



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0137430
(43) 공개일자 2016년11월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 1/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0062141
(22) 출원일자 2016년05월20일
심사청구일자 2016년05월20일
(30) 우선권주장
1020150071834 2015년05월22일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
재단법인 의약바이오컨버전스연구단
경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동)
(72) 발명자
전영호
세종특별자치시 갈매로 480, 206-1702(어진동, 한뜰마을2단지아파트)
황광연
서울특별시 용산구 이촌로81길 14, 102-1302(이촌동, 강촌아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

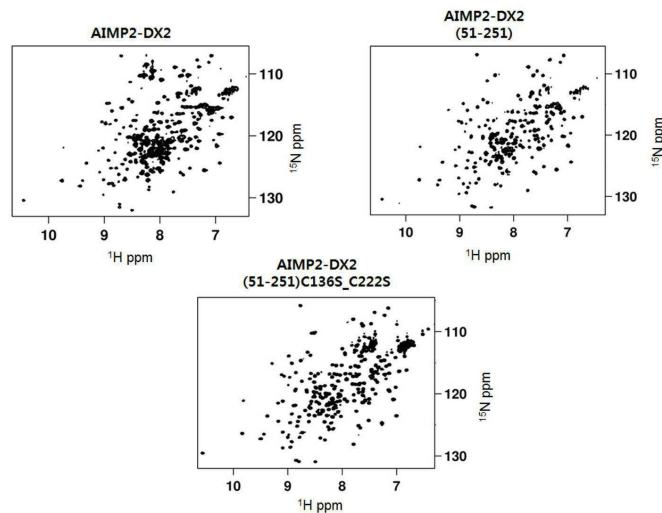
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 압 억제 표적 단백질인 AIMP-DX2의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 제조합 AIMP2-DX2 단백질 또는 이의 변이체의 제조방법 및 AIMP2-DX2 변이체에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 인간 서열의 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 대장균에서 대량 발현할 수 있도록 벡터를 디자인하였고, 다양한 조건의 탐색을 거쳐 고효율로 정제할 수 있는 방법을 확립하였다. 그 결과, 본 발명에서 사용된 발현 정제 방법을 활용하여, 리터당 10mg 이상의 순수한 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 생산할 수 있었는데, 이러한 기술은 단백질 구조 연구, 상호 작용 연구, 및 인 비트로 어레이 등에 폭넓게 활용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C07K 14/52 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

(72) 발명자

김성훈

서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 역삼한신
아파트 4-1005 (도곡동)

한병우

서울특별시 관악구 관악로 1, A동 104호(봉천동,
서울대학교수아파트 122)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A6A4045160

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)글로벌프론티어

연구과제명 Multi-Synthetase Complex의 구조 및 상호작용 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체의 제조방법:

AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현벡터로 형질전환된 대장균을 제1 완충용액에 현탁한 후, 파쇄 및 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계;

상기 수득한 상층액으로부터 제1 완충용액 및 크로마토그래피를 이용하여 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 정제하는 단계; 및

상기 정제된 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 pH 6.0 내지 pH 6.8의 비스-트리스 (Bis-Tris)가 함유된 제2 완충용액에 용해하여 투석하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변이체는 서열번호 10 또는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11 또는 서열번호 13의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 완충용액은 pH 7.0 내지 pH 7.8의 Tris-HCl을 함유하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제1 완충용액은 NaCl, PMSF, 및 DTT를 더 함유하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 정제하는 단계는 Ni-NTA (Nikel-nitrilotriacetic acid) 친화크로마토그래피 및 겔투과 크로마토그래피를 순차적으로 실시하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 7

서열번호 10 또는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진, AIMP2-DX2 변이체.

청구항 8

제7항의 AIMP2-DX2 변이체를 코딩하며, 서열번호 11 또는 서열번호 13의 염기서열로 이루어진, 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현벡터.

청구항 10

제9항의 발현벡터로 형질전환된 대장균.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 AIMP2-DX2 단백질 또는 이의 변이체의 제조방법 및 AIMP2-DX2 변이체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] AIMP2를 코딩하는 유전자는 7번 염색체에 위치하는데 네 개의 엑손으로 구성되어 있다. AIMP2는 어떤 세포로 분화되는지에 대한 세포 운명을 조절하는데 중심적인 역할을 하는데, TGF- β 신호의 성장억제 신호를 강화시킴으로써 항 증식 활성을 보여준다. 그리고 AIMP2는 DNA 손상에 반응한 MDM2에 의해 분해되는 과정으로부터 p53을 보호해줌으로써 활성화를 유도해 아포토시스 (apoptosis)를 촉진하고, 유비퀴틴에 의해 유도되는 TRAF2의 분해를 통하여 TNF- α 의 세포사멸 신호가 유도됨으로써 세포사를 촉진시킨다. 이러한 AIMP2가 결핍된 쥐에서는 폐상피세포의 급격한 증식으로 인해 폐의 형성이 제대로 이루어지지 않아 신생아에게 치명적이라고 하며, 이형 접합적 AIMP2를 가지는 쥐는 AIMP2의 발현양이 적을 뿐만 아니라 종양형성에 대해 보다 높은 민감성을 보였다. 이러한 결과들을 바탕으로, AIMP2는 특별한 작동기전을 가지고 있는 반가불충분성 종양 억제자로 분류되고 있다 (Choi, J. W. 등 2011 PLoS Genet 7(3):e1001351).

[0003] AIMP2-DX2는 AIMP2의 아미노산 중 69개를 코딩하는 엑손 2가 스플라이싱된 단백질이다. EST database에서 검색한 결과, 자궁경부암 (BI259092)과 횡문근육종 (BI115365)에서 발현됨이 보고된 바 있었으며, 특히, AIMP2-DX2의 발현은 폐암 세포에서 특이적으로 많이 증가됨이 보고되었다. 이러한 AIMP2의 이형체는 p53에 경쟁적으로 결합해 종양의 형성을 유도하는 것처럼 보여지고, 이러한 이유로 보통 AIMP2의 전세포사멸 (proapoptotic) 활성을 방해한다. AIMP2-DX2의 발현 비율은 폐암의 진행에 따라 증가되고 환자의 생존과 반비례한다. 두드러지는 점은 발암성의 AIMP2-DX2의 발현이 억제되면 폐암 이중이식 쥐 모델의 종양 성장이 감소되는 것이 관찰되었다는 것이다. 암 형성과의 연관성을 확인하기 위해 AIMP2와 AIMP2-DX2를 정상 폐세포와 폐암세포에서 확인하는 실험이 진행되었으며, 그 결과 폐암세포에서만 AIMP2-DX2가 발견되었다. 그리고 AIMP2-DX2가 사람의 암조직에서도 발견되는지 확인하기 위한 실험도 진행되었는데 정상조직과 비교해 많은 암환자의 임상조직에서 AIMP2-DX2의 발현이 증가됨이 확인되었다 (Choi, J. W. 등 2011 PLoS Genet 7(3):e1001351).

[0004] AIMP2-DX2는 320개의 아미노산으로 이루어진 AIMP2에서 엑손2 부분이 스플라이싱되어 251개의 아미노산으로 이루어진 단백질로, 앞선 여러 연구결과에서 확인할 수 있듯이 암세포 형성에 관여하는 단백질이다. AIMP2-DX2는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)검색을 통해 확인해 본 결과, 사람, 쥐 (mouse, rat), 소, 제브라피시, 서양 발톱 개구리, 침팬지 등에서 유사 시퀀스가 발견되었다. 앞서 언급한 쥐를 통한 실험과 사람의 임상 샘플을 통해 확인한 결과들은 AIMP2-DX2가 존재하면, 특히, 폐조직에서 종양형성이 유도되고 MDM2으로부터 p53을 보호해주지 못하게 되어 아포토시스가 일어나지 못하게 될 것이라는 것을 알 수 있다. 그러므로 AIMP2-DX2는 항암치료제를 개발하는데 있어 중요한 표적이 될 것으로 여겨지고 있다 (Won, Y. S. 등 2012 J Biotechnol 158(1-2):44-9).

