

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 4월 4일 (04.04.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/071527 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/020700

(22) 국제출원일:

2022년 12월 19일 (19.12.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0123588 2022년 9월 28일 (28.09.2022) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATION-

AL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR];

08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

리셉텍 주식회사 (RECEPTCH INC.) [KR/KR]; 15011

경기도 시흥시 배곧로 82, 미래모빌리티연구동 605호,

Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 박태현 (PARK, Tai Hyun); 06668 서울특별시

서초구 반포대로21길 62, 101동 903호, Seoul (KR).

조성연 (CHO, Seongyeon); 15869 경기도 군포시 번영로

353, 523동 603호, Gyeonggi-do (KR). 이해인 (LEE,

Haein); 13456 경기도 성남시 분당구 산운로 37, 201동

111호, Gyeonggi-do (KR). 고휘진 (KO, Hwi Jin); 08294

서울특별시 구로구 구로중앙로28길 35-21, 201호, Seoul

(KR). 김명진 (KIM, Myung Jin); 03311 서울특별시

은평구 진관로 22, 112동 1203호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 위더피플 (WETHEPEOPLE IP &

LAW FIRM); 03752 서울특별시 서대문구 경기대로 47

진양빌딩 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,

SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,

TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,

UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,

KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

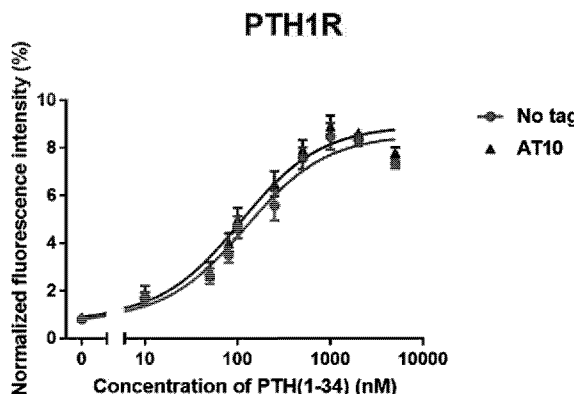
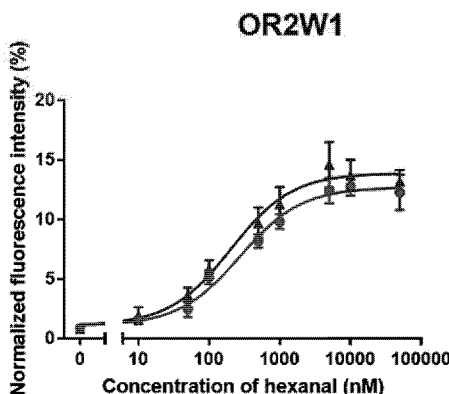
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: TAG FOR INCREASING EXPRESSION OF MEMBRANE PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 막 단백질의 발현을 증가시키기 위한 태그 및 이의 용도



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a tag for increasing the expression of a membrane protein and use thereof. Specifically, the tag according to the present invention significantly increases the expression of various types of GPCR proteins in cell-free systems or E. coli, and thus can be usefully used in expressing membrane proteins such as GPCRs.

(57) 요약서: 본 발명의 목적은 막 단백질의 발현을 증가시키기 위한 태그 및 이의 용도를 제공하는 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 태그는 다양한 종류의 GPCR 단백질 발현을 무세포 시스템이나 대장균에서 유의적으로 증가시킴으로써, GPCR과 같은 막 단백질을 대장균에서 발현시키는 데 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2024/071527 A1

명세서

발명의 명칭: 막 단백질의 발현을 증가시키기 위한 태그 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 막 단백질의 발현을 증가시키기 위한 태그 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 유전자 재조합 기술이 발달되면서 동물세포, 효모와 같은 진핵생물(eukaryote), 및 대장균과 같은 원핵생물(prokaryote) 등을 이용하여 유용한 목적 단백질을 생산하는 기술이 발전하고 있다. 또한, 이와 같이 생산된 재조합 단백질은 의약품 등을 포함하는 생물공학 산업에 널리 사용되고 있다.
- [4] 생화학적으로 모든 생물은 동일한 유전자 단위의 구성과 기능을 갖기 때문에 유전자를 재조합하여 이종 숙주에서 단백질을 생산하는 것이 가능하다. 유전자는 기능적으로 DNA에서 mRNA를 합성하는 전사(transcription) 과정과 mRNA에서 단백질을 합성하는 번역(translation) 과정을 각각 담당하는 부분으로 나눌 수 있다. 번역 과정에서 실제로 단백질로 발현되는 부분인 ORF(open reading frame)는 발현벡터에 삽입되어 기능적 유전자 단위를 완성함으로써 재조합 단백질의 생산을 가능하게 한다. 따라서, 발현벡터에서 단백질의 발현을 조절할 수 있는 요소들이 개발되어 목적 단백질의 특성에 맞춰 발현 시점과 발현량을 조절할 수 있다. 그러나, 유전자의 발현 효율은 항상 동일하지 않기 때문에 목적 단백질의 종류에 따라 최적 조건을 확립하기 위한 필요가 있다. 특히 목적 단백질이 안정성이나 접힘 등의 문제로 발현이 잘 되지 않거나, 낮은 가용성을 보이는 경우에 재조합 단백질을 생산하는데 어려움이 있다. 따라서, 효율적인 재조합 단백질의 생산은 단백질을 과발현시키면서 가용성(solubility)이 높은 형태를 갖도록 하는 것이다.
- [5] 일반적으로 단백질의 발현 효율을 높이기 위해서는 벡터, 숙주, ORF 수준에서 조작이 시도되어 왔다. 그러나, 최근에는 전형적인 이들 요소 외에 새로운 조절인자들이 발굴되어 발현 효율의 증가를 위해 다양한 방법이 시도되고 있다. 그중 하나로서 단백질 접힘(folding) 또는 회수(recovery)를 용이하게 하는 기능성 태그(tag)가 장착된 벡터를 이용하여 목적 단백질의 가용성을 높이거나, 정제과정의 용이성을 제공하는 방법이 관심받고 있다.
- [6] 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-2106773호는 목적 단백질의 수용성 및 발현량 증가를 위한 융합 태그 및 이의 용도에 관한 것으로, 특정 서열로 구성된 융합 태그가 포함된 발현벡터는 목적 단백질의 수용성 및 발현량이 증가됨을 개시하고 있다.

[7]

발명의 상세한 설명**기술적 과제**

[8] 본 발명의 목적은 막 단백질의 발현을 증가시키기 위한 태그 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아데닌(adenine, A) 및 티민(thymine, T)으로 구성되고, 3 내지 99개의 뉴클레오타이드로 구성되는 막 단백질(membrane protein) 발현 증진용 태그(tag)를 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 상기 막 단백질 발현 증진용 태그가 포함된 발현벡터를 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[13] 나아가, 본 발명은 상기 숙주세포에서 막 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는 막 단백질의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명에 따른 태그는 다양한 종류의 GPCR 단백질 발현을 무세포 시스템이나 대장균에서 유의적으로 증가시킴으로써, GPCR과 같은 막 단백질을 대장균에서 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 RBS 계산기를 사용하여 다양한 후각 수용체의 번역 초기속도를 예측한 결과 그래프이다.

[18] 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 RBS 계산기를 사용하여 번역 초기속도에 따른 후각 수용체의 개수를 예측한 결과 그래프이다.

[19] 도 3은 본 발명의 일 실시예에서 AT 태그를 삽입한 발현벡터의 구조를 나타낸 모식도이다.

[20] 도 4는 본 발명의 일 실시예에서 RBS 계산기를 사용하여 AT 태그에 의한 후각 수용체의 번역 개시율을 예측한 결과 그래프이다.

[21] 도 5는 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT 태그에 의한 OR1L4의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면(A) 및 밴드의 강도를 나타낸 그래프(B)이다.

[22] 도 6은 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT 태그에 의한 OR13C4의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면(A) 및 밴드의 강도를 나타낸 그래프(B)이다.

[23] 도 7은 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT 태그에 의한

OR2B11의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면(A) 및 밴드의 강도를 나타낸 그래프(B)이다.

- [24] 도 8은 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT 태그에 의한 OR3A3의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면(A) 및 밴드의 강도를 나타낸 그래프(B)이다.
- [25] 도 9는 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT10 및 AT11 태그에 의한 후각 수용체의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면이다.
- [26] 도 10은 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT10 태그에 의한 후각 수용체의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면이다.
- [27] 도 11은 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT10 태그에 의한, 비슷한 코돈 사용빈도를 갖는 후각 수용체의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면이다.
- [28] 도 12는 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT10 태그에 의한, 동일한 코돈 사용빈도를 갖는 후각 수용체의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면이다.
- [29] 도 13은 본 발명의 일 실시예에서 무세포 시스템을 사용하여 AT10 태그에 의한 GPCR의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면이다.
- [30] 도 14는 본 발명의 일 실시예에서 대장균에서 AT10 태그에 의한 GPCR의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과 도면이다.
- [31] 도 15는 본 발명의 일 실시예에서, AT10 태그에 의한 GPCR의 활성 변화를 형광 소광 분석법으로 확인한 결과 그래프이다.

[32]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [34] 본 발명은 아데닌(adenine, A) 및 티민(thymine, T)으로 구성되고, 3 내지 99개의 뉴클레오타이드로 구성되는 막 단백질(membrane protein) 발현 증진용 태그(tag)를 제공한다.
- [35] 상기 태그는 아데닌 및 티민으로 구성되어 리신(lysine, K) 또는 티로신(tyrosine, Y)을 암호화할 수 있다. 즉, 상기 뉴클레오타이드는 AAA 또는 TAT의 코돈으로 구성되고, 3의 배수로 포함될 수 있다. 상기 뉴클레오타이드는 3 내지 99개, 3 내지 66개, 3 내지 33개, 6 내지 99개, 6 내지 66개, 6 내지 33개, 9 내지 99개, 9 내지 66개, 9 내지 33개, 12 내지 99개, 12 내지 66개, 12 내지 33개, 15 내지 99개, 15 내지 66개, 15 내지 33개, 18 내지 99개, 18 내지 66개, 18 내지 33개, 21 내지 99개, 21 내지 66개, 21 내지 33개, 24 내지 99개, 24 내지 66개, 24 내지 33개, 27 내지 99개, 27 내지 66개, 27 내지 33개, 30 내지 99개, 30 내지 66개 또는 30 내지 33개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.
- [36] 본 발명의 다른 측면에서, 상기 뉴클레오타이드에 의해 번역되는

폴리펩타이드는 1 내지 33개, 1 내지 22개, 1 내지 11개, 2 내지 33개, 2 내지 22개, 2 내지 11개, 3 내지 33개, 3 내지 22개, 3 내지 11개, 4 내지 33개, 4 내지 22개, 4 내지 11개, 5 내지 33개, 5 내지 22개, 5 내지 11개, 6 내지 33개, 6 내지 22개, 6 내지 11개, 7 내지 33개, 7 내지 22개, 7 내지 11개, 8 내지 33개, 8 내지 22개, 8 내지 11개, 9 내지 33개, 9 내지 22개, 9 내지 11개, 10 내지 33개, 10 내지 22개 또는 10 내지 11개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드일 수 있다.

- [37] 이때, 상기 태그는 이에 의해 번역되는 첫번째 아미노산의 C-말단으로부터 KYY가 순차적으로 하나씩 추가된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 태그는 첫번째 아미노산으로 K를, 두번째 아미노산으로 Y를, 세번째 아미노산으로 Y를 포함하며, 아미노산의 수가 증가할 때마다 이의 C-말단에 KYY가 순차적으로 하나씩 추가된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 태그가 하나의 아미노산으로 구성되는 경우 K, 두개의 아미노산으로 구성되는 경우 KY, 세개의 아미노산으로 구성되는 경우 KYY, 네개의 아미노산으로 구성되는 경우 KYYK, 다섯개의 아미노산으로 구성되는 경우 KYYKY, 여섯개의 아미노산으로 구성되는 경우 KYYKYY의 서열로 표시되는 폴리펩타이드를 의미하는 것일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 태그는, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 이에 의해 번역되는 폴리펩타이드가 서열번호 51 내지 83으로 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 51 내지 61으로 기재된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드일 수 있다.

