드록시프로피온산 생산 경로의 최적화

[133]

[134] 1. 균주, 플라스미드 및 실험 재료

[135] 이 연구에서 사용된 박테리아 종과 플라스미드는 표 8과 같다. 대장균(*E. coli*)은 한국미생물자원센터(KCTC)에서, 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) 균주는 ATCC에서 분양받았다. *E. coli* XL1-Blue 는 플라스미드 복제와 유지에 사용되었다. 게놈의 DNA 분리 키트와 pGEM-T 벡터는 Promega (Madison, WI, USA)에서, 고성능 pfx polymerase는 Invitrogen (서울, 대한민국)에서, DNA 변형 효소는 New England Bio-Labs (Beverly, MA, USA)에서, Miniprep과 DNA gel 추출 키트는 Qiagen (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. 그리고 프라이머는 Cosmogenetech Co. Ltd.(서울, 대한민국), Bacto Tryptone과 yeast extract는 Difco (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA)에서 기타 화학물질과 효소들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[136]

[137] [표8]

본 발명에서 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드

	분석내용	출처
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host	KCTC, Korea
<i>P. denitrificans</i> wt	<i>P. denitrificans</i> ATCC13867; Source for <i>3hibdhIV</i> and <i>3hpdh</i> promoters and terminators	ATCC, America
$\Delta 3hpdh \Delta 3hibdhIV$	<i>P. denitrificans</i> ATCC13867 $\Delta 3hpdh \Delta 3hibdhIV$ double mutant strain	Zhou et al. 2014
$\Delta 3hpdh \Delta 3hibdhIV \Delta 3hibdhI$	<i>P. denitrificans</i> ATCC13867 $\Delta 3hpdh \Delta 3hibdhIV \Delta 3hibdhI$ triple mutant strain	This study
Plasmids		
pGEM-T	<i>lacZ</i> α ; cloning vector; pGEM 5zf(+) derivative; 3T-overhang; Amp ^r	Promega
pUCP19	ColE1- <i>ori</i> ; pRO1614- <i>ori</i> ; broad-host-range cloning vector; Amp ^r	West et al. 1994
pUCPK/ P _{C3} - <i>dhaB</i> - <i>gdrAB</i> , P _{C4} -KGSADH	<i>KGSADH</i> gene amplified from pQKS1 were overlapped with <i>3hibdhIV</i> promoter and terminator and cloned in pUCPK/P _{C3} - <i>dhaB</i> - <i>gdrAB</i> ; Km ^r	This study
pUCPK/ P _{C3} - <i>gdrAB</i> - <i>dhaB</i> , P _{C4} -KGSADH	<i>gdrAB</i> and <i>dhaB</i> gene order were switched and cloned in pUCPK/P _{C4} -KGSADH, ; Km ^r	This study

[138]

[139] 2. 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) $\Delta 3hpdh \Delta 3hibdhIV \Delta 3hibdhI$

결실 돌연변이 균주의 개발

[140] 3-HP 분해 유전자의 역할을 파악하기 위해 *3hibdhI*가 슈도모나스데니트리피칸스(*P. denitrificans*) $\Delta 3hpdh \Delta 3hibdhIV$ 의 염색체로부터 제거되었다.목적 유전자는 *sacB* negative counter-selection 시스템에 기초하여 결실되었다.pQE-80L 벡터의 *NdeI*과 *XbaI* 제한부위에 *sacB*-Km 카세트를 도입하여 pQSAK

플라스미드가 만들어졌으며, 이는 목적 유전자의 제거에 사용되었다.

슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) 게놈 DNA를 사용하여 목적

유전자의 ~700 bp 상부와 하부를 포함하는 DNA 단편이 PCR를 통해 얻어졌으며

이 부분은 DNA 시퀀스 확인 후 pGEM-T 벡터로 클로닝되었다. 그 후 pQSAK

플라스미드 안으로 다시 sub-cloning 되었으며 두 번의 재조합을 통해 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) 돌연변이주가 개발되었다. 이러한 돌연변이 균주들은 PCR 및 시퀀스 확인을 통해 재확인되었다. 그렇게 확보된 돌연변이 균주를 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ 라고 명명하였다.

[141]

[142] **3. 플라스미드의 개발**

[143] 글리세롤 탈수효소와 재활성화효소를 암호화하는 유전자는 pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH 플라스미드를 이용하여 증폭되었고 발현카세트는 gdrAB와 dhab123 유전자 끝 측면의 5' 과 3'에 C3 프로모터와 C3 터미네이터를 각각 클로닝하면서 개발되었다. 이 발현카세트는 pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH 플라스미드의 XbaI와 SacI 제한부위에서 복제되었고 pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH라고 명명되었다. 이렇게 개발된 플라스미드 pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH는 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*) $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ 에 형질전환되었고, 최종적으로 Pd $\Delta 3hpdh\Delta 3hibdhIV\Delta 3hibdhI$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)이 개발되었다(도 16).

