(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0117139
(43) 공개일자 2013년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01) *C07K 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0039956
(22) 출원일자 2012년04월17일
심사청구일자 2012년04월17일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이현수
경기도 고양시 덕양구 행신동 773 번지 무원마을 아파트 102동 402호
박나영
서울특별시 마포구 신수동 서강대학교 R305A
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

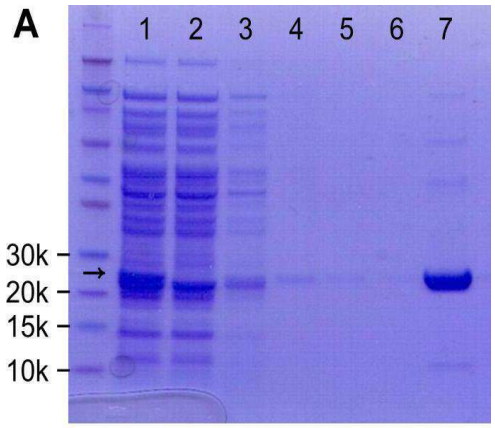
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **비천연 아미노산을 포함하는 단백질 돌연변이체 및 이를 이용한 단백질 정제 방법**

(57) 요 약

서열 내 일부 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환된 단백질 돌연변이체의 제조 방법, 서열 내 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환된 단백질 돌연변이체, 및 상기 단백질 돌연변이체를 이용하는 것을 포함하는 단백질 정제 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2a



(72) 발명자

유지혜

경기도 용인시 처인구 남동 명지대학교용인캠퍼스 기숙사 4동 203호

장소혜

경기도 수원시 영통구 매탄1동 매탄현대힐스테이트 124동 602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0014646
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	비자연 아미노산의 도입을 통한 metalloenzyme의 생합성과 응용
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011K000705
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신기술융합형 성장동력사업
연구과제명	방사성의약품 표지 원천 요소 기술 개발
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

단백질을 코딩하는 핵산 서열을 정지코돈으로 치환하는 단계; 및,

상기 정지코돈에 대응하는 tRNA와 아미노아실 tRNA 합성효소를 사용하여, 상기 단백질 서열 내의 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의하여 치환된 단백질을 세포 내부에서 번역시키는 단계

를 포함하는,

단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 금속 킬레이트 잔기는 2,2'-바이피리딘(bipyridine), 또는 8-하이드록시퀴놀린(hydroxyquinoline)을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 비천연 아미노산은 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA), 또는 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산 (2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소(glutathione-S-transferase,GST)를 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 치환되는 핵산 서열의 일부는, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 서열 중 47번째 아미노산인 페닐알라닌 코딩 영역 내지 114번째 아미노산인 리신 코딩 영역 중 어느 하나인 것을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 또는 뼈 형성 단백질(Bone morphogenetic protein)을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 핵산 서열의 치환은 자리지정 돌연변이에 의하여 수행되는 것을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 핵산 서열의 일부가 TGA, TAG, 및 TAA 로 이루어진 군에서 선택되는 것에 의하여 치환되는 것인, 단백질 돌연변이체의 제조 방법.

청구항 9

단백질에 포함된 하나 이상의 아미노산을 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의하여 치환시킨,

단백질 돌연변이체.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 금속 킬레이트 잔기는 2,2'-바이피리딘(bipyridine), 또는 8-하이드록시퀴놀린(hydroxyquinoline)을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

상기 비천연 아미노산은 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA), 또는 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산(2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체.

청구항 12

제 9 항에 있어서,

상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST)인 것을 포함하는 것인, 단백질 돌연변이체.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 글루타티온-S-전이효소에 포함된 47번째 아미노산인 페닐알라닌 내지 114번째 아미노산인 리신 중 어느 하나가 상기 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의해 치환된 것을 포함하는, 단백질 돌연변이체.

청구항 14

제 9 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 단백질 돌연변이체를 이용하는 것을 포함하는, 단백질 정제 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 단백질 돌연변이체와 금속 이온이 부착된 레진의 상호작용을 이용하는 것을 포함하는, 단백질 정제 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 금속 이온은 니켈 양이온을 포함하는 것인, 단백질 정제 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 금속 이온이 부착된 레진은 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) 레진을 포함하는 것인, 단백질 정제 방법.

청구항 18

제 14 항에 있어서,

상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소, 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 또는 뼈 형성 단백질(Bone morphogenetic protein)을 포함하는 것인, 단백질 정제 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본원은, 서열 내 일부 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환된 단백질 돌연변이체의 제조 방법, 서열 내 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환된 단백질 돌연변이체, 및 상기 단백질 돌연변이체를 이용하는 것을 포함하는 단백질 정제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 재조합 DNA 기술의 개발은 숙주 세포에서 대량 단백질 발현을 가능하게 하였으나, 세포용해물로부터 원하는 단백질만을 농축·정제하는 데에 있어서 순도 높은 정제를 가능하게 하는 방법이 요구되고 있다. 이에 따라 전통적인 단백질 침전법, 이온 교환 크로마토그래피, 및 친화성 크로마토그래피 등과 같은 단백질 정제의 많은 방법들이 개발되어 왔다. 예를 들어, "단백질 정제 방법 및 단백질 정제용 친화성 컬럼(대한민국 공개특허 제 2011-0021723호)" 등의 관련 연구가 있었다.

[0003] 그러나 정제하고자 하는 단백질에 융합된 친화성 태그는 일반적으로 단백질 형태 변화, 효소 활성화의 감소 등을 일으키므로, 친화성 태그를 이용하는 단백질 정제 방법의 경우 추가적으로 단백질 분해효소 등을 이용한 친화성 태그의 제거 단계가 요구된다는 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에, 본원은, 고순도로 쉽게 정제될 수 있고 추가적인 태그 제거단계가 불필요한, 서열 내 일부 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환된 단백질 돌연변이체의 제조 방법, 서열 내 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환된 단백질 돌연변이체, 및 상기 단백질 돌연변이체를 이용하는 것을 포함하는 단백질 정제 방법을 제공한다.

[0005] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본원의 제 1 측면은, 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 정지코돈에 의하여 치환하는 단계; 및, 상기 정지코돈에 대응하는 tRNA와 아미노아실 tRNA 합성효소를 사용하여 단백질 서열 내의 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의하여 치환된 단백질을 세포 내부에서 번역시키는 단계를 포함하는, 단백질 돌연변이체의 제조 방법을 제공한다.

[0007] 본원의 제 2 측면은, 단백질에 포함된 하나 이상의 아미노산을 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의하여 치환시킨, 단백질 돌연변이체를 제공한다.

[0008] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 2 측면에 따른 단백질 돌연변이체를 이용하는 것을 포함하는, 단백질 정제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본원에 의하여, 서열 내에 함유된 비천연 아미노산에 의하여 고순도로 정제될 수 있고 추가적인 태그 제거단계가 불필요한 단백질 돌연변이체를 제조할 수 있고 이를 이용하여 단백질을 고순도로 정제할 수 있다. 본원에 따라 제조된 상기 단백질 돌연변이체는 금속 레진에 대한 높은 친화성을 보이므로 세포추출물로부터 정제·농축될 수 있고, 이에 따라 원하는 목표 단백질에 비천연 아미노산을 도입함으로써 목표 단백질의 정제가 가능하다. 또한 상기 단백질에 도입된 비천연 아미노산은 상기 단백질의 구조 및 기능에 영향을 미치지 않으므로 정제·농축 후 추가적인 태그 제거 과정을 거칠 필요가 없어 간단한 1 단계 정제만으로 고순도의 단백질 정제를 가능하게 한다. 따라서 이러한 단백질 정제방법은 향후 다양한 목표 단백질의 대량 생산과 고순도의 정제과정에 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a는, 본원의 일 실시예에 있어서, 글루타티온-S-전이효소의 47번째 아미노산인 페닐알라닌이 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA)으로 치환된 돌연변이체인 GST-F47BPA의 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-nitrilotriacetic acid) 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다.

