(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12P 19/34
C12N 5/10

(45) 공고일자 1999년12월15일
(11) 등록번호 10-0234840
(24) 등록일자 1999년09월20일

(21) 출원번호	10-1993-0702155	(65) 공개번호	특1994-0700538
(22) 출원일자	1993년07월16일	(43) 공개일자	1994년02월22일
번역문제출일자	1993년07월19일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 92/00277	(87) 국제공개번호	WO 92/13089
(86) 국제출원일자	1992년01월16일	(87) 국제공개일자	1992년08월06일
(81) 지정국	EA 유라시아특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 그리스 모나코 핀랜드 국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 미국		
(30) 우선권주장	642,330 1991년01월17일 미국(US)		

(73) 특허권자 더 제너럴 하스피톨 코포레이션 데이비드 제이. 글라스
미합중국 메사추세츠 02114 보스톤 푸루이트 스트리트더 프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지 조이스 브린톤
미합중국, 메사츄세츠 02138, 캠브리지, 퀸시 스트리트 17
(72) 발명자 하스로프,제임스
미합중국, 매사츄세츠 02139, 캠브리지, 마플 에비뉴 26
굳만,하워드,엠
미합중국, 매사츄세츠 02159, 뉴톤, 더레지스로드 10
페리몬,노버트
미합중국, 매사츄세츠 02146, 브룩클린, 리젠트써클 76
브랜드,안드레아
미합중국, 매사츄세츠 02139, 캠브리지, 마플 에비뉴 26
(74) 대리인 나영환, 조태연

심사관 : 이처영

(54) 트랜스-스플라이싱 리보자임을 이용한 세포절제

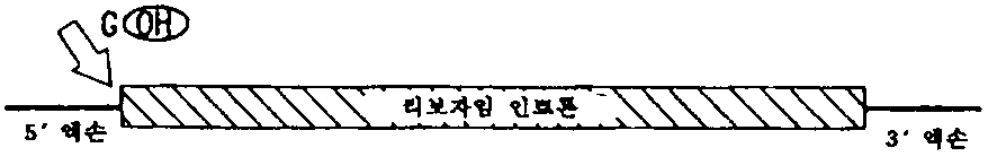
요약

그룹 I 인트론의 촉매 중심에 근거한, 트랜스-접속을 자가-촉매할 수 있는 신규의 리보자임의 고안이 기술되어 있다. 이 고안을 이용하면, 매우 정확한 방식으로 새로운 3'엑손 서열을 임의의 선택된 표적 RNA 서열속으로 효과적으로 접속할 수 있는 리보자임을 제조하는 것이 가능하다. 본 발명의 신규의 트랜스-접속 리보자임을 이용하여, 표적화되고 조절되는 방식으로 생체내에서 숙주 세포에 독성 산물을 제공하는 세포 절제 방법이 또한 기술되어 있다. 불활성 프로-리보자임형이 또한 기술되어 있다.

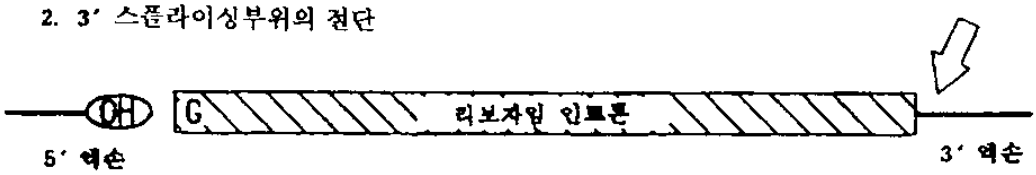
대표도

그룹 I 인트론의 셀프-스플라이싱

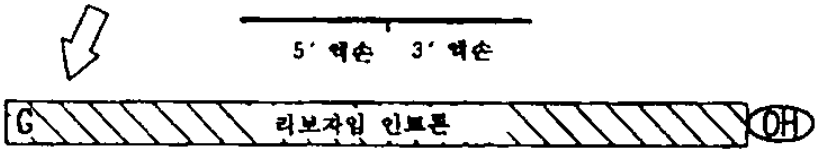
1. 5' 스플라이싱부위의 구아노신-매개 절단



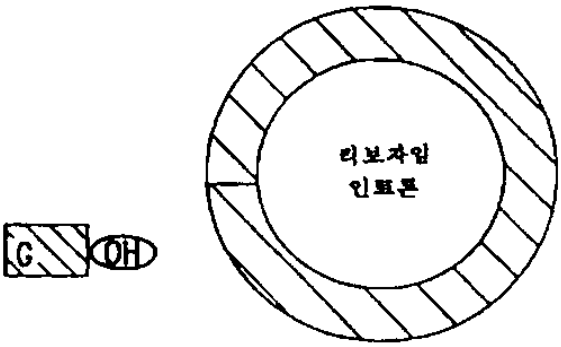
2. 3' 스플라이싱부위의 절단



3. 엑손 분절의 연결



4. 인트론의 환형화



명세서

[발명의 명칭]

트랜스-스플라이싱(Trans-splicing) 리보자임을 이용한 세포절제

[발명의 배경]

본 발명은 신규의 트랜스-스플라이싱 리보자임과 이 리보자임을 이용한 세포절제 방법에 관한 것이다.

[종래 기술의 간단한 설명]

I. 그룹 I 인트론

촉매활성을 보유하는 RNA 분자는 리보자임(ribozyme) 또는 RNA 효소로 명명되고 있다[참조: Cech, T.R., Ann. Rev. Biochem. 59 : 543-568(1990)]. 테트라하이메나 서모필라(Tetrahymena thermophila) 전구체 rRNA는 그 자신의 삭제반응을 촉매할 수 있는 인트론(리보자임)을 포함한다. 이 리보자임(ribozyme)은 구

조적으로 관련된 그룹 I 인트론 부류중 하나이다.

변형된 테트라하이메나 서모필라 인트론의 스플라이싱 활성은 구아노신 보조 인자와 2가 양이온(Mg^{2+} 또는 Mn^{2+})의 존재를 필요로 하며, 2 단계 에스테르 교환반응(제1도)을 통해 일어난다. 1 단계로 유리 구아노신이 리보자임에 결합하고, 구아노신의 3' 히드록실기는 리보자임의 5' 스플라이싱부위(splice site)상의 인 원자를 공격하는 위치에 있게 된다. 구아노신이 인트론 서열에 공유결합하면 5' 엑손은 유리된다. 2 단계로, 3' 스플라이싱부위에 위치한 포스포디에스테르 결합은 새로 유리된 5' 엑손의 3' 히드록실기의 공격을 받게되고, 그 결과 결찰된 엑손 서열이 생성된다. 그후, 삭제된 인트론은, 그 자신의 3' 히드록실기와 내부서열이 관련된 일련의 에스테르 교환반응을 거쳐 짧은 환형을 형성한다.

이러한 연속적인 반응은 화학적으로 유사하며, 하나의 활성 부위에서 일어난다. 셀프-스플라이싱 반응은 상이한 RNA 쇄를 매우 보존된 인트론 주위에서 유사한 형태를 형성하도록 연결시킴으로써 선택적인 RNA 구조를 형성하는 것을 특징으로 한다. 이러한 스플라이싱은 상보성 서열("내부 가이드 서열"또는 IGS)을 통해 인트론-엑손 연결부의 배열이 필요하다.

5' 스플라이싱 부위에서의 제1 절단은 IGS와 상기 스플라이싱 부위 인접서열 사이의 염기쌍 나선 P1의 형성을 필요로 한다. 상기 나선내의 U : G "우블(wobble)"염기쌍이 존재하면 포스포디에스테르 결합이 형성되어 리보자임의 촉매반응하에 절단되게 된다. 이 결합의 절단후, P1 나선의 일부가 대체되어 새로운 나선 P10이 형성되는데, 이는 3'스플라이싱 부위 인접 서열과 IGS 사이의 상보성에 의해 형성된다. 불변의 구아노신 잔기가, 대체되는 P1 서열 부위와 유사한, 3'스플라이싱 부위의 포스포디에스테르 결합을 선행한다. 따라서, 엑손의 결찰은 새로운 엑손 서열 대신 인트론 서열이 관련되었던 제1 절단 방응의 역으로 일어난다. 또한 엑손 결찰에 이어지는 인트론 고리화 반응 역시 IGS를 가로지르는 5' 서열의 염기쌍 형성, 및 인트론의 말단 구아닌 잔기의 3' 히드록실기에 의해 중재되는 공격을 포함한다[참조: Been, M,D 등,"내부 주형-유사 서열의 다중 배열이 요구되는 그룹 I IVS RNA에서의 고리화 부위 선별" Cell 50:951 (1987)].

II. 촉매 활성

그룹 I 인트론의 구조 및 촉매 특성을 더 자세히 규정하기 위하여, 엑손 서열을 T. 서모필라 인트론의 "코어 (core)"로부터 제거했다. WO 88/04300 호(Cech, T.R등)에서는 테트라하이메나 인트론 리보자임이 보유한 3가지 이상의 촉매활성을 기술하고 있다; (1) RNA의 3' 말단 인산염을 서열-특이성 방법으로 제거할 수 있는 탈인산화 반응 촉매 활성, (2) 올리고리보뉴클레오티드를 폴리리보뉴클레오티드로 전환시키는 반응을 촉매할 수 있는 RNA 폴리머라제 활성(뉴클레오티딜 트랜스퍼라제), 및 (3) 서열-특이적 엔도뉴클레아제 활성.

분리된 리보자임 활성은 기질 RNA와 트랜스로(in trans) 상호 작용할 수 있으며, 이러한 상호작용은 특징적이다. 예를들어, 끝이 잘린(truncated) 형태의 인트론을 5' 스플라이싱 연결부에 상응하는 서열과 함께 항온처리하면, 스플라이싱의 제1 단계와 유사하게 구아노신-의존성 절단이 진행된다. 상기 기질과 엔도리보뉴클레아제성 인트론 RNA가 염기쌍을 형성하여 나선 P1을 형성하고, 4-6번째 위치에서 U:G 염기쌍이 형성된후 절단이 진행된다. 계통발생적 비교와 돌연변이 분석결과, 나선 P1의 염기쌍이 유지되는한, 5' 스플라이싱 부위에서 보존된 우라실잔기 바로 옆 서열의 특징은 촉매 작용에서 중요하지 않음을 확인하였다[참조 : Doudna, J.A.외 다수, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7402-7406(1989)].

3' 스플라이싱 부위 선택에 필요한 서열은 나선 P9.0 및 3' 인트론 경계를 이루는 구아노신 잔기를 비롯한 인트론 자체 구조내에 주로 위치하는 것으로 보인다. 그러나, 돌연변이 분석으로 나타난 바와같이, 3' 엑손내의 인접(flanking)서열이 나선 P10의 형성 및 효과적인 스플라이싱에 필요하다[참조: Suh, E.R 등, Mol, Cell, Biol. 10:2960-2965(1990)]. 추가로, 올리고뉴클레오티드는 끝이 잘린 형태의 인트론, "외부의"가이드 서열 및 5' 구아노신 잔기에 의해 연장된 올리고뉴클레오티드를 사용하여, 트랜스 상태로 결찰시켰다. 3' 엑손 서열에 해당하는 기질 올리고뉴클레오티드는 외부 주형상에 P10-유사 나선을 형성함으로써 일렬로 배치하고, 그후 결찰시켰다[참조:Doudna, J.A 등, Nature 339:519-552(1989)].

리보자임의 절단 활성은, 불연속 "하이브리드화" 부위를 상기 리보자임에 유전공학적으로 삽입함으로써 특정 RNA에 표적화할 수 있다. 상기 하이브리드화 부위는 원하는 RNA와 특이적으로 하이브리드할 수 있다. 예를들면, EP 321, 201호(제라크, W.L. 등)에서는 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함하는 리보자임을 작제하였다. 이러한 상보성 서열의 길이가 증가하면 표적에 대한 이 서열의 친화도도 증가한다. 그러나, 상기 리보자임의 하이브리드 부위 및 절단 부위는 서로 필수 부분이었다. 일단 상보성 부위를 통해 표적 RNA에 하이브리드 되면, 리보자임의 촉매 부위는 표적을 절단했다. 이는 이종 숙주의 RNA를 생성하는 것을 특징으로 하는 인체질환의 치료의 경우처럼, 생체내(in vivo)에서 표적 RNA를 불활성화시키거나 절단하는데 상기 리보자임이 유용함을 제시한다. 그러나, 리보자임-지시성 트랜스-스플라이싱(트랜스-절단과 반대됨)은 제시되지 않았으며 기재된 바도 없었다.

각종의 자연발생-리보자임의 엔도리보뉴클레아제 활성(절단 활성)은 광범위하게 연구되어 왔다. 상기 리보자임의 구조 및 서열에 대한 분석은 절단 부위 주변의 특정 뉴클레오티드가 고도로 보존된 반면, 인접 서열은 그렇게 보존되지 않음을 제시하고 있다. 이러한 정보는 자연상태에서 확인되지 않은 신규의 엔도리보뉴클레아제 활성의 고안으로 이끌었다. 예를들어, Cech등은 기질 서열 특이성이 변경된 신규한 리보자임을 작제했다[참조: Cech, T.R 등, W088/04300호; Koizumi, M. 등, FEBS Lett. 228: 228-230(1988); Koizumi, M. 등, FEBS Lett. 239: 285-288(1988); Haseloff, J. 등, Nature 334: 585-591(1987): 및 Heus, H.A 등, Nucl. Acids Res. 18: 1103-1108 1990)]. 자기-절단 식물 비로이드(viroid) 및 위성 RNA에 대한 초기의 연구[참조: Buzayan, J. M 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8859-8862 (1986)]결과, 높은 서열 특이성으로 트랜스 상태로 다른 RNA 분자를 절단할 수 있는 리보자임 구성을 위한 기준이 개발되었다[참조: Haseloff, J. 등, Nature 334:585-591 (1988)]. 그러나, 이러한 구조물은 표적화된 트랜스-스플라이싱 반응을 효율적으로 촉진할 수 없다.

별도의 RNA들 상에 포함된 엑손의 연결, 즉 트랜스-스플라이싱은 자연에서 snRNP-매개 및 자기-촉진된 그룹 I 및 그룹 II 인트론 둘다의 경우 일어난다. 트리파노좀(trypanosome) 및 세노하디티스 엘레칸스

mRNA에 있어서, 공통의 5'리더 서열들이 별도의 유전자로부터 전사되고, mRNA의 3' 부분에 스플라이싱된다[참조: Agabian, N. Cell 61:1157-1160 (1990); Hirsh, D. 등, Mol. Biol. Rep. 14:115 (1990)]. 이러한 작은 사이즈의 "스플라이스드 리더" RNA(slRNA)는 포유류 snRNP-스플라이싱 추출물중 U1 snRNA를 기능적으로 대신할 수 있는 서열에 융합된 5' 엑손으로 구성되어 있다.

또한, 그룹 I 및 그룹 II의 셀프-스플라이싱 인트론 둘다 인공 시스템에 있어서 트랜스 상태로 엑손을 결찰시킬 수 있다[참조: Been, M.D. 등, Cell 47:207-216(1986); Galloway-Salvo J.L. 등, J. Mol. Biol. 211:537-549 (1990); Jacquier, A. 등, Science 234:1099-1194 (1986); 및 Jarrell, K.A. 등, Mol. Cell Biol. 8:2361-2366 (1988)]. 트랜스-스플라이싱은 생체내에서 엽록체의 분리 유전자중 그룹 II 인트론에 대해서 일어난다[참조: Kohchi, T. 등, Nucl. Acids. Res. 16:10025-10036 (1988)]. 그리고 이, 콜리의 인공적인 분리 유전자 중 그룹 I에 대해서도 나타났다[참조: Galloway-Salvo J.L. 등, J.L. 등, J. Mol. Biol. 211:537-549 (1990)]. 이 경우, 그룹 I 인트론을 포함하는 박테리오파지 T4 티미딜레이트 합성효소 유전자(td)는 인트론 나선 P6a에 연결된 루우프에서 분리되었다. td 유전자 분절의 전사체는 생체외(in vitro)에서 트랜스-스플라이싱이 진행되며, 기능장애성 이.콜리 숙주세포를 구제하는 것으로 밝혀졌다. 공지된 염기쌍(P3, P6 및 P6a) 및 인트론 분절 사이의 가능한 3차 상호작용에 의해 유전자 반쪽들이 정확하게 조합되고 프로세싱된다.

생체외에서, 테트라하이메나 리보자임은 단일가닥 모델의 올리고리보뉴클레오티드 기질의 트랜스-스플라이싱 반응을 촉매할 수 있다. 이때 4가지 성분이 필요하다: 리보자임, 3' 단일가닥 RNA, 5' 엑손 및 GTP. 내부 가이드(guide) 서열에서 시작되어 U_{409}에서 종결되는 짧은 형태의 테트라하이메나 리보자임(L-21 Scal IVS RNA)이 상기 셀프-스플라이싱 반응에 사용되어 왔다[참조: Flanegan, J.B. 등, J.Cell. Biochem. (Supp.) 12 part D:28(1988)]. 5' 스플라이싱 부위에 GTP로 공격하면, 5' 엑손이 유리되고, 3' 스플라이싱 부위에서의 에스테르 교환반응으로 리보자임에 의해 3' 엑손에 결찰된다.

생체내에서 특정 RNA를 표적화하고 분해하기 위해 안티센스 RNA를 사용하는 것에 대한 대안으로서 리보자임을 사용하는 것이 제안되었다[참조: Gerlach, W.L. 등, EP 321,201 호; Cotten, M. Trends Biotechnol. 8:174-178 (1990); Cotten, M. 등, EMBO J. 8:3861-3866 (1989); Sarver, N. 등, Science 247:1222-1225 (1990)]. 예를 들어, HIV-1 감염 과정중 발현된 RNA에 대한 엔도뉴클레아제 촉매 활성을 보유하는 리보자임의 발현이 인체 면역결핍성 바이러스 1형(HIV-1) 감염에 대한 가능한 치료법으로서 제안되었다[참조: Sarver, N. 등, Science 247:1222-1225 (1990); Cooper, M. CDC AIDS Weekly, 4월 3일자, 2페이지 (1989); Rossi, J. J. Abstract of Grant No. 1R01AI29329 in Dialog's Federal Research in Progress File 265]. 그러나, 이러한 시도는 성공하지 못했다.

HIV-1 감염을 치료하기 위한 치료제로서 리보자임의 사용가능성에 대한 연구에서, 해머헤드(hammerhead) 모티브의 리보자임[참조: Hutchins, C.J. 등, Nucl. Acids Res. 14 ; 3627 (1986); Keese, P. 등, in Viroids and Viroid-Like Pathogens, J.S. Semancik, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, pp 1-47]을 HIV-1 gag 전사체에 표적화하였다. 인체 세포 배양물에서 gag-표적화된 리보자임의 발현결과 HIV-1 gag RNA의 농도 및 항원 p24 농도가 감소(완전히 소실된 것은 아님)되었다[참조: Sarver, N. 외 다수, Science 247:1222-1225 (1990)]. 따라서, Sarver의 리보자임의 의학적 유효성은 효율이 낮아 제한될 수밖에 없는데, 그 이유는 제거되어야 하는 임의의 병원성 RNA가 숙주에 잔존하기 때문이다.

생체내에서 리보자임을 사용함에 따른 또다른 문제점은, 핵 추출물에 있어서 리보자임 억제 작용을 하기 위해서는 기질에 대한 리보자임의 높은 비가 요구되며, 이러한 높은 비를 수득하는 것이 어려운 과제였다. Cotton 등은 강력한 tRNA 프로모터(폴리머라제 III 프로모터)에 작용적으로 연결된 리보자임-생성 유전자를 함유하는 발현 카세트를, 이 리보자임에 대한 절단 서열을 포함하는 기질 RNA와 함께 개구리 난모세포에 미량 주입함으로써 기질에 대한 리보자임의 높은 비를 수득했다[참조: Cotton, M. 등, EMBO J. 8:3861-3866 (1989)]. 그러나, 미량주입은 다세포 유기체에서의 적합한 전달 방법이 아니다.

이.콜리 β-갈락토시다제를 암호화하는 mRNA에 대한 리보자임이 생체내 활성이 보고되었다[참조: Chuat, J.C. 등, Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 1025-1029 (1989)]. 그러나, 이러한 활성은 리보자임과 표적이 동일 분자로 박테리아 세포로 형질감염되는 경우에만 관찰되었다. 리보자임 활성은 박테리아의 β-갈락토시다제 유전자의 표적부분을 보유한 F 에피좀(episome)으로부터 전사된 mRNA에 대하여 표적화되는 경우 불충분했다.

따라서, 현재 통용되는 리보자임 활성의 기술적 적용은 표적 RNA의 활성을 파괴하는데 리보자임의 절단 활성을 이용하는 것으로 한정된다. 유감스럽게도, 이러한 적용은 종종 모든 표적 RNA 분자의 완전한 분해와, 효율성 보장을 위한 상대적으로 높은 리보자임 : 기질비를 요구하며 이것은 이루기 어렵다. 가장 중요한 점은 종래 기술의 변형된 리보자임은 효율적인 지시성 트랜스-스플라이싱을 실시할 수 없다는 점이다.

따라서, 고효율적의 리보자임과 리보자임 발현 시스템의 개발이 요구되어 왔다. 특히, 공지 기술은 신규한 RNA 서열을 숙주 RNA 내로 트랜스-스플라이싱함으로써 기존의 RNA의 암호서열을 변경하거나 분해하는 효과적인 수단을 제시하지 못하고 있다.

[본 발명의 개요]

신규한 리보자임의 구성 가능성을 인지하고, 생체내에서 고등 진핵세포의 유전적 특징을 변경시키는 극히 효과적인 방법의 필요성에 부응하여, 본원 발명자들은 생체내에서 원상태 RNA's의 유전 정보를 변경시키는데 리보자임의 사용을 조사했다. 그 결과 매우 효과적인 트랜스-스플라이싱 리보자임 및 그것을 유전공학적으로 작제하는 기준을 개발하게 되었다.

본 발명에 의해, 먼저 트랜스-스플라이싱 리보자임을 암호화하는 RNA 또는 DNA 분자가 제공되며, 이 리보자임은 신규한 3' 엑손 서열을, 생체외 또는 생체내에서 매우 정확한 방식으로, 임의의 선택된 표적 RNA 서열에 효율적으로 스플라이싱시킬 수 있으며, 상기 분자들은 임의의 선택된 표적 RNA 또는 3' 엑손 서열을 수용할 수 있는 능력 및 상기 리보자임의 특이성을 향상시키는 상보적 서열을 추가하는 면에서 신

규하다.

또한, 본 발명에 의해, 리보자임을 함호화하는 RNA 또는 DNA 분자가 제공되며, 이 리보자임의 서열은 융합 RNA로서, 상기 융합 RNA는 표적 RNA에 하이브리드하는 상기 리보자임을 충분히 표적화할 수 있는 제1 RNA 서열과, 표적 RNA로 전위될 수 있는 제2 RNA 서열을 제공하는데, 이 제2 서열은 표적화된 RNA 서열에 이종인 RNA 서열을 암호화한다.

본 발명에 따라, 리보자임을 암호화하는 RNA 또는 DNA 분자가 추가로 제공되는 데, 상기 리보자임을 위한 서열은 상기한 바와 같은 융합 RNA이고, 그 융합 RNA에 의해 제공되는 제1 RNA 서열은 상기 RNA 분자가 GAL4 RNA와 혼성화하도록 표적화하는 서열이며, 융합 RNA의 제2 RNA 서열은 디프테리아 독소(DTA)의 A쇄의 암호 서열을 제공한다.

또한, 본 발명에 의해, 입체 배위가 파손된 본 발명의 리보자임(프로-리보자임)을 암호화하는 RNA 또는 DNA 분자가 제공되며, 이 프로-리보자임은 기질에 의해 활성화되는 것으로, 표적 RNA와의 특이적인 상호작용에 의해 반응될때까지 자기-절단이나 트랜스-스플라이싱 활성을 거의 또는 전혀 갖지 않는다.

본 발명에 의해, 리보자임 또는 프로-리보자임 발현 카세트를 포함하는 RNA 또는 DNA 분자가 추가로 제공되는데, 상기 카세트는 숙주내에 안정하게 유지될 수 있거나 숙주의 게놈으로 삽입될 수 있다. 또한, 상기 카세트는 본 발명의 리보자임이나 프로-리보자임 서열에 작동적으로 연결되어, 상기 숙주내에서 작용할 수 있는 프로모터 서열을 제공한다.

본 발명에 따라, 리보자임 또는 프로-리보자임 발현 카세트를 함유하는 RNA 또는 DNA 분자가 추가로 제공되는데, 그러한 카세트는 숙주의 게놈 속으로 안정하게 삽입될 수 있고, 그러한 리보자임 발현 카세트는 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임의 작동적으로 연결된 GAL4-반응성 프로모터의 서열을 제공한다.

본 발명에 의해, 생체외에서의 트랜스-스플라이싱 방법이 추가로 제공되는데, 이 방법은 이하 (1) 내지 (3)의 단계를 포함한다.

(1) 생체외에서 본 발명의 리보자임이나 프로-리보자임 및 그에 대한 적합한 기질을 제공하는 단계.

(2) 상기 리보자임이나 프로-리보자임의 소정의 촉매활성을 촉진하는 반응조건(생체외)을 추가로 제공하는 단계 ; 및

(3) 상기 조건하에 상기 리보자임 또는 프로-리보자임과 상기 기질을 반응시키는 단계.

본 발명에 의해, 하기 (1) 내지 (4)의 단계를 포함하는, 생체내 트랜스-스플라이싱 방법이 제공된다 :

(1) 숙주세포에 본 발명의 RNA 또는 DNA 분자를 제공하는 단계.

(2) 상기 숙주세포 내에서 상기 분자에 의해 암호화되는 리보자임 또는 프로-리보자임을 발현시키는 단계.