[38] [표1]

태그	서열(5'→3')	서열번호
AT1	K	서열번호 51
AT2	KY	서열번호 52
AT3	KYY	서열번호 53
AT4	KYYK	서열번호 54
AT5	KYYKY	서열번호 55
AT6	KYYKYY	서열번호 56
AT7	KYYKYYK	서열번호 57
AT8	KYYKYYKY	서열번호 58
AT9	KYYKYYKYY	서열번호 59
AT10	KYYKYYKYYK	서열번호 60
AT11	KYYKYYKYYKY	서열번호 61
AT12	KYYKYYKYYKYY	서열번호 62
AT13	KYYKYYKYYKYYK	서열번호 63
AT14	KYYKYYKYYKYYKY	서열번호 64
AT15	KYYKYYKYYKYYKYY	서열번호 65
AT16	KYYKYYKYYKYYKYYK	서열번호 66
AT17	KYYKYYKYYKYYKYYKY	서열번호 67
AT18	KYYKYYKYYKYYKYYKYY	서열번호 68
AT19	KYYKYYKYYKYYKYYKYYK	서열번호 69
AT20	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKY	서열번호 70
AT21	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY	서열번호 71
AT22	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYK	서열번호 72
AT23	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKY	서열번호 73
AT24	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY	서열번호 74
AT25	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY K	서열번호 75
AT26	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KY	서열번호 76

AT27	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYY	서열번호 77
AT28	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYYK	서열번호 78
AT29	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYYKY	서열번호 79
AT30	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYYKYY	서열번호 80
AT31	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYYKYYK	서열번호 81
AT32	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYYKYYKY	서열번호 82
AT33	KYYKYYKYYKYYKYYKYYKYYKYY KYYKYYKYY	서열번호 83

[39]

[40]

상기 용어, "막 단백질(membrane protein)"은 생체막의 일부분이거나 생체막과 상호작용하는 단백질을 의미한다. 상기 막 단백질은 막의 일부분이거나 막에 영구적으로 부착된 내재성 막 단백질과 일시적으로 인지질 이중층 또는 다른 내재성 막 단백질에 부착된 내재성 단일체 단백질(integral monotopic protein)로 구분된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 단백질은 내재성 막 단백질을 의미하는 것일 수 있다.

[41]

상기 용어, "내재성 막 단백질(integral membrane protein)"은 생물학적 막에 영구적으로 부착되는 막 단백질의 하나로서, 예로서 수송체, 링커, 채널, 수용체, 효소, 구조적 막 고정 도메인, 에너지 축적 및 변환에 관여하는 단백질, 세포 부착에 관여하는 단백질 등이 포함된다. 구체적으로, 상기 내재성 막 단백질은 G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR), 호르몬 수용체(hormone receptor), 세포막 수송 단백질(membrane transport protein), 세포 접착 분자(cell adhesion molecule), 효소 연결 수용체(enzyme-linked receptor) 등을 포함할 수 있다.

[42]

상기 용어, "G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR)"는 7-막관통 수용체(7-transmembrane receptor, 7TMR)라고도 불리는 단백질로서, 세포막을 7번 통과하는 구조를 갖는 단백질을 의미한다. 상기 GPCR은 생체 내의 거의 모든 생리적 반응을 촉매하며, 이에 결합하는 물질을 리간드라 부른다. 상기 리간드는 수용체의 반응을 촉진하는 수용체 작용제와 반응을 촉진하지 않는 수용체 대항체로 구분할 수 있다. 예를 들어, 상기 GPCR은 클래스 A, 클래스 B, 클래스 C, 클래스 D, 클래스 E 또는 클래스 F의 GPCR로 분류할 수

있다.

- [43] 예를 들어, 상기 클래스 A에 포함되는 GPCR은 후각 수용체(olfactory receptor, OR), CC 케모카인 수용체(CC chemokine receptor, CCR), CXC 케모카인 수용체(CXC chemokine receptor, CXCR), 아데노신 A2a 수용체(adenosine A2a receptor, ADORA), B형 엔도세린 수용체(endothelin receptor type B, ENDRB), 아펠린 수용체(apelin receptor, APLNR) 등이 있다. 한편, 클래스 B에 포함되는 GPCR은 PTH/PTHrP 수용체(PTH/PTHrP receptor, PTHR) 등이 있으며, 클래스 C에 포함되는 GPCR은 미각 수용체(taste receptor) 등이 있다.
- [44] 상기 용어, "호르몬 수용체(hormone receptor)"는 특정 호르몬과 결합하여 이를 세포에 전달하는 단백질로서, 세포막을 통과하지 못하는 호르몬에 의한 세포 밖 신호를 세포 안의 신호로 전달하는 역할을 한다. 상기 호르몬 수용체는 G-단백질 연관 수용체, 단백질 인산화 수용체, 이온통로 수용체 등을 포함할 수 있다.
- [45] 상기 용어, "세포막 수송 단백질(membrane transport protein)"은 생체 막을 가로지르는 이온 및 저분자나, 다른 단백질과 같은 거대 분자의 이동에 관여하는 단백질로서, 수송체(transporter)라고도 불린다. 상기 세포막 수송 단백질은 촉진 확산이나 능동 수송을 통해 물질을 이동시키며, 통로(channel) 또는 운반체(carrier)의 두 가지 유형으로 광범위하게 분류될 수 있다.
- [46] 상기 용어, "세포 접착 분자(cell adhesion molecule)"는 대부분 막 관통형 당단백질로서 당사슬에 의해 막과 유착된 형태로 존재하는 단백질로서, 세포의 발생에서 조직형성 과정, 면역시스템 내에서 세포간 상호작용, 종양의 침윤성 등에 관여하는 것으로 알려진 단백질을 의미한다.
- [47] 상기 용어, "효소 연결 수용체(enzyme-linked receptor)"는 효소의 활성을 이용하여 신호전달 경로를 개시하는 수용체로서, 자신의 세포질 영역에 효소 활성으로서 티로신 인산화효소 활성, 세린-트레오닌 인산화효소 활성, 구아닐산 고리화효소 활성을 갖거나, 자신은 효소활성 부위는 없지만 세포질 영역에서 효소활성을 갖춘 분자와 상호작용하는 수용체로 분류될 수 있다. 예로서, 상기 효소 연결 수용체는 톨-유사 수용체(toll-like receptor, TLR), 교세포 신경성장인자(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF), 심방나트륨이노펩티드 수용체(atrial natriuretic peptide receptor, ANPR) 등을 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명에 따른 막 단백질 발현 증진용 태그는 발현시키고자 하는 막 단백질의 초기 발현 속도를 증진시키는 것일 수 있다.
- [49]
- [50] 또한, 본 발명은 상기 막 단백질 발현 증진용 태그가 포함된 발현벡터를 제공한다.
- [51] 본 발명에 따른 발현벡터에 포함된 막 단백질 발현 증진용 태그는 상기 서술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 이때, 상기 막 단백질 발현 증진용 태그는 발현시키고자 하는 막 단백질의 시작 코돈 뒤에 삽입될 수 있다.

- [52] 상기 용어, "발현벡터(expression vector)"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 바이러스 벡터 등을 모두 포함할 수 있다. 상기 발현벡터는 이에 포함되는 핵산으로부터 펩티드를 생성하기 위해 필요한 요소를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 발현벡터는 신호서열, 복제기점, 마커 유전자, 프로모터, 전사 종결 서열 등을 포함할 수 있다. 이때, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 암호화된 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결될 수 있다.
- [53] 일례로, 원핵세포에 사용되는 발현벡터는 전사를 진행시키는 프로모터, 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리, 및 전사와 해독의 종결서열을 포함할 수 있다. 한편, 진핵세포에 사용되는 발현벡터는 포유동물 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.
- [54] 또한, 상기 발현벡터에 포함되는 마커 유전자로는 통상의 기술분야에 알려진 것을 모두 사용할 수 있으며, 구체적으로 항생제 내성 유전자일 수 있다. 구체적으로, 상기 항생제 내성 유전자는 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 네오마이신, 테트라사이클린 등을 포함하는 항생제에 대해 내성을 나타내는 유전자일 수 있다.
- [55]
- [56] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [57] 본 발명에 따른 숙주세포에 형질전환된 재조합 벡터는 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 상기 숙주세포는 상술한 바와 같은 특징을 갖는 재조합 벡터가 형질전환됨으로써 재조합 벡터에 의해 유전적으로 변형될 수 있다.
- [58] 상기 숙주세포는 통상의 기술분야에 재조합 단백질, 구체적으로 재조합 막 단백질을 생산하기 위해 사용될 수 있다고 알려진 모든 종류의 세포를 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 숙주세포는 원핵세포, 효모 또는 진핵세포일 수 있다. 상기 원핵세포는 대장균(*E. coli*), 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스 속 균주, 슈도모나스 속 균주, 스태필로코쿠스 속 균주 등을 포함할 수 있고, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비지에 등을 포함할 수 있다. 한편, 상기 진핵세포는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PERC6, SP2/0, NS-0, U20S 및 HT1080 등을 포함할 수 있다.
- [59] 또한, 상기 숙주세포는 통상의 기술분야에 알려진 방법에 따라 상술한 바와 같은 발현벡터가 형질주입된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 형질주입은 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개 형질감염(DEAE dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법, 유전자 총(gene gun) 등의 방법으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 방법은 통상의 기술자에 의해 적절히

변형될 수 있다.

[60]

[61] 나아가, 본 발명은 상기 숙주세포에서 막 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는 막 단백질의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[62] 본 발명에 따른 방법으로 생산되는 상기 서술한 바와 같은 태그를 포함하는 막 단백질일 수 있다. 상기 막 단백질의 발현 증가는 단백질의 초기 발현 속도 증가에 의한 것일 수 있다.

[63] 상기 막 단백질은 숙주세포를 배양함으로써 발현될 수 있다. 상기 배양은 막 단백질의 생산에 사용되는 숙주세포의 종류에 따라 적절한 배양배지를 사용하여 수행될 수 있고, 필요에 따라 적절한 보충물이 포함될 수 있다. 또한, 상기 배양은 숙주세포의 종류에 따라 적절한 환경에서 수행될 수 있다.

[64] 본 발명에 따른 생산 방법은 숙주세포에서 생산된 막 단백질을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 회수는 통상의 기술분야에 알려진 방법에 따라 수행될 수 있으며, 이는 필요에 따라 통상의 기술자에 의해 적절히 변형될 수 있다. 일례로, 상기 회수는 원심분리 또는 한외여과를 이용하여 불순물을 제거하고, 수득된 결과물을 크로마토그래피 등으로 추가 정제함으로써 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 친화 크로마토그래피, 양이온 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 등을 포함할 수 있다.

[65]

발명의 실시를 위한 형태

[66] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다, 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 청구범위에 기재된 기술적 사상과 실질적으로 동일한 구성을 갖고 동일한 작용 효과를 이루는 것은 어떠한 것이라도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다.

[67]

[68] 실시예 1. 인간 후각 수용체의 번역 초기속도 예측

[69] 약 400종의 인간 후각 수용체(olfactory receptor)를 사용하여 번역(translation) 초기속도를 통상적인 방법으로 RBS 계산기(RBS calculator, https://salislab.net/software/predict_rbs_calculator)로 예측하였다. 예측된 결과를 이용하여 후각 수용체의 종류에 따른 번역 개시율(initiation rate)을 도 1에, 각 번역 초기속도에 해당하는 후각 수용체 개수를 도 2에 나타내었다.

[70] 도 1에 나타난 바와 같이, 인간 후각 수용체의 번역 개시율은 다양한 분포를 보이며, 도 2에 나타난 바와 같이 대다수의 인간 후각 수용체가 낮은 번역 초기속도를 보였다.

[71]

[72] 실시예 2. AT 태그에 의한 후각 수용체의 번역 초기속도 예측

[73] 인간 후각 수용체를 암호화하는 염기서열의 개시코돈 다음에 AT 태그를 삽입(도 3)한 경우의 번역 초기속도를 상기와 같은 방법으로 예측하였다. 이때, 인간 후각 수용체는 OR1D2(olfactory receptor family 1 subfamily D member 2), OR1L4(olfactory receptor family 1 subfamily L member 2), OR2B11(olfactory receptor family 2 subfamily B member 11), OR3A3(olfactory receptor family 3 subfamily A member 3), OR4F16(olfactory receptor family 4 subfamily F member 16), OR6P1(olfactory receptor family 6 subfamily P member 1), OR9A2(olfactory receptor family 9 subfamily A member 2) 또는 OR13C4(olfactory receptor family 13 subfamily C member 4)를 사용하였고, AT 태그는 하기 표 2에 기재된 바와 같이 사용하였다. 예측된 결과를 이용하여, AT 태그의 종류에 따른 번역 개시율을 도 4에 나타내었다.

