



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0064553  
(43) 공개일자 2023년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/74 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)  
A61K 35/744 (2015.01) A61P 19/06 (2006.01)  
C12N 15/52 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/746 (2013.01)  
A23L 33/135 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2022-0139969  
(22) 출원일자 2022년10월27일  
심사청구일자 2022년10월27일  
(30) 우선권주장  
1020210146454 2021년10월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
가톨릭대학교 산학협력단  
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교  
성의교정내 (반포동)  
(72) 발명자  
서승오  
경기도 부천시 도약로 36, 2321동 102호(상동, 라  
일락마을 신성미소지움)  
이예림  
서울특별시 구로구 오리로17길 77-15, B동 402호  
(궁동, 보강빌라)  
정진영  
서울특별시 강서구 강서로18바길 16-7, 202호(화  
곡동, 달천빌라)  
(74) 대리인  
특허법인태백

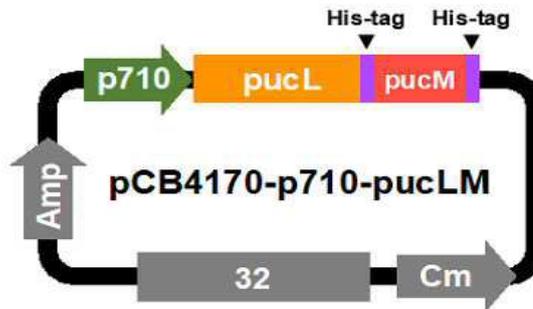
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 요산 분해능이 증대된 재조합 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 요산 산화효소(uricase) 및 5-하이드록시아이소요산(5-hydroxyisourate) 가수분해효소를 암호화하는 pucL 및 pucM 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 도입하여 형질전환시킨 균주에서 요산 분해 활성이 나타나는 것을 확인함으로써, 요산 분해능이 증대된 재조합 균주 제조방법으로서 유용하게 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주가 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

- A61K 35/744 (2013.01)
- A61P 19/06 (2018.01)
- C12N 15/52 (2013.01)
- C12Y 107/03003 (2013.01)
- C12Y 305/02017 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/30 (2013.01)
- A23Y 2260/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072614
과제번호	PJ015770042022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	미생물활용농업환경문제개선기술개발
연구과제명	균체다당류 · 단백질 고생산 미래형 효모 균주 개발 및 소재화(5공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	가톨릭대학교 성심교정
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

pucL 또는 pucM 유전자를 클로닝(cloning)하는 단계;

상기 클로닝한 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; 및

상기 재조합 발현벡터를 박테리아 균주에 도입(integration)하여 형질전환하는 단계를 포함하는, 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 제조방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 pucL 또는 pucM 유전자는 요산 산화효소(uricase) 또는 5-하이드록시아이소요산(5-hydroxyisourate) 가수분해효소를 암호화하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주 제조방법.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 pucL 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 균주 제조방법.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 pucM 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 균주 제조방법.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 pucL 또는 pucM 유전자는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii*) 균주 유래인 것을 특징으로 하는 재조합 균주 제조방법.

#### 청구항 6

청구항 1의 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 요산성 질환 또는 통풍성 질환은 제1고요산혈증, 제2고요산혈증, 제1통풍, 제2통풍, 급성 통풍성 관절염, 피하 통풍 결절(subcutaneous tophi), 만성 통풍 관절염(chronic tophiarthritis), 급성 통증, 만성 통증, 난치성 통증, 암성 통증, 급성 요산 신장병증, 만성 요산 신장병증 및 요산 요로결석증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것으로 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1의 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 요산(uric acid)은 퓨린체의 분해산물 중 하나로 체내에 과잉 축적 시 고요산혈증이나 통풍을 일으킬 수 있다.

혈청 요산 수치가 7.0mg/dL를 초과하는 경우 고요산혈증이라고 하며, 이로 인해 요산이 결정화되어 연골이나 관절에 침착되는 것이 통풍이다. 고요산혈증은 통풍 외에도 관절염, 요로결석, 신장질환 등을 유발한다. 최근 현대인들의 음주 습관, 단백질 섭취 증가 등에 따라 체내 요산 축적이 증가하고 있다.