(3) 상기 숙주세포 내에서 상기 리보자임 또는 프로-리보자임의 기질을 발현시키는 단계.

(4) 상기 숙주세포 내에서 상기 리보자임 또는 프로-리보자임과 상기 기질을 반응시키는 단계.

본 발명에 의해, 하기 (1) 내지 (3)의 단계를 포함하는, 표적 RNA의 활성을 불활성화시키는 방법이 추가로 제공된다 :

(1) 상기 표적 RNA에 대해 촉매적으로 활성인 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 제공하는 단계.

(2) 상기 표적 RNA를 제공하는 단계 ; 및

(3) 상기 리보자임 또는 프로-리보자임의 상기 표적 RNA에 대한 촉매 활성을 발현하는 조건을 제공하는 단계.

또한, 본 발명에 의해, 하기 (1) 내지 (3)의 단계를 포함하는, 생체내에서 숙주세포에 소정의 유전자 서열을 제공하는 방법을 제공한다 :

(1) 상기 숙주세포에서 표적 RNA에 대해 촉매활성이 있는 리보자임이나 프로-리보자임을 상기 소정의 숙주 세포에 제공하는 단계.

(2) 상기 소정의 유전자 서열을 암호화하는 리보자임이나 프로-리보자임을 제공하는 단계 ; 및

(3) 상기 리보자임이나 프로-리보자임이 상기 소정의 유전자 서열을 표적 RNA의 서열내로 트랜스-스플라이싱시킬 수 있는 조건을 제공하는 단계.

본 발명에 따라, 다세포 식물 및 동물의 세포 절제(ablation) 방법이 추가로 제공되는데, 이 방법은 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 임의의 숙주세포에, 특히 수정된 숙주 배세포속으로 제공하는 것을 포함하며, 상기 리보자임 또는 프로-리보자임은 상기 숙주 세포에 독성인 유전자 서열을 암호화하고, 상기 리보자임 또는 프로-리보자임은 상기 숙주 세포에 원하는 표적으로 트랜스-스플라이싱할 수 있다.

본 발명에 따라, 농경학적으로 중요한 식물종에 있어서 웅성 또는 자성불임을 유전공학적으로 생성시키는 방법이 추가로 제공되는데, 이 방법은 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 사용하여 수정에 필요한 임의의 세포를 절제하는 것을 포함한다.

본 발명에 의해, 식물 병원체에 대해 식물을 면역시키는 방법이 제공되는데, 이 방법은 본 발명의 식물 병원체-특이성 융합 리보자임을 발현시킬 수 있는 유전자전이(transgenic) 식물의 작제 단계를 포함하며, 상기 리보자임은 상기 병원체를 파괴하거나 억제할 수 있다.

본 발명에 의해, 형질전환된 병원체-내성의 미생물이 추가로 제공되는데, 이 미생물은 소정의 병원체에

내성을 지니고, 상기 병원체에 의해 발현되는 핵산 분자를 표적화하는 촉매활성을 제공하는 본 발명의 리보자임으로 형질전환된다.

본 발명에 의해, 소정의 숙주에 소정의 리보자임 활성을 전달할 수 있는 바이러스 병원체가 추가로 제공되는데, 상기 리보자임의 활성은 본 발명의 리보자임에 의해 전달된다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 그룹 I 인트론을 스플라이싱시키는 리보자임의 메카니즘을 나타낸 개요도이다.

제2a도는 테트라하이메나 서모필라 rRNA 인트론; (B) 본 발명의 표적 mRNA 및 트랜스-스플라이싱 리보자임의 구조 개요도이다.

제3도는 CAT-LacZ a-펩타이드 트랜스-스플라이싱 리보자임 구성의 개요도이고 ; 제3b도는 CAT-LacZ 리보자임의 완전한 DNA 서열이다.

제4도는 오이 모자이크 바이러스(CMV) RNA 4 트랜스-스플라이싱 리보자임의 서열을 나타낸 것이다. A: 바이러스 RNA 표적 서열; B: 올리고뉴클레오티드 표적 서열; C: CMV RNA 4-디프테리아 독소 A-쇄 트랜스-스플라이싱 리보자임.

제5도는 오이 모자이크 바이러스 ¾ 서열의 비교를 나타낸 것이다.

제6a도는 GAL4-DTA 트랜스-스플라이싱 리보자임의 다이아그램이며, 제6b도는 이소로이신 치환을 갖는 Ga14-DTA 리보자임의 완전한 암호서열을 나타낸 것이다.

제7도는 Ga14 단백질의 발현을 위한 P-요소 매개 "인핸서(enhancer)-포착"방법의 다이아그램이다.

제8도는 야생형 DTA 및 DTA 3'엑손 돌연변이체의 부분서열을 나타낸다.

제9도는 pGaTB 및 pGaTN의 지도이다.

제10도는 pUAST의 지도이다.

제11도는 Ga14-DTA 트랜스-스플라이싱 리보자임을 발현시키는 초파리 배의 표피제제이다.

제12도는 "프로-리보자임"구성에 대한 이론적 근거를 제시한다. 화살표시는 리보자임 절단 부위를 나타내며, "안티센스"부위는 검게 표시했으며, 촉매 도메인은 진한 음영으로, 3'"엑손"서열은 밝은 음영으로 표시했다. 표적 mRNA가 없는 상태에서, 트랜스-스플라이싱 리보자임이 일시적으로 염기쌍을 이루며, 이종성서열(그 자신의 서열 포함)과 반응할 수도 있다. 추가로, "3' 엑손" 연결부가 절단된다. 비활성 "프로-리보자임"은 별도의 자기-상보성 서열을 포함하여 리보자임의 촉매성 중심부가 잘못 겹쳐지도록 형성된다. 활성 리보자임은 정해진 표적 mRNA와 염기쌍을 이루어, 간섭성 2차 구조가 치환된 이후에만 형성된다.

제13도는 CAT-LacZ 트랜스-스플라이싱 리보자임의 서열과 예상 2차 구조를 나타낸다. 리보자임 "코어" 서열은 음영으로 표시했다〔참조: Cech, Gene 73:259-271(1988)〕. 나선 P8은 "안티센스" 부위에 대한 상보성 서열(밝은 활자로 표시)의 13 및 18 뉴클레오티드를 각각 보유하는 비변형 리보자임 및 프로-리보자임 1 및 2를 나타내고 있다.

제14도는 (1) 나선 P8과 3' "엑손" 서열을 보유하는 "안티센스" 리보자임 도메인을 갖는, 도식적으로 나타낸 활성 CAT-LacZ 리보자임을 나타내며; (2) (a) 변형된 나선 P8과 "안티센스" 부위 서열 사이에 염기쌍을 보유하는 비활성 CAT-LacZ 프로-리보자임 2를 나타내며; 및 (b) CAT mRNA와의 염기쌍 형성, 나선 P8-"안티-센스"쌍의 치환 및 나선 P8의 재형성을 이룬후, 활성 프로-리보자임을 나타낸 것이다.

제15도는 CAT-LacZ 프로-리보자임 전사체의 안정성을 나타낸 것이다. CAT-LacZ 리보자임과 프로-리보자임 서열을 함유한 플라스미드를 EcoRI으로 절단하고, T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제와 [32-P] UTP를 사용하여 전사 시켰다. 방사능-표지된 전사체를 7M 우레아 및 25% 포름아미드내의 5% 폴리아크릴아미드겔 전기 영동으로 분별하고 자동방사능 촬영을 했다. 상기 리보자임 전사체는 주로 "3' 엑손" 연결부에서 광범위하게 가수분해가 진행되었다. 프로-리보자임 형태는 훨씬 반응성이 적었다.

제16도는 CAT-LacZ 프로-리보자임의 엔도리보뉴클레아제 활성을 나타낸 것이다. CAT-LacZ 리보자임과 프로-리보자임 서열을 함유한 플라스미드를 ScaI으로 절단하고 T7 또는 SP6 RNA 폴리머라제로 전사시켰다. 이 전사체를 37℃, 45℃ 및 50℃에서, 40 mM Tris-HCl(pH 7.5) 6 mM $MgCl_2$, 2 mM 스퍼미딘, 10 mM NaCl, 2 mM GTP 내에서 방사능-표지된 CAT RNA와 함께 30' 동안 항온처리하고, PuvII로 절단한 플라스미드로부터 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 전사시켰다. 생성물을 7 M 우레아와 25% 포름아미드내에서 5% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분별하고 자동방사능 촬영을 했다. 173개 뉴클레오티드의 CAT RNA가 RNA 매개로 절단되어 각각 76개 및 97개의 뉴클레오티드로 이루어진 5' 및 3' 단편을 산출하였다.

제17도는 도식으로 제시된 가능한 염기쌍을 지닌 프로-리보자임 구성에 사용되는 "야생형" 및 변형 나선 P8을 나타내고 있다. 해당 프로-리보자임의 "안티센스" 부위에 상보적인 염기는 굵게 표시했다. 상보성 염기의 수는 각 나선의 옆에 기재하고 있다. 생체외 전사 동안 "3' 엑손" 가수분해의 정도로 측정하여, 해당 프로-리보자임 전사체의 안정성 순서를 나타냈다.

제18도는 GAL4-DTA 프로-리보자임의 안정성을 나타낸 것이다. 리보자임 및 프로-리보자임 서열을 포함한 플라스미드는 XhoI로 선형화하고, T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 전사시켰다. 전사체는 50℃에서, 40 nM Tris-HCL(pH 7.5), 6mM $MgCl_2$, 2mM 스퍼미딘, 10 mM NaCl, 1 mM GTP 내에서 60'동안 항원처리하고, 7 M 우레아와 25% 포름아미드내의 5% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분별한후, 자동방사능 촬영을 했다. 리보자임 전사체는, 이러한 조건하에 광범위하게 가수분해 되는데, 프로-리보자임 1은 다소 불란정한 반면, 프로-리보자임 2는 안정했다.

[바람직한 구체어의 상세한 설명]

Ⅰ. 용어 정의

본원 명세서에서는 재조함 DNA(rDNA) 기술분야에서 사용되고 있는 많은 용어들을 광범위하게 사용하고 있다. 명세서 및 특허청구의 범위를 명확하게 이해할 수 있도록, 다음과 같은 정의를 제공하고자 한다.

리보자임 : 촉매 활성을 본질적으로 보유한 RNA 분자를 의미한다.

트랜스-스플라이싱 : 제1 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열이 제2 폴리뉴클레오티드의 서열에 일직선으로 연결되거나 삽입됨으로써 상기 폴리뉴클레오티드 사이에 3'→5' 포스포디에스테르 결합을 보유하게 되는 유전적 조작형태를 의미한다. "지시성(directed)"트랜스-스플라이싱 또는 "기질-특이성" 트랜스 스플라이싱은 트랜스-스플라이싱 반응용 기질로서 특정의 RNA가 요구되는 트랜스-스플라이싱 반응을 의미한다(즉, 특정 RNA는 전위된 서열에 스플라이싱된다). 지시성 트랜스-스플라이싱은 관련된 RNA 셋트내에 존재하는 표적 서열에 대하여 지시되도록 리보자임이 구성되는 경우 하나 이상의 RNA 종을 표적화할 수 있다.

표적 RNA : 본 발명 리보자임의 촉매활성에 대한 기질인 RNA 분자를 의미한다.

발현 카세트 : 본 발명 리보자임을 발현 하는데 필요한 서열을 제공하는 유전자 서열을 의미한다.

안정하게 : 게놈에 "안정하게"서열을 삽입하는 것은, 상기 게놈의 복사물에 상기 서열이 내재하도록 하는 삽입을 의미한다.

작동가능한 연결 : "작동가능한 연결"은 서열(들)의 기능을 변경시킬수 있는 방식으로 하나의 서열이 다른 서열(들)에 연결된 것을 의미한다. 예을들어, 리보자임 암호화 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결시킴으로써, 리보자임 암호화 서열의 발현은 이 프로모터의 영향 또는 조절하에 있게 된다. 2 개의 핵산 서열(리보자임 암호화 서열과 이 서열의 5' 말단의 프로모터 부위 서열)은 프로모터 작용이 유도됨으로써 리보자임 암호화 서열이 전사되는 경우 작동가능하게 연결된 것이며, 상기 두 서열 사이의 연결 특성이 (1) 프레임 변경 돌연변이(frame-shiftmutation)를 유도하지 않으며, (2) 발현 조절서열이 리보자임의 발현을 지배하는 능력을 저해하지 않는 경우 작동가능하게 연결되었다고 한다. 따라서, 프로모터가 핵산 서열의 합성을 일으킬 수 있는 경우 프로모터 부위는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 것이다.

Ⅱ. 본 발명의 리보자임의 유전공학

본 발명의 트랜스-스플라이싱 리보자임, 프로-리보자임 및 방법은 먼저, 리보자임을 임의의 RNA 서열, 및 성숙(인트론을 함유하지 않음) mRNA로 지시성 트랜스-스플라이싱할 수 있는 리보자임을 제공한다. 트랜스-스플라이싱 리보자임은 전술한 바와같이 표적에 대해 광범위한 상보성을 보유하며, 종래기술에서 기술된 테트라하이메나.서모필라 유래-엔도리보뉴클레아제 활성과는 크게 상이하다. 본 발명의 리보자임의 추가의 상보성은 표적에 대한 증가된 친화성 및 특이성을 제공하며, 상보성은 촉매활성의 필수부분이 아니다. 또한, 변성물의 부재하에 Mg^{2+} 고농도에서 효과적으로 정확하게 절단이 된다.

트랜스-스플라이싱 리보자임을 구성하기 위해 본원에서 제시된 기준은 그룹I 셀프-스플라이싱 인트론의 잘 규명된 특성면에 기초하고 있으며, 임의의 지시성 트랜스-스플라이싱 리보자임의 구성을 위한 일반적인 도식을 제공한다. 따라서, 본 원에서 제공하는 기준은 T.서모필라 프리-mRNA의 그룹 I 인트론에 제한되지 않으며 상기 기준과 당 분야의 지식을 이용하여 기타 그룹 I 인트론으로 당업자들에 의해 본 발명의 리보자임을 구성하는데 이용될 수 있다. 천연 테트라하이메나 서모필라 리보자임(인트론 서열)은 이하 제시된 테트라하이메나 서모필라 염색체외 rDNA 서열중 53번째 염기에서 465번째 염기에 위치한다.

TGACGCAATT CAACCAAGCG CGGGTAAACG GCGGGAGTAA CTATGACTCT

CTAAATAGCA ATATTTACCT TTGGAGGGAA AAGTTATCAG GCATGCACCT

CCTAGCTAGT CTTTAAACCA ATAGATTGCA TCGGTTTAAA AGGCAAGACC

GTCAAATTGC GGGAAAGGGG TCAACAGCCG TTCAGTACCA AGTCTCAGGG

GAAACTTTGA CATGGCCTTG CAAAGGGTAT GGTAATAAGC TGACGGACAT

GGTCCTAACC ACGCAGCCAA GTCCTAAGTC AACAGATCTT CTGTTGATAT

GGATGCAGTT CACAGACTAA ATGTCGGTCG GGGAAGATGT ATTCTTCTCA

TAAGATATAG TCGGACCTCT CCTTAATGGG AGGTAGCGGA TGAATGGATG

CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT ATGCGAAAGT ATATTGATTA

GTTTTGGAGT ACTCGTAAGG TAGCCAAATG CCTCGTCATC TAATTAGTGA

CGCGCATGAA TGGATTA [서열번호 : 1]

[참조: Kan, N.C. 등, Nucl, Acids Res. 10:2809-2822(1982)]

본원 명세서에 기재된바처럼, 본 발명의 지시성 트랜스-스플라이싱 리보자임은 상기 인트론의 촉매성 코어를 사용하여 유전자 조작된다. 상기 인트론 및 그것의 촉매성 코어는 당분야의 공지된 방법으로 분리할 수 있다. 인트론의 촉매성 코어, 즉 끝이 잘린 인트론은 ScaI 부위에서 절단된 점에서만 전장(full-length) 인트론과 상이하며. 따라서 인트론의 최종 5개의 뉴클레오티드가 제거된다. 끝이 잘린 인트론 RNA는 당분야의 공지 기술로 제조하거나, 시판되고 있는 키트 예를 들어, US 바이오케미칼사에서 제조되는 # 72000 (RNAzyme™ Tet 1.0 Kit; 미국, 오하이오주, 클리브랜드 소재)를 이용할 수 있다. 이러한 US 바이오케미칼 키트는 리보자임 및 리보자임을 사용하기 위한 프로토콜을 제공한다. 전사된 Tet. 1 cDNA는 후술한 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 돌연변이 용 기질로서 사용되어 합성트랜스-스플라이싱 효소를 산출한다.

본 발명의 리보자임의 기질 특이성, 즉 기질로서 특정 RNA를 "표적화"하는 리보자임의 능력은 표적(기질) RNA에 특이적인 상보성 서열을 리보자임의 5' 말단에 융합시킴으로써 제공된다.

본 발명 리보자임의 지시된 트랜스-스플라이싱 특이성, 즉 표적 RNA의 서열과 소정의 이종 서열을 트랜스-스플라이싱하는데 있어서의 특이성은 리보자임의 3' 말단에 신규한 3' 엑손을 제공함으로써 주어진다. 이하에서 이에 대해 상세히 설명한다.

그룹 I 인트론의 구조적 및 촉매적 특성을 변경시키기 위해, 엑손 서열이 상기 인트론의 인접 서열을 대체함으로써 인트론의 촉매성 코어인 리보자임만 남게된다. 그 결과 생성된 변형 리보자임은 기질 RNA와 트랜스로 상호 작용할 수 있다. 끝이 잘린 인트론의 형태(즉, 촉매성 "코어", 즉 ScaI 부위에서 절단되어 인트론의 최종 5개 뉴클레오티드가 제거됨)를 천연 리보자임의 5' 스플라이싱 연결부에 해당하는 서열과 함께 항온처리하면, 이 부위는 스플라이싱의 제1 단계와 유사하게 구아노신-의존성 절단이 일어난다.

본 발명의 리보자임의 유전공학은 다음과 같은 4가지 기준을 고려해야 한다.

1. 스플라이스 부위는 표적 RNA 내에서 선택되어야만 한다.

최종 트랜스-스플라이싱 복합물에 있어서, P1 이중나선의 5'부위만 표적 RNA에 의해 부여된다. 단 하나의 보존된 잔기인 우라실은 정해진 스플라이스 부위의 5'에서 요구된다. 이것은 표적 RNA에 있어서 유일한 서열요건이다. 표적 RNA에 요구되는 기타 구조 요건은 없다. 성숙한 mRNA가 표적화될 수도 있으며, 트랜스-스플라이싱 반응은 핵 보다는 세포질 내에서(프리-mRNA에 대하여) 진행될 수도 있다. 이러한 사실은 세포의 핵중에서 고농도의 리보자임이 요구됨을 명백하게 제시한다.

2. 특정의 표적 서열을 선택함에 있어, 표적과 리보자임 RNA 사이에 적당한 나선 P1이 형성될 수 있도록 리보자임의 5' 부위에 보충 서열 변경을 추가해야만 한다. 나선 P1은 정해진 5' 스플라이싱부위에 U:G 염기쌍을 포함하고, 이 염기쌍은 나선의 염기로부터 네번째, 다섯번째(바람직함) 또는 여섯번째 위치에 배치되어 있는 것이 매우 바람직하다 [참조: Doudma, J.A 등,"RNA Structure, Not Sequence Determines The 5' Splice-Site Specificity of a Group I Intron", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7402-7406 (1989); 본원에서 참고로 인용함] . 천연 테트라하이메나 서모필라 인트론의 경우, P1은 정해진 5' 스플라이싱 부위를 지나 추가의 3 염기쌍이 연장되어 있으며, 바람직한 구체예에서는 본 발명의 트랜스-스플라이싱 리보자임에서 이것이 유지된다. 트랜스-스플라이싱이 효과적으로 이루어지기 위해서, 기질과 엔도리보뉴클레아제 인트론 RNA는 염기쌍을 이루어 나선 P1을 형성해야만 하며, 즉 우블(Wobble) U:G 염기쌍을 형성한다. 표적 RNA의 절단은 U:G 염기쌍의 3'에 있는 포스포디에스테르 결합에서 일어난다. 계통발생학적 비교와 돌연변이 분석에 의해, 5' 스플라이싱 부위의 우라실보존 잔기에 인접한 서열의 특성은 나선 P1의 염

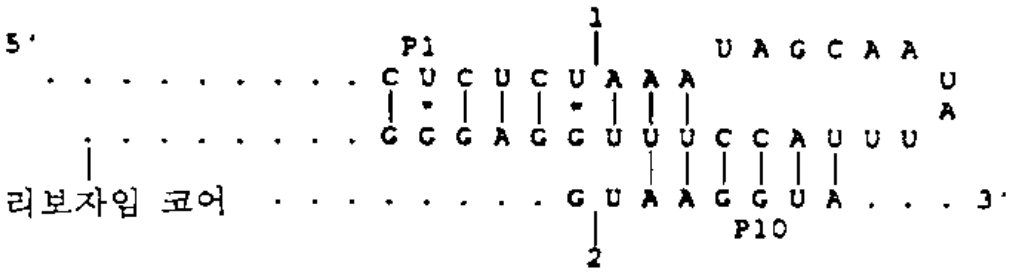
기쌍이 유지되는 한, 촉매작용에서 중요한 역할을 수행하지 않음을 확인하였다.

3. 3' 스플라이스 부위에 인접한 엑손 서열을 선택해야만 하며, 필요하다면, 안정한 P10 나선이 형성될 수 있도록 리보자임의 5' 부위를 조정한다. P10 나선은 필요하다면 생략할 수 있으며, 존재하는 경우는 스플라이싱을 향상시킨다. 본 발명의 리보자임의 바람직한 구체예에서는 P10 나선을 보유한다〔참조: Suh, E.R.등, "Base Pairing Between The 3' Exon And An Internal Guide Sequence Increase 3' Splice Site Specificity in the Tetrahymena Self-Splicing rRNA Intron," Mol. Cell. Biol. 10:2960-2965(1990)〕. 나선 P1과 P10은 테트라하이메나 서모필라 인트론 IGS를 따라서 중첩되고, 5' 및 3' 스플라이스 부위 둘다에 이어지는 2번째 및 3번째 잔기는 IGS의 동일 잔기에 상보적이다(참조: 제2도). 이는 다음과 같은 몇가지 장점이 될 수 있는데, 많은 천연의 그룹 I 인트론은 이러한 구속성 (constraint)을 공유하지 못하며, 따라서 3' 엑손 서열의 선택은 실험적 요건으로서 일차적으로 결정된다. 상기 요건은 스플라이싱 부위의 선택에 있어 광범위한 유연성을 반영한다. 예를들어, 제시된 지점에서 두서열을 연결하는 것이 요구되는 경우, 그 부위의 서열은 돌연변이 될 수 없으며, 또한 트랜스-스플라이싱에 의해 변경될 수 없다. P1 또는 P10은 중첩 서열이 소정의 스플라이싱 부위를 수용하지 않는 경우 더 짧아질 수 있다.

3' 스플라이스 부위 선별을 위한 서열 요건은, 나선 P9.0과 3' 인트론 경계부를 나타내는 인접한 3' 구아노신 잔기를 포함하는 인트론(리보자임) 자체의 구조내에 주로 존재하는 것으로 나타났다. P9.0은 완전히 인트론 서열내에 포함되며 인접한 3' 스플라이스 부위를 규정하도록 한다. 트랜스-스플라이싱 구성을 위하여, P9.0 나선과 인트론내의 나머지 작용성 RNA 부분은 변경되지 않는다. P9.0 나선의 구조적 특징은 공지되어 있다〔참조: Michel, F. 등, "The Guanosine Binding Site of the Tetrahymena Ribozyme,"Nature 342 : 391-395(1989)〕. 그러나, 3' 엑손내의 인접 서열은 돌연변이 분석으로 제시된 바와 같이 나선 P10의 형성 및 효과적인 스플라이싱에 필요하다.

4. 상보적 서열 부위는 트랜스-스플라이싱 리보자임의 5' 말단에 위치함으로써 표적 RNA에 대한 친화성 및 특이성이 증가한다. 본원에서 제시하고 있는 바와 같이, 임의로 약 40개 잔기 길이가 사용된다. 원하는 효과를 저해하지 않는 한 다른 길이도 사용될 수 있다.

예를 들어, 테트라하이메나 서모필라 셀프-스플라이싱 인트론(이하 서열)으로 시작한다:



(상기 서열중 "1" 및 "2"(본원 전반의 기타 리보자임 서열에 있어서)는 각각 제1 및 제2 스플라이스 부위를 나타냄)

(1) "5' "부위는 선택된 표적 RNA 내의 우라실 잔기에 인접하여 선택된다. 상보성에 관계된 서열은 P1 나선 형성에 관계된 서열과 바로 인접해 있지는 않으나, 예를 들면 P10 형성에 역시 관계된 5개 뉴클레오티드에 의해 분리되어 있다;

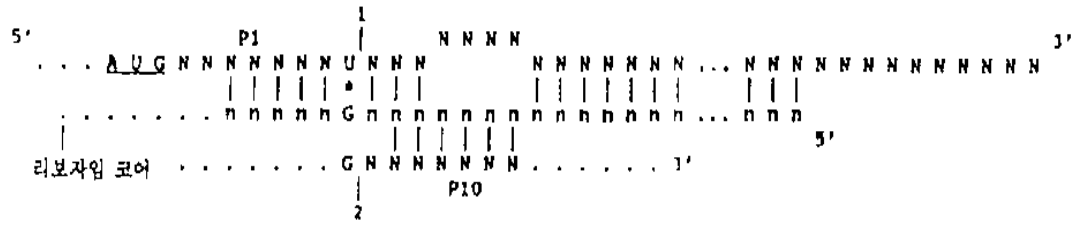
(2) 선택된 RNA에 상보적인 서열은 셀프-스플라이싱 그룹 I 인트론의 5' 붕위에 융합된다. 리보자임과 표적 RNA 사이의 염기쌍은 나선 P1의 형성을 가능케 한다;

(3) 선택된 "3' 엑손" 서열은 리보자임의 3' 부위에 융합되어 보존된 나선 P10을 유지한다; 및

(4) 표적 RNA에 대한 친화력을 증가시키기 위해, 필요하다면, 연장된 상보성 서열 부분을 리보자임의 5' 부위에 융합시켜 30-40개의 염기쌍을 형성케 한다.

