

기술명 : 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물 및 이를 이용한 5-아미노레불린산의 제조방법

IPC : C12N 15/74|C12R 1/15|C12N 9/02|C12N 9/90|C12P 13/00

발명자 : 고려대학교 한성욱

#### 요 약

본 발명은 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 글루탐산을 생산하는 미생물에서, 글루탐일-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물 및 이를 이용한 5-아미노레불린산의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 의약분야나 농업분야에서 유용하게 사용 가능한 5-아미노레불린산을 종래 생산방법보다 현저 하게 높은 수율로 생산할 수 있다. - 도1

#### 청구범위

##### 청구항 1

삭제

##### 청구항 2

삭제

##### 청구항 3

삭제

##### 청구항 4

삭제

##### 청구항 5

삭제

##### 청구항 6

삭제

##### 청구항 7

다음 단계를 포함하는 5-아미노레불린산의 제조방법: (a) 서열번호 10의 아미노산 서열 중 3 번째 서열에 2개의 라이신이 추가되어 있는 살모넬라 티피무리엄 유래 변이 글루탐일-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자 및 대장균 유래 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 코리네박테리움 글루타미쿰을 글 루코오스와 페니실린 G 또는 2,2 디피리딜 함유 배지에서 배양하여 5-아미노레불린산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 5-아미노레불린산을 수득하는 단계.

## 청구항 8 삭제

## 청구항 9

삭제 청구항 10 삭제 청구항 11 삭제 청구항 12 삭제 청구항 13 삭제 청구항 14 삭제 청구항 15 삭제

## 기술분야

본 발명은 5-아미노레볼린산 생산능을 가지는 변이 미생물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 글루탐산을 생산하는 미생물에서, 글루탐산-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 5-아미노레볼린산 생산능을 가지는 변이 미생물 및 이를 이용한 5-아미노레볼린산의 제조방법에 관한 것이다.

## 배경기술

일반적으로, 5-아미노레볼린산(5-Aminolevulinic Acid; ALA)은 모든 생물계에서 헴(heme), 박테리오클로로필 (bacteriochlorophyll), 코리노이드(corrinoid) 등 테트라피롤(tetrapyrrole) 화합물의 주요 전구 물질로서, 태양광선에 의해서 강력한 산화 물질인 클리드(pchlide)가 형성되고, 이 물질에 의한 일련의 산화 반응이 일어나 쌍자엽 식물에게만 선택적으로 잎의 인지질을 파괴하여 고사시키는 포토다이나믹 물질이다. 그러므로, ALA는 사람, 동물 및 농작물 등에는 피해를 주지 않으면서 잡초를 선택적으로 고사시키는 환경친화성의 제초제로 활용 될 수 있다(참조: Rebeiz C.A. et al., Enzyme Microb. Technol., 6:390, 1984)). 또한, ALA는 이러한 제초제로서 뿐만 아니라, 낮은 농도에서 사용할 때 식물 광합성의 증진, 호흡의 저해 및 이 산화탄소의 동화를 촉진시켜서 성장을 촉진시키는 효과가 있어(Hua Z., et al., Cancer Research. 55:1723, 1995); Matsumoto T.H., et al., Weed Research, 37:60, 1992); Matsumoto T.H., et al., Pesticide Biochemistry, 48:214, 1994; Rebeiz N., et al., Photochem. Photobiol., 55:431, 1995) , 법씨를 1 내지 3 ppm의 ALA 용액에 1 내지 48시간 침지 후, 파종을 하였을 경우 크기, 무게 및 뿌리의 성장이 촉진되는 것으로 밝혀졌다. 그 외에도 ALA는 트리초푸시아 니(Trichopusia ni) 등과 같은 해충의 살충제로서 그 사용 범위가 확대되고 있다. 특히, ALA를 이용한 살충효과는 특정 대사단계에 관여하여 효력을 나타내는 기존의 살충제와는 달리 그 작용단계가 복잡하므로 해충이 이에 대한 저항성을 개발하기가 어려우므로, 환경 친화 살충제로서의 활용이 가능하다. 그밖에 ALA는 피부암 치료제 및 미생물 저항성 약품 등 의학 분야에서도 생물활성 물질로 사용될 수 있다고 보고되어 있는데, 특히 여러 종류의 악성종양 치료를 위한 광역학 치료법(PDT: photodynamic therapy)의 포토센시타이저(photosensitizer)로서도 광범위하게 이용될 수 있는 것으로 밝혀져서 활발한 연구가 진행 중이다. 악성종양 부위에 ALA의 투여로 세포 내 포르피린(porphyrin), 특히 헴 생합성 경로의 최종 전구체인, 프로토포르피린 IX(protoporphyrin IX)의 농도가 급증되어 가시광선의 조사에 손상을 입혀 종양을 사멸시키는 것으로 밝혀졌다. 반면에, 정상 세포는 ALA의 흡수가 종양 세포에 비하여 낮고 또한 느린 성장 속도로 인하여, 상대적으로 축적되는 프로토포르피린 IX의 농도가 낮으므로, 빛의 조사로 인한 손상이 낮은 것으로 밝혀졌다. 현재, ALA는 복잡한 유기 합성법을 이용하여 생산하고 있으나(Beale S.I., et al., Phytochemistry, 18:441, 1979), 생산단가가 높아 채산성이 없

