



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0119304
(43) 공개일자 2013년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0042360

(22) 출원일자 2012년04월23일

심사청구일자 2012년04월23일

(71) 출원인

동국대학교 산학협력단

서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

강택진

서울특별시 강북구 삼각산동 SK아파트 123-1304

수드히르 파미디마리

[121-809] 서울특별시 마포구 대흥동 241-7-105호

백승필

충청남도 연기군 조치원읍 서창리 영웅홈피스텔 205호

(74) 대리인

특허법인다나

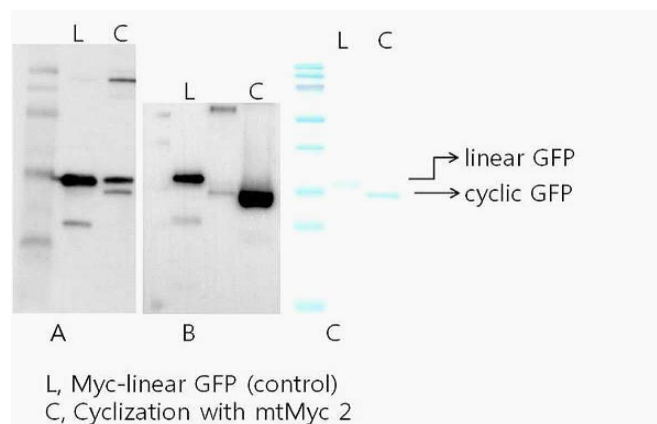
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 변형 에피토프 태그를 포함하는 환형 단백질의 검출 및 분리 방법

(57) 요약

본 발명의 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그는 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터를 제공하며, 상기 벡터의 목적단백질 부위의 카르복시 말단 위치에 인테인이 존재하여, 상기 벡터로 형질 전환된 형질전환체로 발현된 환형 단백질은 인테인이 제거되어 발현되어, 분할되었던 변형 에피토프 태그가 다시 연결면서 변형 에피토프 태그 서열을 포함하므로, 상기 변형 에피토프 태그를 인지하는 항체를 이용하여 환형 단백질을 특이적으로 검출 또는 분리할 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-0026498

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업 핵심연구

연구과제명 산업용 효소 안정화를 위한 단백질 환경화 설계 전략 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할(fragmentation)되어 목적단백질의 양 말단에 융합된 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변형 에피토프 태그가 분할되는 위치는 상기 치환된 시스테인이 N-말단인 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 시스테인을 경계로 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 벡터는 목적단백질 부위의 카르복시 말단 위치에 인테인이 존재하는 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 시스테인을 경계로 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 융합된 벡터의 말단에 시스테인이 위치하는 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 시스테인을 경계로 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 에피토프 태그는 Myc(c-myc) 태그, FLAG 태그, HA 태그 또는 T7 태그인 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 시스테인을 경계로 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 7

제6항에 따른 형질전환체로 발현된 환형 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 발현된 환형 단백질은 변형 에피토프 태그를 포함하는 환형 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 변형 에피토프 태그를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 환형 단백질의 검출 및 분리 방법.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그를 이용한 환형 단백

질의 검출 및 분리방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산업적으로 유용한 화학 물질 및 생물학적 물질들은 효소를 이용한 바이오컨버전(bioconversion)을 통해 생산되고 있다. 이 프로세스에서 중요한 역할을 하는 효소들의 열화학적 안정성의 증대는 전 프로세스의 경제성을 좌우할 정도로 중요하게 여겨지고 있는 실정이다. 따라서 효소 단백질의 활성을 향상시키거나 유지하면서 동시에 단백질의 구조적 안정성을 도모하는 것은 매우 중요한 의미를 가진다. 전통적으로 활성점과 상관없는 부위의 아미노산을 변화하여 안정성을 향상시키는 방법도 제안되었으나, 이를 위해서는 매우 복잡한 디자인 알고리즘을 사용하거나 혹은 복수의 아미노산 부위가 변형된 매우 큰 라이브러리에서 해당 단백질을 찾아내어야 한다는 어려움이 있다.