산출된 트랜스-스플라이싱 리보자임과 그것의 표적 RNA의 배열을 하기에 제시한다. 표적 RNA 서열은 윗줄에, 리보자임 서열은 그 아래에 나타냈으며, 연속서열이 아래 두 라인을 둘러싸고 있으며, 리보자임의 5' 및 3' 말단 및 P1과 P10의 뉴클레오티드의 하이브리드가 나타났다.

표적 RNA와 본 발명 리보자임의 배열



본 발명에 따라, 임의의 RNA 표적상에 본질적으로 임의의 RNA 서열을 트랜스-스플라이싱할 트랜스-스플

라이싱 리보자임을 구성할 수 있다. 표적이 인트론서열을 포함하거나 리보자임이 표적 서열내의 인트론일 필요는 없다. 예를 들면, 상기 트랜스-스플라이싱 리보자임의 구성 단계는 (1) 소정의 표적 RNA의 동정, (2) 소정의 표적 RNA 또는 그 일부의 클로닝 및/또는 서열분석, (3) 표적 RNA에 트랜스-스플라이스될 소정의 암호화 서열의 선별, (4) 본 명세서의 기준을 사용하여 상기 표적에 하이브리드화할 수 있는 본 발명의 리보자임의 작제, (5) 본 발명의 리보자임이 원하는 특이적 트랜스-스플라이싱 반응의 기질로서 상기 표적을 이용한다는 확인, 및 (6) 원하는 숙주 세포내로 리보자임의 삽입을 포함한다.

표적 RNA는 트랜스-스플라이싱 반응의 원하는 목적을 반영하여 선택한다. 반응의 목적이 특정 RNA를 불활성화시키는 것이라면, 그 RNA에 의해 암호화된 기능적인 모든 펩타이드 도메인을 파괴하는 위치 및 바라지 않는 유전자 서열의 계속적인 발현을 일으키지 않는 위치에서 상기 RNA를 트랜스-스플라이싱시켜야 한다. 상기 RNA를 암호화하는 유전자의 하나 이상의 대립 유전자가 존재하면, 모든 발현되는 대립 유전자에 공통된 부위에서 표적 RNA를 불활성화하도록 리보자임을 구성하는 것이 바람직하다. 한편, 하나 이상의 리보자임을 세포에 제공할 수 있는데, 그 각각은 표적 RNA의 특이적 대립 유전자형을 불활성화하도록 구성된 것이다.

표적 RNA의 불활성화만을 원하고, 새로운 원하는 RNA의 발현은 원하지 않을때는, 리보자임에 의해 공여된 이종 RNA가 숙주 세포에 의해 해독될 수 있는 서열을 제공할 필요는 없으며, 해독 정지 코돈을 함유하는 서열이 절단된 인트론, 예를들어 ScaI 부위에서 절단된 리보자임 인트론으로서 사용될 수 있다.

트랜스-스플라이싱 반응의 목적이 숙주 세포에 어떤 유전 형질을 제공하는 것이라면, 표적 RNA는 그 유전 형질의 원하는 발현 유형을 반영하여 선택할 수 있다. 유전 형질이 숙주에 의해 계속 발현되기를 원하다면, 표적 RNA 역시 계속 발현되어야 한다. 유전 형질이 원하는 증식 조건, 호르몬 조건 또는 환경조건하에서만 선택적으로 발현되기를 원한다면, 표적 RNA 또한 그러한 조건하에서 선택적으로 발현되어야 한다.

리보자임 자체가 숙주에 의해 해독되지 않기 때문에, 그러한 리보자임의 기질이 숙주에 달리 존재하지 않으면, 원하는 증식, 호르몬 또는 환경조건에 리보자임 자체의 발현을 선택적으로 제한시킬 필요는 없다. 따라서, 본 발명의 리보자임에 의해 공여된 RNA가 암호화하는 서열은 트랜스-스플라이싱반응이 일어날때까지 해독되지 않으며, 그러한 반응은 숙주의 리보자임 기질의 발현에 의해 조절될 수 있다.

원한다면, 조절된 표적의 발현을 유도하는 동일한 요소들에 대한 응답으로 리보자임의 발현을 유전공학적으로 일으킬 수 있으며, 또는 리보자임의 발현을 공학적으로 조작하여 추가적인 조적 레벨을 제공하므로써, 리보자임 및 표적이 둘다 세포에서 선택적으로 유도되지만, 상이한 요소들에 의해 유도되며 상기 요소들의 조합은 바라지않은 현상이 되는 조건으로 트랜스-스플라이싱 반응의 발생을 제한할 수 있다.

표적 RNA에 하이브리드화하는 리보자임 도메인의 서열은 표적 RNA의 서열에 의해 결정된다. 표적 RNA의 서열은 그러한 RNA를 암화화는 서열들을 클로닝한 후 또는 그 표적에 의해 암호화된 펩타이드를 서열분석한 후, 그러한 펩타이드를 암화화하는 RNA 서열을 추정하여 결정한다. 표적 RNA를 암호화하는 서열의 클로닝에 당분야에 공지된 클로닝 기법을 사용할 수 있다.

표적 RNA로 트랜스-스플라이싱될 원하는 서열(본 명세에서는 "트랜스-스플라이싱 서열")은 트랜스-스플라이싱의 목적을 고려하여 선택할 수 있다. 트랜스-스플라이싱 반응이 새로운 유전자 서열의 발현을 일으키지 않기를 바란다면, 트랜스-스플라이스되는 서열은 해독가능한 단백질 서열을 해독가능한 단백질 서열을 암호할 필요가 없다. 트랜스-스플라이싱 반응이 새로운 유전자 서열의 발현 및 특히 새로운 펩타이드 또는 단백질 서열의 발현을 일으키지 않기를 바란다면, 트랜스-스플라이스 되는 서열은 해독종결 코돈 및 숙주세포에서 RNA의 정확한 해독 프로세싱에 필요한 기타 정보를 추가로 제공할 수 있다. 트랜스-스플라이싱반응의 결과로서 특정 단백질 산물을 원한다면, 생성 융합체에 아미노산 해독 프레임을 유지할 필요가 있다.

본 발명의 리보자임의 특이성의 동정과 확인은 원하는 표적 서열의 존재하에 원하는 트랜스-스플라이싱 반응을 촉매할 수 있는 리보자임의 추정된 능력을 시험하므로써 이루어진다. 존재하는 유일한 RNA 서열이 리보자임이 반응하지 않는 비표적 서열이며(또는 다소 민감하다면), 트랜스-스플라이싱 반응은 일어나지 않는다. 상기 특성 규명은 정확한(또는 부정확한) 리보자임 활성을 더욱 쉽게 모니터할 수 있도록 마커를 이용하여 수행할 수 있다. 대부분의 경우에, 그 의도한 표적에 대해 리보자임을 시험관내에서 테스트하고, 리보자임의 생체내 효과의 연구를 위해 숙주세포를 리보자임으로 형질전환시키는 것으로서 충분하다.

숙주의 RNA를 제거할려고 할 때에는, 가능한한 완전히 제거하여야 한다. 새로운 유전자 서열을 숙주 세포에 제공하고자 할 때에는, 본 발명의 트랜스-스플라이싱 반응이 완전히 이루어져야할 필요는 없다. 소정의 목적을 위해, 충분한 mRNA 및 결과적으로 암호화된 폴리펩타이드를 숙주에 제공하도록 충분한 트랜스-스플라이싱이 일어나는 한, 상기 유전자 서열로부터 해독되는 펩타이드의 생물학적 활성에 따라, 트랜스-스플라이싱 반응이 사실 매우 불충분할 수 있다는 것이 본 발명의 장점이다.

숙주 세포에서 본 발명의 리보자임의 전사는 리보자임 유전자를 숙주 세포속으로 도입한 후 일어난다. 숙주 세포가 리보자임을 보유하기를 원하지 않는다면, 그 리보자임은 화학적으로 또는 효소에 의해 합성되어, 미세주입, 리포좀-매개 형질 감염, 전기적 천공법(electroporation) 또는 인산칼슘 침전법같은 기계적 방법에 의해 숙주 세포에 제공될 수도 있다. 한편, 리보자임을 암호화하는 유전자를 안정하게 보유하기를 원할 때에는, 리보자임의 하나 이상의 DAN 사본을 숙주 염색체속으로 안정하게 삽입하므로써, 또는 숙주 세포가 안정하게 보유하는 플라스미드상에 리보자임의 DNA 사본을 제공하므로써 상기 목적을 달성할 수 있다.

본 발명의 리보자임은 발현 카세트의 일부로서 숙주 염색체속으로 삽입하는 것이 바람직하며, 상기 카세트는 숙주 세포에서 리보자임의 전사를 조절할 전사 조절 요소를 제공한다. 그러한 요소들은 프로모터 요소, 인핸서(enhancer) 또는 UAS 요소, 및 전사 종결 시그날을 포함하지만, 반드시 이들에 국한되지는 않는다. 리보자임이 해독되지 않을 때, 폴리아데닐화는 불필요하다. 그러나, 상기 폴리아데닐화 시그날은 트랜스-스플라이싱될 요소를 암화화하는 서열과 연결되어 제공될 수 있다.

리보자임의 암호화 서열이 숙주 염색체로 안정하게 삽입된 리보자임의 발현은 리보자임 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 포로모토 서열에 의해 조절된다. 리보자임의 발현을 관장하는 프로모터는 숙주 세포에서 작용하는 임의의 프로모터일 수 있으며, 원핵세포 프로모터는 원핵세포에서 바람직하고, 진핵세포 프로모터는 진핵세포에서 바람직하다. 프로모터는 숙주 세포에서 전사의 활성화 및/또는 프로모터의 억제를 이끄는 분리된 단위로 구성되어 있다. 그러한 단위는 리보자임의 프로모터에 혼합되고 조화되어 숙주에서 리보자임의 적절한 발현을 제공할 수 있다. 진핵세포 프로모터는 진핵세포에서 작용하는 임의의 프로모터일 수 있으며, 특히 RNA 폴리머라제 I, II 또는 III 특이성이 있는 임의의 것일 수 있다. 광범위한 진핵 숙주 세포에서 리보자임을 발현시키고자 한다면, 대부분의 진핵 숙주세포에서 작용하는 프로모터를 선택해야 하며, 그 예로는 rRNA 또는 tRNA 프로모터, 또는 광범위하게 발현되는 mRNA에 대한 프로모터(예를 들어, 액틴 유전자 또는 당 분해 유전자에 대한 프로모터)가 있다. 특정 세포 또는 조직 유형에서만 리보자임을 발현시키고자 한다면, 상기 세포 또는 조직 유형에서만 기능하는 세포-특이성(또는 조직-특이성) 프로모터 요소를 선택해야 한다.

트랜스-스플라이싱 반응은 그것이 생체외 또는 생체내 어디에서 수행되든 화학적으로 동일하다. 그러나, 생체내에서는, 숙주 세포에 보조인자가 통상적으로 이미 존재하기 때문에 표적 및 리보자임의 존재가 트랜스-스플라이싱을 일으키기에 충분할 것이다.

본 발명의 트랜스-스플라이싱 리보자임 및 방법은 표적이 되는 세포의 유전적 변형에 유용한 유전자 활성의 생성에 유용하다. 예를 들면, 본 발명의 트랜스-스플라이싱 반응은 독성을 가진 단백질을 원하는 세포속으로 도입하는데 유용하다. 세포들의 민감성은 표적 RNA, 및 리보자임의 발현을 조절하는 조절 서열의 선택에 의해 결정될 것이다. 예를 들면, 독성 단백질을 암호화하는 RNA서열을 전위시키는 리보자임을 유전공학적으로 조작하여 리보자임의 발현이 작동가능하게 연결된 프로모터의 특성에 의존되게 할 수 있다. 매우 바람직한 한 양태에서, 디프테리아 독소 펩타이드 A는 숙주내의 원하는 표적 속으로 트래스-스플라이싱되는 리보자임의 일부에 의해 암화화된다. 리보자임과 디프테리아 독소 펩타이드 A 쇄의 조건적 발현은 숙주 세포의 사멸을 초래한다. 기타 잠재적으로 유용한 펩타이드 독소로는 라이신, 엑소톡신 A, 및 헤르프스 티미딘 키나제[참조: Evans, G.A. Genes & Dev. 3:259-263(1989)]가 있다. 게다가, 다양한 용균 효소는 세포 대사를 파괴하는 잠재력을 가지고 있다. 예를 들면, 균류의 리보뉴클레아제가 식물에서 수컷의 불임을 일으키는데 사용될 수 있다[참조: Mariami, C. et al., Nature 347:737-741(1990)]. 특정 조직들은 표적 RNA의 제한된 발현으로 인해 파괴될 수 있다. 또한 바이러스 RNA가 표적으로 사용되면, 바이러스 내성의 새로운 형태 또는 치료법을 유전공학적으로 만들 수 있다.

조직-특이성 유전자 발현의 조적 및/또는 전위(轉位)성 절제를 위한 이중 시스템이 본 발명의 리보자임을 사용하여 구성될 수 있다. 예를 들면, P-요소 인핸서-포착 벡터를 사용하여 조직 및 공간 특이서 유형으로 효모 전사 활성화 인자가 GAL4를 발현시키는 초파괴 라인을 사용할 수 있다. 임의의 활성화인자가 CALA 대신 사용될 수 있으며 본 발명은 GAL4에 제한되지 않는다. DTA 서열을 트랜스-스플라이스시킬 수 있는 융합 리보자임을 암화화하는 유전자가 GAL4-UAS 프로모터의 조절하에 배치될 수 있으며, 유전적으로 안정한 방식으로 초파리속으로 삽입될 수 있다. 상기 리보자임들은 GAL4가 없을 때 초파리에서 발현되지 않을 것이다. 따라서, 이 리보자임 구성체를 유전적으로 보유한 초파리 숙주를 조직 특이적인 방법으로 GAL4를 발현시키는 초파괴 숙주와 교배시키면, GAL4 발현이 유도될 때 GAL4 발현 유형과 유사한 세포 사멸 유형을 나타내는 자손 특성이 나타난다.

게다가, 리보자임이 GAL4 mRNA와 트랜스-스플라이스하게 하므로써, 리보자임의 스플라이싱 활성은 GAL4 발현을 불활성화하고, 리보자임 발현은 자기-조절 될 수 있다.

[프로-리보자임]

트랜스-스플라이싱 리보자임은 상기에 기술한 바와 같이, 3개의 융합된 서열요소, 즉 표적 RNA에 상보적인 5' "안티-센스" 영역, 셀프-스플라이싱 그룹 I 인트론에 근거한 촉매 영역 및 3' "엑손" 서열로 구성된다. 5' 영역은 선택된 표적 RNA와 염기쌍을 형성하여 표적 서열을 그룹 I 인트론의 촉매 서열과 근접시킬 수 있다. 그룹 I 인트론의 구조는 3' "엑손" 서열에 표적 RNA의 정확한 스플라이싱을 촉매하는데 적합한 화학적 환경을 제공한다. 그러나, 적합한 표적 RNA의 부재시, 리보자임 서열은 3' "엑손"연결부에서의 절단(그룹 I 셀프-스플라이싱 인트론에서 유사한 가수분해가 나타난다)[참조: Zaug et al. Science 231:470-475(1986)]을 여전히 촉매할 수 있으며, 리보자임과 이종 RNA 서열(그 자신의 서열을 포함할 수 있음)의 일시적인 염기쌍 형성을 통해 부정확한 스플라이싱 반응을 촉매할 수도 있다. 그러나 부-반응 및 부정확한 스플라이싱 반응은 바람직하지 않으며 해로울수 있다. 예를들면, 생체내에서 독소의 조건적 운반을 위해 트랜스-스플라이싱을 사용하고자 한다면, 부정확한 트랜스-스플라이싱은 독소 활성의 예기치 않은 발현을 야기할 수 있다. 3' "엑손" 연결부에서 자발적인 절단은 트랜스-스플라이싱의 효율을 저하시킨다.

상기 문제점들을 피하기 위해, 트랜스-스플라이싱 RNA의 "프로-리보자임"형을 제조하였는데, 이들 형태에서는 보존된 나서(예 : 나서 P8)이 파괴되어 있다. 리보자임의 촉매 중심부의 폴딩(folding)의 오류를 야기하는 여분의 자기-상보적서열을 함유하도록 프로-리보자임을 제조한다. 의도한 표적 RNA의 부재시 프로-리보자임은 불활성이며; 활성형은 리보자임과 표적 RNA의 염기쌍 형성후에만 형성되며, 이어서 리보자임내의 간섭 2차 구조가 치환된다. 생체외 및 생체내에서의 원하지 않은 자기-절단, 셀프-스플라이싱 및 부정확한 트랜스-스플라이싱 반응(제7도)을 제거하기 위해, 프로-리보자임은 표적 RNA의 부재시에 촉매적으로 불활성 종이 되도록 한다.

상기한 프로-리보자임은 모양이 파괴되어 트랜스-스플라이싱 활성의 불활성 형태이다. 따라서 상기 프로-리보자임은 자기-절단 활성을 거의 갖지 않는다. 그들은 표적 RNA와의 특이적 상호작용에 의해서만 재활성화되고, 따라서 의도하지 않은 표적 RNA에의 트랜스-스플라이싱을 덜 촉매하는 경향이 있는 기질-활성화된 리보자임이다. 트랜스-스플라이싱 리보자임은 생체내에서 새로운 유전자 활성의 전달을 위해 사용되며, 예기치 않은 부반응 또는 부정확한 스플라이싱 정도를 임의로 감소시키는 것이 바람직하고 또 필요할 수 있다.

나서 P8의 파괴가 트랜스-스플라이싱 프로-리보자임에 대한 상기에서 예시되었지만, 촉매 활성에 필요

한 기타 나선들 또한 사용할 수 있다.

의도한 기질 RNA와의 염기쌍 형성만이 활성 리보자임의 형성을 허용하는 방식으로 촉매적으로 중요한 구조의 형태를 파괴하는 동일한 시도는 기타 리보자임의 구성에 적용할 수 있다. 예를 들면, "해머헤드"형 엔도리보뉴클레아제[참조: Haseloff et al., Nature 334:585-591(1988)]의 루프(loop) 서열은 연장되어 나선 P8의 상기 변형과 유사한 리보자임의 "안티센스" 아암중의 하나와 상보적이 되게 할 수 있다. 엔도리보누클레아제 활성은 선택된 표적 RNA와의 염기쌍 형성, 2차 구조를 파괴하는 치환 및 촉매작용에 필요한 스템-루프 구조의 재형성후에만이 나타날 수 있다. 상기 활성은 표적에 대한 리보자임의 특이성을 효과적으로 증가시킨다.

또한, 프로-리보자임의 활성화는 기질자체와의 염기쌍 형성에만 의존할 필요는 없다. 대신에, 선택된 제3의 RNA 또는 ssDNA 또는 심지어 단백질이 활성에 필요할 수도 있다. 추가적인 염기쌍 형성 또는 RNA-단백질 상호작용이 활성 리보자임 복합체의 형성에 필요할 것이다. 상기 부가 성분들의 이용가능성이 리보자임 활성을 결정하며, 리보자임 선택성을 변화시키는데 사용될 수 있다.

본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임은 임의의 숙주세포, 즉 원핵 또는 진핵 숙주 세포, 특히 식물 또는 포유류 숙주 세포(특히, 사람 세로)속으로, 배양물내 또는 생체내에서, 상기 숙주에 적합한 당분야에 공지된 기법을 사용하여 도입시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 리보자임은 바이러스를 파괴하도록 유전공학적으로 조작할 수 있다. 한 양태에서, 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임은 바이러스의 침투전에 숙주세포에 유전적으로 안정한 방식으로 제공된다. 적합한 바이러스에 의한 감염 또는 상기 숙주 세포내에서 잠복성 바이러스의 발현(숙주 세포에서 리보자임 또는 프로-리보자임의 표적 RNA의 출현을 초래함)은 바이러스-감염 세포의 사멸을 초래하느 트랜스-스플라이싱을 통해 리보자임의 촉매 활성 및 바이러스 RNA 표적의 파괴 및/또는 독소의 생성을 촉진할 것이다. 또 다른 양태에서, 리보자임 또는 프로-리보자임은 유전공학적으로 조작하여 바이러스 자체내에 충진할 수 있다. 상기 양태들은 연구 목적의 바이러스의 구성에 특히 유용한데, 이 경우 리보자임 또는 프로-리보자임은 특정 바이러스 RNA의 기능을 파괴하고, 따라서, 그러한 RNA의 부재시 바이러스 기능의 연구를 허용하도록 구성할 수 있다. 또한, 리보자임 또는 프로-리보자임을 보유하는 바이러스는 원하는 리보자임 또는 프로-리보자임 활성을 숙주 세포로 형질감염시키는 운반체로서 사용될 수 있다.

본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 사용하여 농경학적으로 중요한 종에 웅성 또는 자성의 불임을 유전공학적으로 일으킬 수 있다. 예를 들면, DTA 3' 엑손을 표적내로 트래스-스플라이싱시키는 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 이용하여 TA29 또는 TA13 mRNA[tobacco anther-specific genes: 담배 꽃밥-특이 유전자; Seurinck J. dt al., Nucl. Acids Res. 18:3403(1990)]를 표적으로 하여 유전공학적으로 담배에서 웅성 불임을 일으킬 수 있다.

본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 이용하여 조직을 선택적으로 파괴 또는 변형시키므로써 소낭식물의 형태를 조작할 수 있다. 예를 들면, DTA 3' 엑손을 표적내로 트랜스-스플라이싱시키는 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임을 이용하여 종자 저장 단백질 mRNA를 표적화하므로써 무종자 과실을 만들 수 있다.

유전자저이된 식물은 바이러스-특이성 리보자임 또는 프로-리보자임의 발현에 의해 감염된 세포를 사멸시키므로써 감염에 대해 보호될 수 있다. 이것은 "과민 반응"이라는 인위적 형태일 것이다. 예를 들면, 오이 모자이크 바이러스 피복단백질 mRNA는 DTA 3' 엑손을 표적내로 트랜스-스플라이싱시키는 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임의 표적이 될 수 있다.

미생물 집단은 트랜스-스플라이싱 리보자임 또는 프로-리보자임의 도입에 의해 특정 병원체에 내성이 생길 수 있다. 예를 들면, 치즈-생산 세균은 세균 독소 유전자, 또는 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임에 의해 제공되는 3' 엑손이 암호화하는 용균 효소를 이용하여 파지 RNA를 표적화하므로써 파지 감염에 대한 내성을 보유하도록 할 수 있는데, 상기 표적화는 예를 들면, 파지 감염후 때이른 용균에 의해 파지 복제를 방해할 것이다.

바이러스 병원체는 트랜스-스플라이싱을 통해 독소 활성을 전달하도록 제조할 수 있다. 이런 방식으로, 특정 세포형은 암 또는 바이러스 치료의 경우처럼 제거의 표적이 될 수 있다. 예를 들면, HIV mRNA는 바이러스 또는 리포좀의 전달을 위해, DTA 3'엑손을 보유한 본 발명의 리보자임 또는 프로-리보자임의 표적이 될 수 있다.

하기 실기예들은 단지 예시를 목적으로 한 것이며, 본 발명의 범위가 그것으로 제한되지는 않는다.

[실시예]

[실시예 1]

CAT-LacZ 트랜스-스플라이싱 리보자임의 제조 및 특성 분석

Ⅰ. 본 발명의 리보자임의 PCR 증폭 및 클로닝

상기에서 강조한 지침에 따라, 이.콜리 β-갈락토시다제(LacZ) mRNA의 아미노-말단 암호 서열의 일부를 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT) mRNA의 부위에 스플라이싱시킬 수 있는 트랜스-스플라이싱 융합 리보자임을 구성하였다(제3도). T.서모필라 리보자임 코어 및 3'엑손 주변의 새로운 서열 부분을 올리고뉴클레오티드로서 합성하였다. 그리고 나서 프라이머로서 합성 어댑터 올리고뉴클레오티드를 사용하여 리보자임 및 β-갈락토시다제 DNA 주형으로 연속적인 폴리머라제 연쇄 반응시켜 본래의 리보자임 서열을 조립하였다(기타 방법들도 이용가능하지만, 이 방법이 가장 편리하다).

β-갈락토시다제(LacZ) α-펩타이드 암호서열을 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT)의 5' 암호 서열의 한 부위에 스플라이싱시킬 수 있는 리보자임의 제조를 위해, 3개의 올리고뉴클레오티드를 합성하였다.

올리고뉴클레오티드 1

5′-GGCCA AGCTT CTTTA CGATG CCATT GGGAT ATATC AACGG TGGTA TAAAC CCGTG GTTTT TAAAA GTTAT CAGGC ATGCA CC-3′ [서열번호 : 2]

올리고뉴클레오티드 2

5′-GATTA GTTTT GGAGT ACTCG TACGG ATTCA CGGCC GTCGT TTTAC AA-3′ [서열번호 : 3]

올리고뉴클레오티드 3

5′-GGCCG AATTC TTACA ATTTC CATTC AGGCT GCGCA ACTGT TGG-3′ [서열번호 : 4]

올리고뉴클레오티드 2 및 3(각각 200 pmol)을 0.1μg P_{VU} II-절단 pGEM4 DNA(LacZ α-펩타이드 서열을 함유함)와 배합하고, 50mM KCl, 10nM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, 0.1% 젤라틴 및 5 U TaqI DNA 폴리머라제를 함유하는 조성물 100 μl에서 PCR 증폭시키고, 94℃에서 1분간, 50℃에서 2분간, 72℃에서 2분간, 30사이클 동안 항온처리하였다.