으므로, 로도박터스페로이데(*Rhodobacter sphaeroides*), 클로스트리디움 써 모아세티움(*Clostridium thermoaceticum*), 메타노박테리움 써모오토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*), 아그네멜럼 쿼드러프리카(*Agrimonella quadruplicum*), 아나시스 티스 마리나(*Anacystis marina*) 및 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) 등 미생물의 발효를 이용한 ALA의 생산법 및 그 이용에 관한 연구들이 진행되고 있다(Sasaki K., et al., J. Ferment. Technol., 65:511, 1987; Sasaki K., et al., Biotechnol. Lett., 15:859, 1993; Tanaka T., et al., Biotechnol. Lett., 13:589, 1991; Janschen R., et al., FEMS Microb. Lett., 12:167, 1981; Kipe-Not J.A. and Steven S.E., Plant Physiol., 65:126, 1980; Beale S.I. and Castelfranco P.A., Plant Physiol., 53:297, 1974). ALA는 헴(heme)의 전구체로서, 두 가지의 생합성계(C4, 및 C5 경로)에 의하여 생합성되는 것으로 알려져 있는데, 동물, 진균, 호기성 세균류 등에서 발견되는 C4 계는 글리신(glycine)과 숙시닐-CoA(succinyl - CoA)의 축합에 의하여 생성되며, 이 반응은 피리독살 인산 의존성(pyridoxal phosphate dependent) 효소인 ALA 신타아 제에 의하여 촉매된다. 또 다른 경로인 C5계는 식물, 조류, 대장균 등에서 발견되고 있다. 분자 생물학적인 ALA 생합성 경로는 ALA 영양 요구 변이주(ALA auxotrophy)의 분리를 통하여 밝혀졌는데, C4 경로의 ALA 신타아제 유전자는 두 가지의 동위효소(isozyme) hemA 및 hemT가 존재하는 것으로 밝혀졌고, 반면에 C5 경로는 hemA, hemL 및 hemM 유전자들에 의하여 구성되어 있다. 이러한 미생물에 의한 ALA의 합성 증대를 위하여 전구체인 글루탐산, 글리신, 및 숙시산을 배양액 중에 보강하거나 유기 폐자원으로부터 저급지방산의 분리 및 첨가효과 등에 관한 연구가 있었으며, pH, 온도의 조절, 산소의 공급, 광합성 세균들의 경우에는 빛의 조사 등에 의한 ALA 생성량의 증가에 관한 연구 등도 보고되었다. 본 발명자들은 5-아미노레불린산을 대량생산할 수 있는 효율적인 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 미생물 대사경로 중 탄소 5개의 대사 경로로부터 연계하여 글루탐산을 생산하는 미생물에 5-아미노레불린산을 생산할 수 있는 유전자들을 도입하는 경우, 5-아미노레불린산을 높은 수율로 생산할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

## 해결하려는 과제

본 발명의 목적은 5-아미노레불린산을 높은 수율로 생산할 수 있는 변이 미생물을 제공하는 데 있다. 본 발명의 다른 목적은 상기 변이 미생물을 이용한 5-아미노레불린산의 제조방법을 제공하는 데 있다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기 변이 미생물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

## 과제의 해결 수단

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루탐산을 생산하는 미생물에서, 아미노산 서열 중 3번째 서열에 2개의 라이신이 추가되어있는 변이 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물을 제공한다. 본 발명은 또한, (a) 상기 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물을 글루코오스 함유 배지에서 배양하여 5-아미노레불린산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 5-아미노레불린산을 수득하는 단계를 포함하는 5-아미노레불린산의 제조방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 글루탐산을 생산하는 미생물에서, 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자를 도입시키는 것을 특징으로 하는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물의 제조방법을 제공한다.