[0003] 반면에, 자연계에서 발견되는 일부 펩타이드들은 그 아미노말단과 카르복시 말단이 펩타이드 결합으로 연결된 이른바 환형단백질(cyclic protein)의 구조를 지니고 있으며, 이들 단백질들은 열, 단백질 분해 효소, 그리고 변성체에 대한 저항성이 선형단백질에 비해 현저하게 높은 것으로 알려져 있다. 또한, 자연계에서 발견되는 환형단백질 구조를 모방한 경우 해당하는 선형단백질에 비해 높은 안정성을 나타냄이 몇몇 단백질 모델에서 밝혀진 바가 있다. 이와 함께 변성된 단백질의 재접힘(refolding) 과정에도 단백질 환형화(protein cyclization)가 긍정적인 효과를 나타낼 수 있음이 보고된 바 있다. 현재 환형화의 전략으로 널리 사용되는 방법은 인테인(intein)을 이용하는 방법으로 소수의 모델 단백질에 대해 이 방법이 효율적이고 일관적인 단백질 안정화 방법으로 증명된 바 있으나, 그 예가 소수의 단백질에 국한되어 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 국내 등록특허공보 제10-0465643호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명은 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그 및 인테인을 이용한 단백질의 환형화와 환형 단백질의 검출 및 분리방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할(fragmentation)되어 목적단백질의 양 말단에 융합된 재조합 벡터를 제공한다.

[0007] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한 상기 변형 에피토프 태그를 포함하는 환형 단백질의 검출 및 분리 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그는 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터를 제공하며, 상기 벡터로 형질 전환된 대장균으로 발현된 환형 단백질은 인테인이 제거되고, 변형 에피토프 태그 서열로 연결되어 변형 에피토프 태그 서열을 포함하므로, 상기 변형 에피토프 태그를 인지하는 항체를 이용하여 환형 단백질을 특이적으로 검출 또는 분리할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 *Mt*IR1intein을 사용한 단백질의 환형화 개념도를 나타낸다.

도 2는 환형 단백질 태그의 도입 및 활용 모식도를 나타낸다.

도 3은 변형 태그 서열에 따른 환형화 및 검출 정도의 비교를 나타낸다.

