



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0017415
(43) 공개일자 2017년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/66* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/635 (2013.01)

C12N 15/66 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0111276

(22) 출원일자 2015년08월06일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 삼성로 212 은마아파트 22동 908호(대치동, 은마아파트)

황인엽

경기도 용인시 기흥구 서천동 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공학실험동 103호 나노바이오공학 연구실

아미트 쿠마르 차드하리

경기도 용인시 기흥구 서천동 덕영대로 1732, 경희대학교 국제캠퍼스 공과대학 공학실험동 103호 나노바이오공학 연구실

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

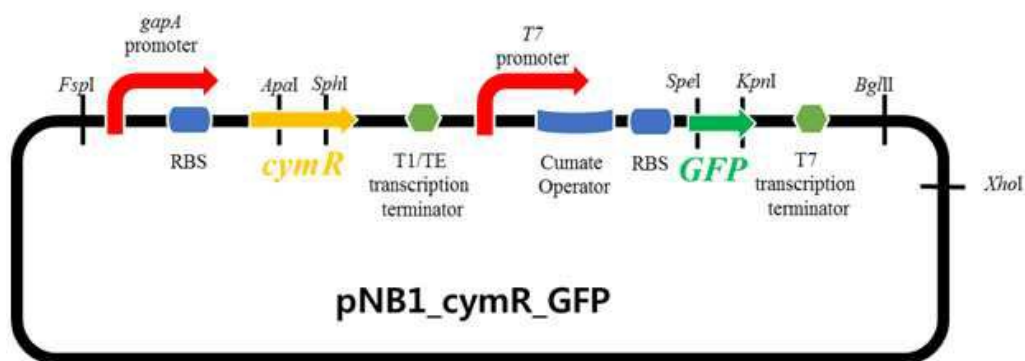
(54) 발명의 명칭 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트

(57) 요약

본 발명은 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트, 상기 유전자 발현용 카세트를 함유하는 발현 벡터, 상기 발현벡터가 도입된 재조합 미생물, 및 외래 유전자의 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 유전자 발현용 카세트에 의해 세포에 독성이 적으면서 저렴한 비용으로 높은 효율의 단백질 발현을 얻을 수 있고 유전자 과발현을 위한 효과적인 도구로 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

C12N 15/70 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20132176

부처명 산업자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 신재생에너지핵심기술

연구과제명 메탄 및 syngas의 상온 상압에서의 알코올 전환 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 제1프로모터-리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS)-리프레서(repressor) 삽입부위-전사 종결부위(transcription terminator site, TTS); 및
- (ii) 제2프로모터-큐메이트 작동유전자(Cumate Operator, Cuo)-리보솜 결합 부위(Ribosome binding site, RBS)-멀티 클로닝 부위(multiple cloning site)-전사 종결부위(transcription terminator site, TTS)를 포함하는, 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현용 카세트는 (a) FspI 절단부위, (b) GapA 프로모터, (c) 리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS), (d) ApaI 절단부위, (e) SphI 절단부위, (f) T1/TE 전사 종결부위(T1/TE transcription terminator site, TTS), (g) T7 프로모터, (h) 큐메이트 작동유전자(Cumate Operator, Cuo), (i) 리보솜 결합부위, (j) 멀티 클로닝 부위(multiple cloning site), (k) T7 전사 종결부위(T7 transcription terminator site, TTS), 및 (l) BglII 절단부위가 순차적으로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현용 카세트는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 멀티 클로닝 부위에는 SpeI, MluI, ScaI 및 KpnI 절단부위로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이 포함된 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현용 카세트의 멀티 클로닝 부위에 외래 유전자가 삽입된 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 외래 유전자는 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP)의 유전자인 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 큐메이트 오페론을 조절하기 위해서 (i)의 리프레서 삽입부위에 도입되는 유전자는 cymR(Cumate Repressor)인 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 cymR은 유도물질 존재시, 큐메이트 작동유전자에 결합하지 않고 불활성화되는 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유도물질은 p-에틸벤조산(p-ethylbenzoic acid), p-프로필벤조산(p-propylbenzoic acid), 쿠믹산(cumic acid), p-이소부틸벤조산(p-isobutylbenzoic acid), p-제3부틸벤조산(p-tertbutylbenzoic acid), p-N-디메틸아미노벤조산(p-N-dimethylaminobenzoic acid), p-N-에틸아미노벤조산(p-N-ethylaminobenzoic acid) 및 큐메이트(cumate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 유전자 발현용 카세트.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 유전자 발현용 카세트를 함유하는 발현벡터.