[74] [표2]

AT 태그	염기서열(5'→3')	서열번호
AT1	AAA	서열번호 1
AT2	AAATAT	서열번호 2
AT3	AAATATTAT	서열번호 3
AT4	AAATATTATAAA	서열번호 4
AT5	AAATATTATAAATAT	서열번호 5
AT6	AAATATTATAAATATTAT	서열번호 6
AT7	AAATATTATAAATATTATAAA	서열번호 7
AT8	AAATATTATAAATATTATAAATAT	서열번호 8
AT9	AAATATTATAAATATTATAAATATTA T	서열번호 9
AT10	AAATATTATAAATATTATAAATATTA TAAA	서열번호 10
AT11	AAATATTATAAATATTATAAATATTA TAAATAT	서열번호 11

[75]

[76] 도 4에 나타난 바와 같이, AT1 내지 AT8 태그의 경우, 후각 수용체의 종류에 따라 상이한 번역 개시율을 나타낸 반면, AT9, AT10 및 AT11 태그는 후각 수용체의 종류와 무관하게 일관되고 빠른 번역 개시율을 보였다.

[77]

[78] 실시예 3. AT 태그가 삽입된 후각 수용체를 포함하는 발현벡터의 제작

[79] 상기 실시예에서 프로그램을 사용하여 확인된 번역 개시율을 실험을 통해

재확인하고자 AT 태그가 삽입된 후각 수용체를 포함하는 발현벡터를 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 이때, 후각 수용체는 OR1L4, OR13C4, OR2B11 또는 OR3A3를 사용하였다.

- [80] 먼저, 후각 수용체인 OR1L4, OR13C4, OR2B11 또는 OR3A3를 암호화하는 유전자를 게이트웨이™ 엔트리(Gateway™ entry) 클로닝 방법을 사용하여 대장균 발현벡터인 pET-DEST42 벡터에 클로닝하였다. 이후, 후각 수용체가 클로닝된 pET-DEST42 벡터를 하기 표 3에 기재된 프라이머를 사용하여 증폭하였다.

[81] [표3]

프라이머	염기서열(5'→3')	서열번호
OR1L4_F	ATGGAGACAAAGAATTATAGCAGCAG	서열번호 12
OR13C4_F	ATGGACAAGATAAACCAGACATTTGTG	서열번호 13
OR2B11_F	ATGAAAAGTGACAACCATAGCTTCTTAG	서열번호 14
OR3A3_F	ATGGAGCCAGAAGCTGGG	서열번호 15
AT1_R	TTTCATATGTATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 16
AT2_R	ATATTTTCATATGTATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 17
AT3_R	ATAATATTTTCATATGTATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 18
AT4_R	TTTATAATATTTTCATATGTATATCTCCTGGTGAAGGG GG	서열번호 19
AT5_R	ATATTTATAATATTTTCATATGTATATCTCCTGGTGA AGGGG	서열번호 20
AT6_R	ATAATATTTATAATATTTTCATATGTATATCTCCTGGT GAAGGGG	서열번호 21
AT7_R	TTTATAATATTTATAATATTTTCATATGTATATCTCCT GGTGAAGGGG	서열번호 22
AT8_R	ATATTTATAATATTTATAATATTTTCATATGTATATCT CCTGGTGAAGGGG	서열번호 23
AT9_R	ATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATATGTAT ATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 24
AT10_R	TTTATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATATGT ATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 25
AT11_R	ATATTTATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATA TGTATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 26

[82]

[83] 증폭된 PCR 산물은 AccuPrep® PCR/젤 DNA 정제 키트(AccuPrep® PCR/Gel purification kit)를 사용하여 정제하고, DpnI, T4 폴리뉴클레오타이드 카이네이즈(polynucleotide kinase) 및 T4 라이게이즈(ligase)를 순차적으로 반응시켜 순도 높은 발현벡터를 제작하였다. 제작된 발현벡터를 통상적인 방법으로 DH5 α 수용성 세포(competent cell)에 형질전환시킨 후, 암피실린에 내성을 나타내는 콜로니를 선택 및 배양하였다. 라보패스™ 플라스미드 DNA 정제 키트(LaboPass™ plasmid DNA purification kit)를 사용하여 상기 배양된 세포로부터 발현벡터를 추출하고 염기서열 분석을 통해 발현벡터 내 AT 태그가 삽입된 후각 수용체를 확인하였다.

[84]

[85] 실시예 4. 후각 수용체의 단백질 발현 확인

[86] 상기 제작된 플라스미드를 이용하여 무세포 단백질 합성을 수행함으로써, AT 태그에 의한 후각 수용체 단백질의 발현을 다음과 같이 확인하였다.

[87]

[88] 4-1. 세포 추출액의 제조

[89] 먼저, 무세포 단백질 합성에 사용하기 위한 세포 추출액을 제조하여 준비하였다.

[90] 구체적으로, BL21(DE3) 균주를 통상적으로 배양하여 OD₆₀₀의 값이 0.6이 되었을 때, 1 mM의 IPTG를 첨가하여 T7 RNA 중합효소의 과발현을 유도하였다. 이후, OD₆₀₀ 값이 0.3이 되었을 때, 배양액을 4,500 rpm 및 4°C의 조건에서 15분 동안 원심분리하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포에 완충액 A(10 mM 트리스-아세트이트 (pH 8.2), 14 mM 아세트산마그네슘, 60 mM 글루탐산칼륨(potassium glutamate) 및 1 mM DDT(dithiothreitol))를 첨가하여 세척하였고, 세척은 총 3회 반복하였다. 세척된 세포 1 g당 1 mL의 완충액 A를 첨가하고 세포를 현탁시켰다. 세포 현탁액을 20 kHz의 주파수 및 50% 진폭에서 3.175 mm 직경 프로브를 이용하여 767 J의 에너지로 초음파 처리하여 세포를 파쇄하였다(Q125 sonicator, Qsonica). 상기 수득된 세포 파쇄액을 18,000 ×g 및 4°C의 조건에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 수득된 상등액은 37°C에서 1시간 동안 교반하고 소량으로 분주하여 사용전까지 -80°C에서 보관하였다.

[91]

[92] 4-2. 무세포 단백질 합성

[93] 무세포 단백질 합성을 위해, 먼저 57 mM의 HEPES-KOH(pH 8.2), 1.2 mM의 ATP, 0.85 mM의 CTP, 0.85 mM의 GTP, 0.85 mM의 UTP, 170 μ g/mL의 대장균 tRNA 혼합물, 2 mM의 각 아미노산들, 33 mM의 포스포엔올피루브산(phosphoenolpyruvate), 1 mM의 DTT, 130 mM의 아세트산칼륨(potassium acetate), 12 mM의 아세트산마그네슘(magnesium acetate),

34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 폴리닌산(folinic acid), 2%(w/v)의 PEG(8000), 13.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 후각 수용체 발현벡터 및 27%(v/v)의 실시예 4-1에서 제조된 세포 추출액을 혼합하여 반응액을 제조하였다. 제조된 반응액을 2 ml의 소형 시험관에 넣고, 30°C의 항온수조에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 이를 18,000 $\times g$ 및 4°C의 조건에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 수득된 펠렛(pellet)에 가용 완충액(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM SDS, 100 mM DTT, 1 mM EDTA)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 가용화된 반응물을 사용하여 웨스턴 블롯을 통상적인 방법으로 수행함으로써 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 이때, 1차 항체로서 V5 태그에 결합하는 토끼 유래 항체를, 2차 항체로서 토끼 항체에 결합하는 HRP 효소가 결합된 염소 유래 항체를 사용하였다. 그 결과, OR1L4, OR13C4, OR2B11 또는 OR3A3에 대한 웨스턴 블롯 결과를 촬영한 사진 및 발현 정도를 정량한 결과를 각각 도 5 내지 8에 나타내었다.

- [94] 도 5 내지 8에 나타난 바와 같이, 후각 수용체만을 발현시킨 경우와 비교하여 AT 태그가 포함된 후각 수용체의 발현이 유의적으로 증가하였다. 특히, AT10 태그의 경우, 모든 후각 수용체에서 발현 증가 효과가 가장 우수하였다.

[95]

- [96] 실시예 5. AT10 및 AT11에 의한 후각 수용체 발현 비교

- [97] 상기 실시예에서 유의적으로 후각 수용체의 발현을 증진시키는 것으로 확인된 AT10 및 AT11 태그를 사용하여 13종류의 후각 수용체 발현을 다음과 같이 비교하였다.

- [98] 먼저, OR1G1(olfactory receptor family 1 subfamily G member 1), OR1L1(olfactory receptor family 1 subfamily L member 1), OR1L4, OR3A3, OR6F1(olfactory receptor family 6 subfamily F member 1), OR6Y1(olfactory receptor family 6 subfamily Y member 1), OR9A2, OR13C4, OR2B11, OR2J2(olfactory receptor family 2 subfamily J member 2), OR2W1(olfactory receptor family 2 subfamily W member 1), OR51E1(olfactory receptor family 51 subfamily E member 1) 또는 OR4F16을 암호화하는 유전자를 상술한 바와 같이 pET-DEST42 벡터에 클로닝하였다. 이후, 하기 표 4에 기재된 프라이머를 사용하여 상술한 바와 같은 방법으로 PCR을 수행함으로써, 후각 수용체 후각 수용체 개시코돈 뒤에 AT10 태그가 삽입된 발현벡터를 제조하였다.

[99] [표4]

프라이머	염기서열(5'→3')	서열번호
OR1G1_ F	ATGGAGGGGAAAAATCTGACCA	서열번호 27
OR1L1_F	ATGGGAAGAAATAACCTAACAAGACCC	서열번호 28
OR1L4_F	ATGGAGACAAAGAATTATAGCAGCAG	서열번호 12
OR3A3_ F	ATGGAGCCAGAAGCTGGG	서열번호 15
OR6F1_F	ATGGACACAGGCAACAAACTC	서열번호 29
OR6Y1_ F	ATGACCACCATAATTCTGGAAGTAGATAA	서열번호 30
OR9A2_ F	ATGATGGACAACCACTCTAGTGC	서열번호 31
OR13C4_ F	ATGGACAAGATAAACCAGACATTTGTG	서열번호 13
OR2B11_ F	ATGAAAAGTGACAACCATAGCTTCTTAG	서열번호 14
OR2J2_F	ATGATGATTAAAAAAAATGCAAGTTCGGAAGAC	서열번호 32
OR2W1_ F	ATGGACCAAAGCAATTATAGTTCTTTACAT	서열번호 33
OR51E1_ F	ATGATGGTGGATCCCAATGGC	서열번호 34
OR4F16	ATGGATGGAGAGAATCACTCAGTG	서열번호 35
AT10_R	TTTATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATATGT ATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 25
AT11_R	ATATTTATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATA TGTATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 26

[100]

[101] 상기 발현백터를 사용하여 실시예 4에 기재된 바와 동일한 조건 및 방법으로 무세포 단백질 합성을 수행함으로써 후각 수용체의 발현을 확인하였다. 그 결과, 후각 수용체의 발현정도를 확인한 웨스턴 블롯 결과를 도 9에 나타내었다.

[102] 도 9에 나타난 바와 같이, 12종류의 후각 수용체 중, OR1G1, OR1L1, OR1L4, OR3A3, OR6F1, OR6Y1, OR9A2 및 OR13C4는 AT11 태그를 사용한 경우보다 AT10 태그에 의해 발현이 유의적으로 현저히 증가하였다. 반면, OR2B11, OR2J2, OR2W1 및 OR51E1는 AT10 및 AT11 모두 비슷한 정도로 발현이 증가하였다.

[103]

[104] 실시예 6. AT10 태그에 의한 후각 수용체 발현 증가 확인-(1)

[105] 상기에서 4종류의 후각 수용체 발현을 가장 우수하게 증가시키는 것으로 확인된 AT10 태그를 사용하여 17종류의 후각 수용체 발현 증가를 다음과 같이 확인하였다. 실험은 OR1L1, OR1L4, OR1N1, OR2B6, OR2J2, OR2W1, OR3A3, OR4E2, OR4F16, OR6B2, OR6F1, OR9A2, OR10K1, OR13C4, OR13D1, OR51E1 또는 OR52E5를 암호화하는 유전자와 하기 표 5에 기재된 프라이머를 사용한 것을 제외하고는 상기 서술한 바와 같은 방법으로 수행되었다. 그 결과, 후각 수용체의 발현정도를 확인한 웨스턴 블롯 결과를 도 10에 나타내었다.

