(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0025478
(43) 공개일자 2009년03월11일

(51) Int. Cl.
C12N 15/64 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0090365
(22) 출원일자 2007년09월06일
심사청구일자 2007년09월06일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
이지원
서울 광진구 광장동 현대 3차 아파트 310동 204호
박진승
서울 성북구 안암동5가 1번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

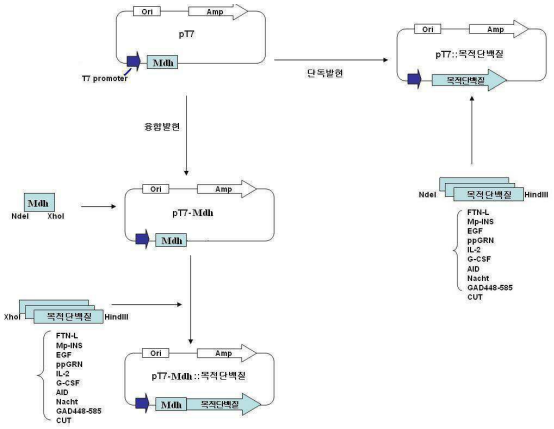
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 말산탈수소효소를 융합파트너로 이용한 재조합 단백질의제조방법

(57) 요 약

본 발명은 말산탈수소효소를 융합파트너로 이용하는 재조합 단백질의 발현벡터 및 이를 이용한 재조합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 융합파트너(fusion partner) 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현벡터를 제조하고, 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하고, 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 공정을 포함하는 재조합 단백질의 생산방법에 있어서, 말산탈수소효소의 유전자를 융합파트너로 사용하여 발현시킴으로써 재조합 단백질의 수용성 및 접힘(folding)을 향상시키는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법 및 말산탈수소효소의 유전자를 융합파트너로 포함된 발현벡터에 관한 것이다. 본 발명의 말산탈수소효소의 유전자를 융합파트너로 사용하여 재조합 단백질을 생산하는 방법은 기존의 융합파트너가 가지고 있는 수용성과 접힘에 관한 한계를 극복할 수 있고, 단백질 의약품 및 산업용 생산에 폭 넓게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자
한경연
서울 성북구 안암동5가 1번지
송종암
서울 성북구 안암동5가 1번지
서혁성
서울 성북구 안암동5가 1번지
안금영
서울 성북구 안암동5가 1번지
이종환
서울 성북구 안암동5가 1번지
이은정
서울 성북구 안암동5가 1번지
권수정
서울 성북구 안암동5가 1번지

특허청구의 범위

청구항 1

1) 융합파트너(fusion partner)로서 말산탈수소효소(이하, Mdh)의 유전자 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및,

3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 말산탈수소효소의 유전자는 서열번호 45로 기재되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 외래단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 4

융합파트너로서 말산탈수소효소의 유전자와 외래단백질의 유전자를 포함하는 재조합 단백질 생산용 발현벡터.

청구항 5

제 4항에 있어서, 도 2의 개열지도로 표시되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 6

제 4항에 있어서, 융합파트너로서 Mdh 유전자와 외래단백질의 유전자가 연결되어 포함되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 7

제 4항에 있어서, Mdh 유전자와 외래단백질 유전자 사이에 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 8

제 4항의 발현벡터가 형질 도입된 형질전환체.

청구항 9

1 항의 방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 말산탈수소효소를 융합파트너로 이용하는 재조합 단백질의 발현벡터 및 이를 이용한 재조합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 융합파트너(fusion partner) 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현벡터를 제조하고, 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하고, 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 공정을 포함하는 재조합 단백질의 생산방법에 있어서, 말산탈수소효소의 유전자를 융합파트너로 사용하여 발현시킴으로써 재조합 단백질의 수용성 및 접힘(folding)을 향상시키는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법 및 말산탈수소효소의 유전자를 융합파트너로 포함된 발

현벡터에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 현재 생명공학 기술에 의해 생산되는 단백질에는 일반적으로 면역 조절 및 효소 저해제 및 호르몬 같은 의약 및 연구용 단백질과 진단용 단백질이나 반응 첨가 효소와 같은 산업용 단백질로 대별될 수 있으며 이 두 가지 단백질들을 중심으로 생산 공정 기술 개발 및 산업화가 추진되고 있다. 특히 재조합 미생물 기술을 이용하여 유용한 재조합 단백질을 생산할 때, 유전정보가 잘 알려져 있으며 다양한 벡터 시스템을 구축하고 있고, 비교적 값싼 배지에서 빠르게 고농도로 배양할 수 있는 장점을 가진 대장균이 연구 또는 상업적 목적으로 많이 사용되고 있다.

<3> 대장균에서 재조합 단백질을 생산함에 있어 강력한 유도성(inducible) 프로모터를 갖춘 다양한 발현벡터가 개발되어 외래단백질의 생산에 이용되어 왔다. 그러나 숙주세포로 대장균을 이용하는 경우 제조하고자 하는 단백질이 대장균 내의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 수율이 낮아지는 경우가 많으며, 특히 분자량이 10kDa 이하의 작은 크기의 폴리펩타이드의 발현에서 이러한 경향이 심한 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 재조합 단백질이 대장균에서 과다 발현시 응집체(inclusion body)로 알려진 불용성 응집체를 형성하는 경우가 많다고 알려져 있으며 응집체로 발현된 폴리펩타이드의 경우 접힘(folding) 중간체가 분자 상호간의 다이설파이드 결합(intermolecular disulfide bond) 또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 숙주세포의 다른 단백질 불순물들[샤페론(chaperon), 라이보좀(ribosome), 초기인자 등]과 비선택적으로 결합함으로써 목적 폴리펩타이드의 응집체 내 순도가 떨어지는 단점이 있다. 또한 이렇게 발현된 단백질을 활성형으로 만들기 위해서는 구아니딘-하이드로클로라이드(Guanidine hychloride)나 우레아(urea)같은 변성제를 사용하여 용해시킨 후 희석하는 재접힘(refolding) 과정을 거쳐야 하는데 이때 단백질이 활성형으로 접히지 않는 등 생산 수율이 감소하는 문제점이 있다.(Marston FA, *Biochem J* 240(1):1-12, 1986).

<4> 대장균에서 활성형의 재조합 단백질을 고 수율로 얻기 위해 대장균의 단백질 발현속도를 낮추어 목적단백질의 수용도를 높여 저온 발현 실행(Hammarstrom *et al.*, *Protein Sci.* 11:313-321, 2002), 다양한 프로모터를 사용하거나 유도(induction) 조건의 최적화(Qing *et al.*, *Nat Biotechnol.* 22:877-882, 2004) 및 분자 샤페론 또는 단백질 접힘 조절자와 목적단백질의 동시발현(de Marco & De Marco, J *Biotechnol.* 109:45-52, 2004) 등이 많이 시도되고 있지만, 정제와 목적단백질의 접힘을 돕는 융합파트너와 목적단백질을 융합하여 발현하는 것이 가장 일반적인 방법이다.

<5> 실제로 대장균 내에서 외래단백질의 수용성 높은 발현을 유도하는 여러 융합파트너가 지난 수년 동안 연구되고 보고되어왔다(Esposito & Chatterjee, *Curr Opin Biotechnol.* 17:353-358 2006; Kapust & Waugh, *Protein Sci.* 8:1668-1674, 1999; Sachdev & Chirgwin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:933-937, 1998). 수많은 융합파트너가 개발되고 이용되어왔지만 가장 많이 연구된 대표적인 융합파트너로는 말토오즈 결합 단백질(Maltose binding protein; MBP), 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase; GST), 티오레독신(Thioredoxin; Trx), NusA 등이 있다. 말토오스 결합 단백질의 경우 이량체 형성에 관여하는 부분에 소수성을 띠는 아미노산이 모여 만들어진 넓은 소수성 틈새가 새로 합성되는 단백질의 소수성 부위를 효과적으로 감춰주어 목적단백질이 불용성 응집체가 되는 것을 방지해 주며, 티오레독신은 목적단백질의 다이설파이드 결합을 도와주고, NusA의 경우 대장균에서 과량으로 발현되었을 때 활성형으로 접히는 능력이 매우 뛰어나므로 뒤따라 발현되는 목적단백질의 올바른 접힘을 유도한다(Bach H *et al.*, *J Mol Biol* 312:79-93, 2001; Edward RL *et al.*, *Nat Biotechnol* 11:187-193, 1993; Davis GD *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 65:382-388, 1999)

<6> 이러한 융합파트너는 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 방법을 이용하여 융합발현된 목적단백질을 쉽게 정제할 수 있다는 장점이 있으며 각기 다른 분자생물학적 특성을 이용하여 목적단백질의 접힘을 돕는다고 알려져 있다. 하지만 이러한 융합파트너들은 목적단백질에 비해 상대적으로 크기가 커서 융합 부분의 크기에 따라 목적단백질의 수율이 현저히 떨어진다는 단점과 의료목적 또는 산업적으로 유용한 단백질들에 모두 범용적으로 작용하지 않는다는 단점이 있다. 또한, 목적단백질을 수용성으로의 발현을 유도하더라도 고유한 기능을 수행하는 활성형으로의 발현을 유도하는 데는 실패하는 경우가 많고, 적합한 용도로 이용되기 위하여 융합파트너의 제거 과정이 추가되어야 하는 공정상의 불합리성을 지닌다는 문제점이 있다.