청구항 11

제10항의 발현벡터가 도입된 재조합 미생물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 13

제11항의 재조합 미생물을 배양하는 1단계;

상기 배양된 미생물에 제9항의 유도물질을 첨가하여 cymR을 불활성시키는 2단계; 및

상기 cymR의 불활성화에 의해 도입된 외래 유전자의 단백질을 생산하는 3단계;를 포함하는 외래 유전자의 단백질을 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트, 상기 유전자 발현용 카세트를 함유하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 재조합 미생물, 및 외래 유전자의 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 생물학적 시스템은 유도발현 시스템에 의하여 단백질의 발현이 단단하게 조절되는 방향으로 연구되고 있다. 하지만 이러한 시스템에 사용되는 유도물질은 세포에 독성을 나타낼 수 있다. 이 시스템은 사용되는 숙주세포의 선호도, 플라스미드의 중추, 전사 종결자, 유도 시스템, 그리고 프로모터에 따라 서로 다른 특성을 가진다.

[0004] 한편, 미생물을 사용하여 재조합 단백질을 생산하는 것은 바이오 산업에 광범위하게 이용되고 있다. 이러한 미생물 중에서, 대장균은 낮은 제조비용, 빠른 동역학, 번역 후 변형의 결핍, 표지된 단백질의 발현과 외인성 DNA

의 형질 전환이 용이하여 많은 양의 재조합 단백질을 생산하기에 적합한 숙주세포이다. 이러한 이유로, 플라스미드의 대량생산과 같은 분자생물학적 도구와 방법들이 가능해졌고 다양한 재조합균주에 따른 다양한 배양 방법들의 개발이 가능해졌다.

[0005] 일반적으로, 재조합 단백질 기술 분야에서 단백질은 유전자 복제를 증가시키거나 프로모터의 결합을 도와주거나 또는 강한 프로모터를 사용하여 프로모터 영역의 결합 강도를 증가시킴으로써 과발현될 수 있다. 그 중에서도, 예를 들면 araBAD 프로모터, lac 프로모터, rhaPBAD 프로모터, T7 프로모터, trc와 tac 프로모터, pL과 pR 프로모터, 그리고 tetA 프로모터 등이 강력한 프로모터로써 널리 사용되었다. 그러나, 일반적으로 이중 단백질 발현을 위해 사용되는 이러한 프로모터는 일반적으로 유도 인자, 영양제의 첨가 또는 결핍이나 물리적 또는 물리화학적 변화를 가해 주어야 한다. 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG) 및 항생제와 같은 화학 유도제들은 비싸고 유독하여 최종 제품이나 생물 공정의 폐기물 폐수에서 제거되어야 한다. 따라서 숙주세포에 독성이 적고 저렴한 유도제를 사용하는 발현 시스템을 개발하는 것이 필요하다.

[0006] 한편, 오페론(Operon)은 조절유전자(regulatory gene), 작동유전자(operator), 프로모터(promoter), 구조유전자(structural gene)들을 포함한 효소합성에 관여하는 일련의 DNA로 구성되어 있다. DNA가 mRNA로 전사되는 것을 개시하기 위해서는 리프레서가 제거되거나 또는 작동유전자와의 결합에서 유리되어야만 하며, 이것은 특정 화학적 또는 물리적 자극에 의해 달성된다. 락토스 오페론, 트립토판 오페론 등을 이용한 형질발현벡터 시스템은 유전공학 기술을 이용하여 최근까지 광범위하게 이용되어 왔다. 대한민국 특허공개공보 제10-2008-0098013호에도 락토스 오페론을 이용한 발현시스템에 대해 개시하고 있다. 하지만, 상기 락토스 오페론의 경우 IPTG를 유도물질로 사용하여 리프레서를 작동유전자로부터 유리시켰는데, IPTG를 유도물질로 사용하게 되면, 숙주세포에 독성을 가하고, 비싸다는 단점이 있었다. 또한, 그 자체로도 유독하여 최종 제품이나 생물 공정의 폐기물 폐수에서 반드시 제거되어야 했다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 숙주세포에 독성이 적고 저렴한 유도제를 사용하는 발현 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) F1 유래의 큐메이트 오페론(Cumate Operon)을 기반으로 한, 단백질 발현에 필요한 모든 요소를 가지고 있는 유전자 발현용 카세트를 제작하였다. 또한, 이소프로필벤조산을 유도물질로 사용하였을 때 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 유도물질로 사용하였을 때보다 높은 단백질 발현효율을 얻을 수 있었고 세포에 독성이 적게 나타나는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자 발현용 카세트를 함유하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 재조합 미생물을 이용하여 외래 유전자의 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 숙주세포에 독성이 적고 저렴한 유도제를 사용하는 발현 시스템을 개발하기 위하여, 슈도모나스 푸티다 F1 유래의 큐메이트 오페론(Cumate Operon)을 기반으로 한 단백질 발현에 필요한 모든 요소를 가지고 있는 474 bp 유전자 발현용 카세트를 제작하였다. 상기 유전자 발현용 카세트를 이용하여 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)보다 독성이 적으면서 저렴한 이소프로필벤조산을 사용하여 재조합 대장균에서 단백질의 발현이 가능함을 확인하였다.