[0003] 인체에는 요산 산화효소가 존재하지 않아 요산이 퓨린대사에서 최종물질이 된다. 그러나 미생물을 비롯한 다른 생물에는 요산 산화효소가 존재하여 요산이 알란토인(allantoin)으로 분해된다. 요산의 용해도는 6mg/100mL로 매우 낮은 편이나 알란토인의 용해도는 0.57g/100mL로, 요산보다 체내에 축적될 가능성이 적다. 따라서 요산 산화효소가 요산의 과잉 축적을 방지하는 방법이 될 수 있다. 한편, 요산이 알란토인으로 분해되기까지 두 가지 단계의 중간과정이 밝혀졌다. 요산 산화효소에 의해 요산이 5-하이드록시아이소요산(5-hydroxyisourate; HIU)으로 전환되고, 5-하이드록시아이소요산 가수분해효소(5-hydroxyisourate hydrolase; EC 3.5.2.17)에 의해 5-하이드록시아이소요산이 다시 OHCU(2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline)로 전환된다. OHCU가 알란토인으로 전환되는 과정은 빠르게 일어난다. 따라서, 미생물을 비롯한 다른 생물을 통해 요산 산화효소를 인체 내로 제공하여 요산 분해 작용을 촉진한다면, 상기 요산 축적에 의한 질환 개선에 도움이 될 수 있을 것이다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1450511호(2014.03.14. 공개)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 pucl 또는 pucM 유전자를 클로닝(cloning)하는 단계, 상기 클로닝한 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계, 및 상기 재조합 발현벡터를 박테리아 균주에 도입(integration)하여 형질전환하는 단계를 포함하는, 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 요산 산화효소(uricase) 및 5-하이드록시아이소요산(5-hydroxyisourate) 가수분해효소를 암호화하는 pucl 및 pucM 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 도입하여 형질전환시킨 균주에서 요산 분해 활성이 나타나는 것을 확인함으로써, 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 제조방법으로서 유용하게 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주가 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 요산 분해 과정을 나타낸다.

도 2는 pCB4170-p710-pucL(7.1kb)의 벡터맵을 나타낸다.

도 3은 pCB4170-p710-pucLM(7.4kb)의 벡터맵을 나타낸다.

도 4는 형질전환 LC(*Leuconostoc citrium*) 균주에서의 pucL 및 pucM 발현을 SDS-PAGE를 통해 분석한 결과이다. M은 단백질 마커, 1은 야생형(WT) LC 균주 용해성 단백질, 2는 형질전환 LC 균주의 용해성(soluble) 단백질, 3은 야생형 LC 균주의 정제(purified) 용해성 단백질, 4는 형질전환 LC 균주의 정제 용해성(soluble) 단백질이다.

도 5는 0.3% (w/v) 요산을 포함하는 아가 플레이트 상에서 형질전환 LC 균주의 요산 클리어 존(clear zone) 분석 결과이다. 구체적으로, 도 5A는 LB 아가 플레이트 내 Bs 균주, 도 5B는 MRS 아가 플레이트 내 형질전환된 LC 균주이다. 1은 양성 대조군, 2는 야생형(WT) LC 균주 및 3-7은 형질전환 LC 균주이다.

도 6은 0.1M 붕산(boric acid) buffer로 현탁한 요산 농도별 흡광도 표준곡선 그래프이다.

도 7은 흡광도 293nm에서 형질전환 LC 균주(○) 및 WT 균주(●)의 시간별 흡광도 변화를 분석한 결과이다.

도 8은 형질전환 균주 및 WT 균주의 요산 분해 효소(uricase) 활성을 비교 및 분석한 결과이다.

도 9는 형질전환 균주 및 WT 균주의 배양시간에 따른 요산 분해 효소(uricase) 활성 변화를 비교 및 분석한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0015] 본 발명은 pucL 또는 pucM 유전자를 클로닝(cloning)하는 단계, 상기 클로닝한 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계 및 상기 재조합 발현벡터를 박테리아 균주에 도입(integration)하여 형질전환하는 단계를 포함하는, 요산 분해능을 가지는 재조합 균주 제조방법을 제공한다.
- [0016] 상기 pucL 또는 pucM 유전자는 요산 산화효소(uricase) 또는 5-하이드록시아이소요산(5-hydroxyisourate) 가수분해효소를 암호화할 수 있다.
- [0017] 상기 pucL 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가질 수 있고, 상기 pucM 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 pucL 또는 pucM 유전자는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii*) 균주에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 요산은 도 1에 나타난 바와 같이, 요산 산화효소 및 5-하이드록시아이소요산 가수분해효소에 의해 분해된다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조한 요산 분해능이 증대된 재조합 균주를 제공한다.
- [0022] 상기 재조합 균주는 요산 분해 활성을 나타낼 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 재조합 균주는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citrium*) 균주일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 요산성 질환 또는 통풍성 질환은 제1고요산혈증, 제2고요산혈증, 제1통풍, 제2통풍, 급성 통풍성 관절염, 피하 통풍 결절(subcutaneous tophi), 만성 통풍 관절염(chronic tophiarthritis), 급성 통증, 만성 통증, 난치성 통증, 암성 통증, 급성 요산 신장병증, 만성 요산 신장병증 및 요산 요로결석증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