플라스미드 pGEM4는 미국, 위스콘신, 매디슨에 소재하는 프로메가 코오퍼레이션으로부터 입수하였다.

저-겔화 온도 아가로오지 전기영동을 사용하여 210 염기쌍의 증폭된 산물을 정제하고, 제2회의 PCR 증폭에서 프라이머로 사용하였다.

제2회의 RCR 증폭후, 2.0μg의 210 염기쌍 증폭 산물, 200 pmol의 올리고뉴클레오티드 1, 및 테트라하이메나 서모필라 IVS를 함유하는 450염기쌍 단편 0.1μg을 혼합하고 상기한 조건을 사용하여 PCR 증폭시켰다. 생성된 660 염기쌍 산물을 제한 엔도뉴클레아제 EcoRI 및 HindIII로 처리하고, 플라스미드 벡터 pGEM4 내로 클로닝시켰다. CAT-LacZ α-펩타이드 리보자임 DNA 서열의 완전한 서열은 SEQ ID NO.5 및 3b도에 제시하였다.

클로닝된 서열을 포함하는 클로닝 벡터를 세균 숙주 XL1/블루(미국, 켈리포니아, 라 졸라에 소재하는 스트라타젠)속으로 당분야에 공지된 기법[참조: 매니아티스의 분자 클로닝, 실험 지침, 제2판, 1989, 콜드 스피링 하버 래버러토리 출판사]을 사용하여 형질전환시키고, 증식시켰다. 그러나, 벡터를 안정하게 유지할 수 있는 임의의 세균 숙주, 예를 들어 JM109를 사용할 수 있다.

그 플라스미드를 계속적으로 분석하기 위해 당분야에서 널리 공지된 기법(상기 매니아티스 문헌 참조)을 사용하여 숙주 세포로부터 추출하였다.

II. 클로닝된 리보자임 및 표적 RNA의 생체외 전사

표준 절차를 사용하여, 클로린된 서열을 세균 숙주로부터 정제하고, 그 플라스미드를 리보자임 서열을 절단하지 않는 제한 엔도뉴클레아제(예를 들어, EcoRI)를 사용하여 선형화하고, 5μg의 선형화된 플라스미드 DNA, 40 mM Tris-HCl(pH 7.5), 6 mM $MgCl_2$, 2 mM 스퍼미딘, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM NTPs(표지된 RNA 전사체를 원한다면, 20μCi[α-^{32}P] UTP를 함유함), 100U RNasin 50μ 및 T7 RNA 폴리머라제를 함유하는 조성물 100μl에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 전사시키고, 그 반응물을 37℃에서 2시간 동안 항온처리하였다.

사용하기 전에 5% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(TBE, 7M 우레아 겔)에 의해 RNA 전사체를 정제하였다. 활성 테트라하이메나 서모필라 IVS 서열을 함유하는 RNA들은 전사하는 동안 3′ 인트론-엑손 연결부에서 약간의 자발적인 절단을 피할 수 없다. 후속하는 트랜스-스플라이싱 분석동안 분석을 분명히 하기 위해 전기 영동 정제에 의해 단편들을 제거하였다.

III. 생체외 트랜스-스플라이싱 반응 조건

0.1 내지 0.5μg RNA 성분(양은 실험유형에 따라 다르며, 보통 리보자임 양은 표적의 5배 초과량임), 30 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100 mM NACl, 2 mM GTP, 5 mM $MgCl_2$을 함유하는 조성물 5μl에서 표적 및 또는 트랜스-스플라이싱 리보자임을 42℃에서 60분 동안 항온처리하였다.

반응물을 95 μl의 0.1 mM Na_2EDTA, 200 mM NaCl로 희석하고, 에탄올로 침전시켰다. 그후, TBE 완충액, 7 M 우레아 및 25% 포름아미드를 함유하는 5% 폴리아크릴아미드 겔에서 RNA를 분석하고 자동 방사선 사진분석하였다.

IV. 엔도뉴클레아제 활성의 분석

리보자임과 표적의 염기쌍 형성후, 트랜스-스플라이싱의 첫 번째 단계는 의도된 5' 스플라이싱 부위에서 구아노신 중재된 표적 RNA의 절단이다. 42℃, 30 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM GTP의 완충액 내에서 어닐링 및 트랜스-스플라이싱을 수행할 수도 있다. 상기 반응에는 3' 스플라이싱 부위가 필수적이 아니므로, 잘려진 트랜스-스플라이싱 리보자임은 고도의 특이성이 있는 엔도리보뉴클레아제처럼 작용해야 한다. 이 활성을 테스트하기 위해, 상기에 기술한 CAT-LacZ α-펩타이드 트랜스-스플라이싱 리보자임의 단축된 시험관내 전사체(SEQ ID NO.5 및 제3도)를 CAT mRNA 서열과 함께 항온처리하였다. CAT-LacZ 리보자임 카세트는 HindIII-EcoRI 단편상에 있다. ScaI 절단 부위는 3' 스플라이싱 부위의 5개 염기 상류의 위치를 표시한다. 리보자임은 예상된 단일 부위에서 표적 RNA를 특이적으로 절단하여 예상된 크기의 단편들을 생성시켰다.

V. 트랜스-스플라이싱 반응

CAT-LacZ α-펩타이드 리보자임이 5' 스플라이싱 부위에서 3'엑손 서열의 연결반응을 촉매하는 능력을 확인하기 위해, 다양한 형태를 방사성 표지된 CAT RNA와 함께 항온처리하였다. 여러 위치들, 즉 리보자임 핵의 말단에서 엑손 서열까지의 위치들 중의 하나에서 3' 절단된 DNA 주형으로부터 리보자임 전사체를 합성하였다. 표지된 CAT와의 항온처리는 기대한 스플라이싱 산물의 형성을 초래하였는데, 이 산물은 3' 엑손 서열의 범위에 따라 길이가 달랐다.

또한, 천연 테트라하이메나 서모필라 인트론과 유사하게. CAT-LacZ α-펩타이드 리보자임 분자들중 일부는 생체외에서 전사되는 동안 3' 스플라이싱 부위에서 자발적인 절단을 진행하였다. 또한, 3' 스플라이싱 부위에 인접한 구아노신 잔기가 말단인 이들 절단된 형태를 CAT RNA와 함께 항온처리하였다. 이 경우에, 리보자임 자체를 CAT RNA의 3' 부분에 연결시켜 크기가 약 550 뉴클레오티드인 생성물을 생성시켰다. 이 반응은 본래의 인트론의 자기-환형화와 유사하며, 동일한 연결 생성물이 기타 트랜스-스플라이싱 반응에서 발견되었다.

VI. 트랜스-스플라이싱의 정확성

CAT-LacZ α-펩타이드 트랜스-스플라이싱 반응의 생성물을 역전사시키고, 예측되는 스플라이싱 부위의 양쪽중 어느 한쪽의 서열과 상보적인 2개의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 증폭시켰다. 증폭된 서열을 클로닝하고 서열분석하였다. 개개의 재조합체는 스플라이싱된 생성물의 기대한 서열과 다르지 않았다. 본래의 인트론을 사용한 연구에서 발견되는 바와 같이, 스플라이싱은 매우 정확한 것 같다.

따라서, 상기 연구는 본 발명의 기준에 따라 구성된 트랜스-스플라이싱 리보자임이 생체외에서 정확하고 효과적인 트랜스-스플라이싱을 수행할 수 있음을 보여주고 있다.

[실시예 2]

식물 바이러스 내성을 제공하는 트랜스-스플라이싱 리보자임의 구성

오이 모자이크 바이러스(CMV)는 다수의 공지된 균주를 가진 유행성 바이러스이다. 9개 서열 균주는 RNA3 및 서브 게놈 mRNA4(SEQ ID NOS. 7-25 : 제4a도 및 제5도)내에서 암호화된 피복 단백질 시스트론의 개시 영역에 나타난다. 서열이 보존되어 있고, 피복 단백질의 AUG 개시 코돈 하류에 존재하는 두 부위를 선택하였다. DTA의 ile 돌연변이체를 CMV 피복 단백질 mRNA속으로 트랜스-스플라이싱시킬 수 있는 리보자임의 제조를 위한 올리고뉴클레오티드를 표 4b에 나타냈으며 하기에서 논의한다.

제 4c 도 및 제 4d 도에 나타낸 트랜스-스플라이싱 리보자임은 제 4b 도에 나타낸 CMV 바이러스 서열에 표적화되며, CMV RNA 분자의 절단뿐만 아니라 감염된 세포내에서 디프테리아 독소 A-쇄의 발현을 초래할 것이다. 제 4 도에 나타낸 트랜스-스플라이싱 카세트는 당분야에 공지된 기술을 사용하여 임의의 CMV-민감성 식물종으로 형질전환될 수 있고, 유전자전이된 자손은 CMV에 의해 감염될 수 있다. 바이러스 감염이 RNA 트랜스-스플라이싱을 통해 독소 생산을 개시하는데 필요하도록 리보자임을 구성하는데, 그 이유는 리보자임 자체는 해독되지 않기 때문이다. 독소의 발현으로 인한 감염된 세포들의 국부적 사멸은 인위적인 과민 반응을 일으키면서 식물내 바이러스의 복제 및 확산을 제안할 수 있다.

[실시예 3]

GaL4-디프테리아 독소 A 쇄 트랜스-스플라이싱 리보자임의 제조 및 특성 분석

본 발명 및 실시예 1에서 기술한 방법에 따라 GaL4-디프테리아 독소 A쇄 트랜스-스플라이싱 리보자임인 융합 리보자임을 구성하였다(제6도). 이 리보자임의 서열은 SEQ ID NO.6으로서 나타내었다. GAL4-DTA리보자임 카세트는 Sall-Xho I 단편이다. Sca I 부위는 3' 스플라이스 부위의 5개 염기 상류의 위치를 표시한다. 이 리보자임은 디프테리아 독소의 A쇄의 암호 서열을 GAL4 mRNA 의 5' 영역의 부위에 스플라이스시킬 수 있다. 이 트랜스-스플라이싱 활성은 시험관내(상기함) 및 생체내(하기함)둘다에서 활성이 있었다.

독성 산물을 암호화하는 서열을 트랜스-스플라이싱시키는 리보자임의 성공적인 구성을 위한 주요 기준은 트랜스-스플라이싱의 효과적이고 정확한 촉매작용 뿐만 아니라, 트랜스-스플라이싱이 없을 때 독성 유전자 예를 들면 DTA의 발현이 일어나지 않아야 한다는 것이다.

리보자임의 촉매 부분은 상기한 구성에 따라 제조하고, 5' 및 3' 스플라이스 부위는 각각 GAL4 및 DTA의 5' 암호영역내에서 선택된다. 3'엑손서열은 처음 AUG 코돈 및 몇개의 인접 아미노산이 제거된 것을 제외하고는, 진핵세포에서의 발현에 이미 사용된 DTA 유전자 서열에 상응한다. DTA의 본래의 C. 디프테리아 형태는 또한 상기 5' 영역에서 상이하며, 해독 개시를 위해 CUG 코돈을 이용한다. 본래의 DTA 서열은 또한 신호 펩타이드 리더 서열을 함유한다.

이들 리보자임 분자들은 3' 스플라이싱부위에서 자발적인 절제를 진행할 수 있다. DTA의 독성이 강하게

주어질 때, 임의의 방출된 3' 엑손 서열은 독성 해독 산물을 생성시키지 않는다는 것이 중요하다. DTA의 3' 엑손은 위치 13에서 인프레임(in-frame) 메티오닌을 함유하고, 이것은 절단상태이나 독성인 폴리펩타이드를 생성시킬 가능성이 있다. 이 가능성을 제거하기 위해, 야생형 서열(Rz-DTAmet)을 두 개의 분리된 리보자임 작제물(제6도)에서 상기 위치의 메티오닌으로부터 이소로이신(Rz-DTA_{ile}) 또는 로이신(Rz-DTA_{leu})으로 변이시켰다.

[실시예 4]

본 발명의 리보자임의 생체내 활성

Ⅰ. 도입

매우 도성인 디프테리아 독소 A 산물을 숙주 세포에 전달하는 상기(실시예 3 및 제6도)한 Gal4-디프테리아 독소 A 쇄 트랜스-스플라이싱 리보자임을 사용하여, 본 명세서에서 제공된 지침에 따라 구성된 리보자임의 생체내 활성 및 그러한 리보자임이 새로운 유전자 활성을 숙주 세포에 전달하는 능력을 측정하였다. 이 시스템에서, 초파리가 선택된 숙주이며, 초파리 숙주내에서 조직-특이적인 방법으로 본 발명의 리보자임의 발현을 조절하기를 기대하였다.

디프테리아 독소는 B 파지에 대해 용원성인 코리네박테리엄 디프테리아에 의해 분비된다. 상기 독소는 A 및 B 쇄를 생성시키는 단백질 분해를 진행하는 단일 폴리펩타이드로서 생성된다. A쇄(DTA)는 진핵세포 해독 신장 인자 EF-2에 특이성이 있는 강력한 ADP 리보실라제(ribosylase) 활성을 함유한다. 상기 효소가 단지 몇 분자만 존재하여도 다양한 진핵세포에서 해독의 중지 및 결과적인 사멸을 충분히 일으킨다. B쇄는 독소를 결합 만노즈 잔기에 의해 세포 표면 수용기에 부착시킴으로써 세포내의 전달을 일으키며, 세포내 이입(endocytosis)되고 소포 융합(vesicular fusion)에 의해 세포질로 들어간다.

B-쇄의 부재시에, A-쇄는 세포 외부에 존재할 때 독성이 훨씬 덜하다. 이 성질 및 맹독성은 전위성 절제 실험용도로 그 사용을 제시하였다. 예를 들면, DTA를 암호화하는 서열을, 발생중인 눈에서 발현을 촉진하는 옵신 프로모터를 사용하여 유전자전이된 생쥐에서 발현시켰다. 그 결과의 생쥐는 변형된 눈을 가진 장님이었다(참고문헌: Breitman M.L., Science 238 : 1563-1656(1987)). 기타 연구에서, 생쥐 췌장의 절제를 수행하였으며, 참고 문헌[Palmiter, R.D. 등, Cell 50 : 435-443(1987) 및 Wert S.E. 등, Am, Rev. Respir. Dis. 141(no. 4, part2): A695(1990)]에는 인간 표면 활성 단백질 C 유전자(Ⅱ형 페포 세포에서 발현됨) 및 DTA 유전자의 프로모터 및 5'주변 서열로 이루어진 이종 유전자의 사용에 의한 페포 세포의 절제를 기술하고 있다.

그러나, 이런 유형의 방법을 사용하면, 더 심각하거나 또는 치사성 표현형을 가질 수 있는 형질전환된 유기체를 유지하거나 번식시키는 것이 가능하지 않다. 게다가, 본래 그대로의 DTA 서열로 초파리 같은 특정 종을 형질전환시키는 것은 아직까지 보고되지 않았다. 그러한 형질전환 동안 DNA 유전자의 누수성 발현은 즉각적인 사멸을 초래한다.

Ⅱ. 초파리 시스템

초파리에서 유전자 발현을 목적으로 하는 일반적인 방법을 개발하였다. 첫째로, 본 시스템은 각각의 균주의 급속한 발생을 허용하는데, 이들 균주에서 전위성 유전자 발현은 상이한 조직 또는 세포 유형을 지향할 수 있다: 인핸서 검출 기술을 이용하여[참고 문헌; O'kane, C.J. 및 Gehring, W.J. Proc. Natl. Acad. Sci USA: 9123-9127(1987); Bellen et al. Genes and Development 3: 1288-1300(1989); Bier et al. Genes and Development 3: 1273-1287(1989)] 배, 유충 및 성체에서 광범위한 유형으로 전사 활성화 단백질을 발현시켰다. 둘째로, 본 방법은 활성화 인자를 그 표적 유전자로부터 별도의 계통으로 분리하여, 각각의 부모 계통이 생존 가능하도록 한다: 한 계통에서는 활성화 인자 단백질이 존재하지만, 활성화할 표적 유전자가 없으며, 두 번째 계통에서는 표적 유전자가 발현성이 없다. 그 두 계통을 교배시킬 때, 표적 유전자는 교배의 자손에서만 발현되고, 우성 표현형(차사형 포함)을 편리하게 연구할 수 있게 한다.

관심의 유전자만을 전위(轉位)적으로 발현시키기 위해서, 파리에서 내생표적을 갖지 않은 전사 활성화 인자가 필요하다. 효모의 활성화 인자인 Gal4는 파리에서 Gal4 결합 부위를 가지는 프로모터로부터만 전사를 활성화할 수 있다(Fischer et al, Nature 332: 843-865(1988)). 유전자 발현을 위해서는, Gal4 전사가 특성 분석된 파리 프로모터에 의해 추진되거나 또는 인핸서 없는 Gal4 유전자가 초파리 게놈에 무작위적으로 통합되어 게놈 인핸서의 다양한 배열의 조절하에 놓임으로써 Gal4는 2가지 방식으로 특정 세포에 제한된다. Gal4에 의한 활성의 전이(transactivation)를 분석하기 위해서는, Gal4를 발현시키는 파리를 Gal4 결합 부위에 의해 전사가 추진되는 lacZ 유전자를 보유하는 파리들과 교잡시킨다(참고문헌: Fischer et al. Nature 332: 853-865(1988)). β-갈락토시다제는 Gal4가 먼저 발현되는 상기 세포들에서만 발현된다. Gal4가 발현되고 다양한 유형이 확립되어 있는 균주들에서 lacZ의 조직-특이적 및 세포-특이적 활성전이를 증명하였다.

상기 시스템으로는 현재 하기와 같은 것이 가능하다:

1) 임의의 암호 서열의 상류에 Gal4 결합 부위를 위치시키고;

2) Gal4가 발현되는 세포내에서만 그 유전자를 활성화하고;

3) 발생에 대한 이러한 변이성 발현의 영향을 관찰한다. 전위성 발현이 치사성인 경우에, 상기 방법은 두 부모 계통(하나는 Gal4를 발현시키고, 다른 하나는 그 프로모터에 Gal4 결합 부위를 갖는 비발현성(silent)유전자를 보유함)이 안정하게 번식하게 된다. 그후 교잡의 자손에서 표현형을 연구할 수 있다.

Ⅲ. 벡터

상기 연구에서 출발 재료로서 이용되는 벡터들은 하기와 같은 것들이 있다:

1) pGATB 및 pGATN(제9도): 이 벡터들은 프로모터 없는 Gal4 유전자의 상류에 포로모터 및 인핸서를 클로닝하는데 사용된다.

특이적인 Not I 또는 Bam HI 부위가 Gal4 암호 영역의 상부에 삽입된 벡터를 제조하였다. 프로모터가 일단 Gal4 암호 서열에 연결되면, 그 유전자는 pHSREM 벡터 골격으로부터 절단되어(참고 문헌: Knipple 및 Marsella-Herrick, Nucl. Acids Res. 16: 7748(1988)) P-요소 벡터속으로 이동될 수 있다. Rh2 프로모터를 상기 벡터속으로 클로닝하고(참고 문헌: Mismer 등, Genetics 120: 173-180(1988)). Gal4가 단안(單眼: Ocelli)에서만 발현되는 파리를 만들었다.

2) pGawB: 이것은 인핸서 검출에 사용하기 위한 Gal4벡터이다.

인핸서 없는 Gal4 유전자를 벡터 plwB(참고 문헌: Wilson et al. Genes and Development 3: 1301-1313(1989))속으로 서브클로닝하여 pGawB를 만들었다. plwB를 먼저 Hin III로 처리하여 lacZ 유전자, 및 P-트랜스포자제 유전자의 N-말단을 제거하였다. 이것을 P-트랜스포자제 유전자의 TATA 박스뒤에 전체 Gal4 암호 영역으로 대체하였다.

3) pUAST(제10도): 이 플라스미드는 Gal USA의 하류에 암호 서열을 클로닝하는데 사용되었다.

Gal4 USA(Upstream Activation Sequence: 상류 활성화 서열)뒤에 유전자가 서브클로닝될 수 있는 벡터를 P-요소 벡터인 pCaSpeR3(C. Thummel, 유타주 솔트 레이크 시티의 유타 메디컬 센터 대학교, 개인정보)에서 제조하였다. 5개 Gal4 결합 부위를 삽입하였는데, 이 결합 부위 다음에는 hsp 70 TATA 박스와 전사 개시부, 폴리링커(polylinker) 및 SV40 인트론과 폴리아데닐화 부위가 있다. 유전자 또는 cDNA가 그속으로 삽입될 수 있는 특이 부위는 다음과 같다: Eco RI, Bgl II, Not, I, Xho I, Kpn I 및 Xbal.

IV. 초파리 균주

이들 연구에서 이용된 초파리 균주를 특성 분석하는데 사용된, 본원에서 기술한 유전적 기법은 당분야에서 널리 공지되어 있다(참고문헌 : D. Lindsley 및 E.H. Grell이 편집한 "드로소필라 멜라노개스터의 유전적 변형")

구성적으로 활성이 있는 트랜스포자제(Robertson et al., Genetics 118: 451-470(1988))를 고농도로 발현시키는 세 번째 염색체상의 결합성 P-요소인 △2-3를 보유하는 점프스타터(jumpstarter) 균주를 사용하여 P-요소 트랜스폰존을 이동시켰다. 삽입 계통을 생성시키고 지도를 만드는 데 현재 사용되는 3종의 종균은 인디애나주 47405 블루밍턴 조오던 홀 A503에 소재하는 인디애나 대학 생물학과의 초파리 종균 센터에 기탁하였다:

1: y w; +/+; Sb P[ry^{+}, △2-3]/TM 6, Ubx

2: w; +/+; TM3 Sb/CxD(기탁번호 제3665호)

3: w; Cyo/Sco; +/+(기탁번호 제3666호)

여기서, 3개의 염색체의 유전적 특징은 세미콜론으로 분리표시하였다. 따라서, 예를 들면, 균주 1에서 첫번째 염색체(X 염색체)는 황색 및 백색("yw")에 대해 상동 염색체이며, 두 번째 염색체는 야생형("+/+")이며, 세 번째 염색체는 그루터기(stubble) 유전자("Sb"), 및 P요소 트랜스포존 장미색 유전자("ry^{+}")와 △2-3을 보유하는 한편, 제2의 세번째 염색체는 균형 유지 역위("/TM6, Ubx")를 보유한다.

V. Gal4 발현 유형을 생성시키는 전략

A. 형질전환체를 분리하는 데 사용되는 계획

구성체를 하기 종균으로부터 유래된 배(胚)속으로 주입시킨다;

♀ ♀ y w/y w; △2-3, Sb/TM6, Ubx X ♂ ♂ y w/Y; △2-3, Sb/TM6, Ubx

Fo: 단일 계통을 확립한다.

♀ y w/y w; △2-3, Sb/TM6, Ubx X ♂ y w/Y; +/+ 또는

♂ y w/Y; △2-3, Sb/TM6, Ubx X ♀ y w/y w: +/+

F1:[w±] 및 [Sb±] 자손을 선별하고 종균을 확립한다.

♀ y w/y w; +/TM6, Ubx X ♂ y w/Y; +/+ 또는

♂ y w/Y; +/TM6, Ubx X ♀ y w/y w: +/+

B. 인핸서없는 Gal4 삽입체를 점프시키는데 사용되는 계획

1. X-염색체로부터 점프시킨다.

♀♀ FM3/FM7, w; +/+ X ♂♂ y w/Y; △2-3, Sb/TM6,Ubx

♀♀ FM7,w/ P[Gal4,w^{+}] X ♂♂ FM7/Y ; △2-3, Sb/+

♀♀ FM7,w/ P[Gal4,w^{+}]; △2-3,Sb/+ X ♂♂ y w/Y; +/+

♀ FM7, w/ y w ; △2-3, Sb/+ X ♂ y w/Y; +/+

[w^{+}] 및 [B] 자손을 선별하고 종균을 확립한다.

2. △2-3-염색체로부터 점프시킨다.

♀♀ y w/y w X ♂♂ y w/Y ; P[Gal4,w^{+}], △2-3, Sb/+

[w^+] 및 [B] 자손을 선별하고 종균을 확립한다.

C. 염색체 분리

삽입체의 분리를 분석하기 위해 다음 두 종균을 사용한다:

w;+/+; TM3, Sb/CxD 및 CyO/Sco; +/+

[방법]

세포-특이적이거나 조직-특이적인 방식으로 Gal4를 발현시키는 많은 균주를 만들기 위해, Gal4 유전자의 상이한 변형체를 가지는 인핸서 검출 벡터를 제조하였다. 전체-길이의 단백질 또는 절단된 단백질을 암호화하는 두 유전자를 장미색(ry^+) 및 백색(w^+) P-요소 벡터(plArB 및 plwB의 변형제 ; Wilson et al., Genes and Dwvelopment 3 : 1301-1313(1989)속으로 클로닝하였다. 검색요소로서 ry^+ 또는 w^+를 사용하여, △2-3 유전자(Robertson et al., Genetics 118: 461-470(1988))의 도입에 의해 상기 벡터들에 이동성을 부여하였다. Gal4의 발현 유형을 가시화하기 위해, Gal4 삽입 계통을 Gal4 UAS의 조절하의 lac Z 유전자를 보유하는 균주와 교잡시켰다(Fischer et al., Nature 332: 853-865(1988)). 상기 교잡으로부터 유도된 배, 유충 및 성체를, 기질로 X-gal을 사용한 효소 분석에 의해 또는 β-갈락토시다제에 대한 단일클론 항체로 염색하므로써, β-갈락토시다제 발현에 대해 검색하였다. UAS-lacZ 구성체가 암호화하는 β-갈락토시다제는 세포질에만 집중되어 있다.