[144]

[145] **4. 효소 활성의 결정**

[146] DhaB 활성은 KGSADH 효소의 활성 측정을 통해 측정이 가능하다. 1 Unit의 DhaB 활성은 1분 동안 $1\mu\text{mol}$ 의 NAD^+ 를 NADH로 환원하는데 필요한 효소의 양으로 정의된다. 요약하건대, 우선 1mM DTT, 15uM coenzyme B12, 3mM MgCl_2 , 1.5mM ATP를 포함하고 있는 50 mM potassium phosphate (pH 8.0) 완충용액 (총 부피 1 mL)에 20ul의 26 U/mg NAD^+ -dependent KGSADH를 37°C에서 5분간 배양한다. 이때 KGSADH는 25% 글리세롤을 함유하고 있다. 반응은 1.5mM NAD^+ 와 37°C에서 예열된 DhaB를 포함하는 적절한 양의 세포 추출물을 추가함으로써 시작되었고, NADH의 흡광도 변화를 통해 관찰되었다. KGSADH 활성은 Raj 박사에 의해 보고된 방법을 사용하여 340nm에서 NAD^+ 가 NADH로 환원되는 것을 측정하여 밝혀졌다. 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 8.0), 1 mM DTT, 적당량의 효소 추출물을 포함한 반응 혼합물이 37°C에서 5분간 배양되었고, 2.0 mM 3-HPA와 2.0 mM NAD^+ 를 추가함으로써 반응이 시작되었다. NADH의 양은 $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 molar extinction coefficient ($\Delta\epsilon_{340}$)를 사용하여 결정되었다. KGSADH의 1 Unit 활성은 1분에 $1\mu\text{mol}$ 의 NAD^+ 를 NADH로 환원시키는데 필요한 효소의 필요량에 따라 정의되었다. 모든 효소 활성은 원료 세포 추출물로 측정되었다.

[147]

[148] **5. 배양 배지와 배양 조건**

- [149] 따로 명시되지 않는 한 진탕배양은 20 mL의 배양액을 포함한 250 mL non-baffled Erlenmeyer 플라스크를 이용하여 200 rpm, 30°C에서 진행되었다. 리터당 MgSO_4 , 0.25 g; NaCl, 1.0 g; NH_4Cl , 1.0 g; yeast extract, 1 g; glycerol, 100 mmol; L-glutamate, 5 g; tryptone, 2 g; glucose 2.5 g을 포함하는 M9 배양 배지가 사용되었다. 배지는 100 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)이 포함되었다. 필요시 12 $\mu\text{mol/L}$ 의 코엔자임 B12가 추가로 주입되었으며, 산소투과 스펜지 플러그로 플라스크를 막았다. 세포량, 잔류 기질, 대사산물의 측정을 위해 정기적으로 샘플링 되었으며 모든 진탕배양 실험은 3회 반복되었고 바이오매스와 대사산물의 표준편차는 10% 미만이었다. 바이오리액터 실험은 1.5-L 용량 Biotron-LiFlus GM 바이오리액터(Biotron, 서울, 대한민국)에서 1L 작업량으로 수행되었다.
- [150] 바이오리액터 실험을 위한 M9 배양배지는 리터당 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.25 g; NaCl, 1.0 g; NH_4Cl , 1.0 g; yeast extract, 1 g; L-glutamate, 5 g; tryptone, 2 g; casamino acids, 2g; glucose 2.5 g, trace element solution, 10 mL/L를 포함하고 있으며 100 mM의 potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0)을 포함한다. 배양은 30°C 유가식 배양 모드로 농축된 글리세롤(10 M)과 7 mM 글루코스를 주기적으로 주입하면서 수행되었다. pH는 5 N NaOH와 2.5 N HCl을 사용하여 7.0 ± 0.1 로 유지되었다. 공기는 agitation 속도 650 rpm에 1 vvm으로 계속해서 공급되었다. 배양 중에는 Tryptone, 2 g/L; casamino acids, 2 g/L; L-glutamate, 5.0 g/L; yeast extract, 1 g/L를 포함하는 배지가 6시간마다 바이오리액터에 추가되었다. 샘플은 세포량, 잔류기질, 대사산물의 측정을 위해 정기적으로 분석되었다.
- [151]
- [152] **6. 분석방법**
- [153] 세포 농도는 분광광도계(Lambda 20, Perkin Elmer; Norwalk, CT, USA)를 사용하여 10-mm 길이의 큐벳으로 측정되었다. 600 nm (OD600) 흡광도의 1 unit은 리터당 0.3g의 건조 세포량과 일치한다. 단백질 농도는 소혈청알부민을 기준으로 하여 Bradford 방법으로 마이크로티터 플레이트 리더(1420, Wallac Victor 2; Perkin Elmer)에 의하여 분석되었다. 글리세롤, 3-HP 및 다른 대사산물의 농도는 HPLC에 의해 측정되었는데, 10분간 10,000×g로 배양 샘플의 원심분리에 의해 얻어진 상등액을 Tuffryn-membrane (Acrodisc, Pall Life Sciences)에 의해 여과하고 300 mm × 7.8 mm Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA) column에 의해 65°C에서 2.5 mM H_2SO_4 를 이동상으로 사용하여 용출된다.
- [154]
- [155] **7. 결과**
- [156] **(1) 재조합 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)의 진탕 플라스크 배양**
- [157] 본 발명자들은 이전 연구에서 글리세롤 전환이 일어날 때 DhaB에 의한 자멸적인 촉매 반응으로 인해 DhaB 활성이 매우 감소되는 것을 관찰하였다.