- [0028] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 유효제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0030] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 유효제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.
- [0034] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조한 재조합 균주를 유효성분으로 포함하는 요산성 질환 또는 통풍성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성” 이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0039] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 “식품 첨가물” 로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0040] 상기 “식품 첨가물 공전” 에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트

를 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전 하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0042] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 요산성 질환 또는 통풍성 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0044] 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 요산성 질환 또는 통풍성 질환을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0045] 본 발명에서 용어 “개선”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 요산성 질환 또는 통풍성 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 말한다.

[0047] 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.

[0049] **[실험예 1] 플라스미드 및 형질전환 균주 제작**

[0050] 모든 플라스미드의 클로닝(cloning)에는 대장균(*E. coli* TOP10)을 사용하였고, 형질전환된 균주는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citrium*; 이하 LC라 함) EFEL2700 균주(KACC 91348)를 사용하였다. 요산 산화효소 및 5-하이드록시아이소요산(5-hydroxyisourate) 가수분해효소는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii*; 이하 Bs라 함) 균주(KACC 14741)에서 클로닝하였다. 상기 바실러스 서브틸리스 균주에서 5-하이드록시아이소요산 가수분해효소가 annotation된 바는 없으나, NCBI에서 제공하는 BLAST database 분석을 통해 상기 균주 유전자 서열과 비교하였을 때 상동성을 보이는 서열을 발굴하여 pucM으로 명명하고, 클로닝하였다.

[0051] DNA fragment를 모두 PrimeSTAR HS DNA polymerase를 사용한 PCR 증폭을 통해 플라스미드를 제작하였다. pCB4170-p710-Bgal에서 backbone fragment를 제작하였다. 상기 Bs 균주 유전체에서 pucL을 클로닝하여 insert fragment를 제작하였다. 각 fragments는 Gibson Assembly를 통해 ligation하여 도 2에 나타난 바와 같이, pCB4170-p710-pucL을 제작하였다. pucL 유전자의 C-말단에 6x his-tag를 추가하여 추후 단백질 정제를 용이하게 하였다. pCB4170-p710-pucL에서 다시 backbone fragment를 제작하고, Bs 균주 유전체에서 pucM을 클로닝하여 insert fragment를 제작하여 Gibson Assembly를 통해 도 3에 나타난 바와 같이, pCB4170-p710-pucLM을 제작하였다. 마찬가지로 6x his-tag를 추가하였다. pCB4170-p710-pucLM은 전기천공법(electroporation)을 통해 LC 균주에 형질전환하였다. 전기천공법은 0.1cm 전기천공 큐벳(electroporation cuvette)을 사용하여 1.5kV에서 시행하였다. 형질전환된 균주는 15 µg/mL 농도의 클로람페니콜(chloramphenicol)을 함유한 MRS 한천배지에서 배양 후, 몇 개의 콜로니들을 같은 농도의 클로람페니콜 MRS 액체배지에서 배양하였다. Bs 균주의 pucL 및 pucM 유전자 염기서열은 하기 표 1 및 표 2와 같다.