- [0017] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하나의 양태로서, (i) 제1프로모터-리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS)-리프레서(repressor) 삽입부위-전사 종결부위(transcription terminator site, TTS); 및 (ii) 제2프로모터-큐메이트 작동유전자(Cumate Operator, Cuo)-리보솜 결합 부위(Ribosome binding site, RBS)-멀티 클로닝 부위(multiple cloning site)-전사 종결부위(transcription terminator site, TTS)를 포함하는, 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 상기 유전자 발현용 카세트는 (i) 제1프로모터-리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS)-리프레서(repressor) 삽입부위-전사 종결부위(transcription terminator site, TTS) 등의 유전자 발현 및 단백질 발현에 필요한 구성을 포함한다.
- [0020] 본 발명에서 용어 "프로모터"란, 적당한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 다른 핵산 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열을 의미하며, 본 발명에서 "작동가능하게 연결(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 프로모터의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0021] 본 발명에서의 상기 프로모터(promoter)는 코어 프로모터(core promoter), 프록시멀 프로모터(proximal promoter), 디스털 프로모터(distal promoter)로 구성될 수 있다.
- [0022] 코어 프로모터는 프로모터 중 전사가 일어나기 위해 필요한 최소한의 부분으로, 전사시작시점으로부터 앞쪽으로 약 45 염기쌍 이내의 부분을 지칭하며 이곳에 RNA 중합효소와 일반적인 전사조절인자들이 결합하며; 프록시멀 프로모터는 전사시작시점으로부터 앞쪽으로 약 250 염기쌍 이내의 부분을 지칭하며 전사를 조절하는 데 있어서 직접적으로 영향을 미치는 주요 부분으로 알려져 있고; 디스털 프로모터는 전사시작시점으로부터 앞쪽으로 멀리 떨어져서 위치하고 있으며 전사를 조절하는 데 있어서 프록시멀 프로모터보다 일반적으로 영향력이 약하고 부차적인 역할을 한다.
- [0023] 본 발명의 발현용 카세트에 있어서, 상기 제1프로모터는 리프레서를 발현시킬 수 있는 한, 어떠한 프로모터도 이용이 가능하며, 이에 제한되지 않지만, 구체적으로 상기 제1프로모터는 GapA 프로모터일 수 있으며, 상기 GapA 프로모터는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나제 A (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A: gapA) 프로모터의 약자로, 리프레서(repressor) 삽입부위에 삽입되는 리프레서(repressor) 유전자 자체의 발현을 조절하게 된다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS)"란, 단백질이 생합성을 개시할 때, DNA로부터 전사된 mRNA가 숙주세포내에서 리보솜과 결합할 수 있도록 하는 리보솜 결합부위를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "리프레서(repressor) 삽입부위"란, 리프레서 유전자가 삽입되는 위치를 의미한다. 본 발명에서 용어 "리프레서(repressor)"란 여러 개의 소단위로 구성된 다른 자리 입체성 단백질이다. 리프레서(repressor)는 그 계에 특이적인 작동유전자(operator)를 인식하여 여기에 결합함으로써 그 작동유전자에 이어지는 유전자군, 즉 오페론의 발현을 억제하고 음성 조절한다. 그러나, 상기 리프레서는 유도물질이 결합하면 불활성화되어 작동유전자와의 결합능이 상실되게 되고 이에 의해 목적 유전자의 전사가 일어나게 된다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "전사 종결부위(transcription terminator site site, TTS)"는 RNA 사슬을 신장시키는 RNA 중합효소에 작용하여 DNA 상의 특정 위치에서 전사종결을 일으키는 전사종결인자가 결합하는 부위를 의미한다.
- [0027] 본 발명의 상기 유전자 발현용 카세트는 (ii) 제2프로모터-큐메이트 작동유전자(Cumate Operator, Cuo)-리보솜 결합 부위(Ribosome binding site, RBS)-멀티 클로닝 부위(multiple cloning site)-전사 종결부위(transcription terminator site, TTS) 등의 유전자 발현 및 단백질 발현에 필요한 구성을 포함한다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종결부위"에 대한 정의는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0029] 본 발명에서 상기 제2프로모터는 T7 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 T7 프로모터는 박테리 오파이지 유래 프로모터로서, 대장균의 RNA 중합효소는 발현률이 아주 낮기 때문에 대장균을 단백질 생산의 숙주로 사용할 경우 통상적으로 사용되는 고발현 프로모터이다. 또한 T7 프로모터는 작동유전자가 위치하며, 이 부분에 리프레서가 결합하고 있어 평상시에는 T7중합효소에 의한 유전자 발현이 억제되다가 유도물질이 첨가될