도 4는 변형 태그를 이용한 단백질 분리를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할(fragmentation)되어 목적단백질의 양 말단에 융합된 재조합 벡터를 제공한다.
- [0012] 상기 에피토프 영역에서 치환되는 아미노산은 하나 이상일 수 있으나, 첫번째 치환되는 아미노산은 시스테인일 수 있다.
- [0013] 상기 변형 에피토프 태그에서 분할되는 위치는 상기 시스테인이 치환된 위치이며, 보다 구체적으로, 시스테인이 N-말단에 위치하도록 분할되는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 상기 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할되어 목적단백질의 양 말단에 융합될 때, 두 조각의 분할된 태그는 각각 목적 단백질 아미노 말단과 카르복시 말단에 융합될 수 있다. 상기 두 조각의 분할된 태그 중 시스테인을 포함하는 태그 조각은 목적단백질의 아미노 말단에 융합될 수 있고, 나머지 한 조각은 목적 단백질의 카르복시 말단에 융합될 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서 에피토프라는 용어는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정소를 의미할 수 있다. 에피토프는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 기로 이루어져 있고, 보통 특이적인 3차 구조 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징도 가진다.
- [0016] 구조 및 비구조성 에피토프는, 비구조성 에피토프가 아닌 구조성 에피토프에의 결합이 변성화 용매의 존재 하에서 상실되는 점에서 구별된다.
- [0017] 상기 벡터는 목적단백질 부위의 카르복시 말단 위치에 인테인이 존재하는 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 시스테인을 경계로 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터일 수 있다.
- [0018] 상기 융합된 벡터의 말단에 시스테인이 위치하는 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터일 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서 상기 인테인이라는 용어는 단백질 이어 맞추기에서 잘려져 나가는 영역을 의미한다. 일부 단백질에서는 번역 후 전구체 단백질이 자기촉매반응에 의해 그 일부가 잘려지고 나머지 부분이 재결합하여 성숙단백질이 되는 것으로 알려져 있다. 이 반응을 RNA의 경우(RNA이어맞추기)와 대비하여 단백질 이어 맞추기라고 하며, 이때 잘려지는 영역(RNA에서는 비활성부위에 해당)을 인테인, 성숙단백질로 남는 영역(RNA에서는 활성부위에 해당)을 엑스테인이라고 한다. 인테인 자체의 단백질 구조에 근거하고 자기촉매적으로 인테인 잘라내기와 엑스테인(구조 배열부분)의 재결합과정이 몇 개의 인테인을 함유한 유전자에서 증명되었다. 또한 핵산내부가수분해효소의 활성을 갖는 인테인도 있다.
- [0020] 상기 에피토프 태그는 이에 제한되지 않으나, Myc(c-myc) 태그, FLAG 태그, HA 태그 또는 T7 태그인 것을 특징으로 하는 시스테인을 포함하는 변형 에피토프 태그가 시스테인을 경계로 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터일 수 있다.
- [0021] 가장 흔히 사용되는 에피토프 태그로는 Myc(c-myc) 태그, HA 태그, FLAG 태그 등이 있다. Myc(c-myc) 태그는 사람 c-myc 단백질로부터 유래된 10개의 아미노산 길이의 에피토프이고(Evans et al., Mol. Cell. Biol., 12 : 3610-3616(1985)), HA 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌(influenza hemagglutinin) HA-1 단백질로부터 유래된 9개의 아미노산 길이의 에피토프이다(Field et al., Mol. Cell. Biol., 8 : 2159-2165(1988)). FLAG 태그는 박테리오파아지 T7로부터 유래된 8개의 아미노산 길이의 에피토프이다(Hopp et al., Bio/Technology, 6 : 1204-1210(1988)).
- [0022] 태그의 아미노산 서열을 암호화하기 위해 형질전환체에 최적화된 혹은 필요에 따라 프로그램화된 핵산 서열을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 구체예로서, myc 태그의 변형태그 1로 GAA CAG AAA CTG ATT TGT GAA GAA GAT CTG, 변형 태그 2로 GAA CAG AAA CTG ATT AGC GAA TGT GAT CTG 또는 변형 태그 3 GAA CAG AAA CTG ATT AGC GAA GAA TGT CTG과 같은 myc 태그 변형 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할되어 목적단백질 양 말단에 융합된 재조합 벡터일 수 있다. 상기 변형 에피토프 태그는 단백질 검출 또는 정제에 이용될 수 있다. 에피토프 태그는 적은 수(전

형적으로 5개에서 20개)의 아미노산으로서, 태깅된 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는다. 태깅된 단백질은 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis), 면역침강(immunoprecipitation), 면역형광 (immunofluorescence), 면역세포화학(immunocytochemistry), 면역친화성 정제(immunoaffinity purification) 방법에서 에피토프 태그에 대한 특이 항체에 의하여 검출되고 정제될 수 있다.

[0024] 본 발명은 상기 본 발명의 벡터로 형질 전환된 형질전환체를 제공한다. 일실시예에서 상기 형질전환체는 대장균 일 수 있다. 본 발명의 구체예로서, 본 발명에 따라 재조합된 벡터들을 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환시키고 이를 37 °C에서 IPTG를 이용하여 발현한 후 키틴 칼럼으로 분리하였다. 목적 단백질(GFP)의 아미노 말단과 융합 단백질의 아미노 최말단의 태그 사이에 히스티딘 태그가 있으므로 Ni-NTA를 이용한 분리를 사용할 수 있다. 또한 키틴 결합 부위 외에 히스티딘 태그, GST 태그 또는 MBP 태그 등의 통상 사용하는 태그를 목적 단백질-인테인의 카르복시 말단에 두어 1차 분리에 사용할 수 있다. 칼럼 상에서 환형화된 단백질은 키틴 결합 부위에서 절단되어 칼럼에서 용출된다.

[0025] 본 발명은 또한 형질전환체로 발현된 환형 단백질을 제공한다.