표 1

[0052]

Sequence of pucl from <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> KACC 14741
ATGTTTCAATGGATGACATGAACCAAATGGACATTCAAACACTGACAGACACGCTTGAATCTATTTTTGAACACTCTTCATGGATTGCGGAG AAAGCCGCGCATTGCGGCCGTTTTCTCCCTATCTGATCTTACCACAAAATGGCCAGCATTGTAAGCCGCGGACCGCCAGACACAGCTT GATTTAATCAACAAGCACCCCTCGGAACAAAGAATAAATGAGCGTACCTCGTAAGAGAGCAGCAAAACGCGGGACTCAGTAACTT GAACAAGAGGAATACGAAGATTTCTGAAGCTGAATGAACGCTATATGAACGCTTCGCTTTCCTTTATTTAGCGGTAAAGGGAAGAGC AAACAGGACATTTACCAAGCTCTGCTGGAAGGCTTGAGAACGAACGAGAAACGGAGTTCCATCAGGCTCTTAAAGAAATTTACCGCATCGCC CGTTTTCGGCTGGCGGACATCAACTGAAAAGGAGAGACGCAATGAAAAGAACTATGCTTATGGCAAAGGAAATGATTTGCATACCGA ACGTTTTTAAAGCCGCTCACAGGGTACGGCAAATCCCTGAGTCTCTTTTACAGGGAGAGACAATACTGTTGTCGGCATTGATGTGACGTGC GAAATTTGGCGGAGATGCCTTCTGACATCATTATAGACGGAGATAATACACTCGTTCGTTGGCTACAGACTCAATGAAAACCTTTATTCAGAGC CATCTCGCTTCTATGAAGGGACGACAACCGAGGGATTCTTACACTATGTGGCACACCGATTTTTAGATACCTATTCTCATATGGACACTATC ACTCTGACAGGCGAAGACATTCCGTTTGAGGCGATGCCTGCATACGAGGGCAAGAATCGGCACAAGCCACCTCGTCTTTAGAAGATCACGC AATGAACGCGCTCGGCTGTGCTGAAAGCGGAACGAACCGGGGATACAATAACGATCACAGAGCAGTACAGCGAAATCATGGATCTTCAGCTC GTCAAGGTGAGCGCAACTCTTCGTCGGCTTTATCCGGGACGAATATACGACTCTCCCGGAGGATGGCAACCGCCCTCTGTTTGTCTATTTA AACATCTGCTGGCAGTATGAAAACACAGATGACGCACGCGCTTCTGATCCAGCCCGCTACGTCGCGGCTGAACAAGTCCGCGACTTGGCGAGC ACCGTTTTTACGAGCTCAAAACCCCTCAATTCAAAATTTAATCTATCATATCGGCTGCAGAATATTAACGAGATTTCCGCGACTCACTGAT GTACGCTTCCAAATCTCAAAACACACATGGGATACAGTCGTTGAAGAGATCCCGGGTCCAAAGGAAAAGTCTACACCGCAACCGCGCCGCA TTCGTTTTCCAGCGCTTACCGTGACAAGAGAAGACGCGGAGAAAAGAAAACGAAAGCCGTCGAAAATTTAGGGAGCCTGAAAGCCTGA

표 2

[0053]

Sequence of pucM from <i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> KACC 14741
ATGGGGAAGCTGACAACGCATATCTGGATTTAACCTGCGGCAAACCGCGCGCAACGTAAGTTGAATTGAAGAAGCTGGACGAAAGCATT ATGAAAGAAGCATATACGAACAATGATGGGAGAGTCGATGTTCTCTGCTGGCTGGTGAAGAGCTGGTGTCCGGAGAGTATGTGATGGAATTT CATGCAGGAGACTATTTCCGCGAGTAAAAATGTGAACACGCGCCGACCGCGTTTTTAAACCATAGTACCGTTTCGTTTTATCTTGCAGATCCG GAAGCTGATTATCACATCCCGCTTTTGTCTGTCGCGTTTGGATATCAGGTGTATAGAGGGAGTTAA

[0055]

[실시에 1] 형질전환 균주의 요산분해능 분석

[0056]

1-1. pucl 및 pucM 단백질 발현 분석

[0057]

상기 형질전환 균주의 pucl 및 pucM 단백질 발현을 확인하기 위해, 먼저 Ni-NTA column을 이용해 세포 파쇄액의 상층액을 정제하였다. 세포 파쇄액의 상층액과 정제한 단백질 샘플을 2x Laemmli sample buffer를 첨가하여 98 °C에서 10분간 가열하였으며 15% 아크릴아미드 겔(acrylamide gel)을 사용하였다. 그 후, 형질전환 균주로부터 추출한 용해성 단백질 및 이로부터 his-tag를 이용하여 정제한 단백질 시료를 SDS-PAGE를 통해 분석하였다.