대략 500개의 Gal4-삽입 균주를 검색하였고, 특정 조직에서 유전자를 활성화하는데 사용될 수 있는 많은 균주들이 동정되었으며, 상기 특정조직의 예로는 표지 줄무늬, 중배엽, 중추 신경계 및 말초 신경계가 있다. 많은 계통이 기타 조직에서뿐만 아니라 타액선에서 β-갈락토시다제를 발현시킨다. 인핸서 없는 Gal4 트랜스포존의 제조시에 위치-의존성 타액선 인핸서가 우연히 생길 가능성이 있다.

VI. 샘플 검색

균주의 번호	염색여부	타액선	기타조직	%
9	+	-	-	5.8
45	-	+	-	28.8
81	-	+	+	51.9
21	-	-	+	13.5
156				100.0

특정 유형으로 유전자(유전자 X)를 활성화하기 위해, Gal4 삽입 계통을 선별하고 GAL UAS뒤에 클로닝된 유전자 X를 보유하는 균주와 교잡하였다.

VII. 리보자임 없는 GAL4/UAS 시스템의 요약

Gal4/UAS 시스템은 유전자 활성을 조절하는 2-부분 시스템이다. 본 방법은 다향하며, 조직-특이적일 수 있으며, 아마도 본원에서 기술한 바와 같이 UAS-DTA 구성체의 경우를 제외하고는 발현의 기초 수준을 나타내는 것 같지 않다. 본 방법은 특성분석된 유전자를 전위적으로 발현시키고, 변형되지 않으면 유기체에 대해 치사성인 변형된 유전자를 발현시키고, 그리고 초파리 발생에 기타 종들의 유전자가 미치는 영향을 연구하기 위해 이들 유전자를 발현시키는데 사용될 수 있다. 본 방법은 우성의 증가-기능 돌연변이를 생성시키는 것이 가능하므로, 눈에 보이거나 또는 치사성인 표현형의 인핸서 또는 억제인자에 대한 검색 및 상위(上位, epistasis)성 테스트를 수행될 수 있다. Gal4 시스템은 또한 독성 산물의 발현으로부터 세포-특이적이고 조직-특이적인 절제의 결과를 연구할 수 있게 한다.

VIII. 본 발명의 DTA 리보자임과 함께 Gal4-발현성 초파리의 사용

DTA 단백질을 암호화하는 서열을 보유하고 있는 융합 리보자임의 발현을 pUAST 내 GAL4 UAS(상류 활성화 서열)의 조절하에서 수행하였다(제10도). 상기에 언급한 바와 같이, 변형된 P-요소 인핸서-포착 벡터를 사용하여 초파리의 많은 안정한 계통을 제조하였는데, 이들은 각각 발생중인 파리에서 특이적인 공간 및 시간적 유형으로 효모 전사 활성화인자 GAL4를 발현한다. GAL4 상류 활성화 서열(UAS)의 조절하의 임의의 유전자를 형질전환시키고 단일성으로 유지할 수 있고, 그후 GAL4를 발현시키는 계통들과의 유전적 교잡에 의해 특히 초파리 조직에서 유도시킬 수 있다(제7도). 그러나, 추가적인 변형없이 DTA 그 자체의 발현을 위해 Gal4 시스템을 이용하는 것은 불가능한데, 그것은 DTA의 누수성 발현을 통해 UAS-DTA 형질전환체를 제조하는데 있어서의 난점에 기인한다.

트랜스-스플라이싱 리보자임(제 6 도)를 통해 DTA를 조건적으로 발현시키는 수단으로서 상기 2-요소 시스템을 사용하면 상기 문제를 극복한다는 것을 발견하였다. GAL4를 발현시키는 상기 세포들에서, GAL4 단백질은 리보자임 전사에 필요한 활성을 제공하며, GAL4 mRNA 는 DTA 생산에 필요한 트랜스-스플라이싱 반응의 표적을 제공한다.

초파리 배를, 당분야에 공지된 기술을 사용하여 상기한 것처럼 UAS 프로모터의 조절하에 놓여진 리보자임 서열과 함께 주입할 수 있다. R_z-DTA_{met} 구성체를 주입한 배는 생존하지 못하는 반면, 정상적으로 형질전

환된 파리를, R_z-DTA_{ile} 및 R_z-DTA_{leu}을 주입한 배로부터 수득하였다. 이 결과는 내부 AUG 코돈이 주입후 독성 산물의 해독을 위한 개시 코돈으로 사실상 작용한다는 것을 암시한다. 상기 코돈은 DTA 서열내에 제안된 NAD^+ 결합부위에 인접해 있고, 슈도모나스 에어러지노사의 또 다른 EF-2 특이적인 ADP-리보실라제인, 연관 관계가 먼외독소 A에서 보존된 서열에 인접해 있다.

GAL4 UAS의 조절하의 R_z-DTA_{ile} 및 R_z-DTA_{leu} 서열을 함유하는 유전자 전이된 파리를 특이한 발현 유형으로 GAL4를 생성시키는 파리와 교잡시켰다. 예를 들면, 하나의 특성 분석된 계통, 계통 1J3에서, GAL4 유전자를 털(hairy) 유전자 근처에 삽입하고, 그 발현 유형을 반영시켰다. 털 유전자 산물을 배발생 동안 짝수개의 복부 분절의 표피 줄무늬에 생성시켰다. UAS-추진된 LacZ 유전자를 GAL4가 털유전자 산물과 동일한 유형으로 발현되는 1J3속으로 도입시킬 경우, β-갈락토시다제는 짝수의 줄무늬내에 국소화되는 것을 발견하였다.

R_z-DTA_{leu} 유전자를 함유한 파리를 이 GAL4-발현 계통과 교잡시킬 경우, 정상적인 자손이 얻어졌다. 하지만, R_z-DTA_{ile} 유전자를 함유하는 파리를 이 GAL4-발현 계통과 교잡시킬 경우, 자손의 발생은 배발생단계에서 멈추었다. 보다 어두운 색깔의 밴드가 배의 소피(Cuticles)상에 분명하게 나타났는데, 이것은 밑에 있는 세포들의 사멸과 일치한다. 소피 제조물을 검사했을 때, 짝수개의 상아립(象芽粒, denticle) 밴드가 파괴되거나 상실되었으며, 특히 4번째, 6번째 및 8번째 줄무늬의 밴드들이 그러하였다(제11도).

R_z-DTA_{ile}를 함유하는 파리를 상이한 GAL4 발현 유전자와 교잡시킬 때 세포 사멸의 기타 특이적 유형이 관찰되었다.

[구성(Design)]

프로-리보자임의 구성을 위한 테스트로서, 전술한 CAT-LacZ 트랜스-스플라이싱 리보자임을 변형시켰다(제2도). 계통발생학적 비교 및 돌연변이 분석[참조: Cech, Ann Rev. Biochem. 59 : 543-568(1990)]은 그룹 I 셀프-스플라이싱 인트론의 코어 영역이 고도로 보존되어 있고, 활성에 중요함을 나타냈다(제8도). 트랜스-스플라이싱 프로-리보자임의 제조를 위해, 이 영역에 바로 인접한 나선 P8을 파괴시켰다. 첫번째 실험에서는, 새로운 서열의 13 또는 18 뉴클레오티드를 나선 P8의 5' 가닥 및 루프속으로 도입하여 프로-리보자임 1 및 2를 각각 생성시켰다. 여분의 뉴클레오티드들은 리보자임의 5' "안티센스" 부분과 상보적인 반면, 인접 서열들은 (1) P8의 염기의 실제 서열 및 (2) P8 내에서 가능한 염기쌍 형성의 정도를 보존하도록 조정하였다(제13도). 프로-리보자임의 5' "안티-센스" 영역과 나선 P8로 삽입된 서열들 사이의 자기-상보성의 정도는, 이 새로운 나선이 나선 P8에 우선하여 초기 전사체내에 형성되는 것으로 기대된다. 또한, 상기 대체 나선의 형성은 리보자임의 촉매 핵내에 주변의 2차 및 아마도 3차 상호작용을 파괴할 것으로 기대된다. 따라서, 프로-리보자임의 부적합-폴딩은 프로-리보자임을 촉매적으로 불활성이 되도록 할 것이다(제14도). 그러나, 의도한 표적 RNA와 프로-리보자임의 염기쌍 형성은 P8-"안티센스" 염기쌍을 대체하고, "안티-센스" 서열을 격리하고, P8 나선 및 활성 촉매 도메인의 재형성을 허용한다. P8-"안티센스" 나선의 대체는 더 많은 양의 염기쌍 형성을 일으키고, 촉매 도메인의 적합한 폴딩을 허용하므로써 에너지학적으로 유리하다.

CAT-LacZ 프로-리보자임

상기한 PCR-돌연변이 유발을 이용하여 2개의 CAT-LacZ 프로-리보자임에 해당하는 클로닝된 서열을 제조하고, 생체외에서의 전사에 의해 RNA를 생성시켰다. CAT-LacZ 트랜스-스플라이싱 리보자임이 인트론 서열에 의해 촉매되는 가수 분해의 결과로서, 3'스플라이싱 연결부에서 전사하는 동안 절단이 이루어짐을 관찰하였다. 변형되지 않은 테트라하이메나 서모필라 인트론의 생체외 전사체내에 유사한 가수분해가 나타난다. 대조적으로, 상이한 CAT-LacZ 프로-리보자임의 전사체는 동일한 조건하에서 더 안정하여 거의 절단이 되지 않는다(제15도). 이것은 프로-리보자임이 불활성인 것을 나타내는데, 그것은 촉매 서열이 부적합-폴딩될 경우 기대되는 것이다. 프로-리보자임의 끝이 절단된 형태를 CAT RNA에 대해 지시되는 특이적 엔도리보뉴클레아제 활성에 대해 테스트하였다. CAT-LacZ 프로-리보자임 RNA를 ScaI 부위에서 끝이 절단된 주형으로부터 전사시켜, 3' 스플라이싱 연결부 및 LacZ 서열을 제거하였다. 3' 스플라이싱부위의 제거후, 리보자임과 프로-리보자임 RNA는 둘다 안정하였다. CAT RNA와 절단된 프로-리보자임을 항온처리하여 표적 RNA의 특이적 절단을 일으켜서 기대한 크기의 단편들을 수득하였다(제16도). 특이적 절단 활성은 37, 45 및 50℃에서 나타났다.

GAL4-DTA 트랜스-스플라이싱 리보자임의 프로-리보자임을 또한 제조하였다(제17도). 20 뉴클레오티드의 영역("안티센스" 영역에 상보적임)을 나선 P8의 5' 가닥 및 루프속으로 삽입하였다. 두 개의 프로-리보자임은 변형된 나선 P8에서 가능한 염기쌍 형성의 정도가 다르며, GAL4-DTA 프로-리보자임 1은 긴 스템 및 루프내에 보다 적은(3) 접근가능한 염기를 가진다. GAL4-DTA 프로-리보자임 2의 나선 P8은 "안티센스"영역과 상보적인 서열을 함유하는 보다 큰 루프(14 염기)를 가진, CAT-LacZ 프로-리보자임 2의 나선 P8과 유사하였다. GAL4-DTA 프로-리보자임의 전사체는 변형되지 않은 리보자임의 전사체보다 더 안정하였다. 특히, 프로-리보자임 2는 리보자임 형태의 본질적으로 완전한 자기-절단을 초래하는 조건에서 항온처리(50℃, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM GTP에서 30분; 제18도)한후, 거의 원상태를 유지했다.

이제 본 발명을 완전히 기술하였으므로, 당분야의 숙련된 자들은 본 발명의 발명 사상 또는 범위 또는 이들의 임의의 양태를 침해하지 않고, 넓고 동등한 범위의 조건, 변수등 내에서 발명을 수행할 수 있음을 이해할 것이다.

[서열 목록]

(1) 일반 정보 :

(ⅰ) 출원인 : 하스로프, 제임스, 굳만, 하워드 엠

(ii) 발명의 명칭 : 트랜스-스플라이싱 리보자임을 사용한 세포 절제

(iii) 서열 갯수 : 56

(iv) 주소 :

(A) 수신인 : 스텐, 케슬러, 골드스타인 및 폭스

(B) 거리명 : 엔. 더블유., 코네티컷 에비뉴 1225,-슈트 300

(C) 도시명 : 워싱턴

(D) 주 : 디씨

(E) 국명 : 미합중국

(F) 우편번호 : 2003

(v) 컴퓨터 판독 형태 :

(A) 매체 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환성

(C) 작동 시스템 : PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어 : Patent In Release #1.0 버전 #1.25

(vi) 현 출원 자료:

(A) 출원번호 : PCT

(B) 출원일 : 동시

(C) 분류

(vii) 종래 출원 자료 :

(A) 출원번호 : US 07/642,330

(B) 출원일 : 1991. 1. 17

(viii) 대리인/회사 정보 :

(A) 명칭 : 골드스타인, 조지 에이

(B) 등록번호 : 29,021

(C) 참고/도켓 번호 : 0609,3476604

(xi) 통신 :

(A) 전화번호 : (202)833-7533

(B) 텔레펙스 : (202)833-8716

(2) SEQ ID NO : 1에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 517 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 1 :

TGACGCAATT CAACCAAGCG CGGGTAAACG GCGGGAGTAA CTATGACTCT 50

CTAAATAGCA ATATTTACCT TTGGAGGGAA AAGTTATCAG GCATGCACCT 100

CCTAGCTAGT CTTTAAACCA ATAGATTGCA TCGGTTTAAA AGGCAAGACC 150

GTCAAATTGC GGGAAAGGGG TCAACAGCCG TTCAGTACCA AGTCTCAGGG 200

GAAACTTTGA CATGGCCTTG CAAAGGGTAT GGTAATAAGC TGACGGACAT 250

GGTCCTAACC ACGCAGCCAA GTCCTAAGTC AACAGATCTT CTGTTGATAT 300

GGATGCAGTT CACAGACTAA ATGTCGGTCG GGGAAGATGT ATTCTTCTCA 350

TAAGATATAG TCGGACCTCT CCTTAATGGG AGGTAGCGGA TGAATGGATG 400

CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT ATGCGAAAGT ATATTGATTA 450

GTTTTGGAGT ACTCGTAAGG TAGCCAAATG CCTCGTCATC TAATTAGTGA 500

CGCGCATGAA TGGATTA 517

(2) SEQ ID NO : 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 82 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 2 :

GGCCAAGCTT CTTTACGATG CCATTGGGAT ATATCAACCG TGGTATAAAC 50

CCGTGGTTTT TAAAAGTTAT CAGGCATGCA CC 82

(2) SEQ ID NO : 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 47 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 3 :

GATTAGTTTT GGAGTACTCG TACGGATTCA CGGCCGTCGT TTTACAA 47

(2) SEQ ID NO : 4에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 43 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 4 :

GGCCGAATTC TTACAATTTC CATTCAGGCT GCGCAACTGT TGG 43

(2) SEQ ID NO : 5에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 623 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 5 :

GGGAGACCGG AAGCTTCTTT ACGATGCCAT TGGGATATAT CAACGGTGGT 50

ATAAAGCCGT GGTTTTTAAA AGTTATCAGG CATGCACCTG GTAGCTAGTC 100

TTTAAACCAA TAGATTGCAT CGGTTTAAAA GGCAAGACCG TCAAATTGCG 150

GGAAAGGGGT CAACAGCCGT TCAGTACCAA GTCTCAGGGG AAACTTTGAG 200

ATGGCCTTGC AAAGGGTATG GTAATAAGCT GACGGACATG GTCCTAACCA 250

CGCAGCCAAG TCCTAAGTCA ACAGATCTTC TGTTGATATG GATGCAGTTC 300

ACAGACTAAA TGTCGGTCGG GGAAGATGTA TTCTTCTCAT AAGATATAGT 350

CGGACCTCTC CTTAATGGGA GCTAGCGGAT GAAGTGATGC AACACTGGAG 400

CCGCTGGGAA CTAATTTGTA TGCGAAAGTA TATTGATTAG TTTTGGAGTA 450

CTCGTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC 500

CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG 550

CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC 600

GCAGCCTGAA TGGAAATTGT AAG 623

(2) SEQ ID NO : 6에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 1038 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 6 :

GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60

AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120

AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180

GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240

CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300

AATGTCGGTC GGGGAAGATG TATTCTTCTC ATAAGATATA GTCGGACCTC TCCTTAATGG 360

GAGCTAGCGG ATGAAGTGAT GCAACACTGG AGCCGCTGGG AACTAATTTG TATGCGAAAG 420

TATATTGATT AGTTTTGGAG TACTCGTCTC GATGATGTTG TTGATTCTTC TAAATCTTTT 480

GTGATTGAAA ACTTTTCTTC GTACCACGGG ACTAAACCTG GTTATGTAGA TTCCATTCAA 540

AAAGGTATAC AAAAGCCAAA ATCTGGTACA CAAGGAAATT ATGACGATGA TTGGAAAGGG 600

TTTTATAGTA CCGACAATAA ATACGACGCT GCGGGATACT CTGTAGATAA TGAAAACCCG 660

CTCTCTGGAA AAGCTGGAGG CGTGGTCAAA GTGACGTATC CAGGACTGAC GAAGGTTCTC 720

GCACTAAAAG TGGATAATGC CGAAACTATT AAGAAAGAGT TAGGTTTAAG TCTCACTGAA 780

CCGTTGATGG AGCAAGTCGG AACGGAAGAG TTTATCAAAA GGTTCGGTGA TGGTGCTTCG 840

CGTGTAGTGC TCAGCCTTCC CTTCGCTGAG GGGAGTTCTA GCGTTGAATA TATTAATAAC 900

TGGGAACAGG CGAAAGCGTT AAGCGTAGAA CTTGAGATTA ATTTTGAAAC CCGTGGAAAA 960

CGTGGCCAAG ATGCGATGTA TGAGTATATG GCTCAAGCCT GTGCAGGAAA TCGTGTCAGG 1020

CGATCTTTGT GACTCGAG 1038

(2) SEQ ID NO : 7에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 134 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 7 :

GTTTAGTTGT TCACCTGAGT CGTGTGTTTT GTATTTTGCG TCTTAGTGTG 50

CCTATGGACA AATCTGGATC TCCCAATGCT AGTAGAACCT CCCGGCGTCG 100

TCGCCCGCGT AGAGGTTCTC GGTCCGCTTC TGGT 134

(2) SEQ ID NO : 8에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 134 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 8 :

GTTTAGTTGT TCACCTGAGT CGTGTTTTCT TTGTTTTGCG TCTCAGTGTG 50

CCTATGGACA AATCTGGATC TCCCAATGCT AGTAGAACCT CCCGGCGTCG 100

TCGCCCGCGT AGAGGTTCTC GGTCCGCTTC TGGT 134

(2) SEQ ID NO : 9에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 152 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 9 :

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAGAGTGT TTGTGCTGTG TTTTCTCTTT 50

TGTGTCGTAG AATTGAGTCG AGTCATGGAC AAATCTGAAT CAACCAGTGC 100

TGGTCGTAAC CGTCGACGTC GTCCGCGTCG TGGTTCCCGC TCCGCCCCCT 150

CC 152

(2) SEQ ID NO : 10에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 152 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 10 :

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAGAGTGT GTGTGCTGTG TTTTCTCTTT 50

TGTGTCGTAG AATTGAGTCG AGTCATGGAT AAATCTGAAT CAACCAGTGC 100

TGGTCGTAAC CGTCGACGTC GTCCGCGTCG TGGTTCCCGC TCCGCCTCCT 150

CC 152

(2) SEQ ID NO : 11에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 131 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 11 :

AGAGAGTGTG TGTGCTGTGT TTTCTCTTTT GTGTCGTAGA ATTGAGTCGA 50

GTCATGGACA AATCTGAATC AACCAGTGCT GGTCGTAACC GTCGACGTCG 100

TCCGCGTCGT GGTTCCCGCT CCGCCCCCTC C 131

(2) SEQ ID NO : 12에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 154 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 12 :

GTTATTGTCT ACTGATTGTA TAAAGAGTGT GTGTGTGCTG TGTTTTCTCT 50

TTTACGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 100

GCTGGTCGCA ACCGTCGACG TCGTCCGCGT CGTGGTTCCC GCTCCGCCCC 150

CTCC 154

(2) SEQ ID NO : 13에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 154 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 13 :

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAGAGTGT GTGTGTGCTG TGTTTTCTCT 50

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 100

GCTGGTCGTA ACCGTCGACG TCGTTTGCGT CGTGGTTCCC GCTCCGCCTC 150

CTCC 154

(2) SEQ ID NO : 14에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 130 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 14 :

GAGTGTGTAT GTGCTGTGTT TTCTCTTTTG TGTCGTAGAA TTGAGTCGAG 50

TCATGGACAA ATCTGAATCA ACCAGTGCTG GTCGTAACCG TCGACGTCGT 100

CCGCGTCGTG GTTCCCGCTC CGCCCCCTCC 130

(2) SEQ ID NO : 15에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 152 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 15 :

GTTATTGTCT ACTGACTATA TAGAGAGTGT GTGTGCTGTG TTTTCTCTTT 50

TGTGTCGTAG AATTGAGTCG AGTCATGGAC AAATCTGAAT CAACCAGTGC 100

TGGTCGTAAC CATCGACGTC GTCCGCGTCG TGGTTCCCGC TCCGCCCCCT 150

CC 152

(2) SEQ ID NO : 16에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 78 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 16 :

GGAGGGGGCG GAGCGGGAAC CACGACGCGG ACGACGTCGA CGGTTACGAC 50

CAGCCCTGGT AGATTCAGAT TTGTCCAT 78

(2) SEQ ID NO : 17에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 49 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 17 :

TTTGCGTCTT AGTGTGCCTA TGGACAAATC TGGATCTCCC AATGCTAGT 49

(2) SEQ ID NO : 18에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 56 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 18 :

TTTGCGTCTC AGTGTGCCTA TGGACAAATC TGGATCTCCC AATGCTAGT 49

(2) SEQ ID NO : 19에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 56 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 19 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 20에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 56 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 20 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ATAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 21에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 56 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 21 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 22에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 56 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 22 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 23에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 56 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 23 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 24에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 56 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 24 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 25에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 56 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 25 :

TTTGTGTCGT AGAATTGAGT CGAGTCATGG ACAAATCTGA ATCAACCAGT 50

GCTGGT 56

(2) SEQ ID NO : 26에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 56 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 26 :

AATTTTGTGT CGTAGAATTG AGTCGAGTCA TGGACAAATC TGAATCAACC 50

AGTGCTGCA 59

(2) SEQ ID NO : 27에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 51 염기

(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 27 :

GCACTGGTTG ATTCAGATTT GTCCATGACT CGAGTCAATT CTACGAGACA 50

A 51

(2) SEQ ID NO : 28에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 59 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 28 :

AATTTTGTGT CGTAGAATTG AGTCGAGTCA TGGACAAATC TGAATCAACC 50

AGTGCTGCA 59

(2) SEQ ID NO : 29에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 23 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 29 :
AGCATTGGTA TCATCAGGTT TGT 23
(2) SEQ ID NO : 30에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 21 염기
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 30 :
GTTGATGATG TTGTTGATTC T 21
(2) SEQ ID NO : 31에 대한 정보 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 10 아미노산
(B) 종류 : 아미노산

(C) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 펩타이드

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 31 :

MET ASP LYS PHE ASP ASP VAL VAL ASP SER
5 10

(2) SEQ ID NO : 32에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 30 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 32 :

ATGGACAAAT TTGATGATGT TGTTGATTCT 30

(2) SEQ ID NO : 33에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 59 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 33 :

AATTTTGTGT CGTAGAATTG AGTCGAGTCA TGGACAAATC TGAATCAACC 50

AGTGCTGCA 59

(2) SEQ ID NO : 34에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 17 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 34 :

AGCCATCCTT GGTTCAG 17

(2) SEQ ID NO : 35에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 15 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 35 :

GTAAGGGTGG ATGTT 15

(2) SEQ ID NO : 36에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 10 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 펩타이드

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 36 :

MET ASP LYS SER GLU LEU ARG VAL ASP VAL
1 5 10

(2) SEQ ID NO : 37에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 30 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 37 :

ATGGACAAAT CTGAATTAAG GGTGGATGTT 30

(2) SEQ ID NO : 38에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 70 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 38 :

TCTCGATGAT GTTGTTGATT CTTCTAAATC TTTTGTGATG GAAAACTTTT 50

CTTCGTACCA CGGGACTAAA 70

(2) SEQ ID NO : 39에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 11 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 펩타이드

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 39 :

MET GLU ASN PHE SER SER TYR HIS GLY THR LYS
1 5 10

(2) SEQ ID NO : 40에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 70 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 40 :

TCTCGATGAT GTTGTTGATT CTTCTAAATC TTTTGTGATG GAAAACTTTT 50

CTTCGTACCA CGGGACTAAA 70

(2) SEQ ID NO : 41에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 70 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 41 :

TCTCGATGAT GTTGTTGATT CTTCTAAATC TTTTGTGATG GAAAACTTTT 50

CTTCGTACCA CGGGACTAAA 70

(2) SEQ ID NO : 42에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 78 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 42 :

ATGAAGCTTC TCGATGATGT TGTTGATTCT TCTAAATCTT TTGTGATGGA 50

AAACTTTTCT TCGTACCACG GGACTAAA 78

(2) SEQ ID NO : 43에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 26 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 펩타이드

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 43 :

MET LYS LEU LEU ASP ASP VAL VAL ASP SER SER LYS SER PHE VAL
1 5 10 15

MET GLU ASN PHE SER SER TYR HIS GLY THR LYS
20 25

(2) SEQ ID NO : 44에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 41 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 44 :