<7> 지금까지 생명공학 기술에 의해 산업적으로 생산된 국내의 재조합 단백질은 발현 가능한 재조합 단백질들의 생산 공정개발에 치중되어 있어서 핵심 원천 기술인 발현시스템 개발은 외국에 비해 상대적으로 모방 또는 개량 수준의 부가기술로서 개발되고 있는 상태이며 상업적으로나 의약적으로 매우 중요한 단백질은 분비 단백질(secretory protein) 및 막 단백질(membrane protein)들로서 대장균 내에서 발현시 불용성 응집체를 만드는 난

발현성 단백질(difficult-to-express proteins)이여서 개발이 지연되고 있다. 이를 극복하기 위해서는 대장균 내에서 난발현 단백질의 발현시스템에 관한 원천 기반기술을 확보하는 것이 중요하다.

<8> 또한 상기한 바와 같이 각각의 융합파트너는 각기 다른 분자생물학적 특성을 가지므로 융합된 재조합 단백질이 접힘을 돕는 기작도 다르기 때문에 모든 단백질에서 동일한 효과를 나타내는 것은 아니다. 좀 더 범용적으로 재조합 단백질의 접힘을 효과적으로 돕는 융합파트너를 이용한 발현 시스템을 구축하기 위해서는 기존에 융합파트너가 가지는 특징을 벗어나 다른 관점에서 융합파트너를 발굴하여 새로운 개념의 융합파트너 라이브러리를 구축해야 한다.

<9> 대장균에서의 재조합 단백질 과다 발현은 외부 환경으로부터 받는 스트레스(열 충격, 아미노산 고갈 등)와 비슷한 영향을 주는 것이 이전의 보고에서 알려진바 있다(Hoffman F & Rinas U, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 89:73-92, 2004). 이에 본 발명자들은 상기 보고를 감안하여 새로운 개념의 융합파트너를 개발하고자 하였다. 대장균에 단백질의 올바른 접힘을 저해하는 스트레스를 주고, 과발현되는 단백질을 융합파트너로 이용하여 다양한 목적단백질을 유전자 재조합 기술을 이용해 생산한 결과, 다양한 목적단백질에 대해서 수용성 발현량이 많이 증가하고 효소 활성에 변화가 없는 재조합 단백질의 생산이 가능함으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> 본 발명의 목적은 형질전환 미생물로부터 목적단백질을 불용성 응집체의 형태로 생산하는 데 있어, 불용성 응집체를 변성제나 환원제를 사용하지 않고도 활성 단백질로 분리해 내는 동시에 다양한 목적단백질에서 활용 가능한 범용성 융합파트너를 이용하는 재조합 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<11> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 융합파트너(fusion partner)로서 말산탈수소효소(이하, Mdh)의 유전자 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현벡터를 제조하는 단계;

<12> 2) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및,

<13> 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.

<14> 또한, 본 발명은 융합파트너와 외래단백질의 유전자가 연결되어 포함되어 재조합 단백질을 생산하는 발현벡터에 있어서, 상기 융합파트너는 말산탈수소효소 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터를 제공한다.

<15> 또한, 본 발명의 발현벡터가 형질 도입된 형질전환체를 제공한다.

<16> 아울러, 본 발명의 방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

<17> 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

<18> "외래단백질(heterologous protein) 또는 목적단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.

<19> "재조합 단백질(recombinant protein) 또는 융합단백질(fusion protien)"은 원래의 외래단백질의 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다. 본 발명의 융합파트너와 목적단백질이 연결된 재조합 융합 단백질 형태 또는 단백질 절단효소에 의해 융합파트너가 재조합 융합단백질로부터 제거된 목적단백질의 재조합 단백질을 의미한다.

<20> "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

<21> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<22> 본 발명은 1) 융합파트너(fusion partner)로서 말산탈수소효소(이하, Mdh)의 유전자 및 외래단백질의 유전자를

연결한 발현벡터를 제조하는 단계;

<23> 2) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및,

<24> 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.

<25> 대장균에서 외래단백질은 불용성 응집체로 발현되는 경우가 많다. 이에 본 발명에서는 단백질의 올바른 접힘을 저해하는 스트레스를 주어졌을 때 발현이 증가하는 대장균 단백질인 말산탈수소효소를 융합파트너로 사용하여, 재조합 단백질의 수용성 발현을 향상시키고자 하였다. 단백질의 접힘을 저해하는 조건에서도 활성이 유지되며 발현량이 증가한 단백질은 단백질의 잘못된 접힘(misfolding)을 극복하기 위한 대장균의 생체 메커니즘에 관여한다는 가능성뿐 아니라 단백질 구조가 안정적이며 자체 접힘 능력이 뛰어나다는 것을 보여주므로 융합단백질로서 효과적으로 이용될 수 있다.

<26> 구체적으로, 대장균의 성장 최적 온도인 37℃보다 높은 온도인 48℃에서 배양함으로써 단백질의 올바른 접힘을 저해하는 스트레스를 주어졌을 때 발현이 증가하는 대장균 단백질을 선별하였으며(도 1 참조), 상기 단백질을 분석·동정한 결과 대장균 말산탈수소효소(Malate dehydrogenase; 이하, Mdh)의 발현량이 증가한 것을 확인하였다(표 1 참조). 일반적으로 성장 최적 조건에서 벗어날 경우 변화된 환경 조건에 적응하기 위한 반응 기작이 나타난다. 이와 동시에 구조적으로 안정하지 못한 단백질들은 불용성 응집체를 형성하게 된다. 대장균이 성장을 유지할 수 있는 온도로 배양한 후 대장균의 단백질체의 변화를 비교하기 위하여 2차원 전기영동을 한 후 발현량이 증가한 단백질을 분석한 결과 특정 단백질의 발현량이 약 1.6배 증가한 것을 확인하였다(도 1 참조). 상기 발현량이 증가한 단백질을 매트릭스보조 탈착이온화 질량분석기(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight; MALDI-TOF)-MS를 이용하여 분석·동정한 결과 Mdh임을 확인하였다(표 1 참조).

