



등록특허 10-2714089



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월07일

(11) 등록번호 10-2714089

(24) 등록일자 2024년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8242 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0115754

(22) 출원일자 2021년08월31일

심사청구일자 2021년08월31일

(65) 공개번호 10-2023-0032679

(43) 공개일자 2023년03월07일

(56) 선행기술조사문헌

비특허문헌1(VIRUS RESEARCH)*

비특허문헌2(CELL)*

KR1020100031603 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

주식회사 바이오엠플

경상북도 포항시 남구 지곡로 394 (지곡동, 포항 테크노파크 내)

(72) 발명자

박정미

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

정수경

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

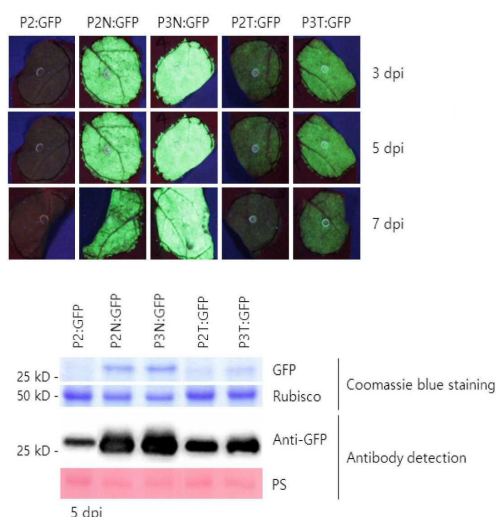
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 이종 바이러스의 RNA 침묵억제 단백질을 포함하는 Potato virus X 기반 재조합 식물 발현 벡터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 Potato virus X 유래 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 코딩 서열; TGBs (triple gene blocks) 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS (multiple cloning site) 및 CP (coat protein) 유전자의 C-말단 서열;을 포함하는 발현 카세트 1, 및 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 2를 포함하는, 식물체에서 목적 단백질의 발현을 증가시키는 재조합 식물 발현 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 2770/26043 (2013.01)

(72) 발명자

손은주

경상북도 포항시 남구 지곡로 394, 테크노빌 1001
호(지곡동, 포항테크노파크)

강항주

경상북도 포항시 북구 양학천로 73-17(죽도동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711134090

과제번호 KGM9942112

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국생명공학연구원

연구사업명 한국생명공학연구원연구운영비지원(R&D)

연구과제명 국가 재난형 바이러스 예방·치료 원천기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한국생명공학연구원

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Potato virus X 유래 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 코딩 서열; 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TGBs (triple gene blocks) 코딩 서열의 252번째부터 1,084번째 염기서열이 결손된 TGBs 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS (multiple cloning site) 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 CP (coat protein) 코딩 서열의 654번째부터 714번째 염기서열인 CP 유전자의 C-말단 서열;을 포함하는 발현 카세트 1, 및 상기 발현 카세트 1과 안티센스 방향으로 연결되며 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 2를 포함하는, 식물체에서 목적 단백질의 발현을 증가시키는 재조합 식물 발현 벡터로서,

상기 RNA 침묵억제 단백질은 서열번호 3의 염기서열로 암호화된 TSWV (Tomato spotted wilt virus) 유래 NSs(non-structural protein) 또는 서열번호 4의 염기서열로 암호화된 TCV (Turnip crinkle virus) 유래 CP인 것을 특징으로 하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 카세트 1은, 프로모터; Potato virus X 유래 RdRp 코딩 서열; 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TGBs 코딩 서열의 252번째부터 1,084번째 염기서열이 결손된 TGBs 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; CP 프로모터; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 CP 코딩 서열의 654번째부터 714번째 염기서열인 CP 유전자의 C-말단 서열; 및 터미네이터가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 발현 카세트 2는, 프로모터; 서열번호 3의 염기서열로 암호화된 TSWV 유래 NSs 또는 서열번호 4의 염기서열로 암호화된 TCV 유래 CP인 RNA 침묵억제 단백질 코딩 서열; 및 터미네이터가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 따른 재조합 식물 발현 벡터의 MCS에 목적 단백질 코딩 서열을 삽입하는 단계; 및

상기 목적 단백질 코딩 서열이 삽입된 재조합 식물 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는, 식물에서 목적 단백질을 생산하는 방법.

청구항 9

제1항의 재조합 식물 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는, 식물에서 목적 단백질을 생산을 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이중 바이러스의 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing)을 포함하는 Potato virus X 기반 재조합 식물 발현 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오리액터(bioreactor)로서의 식물은 상대적으로 단순하고 저렴하며 신속하게 물질을 대량생산할 수 있어 전통적인 발현 시스템에 대한 매력적인 대안을 제시한다. 또한 식물은 본질적으로 사람의 병원체가 없으므로 식물 시스템으로 생산한 단백질은 안전하다고 간주되며, 고등 진핵 생물인 식물은 복잡한 구조의 단백질도 생산할 수 있는 장점이 있다.

[0003] 식물 바이러스를 재조합 벡터로 사용하는 것은 바이러스가 식물체에서 외래 목적 단백질의 빠르고 높은 역가 생산을 유도하기 위해 작고 자율적으로 복제하는 계통을 이용하도록 특별히 진화되었기 때문이다. 최근에는 식물 바이러스 벡터의 2 세대로서, 비필수 바이러스 서열 예컨대, 캡시드 코딩 유전자가 제거된 해체된(deconstructed) 바이러스 벡터가 개발되었으며, 상기 시스템은 아그로박테리움에 의해 식물 숙주 내로 일시적으로 도입된다. 이러한 특징은 재조합 바이러스 확산과 관련된 바이오 안전성 우려를 완화시켰다.