[0005] 일반적으로 선택적 스플라이싱 (alternative splicing)은 유전자의 조절과 변화에 영향을 미친다. 비록 이런 과정이 유전자 조절에 관해 유연성을 제공할 수 있지만, 스플라이싱 변종들 간의 균형을 붕괴시킬 수 있고 특이적인 선택적 스플라이싱 변종들은 병리학적 장애를 일으킬 수 있다. 이런 유사한 특성을 보이는 AIMP2-DX2는 인간의 질병과 관련이 있으며, 특히, 암유전자 (oncogene)으로서 기능을 하는데 이런 작용 기전을 연구함으로써 진단 및 치료에 대한 중요한 단서를 제공할 수 있다. 그러므로 AIMP2-DX2를 항암 관련 약물 표적으로 선택하고 이를 억제할 수 있는 물질을 발명하는 연구를 기반으로 새로운 항암제를 개발하는 것이 절실한 상황이다.

[0006] 새로운 항암제의 개발을 위해서는 천연물 유래의 항암 후보물질을 스크리닝하는 기존의 방법에서 벗어나 새로운 항암제 표적 단백질의 발굴과 함께 이에 관한 구조와 반응 기전을 규명하는 체계적이고 논리적인 방법이 필요한 상황이다. 신약 후보물질을 설계하기 위해서는 단백질의 3차 구조를 결정하는 것이 필수적이며 나아가서는 이 단백질의 작용 기전을 밝히는 것이 필요하다. 이를 위해서는 좋은 물성을 가지는 단백질을 선택하고 적절한 조건을 찾아 안정한 단백질을 생산하는 것이 필요하다.

[0007] 종래 AIMP2-DX2의 생산 기술은 AIMP2-DX2 단백질을 동물 세포에서 미량 발현된 상태로 사용하거나, in vitro translation을 통하여 미량 발현된 단백질을 불순물을 가진 상태로 사용해 왔다. 그러나 이러한 종래 기술로는 AIMP2-DX2 단백질을 순수하게 대량 정제하여 3차원 구조 연구나 SPR 등 in vitro assay에 활용할 수 없는 문제점이 있는바, 순수한 AIMP2-DX2 단백질 및 동일한 생물학적 기능을 가지는 변이체를 대량 생산할 수 있는 기술에 대한 개발이 절실한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 AIMP2-DX2 단백질을 활용한 신약 발굴 연구 및 3차원 구조 규명에 활용하기 위한 발현, 정제 방법을 도출하였으며, AIMP2-DX2의 3차 구조 및 기능에 영향을 미치지 않는 범위에서 단백질의 N 말단 부위가 제거되거나 일부 서열이 치환된 AIMP2-DX2 변이체를 제조하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명은 기존에 알려져 있는 암 억제단백질인 Aminoacyl tRNA synthase complex-Interacting Multifunctional Protein 2 (AIMP2)의 엑손2 (exon2)가 스플라이싱 (splicing)된 암 억제 표적 단백질인 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 대장균에서 제조하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 X-ray 및 NMR을 사용해 AIMP2-DX2의 3차 구조를 결정하고자 할 때, 또는 AIMP2-DX2를 활용한 약물발굴 연구를 할 때, 이를 대장균에서 발현시켜 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 고효율로 생산하기 위한 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은, AIMP2-DX2의 구조 및 기능과 유사한 AIMP2-DX2 변이체를 제공한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여,

[0014] (a) AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현벡터로 형질전환된 대장균을 제1 완충용액에 현탁한 후, 과쇄 및 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계;

[0015] (b) 상기 수득한 상층액으로부터 제1 완충용액 및 크로마토그래피를 이용하여 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 정제하는 단계; 및

[0016] (c) 상기 정제된 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 pH 6.내지 pH 6.8의 비스-트리스 (Bis-Tris)가 함유된 제2 완충용액에 용해하여 투석하는 단계를 포함하는, AIMP2-DX2 또는 이의 변이체의 제조방법을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어, "AIMP2-DX2"는 320개의 아미노산으로 이루어진 AIMP2에서 엑손2 부분이 스플라이싱되어 251개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 앞선 여러 연구결과에서 확인할 수 있듯이 암세포 형성에 관여하는 단백질이며, 항암 치료제를 개발하는데 있어 중요한 표적이 될 것으로 여겨지고 있다. 이러한 생물학적 중요성에도 불구하고, 종래 AIMP2-DX2의 생산 기술은 AIMP2-DX2 단백질을 동물 세포에서 미량 발현된 상태로 사용하거나, in vitro translation을 통하여 미량 발현된 단백질을 불순물을 가진 상태로 사용하였으며, 이러한

종래 기술로는 AIMP2-DX2 단백질을 순수하게 대량 정제하여 3차원 구조 연구나 SPR 등 in vitro assay에 활용할 수 없는 문제점을 지니고 있다. 이러한 종래의 문제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 단계를 포함하는, 제조합 AIMP2-DX2 단백질 또는 이의 변이체의 제조방법을 제공한다.

- [0019] 이하에서는, 본 발명에 따른 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체의 제조방법의 각각 단계에 대하여 상세히 설명하기로 한다.
- [0021] 단계 (a)에서는 상기 형질전환된 대장균을 제1 완충용액에 현탁한 후, 과쇄 및 원심분리하여 상층액을 수득한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "형질전환"은 본래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 외래 유전자가 있는 DNA 사슬 조각 또는 플라스미드가 세포들 사이에 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합함으로써 세포의 유전형질을 변화시키는 분자생물학적 기술을 의미한다. 본 발명의 목적상 형질전환은 서열번호 9의 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드가 대장균 내에 삽입되어 AIMP2-DX2, 서열번호 11 또는 서열번호 13의 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드가 대장균 내에 삽입되어 AIMP2-DX2 변이체가 발현되는 것을 의미한다.
- [0023] 또한, 상기 제1 완충 용액으로 현탁하기 전, 형질전환된 대장균의 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체 발현을 위하여 적절한 조건에서 배양될 수 있다. 구체적으로, 형질전환체의 배양은 목적 단백질인 상기 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 적절한 조건 하에서 수행되며, 이러한 조건은 당업자에게 익히 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 형질전환체는 통상적인 배양방법에 의해 대량으로 배양할 수 있다. 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 예를 들어, LB 배지(Luria-Bertani Broth)를 사용할 수 있다. 형질전환체의 배양은 통상의 미생물 배양 조건상에서 가능하며, 예를 들어, 온도범위 15℃ 내지 45℃에서 10시간 내지 40시간 동안 배양할 수 있다. 배양액 중의 배양 배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하기 위해 원심분리(centrifugation) 또는 여과(filtration) 과정을 거칠 수 있으며, 이러한 과정은 당업자가 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동(frozen)하거나 냉동건조(lyophilized)하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.
- [0024] 상기 형질전환체를 배양하는 단계는 형질전환체의 종류에 따라 알맞은 생육 온도를 당업자가 선택할 수 있다. 예를 들면, 상기 형질전환체가 대장균(E.coli)인 경우, 바람직하게 생육 온도 조건은 35℃ 내지 40℃일 수 있으며, 가장 바람직하게는 37℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 한 구체예로서, 호모사피엔스로부터 분리한 DNA를 주형으로 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하는, 서열번호 9의 염기서열을 가지는 AIMP-DX2를 증폭하는 단계; 상기 증폭된 AIMP-DX2 DNA를 제한 효소(BamHI, XhoI)로 처리한 후, PET28a 벡터에 도입하여 플라스미드 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2를 제조하는 단계; 상기 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2로 대장균을 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 대장균을 0.5 내지 2mM의 IPTG가 포함된 배지에서 배양하는 단계 등으로 실시될 수 있으나(실시예 1 내지 3 참조), 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 단계 (b)에서는 상기 수득한 상층액으로부터 제1 완충용액 및 크로마토그래피를 이용하여 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 정제한다.
- [0028] 상기 상층액에 존재하는 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체는 통상의 방식으로 정제될 수 있으며, 예를 들어, 염석(예를 들어, 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 칼럼 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용시켜 정제할 수 있으며, 가장 바람직하게는 Ni-NTA(Nikel-nitrilotriacetic acid) 친화 크로마토그래피 및 겔투과 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 정제할 수 있으며(실시예 4 참조), 상기 제1 완충용액은 pH 7.0 내지 pH 7.8의 Tris-HCl을 함유할 수 있으며, 보다 구체적으로 Tris-HCl, NaCl, PMSF, 및 DTT로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 단계 (c)에서는 상기 정제된 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 pH 6.0 내지 pH 6.8의 비스-트리스(Bis-Tris)가

함유된 제2 완충용액에 용해하여 투석한다.