## 발명의 효과

본 발명에 따르면, 의약분야나 농업분야에서 유용하게 사용 가능한 5-아미노레불린산을 종래 생산방법보다 현저 하게 높은 수율로 생산할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 코리네박테리움 글루타미쿰에서 5-아미노레불린산 생합성을 위한 대사 공학적 전략을 도시화한 것이다. 도 2는 5-아미노레불린산 생합성을 위한 유전자 발현 카세트와 두개의 라이신이 삽입된 HemA 유전자를 나타낸 것이다. 도 3은 HemA 유전자를 발현하는 변이 균주의 상대적 5-아미노레불린산 생산능을 나타낸 것이다 :HemA-CG, *C. glutamicum*; HemA-BS, *Bacillus subtilis*; HemA-EC, *E. coli*; HemA-ST, *S. typhimurium*. 도 4는 HemA 유전자와 HemL 유전자가 과발현된 코리네박테리움 글루타미쿰의 5-아미노레불린산 생산능(A) 및 성장곡선(B)을 나타낸 것이다. 도 5는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물을 이용한 5-아미노레불린산의 생산과정 중, 페니실린 G(6 U/mL)(PG)와 2,2-디피리딜(250  $\mu$ M)(DP)을 추가하였을 때의 5-아미노레불린산 생성능 변화를 나타낸 것이다. 도 6은 글루탐산 향상 조건에서 대량 발효에서의 코리네박테리움 글루타미쿰 변이 균주의 5-아미노레불린산 생산을 확인한 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명에서는 5-아미노레불린산 생산능이 향상된 변이 미생물을 제조하기 위하여, 산업균주인 코리네박테리움 글루타미쿰의 C5 대사경로를 이용하여 5-아미노레불린산을 생산하고자, 글루탐일-tRNA 환원 효소를 코딩하는 헴 에이 유전자를 도입시킨 변이 미생물을 제조하였으며, 상기 변이 미생물은 기존의 코리네박테리움 글루타미쿰에 비하여 20배 이상의 5-아미노레불린산을 생산하였다. 따라서, 본 발명은 일관점에서, 글루탐산을 생산하는 미생물에서, 아미노산 서열 중 3번째 서열에 2개의 라이신이 추가되어있는 변이 글루탐일-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자가 도입되어 있는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물에 관한 것이다. 본 발명에서는 코리네박테리움 글루타미쿰, 대장균, 바실러스 서브틸리스, 폐렴간균 및 살모넬라 타이피무리움 등의 5종의 균주로부터 글루탐일-tRNA 환원 효소를 코딩하는 헴 에이(HemA) 유전자를 확보하였다 (서열번호 1~5). 이들 중 살모넬라 타이피무리움 유래 헴 에이(HemA) 유전자로 형질전환된 변이 균주가 5-아미노레불린산 생산성이 가장 높았다. 상기 5종의 헴 에이(HemA) 유전자 서열을 서열번호 1~5에 나타내었으며, 이들이 코딩하는 아미노산 서열을 서열 번호 6~10에 나타내었다. 또한, 헴에 의한 효소 활성 저해 효과를 감소시키기 위하여 각 헴 에이 유전자의 아미노산 3, 4번 위치에 라이신을 도입하였다. 따라서, 상기 글루탐일-tRNA 환원 효소는 아미노산 서열 중 3번째 서열에 2개의 라이신이 추가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 변이 미생물은 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소를 코딩하는 유전자가 추가로 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 변이 미생물. 본 발명의 일양태에서는, 상기 코리네박테리움 변이 미생물에 대장균으로부터 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소를 코딩하는 유전자(HemL)를 증폭하여 이를 도입하였고, pMT1s 발현벡터의 프로모터 부분을 항시성 프로모터 중 고효율의 trc 프로모터로 교체하여 각 효소들을 포함하는 재조합 벡터를 제작하였다. 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체를 이용하여 5-아미노레불린산의 효율적인 대량생산이 가능하며 최근 연구되는 5-아미노레