[106] [표5]

프라이머	염기서열(5'→3')	서열번호
OR1L1_F	ATGGGAAGAAATAACCTAACAAGACCC	서열번호 28
OR1L4_F	ATGGAGACAAAGAATTATAGCAGCAG	서열번호 12
OR1N1_F	ATGGAAAACCAATCCAGCATTTCT	서열번호 36
OR2B6_F	ATGAATTGGGTAAATGACAGCATCATAC	서열번호 37
OR2J2_F	ATGATGATTAAAAAAAATGCAAGTTCGGAAGAC	서열번호 32
OR2W1_F	ATGGACCAAAGCAATTATAGTTCTTTACAT	서열번호 33
OR3A3_F	ATGGAGCCAGAAGCTGGG	서열번호 15
OR4E2_F	ATGGACAGTCTAAACCAAACAAGAGT	서열번호 38
OR4F16_F	ATGGAGTTGGGAAATGTCACCA	서열번호 39
OR6B2_F	ATGAGTGGGGAGAATGTCACC	서열번호 40
OR6F1_F	ATGGACACAGGCAACAAAACCTC	서열번호 29
OR9A2_F	ATGATGGACAACCACTCTAGTGC	서열번호 31
OR10K1_F	ATGGAGCAAGTCAATAAGACTGTGG	서열번호 41
OR13C4_F	ATGGACAAGATAAACCAGACATTTGTG	서열번호 13
OR13D1_F	ATGGAGACAAGAAATTACTCTGCCA	서열번호 42
OR51E1_F	ATGATGGTGGATCCCAATGGC	서열번호 34
OR52E5_F	ATGCTTCATACCAACAATACACAGTTT	서열번호 43
AT10_R	TTTATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATATG TATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 25

[107]

[108] 도 10에 나타난 바와 같이, AT10 태그가 포함되지 않은 발현벡터를 사용한 경우와 비교하여 AT10 태그가 삽입된 경우 후각 수용체의 발현이 현저히 증가하였다.

[109]

[110] 실시예 7. AT10 태그에 의한 후각 수용체 발현 증가 확인-(2)

[111] 상기에서 AT10 태그에 의한 발현 증가가 확인된 후각 수용체 중, 대장균에서 코돈 사용 빈도가 상이하면서 번역 초기속도가 유사한 후각 수용체를 사용하여 AT10 태그에 의한 후각 수용체 발현 변화를 확인하였다. 이때, 후각 수용체로는 OR2B6, OR4F16, OR2W1, OR13C4, OR1L1, OR13D1, OR6F1 및 OR6B2를 사용하여 상기 서술한 바와 같이 무세포 단백질 합성방법으로 수행되었으며 AT10 태그 유무에 따른 결과를 비교하여 표 6 및 도 11에 나타내었다.

[112] [표6]

후각 수용체	CAI (codon adaptation index)	TIR(translation initiation rate) (태그 없음)	TIR (TA10 태그)
OR2B6	0.52	7701.14	41638.99
OR4F16	0.55	6912.68	
OR2W1	0.56	7805.82	
OR13C4	0.57	6850.74	
OR1L1	0.58	6608.48	
OR13D1	0.58	7166.10	
OR6F1	0.63	6094.24	
OR6B2	0.65	4447.37	

[113]

[114] 도 11 및 표 6에 나타난 바와 같이, AT10 태그가 없는 경우, 코돈 사용 빈도와 단백질 발현량이 유의적인 상관관계를 나타내지 않았다. 한편, AT10 태그를 사용한 경우에는 코돈 사용 빈도가 달라도 번역 초기속도가 모든 후각 수용체에서 현저히 증가하였을 뿐 아니라, 발현 편차 또한 유의적으로 감소하였다.

[115]

[116] 실시예 8. AT10 태그에 의한 후각 수용체 발현 증가 확인-(3)

[117] 상기에서 AT10 태그에 의한 발현 증가가 확인된 후각 수용체 중, 대장균에서 코돈 사용 빈도가 동일하면서 번역 초기속도가 다른 후각 수용체를 사용하여 AT10 태그에 의한 후각 수용체 발현 변화를 확인하였다. 이때, 후각 수용체로는 OR1D2, OR3A3, OR10K1, OR1N1, OR13D1, OR9A2, OR52E5, OR1L4 및 OR2J2를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였으며 AT10 태그 유무에 따른 결과를 비교하여 표 7 및 도 12에 나타내었다.

[118] [표7]

후각 수용체	CAI	TIR(태그 없음)	TIR(TA10 태그)
OR1D2	0.58	460.28	41638.99
OR3A3	0.58	1132.22	
OR10K1	0.58	2455.31	
OR1N1	0.58	4866.25	
OR13D1	0.58	7166.1	
OR9A2	0.58	10648.3	
OR52E5	0.58	18605.48	
OR1L4	0.58	31500.68	
OR2J2	0.58	38920.86	

[119]

[120] 도 12 및 표 7에 나타난 바와 같이, AT10 태그가 없는 경우, 번역 초기속도가 빠를수록 단백질 발현량이 유의적으로 증가하여 유의적인 상관관계를 나타내는 것을 알 수 있었다. 한편, AT10 태그를 사용한 경우에는 번역 초기속도가 다른 모든 후각 수용체에서 발현이 현저히 증가하였을 뿐 아니라, 발현 편차 또한 유의적으로 감소하였다.

[121] 따라서, 상기 내용에 기초하였을 때, 박테리아 내에서 재조합 단백질의 발현은 코돈 사용 빈도와도 관계가 있으나, 이보다는 번역 초기속도가 더욱 유의적인 관계를 나타냄을 알 수 있었다.

[122]

[123] 실시예 9. AT10 태그에 의한 GPCR 단백질의 발현 증가 확인

[124] 후각 수용체를 포함하는 GPCR(G protein-coupled receptor) 또한 TA10 태그에 의해 발현 변화가 있는지 여부를 확인하였다. 실험은 GPCR인 CCR3(C-C motif chemokine receptor 3), CCR4(C-C motif chemokine receptor 4), CXCR2(C-X-C motif chemokine receptor 2), ADORA2A(adenosine A2a receptor), EDNRB(endothelin receptor type B), APLNR(apelin receptor) 또는 PTH1R(parathyroid hormone 1 receptor)을 암호화하는 유전자와 하기 표 8에 기재된 프라이머를 사용한 것으로 제외하고는 상기 서술한 바와 같은 방법으로 수행되었다. 그 결과, 후각 수용체의 발현정도를 확인한 웨스턴 블롯 결과를 도 13에 나타내었다.

[125] [표8]

프라이머	염기서열(5'→3')	서열번호
CCR3_F	ATGACAACCTCACTAGATACAGTTGAG	서열번호 44
CCR4_F	ATGAACCCACGGATATAGCAG	서열번호 45
CXCR2_F	ATGGAAGATTTTAACATGGAGAGTGAC	서열번호 46
ADORA2 A_F	ATGCCCATCATGGGCTCC	서열번호 47
EDNRB_F	ATGCAGCCGCCTCCAA	서열번호 48
APLNR_F	ATGGAGGAAGGTGGTGATTTTGA	서열번호 49
PTH1R_F	ATGGGGACCGCCCG	서열번호 50
AT10_R	TTTATAATATTTATAATATTTATAATATTTTCATATG TATATCTCCTGGTGAAGGGG	서열번호 25

[126]

[127] 도 13에 나타난 바와 같이, 후각 수용체 이외에도 다른 GPCR 또한 TA10 태그에 의해 발현이 유의적으로 증가하였다.

[128]

[129] 실시예 10. 대장균에서 AT10 태그에 의한 GPCR 단백질의 발현 증가 확인

[130] GPCR 단백질인 OR2B6, OR13C4, CCR3 또는 PTH1R을 암호화하는 유전자가 대장균에서 TA10 태그에 의해 발현 변화를 나타내는지 다음과 같이 확인하였다.

[131] 먼저, OR2B6, OR13C4, CCR3 또는 PTH1R을 암호화하는 유전자를 상기 서술한 바와 같이 AT10이 포함되도록 발현벡터에 클로닝하고, 클로닝된 발현벡터를 통상적인 방법으로 BL21 세포주에 형질전환시켰다. 발현벡터가 형질전환된 벡터를 OD₆₀₀에서 0.7에 도달할 때까지 배양하고, 1 mM의 IPTG를 처리하였다. 이를 4시간 더 배양하고 배양액을 원심분리하여 세포를 회수하였다. 초음파를 이용하여 통상적인 조건으로 세포를 파쇄시켜 세포 파쇄물을 수득하고, 이를 다시 원심분리하여 펠렛을 취하였다. 상기 펠렛에 가용화 완충액(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM SDS, 100 mM DTT, 1 mM EDTA)을 첨가하고 30°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 가용화된 샘플을 사용하여 상기 서술한 바와 같이 웨스턴 블롯을 수행하고, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[132] 도 14에 나타난 바와 같이, 모든 GPCR 단백질이 대장균에서 AT10 태그에 의해 유의적으로 발현이 증가하였다.

[133]

[134] 실시예 11. AT10 태그된 GPCR 단백질의 활성 확인

[135] AT10으로 태그된 GPCR 단백질의 활성변화를 트립토판 형광 소광 분석법으로

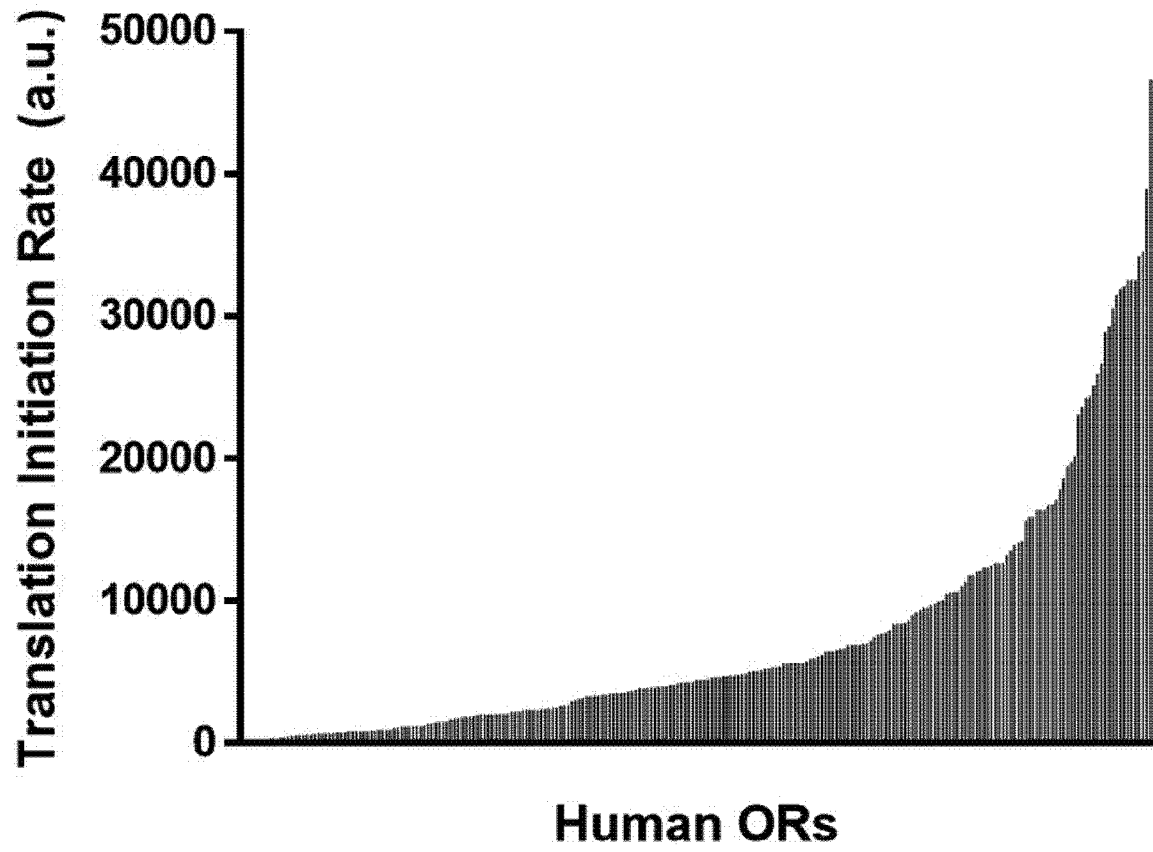
확인하였다.