[0058]

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 요산 산화효소 및 5-하이드록시아이소요산 가수분해효소는 각각 56.5kDa 및 12.6kDa의 단백질 크기를 나타냈고, 형질전환 균주에서 pucl 및 pucM 발현이 나타나는 것을 확인하였다. 이는 형질전환 균주가 요산 분해능이 있음을 의미한다.

[0060]

1-2. 클리어 존(clear zone) 분석

[0061]

상기 형질전환 균주의 요산 분해능을 확인하기 위해, 클리어 존을 분석하였다. 상기 형질전환 균주 배양액 5 μL를 0.3%(w/v) 요산이 첨가된 MRS 한천배지에 떨어뜨린 후, 24시간 동안 배양하였다. CB4170 공백터를 함유하고 있는 야생형(이하 WT라 함) LC 균주를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0062]

그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, Bs 균주는 요산 분해능이 있음을 확인하였다. 이는 상기 균주 유래 pucl 및 pucM가 활성을 나타내는 것을 의미한다. 또한, 도 5B에 나타난 바와 같이, 상기 균주 유래 pucl 및 pucM이 함께 발현하도록 설계된 형질전환된 LC 균주의 경우, 요산 함유 플레이트에서 생육 저해환이 나타난 반면, pCB4170 공백터를 함유하고 있는 LC WT 균주는 생육 저해환이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이는 형질전환 균주가 형질전환에 의해 요산 분해능이 생겼음을 의미한다.

[0064]

1-3. 요산 농도별 흡광도 분석

[0065]

상기 형질전환 균주의 요산 분해 효소 활성 분석에 앞서, 요산 농도별 표준용액의 흡광도를 293nm 파장에서 분

석하였다. 요산을 붕산 버퍼(boric acid buffer pH 8.5)에 200  $\mu$ M로 용해시킨 후 연속희석법을 통해 희석하여 농도별 요산의 표준곡선을 그렸다.

[0066] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 형질전환 LC 균주의 역가는 54U/mg으로 계산되었고, 요산 농도가 증가함에 따라 흡광도가 요산 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다. 이는 형질전환 균주 내 요산 활성 측정에 적합하도록 조건이 잘 설정되어 있는 것을 의미한다.

[0068] 1-4. 시간별 흡광도 분석

[0069] 상기 형질전환 균주의 요산 분해능을 확인하기 위해, 시간별 흡광도 변화를 분석하였다. 형질전환 균주를 30°C에서 30분간 반응하는 동안 초기 흡광도 293nm을 기준으로 하여 시간별 흡광도 변화를 분석하였다. CB4170 공백터를 함유하고 있는 류코노스톡 시트리움 WT(야생형) 균주를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0070] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 형질전환 균주의 흡광도 값이 WT 균주(대조군)보다 더 큰 폭으로 감소하는 것을 확인하였다. 이는 반응 동안 형질전환 균주에서 요산의 농도가 감소하고 있음을 의미하며, 즉 형질전환 균주가 요산 분해능이 있음을 의미한다.

[0072] 1-5. 요산 분해 효소(uricase) 활성 분석

[0073] 상기 형질전환 균주의 요산 분해능을 확인하기 위해, 요산 분해 효소(uricase) 활성을 분석하였다. 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고, 50mM 인산나트륨(sodium phosphate) buffer(pH 7.0)로 2회 세척 후, 같은 버퍼에 현탁하여 ultrasonicator로 세포를 파쇄하였고, 상기 파쇄액의 상층액을 역가 측정에 사용하였다. 세포파쇄액의 상층액 40  $\mu$ L 및 50  $\mu$ M 요산을 용해시킨 붕산 버퍼(boric acid buffer pH 8.5) 160  $\mu$ L를 96 웰 마이크로 플레이트에 넣은 후, 30°C에서 초기 흡광도 293nm 기준 흡광도 변화를 분석하였다. 1U의 요산 분해 효소는 pH 8.5 및 30°C에서 1분에 1  $\mu$ M의 요산을 알란토인으로 전환하는 효소의 양으로 정의하였다. CB4170 공백터를 함유하고 있는 류코노스톡 시트리움 WT 균주를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0074] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 형질전환 균주에서는 54U/mg의 요산 분해 효소 활성이 나타난 반면, WT 균주에서는 요산 분해 효소 활성이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이는 형질전환에 의해 요산 분해 효소 활성이 나타났음을 의미한다.