불린산의 생산에 있어서 경제적으로 저렴하고 생산적으로 효율적인 5-아미노레불린산의 생산 기술이며 코리네박테리움을 이용한 최초의 5-아미노레불린산 생산 연구로써 매우 유용한 발명이다. 본 발명에 있어서, 상기 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소를 코딩하는 유전자는 대장균 유래인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 글루탐산을 생산하는 미생물은 코리네박테리움 속 균주인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 사용할 수 있다. 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물을 글루코오스 함유 배지에 서 배양하여 5-아미노레불린산을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 5-아미노레불린산을 수득하는 단계를 포함하는 5-아미노레불린산의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 있어서, 5-아미노레불린산의 생산량을 증대시키기 위하여 (a) 단계의 배지에 세포의 대사경로 중 2-옥소글루타르산 복합체 탈수효소의 활성을 저해하여 대사경로를 글루탐산 생산 경로로 유도되도록 하는 페니실린 G 또는 킬레이트로 작용하여 헴의 생산을 저감시키는 2,2-디피리딜을 첨가할 수 있다. 본 발명에서는 5, 5-아미노레불린산의 생산 배양 중 12시간 후에 페니실린 G (penicillin G; 6 U/mL) 및 2,2-디피리딜(2,2'-dipyridyl; 250  $\mu$ M)을 첨가해주었다. 페니실린 G는 세포의 대사경로 중 2-옥소글루타르산 복합체 탈수효소의 활성을 저해하여 대사경로를 글루탐산 생산 경로로 유도되도록 한다. 2,2-디피리딜은 양 중에 킬레이트로 작용하여 헴의 생산을 저감시키는 역할을 한다. 본 발명의 일양태에서는 형질전환된 코리네박테리움 글루타미쿰을 최적화된 배양액으로 배양함으로써 5-아미노레불린산을 생산하였으며 본 발명에 따른 재조합 미생물은 진핵생물로부터 유래한 유전자가 아니라 세균의 유전자를 바로 이용함으로써 안정적으로 5-아미노레불린산의 생산이 가능하게 하였으며 균주 자체 또한 GRAS 균주로서 생산된 5-아미노레불린산 또한 직접적으로 이용이 가능한 장점이 있다. 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법을 사용하면 된다. 또 배양방법은, 배치(batch)식, 유동배치식, 연속배양, 리액터형식 등, 통상의 미생물의 배양에 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 대장균 등의 세균을 숙주로 해서 얻어진 형질전환체를 배양하는 배지로서는, 완전배지 또는 합성배지, 예를 들면 LB배지, NB배지 등을 들 수 있다. 또, 배양온도는 적온의 범위, 바람직하게는 약 30도에서 배양함으로써 ALAS를 균체 내에 축적시키고, 회수한다. 탄소원은 미생물의 증식에 필요하고, 예를 들면 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 이용할 수 있다. 질소원으로서, 예를 들면 암모니아, 염화암모늄, 황산암모늄, 인산암모늄 등의 암모늄염 외에, 펩톤, 고기즙, 효모엑기스, 맥아엑기스, 카제인분해물, 옥수수 침지액 등의 천연물유래의 것을 들 수 있다. 또, 무기물로서는, 예를 들면 인산제 1칼륨, 인산제 2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 배양액에, 카나마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 등의 항생물질을 첨가해도 된다. 또, 프로모터가 유도성의 발현벡터를 사용해서 형질전환한 미생물을 배양하는 경우는, 프로모터의 종류에 적합한 유도물질을 배지에 첨가하면 된다. 예를 들면, 이소프로필--D-티오갈락토피라노시드 (IPTG), 테트라사이클린, 인돌아크릴산(IAA) 등을 유도물질로서 들 수 있다. 또 다른 관점에서, 본 발명은 글루탐산을 생산하는 미생물에서, 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 유전자를 도입시키는 것을 특징으로 하는 5-아미노레불린산 생산능을 가지는 변이 미생물의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 일양태에서는, 코리네박테리움 균주에 글루타밀-tRNA 환원