<27> 상기 외래단백질은 당업자가 원하는 모든 단백질이 가능하며, 특히, 의료, 연구용 및 산업용 단백질, 예를 들어, 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청, 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 외래단백질을 재조합 단백질로 발현할 수 있다. 본 발명에서는 Mdh가 외래단백질의 접힘을 돕는 융합파트너로서의 가능성을 검증하기 위하여 대장균에서 융합파트너 없이 단독으로 발현하였을 때 불용성 응집체를 형성한다고 알려진 10개의 단백질과 융합 발현하였다. 즉, 의료, 연구용 단백질로는 대표적으로 인간 미니프로인슐린(human minipro-insulin, 이하 mp-INS), 인간 상피세포 성장인자(human epidermal growth factor, 이하 EGF), 인간 프리프로-그렐린(human prepro-ghrelin, 이하 ppGRN), 인간 인터루킨-2(human interleukin-2, 이하 hIL-2), 인간 활성유도 시티딘 디아미네이즈(human activation induced cytidine deaminase, 이하 AID), 인간 글루타메이트 디카르복실레이즈(human glutamate decarboxylase, 이하 $GAD_{448-585}$), 수도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 큐티네이즈(cutinase, 이하 CUT), 인간 페리틴 가벼운 사슬(human ferritin light chain, 이하 hFTN-L), 인간 과립구 집락-자극인자(human granulocyte colony-stimulating factor, 이하 G-CSF) 및 한냉 자가염증 증후군 Nacht 도메인[cold autoinflammatory syndrome1(NALP3) Nacht domain, 이하 Nacht]을 목적단백질로 융합 발현하였고 산업용 단백질로는 제1형 당뇨병의 진단 마커로 알려진 글루탐산 탈카르복시화 효소의 448 내지 558 아미노산(glutamate $decarboxylase_{448-585}$, 이하 '$GAD_{448-585}$')과 섬유의 전처리에 이용되고 플라스틱 분해능을 가져 친환경 산업용 효소로 각광받고 있는 수도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 큐티네이즈(cutinase, 이하 'CUT')를 목적단백질로 선정하여 각각 Mdh의 카르복실 말단에 삽입한 발현 벡터를 제조한 후(도 2 참조) 이를 대장균에 형질전환시키고 이로부터 재조합 단백질 형태로 생산하였다. 각각의 재조합 단백질의 발현량을 확인한 결과, Mdh와 융합한 외래단백질의 발현이 대부분 불용성 응집체보다 수용성 발현에서 더 많은 것을 확인하였고(도 3 참조), 또한 단독 발현한 외래단백질의 수용성 발현량보다 Mdh와 융합한 외래단백질에서 수용성 발현량이 매우 증가하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

<28> 또한, 상기의 방법으로 재조합 단백질의 활성을 검증하기 위해 융합발현 파트너가 따로 제거되지 않아도 사용할 수 있는 산업용 단백질인 재조합 큐티네이즈(Mdh::CUT)의 PNP 특이적 분해 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다(도 5 참조).

<29> 또한, 본 발명은 융합파트너와 외래단백질의 유전자가 연결되어 포함되어 재조합 단백질을 생산하는 발현벡터에 있어서, 상기 융합파트너는 말산탈수소효소 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터를 제공한다.

<30> 뼈대 벡터에 융합 파트너로서 Mdh 유전자와 외래단백질의 유전자가 연결되어 포함되며, 본 발명의 방법에서 사

용될 수 있는 뼈대 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 상기 발현벡터는 pT7 뼈대 벡터에 상기 융합파트너의 유전자와 외래단백질의 유전자를 삽입할 부위를 일련의 순서로 포함함으로써 상기 융합파트너와 외래단백질을 재조합 단백질로 발현할 수 있다.

<31> 더 나아가, 본 발명의 벡터의 융합파트너의 유전자에 작동 가능하도록 Mdh 유전자와 외래단백질 사이에 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결될 수 있다. 융합파트너와 융합할 목적단백질이 산업용 단백질일 경우, 융합파트너가 목적단백질의 기능을 저하할 수도 있으며, 의학용 단백질일 경우는 항원항체 반응을 야기할 수 있으므로 융합파트너는 제거되는 것이 바람직하다. 이때, 상기 단백질 절단효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위, 제네나제(Genenase) I 인식부위 또는 퓨린(Furin) 인식부위가 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다.

<32> 아울러, 본 발명의 벡터의 융합파트너 또는 외래단백질의 유전자에 작동 가능하도록 재조합 단백질의 분리 정제가 용이하도록 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결될 수 있다. 이때, 상기 분리정제용 태그는 GST, poly-Arg, FLAG, poly-His 및 c-myc 등이 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다. 발명의 실시태양에서, 본 발명의 벡터는 pT7 뼈대 벡터에 상기 융합파트너의 유전자, 외래단백질의 유전자 및 분리정제용 태그를 삽입할 부위를 일련의 순서로 포함함으로써 상기 융합파트너, 외래단백질 및 분리정제용 태그를 포함하는 재조합 단백질로 발현할 수 있다.

<33> 발명의 실시태양에서, 상기 외래 유전자는 제한효소 부위를 통해 클로닝될 수 있고, 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 사용된 경우에는 상기 폴리뉴클레오티드와 틀이 맞도록(in frame) 연결되어, 외래단백질 분비 후 단백질 절단효소로 절단 시, 원래 형태의 외래단백질이 생산될 수 있도록 할 수 있다.

<34> 또한, 본 발명은 융합파트너와 외래단백질의 유전자가 연결되어 포함되어 재조합 단백질을 생산하는 발현벡터에 있어서, 상기 융합파트너는 말산탈수소효소 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터가 형질 도입된 형질전환체를 제공한다.

<35> 아울러, 본 발명은 1) 융합파트너(fusion partner)로서 말산탈수소효소(이하, Mdh)의 유전자 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현벡터를 제조하는 단계;

<36> 2) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및,

<37> 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

<38> 본 발명의 재조합 단백질의 융합파트너 말산탈수소효소는 크기가 작아서 목적단백질의 수율이 이전의 융합파트너에 비해 훨씬 향상될 수 있다. 또한, 도 3 내지 4에서 나타난 바와 같이 의료목적 또는 산업적으로 유용한 단백질들에 모두 범용적으로 작용할 수 있고, 도 5에 나타난 바와 같이 목적단백질의 수용성 발현을 유도할 뿐만 아니라 고유한 기능을 수행하는 활성형으로의 발현을 유도하는 데 적합하다.

효 과

<39> 본 발명의 말산탈수소효소의 유전자를 융합파트너로 사용하여 재조합 단백질을 생산하는 방법은 기존의 융합파트너가 가지고 있는 수용성과 접힘에 관한 한계를 극복할 수 있고, 단백질 의약품 및 산업용 생산에 폭 넓게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<40> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<41> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<42> **<실시예 1> 환경 스트레스 하에 의한 대장균 단백질체 변화 분석**

<43> **<1-1> 열 스트레스에서 배양된 대장균에서 발현한 수용성 단백질의 회수**

<44> 대장균에 단백질의 올바른 접힘을 저해하는 스트레스를 주기 위해 48℃에서 배양한 대장균에서 발현한 수용성 단백질을 회수하였다.

<45> 37℃, 130 rpm 및 1L당 트립톤 10 g, 효모 추출물 10 g, NaCl 5 g으로 조성된 LB 배지에서 배양한 대장균

BL21(*Escherichia coli* K-12)을 OD_{600}이 0.5에 도달했을 때 37℃(대조군) 및 48℃(실험군)에서 3시간 더 배양한 후 세포배양액을 6000 rpm 4 ℃에서 원심 분리하여 균체 침전물을 회수하였다. 균체 침전물을 40 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 두 번 씻어낸 후, 500 ㎕의 파쇄 용액[lysis buffer; 8M Urea, 4%(w/v) CHAPS, 40mM Tris, 단백질 분해효소 제한 혼합물(Protease inhibitor cocktail; Roche Diagnostics GmbH, 독일)]에 현탁한 다음 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄액을 4℃에서 12,000 rpm으로 60분간 원심 분리하여 상등액과 침전물을 분리하여 단백질 응집체를 제거한 뒤 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit)를 이용하여 측정하였고, 상기 상등액의 수용성 단백질 30 mg을 재수화 완충액[rehydration solution, 2 M 싸이오우레아(thiourea), 8 M 우레아(urea), 4%(w/v) 챕스(CHAPS), 1%(w/v) DTT, 1%(w/v) 이동성 양성전해질(carrier ampholyte), pH 4.7]에 녹여 2차원 겔 전기영동(2-dimmensional polyacrylamide gel electrophoresis; 2D-PAGE)용 시료로 -80℃에 냉동보관하였다.

<46> **<1-2> 단백질체 분석을 위한 2차원 겔 전기영동**

<47> 2차원 겔 전기영동을 이용하여 실시예 <2-1>의 방법으로 수득한 대조군과 실험군의 단백질체를 분석하였다.