경우 발현을 재개할 수 있는 특징이 있으며 T7 전사 종결부위를 인지함으로써, 발현이 종료된다.

- [0030] 본 발명에서 용어 "큐메이트 작동유전자(Cumate Operator, Cuo)"는 큐메이트오페론(Cumate Operon)에 관여하는 유전자를 의미한다. 상기 큐메이트 오페론(Cumate Operon)은 큐메이트 작동유전자와 큐메이트 리프레서(Cumate Repressor, cymR)에 의해 조절된다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "오페론"은 염색체 상에 프로모터(promoter), 작동유전자(operator), 구조유전자가 서로 인접하여 늘어서 있어 조절유전자에 의하여 일률로 제어를 받는 일련의 mRNA 전사단위를 말한다. 본 발명에서 용어 "큐메이트 오페론"은 큐메이트 작동유전자와 큐메이트 리프레서에 의해 조절되는 오페론을 의미한다. 상기 큐메이트 오페론을 조절하기 위해서 상기 리프레서 삽입부위에 도입되는 유전자는 cymR(Cumate Repressor)일 수 있다.
- [0032] 상기 큐메이트 리프레서(cymR)가 큐메이트 작동유전자에 결합하면, DNA의 mRNA로의 전사가 방지된다. DNA가 mRNA로 전사되는 것을 개시하기 위해서는 상기 cymR가 제거되거나 또는 큐메이트 작동유전자와의 결합이 유리되어야만 하며, 이것은 특정 화학적 또는 물리적 자극에 의해 달성된다.
- [0033] 본 발명의 유전자 발현용 카세트의 리프레서 삽입부위에 삽입된 cymR 유전자가 발현되면, cymR가 큐메이트 작동유전자에 결합하여 T7 프로모터의 작동을 억제한다. 유도물질이 있는 경우, 유도물질이 cymR와 결합하여 cymR의 구조를 변화시켜 큐메이트 작동유전자에 결합할 수 없게 만든다. 그 결과 T7 프로모터가 정상적으로 작동하고 멀티클로닝 사이트에 삽입한 외래 유전자가 정상적으로 발현되게 된다. 따라서, 상기 cymR은 유도물질 존재시, 큐메이트 작동유전자에 결합하지 않고 불활성화되게 된다.
- [0034] 상기 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트의 경우, 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG) 및 항생제와 같은 화학 유도제들 대신 Cumate Repressor(cymR)와 결합할 수 있는 유도물질에 의해 도입된 외래 유전자의 발현이 가능하게 되므로, 숙주세포에 독성이 적고 저렴한 유도물질을 사용하는 발현 시스템이 될 수 있다.
- [0035] 상기 리프레서와 결합하는 유도물질로는 이소프로필벤조산 계열을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않지만 구체적으로, p-에틸벤조산(p-ethylbenzoic acid), p-프로필벤조산(p-propylbenzoic acid), 쿠믹산(cumic acid), p-이소부틸벤조산(p-isobutylbenzoic acid), p-제3부틸벤조산(p-tertbutylbenzoic acid), p-N-디메틸아미노벤조산(p-N-dimethylaminobenzoic acid), p-N-에틸아미노벤조산(p-N-ethylaminobenzoic acid) 및 큐메이트(cumate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일실시예에서는 유전자 발현에 필요한 요소인 T7 프로모터, Cumate Operator(Cuo), 리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS) 및 T7 전사종료 부위(T7 transcription terminator site, TTS)의 서열을 Biobrick Library(www.partsregistry.org)로부터 수집한 후, 수집된 정보를 종합하여 Cumate Operon에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트를 디자인하였으며, 이의 유전자 서열을 Bioneer(대전, 한국)에 의뢰하여 화학적으로 합성하여 서열번호 1로 이루어진 474 bp의 유전자 발현용 카세트를 제조하였다.
- [0037] 본 발명에서 용어 "멀티 클로닝 부위(multiple cloning site)"는 벡터에 삽입할 수 있도록 제한 효소 절단 부위가 도입되어 있는 핵산 서열을 의미한다. 상기 멀티 클로닝 부위에는 SpeI, MluI, ScaI 및 KpnI 절단부위로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 유전자 발현용 카세트는 (a) FspI 절단부위, (b) GapA 프로모터, (c) 리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS), (d) ApaI 절단부위, (e) SphI 절단부위, (f) T1/TE 전사 종결부위(T1/TE transcription terminator site, TTS), (g) T7 프로모터, (h) 큐메이트 작동유전자(Cumate Operator, Cuo), (i) 리보솜 결합부위, (j) 멀티 클로닝 부위(multiple cloning site), (k) T7 전사 종결부위(T7 transcription terminator site, TTS), 및 (l) BglIII 절단부위가 순차적으로 구성된 것일 수 있으며, 이에 제한되지 않지만 상기 유전자 발현용 카세트는 서열번호 1로 표시될 수 있다.
- [0039] 상기 유전자 발현용 카세트의 멀티 클로닝 부위에 외래 유전자가 삽입될 수 있으며, 상기 외래 유전자는 숙주세포에 도입하여 발현하고자 하는 어떠한 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP)의 유전자를 상기 멀티 클로닝 부위에 도입하여, 이의 발현을 확인하였다(실시예 2).