[0004] Potato virus X (PVX)는 플러스 가닥 RNA 바이러스로, 비교적 크기가 큰 외부 유전자 (1 kb 이상)의 도입이 용이하고 안정적이어서, 식물에서 재조합 단백질 발현 벡터로 사용되고 있지만, 현재 식물 기반 biologics 연구에서는 PVX를 벡터로 거의 사용하지 않는다. 이는 PVX에 비해 외부 유전자의 발현율이 더 높고 바이러스의 병원성을 가지지 않는 새로운 해체된(deconstructed) 바이러스 벡터가 개발되었기 때문이다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2003-0004305호에는 '전사 후 유전자 사일런싱 (PTGS)의 억제제와 함께 발현시킴으로써 이식 유전자의 발현을 증가시키는 방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2018-0084680호에는 '식물 세포에서의 목적 단백질 발현을 위한 재조합 벡터'가 개시되어 있으나, 본 발명의 'RNA 침묵억제 단백질을 포함하는 Potato virus X 기반 재조합 식물 발현 벡터 및 이의 용도'에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 식물에서 외래 목적 단백질을 신속·대량으로 발현시킬 수 있는 Potato virus X (PVX) 기반의 신규한 발현 벡터를 개발하기 위해, PVX의 RNA 중합효소 기능은 유지시키고, 목적 단백질의 발현에 필요하지 않은(PVX 바이러스의 병원성과 관련된) 유전자들은 제거하였으며, 이중 바이러스 유래 RNA 침묵억제 단백질(heterologous viral suppressor of RNA silencing)을 도입하여 신규한 PVX 기반 재조합 식물 발현 벡터를 개발하였다. 그 후 상기 발현 벡터에 형광 단백질 서열을 삽입하여, 이중 바이러스 유래 RNA 침묵억제 단백질의 종류 및 벡터 내 발현 방향(orientation)을 달리하면서 원래의 PVX 벡터에 의한 형광 단백질 발현과 비교하여 월등히 높은 형광 발현을 보이는 신규한 PVX 기반 발현 벡터를 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Potato virus X 유래 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 코딩 서열; TGBs (triple gene blocks) 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS (multiple cloning site) 및 CP (coat protein) 유전자의 C-말단 서열;을 포함하는 발현 카세트 1, 및 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 2를 포함하는, 식물체에서 목적 단백질의 발현을 증가시키는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터의 MCS에 목적 단백질 코딩 서열을 삽입하는 단계; 및 상기 목적 단백질 코딩 서열이 삽입된 재조합 식물 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는, 식물에서 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 Potato virus X 유래 RdRp 코딩 서열; TGBs 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; CP 유전자의 C-말단 서열; 및 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 식물에서 목적 단백질 생산을 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 신규 재조합 벡터는 이종(異種) 바이러스 유래 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing)을 도입하지 않은 벡터와 비교하여 식물 세포 내에서 목적 단백질의 발현 수준이 현저히 향상되었으므로, 아그로박테리움 유도 일시적 발현법을 이용한 목적 단백질 생산에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 이종(異種) 바이러스 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing, VSR)을 포함하는 PVX 벡터 변형을 통해 개발한 신규의 PVX 재조합 발현 벡터의 모식도이다.

도 2는 도 1의 P1 및 P2의 발현을 P0과 비교하고, 다른 벡터에 클로닝되어 있는 이종 바이러스의 VSR (P19, TCV CP, NS)에 의해 이들 P1, P2의 GFP 발현이 더욱 증가하는지 확인한 실험이다. 이를 통해 PVX 자체 VSR인 TGBs와 CP를 없앤 P2 벡터에 이종 바이러스 유래 VSR을 공동 발현시키는 것이 가장 높은 목적 단백질 발현을 얻을 수 있는 조합임을 확인하였다.

도 3은 도 1의 P2에 이종 바이러스 유래 VSR (P19, NSs, TCV CP)을 도입하여, 단일 벡터에서 이들이 발현되게 한 후 GFP 발현 수준을 형광 이미지와 겔 염색 사진으로 확인한 결과이다. 이로부터 도2에서는 GFP의 높은 발현을 유도한 P19가 P2 벡터 내에 도입되어 발현할 때에는 GFP 발현을 오히려 억제하는 것을 볼 수 있었다. TCV CP를 P2에 도입한 P2T는 P2보다는 높은 발현을 가지지만, 도2의 결과와 비교하면 TCV CP가 별도의 독립적인 벡터에 있는 경우보다는 낮은 GFP 발현을 보여 주었다. NSs가 도입된 P2N의 경우는 도2의 조건보다 높은 GFP 발현을 유도하였다.

도 4는 이종 바이러스 유래 VSR의 P2 벡터 내 발현 방향을 PVX RdRp 발현 방향과 반대로 하여 GFP의 발현 변화를 분석한 것으로 NSs와 TCV CP의 발현 방향이 반대 방향인 P3N 및 P3T 벡터에서의 GFP의 발현이 P2N 및 P2T 벡터에서의 GFP 발현보다 더 높은 것을 알 수 있다.

도 5는 본 발명에서 제작한 P3N에서 항원을 발현하는 벡터 모식도 및 일시적 발현 시험 결과로, 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 확인한 것이다. 이로부터 P3N 벡터에서 발현하는 항원이 높은 효율로 발현되는 것을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Potato virus X 유래 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 코딩 서열; TGBs (triple gene blocks) 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS (multiple cloning site) 및 CP (coat protein) 유전자의 C-말단 서열;을 포함하는 발현 카세트 1, 및 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 2를 포함하는, 식물체에서 목적 단백질의 발현을 증가시키는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[0013] 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에 있어서, 상기 발현 카세트 1은, 프로모터; Potato virus X 유래 RdRp 코딩 서열; TGBs 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; CP 프로모터; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS; CP 유전자의 C-말단 서열; 및 터미네이터가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에 있어서, 상기 TGB 기능상실 돌연변이체는 TGB 암호화 서열 중 일부 염기가 결손되어, 정상적인 TGB의 기능을 상실한 돌연변이체를 의미한다.