<48> 상기 냉동보관된 단백질을 pI별로 분리하기 위한 1차원 등전점 분리과정은 상기 냉동보관된 단백질을 선형 IPG(immobilized pH gradient) 겔 스트립(pH 4-7, 17 cm, ReadyStrip, BIO-RAD, USA)에 45 ㎍ 씩 분주한 뒤, 단백질 IEF 셀 전기영동장치(Bio-Rad Protein IEF cell electrophoresis system, USA)에서 500 V, 2시간; 1000 V, 30분; 2000 V, 30분; 4000 V, 30분; 8000 V, 70000 VHr(Volt-hours) 동안 시행하였다. pI별로 분리된 단백질을 포함하고 있는 상기 IPG 겔 스트립을 1% DTT 및 브로모페놀 블루(bromophenol blue)가 포함된 평형화 용액[epuilibration solution; 50 mM 트리스(Tris), pH 8.6, 6 M 우레아(urea), 30%(v/v) 글리세롤(glycerol), 2% SDS]에서 15분간 반응시킨 뒤, 2.5% 아이오도아세트아마이드(iodoacetamide)가 포함된 평형화 용액에서 15분간 반응시켰다. 단백질을 분자량에 의해 분리하기 위해 평형화된 겔 스트립을 12.5% 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 PROTEAN II Xi cell system(Bio-Rad, USA)을 이용하여 2차 전기영동 하였다. 전기영동은 브로모페놀 블루 시약이 겔의 끝 부분에 이를 때까지(30 mA/gel, 12h) 4℃에서 진행하였다.

<49> Rabilloud 방법(Rabilloud T, *Methods Mol Biol*, 112:297-305, 1999)에 따라 젤을 은-염색(silver staining)한 후 UMAX 파워룩 1100 스캐너(UMAX, USA)로 스캐닝을 하였고, 이미지 마스터 소프트웨어 버전 4.01(Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 젤에 나타난 각 단백질 스팟의 영역당 밀도 변화를 측정, 분석하였다. 상기 분석 결과를 바탕으로, 대조군과 실험군에서 분리한 단백질의 발현량을 비교하였고, 실험군에서 스팟 부피가 1.6배 증가한 단백질의 스팟을 선정하였다(도 1).

<50> **<실시예 2> MALDI-TOF-MS분석을 이용한 환경 스트레스 하에 수용성 발현량이 증가한 대장균 단백질의 동정**

<51> 실시예 1에 의해 선정된 단백질 스팟을 추출하여 한국기초과학연구소에 기탁하여, MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight, MALD-TOF)-MS분석을 이용하여 동정하였다.

<52> 구체적으로, MALDI-TOF-MS 분석을 위해서 실시예 1에 의해 선정된 단백질 스팟을 은-염색된 겔로부터 추출하였다(Gharahdaghi F, *et al.*, *Electrophoresis*, 20:601-605, 1999). 추출된 단백질 스팟을 트립신(trypsin, 10.15 mg/㎖)을 포함하는 25 nM 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate, pH 8.0) 용액에서 37℃에서 하룻밤 동안 두어 펩타이드 분해과정을 수행하였다. 분해된 펩타이드는 5%(v/v) TFA, 50% (v/v) ACN 용액을 이용하여 추출하였으며, 상기 추출 과정을 세 번 반복한 후 진공 원심분리기를 이용하여 추출한 펩타이드를 포함하는 용액을 건조시켰다. 건조된 펩타이드를 50% ACN/0.1% TFA 용액에 용해시킨 뒤, 한국기초과학연구소에 기탁하여 MALDI-TOF-MS 시스템(Voyager DE-STR instrument; Biosystems, USA)을 이용하여 분자량을 측정하였다. 측정된 펩타이드의 질량 지문(peptide mass fingerprints)은 Prospector 웹사이트의 MS-FIT (http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msfit.htm)을 이용하여 수행하였으며 단백질 동정을 위한 MS-FIT 데이터베이스로는 Swiss-Prot을 이용하였다. 단백질 동정을 수행한 결과 48℃ 배양에 의해 발현량이 1.6배 증가한 단백질은 대장균 Mdh로 확인되었다(표 1).

표 1

<53> 단백질 정보

유전자 이름	유전자 접근 번호[a]	단백질 이름	등전점(pI)/분자량(kDa)		상대적 발현량 증가[d]	서열 유사성(%)
			이론값[b]	실험값[c]		
Mdh	P61889	Malate dehydrogenase	5.6 / 32.3	5.4 / 33.1	1.6	17.9 %

<54> a. 유전자 접근 번호 : ExPASy Proteomics Server(http://www.expasy.org/)에서 유전자 정보 검색용 식별번호이다.

<55> b 이론값은 Compute pI/Mw tool(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 수집하였다.

<56> c 실험값은 이차원 전기영동 젤 이미지로부터 산출하였다.

<57> d 대조군 Mdh의 발현량을 1로 하여 실험군 Mdh의 상대적 발현량을 나타내었다.

<58> **<실시예 3> 아미노 말단에 Mdh를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터의 제조**

<59> 실시예 1 내지 2의 방법으로 선정된 환경 스트레스 하에 수용성 발현량이 증가한 대장균 단백질 말산탈수소효소(Malate dehydrogenase; Mdh)를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

<60> Mdh 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드를 획득하기 위해, Entrez Nucleotide 데이타베이스의 gi:49175990에서 3381352bp 내지 3382290bp의 서열정보(서열번호 45)를 이용하여 정지 코돈을 제외한 Mdh 유전자의 PCR 증폭을 위한 프라이머쌍을 제작하였다. 또한, 상기 프라이머쌍의 센스 프라이머(서열번호 1: cat atg aaa gtc gca gtc ctc ggc)에는 *Nde*I 제한효소 인식서열을, 안티센스 프라이머(서열번호 2: ctc gag ctt att aac gaa ctc ttg)에는 *Xho*I 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작하였다. PCR은 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM $(NH_4)_2SO_4$; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM $MgSO_4$; 0.1% Triton X-100)에 대장균으로부터 분리한 염색체를 주형 DNA로 100 ng, 서열번호 1 내지 2로 기재되는 프라이머쌍을 각각 50 pmol을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 수행되었다. 반응 조건은 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 수행하였으며, 그 결과 증폭된 DNA절편의 5' 말단에 *Nde*I 제한효소 부위와 3' 말단에 *Xho*I 제한 효소 부위를 포함하는 PCR 산물을 수득하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Nde*I과 *Xho*I으로 각각 처리하여 pT7-7(Novagen, USA)의 제한효소 *Nde*I과 *Xho*I자리에 삽입하였고 이를 pT7-Mdh라고 명명하였다.

<61> **<실시예 4> 외래단백질을 융합단백질 형태로 제조하는 발현 벡터**

<62> Mdh를 융합파트너로 이용하여 다양한 외래단백질의 수용성 발현의 증가를 확인하기 위해 외래단백질의 단독 발현 벡터 및 융합파트너와의 융합 발현 벡터를 제작하였다.

<63> **<4-1> 외래단백질 단독 발현 벡터**

<64> 인간 미니프로인슐린(human minipro-insulin, 이하 mp-INS; EF518215:1-180bp; 서열번호 46), 인간 상피세포 성장인자(human epidermal growth factor, 이하 EGF; NCBI Nucleotide accession number M15672: 1-165bp), 인간 프리프로-그렐린(human prepro-ghrelin, 이하 ppGRN; NCBI Nucleotide accession number NM;016362: 109-393), 인간 인터루킨-2(human interleukin-2, 이하 hIL-2; NCBI Nucleotide accession number NM;000586: 116-517), 인간 활성유도 시티딘 디아미네이즈(human activation induced cytidine deaminase, 이하 AID; NCBI Nucleotide accession number NM;020661: 77-673bp), 인간 글루타메이트 디카르복실레이즈(human glutamate decarboxylase, 이하 $GAD_{448-585}$; 서열번호 24), 수도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 큐티네이즈(cutinase, 이하 CUT; 서열번호 47), 인간 페리틴 가벼운 사슬(human ferritin light chain, 이하 hFTN-L; NM;000146:200-727bp; 서열번호 48), 인간 과립구 집락-자극인자(human granulocyte colony-stimulating factor, 이하 G-CSF; NCBI Nucleotide accession number NM;172219: 131-655bp) 및 한냉 자가염증 증후군 Nacht 도메인[cold autoinflammatory syndrome1(NALP3) Nacht domain, 이하 Nacht; 서열번호 24] 등의 외래단백질의 5'-말단에 *Nde*I 제한효소 인식서열과 3'-말단에 *Hind*Ⅲ 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작된 표 2의 프라이머쌍을 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM

$(NH_4)_2SO_4$; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM $MgSO_4$; 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 PCR을 수행하였다.