[0076] 1-6. 균주 배양시간에 따른 요산 분해 효소 활성 분석

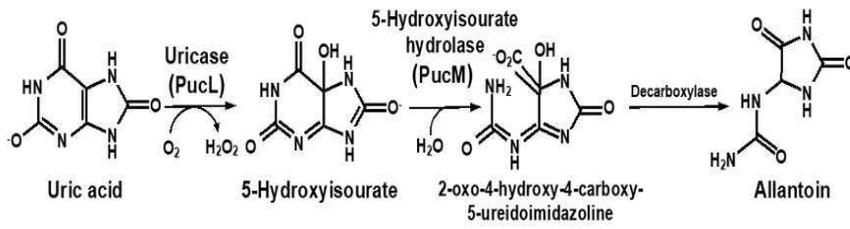
[0077] 상기 형질전환 균주의 배양시간에 따른 요산 분해 효소 활성 변화를 확인하기 위해, 형질전환 균주를 30°C에서 6, 12 및 18시간 동안 배양한 후, 시간에 따른 요산 분해 효소 활성을 분석하였다. CB4170 공백터를 함유하고 있는 류코노스톡 시트리움 WT 균주를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0078] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 6시간 배양 시, 요산 분해 효소 활성이 가장 높았고, 12 및 18시간 순으로 활성이 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 추후 상기 형질전환 균주가 상용화되었을 때, 복용 후 인체 내 과도한 요산 분해 효소 활성으로 인한 부작용이 발생할 가능성이 적다는 것을 의미한다.

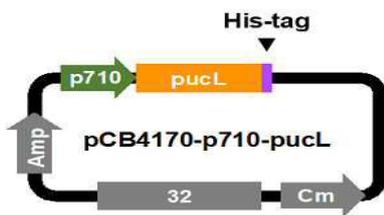
[0080] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