- [136] 먼저, OR2W1 또는 PTH1R을 암호화하는 유전자를 상기 서술한 바와 같이 AT10이 포함되도록 발현벡터에 클로닝하고, 상기 서술한 바와 같이 대장균에 형질전환하여 세포 파쇄물을 수득하였다. 수득된 세포 파쇄물을 원심분리하여 봉입체(inclusion body) 형태의 GPCR 단백질을 얻고 가용화 완충액을 첨가하고 30°C에서 하룻밤동안 반응시켜 단백질을 가용화시켰다. 가용화된 GPCR 단백질을 결합 완충액(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM SDS)으로 투석하고, Ni-NTA 컬럼을 사용하여 통상적인 방법으로 정제하였다. 정제된 GPCR 단백질을 구조 재형성(refolding) 완충액(5 mM GSH, 1 mM GSSG, 6 mM n-도데실- β -D-말토피라노사이드(DDM), 6 mM 6-사이클로헥실헥실- β -D-말토사이드(Cymal6), 6 mM 메틸- β -사이클로덱스트린)을 첨가하여 통상적인 방법으로 단백질 구조를 재형성시켰다. 구조 재형성된 GPCR 단백질을 사용하여 트립토판 형광 소광 분석법으로 GPCR의 활성을 확인하고, 그 결과를 도 15에 나타내었다.
- [137] 도 15에 나타난 바와 같이, AT10 태그가 GPCR 단백질의 활성에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

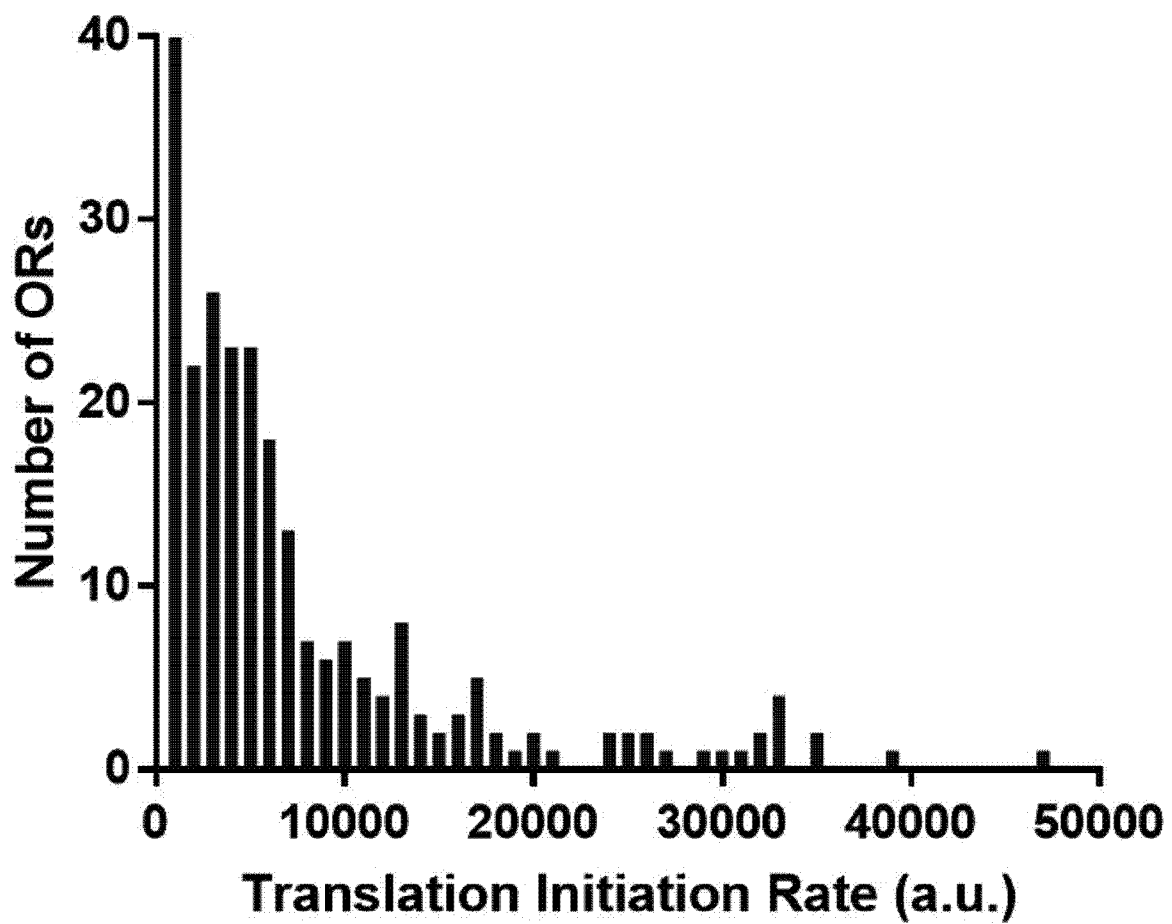
청구범위

- [청구항 1] 아데닌(adenine, A) 및 티민(thymine, T)으로 구성되고, 3 내지 99개의 뉴클레오타이드로 구성되는 막 단백질(membrane protein) 발현 증진용 태그(tag).
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 태그는 리신(lysine, K) 또는 티로신(tyrosine, Y)을 암호화하는, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 태그는 이에 의해 번역되는 첫번째 아미노산의 C-말단으로부터 KYK가 순차적으로 하나씩 추가되는, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 3의 배수로 포함되는, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 3 내지 66개의 뉴클레오타이드로 구성되는, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 3 내지 33개의 뉴클레오타이드로 구성되는, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 막 단백질은 G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR), 호르몬 수용체(hormone receptor), 세포막 수송 단백질(membrane transport protein), 세포 접착 분자(cell adhesion molecule) 또는 효소 연결 수용체(enzyme-linked receptor)인, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 GPCR은 클래스 A, 클래스 B, 클래스 C, 클래스 D, 클래스 E 또는 클래스 F의 GPCR인, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 막 단백질 발현 증진용 태그는 단백질의 초기 발현 속도를 증진시키는, 막 단백질 발현 증진용 태그.
- [청구항 10] 제1항의 막 단백질 발현 증진용 태그가 포함된 발현벡터.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 막 단백질 발현 증진용 태그는 발현시키고자 하는 막 단백질의 시작 코돈 뒤에 삽입된, 발현벡터.
- [청구항 12] 제10항의 발현벡터가 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 13] 제12항의 숙주세포에서 막 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는 막 단백질의 발현을 증가시키는 방법.

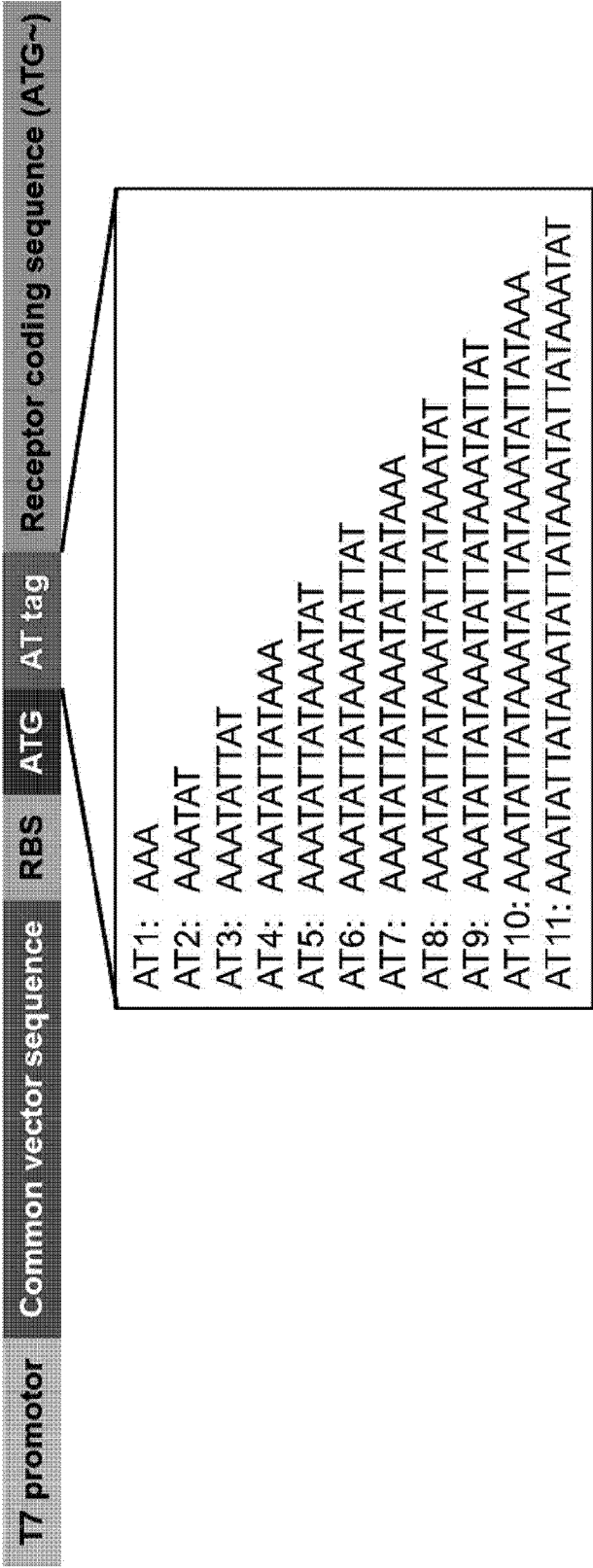
[도1]



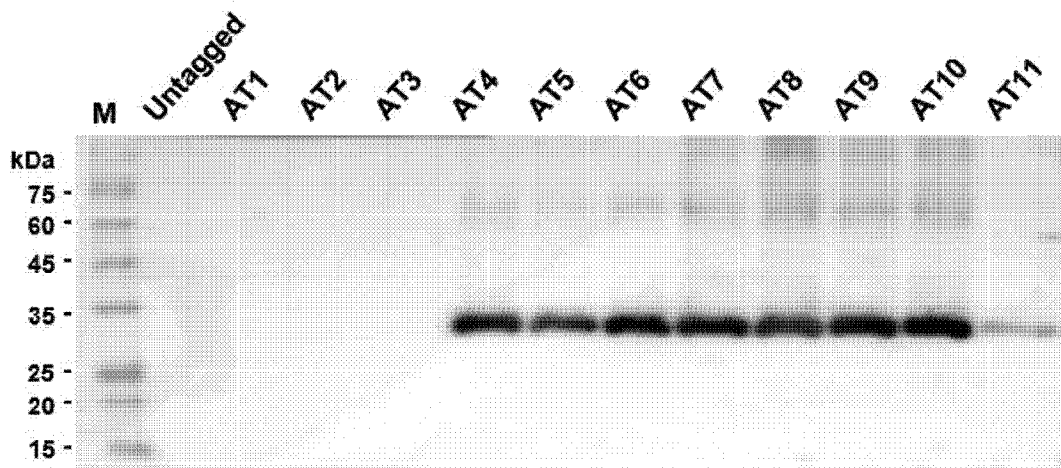
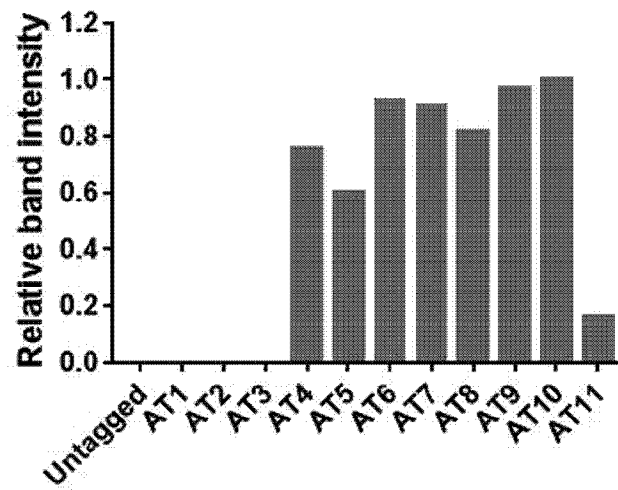
[도2]