도 1b는, 본원의 일 실시예에 있어서, 상기 글루타티온-S-전이효소의 114번째 아미노산인 리신이 바이피리딜알라닌으로 치환된 돌연변이체인 GST-K114BPA의 니켈-니트릴로트리아세트산 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다.

도 2a는, 본원의 일 실시예에 있어서, 글루타티온-S-전이효소의 47번째 아미노산인 페닐알라닌이 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산(2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)으로 치환된 돌연변이체인 GST-F47HQA의 니켈-니트릴로트리아세트산 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다.

도 2b는, 본원의 일 실시예에 있어서, 상기 글루타티온-S-전이효소의 114번째 리신이 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산으로 치환된 돌연변이체인 GST-K114HQA의 니켈-니트릴로트리아세트산 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다.

도 3은, 본원의 일 실시예에 있어서, 야생형 글루타티온-S-전이효소를 니켈-니트릴로트리아세트산 레진에 통과

시켜 상기 레진과의 결합 여부를 SDS-PAGE 로 분석한 것이다.

도 4는, 본원의 일 실시예에 있어서, 글루타티온-S-전이효소의 47번째 아미노산인 페닐알라닌이 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산으로 치환된 돌연변이체인 GST-F47HQA의 금속 킬레이트 레진에 의한 정제효율을 SDS-PAGE로 분석한 것이다.

도 5는, 본원의 일 실시예에 있어서, 글루타티온-S-전이효소에 혼입된 아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산이 금속이온과 결합할 수 있는지 여부의 확인을 위한 형광 강도 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0012] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0013] 본원 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로서 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 또한, 본원 명세서 전체에서, "~ 하는 단계" 또는 "~ 의 단계" 는 "~ 를 위한 단계" 를 의미하지 않는다.

[0014] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.

[0015] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0016] 본원 명세서 전체에서, "비천연 아미노산" 은 20가지 통상의 아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인 중 하나가 아닌 아미노산을 지칭하며; 용어 "비천연 아미노산" 과 유사한 의미로 사용될 수 있는 다른 용어는 "비천연적으로 코딩된 아미노산", "자연적으로 존재하지 않는 아미노산" 등이 있다. "비천연 아미노산" 은 천연적으로 코딩된 아미노산의 변형에 의해 자연적으로 발생하나, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩티드 내로 도입되지는 않는 아미노산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 천연적으로 코딩된 아미노산이란, 20가지 통상의 아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본원 명세서 전체에서, "핵산" 은 단일-또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오시드, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오티드 및 그의 중합체를 지칭한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 참고 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 천연 발생의 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 또한 PNA(펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체(포스포로티오에이트, 포르포로아미데이트 등)를 비롯한 올리고뉴클레오티드도 지칭한다. 달리 명시하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 및 상보적 서열뿐만 아니라, 명확히 특정된 서열을 포함한다.

[0018] 본원 명세서 전체에서, "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질" 은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 즉, 단백질에 대한 기술 사항은 동등하게 펩티드의 기술 사항 및 폴리펩티드의 기술 사항에도 적용되며, 반대의 경우도 마찬가지이다. 본 용어는 자연적으로 존재하는 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에서 사용되는 바, 본 용어는 전체 길이의 단백질을 비롯한, 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결되어 있는 임의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.

[0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.

[0020] 본원의 제 1 측면은, 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 정지코돈으로 치환하는 단계; 및, 상기 정지코돈에 대응하는 tRNA와 아미노아실 tRNA 합성효소를 사용하여 서열 내의 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의하여 치환된 단백질을 세포 내부에서 번역시키는 단계를 포함하는, 단백질 돌연변이체의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 코딩하는 핵산서열은 모체 단백질의 아미노산 서열에 기초하여 합성되고, 이후 특정 아미노산 잔기를 도입, 치환, 또는 제거시키기 위하여 상기 핵산 서열을 변화시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 선택적으로 또는 비선택적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질의 유전자 중 특정 아미노산을 코딩하는 코돈을 TAG 코돈으로 치환하고; 상기 치환된 코돈을 가지는 단백질의 유전자를 포함하는 플라스미드, 적합한 tRNA 유전자를 포함하는 플라스미드, 및 적합한 아미노아실 tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 플라스미드를 세포, 바람직하게는 대장균, 내로 도입하여 형질전환 대장균을 제조하고; 상기 형질전환 대장균을 상기 비천연 아미노산이 포함된 배지에서 배양하는 방법을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 예를 들어, 상기 형질전환 대장균이 단백질 돌연변이체를 생산함에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 상기 아미노아실 tRNA 합성효소에 의하여 tRNA에 결합할 수 있고, 상기 비천연 아미노산과 결합된 상기 tRNA는 상기 치환된 핵산 서열을 인식하여 코딩되는 단백질에 상기 비천연 아미노산을 코딩하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비천연 아미노산은 단백질의 임의 말단 위치 또는 임의의 내부 위치를 비롯한, 단백질 상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 상기 비천연 아미노산이 도입된 단백질은 생합성적으로 생산될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 "생합성적으로" 라는 것은 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA, 및 리보솜 중 1개 이상을 사용하는 것을 포함하여, 세포성 번역 시스템을 사용한 방법을 의미하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 예를 들어, 상기 비천연 아미노산으로 치환될 수 있는 위치는, 하나 이상의 결합 파트너에 결합하는 부위인 잠재적인 수용체 결합 부위로부터 배제된 위치, 완전히 또는 부분적으로 용매에 노출될 수 있는 위치, 근접 잔기와의 수소결합 상호작용이 최소이거나 전무한 위치, 근접 반응성 잔기에 최소한으로 노출된 위치, 단백질의 3차원, 2차, 3차, 또는 4차 구조로부터 예상되는 바, 매우 유연성이 높거나 구조적으로 강성인 위치, 관련 수용체, 리간드 또는 결합 단백질과 결합하였거나 결합하지 않은 위치, 또다른 단백질 또는 다른 생물학적으로 활성인 분자에 결합하였거나 결합하지 않은 부위에 있는 위치, 또는 전체 구조의 유연성 또는 강성을 원하는 대로 변경시킴으로써 단백질 그 자체, 또는 하나 이상의 단백질을 포함하는 이량체 또는 다량체의 입체형태를 조절할 수 있는 위치를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