효소를 코딩하는 헴 에이 유전자를 도입시 킨 변이 미생물을 제조하였으며, 변이 미생물에 대장균으로부터 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소를 코딩하는 유전자(HemL)를 증폭하여 이를 도입하였고, pMT1s 발현벡터의 프로모터 부분을 항시성 프로모터 중 고활성의 trc 프로모터로 교체하여 각 효소들을 포함하는 재조합 벡터를 제작하였다. 이때, 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation) 할 수 있다. 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, et al., EMBO J., 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있다. 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주 세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다. 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로

서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 실시예 1: 유전자의 과발현을 위하여 프로모터를 치환한 재조합 벡터의 제조 재조합 벡터는 pMT1s(Hyun, JE et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 371-377, 2011)를 기본으로 해서 프로모터와 시그널 시퀀스 부분을 항시성 프로모터인 trc 프로모터로 교체하였다. trc 프로모터의 교체에 사용한 프로모터는 정방향 프로모터 부분에는 제한효소 XhoI 인식서열이 삽입되도록, 그리고 역방향 프로모터 부분에는 제한효소 BamHI 인식서열이 삽입되도록 증폭시킨 후에 기존 프로모터 부분부터 시그널 시퀀스 부분까지 치환하였다. 제조된 재조합된 벡터는 pMT-Trc라 명명하였으며 이후, 각 효소들의 발현에 사용하였다.

pMT-Trc F: AATAGCCTCGAGCGACTGCACGGTGCACCAATG(서열번호 11) pMT-Trc R: GCATTAGGATCCTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG(서열번호 12) 실시예 2: 5종의 균주로부터 hemA 유전자의 확보 및 재조합 벡터에 도입 2-1. 코리네박테리움 글루타미쿰 유래 hemA 유전자의 확보 코리네박테리움 글루타미쿰 균주로부터 유래한 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 hemA 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 BamHI와 유전자 7번째 부분에 AAGAAG의 염기서열을 도입하여 두 개의 라이신을 삽입하였으며, 역방향 프라이머의 5'에는 NotI의 서열이 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며 증폭된 유전자를 재조합된 pMT-Trc 벡터에 도입하였다.

HemA-CG F: AATAGCGGATCCCATGGATGATTCAGTACGT(서열번호 13) HemA-CG R: GATATAGCGCCGCATTACTCCCTCGTTTGTGTGGC(서열번호 14) 2-2. 대장균 유래 hemA 유전자의 확보 대장균 균주로부터 유래한 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 hemA 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 BamHI와 유전자 7번째 부분에 AAGAAG의 염기서열을 도입하여 두 개의 라이신을 삽입하였으며, 역방향 프라이머의 5'에는 NotI의 서열이 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며 증폭된 유전자를 재조합된 pMT-Trc 벡터에 도입하였다.

HemA-EC F: AATAGCGGATCCCATGACCCTTTTAGCACTC(서열번호 15) HemA-EC R: AGATTAGCGCCGCGACTACTCCAGCCCGAGGCT((서열번호 16) 2-3. 바실러스 서브틸리스 유래 hemA 유전자의 확보 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 hemA 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 BamHI와 유전자 7번째 부분에 AAGAAG의 염기서열을 도입하여 두 개의 라이신을 삽입하였으며, 역방향 프라이머의 5'에는 NotI의 서열이 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며 증폭된