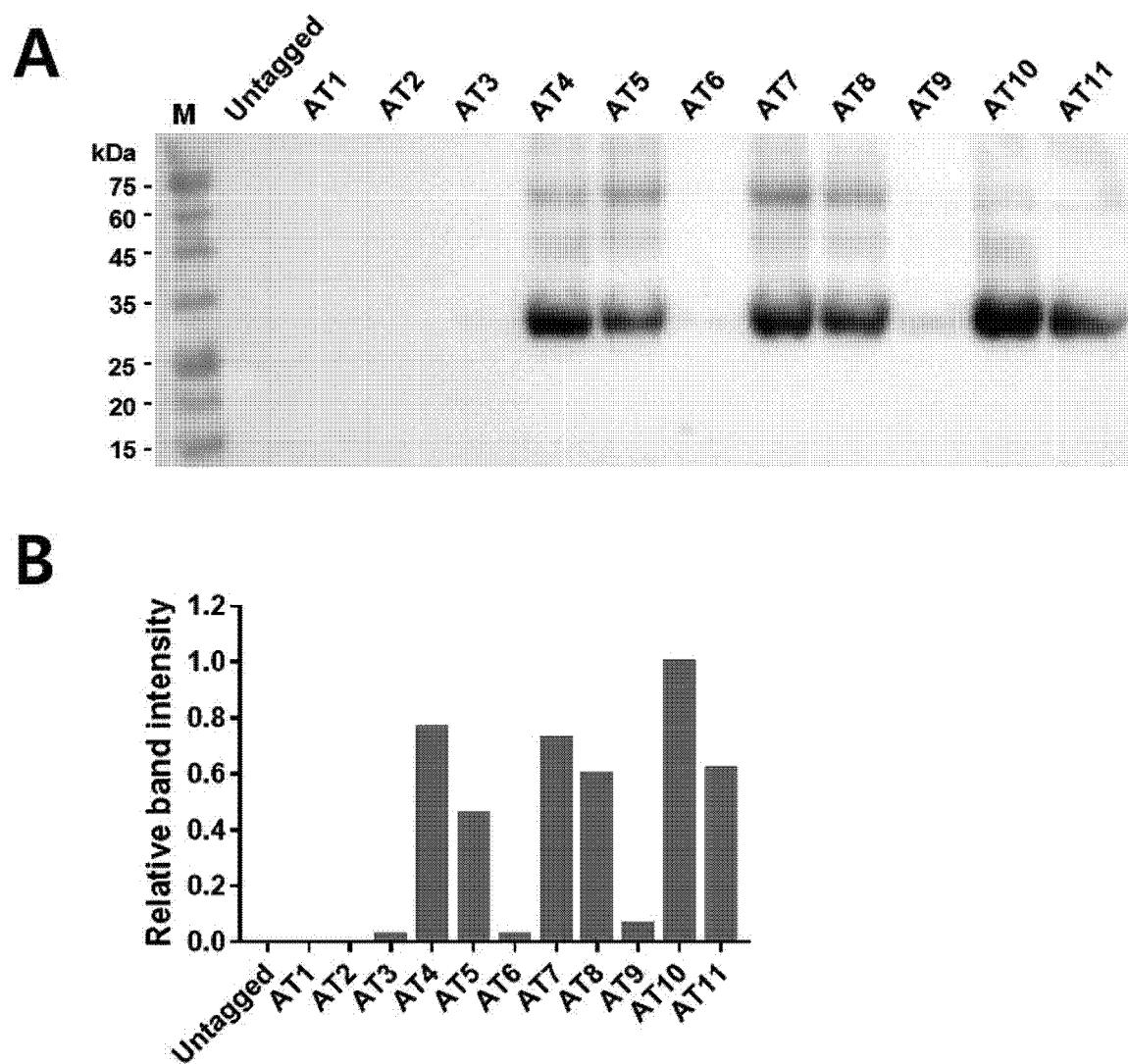
[도3]



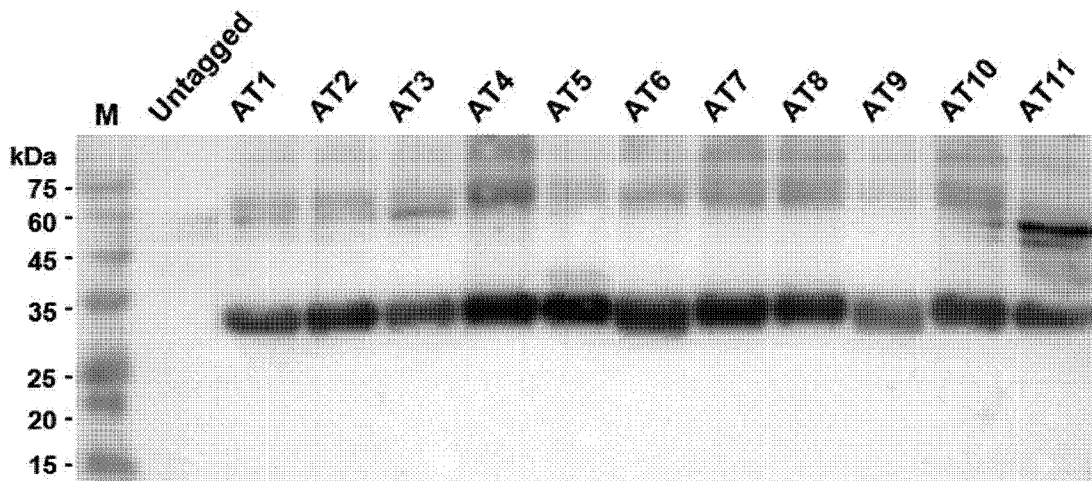
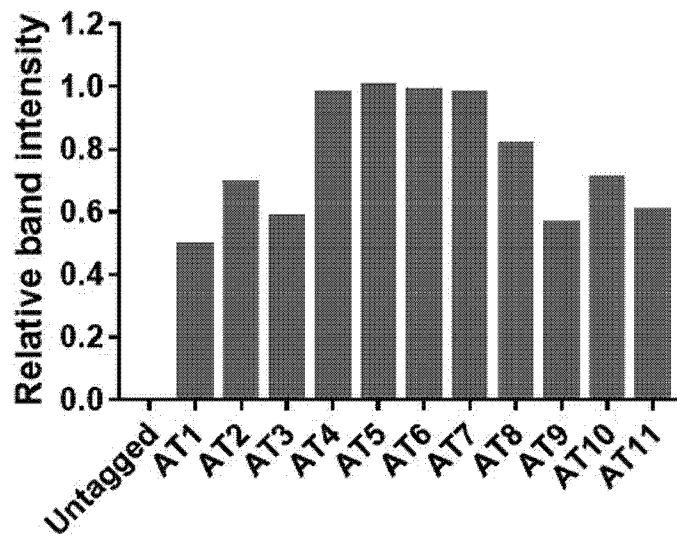
[도5]

A**B**

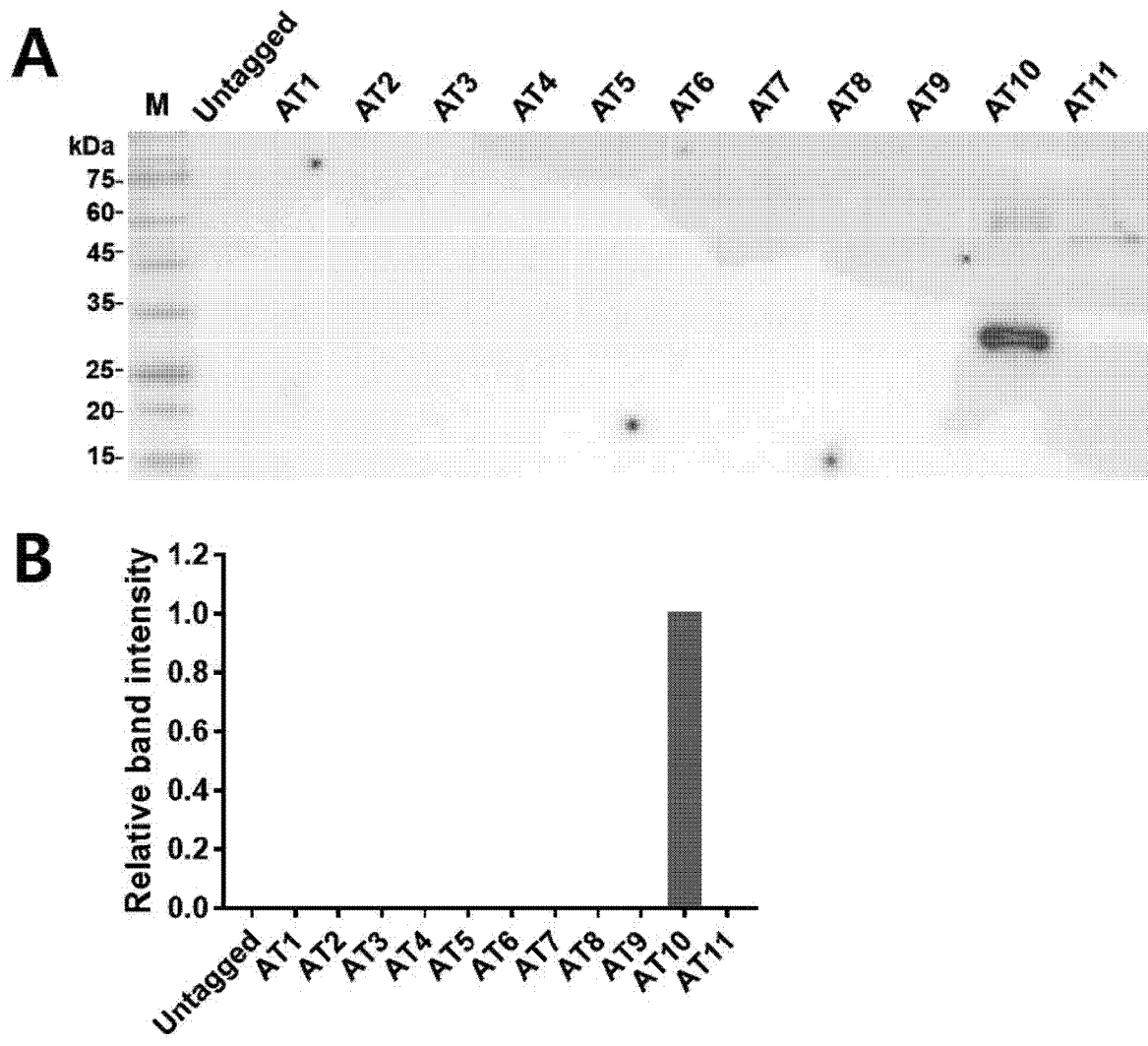
[도6]



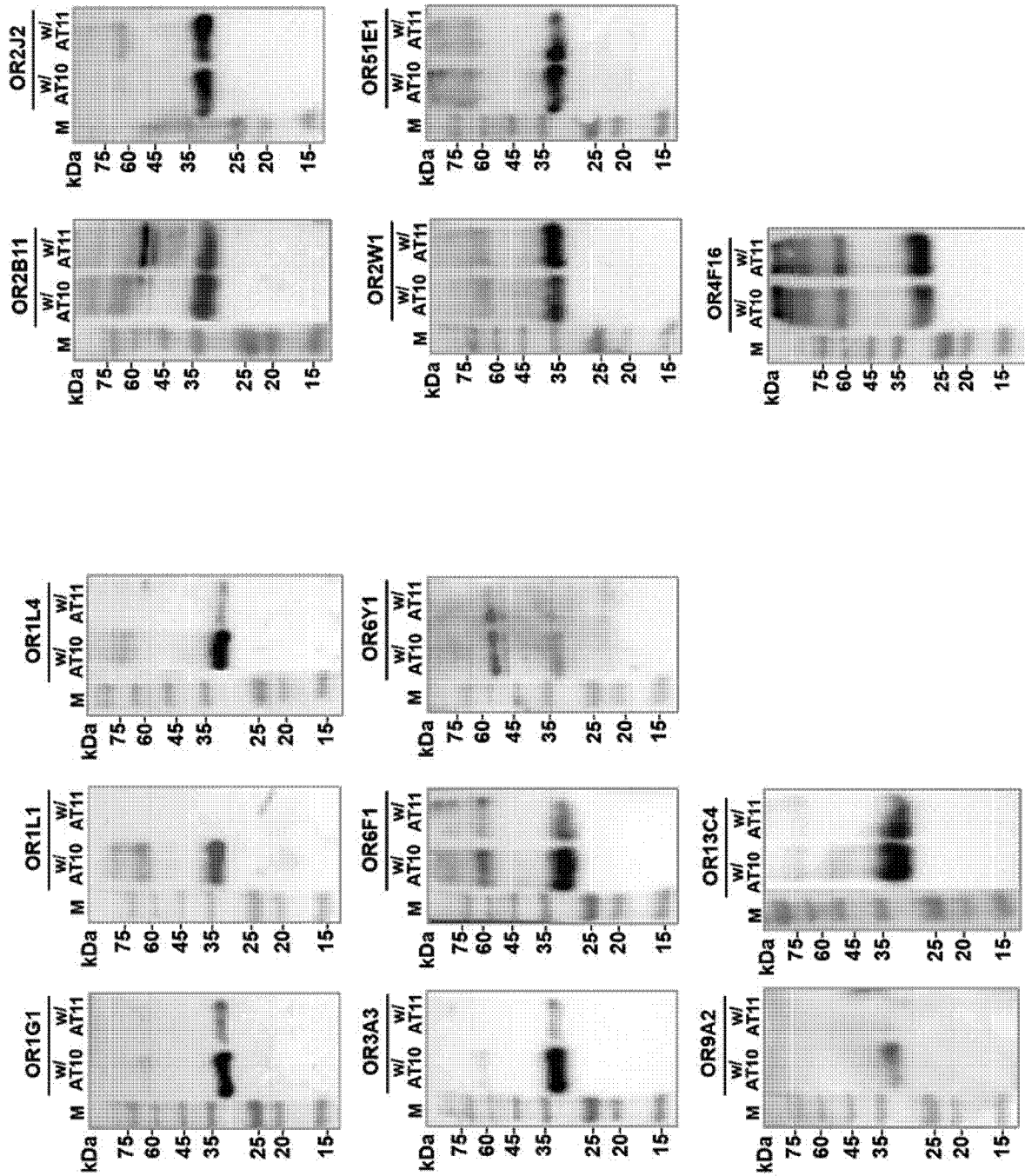
[도7]