[0015] 본 발명에서 "발현 카세트(expression cassette)"란 식물체 내에서 아그로박테리움을 이용하여 일시적으로 발현시키고자 하는 목적 단백질의 발현을 가능하게 하기 위한 DNA 세트를 말하며, 하기의 세 가지 주요한 요소를 포함한다: i) 프로모터; ii) 상기 프로모터에 작동가능하게 연결되고 상기 발현 카세트가 식물체 내로 도입되는 경우 상기 프로모터에 의해 그 전사가 지시되는 것인 "코딩 폴리뉴클레오티드(coding polynucleotide)", 또는 "코딩 서열(coding sequence)(코딩 유전자라고도 함)"로 지칭될 수 있는 폴리뉴클레오티드; 및 iii) 전사의 종료를 지시하고 상기 폴리뉴클레오티드의 바로 하류에 위치하는 종결자(terminator) 폴리뉴클레오티드(전사종결인자라고도 함).

- [0016] 용어 "프로모터(promoter)"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 상류(upstream)의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소(RNA Polymerase)가 결합한다. 본 발명에 따른 상기 발현 카세트 1의 프로모터는 형질 전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화 과정에서 활성이 있는 프로모터이다. 일시적 발현을 통해 식물체에서 항상 발현이 이루어질 수 있도록 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 TGBs 기능상실 돌연변이체 코딩 서열은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TGBs 암호화 서열의 252 번째부터 1,084번째 염기서열이 결손된 서열이며, CP 유전자의 C-말단 서열은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 CP 코딩 서열의 654번째부터 714번째 염기서열인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 또한, 상기 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(Nopaline synthase; NOS) 터미네이터, 베타-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseolin) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토판인 신타아제(Octopine synthase) 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.
- [0019] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 즉, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터에 의해 그 발현이 조절될 수 있도록 연결될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에 있어서, 상기 MCS는 다양한 제한효소에 의해 인식되고 절단되는 부위인 제한 부위(restriction site)를 갖는 DNA 단편을 의미하고, 상기 MCS는 특정 제한효소에 의해 인지되어 절단되므로 절단된 MCS의 부위에 목적 단백질을 코딩 서열의 삽입을 가능하게 한다. 상기 MCS는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 공지된 MCS라면 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 MCS는 당업계에서 일반적으로 이용할 수 있는 제한효소 자리를 추가하는 것이 가능하다. 본 발명의 발현 카세트 1의 MCS에 목적 단백질을 코딩 서열을 삽입하고자 할 때, 식물 바이러스 유전자에 존재하지 않는 제한효소 자리를 이용할 수 있다. 식물 바이러스 유전자는 각기 서열이 서로 상이하므로 식물 바이러스에 따라 이용하는 MCS 내의 제한효소 자리가 달라질 수 있는 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에 있어서, 상기 발현 카세트 2는 프로모터; RNA 침묵억제 단백질 코딩 서열; 및 터미네이터가 작동가능하게 연결된 것일 수 있고, 발현 카세트 2의 프로모터 및 터미네이터는 전술한 것과 같다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 식물 발현 벡터에 있어서, 상기 RNA 침묵억제 단백질은 TSWV (Tomato spotted wilt virus) 유래 NSs (non-structural proteins) 또는 TCV (Turnip crinkle virus) 유래 CP일 수 있고, TSWV 유래 NSs는 서열번호 3의 염기서열로 암호화된 것일 수 있으며, TCV 유래 CP는 서열번호 4의 염기서열로 암호화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또한, 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터에 있어서, 상기 발현 카세트 2는 발현 카세트 1과 센스 또는 안티센스 방향(orientation)으로 연결될 수 있다.
- [0024] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터는 '재조합 바이러스 벡터'로, 바이러스를 이루고 있는 구성 요소의 해체와 재조합 과정을 통해 기존 바이러스 벡터와는 다르게 바뀌는 과정을 지칭하는 것이다. 재조합 바이러스 벡터는 기존의 벡터의 구성 요소를 통해서 발현되지 않는 단백질을 또는 유전자 단편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다.
- [0025] 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin) 또는 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에

한정되는 것은 아니다.

- [0026] 본 발명은 또한, 상기 재조합 식물 발현 벡터의 MCS에 목적 단백질 코딩 서열을 삽입하는 단계; 및 상기 목적 단백질 코딩 서열이 삽입된 재조합 식물 발현 벡터를 식물세포에 도입하는 단계;를 포함하는, 식물에서 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 식물에서 목적 단백질을 생산하는 방법은, 목적 단백질 코딩 서열이 삽입된 재조합 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움을 이용하여 식물에 감염시켜 일시적 발현을 통해 목적 단백질을 생산하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 재조합 식물 발현 벡터는 Potato virus X 유래 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 코딩 서열; TGBs (triple gene blocks) 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; 목적 단백질 코딩 서열 삽입을 위한 MCS (multiple cloning site) 및 CP (coat protein) 유전자의 C-말단 서열;을 포함하는 발현 카세트 1, 및 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 2를 포함하는 재조합 벡터로, 상세한 설명은 전술한 것과 같다.
- [0029] 본 발명에 있어서, MCS에 삽입될 수 있는 목적 단백질은 의료, 연구용 및 산업용 단백질, 예를 들어, 효소, 항원, 항체, 세포 수용체, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 종류의 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 재조합 벡터를 식물 숙주세포 내로 도입하는 방법은 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 및 아그로박테리움-매개 일시적 발현법(Bevan M., Nucleic Acids Res. 12:8711-8721(1984); Sainsbury F., Lomonosoff G.P., Plant Physiology, 148:1212-1218(2008)) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 소포자, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체, 짝 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 식물은 담배, 애기장대, 감자, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 무, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있고, 바람직하게는 담배일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명은 또한, Potato virus X 유래 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 코딩 서열; TGBs (triple gene blocks) 기능상실 돌연변이체 코딩 서열; CP (coat protein) 유전자의 C-말단 서열; 및 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 식물에서 목적 단백질 생산을 위한 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물은 목적 단백질의 발현 수준을 증가시킬 수 있는 RNA 침묵억제 단백질(viral suppressor of RNA silencing) 코딩 서열을 구성 요소로 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하고 있어, 상기 재조합 벡터 내에 목적 단백질을 클로닝하여 식물세포에 형질전환하면, 식물에서 목적 단백질을 대량으로 생산할 수 있게 된다.
- [0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] **재료 및 방법**
- [0038] **1. 일시적 발현(transient expression) 프로토콜**
- [0039] 파종 후 4주(±3일)령의 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물체를 사용하였으며, 16시간 명/8시간 암의 광주기 및 23±2℃의 온도 조건에서 성장시켰다.