ATGGAGAAAA AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT C 41

(2) SEQ ID NO : 45에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 17 아미노산

(B) 종류 : 아미노산

(C) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 펩타이드

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 45 :

MET GLU LYS LYS ILE THR ASP SER LEU ALA VAL VAL LEU GLN ARG
1 5 10 15

ARG ASP
17

(2) SEQ ID NO : 46에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 51 염기

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 단일

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : 핵산

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 46 :

ATGGAGAAAA AAATTACGGA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA 50

C 51

(2) SEQ ID NO : 47에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 40 염기쌍
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 47 :

ATGAAGCTAC TGTCTTCTAT CGAACAAGCA TGCGATATTT 40

(2) SEQ ID NO : 48에 대한 설명 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 20 아미노산
(B) 종류 : 아미노산
(C) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 펩타이드
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 48 :

MET LYS LEU LEU ASP ASP VAL VAL ASP SER SER LYS SER PHE VAL
1 5 10 15

MET GLU ASN PHE SER
20

(2) SEQ ID NO : 49에 대한 설명 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 60 염기쌍
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 단일
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : 핵산
(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 49 :

ATGAAGCTTC TCGATGATGT TGTTGATTCT TCTAAATCTT TTGTGATGGA 50

AAACTTTTCT 60

(2) SEQ ID NO : 50에 대한 설명 :
(i) 서열 특성 :
(A) 길이 : 72 염기쌍
(B) 종류 : 핵산
(C) 가닥형태 : 이중
(D) 형태 : 선형
(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 50 :

AUGGAGAAAA AAAUCACUGG AUAUACCACC GUUGAUAUAU CCCAAUGGCA UCGUAAAGAA 60

CAUUUUGAGG CA 72

(2) SEQ ID NO : 51에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 479 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 51 :

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGG AAGAUGUAUU CUUCUCAUAA CAUAUAGUCG GACCUCUCCU UAAUGGGAGC 360

UAGCGGAUGA AGUGAUGCAA CACUGGAGCC GCUGGGAACU AAUUUGUAUG CGAAAGUAUA 420

UUGAUUAGUU UUGGAGUACU CGUACGGAUU CACUGGCCGU CCUGUUACAA CGUCGUGAC 479

(2) SEQ ID NO : 52에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 479 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 52 :

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGG AAGAUGUAUU CUUCUCAUAA CAUAUAGUCG GACCUCUCCU UAAUGGGAGC 360

UAGCGGAUGA AGUGAUGCAA CACUGGAGCC GCUGGGAACU AAUUUGUAUG CGAAAGUAUA 420

UUGAUUAGUU UUGGAGUACU CGUACGGAUU CACUGGCCGU CCUGUUACAA CGUCGUGAC 479

(2) SEQ ID NO : 53에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 480 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : RNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 53 :

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGA CCGUUGAUAU AUGGUUCAUA ACAUAUAGUC GGACCUCUCC UUAAUGGGAG 360

CUAGCGGAUG AAGUGAUGCA ACACUGGAGC CGCUGGGAAC UAAUUUGUAU GCGAAAGUAU 420

AUUGAUUAGU UUUGGAGUAC UCGUACGGAU UCACUGGCCG UCCUGUUACA ACGUCGUGAC 480

(2) SEQ ID NO : 54 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 487 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 54:

AAGCUUCUUU ACGAUGCCAU UGGGAUAUAU CAACGGUGGU AUAAAGCCGU GGUUUUUAAA 60

AGUUAUCAGG CAUGCACCUG GUAGCUAGUC UUUAAACCAA UAGAUUGCAU CGGUUUAAAA 120

GGCAAGACCG UCAAAUUGCG GGAAAGGGGU CAACAGCCGU UCAGUACCAA GUCUCAGGGG 180

AAACUUUGAG AUGGCCUUGC AAAGGGUAUG GUAAUAAGCU GACGGACAUG GUCCUAACCA 240

CGCAGCCAAG UCCUAAGUCA ACAGAUCUUC UGUUGAUAUG GAUGCAGUAC AGACUAAAUG 300

UCGGUCGGGA CCGUUGAUAU AUCCCAAACG GUUCAUAACA UAUAGUCGGA CCUCUCCUUA 360

AUGGGAGCUA GCGGAUGAAG UGAUGCAACA CUGGAGCCGC UGGGAACUAA UUUGUAUGCG 420

AAAGUAUAUU GAUUAGUUUU GGAGUACUCG UACGGAUUCA CUGGCCGUCC UGUUACAACG 480

UCGUGAC 487

(2) SEQ ID NO : 55에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 1044 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 55 :

GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60

AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120

AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180

GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240

CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300

AATGTCGGTC GGGGAACAAC ATGCGATATT GTTCTCATAA GATATAGTCG GACCTCTCCT 360

TAATGGGAGC TAGCGGATGA AGTGATGCAA CACTGGAGCC GCTGGGAACT AATTTGTATG 420

CGAAAGTATA TTGATTAGTT TTGGAGTACT CGTCTCGATG ATGTTGTTGA TTCTTCTAAA 480

TCTTTTGTGA TTGAAAACTT TTCTTCGTAC CACGGGACTA AACCTGGTTA TGTAGATTCC 540

ATTCAAAAAG GTATACAAAA GCCAAAATCT GGTACACAAG GAAATTATGA CGATGATTGG 600

AAAGGGTTTT ATAGTACCGA CAATAAATAC GACGCTGCGG GATACTCTGT AGATAATGAA 660

AACCCGCTCT CTGGAAAAGC TGGAGGCGTG GTCAAAGTGA CGTATCCAGG ACTGACGAAG 720

GTTCTCGCAC TAAAAGTGGA TAATGCCGAA ACTATTAAGA AAGAGTTAGG TTTAAGTCTC 780

ACTGAACCGT TGATGGAGCA AGTCGGAACG GAAGAGTTTA TCAAAAGGTT CGGTGATGGT 840

GCTTCGCGTG TAGTGCTCAG CCTTCCCTTC GCTGAGGGGA GTTCTAGCGT TGAATATATT 900

AATAACTGGG AACAGGCGAA AGCGTTAAGC GTAGAACTTG AGATTAATTT TGAAACCCGT 960

GGAAAACGTG GCCAAGATGC GATGTATGAG TATATGGCTC AAGCCTGTGC AGGAAATCGT 1020

GTCAGGCGAT CTTTGTGACT CGAG 1044

(2) SEQ ID NO : 56에 대한 설명 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 1047 염기쌍

(B) 종류 : 핵산

(C) 가닥형태 : 이중

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 종류 : DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 56 :

GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60

AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120

AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180

GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240

CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300

AATGTCGGTC GGGCAAACAT GCGATATTTG CCGTTTGTCA TAAGATATAG TCGGACCTCT 360

CCTTAATGGG AGCTAGCGGA TGAAGTGATG CAACACTGGA GCCGCTGGGA ACTAATTTGT 420

ATGCGAAAGT ATATTGATTA GTTTTGGAGT ACTCGTCTCG ATGATGTTGT TGATTCTTCT 480

AAATCTTTTG TGATTGAAAA CTTTTCTTCG TACCACGGGA CTAAACCTGG TTATGTAGAT 540

TCCATTCAAA AAGGTATACA AAAGCCAAAA TCTGGTACAC AAGGAAATTA TGACGATGAT 600

TGGAAAGGGT TTTATAGTAC CGACAATAAA TACGACGCTG CGGGATACTC TGTAGATAAT 660

GAAAACCCGC TCTCTGGAAA AGCTGGAGGC GTGGTCAAAG TGACGTATCC AGGACTGACG 720

AAGGTTCTCG CACTAAAAGT GGATAATGCC GAAACTATTA AGAAAGAGTT AGGTTTAAGT 780

CTCACTGAAC CGTTGATGGA GCAAGTCGGA ACGGAAGAGT TTATCAAAAG GTTCGGTGAT 840

GGTGCTTCGC GTGTAGTGCT CAGCCTTCCC TTCGCTGAGG GGAGTTCTAG CGTTGAATAT 900

ATTAATAACT GGGAACAGGC GAAAGCGTTA AGCGTAGAAC TTGAGATTAA TTTTGAAACC 960

CGTGGAAAAC GTGGCCAAGA TGCGATGTAT GAGTATATGG CTCAAGCCTG TGCAGGAAAT 1020

CGTGTCAGGC GATCTTTGTG ACTCGAG 1047

(57) 청구의 범위

청구항 1

테트라하이메나 서모필라의 그룹 I 인트론의 촉매 코어로부터 유래된 트랜스-스플라이싱 리보자임을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자로서, 상기 리보자임의 서열은 (1) 상기 리보자임 표적 RNA에 하이브리드화하도록 표적화하기에 충분하며 표적 RNA와 리보자임 사이에 나선 P1이 형성되도록 하는 제1 RNA 서열 및 (2) 상기 리보자임의 트랜스-스플라이싱 활성의 결과로서 상기 표적 RNA의 우라실 잔기 바로 뒤의 위치에 동일선상으로 전달될 수 있는 제2 RNA 서열을 포함하는 융합 RNA이며, 이때, 상기 폴리뉴클레오티드 분자의 발현은 전사 활성화 단백질의 발현과 작동적으로 연결되며, 상기 제1 RNA 서열은 상기 전사 활성화 단백질을 암호화 하는 RNA에 혼성화되는 서열인 것인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전사 활성화 인자가 GAL4인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2 RNA 서열이 숙주 세포에 독성인 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 펩타이드가 DTA 펩타이드인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 DTA 펩타이드가 돌연변이 펩타이드 서열인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 돌연변이 펩타이드 서열이 서열 번호(SEQ ID. NO.)40에 의해 암호되는 아미노산들을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 돌연변이 펩타이드 서열이 서열 번호 41에 의해 암호화되는 아미노산들을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제1 RNA 서열이 GAL4 RNA에 혼성화되는 서열이며, 제2 RNA 서열이 DTA 펩타이드를 암호화하는 서열인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 RNA인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 10

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 RNA인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 11

리보자임 발현 카세트(cassette)를 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자로서, 상기 카세트가 숙주의 게놈속으로 안정하게 삽입될 수 있으며, 그러한 숙주에서 기능할 수 있으며 제1항 내지 제9항중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드의 암호 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 12

제11항에 따른 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 바이러스 세포인 숙주 세포.

청구항 14

제12항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 15

제12항에 있어서, 진핵세포인 숙주 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 진핵세포가 식물세포인 숙주 세포.

청구항 17

제15항에 있어서, 진핵세포가 동물세포인 숙주 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 동물 초파리인 숙주 세포.

청구항 19

제17항에 있어서, 동물이 포유류인 숙주 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 동물이 인간인 숙주 세포.

청구항 21

(1) 제2폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있는 서열을 포함하는 제9항에 따른 폴리뉴클레오티드 분자를 트랜스-스플라이싱 반응 혼합물에 제공하는 단계; (2) 상기 반응 혼합물에 상기 제2 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계 ; 및 (3) 상기 조건하에서 상기 제2 폴리뉴클레오티드의 트랜스-스플라이싱을 촉매하는 단계를 포함하는 시험관내 트랜스-스플라이싱 방법.

청구항 22

(1) 제9항에 따른 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 제공하는 단계; (2) 상기 숙주 세포내에서 상기 분자에 의해 암호화된 리보자임을 발현시키는 단계 ; 및 (3) 상기 숙주 세포내에서 상기 리보자임의 기질을 발현시키는 단계; (4) 상기 숙주 세포내에서 상기 리보자임과 상기 기질의 트랜스-스플라이싱을 촉매하

는 단계를 포함하는 생체내 트랜스-스플라이싱 방법.

청구항 23

(1) 표적 RNA에 대한 촉매 활성을 가지며 이 촉매 활성은 상기 표적 RNA의 기능의 불활성화를 초래하는 리보자임인 제9항에 따른 폴리뉴클레오티드를 트랜스-스플라이싱 방응 혼합물을 제공하는 단계; (2) 상기 표적 RNA를 상기 혼합물에 제공하는 단계; (3) 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 촉매활성을 발현하도록 하는 조건을 제공하는 단계를 포함하는 표적 RNA의 활성을 불활성화시키는 방법.

청구항 24

(1) 숙주 세포내에서 표적 RNA에 대한 촉매 활성을 가지며 원하는 유전자 서열을 트랜스-스플라이싱시킬 수 있는 리보자임인 제9항에 따른 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계; (2) 상기 숙주 세포내에서 상기 표적 RNA를 제공하는 단계; (3) 상기 리보자임이 상기 표적 RNA 서열속으로 상기 원하는 유전자 서열을 트랜스-스플라이싱시키게 하는 조건을 제공하는 단계를 포함하는, 생체내에서 숙주 세포에 원하는 유전자 서열을 제공하는 방법.

청구항 25

제9항에 따른 폴리뉴클레오티드를 수정된 숙주 배세포에 제공하는 것을 포함하는, 다세포 식물 및 동물에서의 세포 절제(ablation) 방법으로서, 리보자임이 숙주 세포에 독성인 펩티드 서열을 암호화하며, 그 서열을 상기 숙주 세포에서 표적속으로 트랜스-스플라이싱시킬 수 있는 것인 세포 절제 방법.

청구항 26

제9항에 따른 폴리뉴클레오티드를 식물의 배아 세포에 제공하는 것을 포함하는, 식물에서 응성 또는 자성 불임을 일으키는 방법으로서, 단백질로서 발현될 때 상기 식물의 수정에 필수적이며 상기 단백질을 발현시키는 세포의 절제를 초래하는 RNA를 리보자임이 표적으로 하는 것인 방법.

청구항 27

식물 세포를 제9항에 따른 폴리뉴클레오티드로 형질전환시키는 것을 포함하는, 식물 병원체에 대하여 식물을 면역화시키는 방법으로서, 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 식물에 상기 병원체에 대한 면역을 제공할 수 있는 트랜스-스플라이싱 서열을 암호화하며, 상기 식물의 세포를 상기 병원체로 감염시키면 상기 세포의 절제를 초래하는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 29

제8항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 30

제9항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 31

제10항 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 32

제11항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 33

제12항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 숙주 세포.

청구항 34

제21항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

청구항 35

제22항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

청구항 36

제23항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

청구항 37

제24항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

청구항 38

제25항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

청구항 39

제26항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

청구항 40

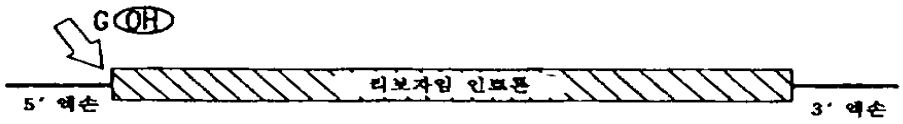
제27항에 있어서, 상기 리보자임이 프로-리보자임인 방법.

도면

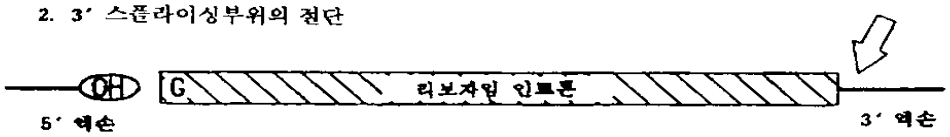
도면1

그림 I 인트론의 셀프-스플라이싱

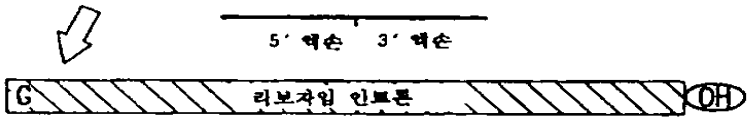
1. 5′ 스플라이싱부위의 구아노신-매개 절단



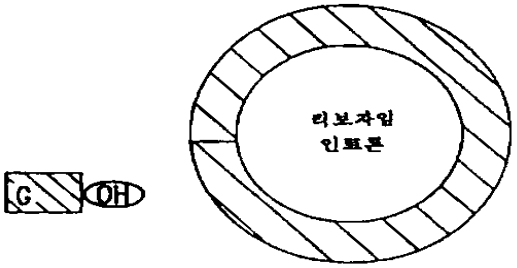
2. 3′ 스플라이싱부위의 절단



3. 엑손 분절의 연결



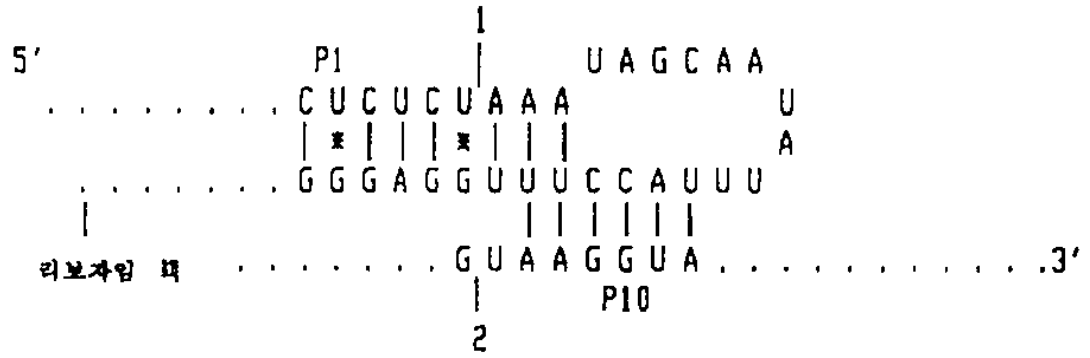
4. 인트론의 환형화



도면2a

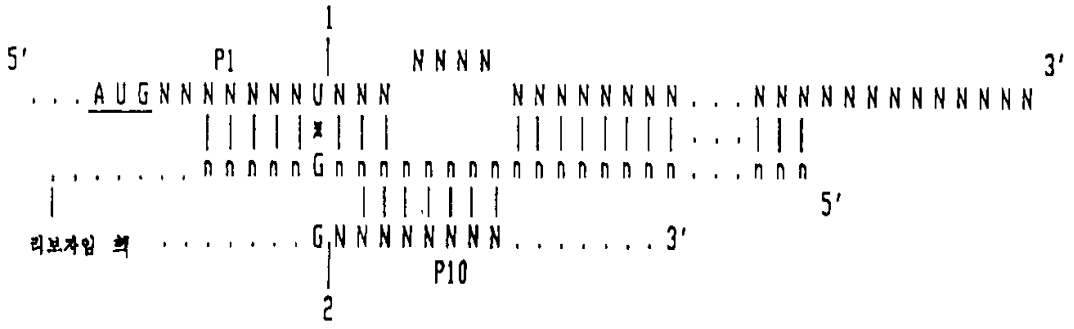
트랜스-스플라이싱을 위한 리보자임의 고안

A) 테트라하이메나 서모필라 셀프-스플라이싱 rRNA 인트론

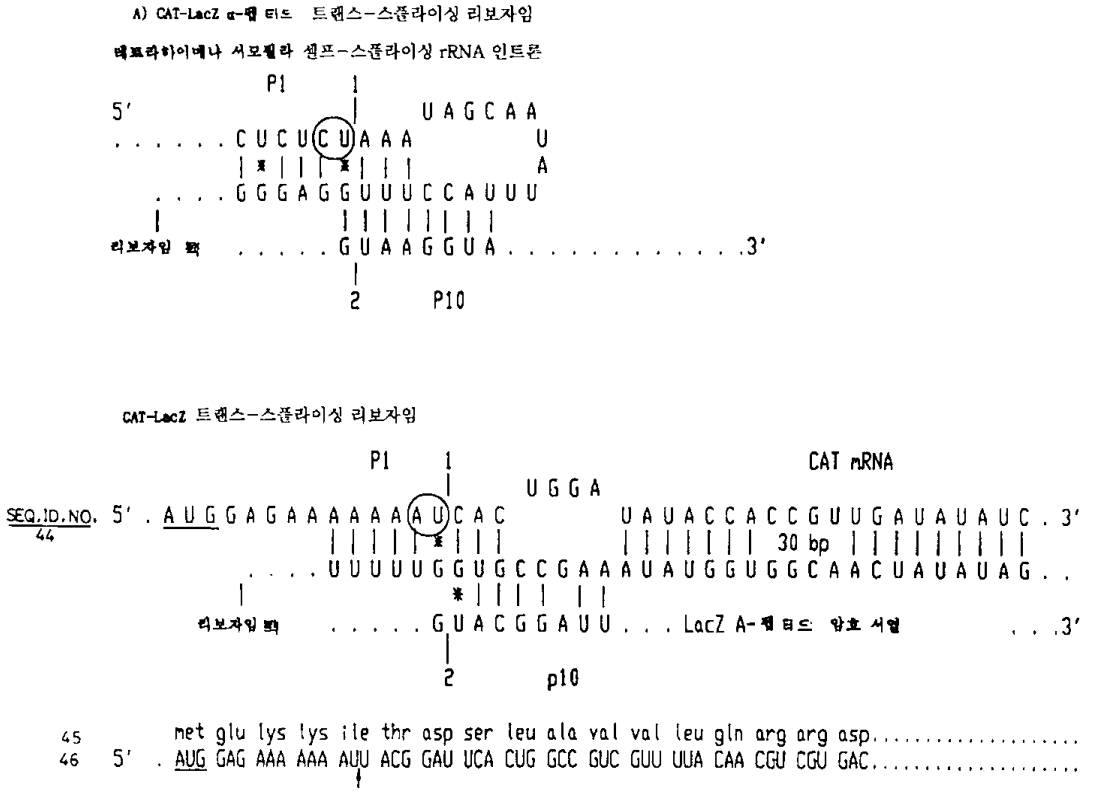


도면2b

B) 표적 mRNA 및 트랜스-스플라이싱 리보자임



도면3



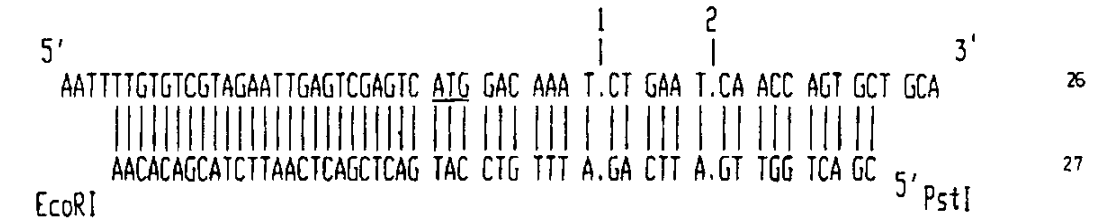
도면4a

호미 모자이크 바이러스 RNA4 트랜스-스플라이싱 리보자임
베이러스 RNA 표적서열
CMV 분리물

		1	2	SEQ.ID.NO.
WD	UUUGCGUCU.....UAGUGUGCCU	AUG GAC AAA U.CU GGA U.CU CCC AAU GCU AGU		17
Q	UUUGCGUCUCAG.....UGUGCCU	AUG GAC AAA U.CU GGA U.CU CCC AAU GCU AGU		18
Fny	UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		19
M	UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAU AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		20
I	UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		21
O	UUUACGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		22
Y	UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		23
D	UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		24
C	UUUGUGUCGUAGAAUUGAGUCGAGUC	AUG GAC AAA U.CU GAA U.CA ACC AGU GCU GGU		25
5'				3'