[0026] 상기 환형 단백질은 형질전환체로부터 발현되어 에피토프 영역에서 하나의 시스테인이 치환된 변형 에피토프의 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할 되어 목적단백질의 양 말단에 융합되므로, 상기 변형 에피토프의 완전한 서열이 아니었으나, 인테인이 잘려나가 단백질로 발현되므로, 변형 에피토프 태그가 포함된 환형 단백질일 수 있다.

[0027] 또는 인테인의 사용 없이 목적단백질을 포밀화 메티오닌이 목적 단백질의 첫 아미노산이 되도록 발현하도록 할 수도 있다. 이 포밀화 메티오닌은 세포 내에 존재하는 펩타이드 디포밀라아제(Peptidyl deformylase)와 메티오닐 아미노 펩티다아제(Methionyl aminopeptidase)의 작용으로 제거된다.

[0028] 본 발명은 또한 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인으로 치환된 변형 에피토프 태그가 상기 시스테인이 치환된 위치에서 분할(fragmentation)되어 목적 단백질의 양 말단에 융합된 재조합 벡터를 이용한 환형 단백질의 검출 및 분리 방법을 제공한다.

[0029] 상기 변형 에피토프 태그는 에피토프 영역에서 하나의 아미노산이 시스테인을 치환된 것을 특징으로 하는 변형 에피토프 태그를 포함하는 환형 단백질의 검출 및 분리 방법일 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] <실시예>

[0032] 실시예 1. 환형단백질 생산을 위한 벡터의 제작

[0033] New England Biolab사의 pTwin2 벡터에 녹색형광단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)을 클로닝하고 도 2와 같이 Myc 태그에서 유래한 변형 태그 서열을 GFP의 양측 말단에 시스테인을 경계로 분할하여 각각 유전적으로 융합하였다. pTwin2벡터에는 목적단백질 부위의 카르복시 말단 위치에 self-cleavage가 가능한 인테인 1(Ssp DnaB)이 존재하여 단백질 발현 뒤 아미노 말단의 첫 아미노산이 시스테인으로 변형되도록 하였다. 태그의 아미노산 서열을 암호화하기 위해 대장균에 최적화된 혹은 필요에 따라 프로그램화된 핵산 서열을 사용할 수 있다. 본 실시 예에서 사용한 변형 태그의 핵산 서열은 아래와 같다.

[0034] Myc 태그: GAA CAG AAA CTG ATT AGC GAA GAA GAT CTG

[0035] 변형 태그 1: GAA CAG AAA CTG ATT TGT GAA GAA GAT CTG

[0036] 변형 태그 2: GAA CAG AAA CTG ATT AGC GAA TGT GAT CTG

[0037] 변형 태그 3: GAA CAG AAA CTG ATT AGC GAA GAA TGT CTG

[0038] 실시예 2. 단백질 환형화 및 환형단백질 검출

[0039] 실시예 1의 벡터들을 대장균 BL21(DE3)(인트론 바이오 테크놀로지)에 형질 전환시키고 이를 37 °C에서 IPTG를 이용하여 발현한 후 키틴 칼럼으로 분리하였다. 목적 단백질의 카르복시 말단에 인테인 2와 키틴결합부위(chitin binding domain)가 위치하므로 융합단백질의 분리가 가능하였다. 도 3에 나타난 바와 같이 자연형의 myc 태그를 사용한 경우 환형화가 일어나지 않아 면역 검출되지 않은 반면, 실시예 2의 변형 myc 태그 서열 1, 2, 3의 경우 명확히 검출되었음을 볼 수 있었다. 이는 변형 태그들에 의해 환형화된 단백질이 검출되었음을 의미하며 이 중 태그 서열 2와 3이 효과적임을 알 수 있었다.

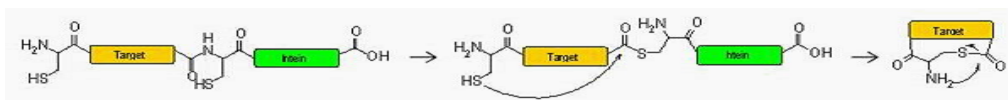
[0040] 실시예 3. 환형단백질의 분리

[0041] 환형화되어 키틴 칼럼에서 용출된 단백질을 anti-Myc 항체 칼럼을 이용하여 2차 분리하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 분리 전 선형단백질과 환형단백질이 혼합되어 있던 샘플(도 4A)에서 환형단백질만을 분리할 수 있었다(도 4C). 이는 오직 환형화된 경우에만 분할된 태그가 합쳐져 변형 에피토프 태그로 작용할 수 있게 되기 때문이다(도 4B).