[0040] 일시적 발현에 사용될 아그로박테리움 GV3101 균주를 28℃에서 180~220 rpm의 교반 속도로 하루 동안 LB broth에서 배양하였다. 그 후 배양액을 8분 동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 세포 펠렛을 회수하였다. 아그로박테리움 세포를 인필트레이션 버퍼(infiltration buffer: 10 mM MES (pH 5.6), 10 mM MgCl₂, 200 μM acetosyringone)에 현탁시킨 후 상온에서 3시간 배양하여 세포를 활성화시켰다. 그 후, 세포 현탁액의 농도를 OD₆₀₀에서 0.4로 조정하였다. 바늘이 없는 일회용 주사기를 사용하여 담배 잎에 아그로박테리움을 접종하였다. 박테리아를 접종한 후 식물체를 배양실로 바로 옮기지 않고, ≤20℃의 온도에서 반나절 동안 유지한 후 배양실로 옮겼다. 아그로박테리움 접종 3일, 5일, 7일 후 UVP MultiDoc-It에서 UV 램프를 사용하여 GFP 형광을 확인한 뒤 샘플링을 진행하였다. 서로 다른 담배 식물체에서 잎 디스크(직경 1cm)를 3장씩 튜브에 샘플링하였다. 샘플링한 튜브는 액체질소에 바로 넣어 잎을 얼리고, 초저온냉동고에 잎 샘플을 보관하였다.

[0042] 2. 웨스턴 블랏(Western blot)

[0043] 초저온냉동고에 보관된 샘플들을 액체질소로 옮겨 준비하고 샘플이 녹지 않게 pestle을 이용하여 담배 잎 디스크 3장을 튜브 안에서 분쇄하였다. NP-40 lysis 버퍼를 100~150 μl 넣어준 후 pestle motor (Kontes™)를 이용하여 잎 시료를 완전히 분쇄하였다.

표 1

[0044] NP-40 lysis buffer 조성

성분	농도
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0.5 mM
NP-40	0.5 %
Protease inhibitor cocktail (11836153001 Roche)	1 tablet per 10 ml

[0045] 그 후, 30분 동안 얼음에서 반응시키고, 4℃, 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액만 분리하였다. 분리한 상층액은 5X Sample buffer와 혼합한 후 100℃에서 5~10분간 끓여 변성시킨 뒤 얼음에서 식혔다.

표 2

[0046] 5X Sample buffer 조성

성분	농도
Tris-HCl (pH 6.8)	60 mM
Glycerol	25 %
SDS	2 %
2-mercaptoethanol	14.4 mM
Bromophenol blue	0.1 %

[0047] 20~30 μg의 단백질을 12% SDS PAGE 겔에 로딩한 후 65~120V로 2~3시간 전기영동을 진행하였다. 단백질 전이(transfer)를 위해 PVDF 멤브레인을 5분간 메탄올에 담귀 활성화시킨 후 Wet transfer 방법으로 200 mA에서 2시간 동안 단백질 전이를 수행하였다. Ponceau S 시약으로 멤브레인을 염색하여 단백질의 전이 여부를 확인하였다. 그 후, PBS-T 버퍼로 멤브레인의 염색을 완전히 제거하였다. 블로킹 버퍼(7% skim milk in PBS-T)에 멤브레인을 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 멤브레인을 PBS-T로 세척시킨 후 GFP 항체 (sc-9996, Santa Cruz)를 1:1,000 또는 1:2,000 농도로 처리 후 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 반응 후 멤브레인을 PBS-T로 10분간 세척하는 과정을 3회 반복하고, Goat anti-mouse HRP (ab6789, Abcam) 항체를 1:10,000으로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 멤브레인을 PBS-T로 10분간 세척하는 과정을 3회 반복하고 ECL (P65406271, Amersham ECL Prime) 시약을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

[0049] 실시예 1. 목적 단백질 고발현을 위한 PVX 기반 식물 발현 벡터 제작

[0050] 1-1. PVX의 내부 요소 제거

[0051] 본 발명에 사용된 original PVX 벡터는 NovoPro사의 V005901 제품과 동일하다. PVX와 이중 바이러스의 RNA 침

목 억제 단백질(VSR) 조합으로 새로운 바이러스 벡터를 개발하기 위해, 먼저 PVX 바이러스 요소 단백질 중 외부 단백질 발현에 관여하지 않은 것으로 알려진 외피 단백질(CP) 코딩 유전자, 그리고 다른 바이러스에 비해 상대적으로 VSR 기능이 약한 것으로 알려진 PVX의 TGBs (triple gene blocks) 단백질 코딩 유전자를 결손시킨 벡터를 제조하였다. 상기 CP 유전자 결손은 CP 코딩 서열(서열번호 2)의 1번째부터 653번째 염기서열을 결손을 의미하고, TGBs 결손은 TGBs 코딩 서열(서열번호 1)의 252번째부터 1,084번째 염기서열을 결손시킨 형태를 의미한다. 각각의 벡터를 제조한 뒤, 마커 단백질 GFP 코딩 유전자를 삽입하고, GFP의 발현 변화를 형광과 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

[0053]

1-1-1) P1: PVX CP 결손

[0054]

Original PVX 벡터의 MCS (multiple cloning site)에 있는 SalI (G[▼]TCGA[▲]C, cat.# R3138, NEB)과 CP에 있는 XhoI (C[▼]TCGA[▲]G, cat.# R0146, NEB) 제한효소 사이트를 이용하여 CP의 1~653번째 염기서열을 절단시킨 후 T4 DNA Ligase (M0202, NEB)로 절단면을 붙여 P1 벡터를 제작하였다. 분해하고 재조합함으로써 CP 유전자의 653개의 염기가 결손되었고 남은 61개의 염기서열은 단백질로 번역되지 못하는 비암호화 서열로 존재한다.