[0031] 상기 단계에서 이용된 투석막으로는 바람직하게 투과 분자량 10,000Da의 반투막을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼에 비해 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 이용한 경우, 상층액의 AIMP2-DX2 단백질 용해도가 증가되었으며, 동결 후, 이를 해동시키거나, 상온 (약 20℃)에 방치시킨 경우에도 단백질의 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었으나, 상기 단계를 통해 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체에 대한 정제 효율 및 동결 보관 후 이용 과정에서 단백질의 안정성을 현저하게 증가시킬 수 있다 (실시예 6 참조).

[0033] 한편, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 10 또는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 AIMP2-DX2 변이체, 상기 변이체를 코딩하며 서열번호 11 또는 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어, "AIMP2-DX2 변이체"는 AIMP2-DX2 단백질과 구조 및 기능이 유지되는 범위 내에서 변형된 단백질로서, 암 억제 표적 단백질인 AIMP2-DX2에 대한 3차원 구조 규명, 약물 작용 기전, 및 신약 발굴 등의 연구에 활용될 수 있다 (실시예 5 참조). 상기 AIMP2-DX2 변이체는 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 결실, 삽입, 및/또는 치환을 포함하며, 바람직하게 AIMP2-DX2에서, N 말단의 50개 아미노산이 절단 (결실)된 AIMP2-DX2 (51-251), 및 상기 AIMP2-DX2 (51-251) 단백질 136번 및 222번 시스테인 (Cysteine) 잔기가 세린 (Serine)으로 치환된 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S일 수 있으며, 상기 AIMP2-DX2 (51-251)는 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드, 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 상기 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S는 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드, 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 AIMP2-DX2 변이체는 서열번호 10 또는 서열번호 12의 아미노산 서열, 서열번호 11 또는 서열번호 13의 염기서열과 각각 바람직하게 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 또는 염기서열을 포함할 수도 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 (재조합 벡터)를 제공한다.

[0038] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"는 적당한 숙주세포에서 목전 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0039] 본 발명에서 용어, "작동 가능하게 연결된 (operably linked)"은 일반적인 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동 가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0040] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 본 발명에 따른 재조합 벡터는 대장균용 발현벡터인 PET28a_SUMO를 사용하여 도 4에 나타난 바와 같이 제조된 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251), pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S일 수 있으나, AIMP2-DX2 변이체를 코딩하며, 이를 숙주세포에 발현시킬 수 있는 재조합 벡터라면, 제한없이 포함될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0043] 본 발명의 형질전환체는 바람직하게 E.coli(대장균, *Escherichia coli*)일 수 있으며, 상기 본 발명의 E.coli로는 이에 제한되지 않으나, 예를 들어, BL21(DE), Rosetta2(DE3)pLysS, BL21-codonPlus(DE3)-RIPL, C43(DE3) 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게 BL21 (DE)일 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따르면, 인간 서열의 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 대장균에서 대량 발현할 수 있도록 벡터를 디자인하였고, 다양한 조건의 탐색을 거쳐 고효율로 정제할 수 있는 방법을 확립하였다.

[0045] 그 결과, 본 발명에서 사용된 발현 정제 방법을 활용하여, 리터당 10mg 이상의 순수한 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체를 생산할 수 있고, 10mg/mL 농도 및 상온에서 144시간 이상 안정한 단백질 용액을 유지할 수 있음을 확인할 수 있었는바, 이러한 기술은 단백질 구조 연구, 상호 작용 연구, 및 인 비트로 어세이 등에 폭넓게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 AIMP2-DX2의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도이다.

도 2는 AIMP2-DX2 (51-251)의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도이다.

도 3은 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도이다.

도 4는 AIMP2-DX2, AIMP2-DX2 (51-251), AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S를 대장균에 도입하여 형질전환시키기 위한 발현벡터 (pET28a_SUMO-AIMP2-DX2, pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251), 및 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S)를 개략적으로 나타낸 모식도이다.

도 5는 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양하여 수득한, 세포 침전물에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 6은 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251) 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양하여 수득한, 세포 침전물에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 7은 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양하여 수득한, 세포 침전물에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 8은 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양하여 수득한, 세포 침전물에 대하여 AIMP2-DX2 단백질을 정제한 후, SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 9는 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251) 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양하여 수득한, 세포 침전물에 대하여 AIMP2-DX2 (51-251) 단백질을 정제한 후, SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 10은 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 발현벡터로 형질전환된 대장균을 배양하여 수득한, 침전물에 대하여 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 단백질을 정제한 후, SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 11은 정제된 AIMP2-DX2, AIMP2-DX2 (51-251) 및 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 단백질을 이용하여 2D TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy) NMR을 실시한 결과이다.

도 12는 AIMP2-DX2 단백질의 정제 후 농축과정에서, 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 또는 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 사용하여 수득한, 상층액 (sup) 또는 침전물 (ppt)에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 13은 AIMP2-DX2 단백질의 정제 후 농축과정에서, 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 또는 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 사용하고, 이후, 동결 및 해동시켜 수득한, 상층액 (sup) 또는 침전물 (ppt)에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

도 14는 AIMP2-DX2 단백질의 정제 후 농축과정에서, 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 또는 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 사용하고, 동결 및 상온에서 보관한 뒤 수득한, 상층액 (sup) 또는 침전물 (ppt)에 대하여 SDS-PAGE를 실시한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] (단계 1) AIMP2-DX2 유전자의 증폭

[0048] N-말단이 아미노산 1번 (메티오닌-프롤린-메티오닌)으로부터 시작되는 AIMP2-DX2 유전자를 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR)을 통해 합성하고 증폭하기 위해 각각의 프라이머 올리고 뉴클레오타이드를 다음과 같은 과정으로 고안하여 유전자 증폭을 수행하였다.

서열번호 1: 5'-CGCGGATCCATGCCGATGTACCAGGTAAA-3'

서열번호 2: 5'-CCGCTCGAGTTACTTAAGGAGCTTGAGGGC-3'

[0050]

[0052] 서열번호 1의 염기서열을 가지는 프라이머는 BamHI 제한효소 인지부위 (밑줄)에 해당하는 염기서열을 포함하고, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 프라이머는 종결코돈 (박스), 제한효소 XhoI 인지부위 (밑줄)에 해당하는 염기서열을 포함한다.

[0053] 호모사피엔스의 DNA를 주형으로 사용해 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행하였다. 100ng/ μ l의 주형 DNA 1 μ l, 2.5 μ l의 10mM dNTP (최종농도:0.5mM), 각 2 μ l의 10pmol 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 (최종농도: 0.4pmol), SolgTM Pfu DNA 중합효소 0.5 μ l (2.5U/ μ l, solgent, korea), 5 μ l PCR 완충용액 (solgent)에 37 μ l 증류수를 넣어 반응액을 제조하였다. 상기 혼합물을 95 $^{\circ}$ C에서 5분을 둔 뒤, 95 $^{\circ}$ C 30초; 55 $^{\circ}$ C 1분; 72 $^{\circ}$ C 1분의 반응을 35회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C, 5분의 조건으로 반응시켰다. 반응용액을 1% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 확인한 후, 약 750개의 염기쌍으로 이루어진 AIMP2-DX2 유전자를 용출하였다. 이 용출액 16 μ l에 10배 농축 제한효소 반응 완충액 2 μ l와 제한효소 BamHI, XhoI을 각 1 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 이 반응액을 1% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 확인한 후, 원하는 DNA 절편을 용출해 30 μ l의 용출버퍼에 용존시켰다.