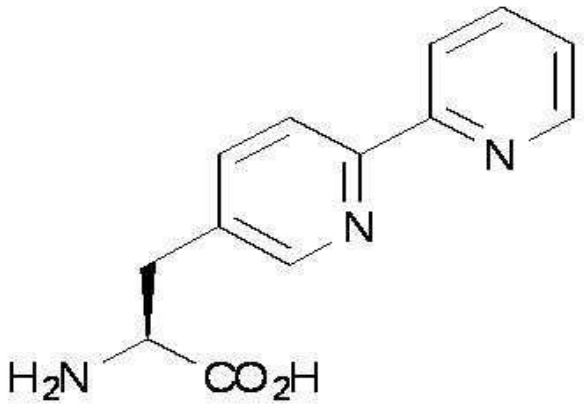
[0023] 본원의 비천연 아미노산은 전형적으로 오직 측쇄 구조면에서만 천연 아미노산과 상이하기 때문에, 상기 비천연 아미노산은 천연 또는 비천연적으로 코딩된 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다른 아미노산과 천연 발생의 단백질에서 형성되는 것과 동일한 방식으로 아미드 결합을 형성한다. 이러한 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산의 대장균 유전체 내로의 혼입은 대장균의 CAP(catabolite activator protein)를 특정한 DNA 절단 단백질로 전환하는 데에 사용되고 SAD(Single-wavelength anomalous dispersion) 분석에 의해 단백질의 X-ray 결정구조를 결정하는 데에 사용되기도 하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 예를 들어, 상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소, 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 뼈 형성 단백질(Bone morphogenetic protein), 레닌, 성장 호르몬 방출 인자, 부갑상선 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 지단백질, 알파-1-안티트립신, 인슐린 A-쇄, 인슐린 B-쇄, 프로인슐린, 여포 자극 호르몬, 칼시토닌, 황체형성호르몬, 글루카곤, 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자, 폰 빌레브란츠 인자, 단백질 C 심방 나트륨 이뇨인자, 폐 표면활성 물질, 유로키나제, 인간 뇨 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성 물질(t-PA), 봄베신, 트롬빈, 종양 괴사 인자-알파 및 종양 괴사 인자-베타, 엔케팔리나제, RANTES, 인간 마크로파지 염증 단백질(MIP-1-알파), 혈청 알부민, 뮬러리안-억제 물질, 릴랙신 A-쇄, 릴랙신 B-쇄, 프로릴랙신, 마우스 성선자극 호르몬 관련 펩티드, 베타-락타마제, DNase, IgE, 세포독성 T-림프구 관련 항원(CTLA), 인히빈, 액티빈,혈관 내피 성장 인자(VEGF), 호르몬 또는 성장 인자의 수용체, 단백질 A 또는 D, 류마토이드 인자, 골 유래 향신경 인자(BDNF), 뉴트로핀-3, -4, -5, 또는 -6, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 섬유아세포 성장 인자, 표피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장 인자(TGF), 인슐린 유사 성장 인자 I, 인슐린 유사 성장 인자 II, 뇌 IGF-I, 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(IGF-BP), CD단백질, 에리트로포이에틴(erythropoietin), 골유도 인자, 면역 독소, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 콜로니 자극 인자 (CSF), 인터루킨 1 내지 인터루킨 10, 수퍼옥시드 디스뮤타제, T-세포 수용체, 표면 막 단백질, 붕괴 촉진 인자, 바이러스 항원, 운반 단백질, 호밍 수용체, 어드레신, 조절 단백질, 인테그린, 종양 관련 항원, 및 이들의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 킬레이트 잔기는 2,2'-바이피리딘(bipyridine), 또는 8-하이드록시퀴놀린(hydroxyquinoline)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) 레진의 니켈 이온 복합체에 헥사히스티딘의 해리 상수는 14 nM로 알려져 있으며, 자유 니켈 이온과 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA)의 금속 이온 킬레이트화 그룹인 2,2'-바이피리딘의 해리 상수는 91 nM이고, 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산(2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)의 금속 이온 킬레이트화 그룹인 8-하이드록시퀴놀린의 해리 상수는 0.54 nM로 알려져 있다. 따라서, 2,2'-바이피리딘과 8-하이드록시퀴놀린과 같은 금속 킬레이트화 그룹을 포함한 비천연 아미노산은 금속이온과의 이러한 높은 결합 친화성에 의해 금속 이온이 포함된 레진에 농축되어 정제될 수 있으며, 그러한 결합 친화성이 비천연 아미노산 주위의 입체적 환경에 달려 있음에도 불구하고, 금속 이온과 금속 킬레이트화 그룹을 가진 비천연 아미노산 간의 결합 친화성은 단백질 정제에 충분히 활용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산의 X-선 결정 구조는 하이드록시퀴놀린 잔기는 아연이온과의 관계에서 안정한 복합체를 형성하며 금속 부착형 측쇄를 형성하지 않으므로 이러한 비천연 아미노산을 가지는 단백질 돌연변이체는 상업적으로 이용가능한 친화성 레진을 사용함으로써 순도 높게 정제될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 비천연 아미노산은 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA), 또는 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산 (2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 바이피리딜알라닌의 구조식은 하기 [화학식 1]로서 나타낼 수 있고, 상기 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산의 구조식은 하기 [화학식 2]로서 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

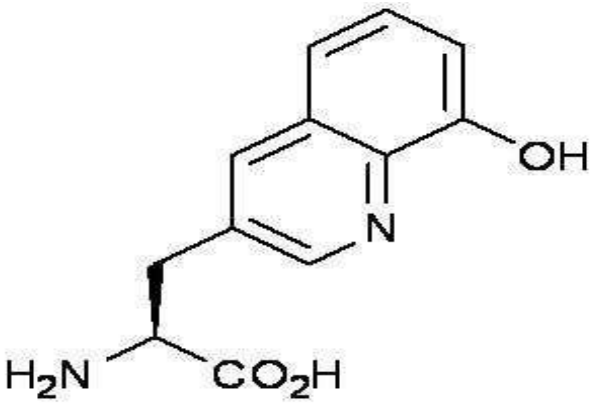
[0027] [화학식 1]



BPA

[0028]

[0029] [화학식 2]



HQA

[0030]

[0031] 예를 들어, 상기 바이피리딜알라닌은 상업적으로 이용할 수 있는 물질인 2-브로모-5-메틸피리딘(2-bromo-5-methylpyridine)으로부터 공지된 방법에 의하여 제조될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산(2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)은 상업적으로 이용할 수 있는 물질인 o-아니시딘(o-anisidine)으로부터 공지된 방법에 의하여 제조될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 글루타티온-S-전이효소는 다양하고 유용한 용도를 가진다. 예를 들어, 본원에서 상기 글루타티온-S-전이효소는 효소 자체의 글루타티온에 대한 결합특이성으로 인하여 단백질 정제에 이용될 수 있으나, 이러한 용도에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 치환되는 핵산 서열의 일부는, 상기 글루타티온-S-전이효소를 코딩하는 핵산 서열 중 47번째 아미노산인 페닐알라닌 코딩 영역 내지 114번째 아미노산인 리신 코딩 영역 중 어느 하나인 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 글루타티온-S-전이효소를 코딩하는 핵산 서열 중 47번째 아미노산인 페닐알라닌 코딩 영역 내지 114번째 아미노산인 리신 코딩 영역은 X-선 결정 구조를 참조할 때 용매에 노출되어 있고 상기 비천연 아미노산과 금속 이온이 결합할 때 상기 단백질의 입체구조에 의한 장애가 최소화될 것으로 예측되기 때문에 비천연 아미노산이 삽입되는 위치로 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질은 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 또는 뼈 형성 단백질(Bone morphogenetic protein)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자, 또는 뼈 형성 단백질은 유용 단백질로서 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 유전자 재조합 또는 형질 전환을 통하여 생산된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 서열의 치환은 자리지정 돌연변이에 의하여 수행되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 자리지정 돌연변이 유발 방법을 이용하여 의해 용이하게 변형될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 치환되는 서열은 3 염기 코돈, 예를 들어 TAG, TGA, TAA를 포함하고, 아미노산을 코딩하는 코돈이나 코딩하지 않는 넌센스 코돈을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 서열의 일부가 TGA, TAG, 및 TAA 로 이루어진 군에서 선택되는 것에 의하여 치환되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 핵산 서열은 일반적으로 단백질을 코딩하지 않으므로, 목표하는 비천연 아미노산 이외의 다른 천연 아미노산이 상기 핵산 서열에 의해 코딩되는 것을 차단하여 비천연 아미노산으로의 치환 성공 효율을 높일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본원의 제 2 측면은, 단백질에 포함된 하나 이상의 아미노산을 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의하여 치환시킨, 단백질 돌연변이체를 제공한다.