[0056]

1-1-2) P2: PVX CP, TGB 결손

[0057]

Original PVX 벡터의 CP에 있는 XhoI과 TGB에 있는 BstZ17I (GTA:TAC, cat.# R3594, NEB) 제한효소 사이트를 이용하여 TGB의 253-833번째 염기서열을 절단시킨 후 PCR을 통해 합성한 CP 프로모터 및 MCS를 인-퓨전 클로닝 (In-Fusion[®] HD Cloning Kit, TaKaRa)으로 절단한 벡터와 합쳐 P2 벡터를 제작하였다. 인-퓨전 클로닝을 통해 TGB 코딩 서열에서 남은 267nt의 서열은 TGB로써 기능하지 못한다.

[0059]

그 결과, P0 (original PVX 벡터)에 비해 P1(CP를 결손시킨 PVX 벡터)에서 GFP 발현이 증가된 것을 관찰할 수 있었다(도 2A). CP와 TGBs를 모두 결손시킨 PVX 벡터(P2)의 경우 P0보다 GFP 발현 수준이 크게 감소되었음이 확인되었다.

[0061]

1-2. 이중 바이러스 VSR 유전자 도입

[0062]

본 발명자는 상기 P0, P1 또는 P2 벡터와 35S 프로모터에 의해 발현 조절되는 이중 바이러스 유래 VSRs를 포함하는 벡터를 각각 포함하는 아그로박테리움 균주를 1:1 비율로 혼합하여 담배 잎에 접종한 후 GFP의 발현 수준을 관찰하였다. 상기 이중 바이러스 유래 VSRs는 다음과 같다: TBSV (Tomato bushy stunt virus) 유래 P19, TSWV (Tomato spotted wilt virus) 유래 NSs 또는 TCV (Turnip crinkle virus) 유래 CP.

[0063]

그 결과, 도 2B에 개시된 바와 같이 각각의 VSRs를 포함하는 벡터와 혼합 접종한 실험구가 PVX 벡터 단독 접종 실험구(P0, P1 및 P2) 대비 GFP의 발현이 증가된 것을 확인하였다(도 2B).

[0064]

상기 결과에 기반하여, 본 발명자는 이중 바이러스 유래 VSRs를 P2 벡터 내로 도입한 새로운 컨스트럭트를 구축하고(도 1의 P2N 및 P2T), GFP 발현 수준을 분석하였다. 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이, TSWV NSs 또는 TCV CP를 P2에 각각 도입한 벡터(각각 P2N, P2T) 실험구에서 GFP 형광이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 특히, TSWV NSs를 도입한 P2N 벡터는 VSR를 포함하는 개별 벡터와 P2 벡터의 혼합 처리 조건과 유사하게 높은 GFP 발현이 확인되었고, TCV CP를 도입한 P2T 벡터는 VSR 벡터와 P2 벡터의 혼합 처리 조건보다 낮은 형광을 보여주었다. 그러나, TBSV 유래 P19를 P2에 도입한 컨스트럭트, P2P19의 경우 GFP 발현이 크게 감소하는 반대의 결과를 얻었다(도 3). 이는 어떤 이중 바이러스의 VSR이 도입되는지에 따라 PVX 기반 단백질 발현이 크게 달라진다는 것을 보여준다.

[0066]

1-3. TSWV NSs와 TCV CP의 벡터 내 전사 방향 변경

[0067]

본 발명자는 도입된 VSRs의 전사 방향을 새로운 PVX 벡터(P2)의 진행 방향과 역으로 되도록 클로닝하고 GFP 발현 증대 효과를 검토하였다. 그 결과, PVX 벡터의 전사 진행 방향과 역으로 TSWV NSs 또는 TCV CP가 클로닝된 경우(각각 P3N, P3T)에 동일한 방향으로 클로닝된 경우(P2N, P2T) 보다 GFP 발현이 현저히 증진되었음이 관찰되었다(도 4).

[0069]