[0055] (단계 2) AIMP2-DX2 유전자를 포함하는 발현벡터의 제조

[0056] Yeast SUMO sequence가 삽입되어있는 pET28a-SUMO 플라스미드를 제한효소 BamHI과 XhoI을 이용하여 완전 절단하고 1% 아가로스 겔 상에서 분리하였다. 분리된 AIMP2-DX2 500ng과 위의 플라스미드 100ng을 반응 튜브에 넣은 후, 2 μ l의 5배 연결 반응용액 (250mM Tris-HCl, pH7.8, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 5mM ATP), 10U의 T4 DNA 리가아제를 넣고 총 부피가 10 μ l가 되도록 증류수를 넣어준 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 이 반응용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 첨가하여 형질전환시킨 다음, 50 μ g/ml 농도의 카나마이신이 첨가된 LB 배지에 도말하여 대장균 형질전환체를 선발하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2 유전자의 삽입유무를 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 AIMP2-DX2 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등 (Sanger, F. et al. 1977. PNAS. 74:5463)의 방법에 따라 Big Dye Cycle Sequencing System (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였고 ABI 377 DNA 염기서열 분석기에 의해 분석하였다.

[0058] (단계 3) AIMP2-DX2의 대장균에서 발현

[0059] 상기 단계 2에서 얻은 발현벡터 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2를 발현 숙주인 대장균 BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균 균주를 50 μ g/ml의 카나마이신이 함유된 LB배지에서 12시간 동안 진탕배양한 후 이중 100 μ l를 100ml의 LB배지에 옮겨 37 $^{\circ}$ C에서 박테리아의 흡광도가 600nm에서 0.4-0.6 정도가 될 때 IPTG를 최종농도 0.5mM이 되도록 첨가하였다. IPTG 첨가 전과 첨가 후 4시간이 지난 박테리아를 각각 1ml씩 취하고 13,000rpm에서 2분간 원심분리한 후 각각 세포 펠렛을 수거하였다. 수거한 펠렛을 램리 등의 방법 (Laemmli, et al. 1970. Nature. 227:680)에 따라 15% SDS-PAGE를 수행한 후 쿠마지블루 (Coomassie Brilliant Blue)로 단백질을 염색하여 분석한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, SUMO-AIMP2-DX2 단백질의 발현을 확인할 수 있었다.

실시예 2. AIMP2-DX2 (51-251) 유전자의 증폭 및 발현

(단계 1) AIMP2-DX2 (51-251) 유전자의 증폭

N-말단이 51번(라이신-아스파틱산-아이소류신)으로 시작되는 AIMP2-DX2 (51-251) 유전자를 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR)을 통해 합성하고 증폭하기 위해 각각의 프라이머 올리고 뉴클레오타이드를 다음과 같은 과정으로 고안하여 유전자 증폭을 수행하였다.

서열번호 3: 5'-CGCGGATCCAAAGACATCGTGATCAACGC-3'

서열번호 2: 5'-CCGCTCGAGTTACTTAAGGAGCTTGAGGGC-3'

서열번호 3의 염기서열을 가지는 프라이머는 BamHI 제한효소 인지부위 (밑줄)에 해당하는 염기서열을 포함하고, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 프라이머는 중결코돈 (박스), 제한효소 XhoI 인지부위(밑줄)에 해당하는 염기서열을 포함한다.

호모사피엔스의 DNA를 주형으로 사용해 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행하였다. 100ng/ μ l의 주형 DNA 1 μ l, 2.5 μ l의 10mM dNTP (최종농도:0.5mM), 각 2 μ l의 10pmol 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 (최종농도: 0.4pmol), SolgTM Pfu DNA 중합효소 0.5 μ l (2.5U/ μ l, solgent, korea), 5 μ l PCR 완충용액 (solgent)에 37 μ l 증류수를 넣어 반응액을 제조하였다. 상기 혼합물을 95 $^{\circ}$ C에서 5분을 둔 뒤, 95 $^{\circ}$ C 30초; 55 $^{\circ}$ C 1분; 72 $^{\circ}$ C 1분의 반응을 35회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C 5분의 조건으로 반응시켰다. 반응용액을 1% 아가로스 젤에서 전기영동법으로 확인한 후, 약 600개 염기쌍의 AIMP2-DX2 (51-251) 유전자를 용출하였다. 이 용출액 16 μ l에 10배 농축 제한효소 반응 완충액 2 μ l와 제한효소 BamHI, XhoI을 각 1 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 이 반응액을 1% 아가로스 젤에서 전기영동법으로 확인한 후, 원하는 DNA 절편을 용출해 30 μ l의 용출버퍼에 용존시켰다.

(단계 2) AIMP2-DX2 (51-251) 유전자를 포함하는 발현벡터의 제조

Yeast SUMO sequence가 삽입되어있는 pET28a-SUMO 플라스미드를 제한효소 BamHI과 XhoI을 이용하여 완전 절단하고 1% 아가로스 젤 상에서 분리하였다. 분리된 AIMP2-DX2 (51-251) 500ng과 위의 플라스미드 100ng을 반응 튜브에 넣은 후 2 μ l의 5배 연결 반응용액 (250mM Tris-HCl, pH7.8, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 5mM ATP), 10U의 T4 DNA 리가아제를 넣고 총 부피가 10 μ l가 되도록 증류수를 넣어준 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 이 반응 용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 첨가하여 형질전환시킨 다음, 50 μ g/ml 농도의 카나마이신이 첨가된 LB 배지에 도말하여 대장균 형질전환체를 선발하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)의 유전자의 삽입유무를 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 AIMP2-DX2 (51-251) 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등 (Sanger, F. et al. 1977. PNAS. 74:5463)의 방법에 따라 Big Dye Cycle Sequencing System (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였고 ABI 377 DNA 염기서열 분석기에 의해 분석하였다.

(단계 3) AIMP2-DX2 (51-251)의 대장균에서 발현

상기 단계 2에서 얻은 발현벡터 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)를 발현 숙주인 대장균 BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균 균주를 50 μ g/ml의 카나마이신이 함유된 LB배지에서 12시간 동안 진탕배양한 후, 이중 100 μ l를 100ml의 LB배지에 옮겨 37 $^{\circ}$ C에서 박테리아의 흡광도가 600nm에서 0.4-0.6 정도가 될 때 IPTG를 최종 농도 0.5mM이 되도록 첨가하였다. IPTG 첨가 전과 첨가 후 4시간이 지난 박테리아를 각각 1ml씩 취하고 13,000rpm에서 2분간 원심분리한 후 각각 세포 펠릿을 수거하였다. 수거한 펠릿을 램리 등의 방법 (Laemmli, et al. 1970. Nature. 227:680)에 따라 15% SDS-PAGE를 수행한 후 쿠마지블루 (Coomassie Brilliant Blue)로 단백질을 염색하여 분석한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, SUMO-AIMP2-DX2 (51-251) 단백

질의 발현을 확인할 수 있었다.

[0076] 실시예 3. AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 유전자의 발현

[0077] (단계 1) AIMP2-DX2 (51-251)C136S 유전자의 돌연변이

[0078] 136번 아미노산 시스테인 (TGC)이 세린 (AGC)으로 돌연변이 되도록 코딩하는 AIMP2-DX2 (51-251)C136S 유전자를 PCR을 통해 증폭하기 위해 올리고 뉴클레오타이드인 프라이머 2개를 다음과 같이 고안하여 유전자 증폭을 수행하였다.