<65> 구체적으로 mp-INS, EGF, ppGRN, hIL-2, AID, CUT, G-CSF 및 hFTN-L은 시작 코돈을 제외하고 정지 코돈을 포함하는 아미노산 서열을 증폭하였고, $GAD_{448-585}$의 경우는 448번째 아미노산부터 585번째에 해당하는 138개의 아미노산 서열을(서열번호 23), Nacht는 크라이오파이린(cryopyrin)의 nacht 도메인에 해당하는 316개의 아미노산 서열을 증폭하였다(서열번호 24). 이때, $GAD_{448-585}$의 경우는 3'-말단에 *Cla*I 제한효소 인식서열을 포함하도록 프라이머를 제작하였다.

<66> 또한, mp-INS, EGF, ppGRN, hIL-2, AID, $GAD_{448-585}$, hFTN-L, G-CSF 및 Nacht의 주형 DNA는 상기 단백질들이 많이 발현하는 인간 조직으로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1 ㎍과 oligo-d(T) 1 ㎕(Invitrogen, USA, 0.5 ㎍/㎕)에 증류수를 50 ㎕까지 채운 후, AccuPower RT-premix(Bioneer, 한국)에 넣어 RT-PCR(reverse transcription polymerasechain reaction) 반응시켰다. 70℃에서 5분, 4℃에서 5분, 42℃에서 60분, 94℃에서 5분, 4℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성함으로써 수득하였다. 상기 mp-INS는 인간 췌장 조직, EGF는 상피 세포, ppGRN은 인간 태반, hIL-2, hFTN-L, G-CSF 및 Nacht는 인간 백혈구, AID는 인간 측두엽 세포 및 $GAD_{448-585}$는 인간 해마 조직에서 각각 클로닝 하였다. CUT의 경우는 Genomic DNA Purification. kit(promega, USA)을 슈도모나스 푸티다로부터 이용하여 추출한 DNA를 주형 DNA로 사용하였다.

표 2

<67> 프라이머 서열

유전자명	프라이머	서열번호	염기서열
mp-INS	센스	서열번호 3	**cat atg** ttt gtc aac caa cat
	안티센스	서열번호 4	**aag ctt** tta gtt aca gta gtt c
EGF	센스	서열번호 5	**cat atg** aac tct gac tcc gaa tgc
	안티센스	서열번호 6	**aag ctt** tta acg cag ttc cca cca
ppGRN	센스	서열번호 7	**cat atg** ggc tcc agc ttc ctg
	안티센스	서열번호 8	**aag ctt** tca ctt gtc ggc t
hIL-2	센스	서열번호 9	**cat atg** gca cct act tca agt
	안티센스	서열번호 10	**aag ctt** tta tca agt cag tgt
AID	센스	서열번호 11	**cat atg** gac agc ctc ttg atg aac
	안티센스	서열번호 12	**aag ctt** tca taa caa aag tcc ca
$GAD_{448-585}$	센스	서열번호 13	**cat atg** cgc cac gtt gat gt
	안티센스	서열번호 14	**atc gat** tta taa atc ttg tcc
CUT	센스	서열번호 15	**cat atg** gct ccc ctg ccg gat ac
	안티센스	서열번호 16	**aag ctt** tta aag ccc gcg gcg ct
hFTN-L	센스	서열번호 17	**cat atg** agc tcc cag att cgt
	안티센스	서열번호 18	**aag ctt** tta gtc gtg ctt gag agt
G-CSF	센스	서열번호 19	**cat atg** act cca ctc gga cct g
	안티센스	서열번호 20	**aag ctt** tca tgg ctg tgc aag
Nacht	센스	서열번호 21	**cat atg** act gtg gtg ttc cag
	안티센스	서열번호 22	**aag ctt** tca cag cag gta gta c

<68> 상기 PCR 증폭 산물을 *Nde*I/*Hind*III($GAD_{448-585}$의 경우는 *Nde*I/*Cla*I) 제한 효소로 처리한 후, 대장균 발현벡터 pT7(Novagen, USA)의 *Nde*I/*Hind*III($GAD_{448-585}$의 경우는 *Nde*I/*Cla*I) 자리에 삽입함으로써 외래단백질의 단독 발현 벡터를 수득하였다.

<69> **<4-2> 외래단백질의 융합파트너와의 융합 발현 벡터**

<70> mp-INS, EGF, ppGRN, hIL-2, AID, $GAD_{448-585}$, CUT, hFTN-L, G-CSF 및 Nacht 등의 외래단백질의 5'-말단에 *Xho*I 제한효소 인식서열과 3'-말단에 *Hind*III 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작된 표 3의 프라이머쌍을 각각 50

pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM $(NH_4)_2SO_4$; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM $MgSO_4$; 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 PCR을 수행하였다. 구체적으로 hFTN-L, mp-INS, EGF, ppGRN, hIL-2, G-CSF, AID, CUT는 시작 코돈을 제외하고 정지 코돈을 포함하는 아미노산 서열을 증폭하였고, $GAD_{448-585}$의 경우는 448번째 아미노산부터 585번째에 해당하는 138개의 아미노산 서열을(서열번호 23), Nacht는 크라이오파이린(cryopyrin)의 nacht 도메인에 해당하는 316개의 아미노산 서열을 증폭하였다(서열번호 24). 이때, $GAD_{448-585}$의 경우는 3'-말단에 *Cla*I 제한효소 인식서열을 포함하도록 프라이머를 제작하였다.

표 3

<71> 프라이머 서열

유전자명	프라이머	서열번호	염기서열
mp-INS	센스	서열번호 25	**ctc gag** ttt gtc aac caa cat
	안티센스	서열번호 26	**aag ctt** tta gtt aca gta gtt c
EGF	센스	서열번호 27	**ctc gag** aac tct gac tcc gaa tgc
	안티센스	서열번호 28	**aag ctt** tta acg cag ttc cca cca
ppGRN	센스	서열번호 29	**ctc gag** ggc tcc agc ttc ctg
	안티센스	서열번호 30	**aag ctt** tca ctt gtc ggc t
hIL-2	센스	서열번호 31	**ctc gag** gca cct act tca agt
	안티센스	서열번호 32	**aag ctt** tta tca agt cag tgt
AID	센스	서열번호 33	**ctc gag** gac agc ctc ttg atg aac
	안티센스	서열번호 34	**aag ctt** tca taa caa aag tcc ca
$GAD_{448-585}$	센스	서열번호 35	**ctc gag** cgc cac gtt gat gt
	안티센스	서열번호 36	**atc gat** tta taa atc ttg tcc
CUT	센스	서열번호 37	**ctc gag** gct ccc ctg ccg gat ac
	안티센스	서열번호 38	**aag ctt** tta aag ccc gcg gcg ct
hFTN-L	센스	서열번호 39	**ctc gag** agc tcc cag att cgt
	안티센스	서열번호 40	**aag ctt** tta gtc gtg ctt gag agt
G-CSF	센스	서열번호 41	**ctc gag** act cca ctc gga cct g
	안티센스	서열번호 42	**aag ctt** tca tgg ctg tgc aag
Nacht	센스	서열번호 43	**ctc gag** act gtg gtg ttc cag
	안티센스	서열번호 44	**aag ctt** tca cag cag gta gta c

<72> 상기 PCR 증폭 산물을 *Xho*I/*Hind*III($GAD_{448-585}$의 경우는 *Xho*I/*Cla*I) 제한 효소로 처리한 후, 실시예 3의 방법으로 제작한 발현벡터 pT7-Mdh의 *Xho*I/*Hind*III($GAD_{448-585}$의 경우는 *Nde*I/*Cla*I) 자리에 삽입함으로써 외래단백질의 융합파트너와의 융합 발현 벡터를 수득하였다. 상기의 방법으로 만들어진 플라스미드를 각각 pT7-Mdh::FTN-L, pT7-Mdh::IL-2, pT7-Mdh::EGF, pT7-Mdh::G-CSF, pT7-Mdh::AID, pT7-Mdh::CUT, pT7-Mdh::ppGRN, pT7-Mdh::GAD448-585 및 pT7-Mdh::Nacht라고 명명하였다.