실시에 2. 목적 단백질 발현을 통하여 개발된 벡터의 식물체 내 단백질 발현 검증

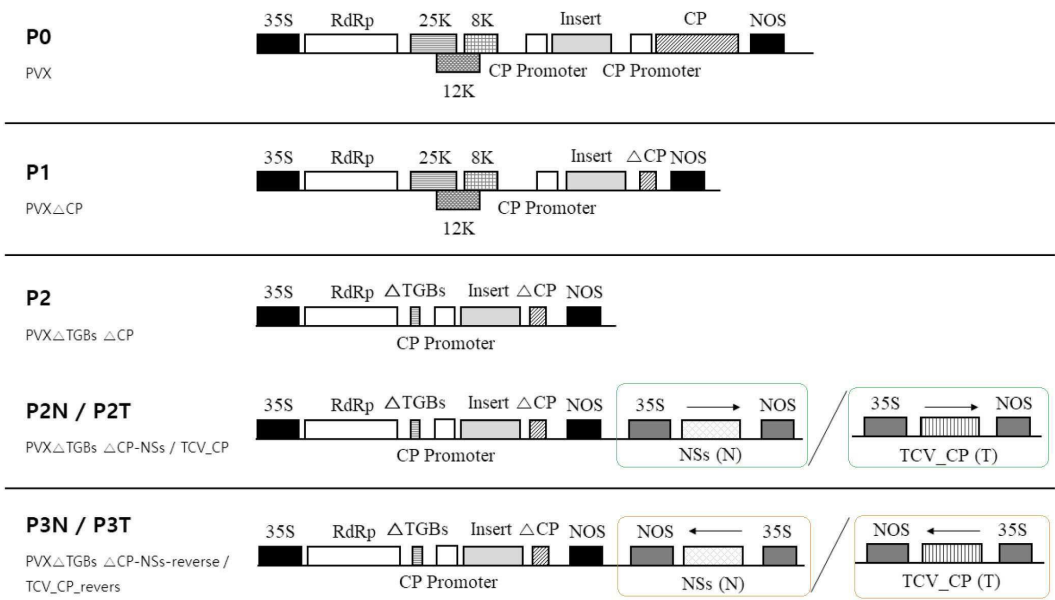
[0070]

간흡충증(clonorchiasis)는 중국, 한국, 베트남과 같은 아시아 국가에서 흔한 풍토병으로, 이 지역에서 약 3,500만 명이 간흡충(*Clonorchis sinensis*)에 감염되어 있다고 알려져 있다. 간흡충의 감염여부를 현장에서 간편하게 확인하기 위해 신속진단키트 개발이 요구되고 있어 이를 위해 간흡충 융합항원 유전자(이하 Ag)를 P3N

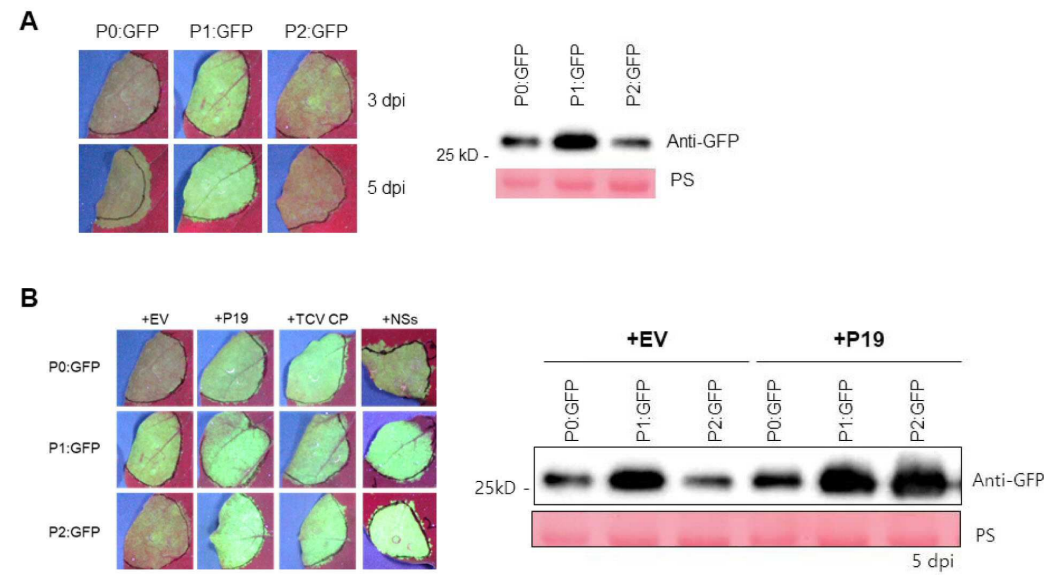
벡터에 도입하고 식물체에서 웨스턴 블랏을 통해 발현을 확인하였다(도 5).