서열번호 4 : 5'- ATC CAG ACG ATG AGC CCC ATC GAA GGC -3'

서열번호 5 : 5'- GCC TTC GAT GGG GCT CAT CGT CTG GAT -3'

[0080]

[0082] 실시예 2의 단계 2에서 제조한 발현벡터 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)의 DNA를 주형으로 사용해 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행하였다. 20ng/ μ l의 주형 DNA 1 μ l, 2.5 μ l의 10mM dNTP (최종농도:0.5mM), 각 2 μ l의 10pmol 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머 (최종농도: 0.4pmol), SolgTM Pfu-X DNA 중합효소 0.5 μ l (2.5U/ μ l, solgent, korea), 5 μ l PCR 충용액(solgent)에 37 μ l 증류수를 넣어 반응액을 제조하였다. 상기 혼합물을 95℃에서 30초를 둔 뒤, 95℃ 30초; 55℃ 1분; 72℃ 6분 30초의 반응을 15회 반복한 후, 4℃ 5분의 조건으로 반응시켰다. 이후 반응용액에 제한효소 DpnI을 1 μ l 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 10 μ l 첨가하여 형질전환시킨 다음, 50 μ g/ml 농도의 카나마이신이 첨가된 LB 배지에 도말하여 대장균 형질전환체를 선발하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S의 유전자 돌연변이를 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 AIMP2-DX2 (51-251)C136S 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등 (Sanger, F. et al. 1977. PNAS. 74:5463)의 방법에 따라 Big Dye Cycle Sequencing System (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였고 ABI 377 DNA 염기서열 분석기에 의해 분석하였다.

[0084] (단계 2) AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 유전자의 돌연변이

[0085] 136번 아미노산 시스테인(TGC)이 세린(AGC)으로, 222번 아미노산 시스테인(TGC)이 세린(AGC)으로, 돌연변이 되도록 코딩하는 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 유전자를 PCR을 통해 증폭하기 위해 올리고 뉴클레오타이드인 프라이머 2개를 다음과 같이 고안하여 유전자 증폭을 수행하였다.

서열번호 6 : 5'- AGC AGA TCG GAG GCT GCA GTG TGA CAG TG -3'

서열번호 7 : 5'- CAC TGT CAC ACT GCA GCC TCC GAT CTG CT - 3'

[0087]

[0089] 실시예 3의 단계 1에서 제조한 발현벡터 pET28a-SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S의 DNA를 주형으로 사용해 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행하였다. 20ng/ μ l의 주형 DNA 1 μ l, 2.5 μ l의 10mM dNTP (최종농도:0.5mM), 각 2 μ l의 10pmol 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머 (최종농도: 0.4pmol), SolgTM Pfu-X DNA 중합효소 0.5 μ l (2.5U/ μ l, solgent, korea), 5 μ l PCR 완충용액(solgent)에 37 μ l 증류수를 넣어 반응액을 제조하였다. 상기 혼합물을 95℃에서 30초를 둔 뒤, 95℃ 30초; 55℃ 1분; 72℃ 6분 30초의 반응을 15회 반복한 후, 4℃ 5분의 조건으로 반응시켰다. 이후, 반응용액에 제한효소 DpnI을 1 μ l 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응용액을 대장균 DH5 α 컴피턴트 세포에 10 μ l 첨가하여 형질전환시킨 다음, 50 μ g/ml 농도의 카나마이신이 첨가된 LB 배

지에 도달하여 대장균 형질전환체를 선발하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S의 유전자 돌연변이를 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등 (Sanger, F. et al. 1977. PNAS. 74:5463)의 방법에 따라 Big Dye Cycle Sequencing System (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였고 ABI 377 DNA 염기서열 분석기에 의해 분석하였다.

[0091] (단계 3) AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S의 대장균에서 발현

[0092] 상기 단계 2에서 얻은 발현벡터 pET28a_SUMO-AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S를 발현 숙주인 대장균 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL에 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균 균주를 50 µg/ml의 카나마이신이 함유된 LB 배지에서 12시간 동안 진탕배양한 후, 이중 100 µl를 100ml의 LB배지에 옮겨 37℃에서 박테리아의 흡광도가 600nm에서 0.4-0.6 정도가 될 때 IPTG를 최종농도 0.5mM이 되도록 첨가하였다. IPTG 첨가 전과 첨가 후 4시간이 지난 박테리아를 각각 1ml씩 취하고 13,000rpm에서 2분간 원심분리한 후 각각 세포 펠릿을 수거하였다. 수거한 펠릿을 램리 등의 방법 (Laemmli, et al. 1970. Nature. 227:680)에 따라 15% SDS-PAGE를 수행한 후 쿠마지블루 (Coomassie Brilliant Blue)로 단백질을 염색하여 분석한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, SUMO-AIMP2-DX2 (51-251) C136S_C222S 단백질의 발현을 확인할 수 있었다.

[0094] 실시예 4. AIMP2-DX2 또는 이의 변이체 단백질의 정제

[0095] (단계 1) 대장균 세포의 배양 및 파쇄

[0096] 실시예 1,2,3에서 제조된 AIMP2-DX2, AIMP2-DX2 (51-251), AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S (이하, 실시예 4에서는 상기 단백질들을 AIMP2-DX2 단백질로 명명함.)가 발현된 대장균 세포를 각 실시예의 단계 3과 같은 방법으로 2리터 배양한 후, 원심분리기를 이용하여 5,000rpm에서 20분간 원심분리하여 대장균 세포 침전물을 수거하고, 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM DTT pH7.4 조성의 완충용액에 현탁시킨 후, 얼음중탕에서 초음파 분쇄기 (Sonic Dismembrator, Fisher, USA)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 용액을 원심분리기로 18,000rpm에서 90분간 원심분리한 후, 그 상층액을 이용해 정제를 진행하였다.

[0098] (단계 2) 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM PMSF, pH7.4 조성의 완충용액에서의 정제

[0099] 단계 1에서 얻은 상층액을 PMSF가 없는 상기의 완충용액으로 미리 평형된 니켈-니트릴로트리아세틱 액시드(Ni-NTA) 칼럼 (GE healthcare, USA)에 결합시킨 후 0-0.5M 이미다졸 농도구배를 이용하여 용출한 후, SDS-PAGE하여 His-yeast SUMO-AIMP2-DX2 단백질 부분만 모은 후, 다음 과정에 이용하였다. 상기 과정에서 얻은 His-yeast SUMO-AIMP2-DX2 단백질에 ULP (Yeast SUMO cleavage protease)를 첨가하여 4℃에 12시간 동안 두어 His-Yeast SUMO를 잘라내었다. 이때, 다음 스텝을 위해서 이미다졸 농도를 줄여야 하므로 20mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl 완충용액에 dialysis하였다. His-Yeast SUMO가 잘린 AIMP2-DX2 단백질은 Ni-NTA칼럼을 통과하므로, Yeast SUMO를 잘라낸 AIMP2-DX2 단백질 용액을 상기의 완충용액으로 미리 평형된 Ni-NTA 칼럼에 통과시킨 후, 통과한 용액만을 모았다. 상기 과정에서 얻은 AIMP2-DX2 단백질을 5ml까지 농축한 후, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF 조성의 완충용액으로 평형된 젤 필트레이션 칼럼 (Superdex 200, 16/60, GE Healthcare, USA)에 주입시킨 후, 단백질의 분자량에 의해 분리하여 전기영동으로 확인하고 AIMP2-DX2 단백질의 부분만 모아 SDS-PAGE로 확인한 결과, 도 8 내지 도 10에 나타난 바와 같이, AIMP2-DX2, AIMP2-DX2 (51-251), AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 단백질이 높은 수율로 수득될 수 있음을 알 수 있었다.

[0101] 실시예 5. 정제된 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체 단백질을 이용한 구조분석

[0102] 본 실시예에서는, 상기 실시예 4에서 정제된 AIMP2-DX2, AIMP2-DX2 (51-251), AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S 단백질을 이용한 실험의 일례로서, 이에 대한 구조 분석을 실시하였으며, 구체적으로, 상기 AIMP2-DX2 또는 이의 변이체 단백질을 대상으로 2D TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy) NMR을 실시하였다.