<73> **<실시예 5> 재조합 단백질의 수용성 발현**

<74> 실시예 4의 방법으로 제조한 외래단백질의 단독 발현 벡터 및 융합파트너와의 융합 발현 벡터를 대장균에 형질전환하여 배양한 뒤, IPTG로 재조합 단백질의 발현을 유도함으로써 본 발명의 융합파트너에 의한 수용성 발현의 효과를 확인하였다.

<75> **<5-1> 대장균 형질전환 및 재조합 단백질의 발현**

<76> 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, *DNA Cloning* vol.1 109-135, IRS press 1985)에 의해 실시예 4의 벡터들을 대장균에 형질전환 하였다.

<77> 구체적으로 $CaCl_2$로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 실시예 4의 벡터들을 열충격 방법으로 형질전환시킨 후, 앰피실린(ampicillin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 앰피실린 저항성을 나타내는 콜로니

를 선별하였다. 융합파트너와의 융합 발현 벡터 pT7-Mdh로 형질전환된 대장균을 BL21(DE3):pT7-Mdh로 명명하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100 mg/mℓ 앰피실린을 포함하는 LB 배지에 접종한 다음 37℃에서 200 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD_{600}이 0.5에 이르렀을 때 IPTG를 첨가(1 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건으로 3 내지 4시간 더 배양하였다.

<78> **<5-2> SDS-PAGE를 이용한 가용성으로 생산된 재조합 단백질 확인**

<79> 실시예 5-1의 방법으로 배양한 대장균을 6,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mℓ의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한, 상등액과 불용성 응집체를 각각 5×SDS(0.156M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료를 10% SDS-PAGE겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색하여 각각의 재조합 단백질의 발현량을 농도계(Densitometer, Bio-Rad, USA)로 확인하고, 수학식 1에 따라 용해도(%)를 계산하였다.

수학식 1

<80>
$$\text{용해도}(\%)=\frac{\text{상등액단백질총량}(\mu g)\text{X}100}{\text{상등액단백질총량}(\mu g)+\text{침전물단백질총량}(\mu g)}$$

<81> 그 결과, Mdh와 융합한 외래단백질의 발현이 대부분 불용성 응집체보다 수용성 발현에서 더 많은 것을 확인하였다(도 3). 또한, 단독 발현한 외래단백질의 수용성 발현량보다 Mdh와 융합한 외래단백질에서 용해도가 매우 증가하는 것을 확인하였다(도 4).

<82> **<5-3> Mdh와 융합 발현한 큐티네이즈의 효소 활성**

<83> 실시예 5-1 내지 5-2를 통해서 확보한 Mdh 융합발현된 큐티네이즈(이하 Mdh::CUT)의 가수분해 활성을 측정하였다.

<84> 96-웰 마이크로플레이트에 106.7 ㎕의 0.1M 인산완충액(pH 8.0) 및 13.3 ㎕의 Triton X-100(4 g/L)을 넣은 후, 정제하지 않은 Mdh::CUT 상등액과 대조군으로 대장균 BL21(DE3)의 상등액 13.3 ㎕를 각각 첨가하였다. 상기 용액에 66.7 ㎕의 기질(PNP(p-nitrophenyl palmitate) 및 PNB(p-nitrophenyl butyrate), 6.6 mM; Sigma, USA)을 첨가함으로써 가수분해 반응을 시작하였고, 37℃에서 20분간 반응하였다. 반응이 시작된 후 매분 415 nm 파장에서 흡광도의 변화를 측정하였다(Bio-Rad microplate reader, USA).

<85> 그 결과 상기 수용성 재조합 단백질 Mdh::CUT이 PNP 특이적 분해 능력을 가짐을 확인하였다(도 5).

도면의 간단한 설명

<86> 도 1은 환경 스트레스 하에 의한 대장균 단백질체 변화를 분석한 결과도이다:

<87> 도 A: 2-D PAGE(2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis) 결과

<88> 도 B: 48℃ 배양에 의한 Mdh 발현량의 증가

<89> 도 2는 외래단백질 단독 발현 벡터와 융합파트너와의 융합 발현 벡터의 제조과정을 나타낸 도이다.

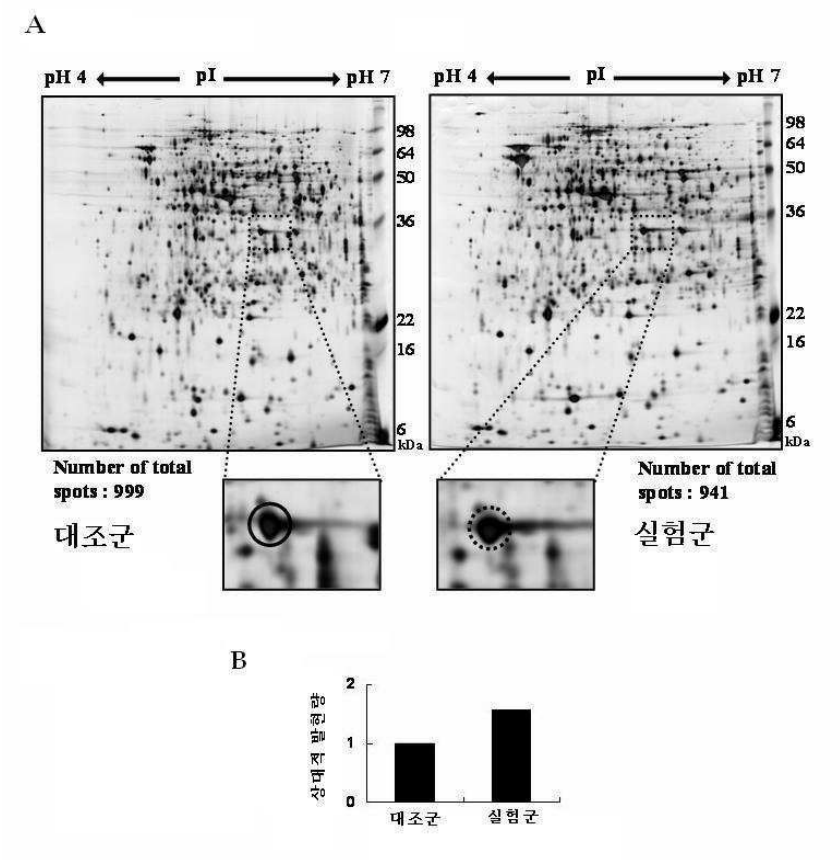
<90> 도 3은 Mdh 융합 발현한 재조합 단백질의 수용성 상등액(S)과 불용성 응집체(IS)에서의 발현량을 비교한 결과도이다.

<91> 도 4는 단독 발현 재조합 단백질과 Mdh 융합 발현한 재조합 단백질의 수용성 발현량을 비교한 그래프이다.

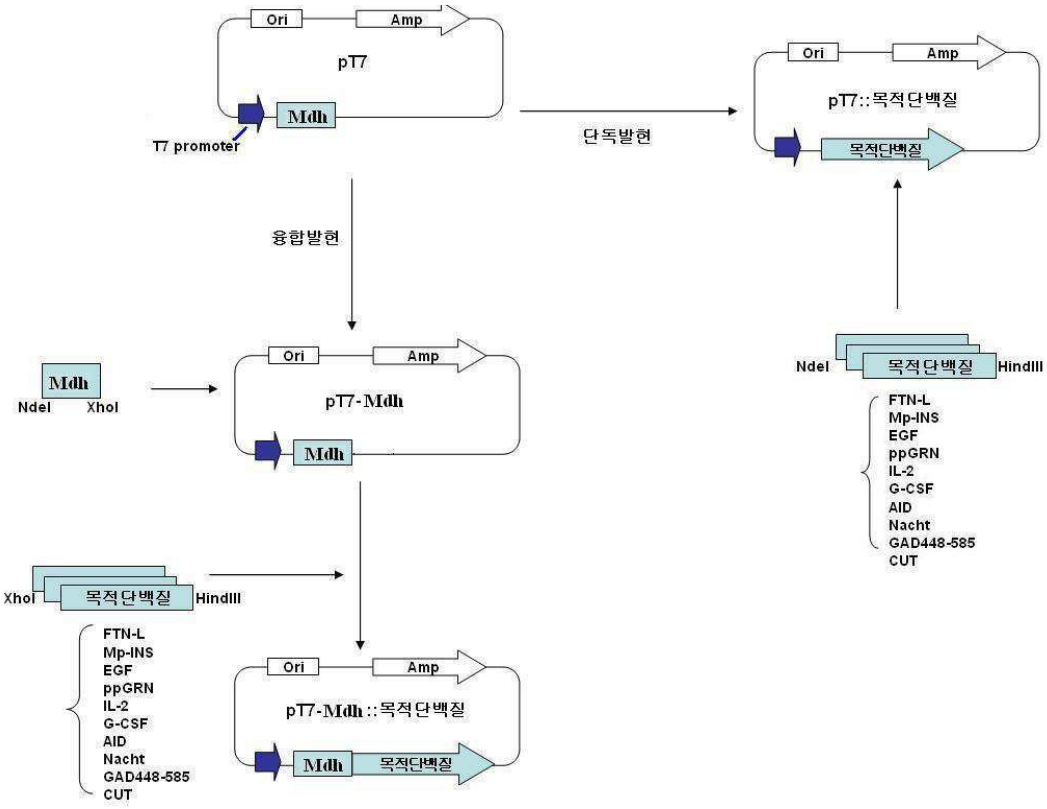
<92> 도 5는 큐티네이즈를 발현하지 않은 대장균의 정제되지 않은 수용성 단백질과 RppA::CUT의 형태로 Mdh 융합 발현한 재조합 단백질을 발현하는 대장균의 정제되지 않은 수용성 단백질의 PNB(●) 및 PNP(○)의 분해능을 측정한 결과도이다.