도면

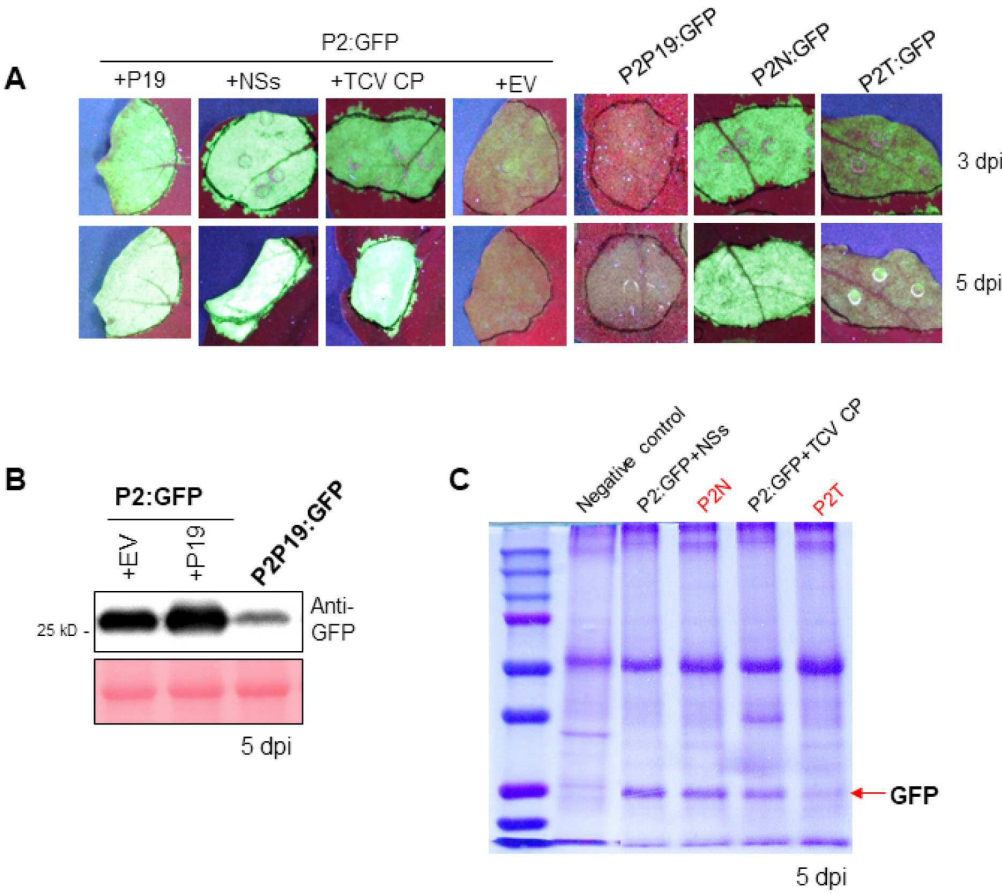
도면1



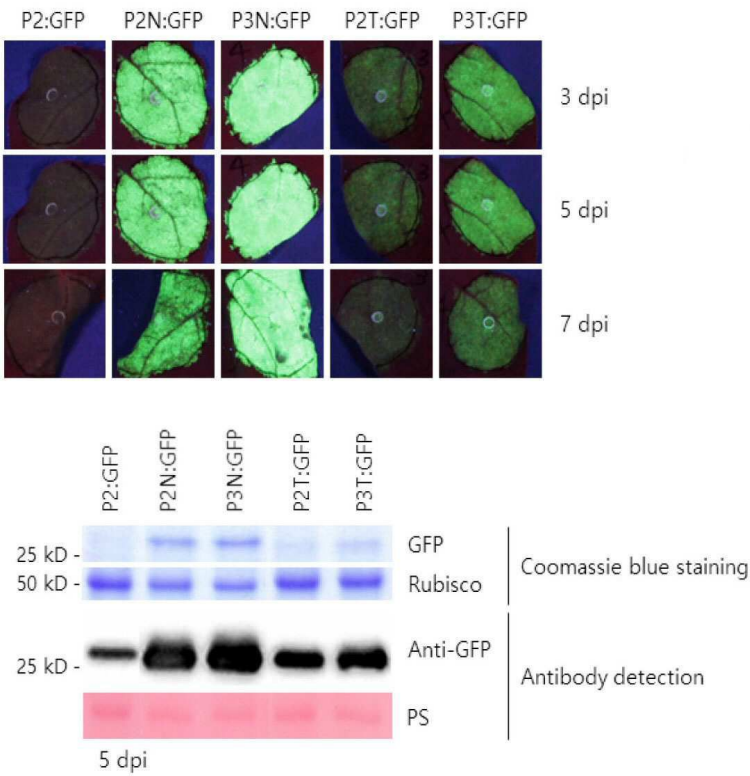
도면2



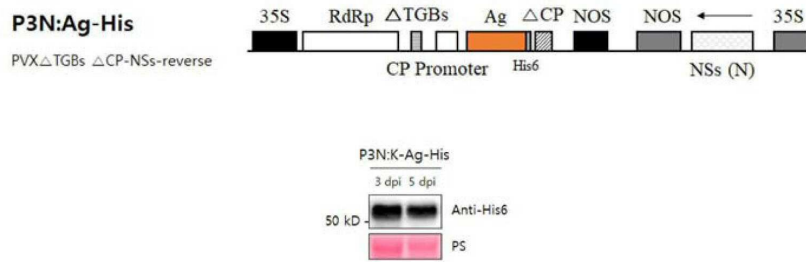
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
BioApplications Inc.
- <120> Potato virus X-based recombinant plant expression vector
containing heterologous viral suppressor of RNA silencing and
uses thereof
- <130> PN21184
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1100
- <212> DNA
- <213> Potato virus x
- <400> 1

```

atgatattc tcatcagtag ttgaaaagt ttaggttatt ctaggacttc caaatcttta      60
gattcaggac ctttggtagt acatgcagta gccggagccg gtaagtccac agccctaagg    120

aagttgatcc tcagacaccc aacattcacc gtgcatacac tcggtgtccc tgacaaggtg    180
agtatcagaa ctagaggcat acagaagcca ggacctattc ctgagggcaa cttcgcaatc    240
ctcgatgagt atactttgga caacaccaca aggaactcta accaggcact ttttgctgac    300
ccttatcagg caccggagtt tagcctagag cccacttct acttggaac atcatttcga     360
gttccgagga aagtggcaga ttgatagct ggctgtggct tcgatttcga gaccaactca    420
ccggaagaag ggcacttaga gatcactggc atattcaaag ggcccctact cggaaaggtg    480
atagccattg atgaggagtc tgagacaaca ctgtccaggc atggtgttga gtttgtaag     540

ccctgccaag tgacgggact tgagttcaaa gtagtcacta ttgtgtctgc cgcaccaata    600