[0104] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 2D TROSY NMR을 통한 구조 분석이 가능한 양의 단백질을 상기 실시예 1 내지 4의 방법을 통해 수득할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 이를 기초로, 상기 AIMP2-DX2 단백질 N 말단의 50개 아미노산이 절단 (결실)된, AIMP2-DX2 (51-251), 및 상기 AIMP2-DX2 (51-251) 단백질 136번 및 222번 시스테인 (Cysteine) 잔기가 세린 (Serine)으로 치환된, AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S는 결실 또는 치환에 의해서도 AIMP2-DX2 단백질 본연의 구조와 기능에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 이를 통해 AIMP2-DX2 단백질 자체 뿐만 아니라, AIMP2-DX2 (51-251) 및 AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S를 이용하여 암 억제 표적단백질인 AIMP2-DX2에 대한 3차원 구조 규명, 약물 작용 기전, 및 신약 발굴 등의 연구에 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0106] 실시예 6. 완충 용액에 따른 정제 효율 및 안정성 증진 효과

[0107] 본 실시예에서는, 상기 실시예 4의 AIMP2-DX2 단백질 정제 과정 후, 농축하는 단계에서 버퍼 조성, 즉, pH 변화가 상기 단백질의 정제 효율 및 안정성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4와 동일한 과정으로 AIMP2-DX2 단백질을 정제하였으며, 다만, 이후 농축 단계에서, 하나는 20mM Tris-HCl (pH 7.4)를 이용한 반면, 다른 하나는 20mM Bis-Tris (pH 6.0)를 이용하여 dialysis (10,000Da의 반투막 사용)하였다. 이후, 동일한 양을 농축하고, 이들의 상층액 (sup)과 침전물 (ppt)을 수거하여 SDS-PAGE를 수행함으로써, 이들간 정제 효율을 비교하였다. 이 뿐만 아니라, 상기 농축물을 액체 질소로 동결시키고, 다시 이를 해동시키거나, 상온 (약 20℃)에 방치시킨 후, 원심분리하여 상층액 (sup)과 침전물 (ppt)을 수득하였으며, 다시 이에 대한 SDS-PAGE를 수행하여 정제된 단백질의 안정성을 평가하였다.

[0109] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼에 비해 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 이용한 경우, 침전물 내 존재하는 AIMP2-DX2 단백질의 양이 감소하고 상층액에 대한 용해도가 증가하여 정제할 수 있는 AIMP2-DX2 단백질의 양, 즉, 정제 효율이 증진됨을 알 수 있었다. 특히, 액체 질소로 동결시킨 후 해동시킨 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼에서는 침전물 내 다량의 AIMP2-DX2가 관찰되어 동결 및 해동 과정에서 단백질의 안정성 변화가 관찰된 반면, 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼에서는 동결 전과 마찬가지로 상층액 내 다량의 AIMP2-DX2가 용해되어 있었는바, 동결 및 해동과정에서도 단백질의 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다. 아울러, 액체 질소로 동결시킨 후 상온에 방치시킨 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, 상기 결과들과 마찬가지로 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼에 비해 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 이용한 경우, 상층액 내 다량의 AIMP2-DX2가 용해되어 있었고, 침전물에서는 적은 양만이 관찰되었는바, 동결 후 상온 조건에서도 단백질의 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

[0110] 상기 결과들을 종합해 볼 때, 농축 과정에서 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 버퍼 가 아닌, 20mM Bis-Tris (pH 6.0) 버퍼를 사용함으로써, AIMP2-DX2 단백질에 대한 정제 효율 및 동결 후 해동 등 과정에서 단백질의 안정성이 개선됨을 알 수 있었다.

[0112] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1

AIMP2-DX2 (DX2 full) 염기 서열

ATGCCGATGTACCGAGTAAAGCCCTATCACGGGGCGCGCGCCTCTCCGTGTG
GAGCTTCCACCTGCATGTACCGGCTCCCAACGTGCACGGCAGGAGCTACGG
CCCAGCGCCGGCGCTGGCCACGTGCAGGATTACGGGGCGCTGAAAGACATC
GTGATCAACGCAAAACCGGCTCCCTCCCTCTCCCTGCTTGTGCTGCACAGG
CTGCTCTGTGACACTTCAGGGTCTGTCCACGTGCACACGCACTCTCGGTC
AAGAGCGTGCTGAAAACCTTCTCAAGTGCTTTGGAGAACAGAATAAAAAACA
GCCCCCAAGACTATCAGCTGGGATCACTTTAATTTGAAGAATGTGCCGAA
GACGCAGATGAAATTCAGCATCCAGACATGTGCCCCATCGAAGGCGAAGGGA
ACATTGCACGTTTCTTGTCTCTGTTTGGCCAGAAGCATAATGCTGTCAACGC
AACCCTTATAGATAGCTGGGTAGATATGCGATTTTTCAGTTAAAGAGGGGAA
CAGTAAAGAAAAAGCCGCTGTTTCCGCTCCATGAACCTGCTCTTGGGAAGA
GCCCTTGGCTCGCTGGGAATGAACCTACCGTAGCAGACGTGGTGTGTGGTCTG
TACTCCAGCAGATCGGAGGCTGCAGTGTGACAGTGCCAGCCAATGTGCAGAGG
TGGATGAGGTCTTGTGAAAACCTGGCTCCTTTTAAACACGGCCCTCAAGCTCCTT
AAGTGA

AIMP2-DX2 (DX2 full) 아미노산 서열

MPMYQVKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGP
APGAGHVQDYGALKDIVINANPASPLSLLVLRLLCEHF
RVLSTVHTHSSVKSVPENLLKCFGEQNKQPRQDYQLGF
TLIWKNVPKTQMKFSIQTMCPIEGEGNIARFLFSLFGQKH
NAVNATLIDSWVDIAIFQLKEGSSKEKA AVFRSMNSALG
KSPWLAGNELTVADVVLWSVLQIQIGGCSVTPANVQR
WMRSCENLAPFNTALKLL K

도면2

AIMP2-DX2 (51-251) 염기 서열

AAAGACATCGTGATCAACGCAAAACCGGCTCCCTCCCTC
TCCCTGCTTGTGCTGCACAGGCTGCTCTGTGAGCACTTCAGG
GTCTCTGCCACGGTGACACGCACTCTCGGTCAAGAGCGTG
CTGAAAAACCTTCTCAAGTGCTTTGGAGAACAGAATAAAAA
CAGCCCCGCAAGACTATCAGCTGGGATCACTTTAATTTGG
AAGAATGTGCCGAAGACGCAGATGAAATTCAGCATCCAGAC
GATGTGCCCCATCGAAGGCGAAGGGAACATTGCACGTTTCTT
GTTCTCTGTTTGGCCAGAAGCATAATGCTGTCAACGCAACC
CTTATAGATAGCTGGGTAGATATGCGATTTTTCAGTTAAAGA
GGGAAGCAGTAAAGAAAAAGCCGCTGTTTCCGCTCCATGA
ACTCTGCTCTTGGGAAGAGCCCTGGCTCGCTGGGAATGAAC
TCACCGTAGCAGACGTGGTGTGTGGTCTGTACTCCAGCAGAT
CGGAGGCTGCAGTGTGACAGTGCCAGCCAATGTGCAGAGGT
GGATGAGGTCTTGTGAAAACCTGGCTCCTTTTAAACACGGCC
TCAAGCTCCTTAAGTGA

AIMP2-DX2 (51-251) 아미노산 서열

KDIVINANPASPLSLLVLRLLCEHFRVLSTVHTHSSVKSVPEN
LLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTLIWKNVPKTQMKFSIQTMCP
IEGEGNIARFLFSLFGQKHNAVNATLIDSWVDIAIFQLKEGSSKE
KA AVFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVVLWSVLQIQIGGCS
VTPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK

도면3

AIMP2-DX2 (51-251) C136S_C222S 염기 서열

```

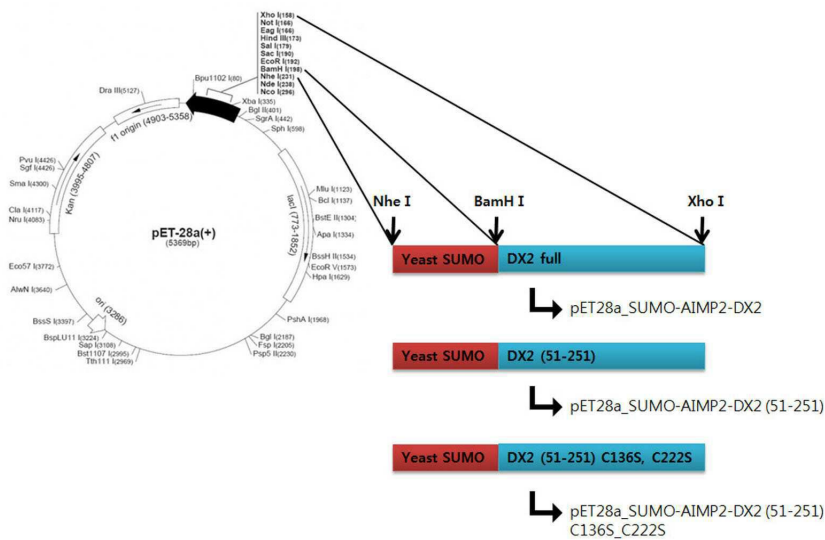
AAAGACATCGTGATCAACGCAACCCGGCCTCCCTCCCTC
TCCCTGCTTGTGCTGCACAGGCTGCTCTGTGAGCACTTCAGG
GTCCTGTCCACGGTGCACAGCACTCCTCGGTCAAGAGCGTG
CCTGAAACCTTCTCAAGTGCTTTGGAGAACAGATAAAAAA
CAGCCCCGCAAGACTATCAGCTGGGATCACTTTAATTGG
AAGAATGTGCCGAAGACGCAGATGAAATCAGCATCCAGAC
GATGAGCCCCATCGAAGGCGAAGGGAACATTGCACGTTTCTT
GTTCTCTCTGTTTGCCAGAACATAATGCTGCAACGCAACC
CTTATAGATAGCTGGGTAGATATTGCGATTTTTCAGTAAAAA
GGGAAGCAGTAAAGAAAAAGCCGCTGTTTCCGCTCCATGA
ACTCTGCTCTTGGAAGAGCCCTTGCTCGCTGGGAATGAAC
TCACCGTAGCAGACGTGGTGTGTGGTCTGTACTCCAGCAGAT
CGGAGGCGAGCAGTGTACAGTGCCAGCCAATGTGCAGAGGT
GGATGAGGTCTGTGAAAACCTGGCTCCTTTTAACACGGCCC
TCAAGCTCCTAAGTGA
    
```

AIMP2-DX2 (51-251) C136S_C222S 아미노산 서열

```

KDIVINANPASPLSLVLHRLCEHFRVLSTVHTHSSVKSVPEN
LLKCFGEQNKQPRQDYQLGFTLIWKNVPKQMKFSIQTMSP
EGEGNIARFLSLFGQKHNAVNATLIDSWVDIAIFQLKEGSSKE
KAAVFRSMNSALGKSPWLGNELTVADVVLWSVLQIQGSSSV
TVPANV QRWMRSCENLAPFNTALKLLK
    
```

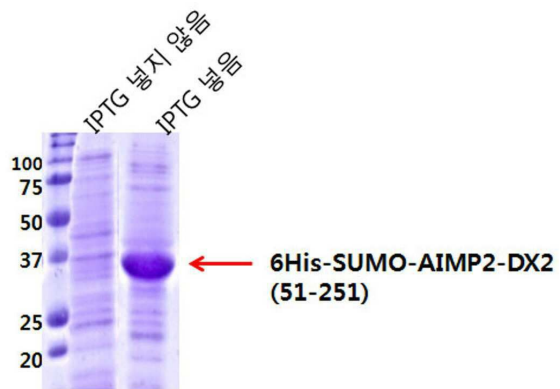
도면4



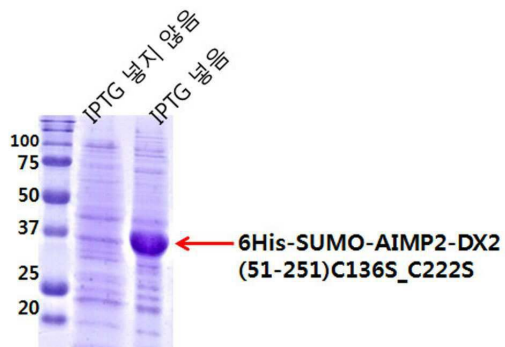
도면5



도면6



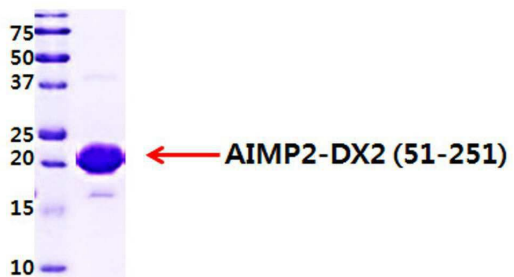
도면7



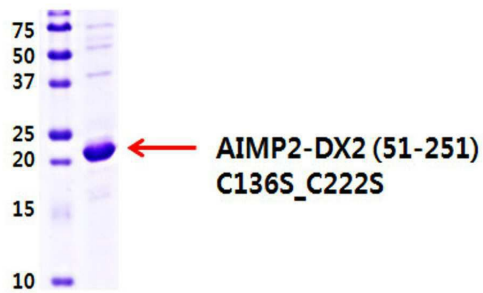
도면8



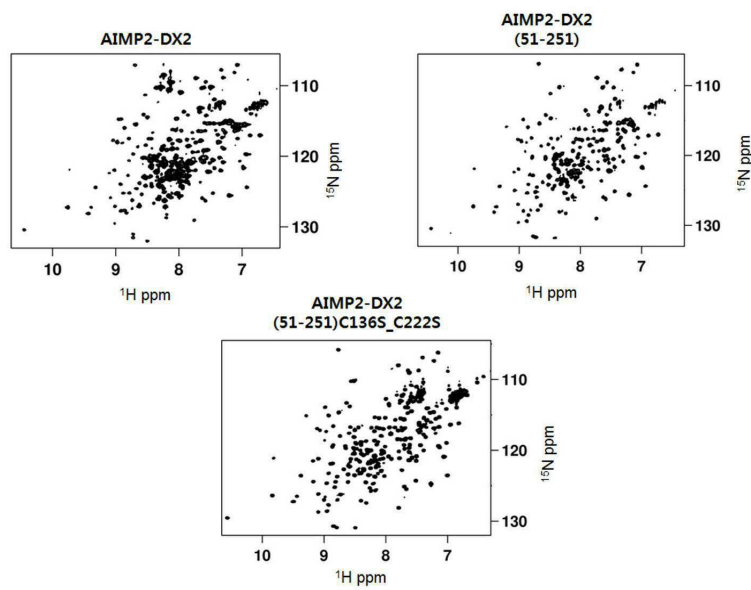
도면9



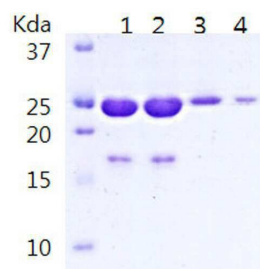
도면10



도면11

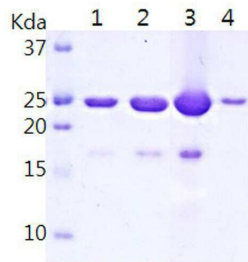


도면12



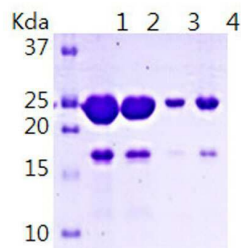
- 1 : pH 7.4 버퍼 조건에서 농축 후 sup
2 : pH 6.0 버퍼 조건에서 농축 후 sup
3 : pH 7.4 버퍼 조건에서 농축 후 ppt
4 : pH 6.0 버퍼 조건에서 농축 후 ppt