[0038] 상기 단백질을 구성하는 일부 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 상기 비천연 아미노산으로 치환되어 단백질 돌연변이체가 형성되는 경우, 상기 단백질 돌연변이체는 상기 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산의 금속 이온 친화성에 의해 효과적으로 농축될 수 있고 뛰어난 순도로 정제될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 단백질을 구성하는 일부 아미노산이 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산으로 치환되어 상기 단백질 돌연변이체가 되는 경우, 원래의 단백질의 구조적 및 기능적 섭동을 최소화하므로 상기 비천연 아미노산을 제거할 필요가 없으며 기술적으로 단순하고 임의의 단백질 부위에 적용될 수 있고 특별히 구조 또는 기능이 아미노-말단 또는 카복시-말단에 융합된 친화성 태그에 영향을 받는 단백질에 대하여 매우 유용하게 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 킬레이트 잔기는 2,2'-바이피리딘(bipyridine), 또는 8-하이드록시퀴놀린(hydroxyquinoline)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) 레진의 니켈 이온 복합체와 헥사히스티딘의 해리 상수는 14 nM로 알려져 있으며, 자유 니켈 이온과 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA)의 금속 이온 킬레이트화 그룹인 2,2'-바이피리딘의 해리 상수는 91 nM이고, 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산(2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)의 금속 이온 킬레이트화 그룹인 8-하이드록시퀴놀린의 해리 상수는 0.54 nM로 알려져 있다. 따라서, 2,2'-바이피리딘과 8-하이드록시퀴놀린과 같은 금속 킬레이트화 그룹을 포함한 비천연 아미노산은 금속이온과의 이러한 높은 결합 친화성에 의해 금속 이온이 포함된 레진에 농축되어 정제될 수 있으며, 그러한 결합 친화성이 비천연 아미노산 주위의 입체적 환경에 달려 있음에도 불구하고, 금속 이온과 금속 킬레이트화 그룹을 가진 비천연 아미노산 간의 결합 친화성은 단백질 정제에 충분히 활용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산의 X-ray 결정구조 분석에 따르면 하이드록시퀴놀린 잔기는 아연이온과의 관계에서 안정한 복합체를 형성하며 금속 부착형 측쇄를 형성하지 않으므로, 이러한 비천연 아미노산을 가지는 단백질 돌연변이체는 상업적으로 이용가능한 친화성 레진을 사용함으로써 순도 높게 정제될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 비천연 아미노산은 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA), 또는 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산(2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)을 포함하는 것이 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 바이피리딜알라닌은 상업적으로 이용할 수 있는 물질인 2-브로모-5-메틸피리딘(2-bromo-5-methylpyridine)으로부터 공지된 방법에 의하여 제조될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산은 상업적으로 이용할 수 있는 물질인 o-아니시딘(o-anisidine)으로부터 공지된 방법에 의하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST)인 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 글루타티온-S-전이효소는 다양하고 유용한 용도를 가진다. 예를 들어, 본원에서 상기 글루타티온-S-전이효소는 효소 자체의 글루타티온에 대한 결합특이성으로 인하여 단백질 정제에 이용될 수 있으나, 이러한 용도에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 글루타티온-S-전이효소에 포함된 47번째 아미노산인 페닐알라닌 내지 114번째 아미노산인 리신 중 어느 하나가 상기 금속 킬레이트 잔기를 함유하는 비천연 아미노산에 의해 치환된 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 글루타티온-S-전이효소를 코딩하는 핵산 서열 중 47번째 아미노산인 페닐알라닌 코딩 영역 내지 114번째 아미노산인 리신 코딩 영역은 X-ray 결정 구조를 참조할 때 용매에 노출되어 있고 상기 비천연 아미노산과 금속 이온이 결합할 때 단백질의 입체구조에 의한 장애가 최소화 될 것으로 예측되기 때문에 비천연 아미노산이 삽입되는 위치로 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 2 측면에 따른 단백질 돌연변이체를 이용하는 것을 포함하는 단백질 정제 방법을 제공한다. 예를 들어, 금속 이온 친화성 크로마토그래피 (metal-ion affinity chromatography)에 의하여 상기 비천연 아미노산이 포함된 단백질 돌연변이체를 정제할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 크로마토그래피 또는 다른 정제 방법에 의해 정제되는 상기 단백질 돌연변이체의 능력은 하나 이상의 비천연 아미노산의 첨가 또는 치환에 의해 조정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 단백질 돌연변이체의

특성은 공지된 매트릭스와 그와의 상호작용을 증가 또는 감소시킬 수 있는 상기 비천연 아미노산의 조성을 변경시킴으로써 변형될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소, 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 뼈 형성 단백질(Bone morphogenetic protein), 레닌, 성장 호르몬 방출 인자, 부갑상선 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 지단백질, 알파-1-안티트립신, 인슐린 A-쇄, 인슐린 B-쇄, 프로인슐린, 여포 자극 호르몬, 칼시토닌, 황체형성호르몬, 글루카곤, 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자, 폰 빌레브란츠 인자, 단백질 C 심방 나트륨 이뇨인자, 폐 표면활성 물질, 유로키나제, 인간 뇨 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성 물질(t-PA), 봄베신, 트롬빈, 종양 괴사 인자-알파 및 종양 괴사 인자-베타, 엔케팔리나제, RANTES, 인간 마크로파지 염증 단백질(MIP-1-알파), 혈청 알부민, 뮬러리안-억제 물질, 릴랙신 A-쇄, 릴랙신 B-쇄, 프로릴랙신, 마우스 성선자극 호르몬 관련 펩티드, 베타-락타마제, DNase, IgE, 세포독성 T-림프구 관련 항원(CTLA), 인히빈, 액티빈,혈관 내피 성장 인자(VEGF), 호르몬 또는 성장 인자의 수용체, 단백질 A 또는 D, 류마토이드 인자, 골 유래 향신경 인자(BDNF), 뉴트로핀-3, -4, -5, 또는 -6, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 섬유아세포 성장 인자, 표피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장 인자(TGF), 인슐린 유사 성장 인자 I, 인슐린 유사 성장 인자 II, 뇌 IGF-I, 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(IGF-BP), CD단백질, 에리트로포이에틴(erythropoietin), 골유도 인자, 면역 독소, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 콜로니 자극 인자 (CSF), 인터루킨 1 내지 인터루킨 10, 수퍼옥시드 디스뮤타제, T-세포 수용체, 표면막 단백질, 붕괴 촉진 인자, 바이러스 항원, 운반 단백질, 호밍 수용체, 어드레신, 조절 단백질, 인테그린, 종양 관련 항원, 및 이들의 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질 정제 방법은 상기 단백질 돌연변이체와 금속 이온이 부착된 레진의 상호작용을 이용하는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 단백질 돌연변이체는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는데, 친화성 크로마토그래피는 분자의 공지된 하위세트에 가역적으로 결합하는 정지상을 디자인할 수 있는 능력에 의존한다. 예를 들어, 상기 친화성 크로마토그래피는 조 샘플을 정지상에 고정된 리간드 지지체 물질과 인큐베이션시켜 샘플내 표적 분자가 고정된 리간드에 결합하도록 하는 단계, 고체 지지체로부터 미결합 샘플 성분을 세척하는 단계, 및 더 이상 결합 상호작용이 일어나지 않도록 완충액 조건을 변경시킴으로써 고정된 리간드로부터 표적 분자를 용리시키는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 정지상이 금속 킬레이트 수지를 포함하는 금속 이온 친화성 크로마토그래피에서, 금속 이온, 예를 들어 아연이온, 구리이온 및 니켈이온은 상기 정지상에 고정되어 있고, 상기 금속이온과 상기 단백질 돌연변이체에 포함된 비천연 아미노산의 금속 킬레이트 잔기와의 가역성 상호작용에 관여하는 킬레이트 결합에 의해 상기 단백질 돌연변이체는 크로마토그래피 정지상에 고정된다. 상기 비천연 아미노산의 금속 킬레이트 잔기와 금속이온과의 결합이 유지되는 조건 하에서 상기 단백질 돌연변이체는 정지상에 결합하고, 이후 상기 비천연 아미노산의 금속 킬레이트 잔기보다 경쟁적으로 금속이온과 결합하는 물질이 존재하는 조건 하에서 상기 단백질 돌연변이체는 용리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 정지상에 포함되는 금속 킬레이트 수지는, 예를 들어, 8-하이드록시퀴놀린, 살리실산, 디에틸렌트리아민, 디에틸렌트리아민테트라아세트산, 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylendiaminetetraacetic acid, EDTA), 이미노디아세트산, 또는 니트릴로트리아세트산이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 이온은 니켈 양이온을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 니켈 이온은 폴리히스티딘 또는 다른 아미노산의 금속 킬레이트 잔기와의 결합 특이성 때문에 크로마토그래피 및 친화성 정제 방법에서 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 이온이 부착된 레진은 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) 레진을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 니트릴로트리아세트산은 현재 사용되고 있는 금속 킬레이트 수지 중 가장 강한 리간드 친화력과 전이금속 결합력을 가지므로 금속 이온이 부착될 레진으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질은 글루타티온-S-전이효소, 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 또는 뼈 형성 단백질(Bone morphogenetic protein)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 인슐린, 성장 호르몬, 인터페론-감마, 조혈 성장 인자, 또는 뼈 형성 단백질은 유용 단백질로서 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 유전자 재조합 또는 형질 전환을 통하여 생산된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 이하, 본원에 대하여 실시예를 이용하여 보다 더 구체적으로 설명하지만, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] [실시예]