```

gaggaaattg gccagtccac agctttctac aacgctatca ccaggtcaaa gggattgaca	660
tatgtccgcg caggccata ggctgaccgc tccggtcaat tctgaaaaag tgtacatagt	720
attaggtcta tcatttgctt tagtttcaat tacctttctg ctttctagaa atagcttacc	780
ccacgtcggg gacaacattc acagcttgcc acacggagga gcttacagag acggcaccaa	840
agcaatcttg tacaactccc caaatctagg gtcacgagtg agtctacaca acggaaagaa	900
cgcagcattt gctgccgttt tgctactgac tttgctgac tatggaagta aatacatatc	960
tcaacgcaat catacttggtg cttgtggtaa caatcatagc agtcattagc acttccttag	1020
tgaggactga accttggtgc atcaagatta ctggggaatc aatcacagtg ttggcttgca	1080
aactagatgc agaaccata	1100
<210> 2	
<211> 714	
<212> DNA	
<213> Potato virus x	
<400> 2	
atgtcagcac cagctagcac aacacagccc atagggtcaa ctacctcaac taccacaaaa	60
actgcaggcg caactcctgc cacagcttca ggctgttca ccatcccga tggggatttc	120
tttagtacag cccgtgccat agtagccagc aatgctgtcg caacaaatga ggacctcagc	180
aagattgagg ctatttgga ggacatgaag gtgccacag acactatggc acaggctgct	240
tgggacttag tcagacactg tgctgatgta ggatcatccg ctcaaacaga aatgatagat	300
acaggtcctt attccaacgg catcagcaga gctagactgg cagcagcaat taaagagggtg	360
tgcacactta ggcaattttg catgaagtat gctccagtgg tatggaactg gatgttaact	420
aacaacagtc cacctgctaa ctggcaagca caaggtttca agcctgagca caaatcgtc	480
gcattcgact tcttcaatgg agtcaccaac ccagctgcca tcatgcccac agaggggctc	540
atccggccac cgtctgaagc tgaaatgaat gctgcccaaa ctgctgcctt tgtgaagatt	600
acaaaggcca gggcacaatc caacgacttt gccagcctag atgcagctgt cactcgaggt	660
cgtatcactg gaacaacaac cgctgaggct gttgtcactc taccaccacc ataa	714
<210> 3	
<211> 1380	
<212> DNA	
<213> Tomato spotted wilt virus	
<400> 3	
atgagcaccg ccaagatgag cgctgggtgag ttctctaaga cctacggcac caaggatagc	60

cggctctgtga atgattgcta cgccatctac agcggcaacg gcatcaactt catcaacctg	120
ttcattgcaca ccaacaccgg catcaagagc gcctttctcta ttaacgacct tggccggaac	180
gaggacatta agcttcatga ggccgagatc atcaacagct tgcacccgta ctcattcttc	240
gacaagtctg gcctggatat catcctgtgc aaccacgtga tggacatcat cgtgactaag	300
cctggcctta agaacaccgg atgcaagttc cagatgcaca accagatctt caacccgaat	360
gaggatattc tggctaagac ccctggcatc atcagcgaag agaacttcta cgacctgagc	420
aagatcaagc ctaagggcac gacacctttc gactgggtaca tcaacgagtg caagaagtac	480
gactttctaca tcagcgacaa ggccgacatc tctctggatt acggtttccc tgtgatgggc	540
aagaccacct cttattggag agagaacatc ccgcgagaga agatcatctc cgttaagcag	600
aagtgcctgc cgaacacctc tgctcttacc aacaggattc tgagcctttc taccgtgagg	660
gctatccaga ttgctttctga gctggcttct gaaaagaccg tggttcttgc ttctaggcag	720
aggctggatc tggacatcaa gtctcagtac cggatctcat tccctgggtg tcaagatgag	780
ggcgctttca ctaggacttt ctgcatccct atggacaaga ccgctaggat cgtttgcttc	840
tacgctaaga cctccgtgga cgtgtcaaat gagaggacca ccttgacat caagatcgtc	900
aacaagaccg tcgagagcaa ctacatgggt cctgtgccta aggatcacat gtactcgat	960
aagagcatcg gcgctaggat tggctttgtg gatattgtga gggcgaccc gaactacaat	1020
cagatgattg ctcgggaaat gatcagcgtc cacaccaact ttgctctgag gctttctgag	1080
gctctgaaga agccggatcat cgttttcaag atgtacgaga aagagctgaa cttcgagact	1140
tacgacctgt ccggtcggtc tttgtcttac cagaaggaca gcagcggcaa tatctacttc	1200
ctgtctagga ccttgagat cctgccgaag tctctttcta cctgaccta cctgaagaac	1260
atctctctg cctgctgaa agaattcatc agcatgcagc atttctacat cggggagcaa	1320
gaagaggac cttctggttc taatctggcc gactctgaag agaaggtgca gactgcttag	1380
	1380
<210> 4	
<211> 1056	
<212> DNA	
<213> Turnip crinkle virus	
<400> 4	
atggaaaatg atcctagagt ccggaagttc gcatctgatg gcgccaatg ggcgataaag	60
tggcagaaga agggctggtc aacctaaccc agcagacaga aacagaccgc ccgcgacgcg	120
atggggatca agctctctcc tgtggcgcaa cctgtgcaga aagtgactcg actgagtgt	180

ccggtggccc ttgcctaccg cgaggttacc acccagcctc gggctctctac tgccagggac	240
ggcataacca gaagcgggtc tgaactgac acaaccttga agaagaacac tgacactgaa	300
cctaagtaca ccacagctgt gcttaacca agcgaaccg gaacattcaa ccagtcatt	360
aaggaggcgg ccagtatga aaaataccga ttcacgtcac tcagatttag gtactcccc	420
atgagccctt caaccaccgg aggcaagggt gctctggcat tcgatcgaga tgccgcaaaa	480
cctccgccc aagacctgc ttcctctac aacatagagg gttgtgtatc tagcgtgccc	540
tggacagggt ttattttgac cgtcccaaca gattctactg accgctttgt ggcggtggt	600
atcagcgatc caaagcttgt cgatttcggc aagtcacatc tggccaccta cggccaagga	660
gccaatgatg ccgcccact cggtgaagtg cgagtcgagt acaccgtgca gctcaagaac	720
agaactggct caaccagcga cgcccagatt ggggacttcg cagggtgtaa ggacggaccc	780
aggctggttt catggtccaa gaccaagggg acagctgggt gggagcacga ttgtcatttt	840
ctcggaaccg gaaacttctc gttgacattg ttctacgaga aggcgccggt ctcggggcta	900
gaaaacgcag acgctctga cttctcggtc ctgggagaag ccgcagcagg tagtgtccaa	960
tgggcaggag tgaaggtagc agaaagggga caaggcgtga aaatggtcac aactgaggag	1020
cagccaaagg gtaaattggca agcactcaga atttag	1056