유전자를 재조합된 pMT-Trc 벡터에 도입하였다. HemA-BS F: GAATCAGGATCCCATGCATATACTTGTGTG(서열번호 17) HemA-BS R: GCATATGGTACCTCACTCACTTACAAGTGGGCTAAA(서열번호 18) 2-4. 살모넬라 타이피무리움 유래 헴 에이 유전자의 확보 살모넬라 타이피무리움 균주로부터 유래한 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 헴 에이 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 BamHI와 유전자 7번째 부분에 AAGAAG의 염기서열을 도입하여 두 개의 라이신을 삽입하였으며, 역방향 프라이머의 5'에는 BamHI의 서열이 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며 증폭된 유전자를 재조합된 pMT-Trc 벡터에 도입하였다. HemA-ST F: GCAAGGATCCCATGACCCTTTTAGCGCTCGGT(서열번호 19) HemA-ST R: GCAATAGGTACCCTACTCCAGCCCGAGGCT(서열번호 20) 2-5. 폐렴 간균 유래 헴 에이 유전자의 확보 폐렴 간균 균주로부터 유래한 글루타밀-tRNA 환원 효소를 코딩하는 헴 에이 유전자를 클로닝하기 위하여 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머의 5'에는 제한효소 BamHI와 유전자 7번째 부분에 AAGAAG의 염기서열을 도입하여 두 개의 라이신을 삽입하였으며, 역방향 프라이머의 5'에는 NotI의 서열이 삽입된 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며 증폭된 유전자를 재조합된 pMT-Trc 벡터에 도입하였다. HemA-KP F: AATAGCGGATCCCATGACCCTTTAGCTCTT(서열번호 21) HemA-KP R: ACTATAGCGGCCGCACTATTCCAGCCCGAGGCT(서열번호 22) 유전자 증폭 산물은 PCR Purification Kit (GeneAll)에 의해 정제하였으며 실시예 1에서 제조한 pMT-Trc 벡터와 함께 각각 상기 제한효소로 Digestion 하였다. 각 DNA 절편들은 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 진행하였고 아가로스 겔 상의 DNA 절편은 Gel extraction kit (GeneAll)를 사용하여 회수하였다. 회수된 DNA 절편은 T4 Ligase에 의해 Ligation하여 각각의 발현벡터를 구축하였다. 실시예 3: 2개의 라이신이 도입된 5종 균주 유래 헴 에이의 활성 비교 각 균주는 PCR기법을 이용하여 아미노산 3,4번째에 라이신을 도입시켰다 (도 2). HemA-CG F: AATAGCGGATCCCATGGATAAGAAGGATTCAGTACGT(서열번호 23) HemA-CG R: GATATAGCGGCCGCATTACTCCCTCGTTTGTGTGGC(서열번호 24) HemA-EC F: AATAGCGGATCCCATGACCAAGAAGCTTTTAGCACTC(서열번호 25) HemA-EC R: AGATTAGCGGCCGCACTACTCCAGCCCGAGGCT(서열번호 26) HemA-BS F: GAATCAGGATCCCATGCATAAGAAGATACTTGTGTG(서열번호 27) HemA-BS R: GAATCAGGATCCCATGCATAAGAAGATACTTGTGTG(서열번호 28) HemA-ST F: GCAAGGATCCCATGACCAAGAAGCTTTTAGCGCTCGGT(서열번호 29) HemA-ST R: GCAATAGGTACCCTACTCCAGCCCGAGGCT(서열번호 30) HemA-KP F: AATAGCGGATCCCATGACCAAGAAGCTTTTAGCTCTT(서열번호 31) HemA-KP R: ACTATAGCGGCCGCACTATTCCAGCCCGAGGCT(서열번호 32) 코리네박테리움 글루타미쿰의 형질전환 방법: 1. 배양 배지 및 배양 조건: MB broth: 10g 트립톤, 5g NaCl, 4g 효모 추출물 및 4g 펩톤/ 1L. SSBK 플레이트: 40g BHI, 16g agar, 40g 솔비톨 및 10g 수크로오스/1L kanamycin (25mg/L). Electroporation-competent Corynebacterium을 위한 버퍼: Hepes 0.5 M (23.8 g / 200 ml) stock pH 7.2. EPB 1 (20 mM Hepes pH 7.2, 5% Glycerol), EPB 2 ( 5 mM Hepes pH 7.2, 15% Glycerol). 리커버리 배지(BHI 4 g, 솔비톨 3 g, 수크로오스 1g/100ml. 모든 샘플은 30°C, 250 rpm에서 배양. 2. 형질전환 용 competent cell 준비: Corynebacterium 5 ml Preculture 준비 후 MB Broth 100ml에