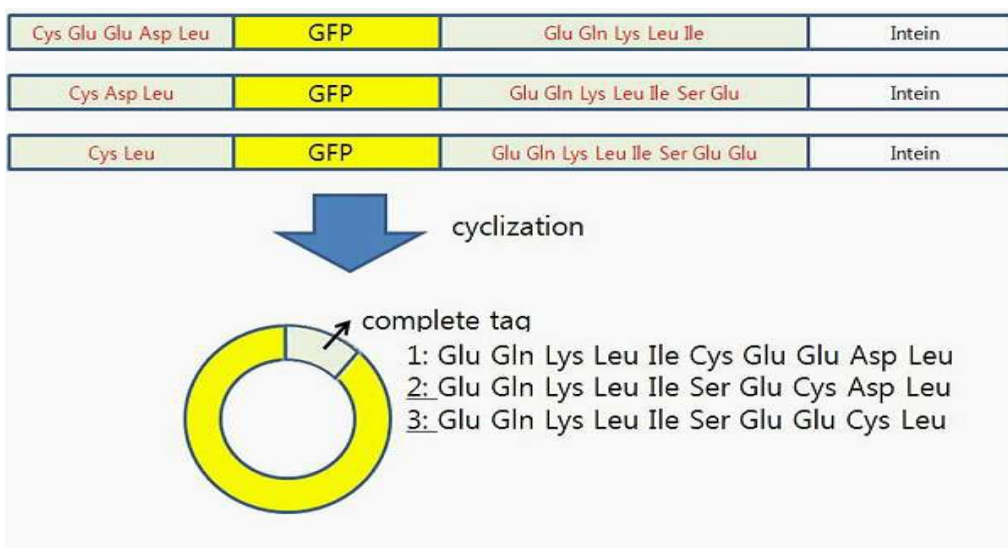
[0042] 도 4는 변형 태그를 이용한 환형 단백질의 분리를 나타낸 것으로, 도 4A는 anti-Myc 항체를 이용한 면역분리 전 샘플을 히스티딘 태그로 분석한 결과이고, 도 4B는 anti-Myc 항체를 이용한 면역분리 전 샘플을 anti-Myc 항체로 면역 검출한 결과이며, 도 4C는 anti-Myc 항체를 이용한 면역분리 후 샘플을 쿠마시 블루로 염색한 결과를 나타낸다.

도면

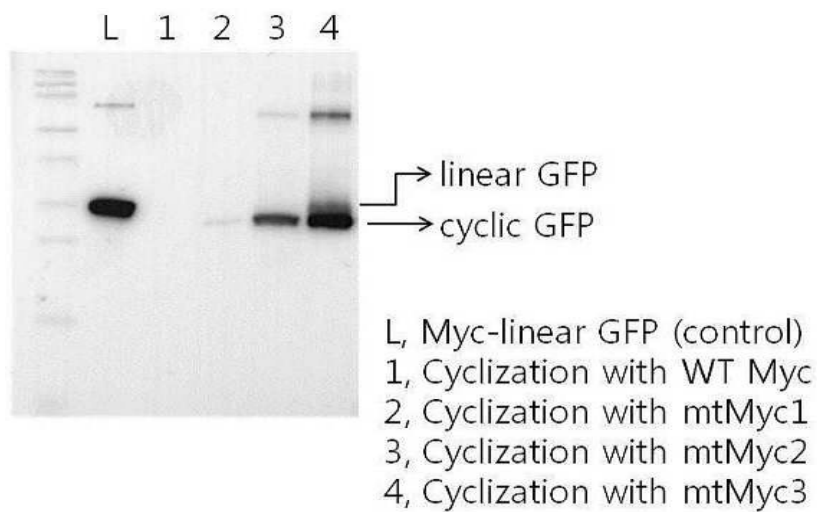
도면1



도면2



도면3



도면4