[0050] 본 실시예에서 이용된 모든 시약들은 일반적으로 시판되는 것을 사용한 것이며, 구체적인 기재가 없는 경우는 특별한 정제 없이 사용한 것이다.

[0051] 1. 글루타티온-S-전이효소 돌연변이체의 제조

[0052] 비천연 아미노산을 혼입하기 위하여 글루타티온-S-전이효소를 코딩하는 핵산서열 중 47번째 아미노산인 페닐알라닌 코딩 영역 또는 114번째 아미노산인 리신 코딩 영역을 자리지정 돌연변이에 의하여 TAG 서열로 치환하였다.

[0053] 구체적으로, 바이피리딜알라닌(2,2'-bipyridin-5-yl alanine, BPA)을 포함하는 글루타티온-S-전이효소의 돌연변이체는, TAG 서열을 인식하는 개량된 tRNA와 상기 tRNA에 상기 바이피리딜알라닌을 아실결합시키는 아미노아실 tRNA 합성효소를 가지는 E. coli 균주 DH10B를 상기 바이피리딜알라닌 1 mM이 존재하는 LB(lysogeny borth)배지에서 배양함으로써 제조되었다. 이 때 상기 바이피리딜알라닌은 자리지정 돌연변이에 의해 상기 TAG로 치환된 핵산 서열에 해당하는 아미노산 영역에 삽입되었다.

[0054] 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산 (2-amino-3-(8-hydroxyquinolin-3-yl)propanoic acid, HQA)을 포함하는 글루타티온-S-전이효소의 돌연변이체는 상기 바이피리딜알라닌 대신 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산을 이용한 점을 제외하고 위와 동일한 방법으로 제조되었다.

[0055] 이하에서는, 2-아미노-3-(8-하이드록시퀴놀린-3-일)프로판산을 HQA, 글루타티온-S-전이효소의 47번째 아미노산인 페닐알라닌이 바이피리딜알라닌으로 치환된 돌연변이체를 GST-F47BPA, 글루타티온-S-전이효소의 114번째 아미노산인 리신이 바이피리딜알라닌으로 치환된 돌연변이체를 GST-K114BPA, 글루타티온-S-전이효소의 47번째 아미노산인 페닐알라닌이 HQA로 치환된 돌연변이체를 GST-F47HQA, 그리고 글루타티온-S-전이효소의 114번째 아미노산인 리신이 HQA로 치환된 돌연변이체를 GST-K114HQA라 한다.

[0056] 2. 글루타티온-S-돌연변이체의 정제

[0057] 글루타티온-S-돌연변이체의 정제는 금속 이온 친화성 크로마토그래피에 의해 수행되었으며, 이 때 퀴아젠(Qiasen) 제조사에서 제공된 프로토콜에 따른 상업용 니켈-니트릴로트리아세트산(Nickel-nitrilitriacetic acid; 이하 '니켈-NTA' 라고 함) 레진을 사용하였다. 세포용해물은 300 mM 염화나트륨(NaCl)과 10 mM 이미다졸(imidazol)을 포함한 pH 8.0의 50 mM 인산염 완충액에서 초음파를 이용하여 제조하였다. 상기 세포 용해물은 용해물 내에 포함된 글루타티온-S-돌연변이체와 레진의 니켈 이온과의 결합을 위하여 니켈-NTA 레진에 적용시켰고 이후 상기 레진을 20 mM 이미다졸을 포함한 동일 완충액으로 씻어 잔여 세포 용해물을 제거하였다. 상기 레진에 결합되어 농축된 글루타티온-S-돌연변이체는 250 mM 이미다졸을 함유한 동일 완충액을 적용하여 용리시켰다.

[0058] 3. 정제된 글루타티온-S-돌연변이체의 SDS-PAGE 분석

[0059] 니켈-NTA 레진을 이용한 상기 글루타티온-S-돌연변이체의 정제과정 이후 유체 통과 분획물(the flow-through fraction)에 포함된 단백질을 SDS-PAGE 분석하였다.

[0060] 이와 관련하여, 도 1a는 GST-F47BPA의 니켈-NTA 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이고, 도 1b는 GST-K114BPA의 니켈-NTA 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다. 샘플들은 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색약으로 염색되었다. 도 1a와 도 1b에서, 1번째 열은 세포 용해물, 2번째 열은 분획 통과물, 3 내지 6번째 열은 단백질 결합된 레진을 씻은 용액, 7번째 열은 단백질이 용리된 용액이다. 상기 분석에서 상기 글루타티온-S-전이효소에 포함된 비천연 아미노산으로 인하여 돌연변이체 GST-F47BPA와 GST-K114BPA는 니켈-NTA 레진과 결합·농축되어 용리되었다.