이는 DhaB를 재활성화시키는 GdrAB의 발현정도가 낮았을 가능성이 있다. 또 PC3 프로모터 바로 밑에 GdrAB와 DhaB를 순서대로 배열함으로써 GdrAB의 발현이 향상될 것으로 예상했다. 이러한 가설을 바탕으로, 플라스미드 pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH이 개발되었고, 플라스미드는 다시 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*, 이후 Pd로 표기함) $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ 균주에 도입된 후 3-HP 생산에 사용되었다. 글리세롤로부터 3-HP 생산에 대한 GdrAB과 DhaB의 배열순서 변경에 대한 효과는 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)에서 측정되었다. 코엔자임 B12의 공급 효과는 0h에 12 μ M를 공급함으로써 조사되었다. Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH)는 대조균으로 사용되었다. 도 17의 S1~S3는 제조합 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)에 의한 글리세롤로부터 3-HP의 생산을 보여주고 있으며, 도 17의 O1~O3는 제조합 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH)에 의한 글리세롤로부터 3-HP의 생산을 나타낸다. 도 17의 S1과 O1은 글리세롤 공급이 없는 경우의 결과를 보여주고 있으며, 도 17이 S2과 O2는 코엔자임 B12의 공급이 없는 경우의 결과를 보여준다. 반면, 도 17의 S3과 O3는 코엔자임 B12가 공급된 결과이다. 두 균주 사이에 세포성장에는 큰 차이가 없었다. 그러나 코발트(cobalt)와 코엔자임 B12가 공급된 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH) 균주에 의한 3-HP 생산은 12h 후 각각 41%, 29%로 증가하였다. 이러한 결과는 DhaB 반응 속도가 코엔자임 혹은 코발트 양에 영향을 받는다는 것을 의미한다.

- [158] 코발트(cobalt)의 추가 시 12h에 3-HPA과 1,3-PDO가 생산되는 것을 관찰하였지만 대조 균주에서는 3-HPA가 (코발트 있음) 축적되지 않는 것을 알 수 있었다(표 9). 글리세롤로부터 3-HP 생산 수율은 ~1이었으며, 이는 공급된 글리세롤이 완전히 3-HP 생산에 사용되었고 또한 생산된 3-HP는 다시 분해되지 않았음을 의미한다.

[159]

[160] [표9]

제조합 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)
 $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ 의 12-h 배양에서 탄소분포

	S2	S3	O2	O3
substrates				
Glucose (mM)	0.58	0.91	0.67	0.88
Glycerol (mM)	64.13	52.15	44.92	37.45
Biomass (g/L)	1.51	1.36	1.66	1.17
Metabolites				
3-HP (mM)	64.83	49.51	45.93	38.24
3-HPA (mM)	0.78	0.52	0	0.39
1,3-PDO (mM)	3.55	4.95	1.37	1.42
Growth rate ($\mu_{\max}$, h ⁻¹)	0.56	0.54	0.54	0.53
3-HP yield on glycerol (mol/mol)	1.01	0.95	1.02	1.02
Glycerol carbon recovery (%)	1.08	1.05	1.05	1.07

[161]