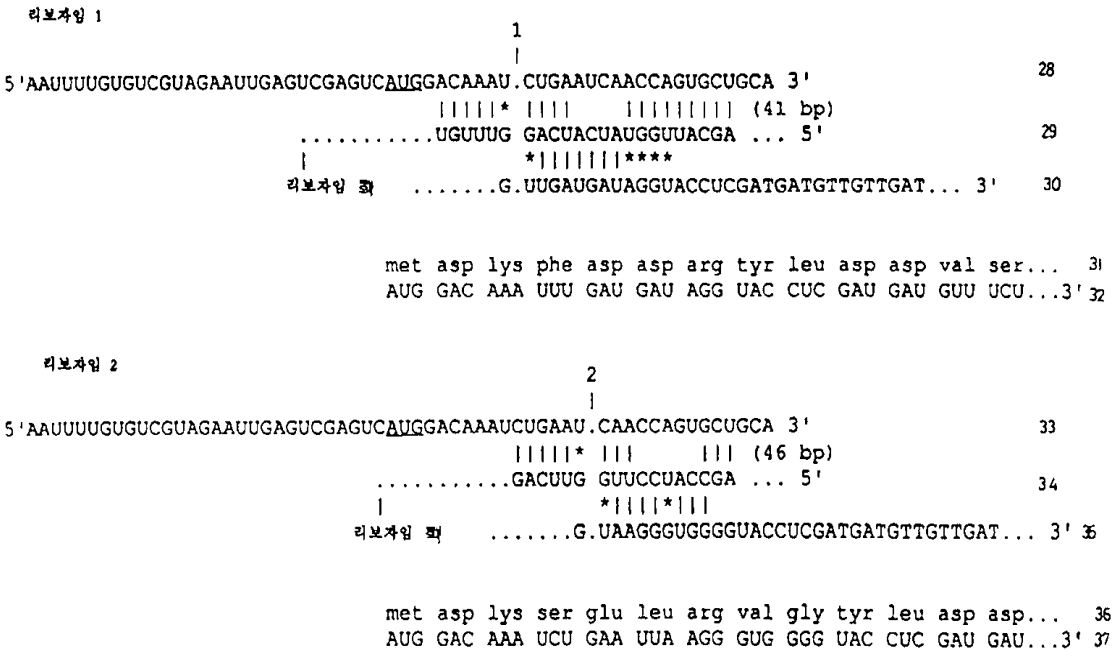
도면4b

올리고 뉴클레오티드 표적서열



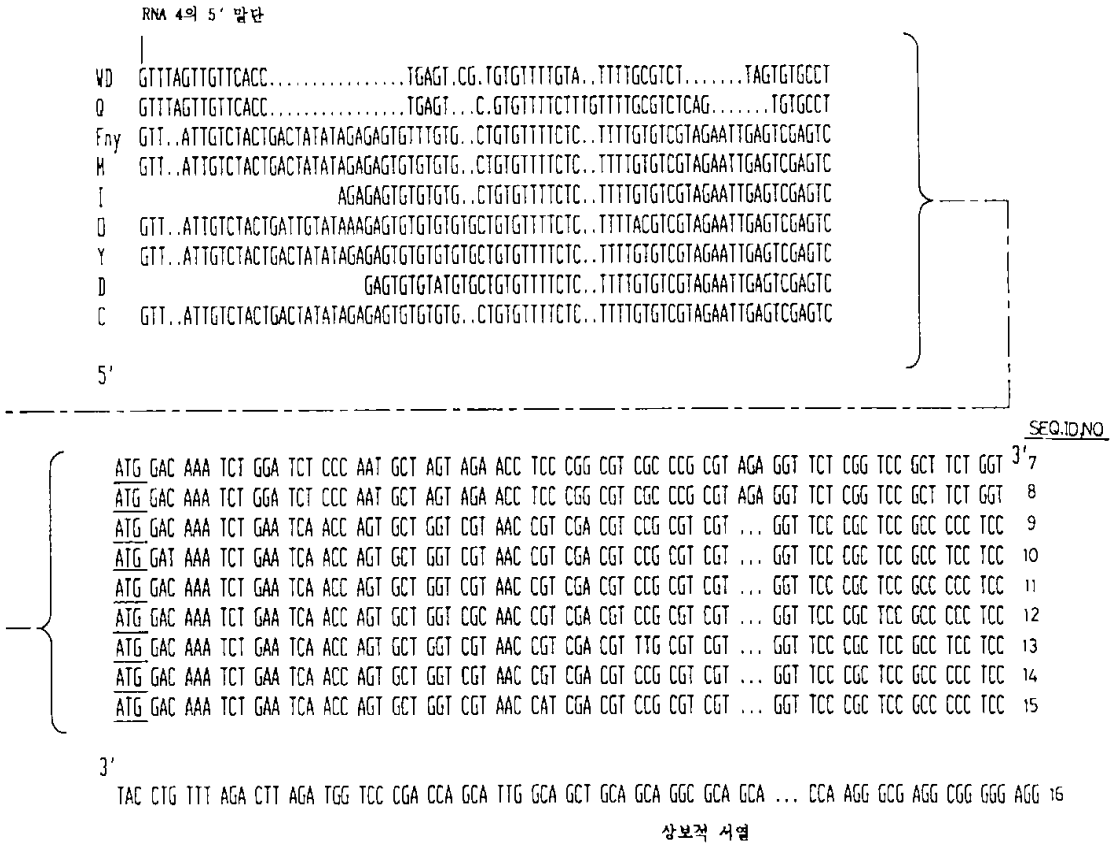
도면4c

CMV RNA4-디프테리아 독소 A-쇄 트랜스-스플라이싱 리보자임



도면5

오이 모자이크 바이러스 RNA 3/4 서열의 비교



SEQ.ID.NO

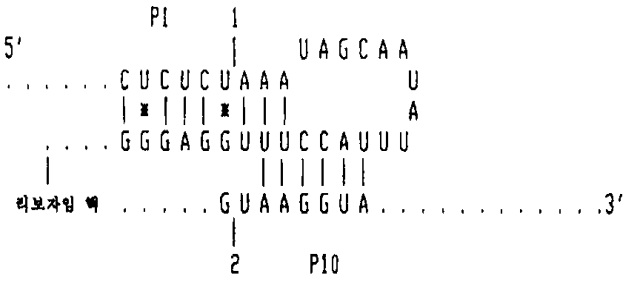
ATG GAC AAA TCT GGA TCT CCC AAT GCT AGT AGA ACC TCC CGG CGT CGC CCG CGT AGA GGT TCT CGG TCC GCT TCT GGT 3' 7
ATG GAC AAA TCT GGA TCT CCC AAT GCT AGT AGA ACC TCC CGG CGT CGC CCG CGT AGA GGT TCT CGG TCC GCT TCT GGT 8
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC 9
ATG GAT AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC TCC TCC 10
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC 11
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGC AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC 12
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT TTG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC TCC TCC 13
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CGT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC 14
ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT CGT AAC CAT CGA CGT CCG CGT CGT ... GGT TCC CGC TCC GCC CCC TCC 15

3'
TAC CTG TTT AGA CTT AGA TGG TCC CGA CCA GCA TTG GCA GCT GCA GCA GGC GCA GCA ... CCA AGG GCG AGG CGG GGG AGG 16

상보적 서열

도면6a

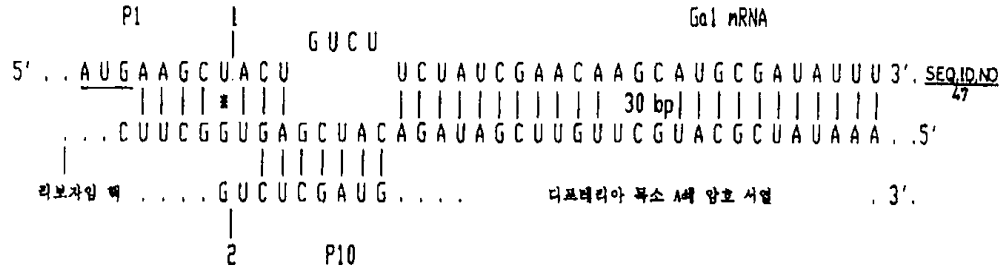
Gal-4 디프테리아 독소 A쇄 트랜스-스플라이싱 리보자임의 고안
테르타 하이메나 서모필라 셀프-스플라이싱 rRNA 인트론



```
                P1      1
5'                      |     U A G C A A
. . . . . . C U C U C U A A A          U
            | * | | | * | | |          A
    . . . . G G G A G G U U U C C A U U U
    |                   | | | | | |
리보자임 핵  . . . . . G U A A G G U A . . . . . . . . . . . . .3'
                        |
                        2       P10
```

Gal-4-Dt-A 트랜스-스플라이싱 리보자임

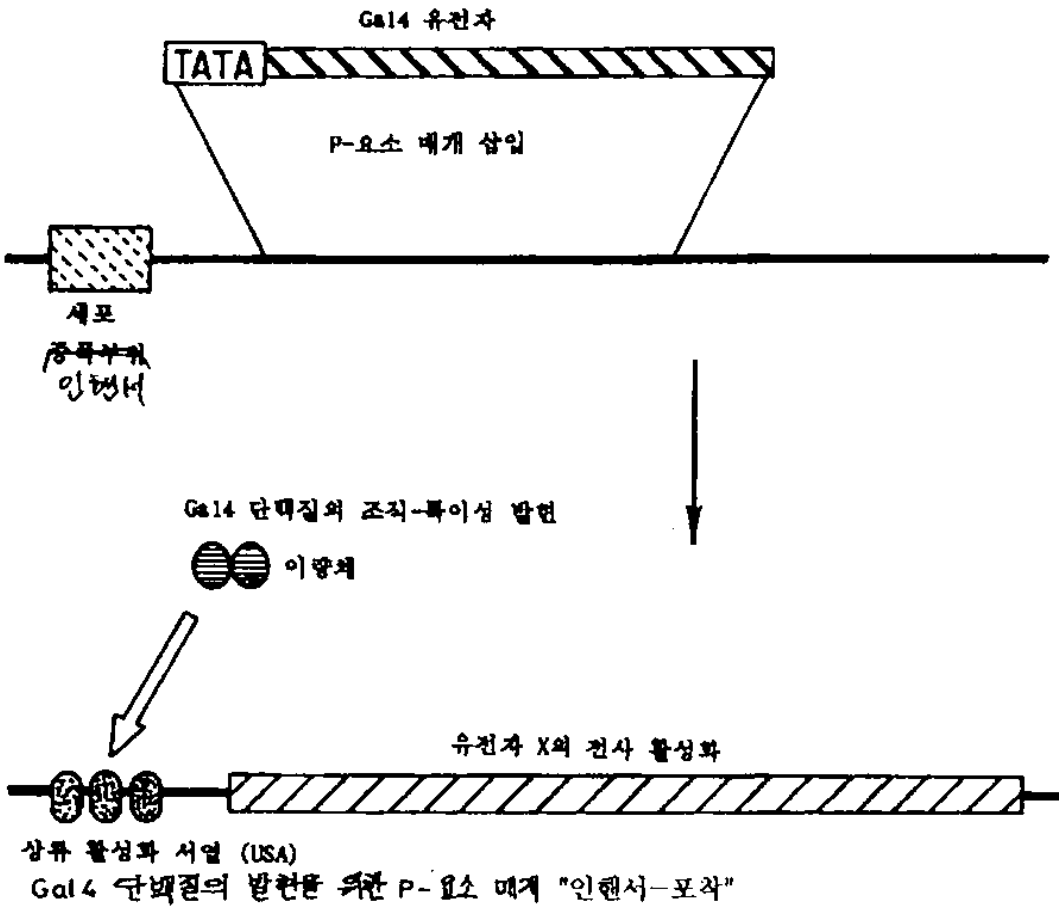
```
                P1      1                                        Gal mRNA
                        |       G U C U
5' . . A U G A A G C U A C U          U C U A U C G A A C A A G C A U G C G A U A U U U 3'. SEQ.ID.NO
            | | | | * | | |          | | | | | | | | | | | 30 bp| | | | | | | | | | |      47
    . . . C U U C G G U G A G C U A C A G A U A G C U U G U U C G U A C G C U A U A A A . .5'
    |                   | | | | | | |
리보자임 핵  . . . . G U C U C G A U G . . . .        디프테리아 독소 A쇄 암호 서열          . 3'.
                        |
                        2       P10

      met lys leu leu asp asp val val asp ser ser lys ser phe val met glu asn phe ser .....   48
5'. . AUG AAG CUU CUC GAU GAU GUU GUU GAU UCU UCU AAA UCU UUU GTG AUG GAA AAC UUU UCU .....3'  49
```



도면6b

```
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60      SEQ.ID.NO
   1 GTCGACCTTT TTAAGTCGGC AAATATCGCA  TGTTTGTTCG ATAGACATCG AGTGGCTTCA 60      7
  61 AAAGTTATCA GGCATGCACC TGGTAGCTAG  TCTTTAAACC AATAGATTGC ATCGGTTTAA 120
 121 AAGGCAAGAC CGTCAAATTG CGGGAAAGGG  GTCAACAGCC GTTCAGTACC AAGTCTCAGG 180
 181 GGAAACTTTG AGATGGCCTT GCAAAGGGTA  TGGTAATAAG CTGACGGACA TGGTCCTAAC 240
 241 CACGCAGCCA AGTCCTAAGT CAACAGATCT  TCTGTTGATA TGGATGCAGT TCACAGACTA 300
 301 AATGTCGGTC GGGGAAGATG TATTCTTCTC  ATAAGATATA GTCGGACCTC TCCTTAATGG 360
 361 GAGCTAGCGG ATGAAGTGAT GCAACACTGG  AGCCGCTGGG AACTAATTTG TATGCGAAAG 420
 421 TATATTGATT AGTTTTGGAG TACTCGTCTC  GATGATGTTG TTGATTCTTC TAAATCTTTT 480
 481 GTGATTGAAA ACTTTTCTTC GTACCACGGG  ACTAAACCTG GTTATGTAGA TTCCATTCAA 540
 541 AAAGGTATAC AAAAGCCAAA ATCTGGTACA  CAAGGAAATT ATGACGATGA TTGGAAAGGG 600
 601 TTTTATAGTA CCGACAATAA ATACGACGCT  GCGGGATACT CTGTAGATAA TGAAAACCCG 660
 661 CTCTCTGGAA AAGCTGGAGG CGTGGTCAAA  GTGACGTATC CAGGACTGAC GAAGGTTCTC 720
 721 GCACTAAAAG TGGATAATGC CGAAACTATT  AAGAAAGAGT TAGGTTTAAG TCTCACTGAA 780
 781 CCGTTGATGG AGCAAGTCGG AACGGAAGAG  TTTATCAAAA GGTTCGGTGA TGGTGCTTCG 840
 841 CGTGTAGTGC TCAGCCTTCC CTTCGCTGAG  GGGAGTTCTA GCGTTGAATA TATTAATAAC 900
 901 TGGGAACAGG CGAAAGCGTT AAGCGTAGAA  CTTGAGATTA ATTTTGAAAC CCGTGGAAAA 960
 961 CGTGGCCAAG ATGCGATGTA TGAGTATATG  GCTCAAGCCT GTGCAGGAAA TCGTGTCAGG 1020
1021 CGATCTTTGT GACTCGAG                                                1038
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
```

도면7



Ga14 단백질의 발현을 위한 P-요소 매개 "인핸서-포착"

도면8

접속 부-산물로 부터 독소 발현의 방지

트랜스-스플라이싱된 Ga14-DTA mRNA의 해독

5' ↓ 3 SEQ.ID.NO

ATG AAG CTT CTC GAT GAT GTT GTT GAT TCT TCT AAA TCT TTT GTG ATG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA 42
met lya leu leu asp asp val val asp ser ser lys ser phe val met glu asn phe ser ser tyr his gly thr lys 43

3' 엑손들의 해독

5' 3'

Rz-DTA$_{met}$ TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG ATG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA 38
met glu asn phe ser ser tyr his gly thr lys 39

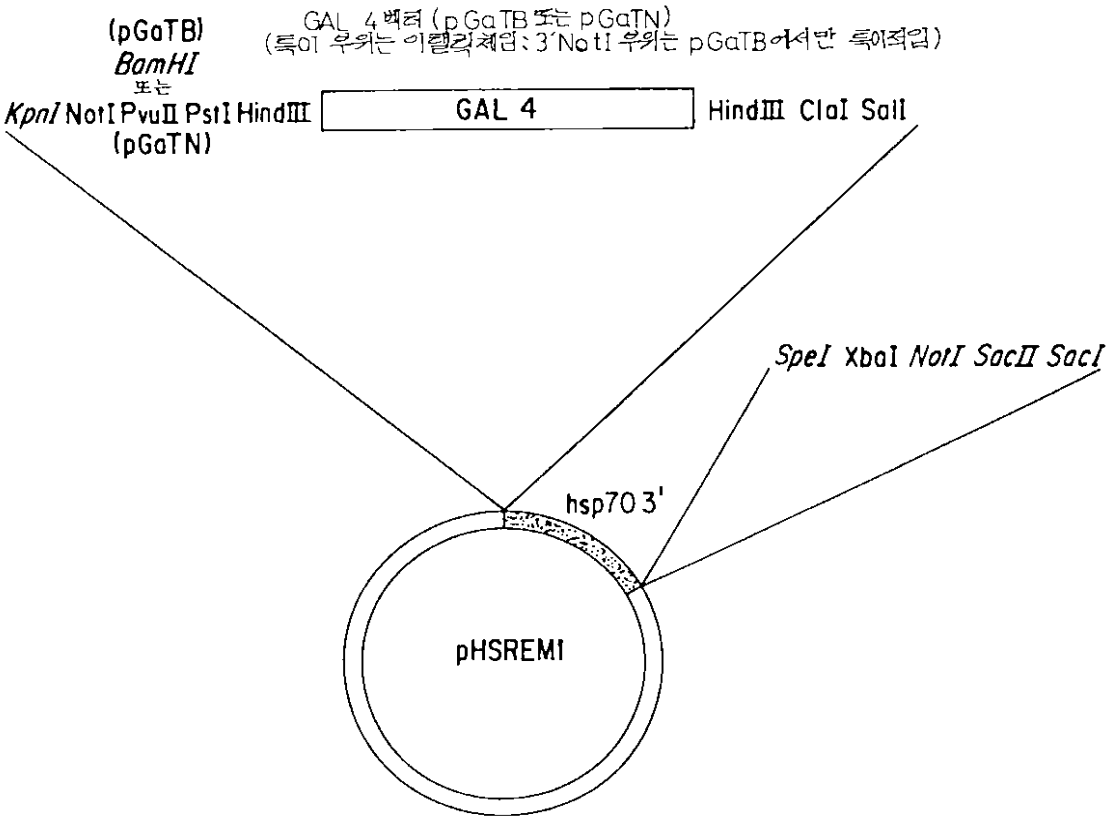
5' 3'

Rz-DTA$_{ile}$ TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG ATT GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA 40
ile

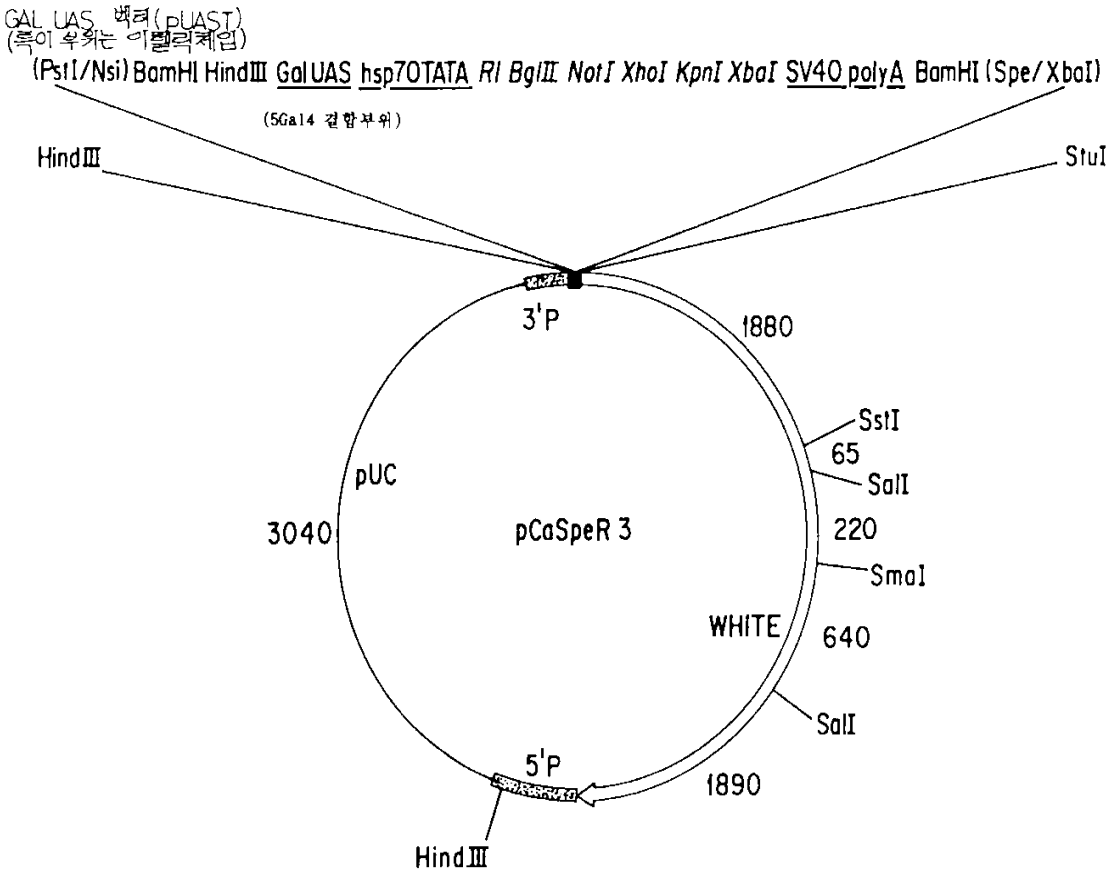
5' 3'

Rz-DTA$_{leu}$ TCTCGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTG TTG GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA 41
leu

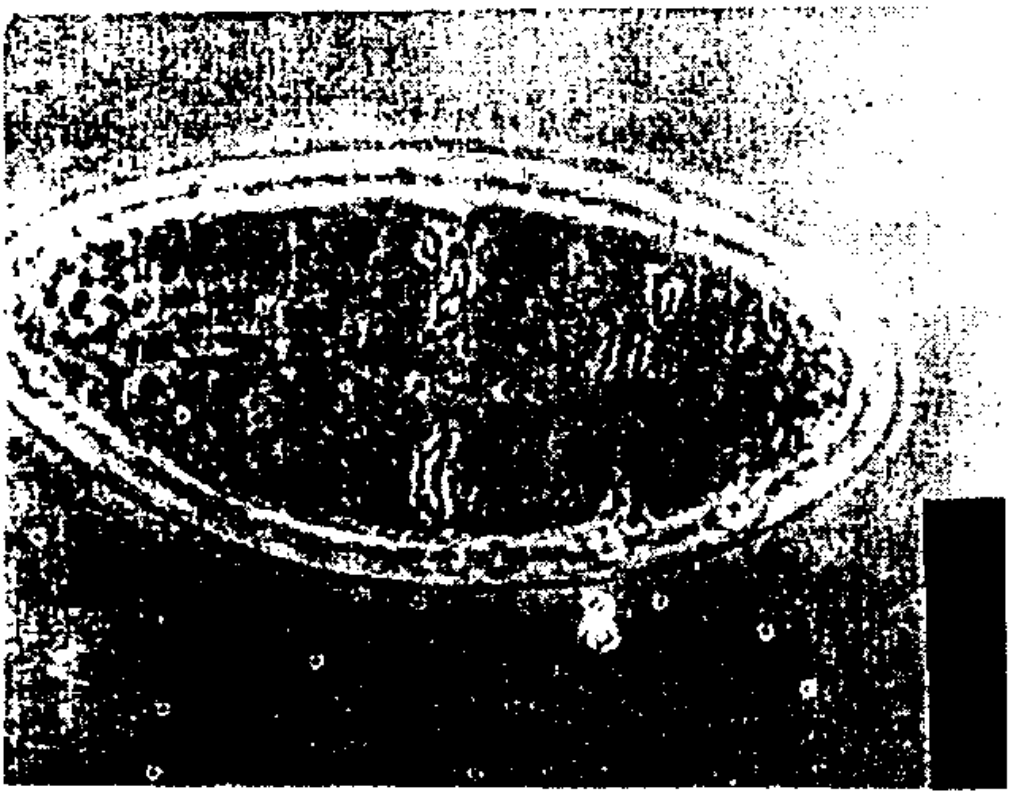
도면9


(pGaTB)
BamHI
또는
KpnI NotI PvuII PstI HindIII
(pGaTN)
GAL 4 벡터 (pGaTB 또는 pGaTN)
(특이 우위는 이펠릭체임; 3'NotI 우위는 pGaTB에서만 특이적임)
GAL 4
HindIII ClaI SalI
SpeI XbaI NotI SacII SacI
hsp70 3'
pHSREM1

도면10

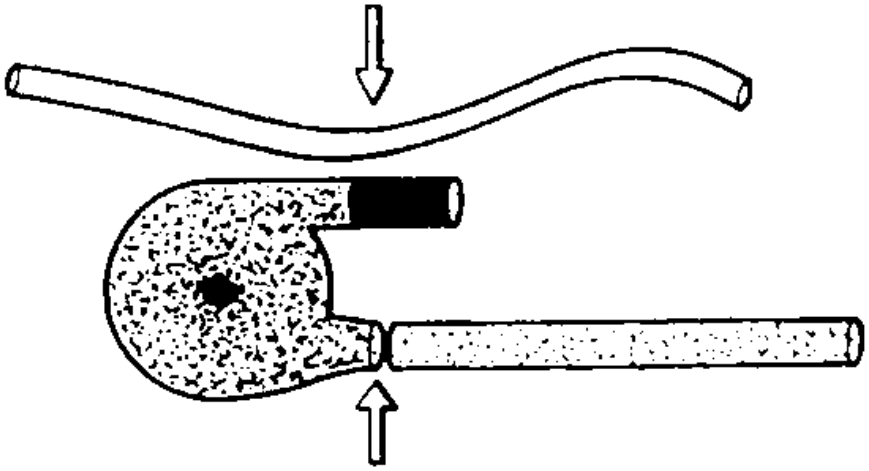

GAL UAS 벡터(pUAST)
(특이 우위는 이펠릭체임)
(PstI/NsiI) BamHI HindIII GalUAS hsp70TATA RI BglII NotI XhoI KpnI XbaI SV40 polyA BamHI (Spe/XbaI)
(5Gal4 결합부위)
HindIII
StuI
3'P
1880
SstI
65
SalI
220
SmaI
640
SalI
1890
HindIII
5'P
WHITE
3040
pUC
pCaSpeR 3