[0061] 한편, 도 2a는 GST-F47HQA의 니켈-NTA 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이고, 도 2b는 GST-K114HQA의 니켈-NTA 레진에서의 정제 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다. 샘플들은 쿠마시 블루 염색약으로 염색되었다. 각 열에 적용된 샘플은 도 1a 및 도 1b에서와 동일하였다. 상기 분석에서 글루타티온-S-전이효소에 포함된 비천연 아미노산으로 인하여 돌연변이체 GST-F47HQA와 GST-K114HQA는 니켈-NTA 레진과 결합·농축되어 용리되었으며, 도 1a 및 도 1b의 결과와 비교하였을 때 정제 과정에서 유출되는 돌연변이체의 양이 매우 적고 용리된 단백질의 양이 많으므로 정제 효율은 도 1a 및 도 1b에서 보여진 GST-F47BPA 및 GST-K114BPA의 정제효율보다 우수한 것으로 해석될 수 있다.

[0062] 한편, 도 3은 야생형 글루타티온-S-전이효소를 니켈-NTA레진에 통과시켜 레진과의 결합 여부를 SDS-PAGE 분석을 통하여 관찰한 것이다. 샘플들은 쿠마시 블루 염색약으로 염색되었다. 각 열에 적용된 샘플은 도 1a 및 도 1b에서와 동일하였다. 상기 야생형 글루타티온-S-전이효소는 니켈-NTA 레진과 결합하지 않고 통과한 것을 참조할 때, 도 1a, 도 1b, 도 2a, 및 도 2b의 결과는 글루타티온-S-전이효소에 포함된 상기 비천연 아미노산에 의해 나타났음을 확인할 수 있었다.

[0063] 한편, 도 4는 GST-F47HQA의 금속 킬레이트 레진에 의한 정제효율을 기존의 글루타티온 친화성 크로마토그래피에 의한 정제효율과 비교한 SDS-PAGE 분석결과이다. GST-F47HQA는 글루타티온-S-전이효소 단백질을 포함하므로, 금속 킬레이트 레진이 없어도 매트릭스에 고정된 글루타티온과의 친화성에 의하여 정제될 수 있다. 상기 분석에서, 두 개의 다른 방법에 의해 정제된 GST-F47HQA는 SDS-PAGE에 의해 분석되었고 샘플들은 쿠마시 블루 염색약으로 염색되었다. 1번 열은 금속 킬레이트 레진에 의한 정제 결과이고, 2번 열은 기존의 글루타티온 친화성 크로마토그래피에 의한 정제 결과이다. 그 결과 두 방법에 의한 정제 후 돌연변이체의 수율은 3 mg/L 내지 5 mg/L로 비슷하였으므로, 상기 금속 킬레이트 잔기를 함유한 비천연 아미노산이 혼입된 글루타티온-S-전이효소의 금속 킬레이트 레진에 의한 정제법은 기존의 글루타티온 친화성 크로마토그래피 정제법만큼 효율적인 정제법인 것으로 해석될 수 있다.

[0064] 한편, 도 5는 글루타티온-S-전이효소에 혼입된 HQA가 금속이온과 결합할 수 있는지를 시험하기 위해 10 μM의 GST-F47HQA를 다양한 농도의 $ZnSO_4$와 반응시켜 적정하였고, HQA-아연 이온 복합체로부터 형광도를 측정하였다.

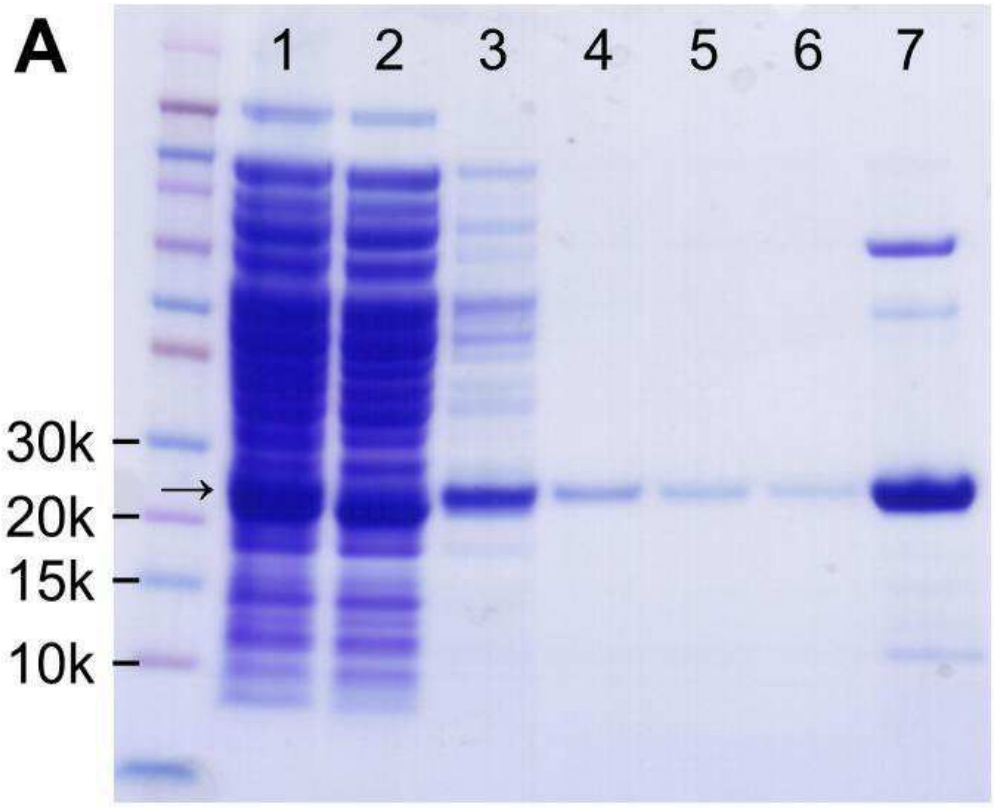
그 결과, 상기 GST-F47HQA 돌연변이체는 400 nm 파장의 빛에서 아연 이온이 첨가되지 않았을 때는 형광이 발현되지 않았으나 아연 농도가 증가함에 따라 형광도가 증가하였다. 이에 따라, 상기 단백질 돌연변이체에 혼입된 비천연 아미노산이 금속과 결합함으로써 금속 킬레이트 레진에 의한 정제를 가능하게 하는 것임을 확인할 수 있었다.

[0065] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

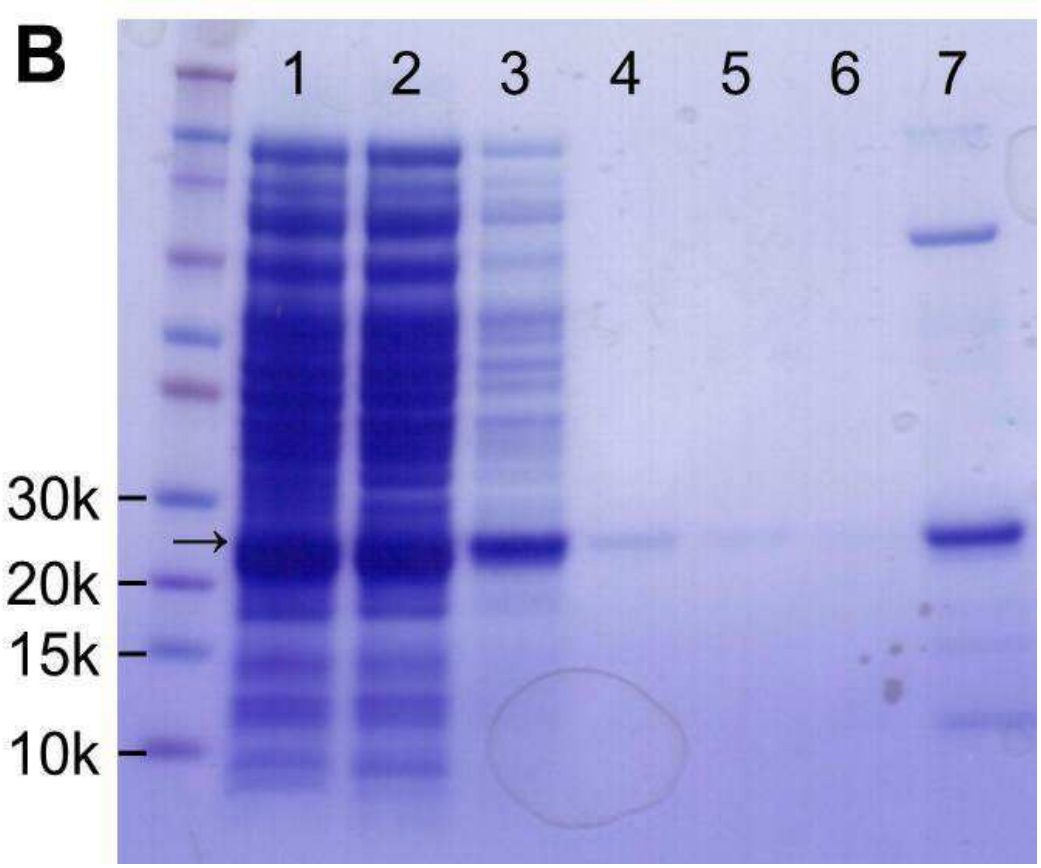
[0066] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