[162] (2) 효소 활성

[163] 시간에 따른 DhaB와 KGSADH의 in vitro 효소활성이 측정되었다(도 18). DhaB 효소활성은 KGSADH 효소의 활성을 이용해 조사되었고, KGSADH 효소 활성은 프로피온알데히드를 기질로 사용하여 측정되었다. DhaB와 GdrAB 유전자 순서가 바뀔 때 DhaB 활성이 낮아지는 것으로 관찰되었다. 한편 글리세롤, 코발트 또는 코엔자임 B12의 추가는 오히려 DhaB 효소의 심각한 활성 저하를 일으키는 것으로 관찰되었다. 3-HPA의 축적에 따른 효과인지 혹은 다른 요인에 의한 것인지 추가적인 실험이 필요하다. 그러나 한 가지 분명한 사실은 gdrAB와 DhaB 순서를 바꾸는 것만으로는 DhaB의 효소활성을 충분히 향상시키지 못한다는 것이다. 현재 사용한 제조합 균주에서 gdrB 발현이 향상되었는지 그 여부는 확실하지 않다. gdrB translation에 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)의 RBS가 사용되었고 추후 이 부분에 대한 검증이 필요하다.

[164]

[165] (3) GdrAB, DhaB, KGSADH 과발현 제조합 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3- gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)의 바이오리액터 배양

[166] Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-gdrAB-dhaB, PC4-KGSADH)과 Pd

$\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH) 균주를 이용한 글리세롤과 글루코스 유가식 바이오리액터 운전이 수행되었다. 바이오리액터 실험에서 글루코스와 글리세롤 농도는 각각 10, 150mM 보다 낮게 유지되었다. 6시간마다 글루타메이트(glutamate)가 세포성장을 위해 공급되었다. 배양결과 두 바이오리액터 모두에서 비슷한 세포성장이 관찰되었다. 두 배양 모두 성장이 9시간 후 감소하였고 그 후 세포성장은 반응 끝까지 지속되었다. 바이오리액터 A에서는 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ (pUCPK'/PC3-dhaB-gdrAB, PC4-KGSADH) 균주가 사용되었다 (도 19). 3-HP 생산은 36시간까지 대체로 증가하여 58 ± 2 g/L 이상, 생산율 1.2 g/L/h, 글리세롤로부터 0.9 mol/mol 이상의 3-HP 수율이 얻어졌다. 3-HP 생산속도는 36시간 후 감소하였다. 36h 부터 48h 사이에서는 단지 2 ± 0.5 g/L의 3-HP 생산에 머물렀다. 전체적으로 48h 동안 1.0 g/L/h의 생산성, 글리세롤로부터 3-HP 수율 0.93 mol/mol로 60 ± 2 g/L의 3-HP가 생산되었다. 이전 실험, 즉 3hibdhI가 결실되지 않은 균주의 발효실험과 비교할 때 3-HP 생산수율이 크게 향상되었는데, 이는 3hibdhI가 3-HP의 분해에 중요한 역할을 하고 있음을 확인시켜 준다. 3hibdhI의 영향은 발효시간이 짧은 플라스크 실험에서는 전혀 관찰되지 않았다.

[167] 바이오리액터 B에서 유전자(dhaB과 gdrAB) 순서가 바뀐 균주를 이용하였고, 그 결과 3-HP 생산이 발효 후반에 보다 향상되었다. 1.3 g/L/h의 생산성, 글리세롤로부터 3-HP 수율 0.95 mol/mol로 약 63 ± 2 g/L의 3-HP가 생산되었다. 바이오리액터 A에 비하여 3-HP 생산이 5% 증가하였다. 비록 효소활성 분석이나 플라스크 실험에서는 그 결과가 나타나지 않았으나 GdrAB 발현 정도가 3-HP 생산에서 매우 중요하다는 것을 의미한다.

[168]

[169] 결론적으로, 3-HP 생산 경로 효소인 DhaB, GdrAB와 KGSADH가 발현될 때 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*)는 글리세롤로부터 3-HP를 생산할 수 있었다. 재조합 플라스미드는 PC3와 PC4라는 두 개의 강력한 유도 프로모터를 사용하여 개발되었고, 3개의 유전자가 결실된 Pd $\Delta 3\text{hpdh}\Delta 3\text{hibdhIV}\Delta 3\text{hibdhI}$ 가 숙주로 사용되었다. DhaB의 불활성화 정도를 완화시켜주기 위해 gdrAB를 dhaB 앞에 위치하도록 하였고 이로 인해 gdrAB의 발현이 강화될 수 있었다. 효소 활성 분석과 SDS-PAGE를 통한 단백질 발현 분석은 이러한 위치변화를 통해 DhaB의 활성이 낮아지는 것을 보여주었다. 하지만 감소한 DhaB의 활성에도 불구하고 3-HP 생산은 향상되었다. 또 새로운 재조합 균주를 이용한 유가식 바이오리액터의 운전 결과, 더 높은 농도, 생산성 및 수율이 얻어졌다.

[170]