2ml 접종함. OD이 0.6 정도에 도달할 때까지 30 °C, 250 rpm에서 배양. Ampicillin (12.5 mg/ml) 12 ul 첨가 (Amp 최종농도 1.5µg/ml) 후 1 ~ 1.5 시간 배양. 원심분리 5,000 rpm, 5분 후 Pellet을 EPB 1 30ml에 현탁함. 이를 3회 반복함. 원심분리 5,000 rpm, 5분 후 Pellet을 EPB 2 1.5 ml에 현탁함. 3. Electroporation을 이용한 형질전환: Competent cell 150µl를 녹여서 약 1 ~2 µl의 DNA 첨가함. DNA를 넣지 않은cell은 Negative, positive control 을 위해서는 Empty vector를 넣는다. Sample도 동일하게 첨가함. Ice 에 5 분간 보관. 파스텔 피펫을 사용하여 Cell과 DNA 혼합액을 큐벳에 옮김. 기포가 생기지 않도록 잘 혼합하여 E. coli pulser에서 pulse. Recovery broth 0.75ml의 15ml 튜브에 즉시 혼합, 30°C, 250 rpm, 1.5 시간 배양함. SSBK 플레이트에 스프레딩하여 선 택하였다. 발현된 각 글루탐일-tRNA 환원 효소인 헴 에이는 OD을 기준으로 UV-Vis spectrophotometer로 Ehrlich 시약을 이용하여 5-아미노레불린산의 생산량 변화를 측정하였으며 이 결과를 도 3에 제시하였다. 결과적으로 살모넬라 타이피무리움으로부터 유래한 헴 에이의 활성이 가장 좋은 것으로 확인되었으며 이후 헴 에이 유전자는 살모넬라 타이피무리움으로부터 유래한 유전자를 사용하였다. 실시예 4: 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소의 도입 및 글루탐일-tRNA 환원 효소와의 상호 상승효과 글루탐산-1-세미알데하이드 아미노기 전이 효소(헴 엘)는 대장균 BL21의 지노믹 DNA를 추출하여 정방향 프라이머의 5'와 역방향 프라이머의 5'에 각각 제한효소 BamHI의 염기서열을 도입하여 유전자를 증폭시켰다. HemLF: GCGGCGGGTACCAAGGAGATATACATGAGTAAGTCTGAAAAT (서열번호 33) HemLR: GACTATGGTACCTCACAACTTCGCAACACCCGACGTGC(서열번호 34) 증폭된 유전자는 헴 에이를 포함하는 pMT-trc 벡터에 도입하여 코리네박테리움 글루탐미쿰에서 발현시켰다. 발현된 헴 엘은 도 4에 나타난 바와 같이, 헴 에이와 함께 5-아미노레불린산의 생산량을 증대하는 효과를 나타내었다. 실시예 5: 페니실린 G 첨가로 인한 글루탐산의 생산 경로 흐름의 증대 5-아미노레불린산의 생산량을 증대시키기 위하여, 5-아미노레불린산의 생산 배양 중 12시간 후에 페니실린 G (penicillin G; 6 U/mL) 및 2,2-디피리딜(2,2'-dipyridyl; 250 µM)을 첨가해주었다. 페니실린 G는 세포의 대 사경로 중 2-옥소글루타르산 복합체 탈수효소의 활성을 저해하여 대사경로를 글루탐산 생산 경로로 유도되도록 한다. 2,2-디피리딜은 배양 중에 킬레이트로 작용하여 헴의 생산을 저감시키는 역할을 한다. 각각의 첨가제가 5-아미노레불린산의 생산에 미치는 영향은 도 5에 나타내었으며, 결과적으로 2,2-디피리딜은 5-아미노레불린산의 생산량을 29.9배, 페니실린 G는 약 33배 증대시켰다. 실시예 6: 대량 배양으로 5-아미노레불린산의 생산량 증대 확인 페니실린 G를 첨가한 5-아미노레불린산 생산 배양은 각각 공벡터, 헴 에이만 도입된 벡터, 헴 에이와 헴 엘이 동시에 도입된 벡터를 포함하는 세가지 재조합 균주들을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 헴 에이와 헴 엘이 동시에 도입된 벡터를 포함하는 코리네박테리움 글루탐 미쿰 형질전환체는 공벡터를 포함하는 대조군과 비교하여 최대 22배 5-아미노레불린산의 생산량이 증대되었다. 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이 러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.