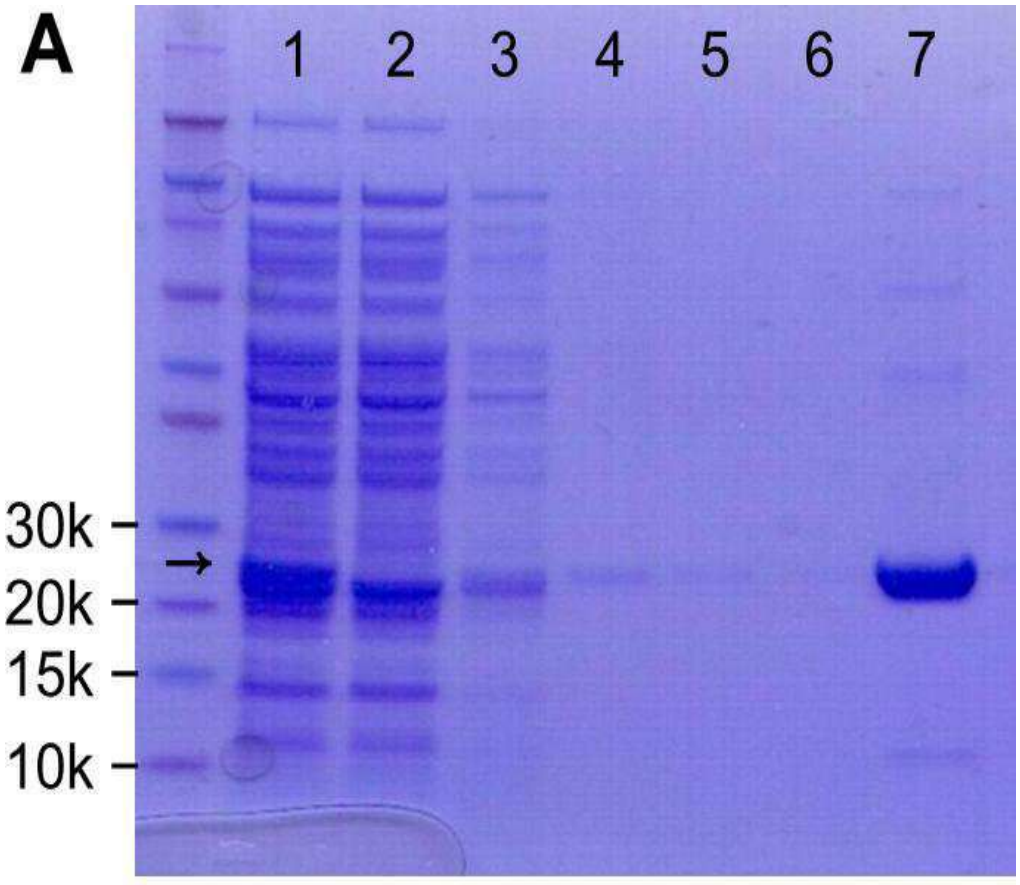
도면1a



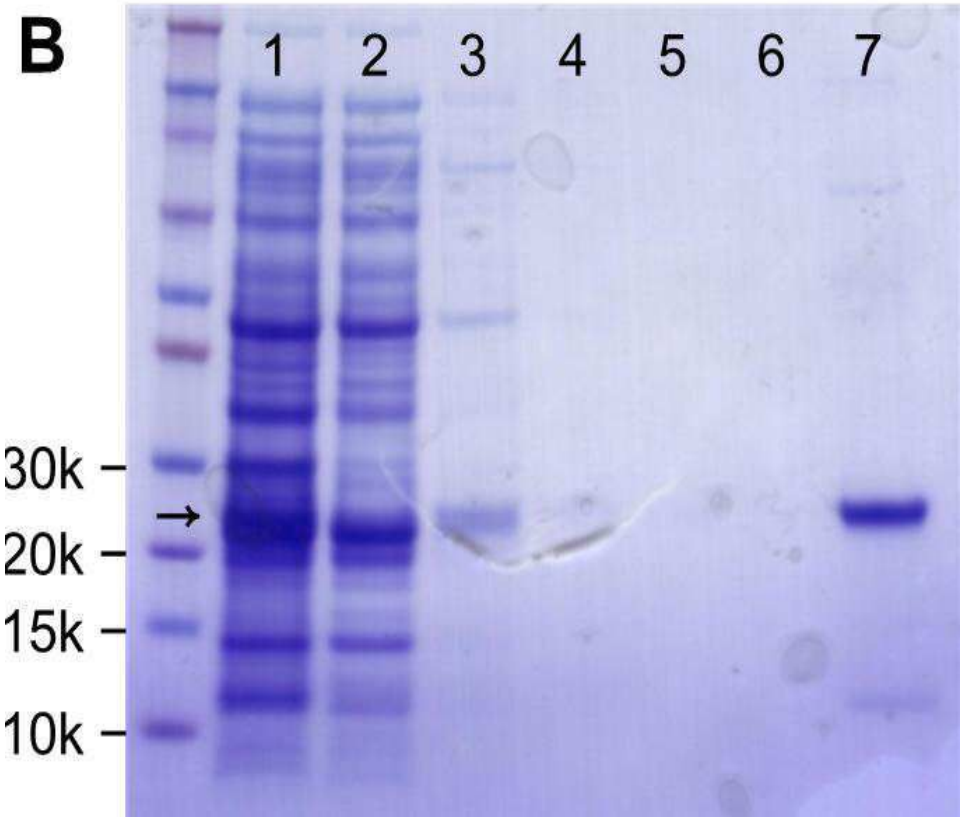
도면1b



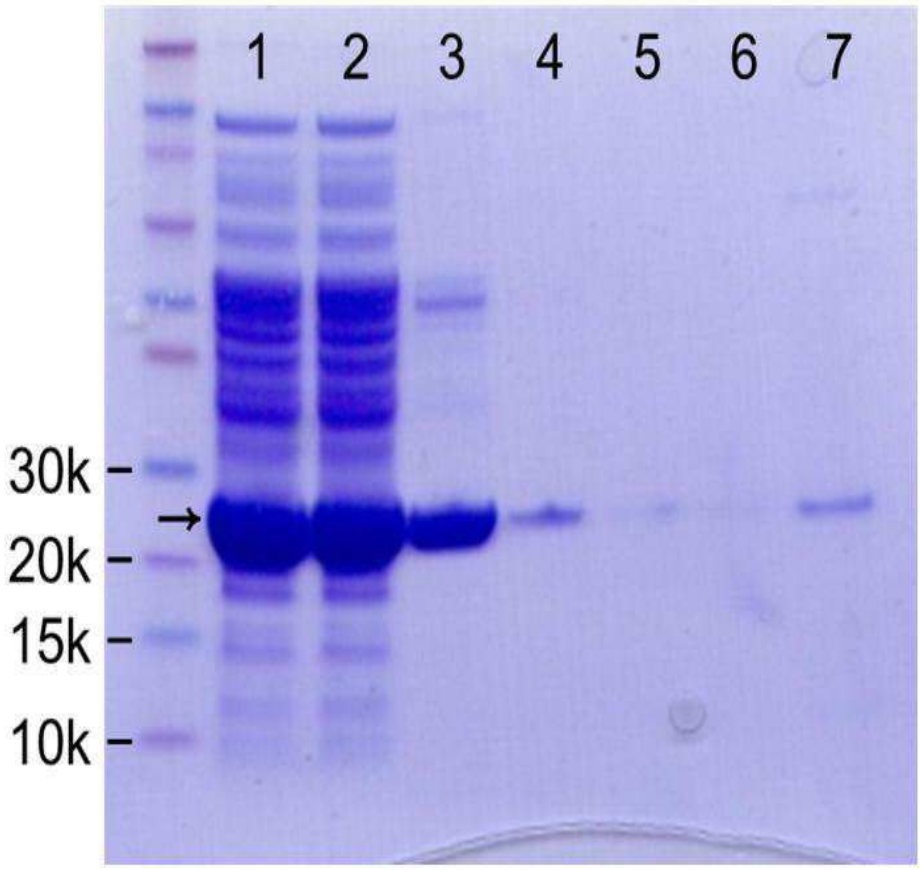
도면2a



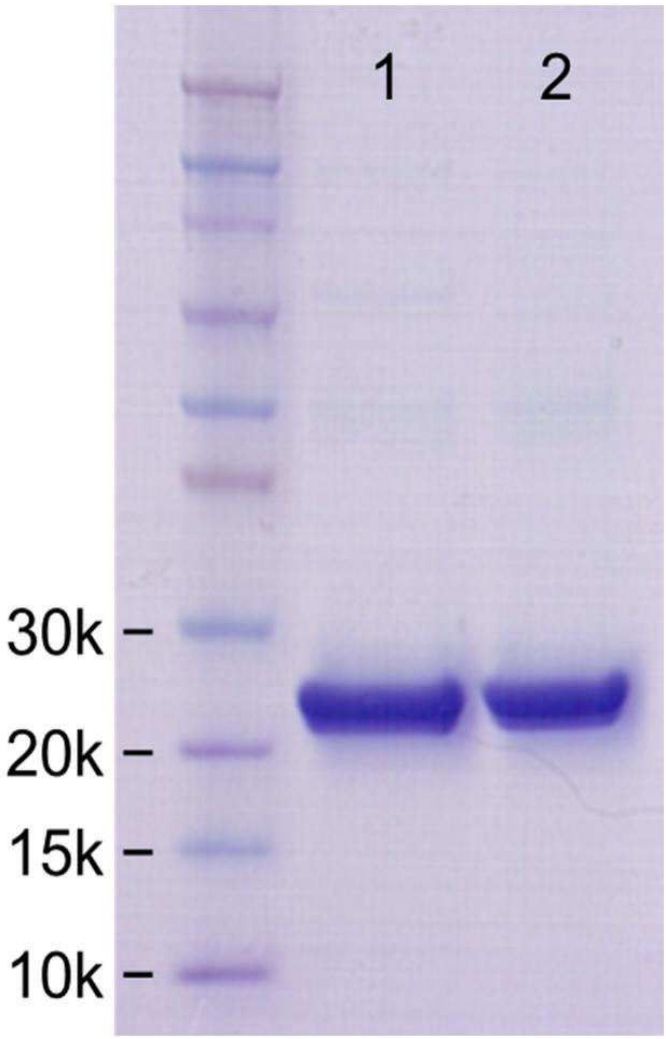
도면2b



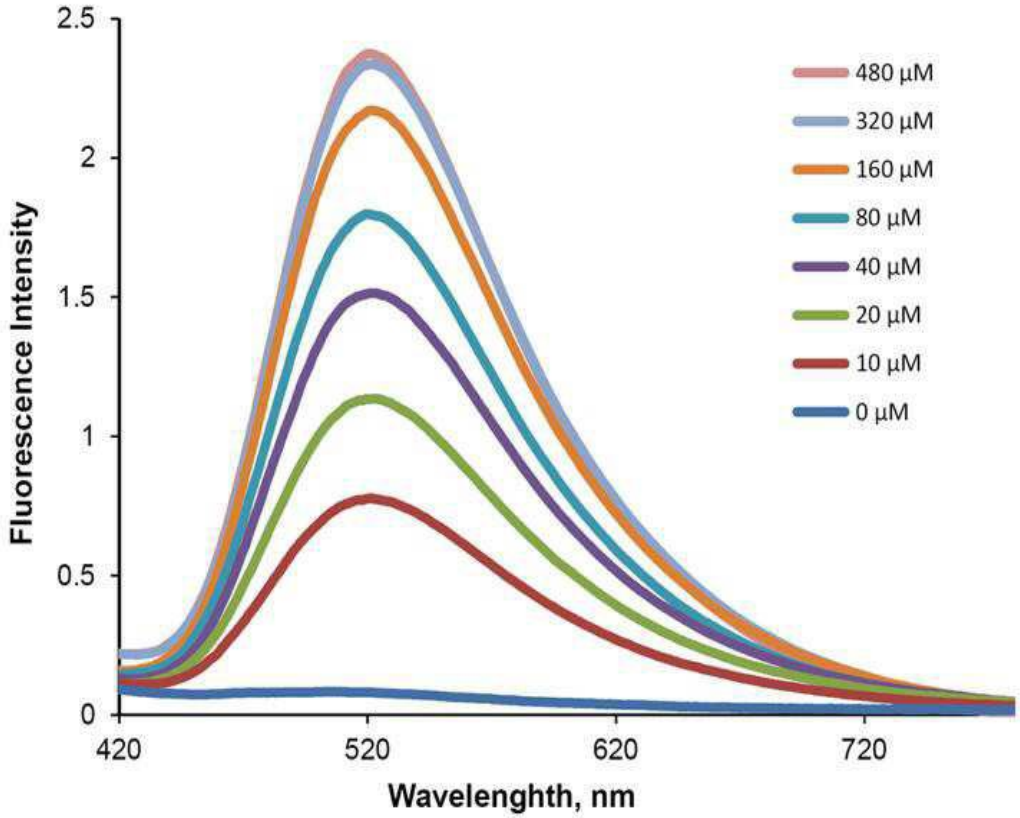
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<130> P20120035KR

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Gly Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln
1 5 10 15

Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His
20 25 30

Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu
35 40 45

Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val
50 55 60

Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His
65 70 75 80

Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu
85 90 95

Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr
100 105 110

Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro
115 120 125

Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu
130 135 140

Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu
145 150 155 160

Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys
165 170 175

Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys
180 185 190

Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln
195 200 205

Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Arg Ser
210 215 220