A**B**

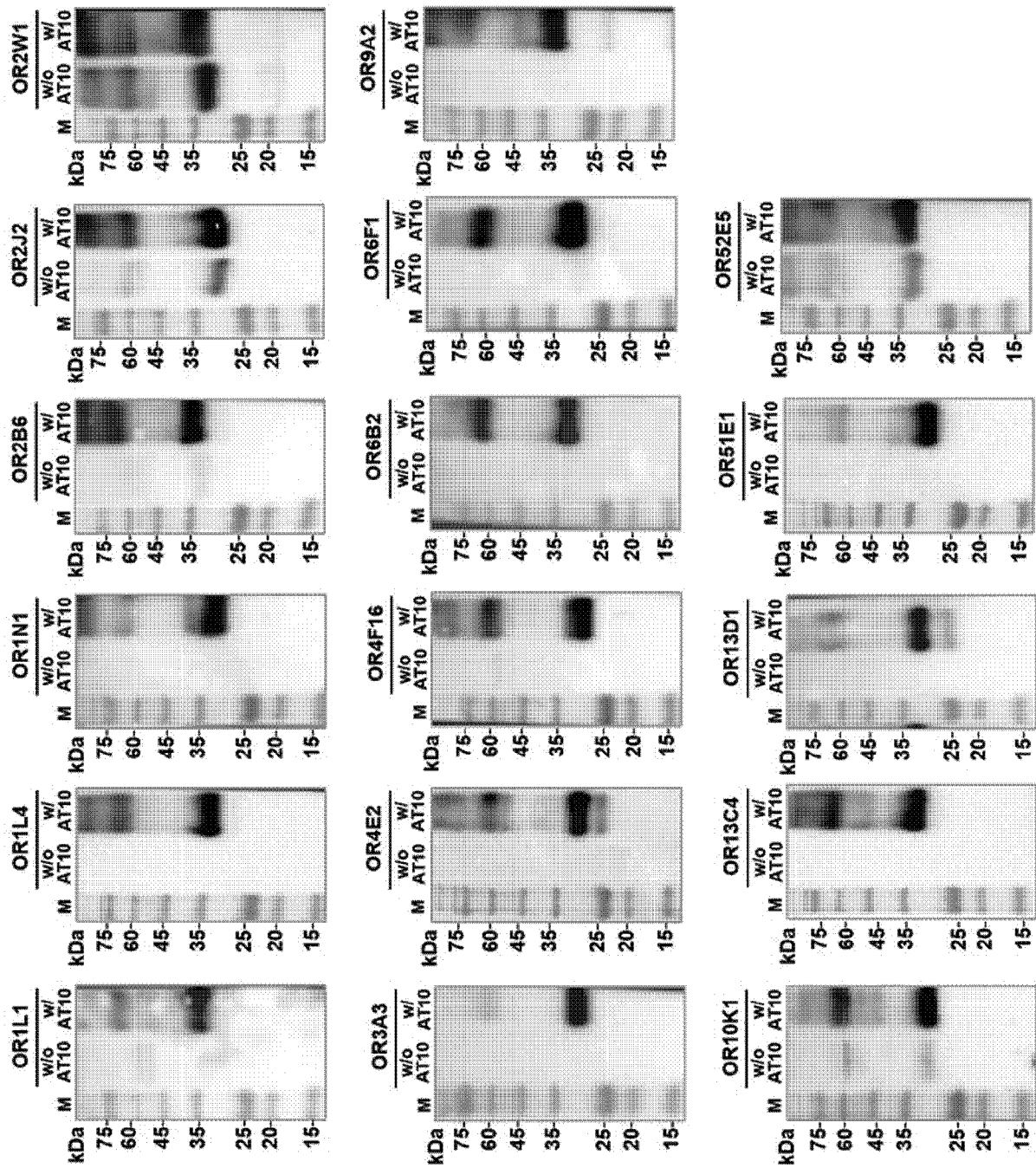
[도8]



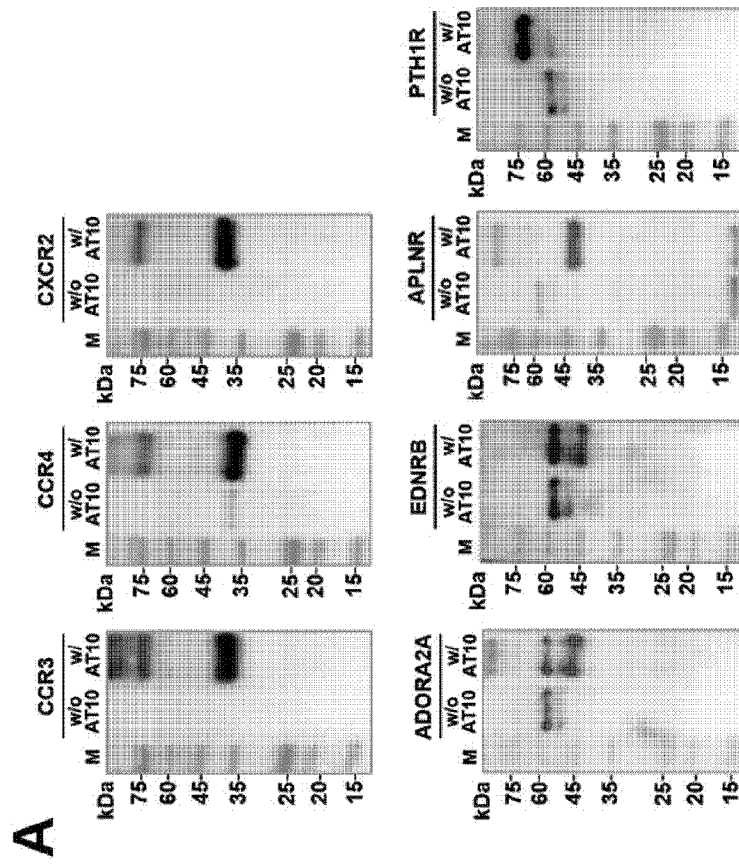
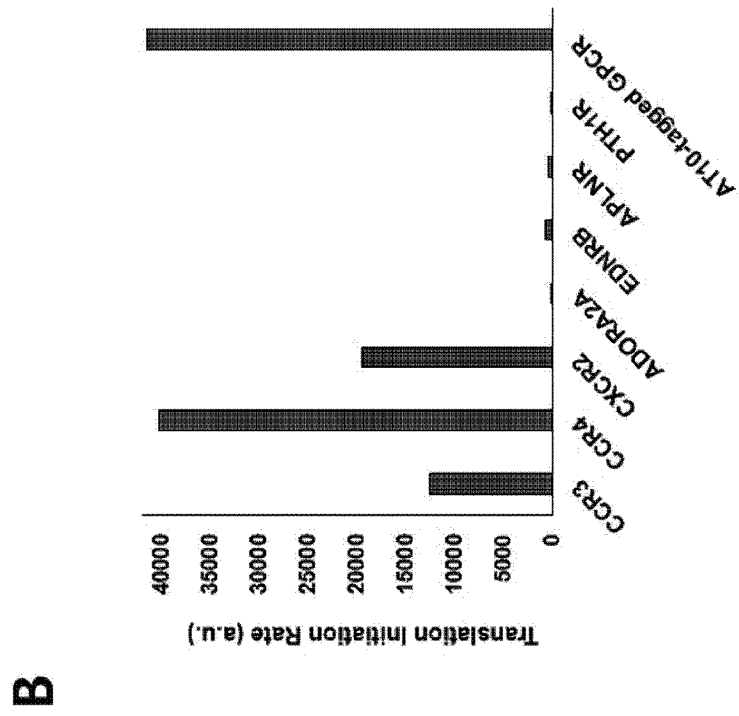
[도9]



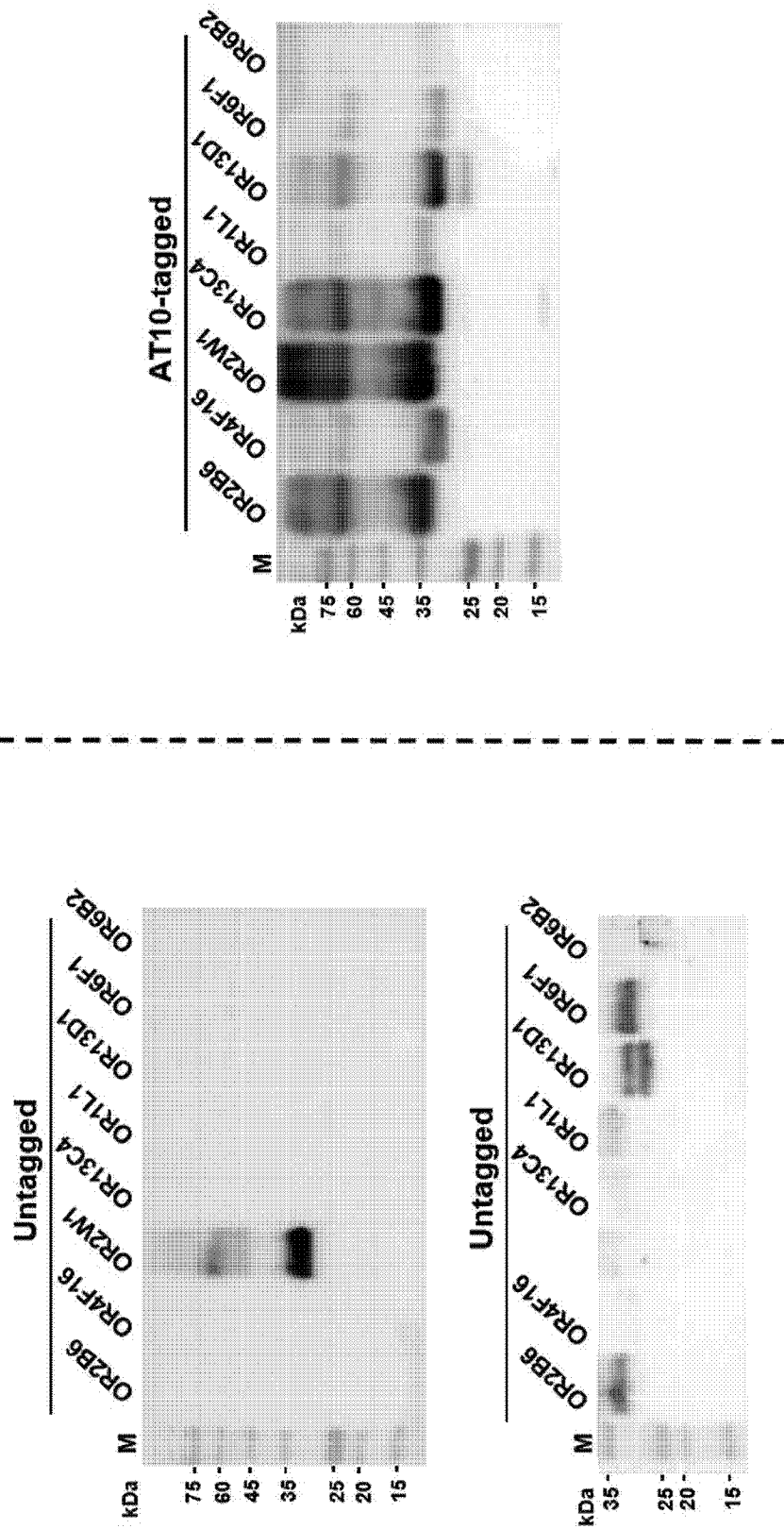
[도10]