도면11

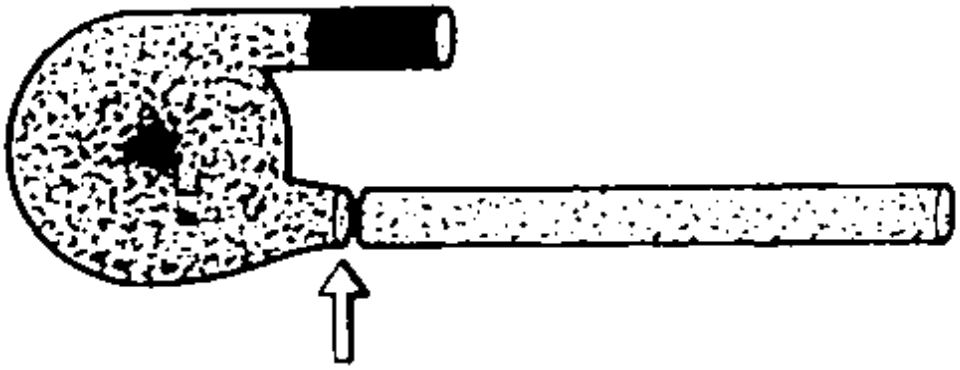


절제된 조직

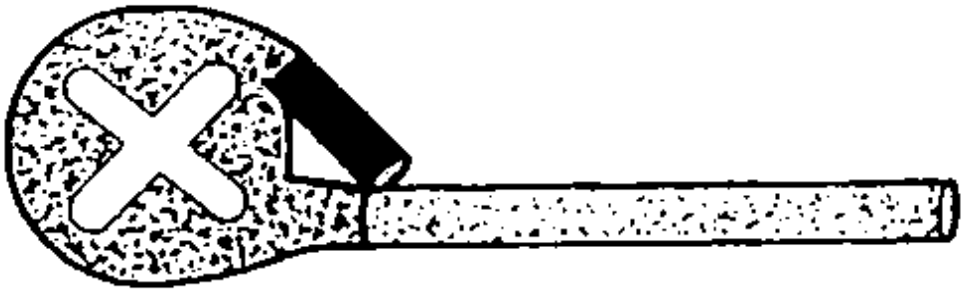
도면12a



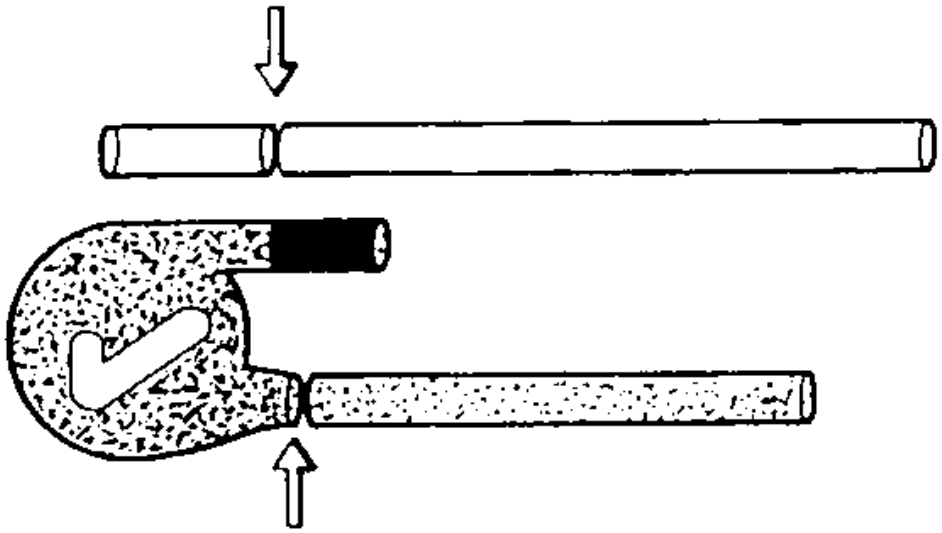
도면12b



도면12c

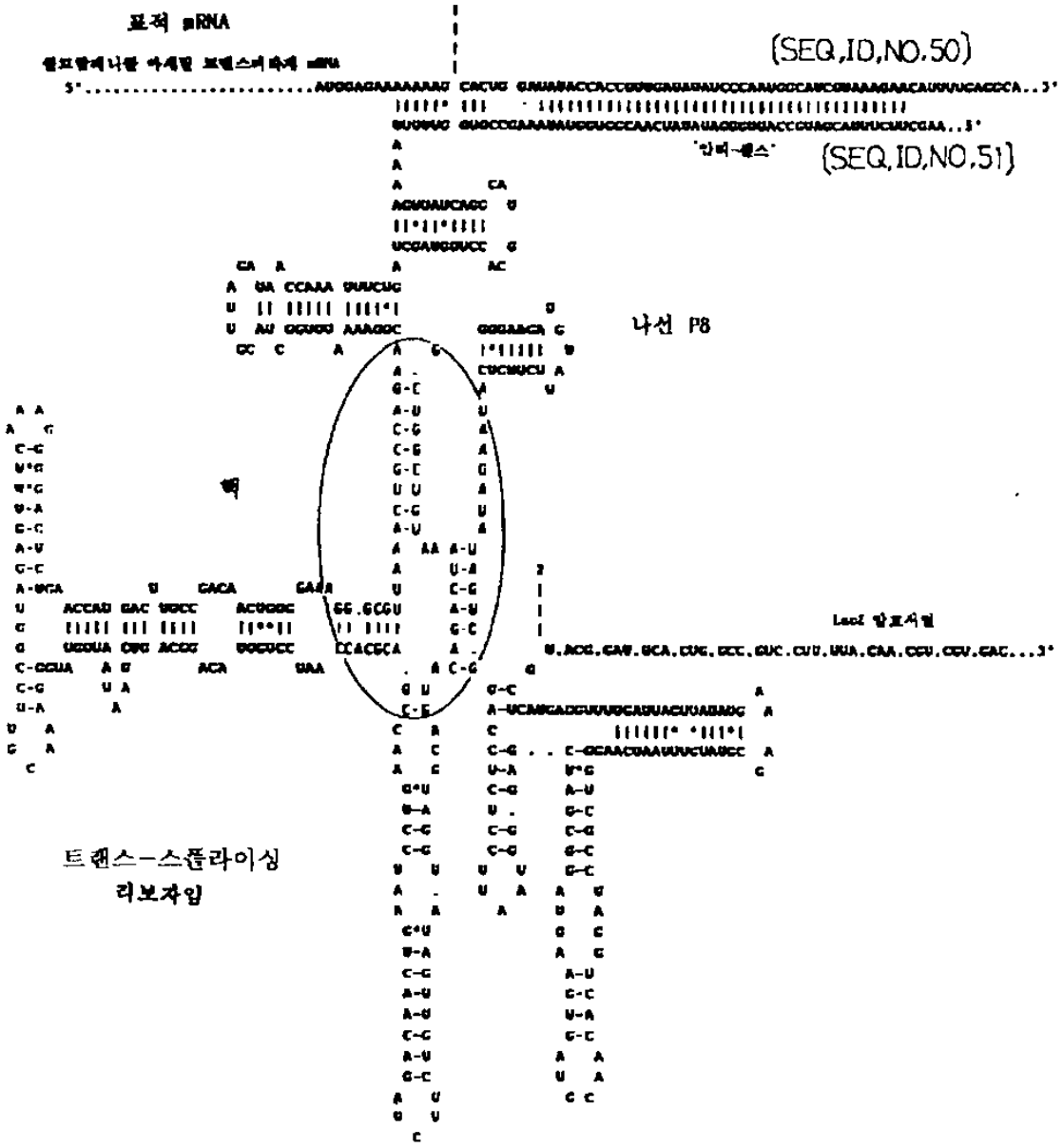


도면12d



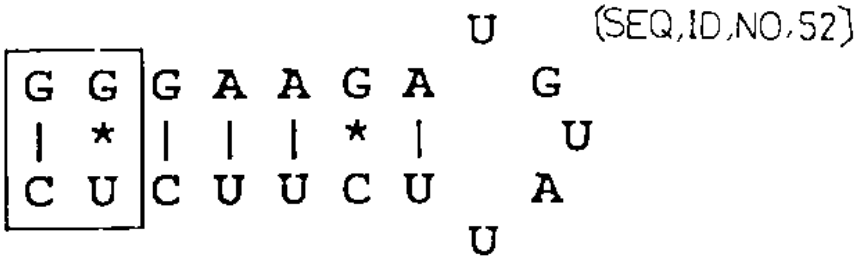
도면13a

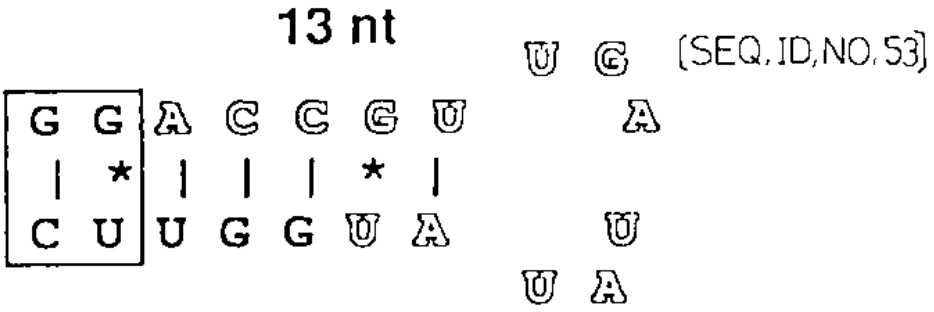
CAT-Lac Z 트랜스-스플라이싱 프로-리보자임

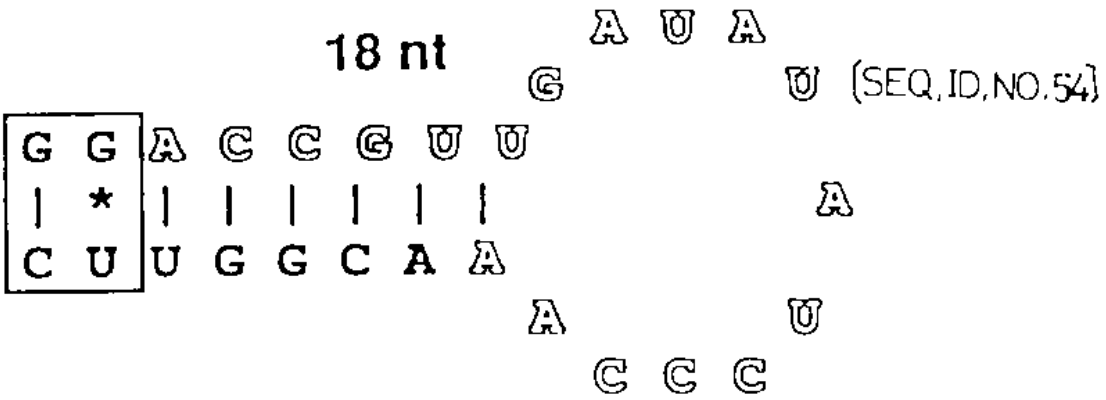


도면13b

변형된 사슬 P8

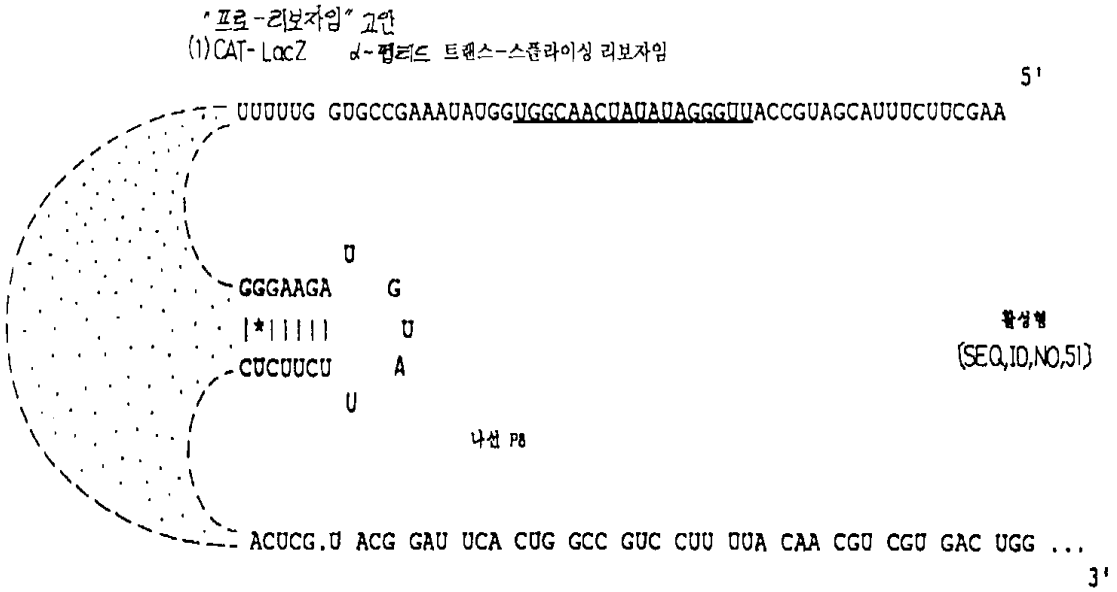




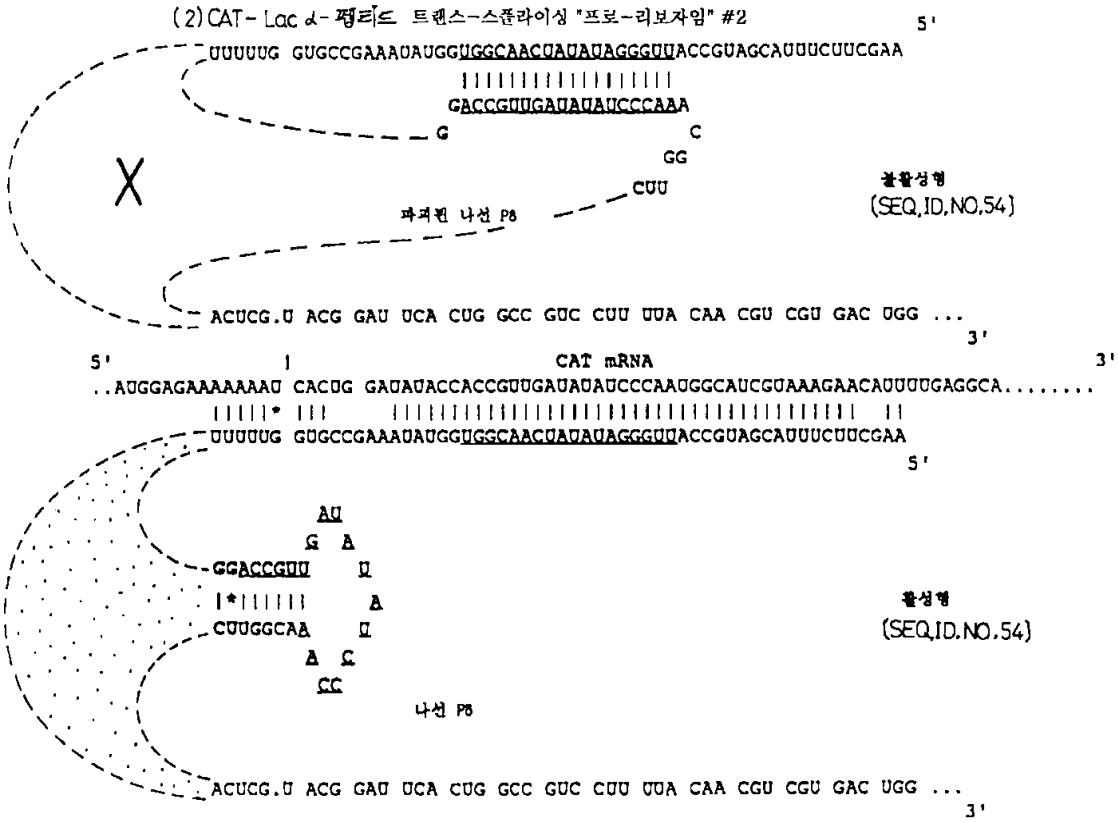


N = '안티-센스'에 삼보적임

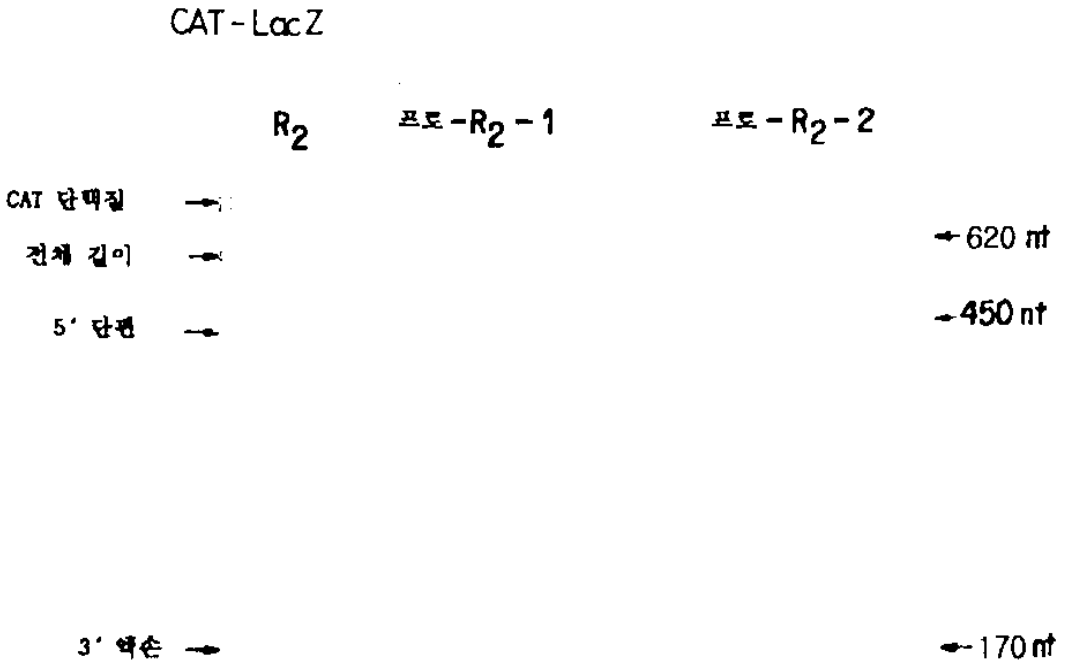
도면14a


"프로-리보자임" 고안
(1) CAT-LacZ α-펩티드 트랜스-스플라이싱 리보자임
5'
UUUUUG GUGCCGAAAUAUGGUGGCAACUAUAUAGGGUUACCGUAGCAUUUCUUCGAA
U
GGGAAGA G
|*|||||| U
CUCUUCU A
U
나선 P8
활성형
(SEQ.ID.NO.51)
ACUCG.U ACG GAU UCA CUG GCC GUC CUU UUA CAA CGU CGU GAC UGG ...
3'

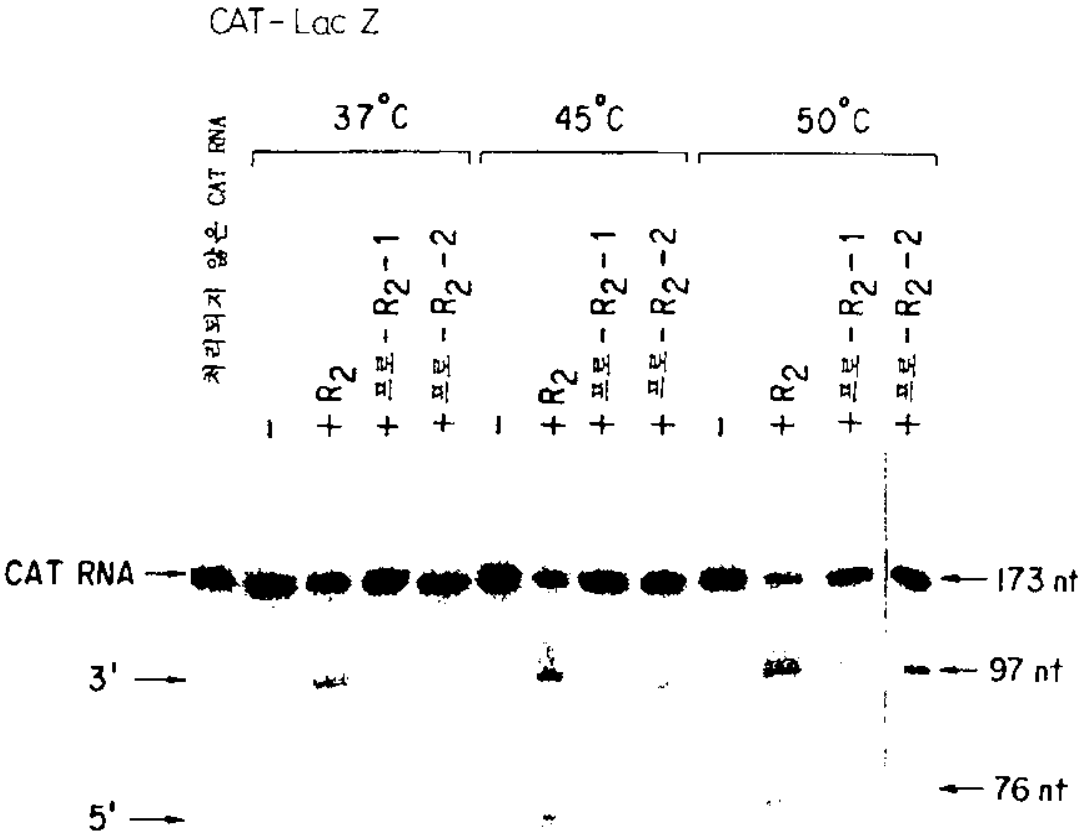
도면14b


(2) CAT-Lac α-펩티드 트랜스-스플라이싱 "프로-리보자임" #2
5'
UUUUUG GUGCCGAAAUAUGGUGGCAACUAUAUAGGGUUACCGUAGCAUUUCUUCGAA
GACCGUUGAUAUAUCCCAAA
G C
GG
CUU
X
파괴된 나선 P8
불활성형
(SEQ.ID.NO.54)
ACUCG.U ACG GAU UCA CUG GCC GUC CUU UUA CAA CGU CGU GAC UGG ...
3'
5'
CAT mRNA
3'
..AUGGAGAAAAAAAU CACUG GAUAUACCACCGUUGAUAUAUCCCAAUGGCAUCGUAAAGAACAUUUUGAGGCA.....
UUUUUG GUGCCGAAAUAUGGUGGCAACUAUAUAGGGUUACCGUAGCAUUUCUUCGAA
5'
AU
G A
GGACCGUU U
|*|||||| A
CUUGGCAA U
A C
CC
나선 P8
활성형
(SEQ.ID.NO.54)
ACUCG.U ACG GAU UCA CUG GCC GUC CUU UUA CAA CGU CGU GAC UGG ...
3'

도면15

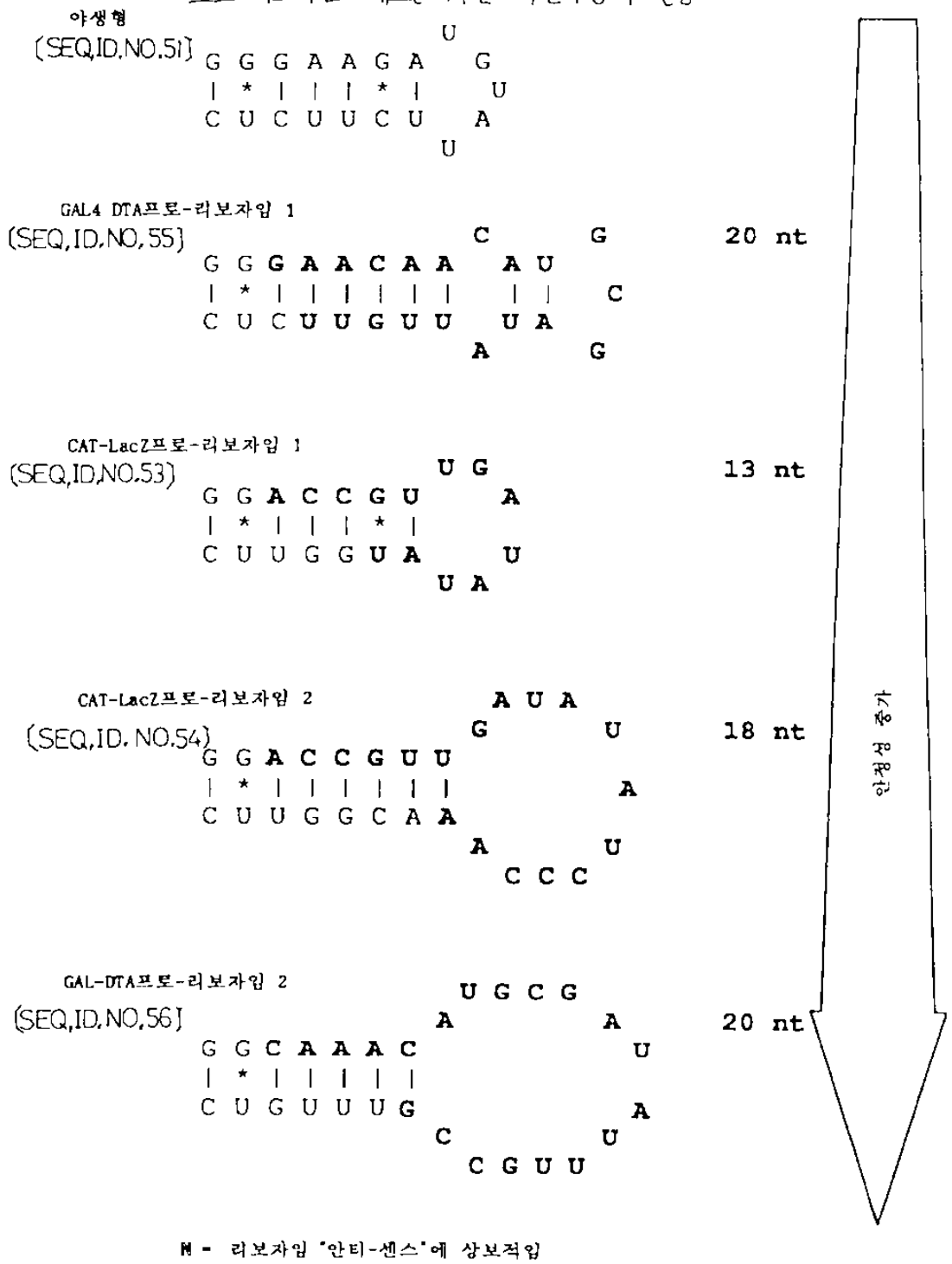

CAT - LacZ
R2
프로-R2-1
프로-R2-2
CAT 단백질
전체 길이
5' 단편
3' 박손
620 nt
450 nt
170 nt

도면16


CAT - Lac Z
37°C
45°C
50°C
처리되지 않은 CAT RNA
-
+R2
+프로-R2-1
+프로-R2-2
CAT RNA
3'
5'
173 nt
97 nt
76 nt

도면17

프로 리보자임 제조를 위한 사선 P8의 변형



N - 리보자임 '안티-센스'에 상보적임

도면18