도면13



- 1 : pH 7.4 버퍼 조건에서 농축 후 얼린 뒤 다시 녹인 후 sup
 2 : pH 6.0 버퍼 조건에서 농축 후 얼린 뒤 다시 녹인 후 sup
 3 : pH 7.4 버퍼 조건에서 농축 후 얼린 뒤 다시 녹인 후 ppt
 4 : pH 6.0 버퍼 조건에서 농축 후 얼린 뒤 다시 녹인 후 ppt

도면14



- 1 : pH 6.0 버퍼 조건, 상온에서 48시간 후 sup
 2 : pH 7.4 버퍼 조건, 상온에서 48시간 후 sup
 3 : pH 6.0 버퍼 조건, 상온에서 48시간 후 ppt
 4 : pH 7.4 버퍼 조건, 상온에서 48시간 후 ppt

서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 Medicinal Bioconvergence Research Center
 <120> Method for the preparation of AIMP2-DX2 as a target for
 anti-cancer drug discovery
 <130> P16U13C0945_DP-2015-0325
 <150> KR 10-2015-0071834
 <151> 2015-05-22
 <160> 13
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 forward primer		
<400> 1		
cgcggatcca tgccgatgta ccaggtaaa		29
<210> 2		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> AIMP2-DX2 reverse primer		
<400> 2		
ccgctcgagt tacttaagga gcttgagggc		30
<210> 3		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> AIMP2-DX2 (51-251) forward primer		
<400> 3		
cgcggatcca aagacatcgt gatcaacgc		29
<210> 4		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> AIMP2-DX2 (51-251)C136S forward primer		
<400> 4		
atccagacga tgagcccat cgaaggc		27
<210> 5		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> AIMP2-DX2 (51-251)C136S reverse primer		
<400> 5		
gccttcgatg gggctcatcg tctggat		27
<210> 6		
<211> 29		

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S forward primer
 <400> 6
 agcagatcgg aggctgcagt gtgacagtg 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S reverse primer
 <400> 7
 cactgtcaca ctgcagcctc cgatctgct 29

<210> 8
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 polypeptide
 <400> 8
 Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15
 Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
 20 25 30
 Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly
 35 40 45
 Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu
 50 55 60
 Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu
 85 90 95
 Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr
 100 105 110

Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met
 115 120 125
 Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile
 130 135 140
 Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn
 145 150 155 160
 Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys

165 170 175
 Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser
 180 185 190
 Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala
 195 200 205
 Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val
 210 215 220
 Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu
 225 230 235 240

Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 245 250

<210> 9

<211> 756

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 polynucleotide

<400> 9

atgccgatgt accaggtaaa gccctatcac gggggcggcg cgctctccg tgtggagctt 60
 cccacctgca tgiaccggct cccaacgtg cacggcagga gctacggccc agcgccgggc 120
 gctggccacg tgcaggatta cggggcgctg aaagacatcg tgatcaacgc aaacccggcc 180
 tcccccccc tctccctgct tgtgtgtcac aggtgtctct gtgagcaatt cagggtcctg 240

tccacggtgc acacgcactc ctccgtcaag agcgtgcctg aaaaccttct caagtgttt 300
 ggagaacaga ataaaaaaca gccccgcaa gactatcagc tgggattcac tttaatttgg 360
 aagaatgtgc cgaagacgca gatgaaattc agcatccaga cgatgtgccc catcgaaggc 420
 gaagggaaca ttgcacgttt cttgttctct ctgtttggcc agaagcataa tgctgtcaac 480

gcaaccctta tagatagctg ggtagatatt gcgatttttc agttaaaga gggaagcagt 540
aaagaaaaag ccgctgtttt ccgctccatg aactctgctc ttgggaagag cccttggtc 600
gctgggaatg aactcaccgt agcagacgtg gtgctgtggt ctgtactcca gcagatcgga 660

ggctgcagtg tgacagtgcc agccaatgtg cagaggtgga tgaggtcttg tgaaaacctg 720
gctcctttta acacggccct caagtcctt aagtga 756

<210> 10

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 (51-251) polypeptide

<400> 10

Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu Ser Thr
20 25 30

Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu Leu Lys
35 40 45

Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr Gln Leu
50 55 60

Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met Lys Phe
65 70 75 80

Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile Ala Arg
85 90 95

Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn Ala Thr
100 105 110

Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys Glu Gly
115 120 125

Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser Ala Leu
130 135 140

Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala Asp Val
145 150 155 160

Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val Thr Val

165

170

175

Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu Ala Pro

180

185

190

Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys

195

200

<210> 11

<211> 606

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 (51-251) polynucleotide

<400> 11

aaagacatcg tgatcaacgc aaaccgggcc tcccctcccc tctccctgct tgtgtgtcac 60

aggctgctct gtgagcactt cagggtcctg tccacggtgc acacgcactc ctcggtcaag 120

agcgtgcctg aaaaccttct caagtgcctt ggagaacaga ataaaaaaca gccccgcaa 180

gactatcagc tgggattcac tttaatttgg aagaatgtgc cgaagacgca gatgaaattc 240

agcatccaga cgatgtgccc catcgaaggc gaagggaaca ttgcacgttt ctgtttctct 300

ctgtttggcc agaagcataa tgctgtcaac gcaaccctta tagatagctg ggtagatatt 360

gcgatttttc agttaaaga gggaagcagt aaagaaaag ccgctgtttt ccgctccatg 420

aactctgctc ttgggaagag cccctggctc gctgggaatg aactcacctg agcagacgtg 480

gtgtgtgtgt ctgtactcca gcagatcgga ggctgcagtg tgacagtgcc agccaatgtg 540

cagaggtgga tgaggtcttg tgaaaacctg gctcctttta acacggccct caagtcctt 600

aagtga 606

<210> 12

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S polypeptide

<400> 12

Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu Ser Leu

1

5

10

15

Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu Ser Thr

20

25

30

Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu Leu Lys

35 40 45
Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr Gln Leu
50 55 60
Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met Lys Phe
65 70 75 80
Ser Ile Gln Thr Met Ser Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile Ala Arg
85 90 95
Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn Ala Thr
100 105 110

Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys Glu Gly
115 120 125
Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser Ala Leu
130 135 140
Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala Asp Val
145 150 155 160
Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Ser Ser Val Thr Val
165 170 175
Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu Ala Pro

180 185 190
Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
195 200

<210> 13

<211> 606

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 (51-251)C136S_C222S polynucleotide

<400> 13

aaagacatcg tgatcaacgc aaaccgggcc tccctcccc tctccctgct tgtgctgcac 60
aggctgctct gtgagcactt cagggtcctg tccacggtgc acacgcactc ctcggtcaag 120
agcgtgcctg aaaaccttct caagtgcctt ggagaacaga ataaaaaaca gccccgccaa 180

gactatcagc tgggattcac ttttaatttg aagaatgtgc cgaagacgca gatgaaattc	240
agcatccaga cgatgagccc catcgaaggc gaagggaaca ttgcacgttt ctgtttctct	300
ctgtttggcc agaagcataa tgctgtcaac gcaaccctta tagatagctg ggtagatatt	360
gcgatttttc agttaaaga gggaagcagt aaagaaaag ccgctgtttt ccgctccatg	420
aactctgctc ttgggaagag cccttggtc gctgggaatg aactcacgt agcagacgtg	480
gtgctgtggt ctgtactcca gcagatcgga ggcagcagtg tgacagtgcc agccaatgtg	540
cagaggtgga tgaggtcttg tgaaaacctg gctcctttta acacggcct caagctcctt	600
 aagtga	 606