도면

도면1


A
pH 4
pI
pH 7
98
64
50
36
22
16
6
kDa
Number of total spots : 999
대조군
Number of total spots : 941
실험군
B
상대적 발현량
2
1
0
대조군
실험군

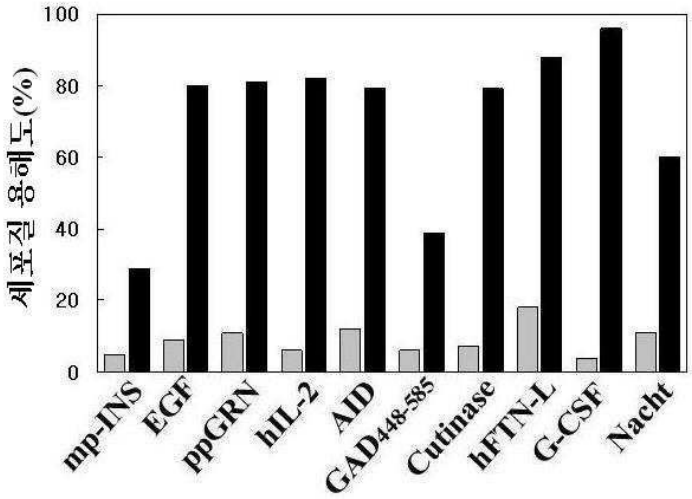
도면2



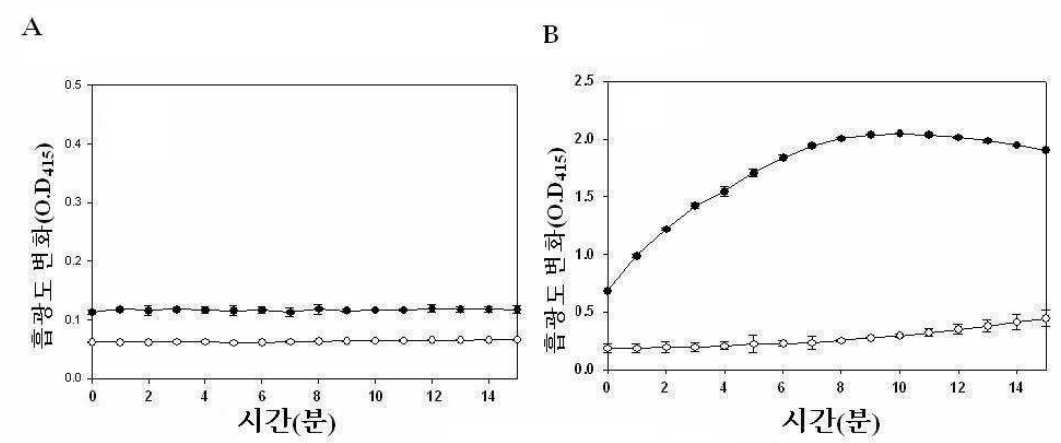
도면3

목적 단백질	용해도(%) (재조합 단백질)	S IS
Mini pro-Insulin (mp-INS)	29	
Epidermal Growth Factor (EGF)	80	
pp Ghrelin (ppGRN)	81	
Interleukin 2 (hIL-2)	82	
Activation Induced cytidine Deaminase (AID)	79	
$GAD_{448-585}$	39	
Cutinase	79	
Ferritin Light Chain (hFTN-L)	88	
Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)	96	
Nacht	60	

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY Industry & Academy Collaboration Foundation

<120> PREPARATION METHOD OF RECOMBINANT PROTEIN BY USE OF MALATE DEHYDROGENASE AS A FUSION EXPRESSION PARTNER

<130> 7P-08-20

<160> 48

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mdh Sense Primer

<400> 1
catatgaaag tcgcagtcct cggc 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mdh Antisense Primer

<400> 2
ctcgagctta ttaacgaact cttg 24

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mp-INS Sense Primer

<400> 3
catatgtttg tcaaccaaca t 21

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mp-INS Antisense Primer

<400> 4
aagcttttag ttacagtagt tc 22

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EGF Sense Primer

<400> 5
catatgaact ctgactccga atgc 24

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EGF Antisense Primer

<400> 6
aagcttttaa cgcagttccc acca 24

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ppGRN Sense Primer

<400> 7
catatgggct ccagcttcct g 21

<210> 8
<211> 19

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ppGRN Antisense Primer

<400> 8
aagctttcac ttgtcggct 19

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hIL-2 Sense Primer

<400> 9
catatggcac ctacttcaag t 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hIL-2 Antisense Primer