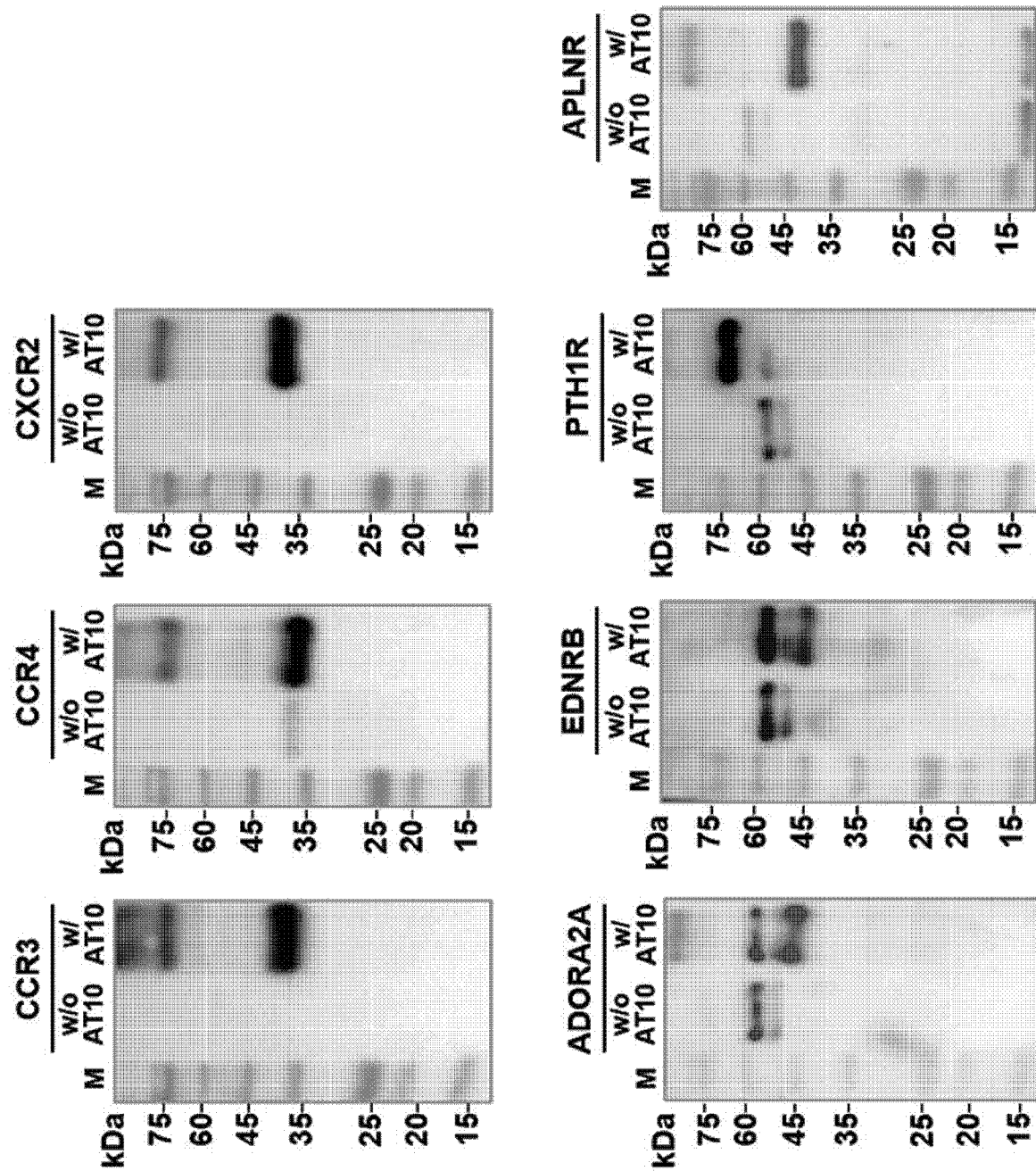
[115]



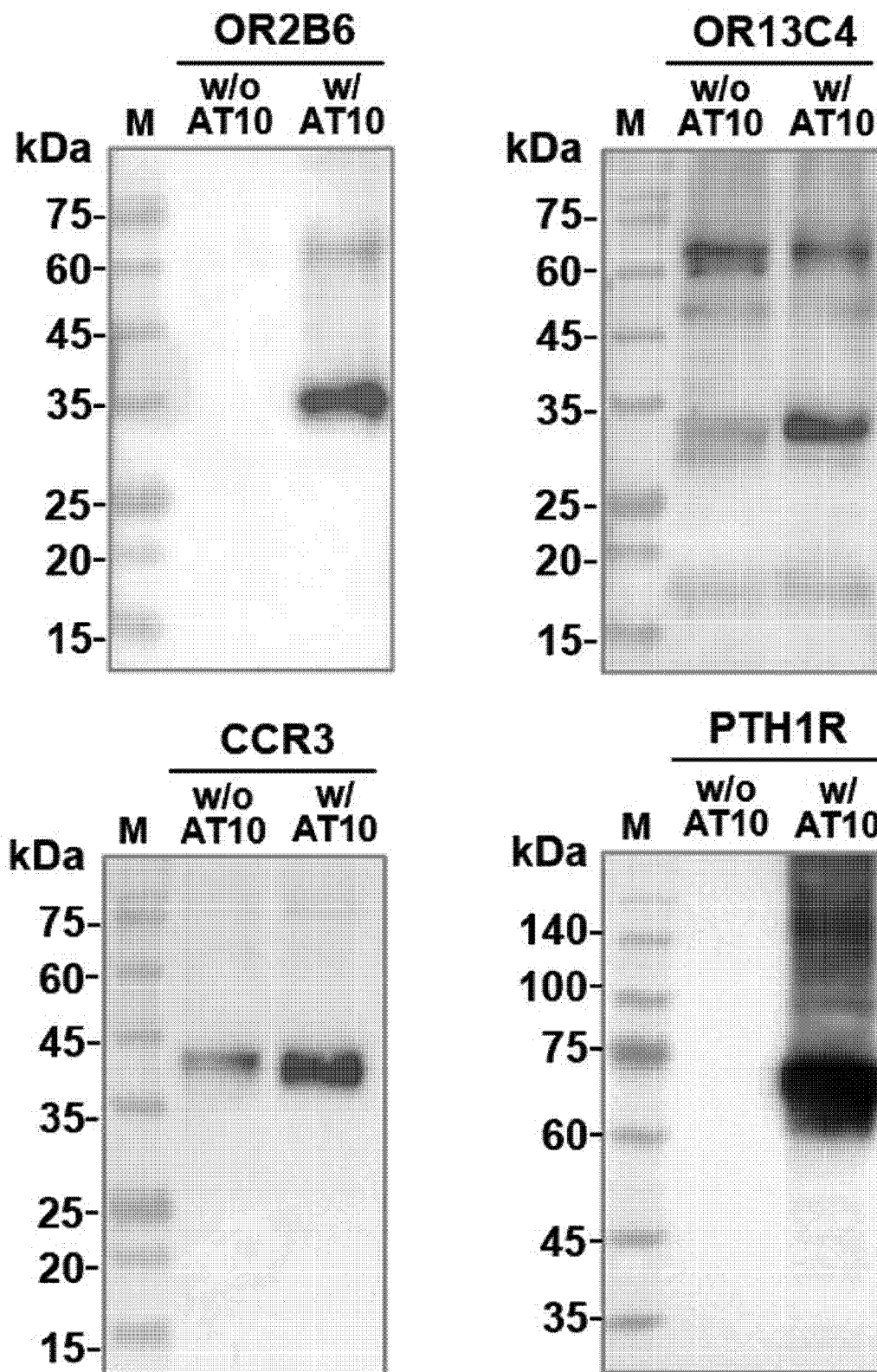
[도12]



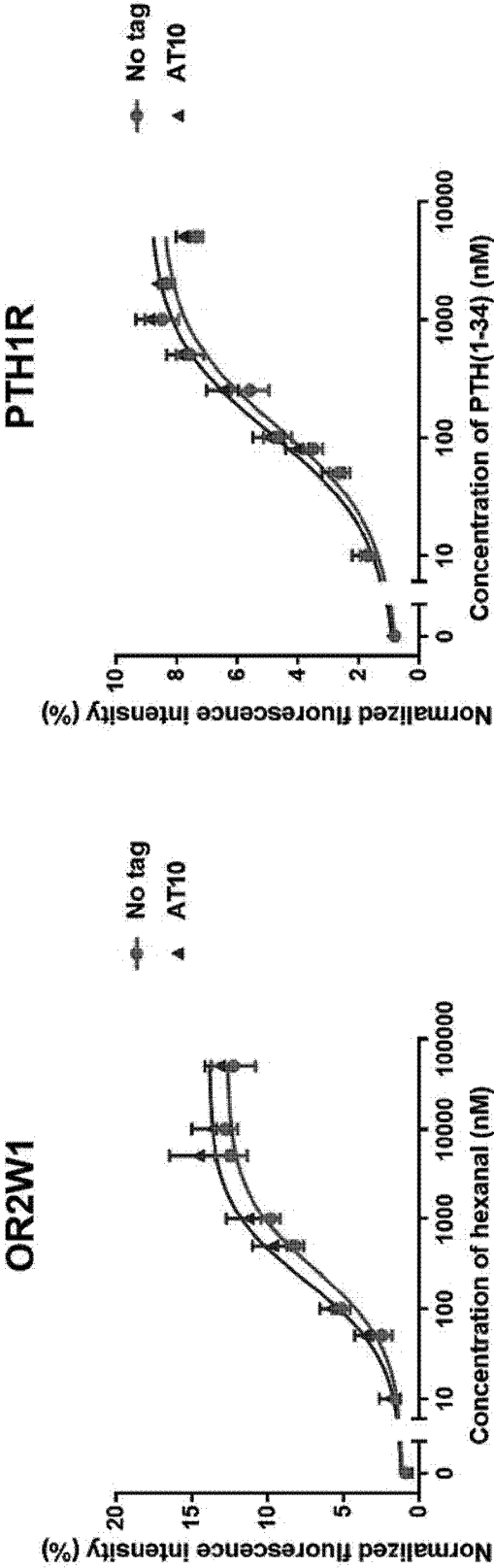
[도13]



[도14]



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020700

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/11(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C07K 14/195(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C07K 14/605(2006.01); C07K 7/06(2006.01); C12N 15/63(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 융합 태그(fusion tag), 막 단백질(membrane protein), 목적 단백질(target protein), G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR), 발현벡터(expression vector)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PANDEY, A. et al. Small expression tags enhance bacterial expression of the first three transmembrane segments of the apelin receptor. Biochemistry and Cell Biology. 2014, vol. 92, no. 4, pp. 269-278. See abstract; pages 272, 273 and 276; Figure 1; Tables 1 and 2; and Supplementary Material, Table S1.	1-13
X	HABERSTOCK, S. et al. A systematic approach to increase the efficiency of membrane protein production in cell-free expression systems. Protein Expression and Purification. 2012, vol. 82, no. 2, pp. 308-316. See pages 309-311 and 313; Table 2; and Figures 2 and 4.	1-13
DA	KR 10-2106773 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 06 May 2020 (2020-05-06) See paragraphs [0012]-[0099].	1-13
A	KR 10-1912631 B1 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION et al.) 30 October 2018 (2018-10-30) See paragraphs [0029]-[0099].	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 2023

Date of mailing of the international search report

15 June 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020700

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2021-0010366 A (PEPGENE INC.) 27 January 2021 (2021-01-27) See paragraphs [0016]-[0098].	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020700

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020700

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
KR	10-2106773	B1	06 May 2020	KR 10-2019-0083307	A	11 July 2019
				US 11542491	B2	03 January 2023
				US 2021-0163914	A1	03 June 2021
				WO 2019-135559	A1	11 July 2019
KR	10-1912631	B1	30 October 2018	KR 10-2017-0065394	A	13 June 2017
				WO 2017-094969	A1	08 June 2017
KR	10-2021-0010366	A	27 January 2021	KR 10-2021-0064144	A	02 June 2021
				KR 10-2345011	B1	29 December 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/11(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C07K 14/195(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C07K 14/605(2006.01); C07K 7/06(2006.01); C12N 15/63(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 융합 태그(fusion tag), 막 단백질(membrane protein), 목적 단백질(target protein), G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR), 발현벡터(expression vector)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PANDEY, A. 등, Small expression tags enhance bacterial expression of the first three transmembrane segments of the apelin receptor, Biochemistry and Cell Biology, 2014년, 92권, 4호, 페이지 269-278 abstract; 페이지 272, 273, 276; Figure 1; Table 1, 2; 및 보충자료, Table S1	1-13
X	HABERSTOCK, S. 등, A systematic approach to increase the efficiency of membrane protein production in cell-free expression systems, Protein Expression and Purification, 2012년, 82권, 2호, 페이지 308-316 페이지 309-311, 313; Table 2; 및 Figure 2, 4	1-13
DA	KR 10-2106773 B1 (경상대학교산학협력단) 2020.05.06 단락 [0012]-[0099]	1-13
A	KR 10-1912631 B1 (국민대학교산학협력단 등) 2018.10.30 단락 [0029]-[0099]	1-13
A	KR 10-2021-0010366 A (주식회사 펩진) 2021.01.27 단락 [0016]-[0098]	1-13
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년06월15일(15.06.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년06월15일(15.06.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2106773 B1	2020/05/06	KR 10-2019-0083307 A	2019/07/11
		US 11542491 B2	2023/01/03
		US 2021-0163914 A1	2021/06/03
		WO 2019-135559 A1	2019/07/11
KR 10-1912631 B1	2018/10/30	KR 10-2017-0065394 A	2017/06/13
		WO 2017-094969 A1	2017/06/08
KR 10-2021-0010366 A	2021/01/27	KR 10-2021-0064144 A	2021/06/02
		KR 10-2345011 B1	2021/12/29