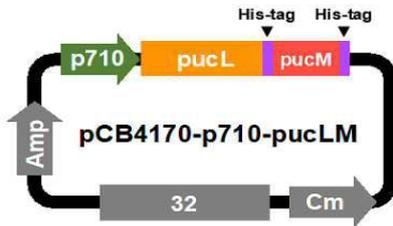
도면1



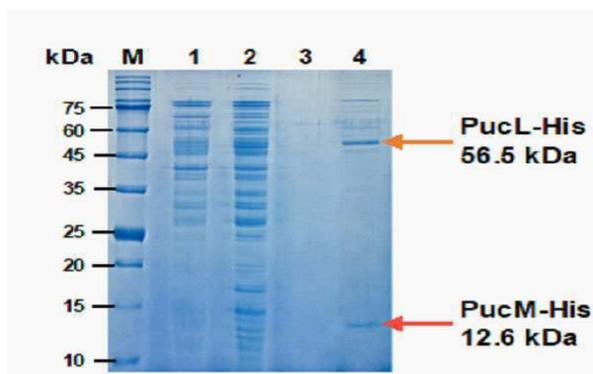
도면2



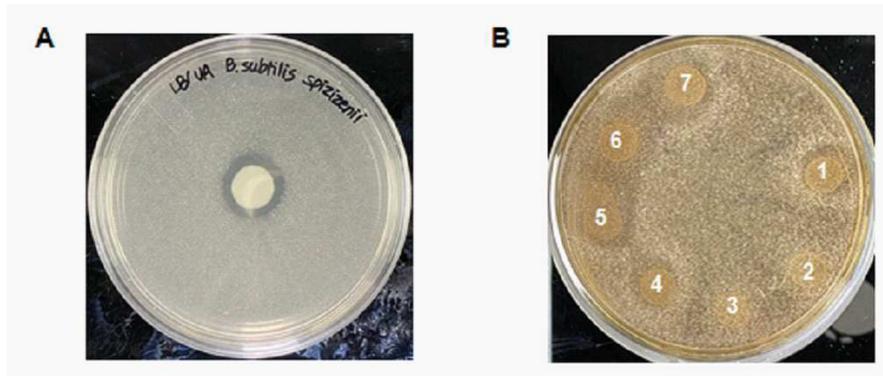
도면3



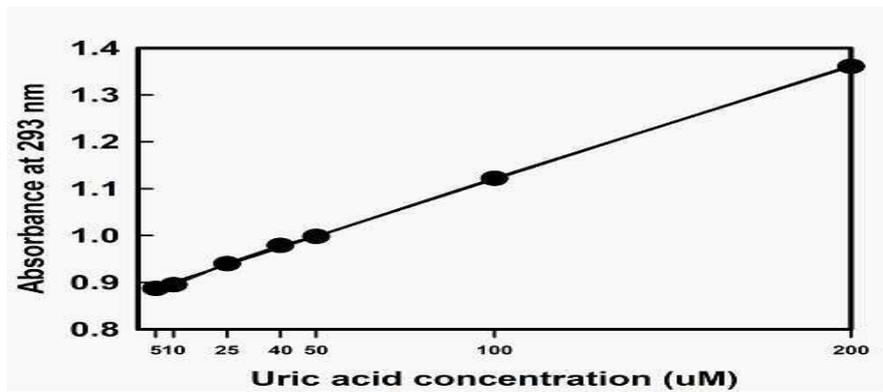
도면4



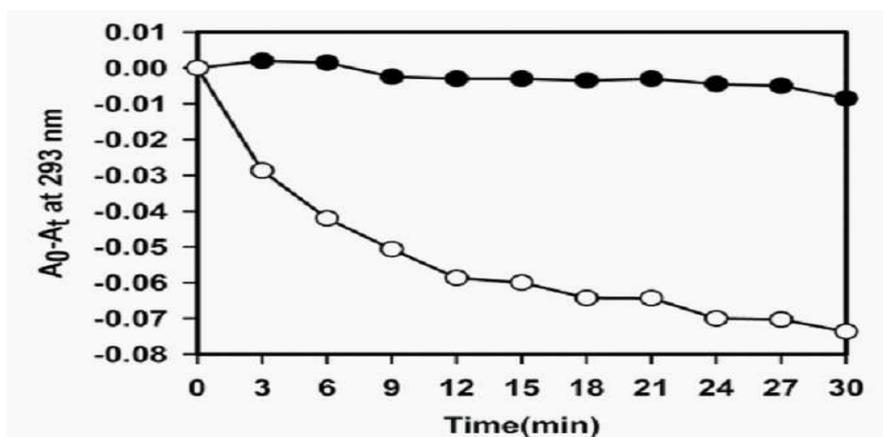
도면5



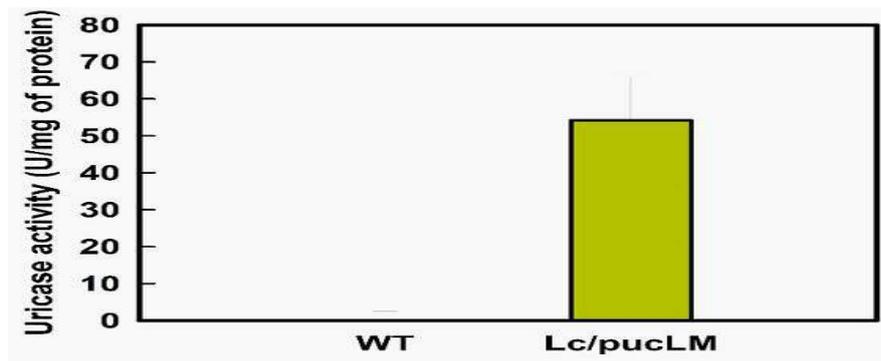
도면6



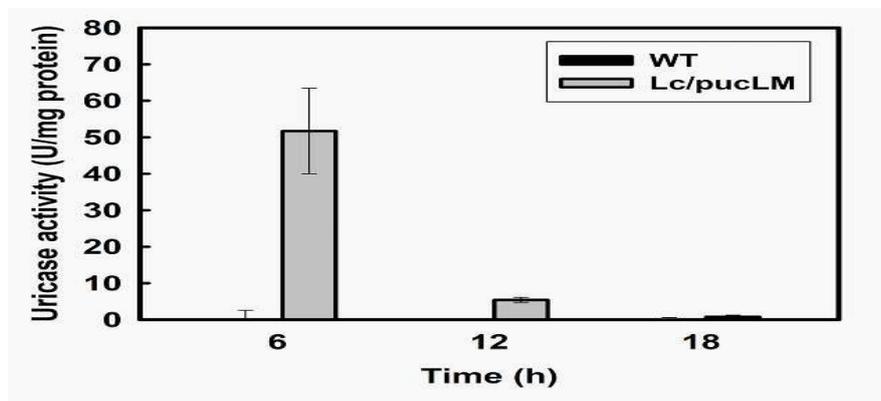
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.