<400> 10
aagcttttat caagtcagtg t 21

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AID Sense Primer

<400> 11
catatggaca gcctcttgat gaac 24

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AID Antisense Primer

<400> 12
aagctttcat aacaaaagtc cca 23

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAD448-585 Sense Primer

<400> 13
catatgcgcc acgttgatgt 20

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAD448-585 Antisense Primer

<400> 14
atcgatttat aaatcttgtc c 21

<210> 15
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CUT Sense Primer

<400> 15
catatggctc ccctgccgga tac 23

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CUT Antisense Primer

<400> 16
aagcttttaa agcccgcggc gct 23

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hFTN-L Sense Primer

<400> 17
catatgagct cccagattcg t 21

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hFTN-L Antisense Primer

<400> 18

aagcttttag tcgtgcttga gagt 24

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> G-CSF Sense Primer

<400> 19
catatgactc cactcggacc tg 22

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> G-CSF Antisense Primer

<400> 20
aagctttcat ggctgtgcaa g 21

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nacht Sense Primer

<400> 21
catatgactg tggtgttcca g 21

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nacht Antisense Primer

<400> 22
aagctttcac agcaggtagt ac 22

<210> 23
<211> 948
<212> DNA
<213> Human GAD448-585

<400> 23
accgtggtgt tccagggggc ggcagggatt gggaaaacaa tcctggcccg gaagatgatg 60

ttggactggg cgtcggggac actctaccaa gacaggtttg actatctgtt ctatatccac 120

tgtcgggagg tgagccttgt gacacagagg agcctggggg acctgatcat gagctgctgc 180

cccgacccaa acccacccat ccacaagatc gtgagaaaac cctccagaat cctcttcctc 240

atggacggct tcgatgagct gcaaggtgcc tttgacgagc acataggacc gctctgcact 300

gactggcata aggccgagcg gggagacatt ctcctgagca gcctcatcag aaagaagctg 360

cttcccgagg cctctctgct catcaccacg agacctgtgg ccctggagaa actgcagcac 420

ttgctggacc atcctcggca tgtggagatc ctgggtttct ccgaggccaa aaggaaagag 480

tacttcttca agtacttctc tgatgaggcc caagccaggg cagccttcag tctgattcag 540

gagaacgagg tcctcttcac catgtgcttc atccccctgg tctgctggat cgtgtgcact 600

ggactgaaac agcagatgga gagtggcaag agccttgccc agacatccaa gaccaccacc 660

gcggtgtacg tcttcttcct ttccagtttg ctgcagcccc ggggagggag ccaggagcac 720

ggcctctgcg cccacctctg ggggctctgc tctttggctg cagatggaat ctggaaccag 780

aaaatcctgt ttgaggagtc cgacctcagg aatcatggac tgcagaaggc ggatgtgtct 840

gctttcctga ggatgaacct gttccaaaag gaagtggact gcgagaagtt ctacagcttc 900

atccacatga ctttccagga gttctttgcc gccatgtact acctgctg 948

<210> 24
<211> 414
<212> DNA
<213> nacht domain of cryopyrin

<400> 24
cgccacgttg atgtttttaa actatggctg atgtggaggg caaaggggac taccgggttt 60

gaagcgcatg ttgataaatg tttggagttg gcagagtatt tatacaacat cataaaaaac 120

cgagaaggat atgagatggt gtttgatggg aagcctcagc acacaaatgt ctgcttctgg 180

tacattcctc caagcttgcg tactctggaa gacaatgaag agagaatgag tcgcctctcg 240

aaggtggctc cagtgattaa agccagaatg atggagtatg gaaccacaat ggtcagctac 300

caacccttgg gagacaaggt caatttcttc cgcatggtca tctcaaaccc agcggcaact 360

caccaagaca ttgacttcct gattgaagaa atagaacgcc ttggacaaga ttta 414

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mp-INS Sense Primer

<400> 25
ctcgagtttg tcaaccaaca t 21

<210> 26
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mp-INS Antisense Primer

<400> 26
aagcttttag ttacagtagt tc 22

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EGF Sense Primer

<400> 27
ctcgagaact ctgactccga atgc 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EGF Antisense Primer

<400> 28
aagcttttaa cgcagttccc acca 24

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ppGRN Sense Primer

<400> 29

ctcgagggct ccagcttcct g 21

<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ppGRN Antisense Primer

<400> 30
aagctttcac ttgtcggct 19

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hIL-2 Sense Primer

<400> 31
ctcgaggcac ctacttcaag t 21

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hIL-2 Antisense Primer

<400> 32
aagcttttat caagtcagtg t 21

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AID Sense Primer

<400> 33
ctcgaggaca gcctcttgat gaac 24

<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AID Antisense Primer

<400> 34
aagctttcat aacaaaagtc cca 23

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAD448-585 Sense Primer

<400> 35
ctcgagcgcc acgttgatgt 20

<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAD448-585 Antisense Primer

<400> 36

atcgatttat aaatcttgtc c 21

<210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CUT Sense Primer

<400> 37
ctcgaggctc ccctgccgga tac 23

<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CUT Antisense Primer

<400> 38
aagcttttaa agcccgcggc gct 23

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hFTN-L Sense Primer

<400> 39
ctcgagagct cccagattcg t 21

<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hFTN-L Antisense Primer

<400> 40
aagcttttag tcgtgcttga gagt 24

<210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> G-CSF Sense Primer

<400> 41
ctcgagactc cactcggacc tg 22

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> G-CSF Antisense Primer

<400> 42
aagctttcat ggctgtgcaa g 21

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nacht Sense Primer

<400> 43

ctcgagactg tggtgttcca g 21

<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nacht Antisense Primer

<400> 44
aagctttcac agcaggtagt ac 22

<210> 45
<211> 939
<212> DNA
<213> Escherichia coli Mdh

<400> 45
ttacttatta acgaactctt cgcccagggc gatatctttc ttcagcgtat ccagcatacc 60

ttccagcgcg ttctgttcaa atgcgctcag ggtaccgata gatttacgct cttccacgcc 120

gtttttaccc agcagcagcg gttgagagaa gaaacgggcg tactgaccgt cgccttcaac 180

gtaggcacat tcgacaacgc cttgttcgcc ctgcagtgca cgaaccagag acagaccaaa 240

acgtgcagct gcctggccca tagacagggt tgcagacccg ccaccggcct tcgcttcaac 300

cacttcagta cccgcgttct ggatgcgttt ggtcagatca gccacttcct gctcggtaaa 360

actaacgcca ggaacctgtg acagcagcgg cagaatggta acaccagagt gaccgccaat 420

aaccggcact tcaacttcgc ctggctgttt gcctttcagt tccgcaacaa aggtgttgga 480

acgaatgata tccagcgtgg taacgccgaa cagtttgttt ttgtcataaa caccggcttt 540

tttcagcact tcagcagcaa ttgcaactgt ggtgttaacc gggttagtga taataccaat 600

gcacgctttc gggcaggttt tcgcaacttg ctgtaccagg tttttcacga tgccggcgtt 660

aacgttaaac aggtcggaac gatccatacc cggtttacgc gctacgcctg cagagataag 720

aacgacatct gcgccttcca gcgccggagt cgcatcttca ccagaaaaac ctttgatttt 780

cacagcagta gggatatggc tcagatcgac agccacaccg ggagtcactg gagcgatatc 840

atacagagag agttctgaac ctgaaggcag ttgggttttt aacagtagtg caagcgcctg 900

gccaataccg ccagcagcgc cgaggactgc gactttcat 939

<210> 46
<211> 180
<212> DNA
<213> human minipro-insulin

<400> 46
tttgtcaacc aacatttatg tggatcacat ttagtagagg ctttgtatct tgtttgtggt 60

gaacgtggat ttttctatac acctaagaca cgtagatctc ctaatggaaa acgtggtatt 120

gttgaacaat gctgtacatc aatctgttca ttgtatcaac ttgagaacta ctgtaactaa 180

180

<210> 47
<211> 528
<212> DNA
<213> human ferritin light chain

<400> 47
atgagctccc agattcgtca gaattattcc accgacgtgg aggcagccgt caacagcctg 60

gtcaatttgt acctgcaggc ctcctacacc tacctctctc tgggcttcta tttcgaccgc 120

gatgatgtgg ctctggaagg cgtgagccac ttcttccgcg aattggccga ggagaagcgc 180

gagggctacg agcgtctcct gaagatgcaa aaccagcgtg gcggccgcgc tctcttccag 240

gacatcaaga agccagctga agatgagtgg ggtaaaaccc cagacgccat gaaagctgcc 300

atggccctgg agaaaaagct gaaccaggcc cttttggatc ttcatgccct gggttctgcc 360

cgcacggacc cccatctctg tgacttcctg gagactcact tcctagatga ggaagtgaag 420

ctcatcaaga agatgggtga ccacctgacc aacctccaca ggctgggtgg cccggaggct 480

gggctgggcg agtatctctt cgaaaggctc actctcaagc acgactaa 528

<210> 48
<211> 780
<212> DNA
<213> Pseudomonas putida cutinase

<400> 48
atggctcccc tgccggatac accgggagcg ccatttccgg ctgtcgccaa tttcgaccgc 60

agtggcccct acaccaccag cagccagagc gaggggccga gctgtcgcat ctatcggccc 120

cgcgacctgg gtcagggggg cgtgcgtcat ccggtgattc tctggggcaa tggcaccggt 180

gccgggccgt ccacctatgc cggcttgcta tcgcactggg caagccacgg tttcgtggtg 240

gcggcggcgg aaacctccaa tgccggtacc gggcgggaaa tgctcgcctg cctggactat 300

ctggtacgtg agaacgacac cccctacggc acctattccg gcaagctcaa taccgggcga 360

gtcggcactt ctgggcattc ccagggtggt ggcggctcga tcatggccgg gcaggatacg 420

agggtgcgta ccacggcgcc gatccagccc tacaccctcg gcctggggca cgacagcgcc 480

tcgcagcggc ggcagcaggg gccgatgttc ctgatgtccg gtggcggtga caccatcgcc 540

tttccctacc tcaacgctca gccggtctac cggcgtgcca atgtgccggt gttctggggc 600

gaacggcgtt acgtcagcca cttcgagccg gtcggtagcg gtggggccta tcgcggcccg 660

agcacggcat ggttccgctt ccagctgatg gatgaccaag acgcccgcgc taccttctac 720

ggcgcgcagt gcagtctgtg caccagcctg ctgtggtcgg tcgagcgccg cgggctttaa 780

780