- [0041] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 유전자 발현용 카세트를 함유하는 발현백터를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 일실시예에서는 상기 서열번호 1의 유전자 발현용 카세트를 pET-28a(+)(Novagen, USA)백터의 FspI/BglII에 삽입하여 PNB1(4,039 bp)을 제조하였다(실시예 1).
- [0044] 본 발명의 일실시예에서는 cymR유전자 단편과 pNB1을 ApaI 및 SphI으로 제한효소 처리한 후에, 절단부위를 라이게이션시켜 pNB1_cymR을 제조하였고, 녹색형광단백질의 유전자인 GFP와 pNB1-cymR백터를 XbaI과 KpnI으로 제한효소 처리한 후에, 절단부위를 라이게이션시켜, pNB1_cymR_GFP를 얻었다(실시예 2).
- [0045] 본 발명에서 용어, "발현백터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 도입된 외래 유전자가 발현되도록 외래 유전자에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현백터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 백터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 백터가 바람직하다. 발현 백터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코딩하는 유전자, 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩타이드를 코딩하는 DNA, 인핸서 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 발현백터의 형태는 하나의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 모노시스트론(mono-cistronic) 백터, 둘 이상의 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리시스트론(poly-cistronic) 백터가 될 수 있다.
- [0047] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 발현백터가 도입된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0049] 본 발명에서 용어 "도입"은 형질감염(transfection) 또는 형질도입(transduction)에 의해 외래 유전자를 세포로 유입시키는 것을 의미한다. 형질감염은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 형질감염법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법(전기천공법), 미세주사법, 리포좀 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 용어 "미생물"은 공지의 미생물을 제한없이 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않지만, 상기 미생물은 대장균일 수 있다.
- [0052] 또 다른 하나의 양태로서, 상기 재조합 미생물을 배양하는 1단계; 상기 배양된 미생물에 유도물질을 첨가하여 cymR을 불활성시키는 2단계; 및 상기 cymR의 불활성화에 의해 도입된 외래 유전자의 단백질을 생산하는 3단계를 포함하는 외래 유전자의 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명에서 상기 재조합 미생물에 유도물질을 첨가하게 되면, cymR과 큐메이트 작동유전자와의 결합이 해리되고, 이에 의해 도입된 외래 유전자가 전사되고, 궁극적으로 재조합 미생물 내에서 단백질의 생산이 가능하게 된다.
- [0055] 본 발명의 일실시예에서는 pACYC_GFP가 형질전환된 *E.coli* BL21 (DE3)를 함유하는 배양액에는 유도물질로 이소프로필 β-D-1-티오갈락토포라노시드(IPTG)를 첨가하였고, pNB1_cymR_GFP가 형질전환된 *E.coli* BL21 (DE3)를 함유하는 배양액에는 이소프로필벤조산을 유도물질로 첨가한 경우, 이소프로필 β-D-1-티오갈락토포라노시드(IPTG)를 유도물질로 사용한 경우에 비하여, 이소프로필벤조산을 유도물질로 사용한 경우, GFP 단백질의 발현이 약 2.5배 더 높음을 확인하였다(도 4).
- [0056] 따라서, 본 발명의 이소프로필벤조산을 유도물질로 사용하여, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) F1 유래의 큐메이트 오페론(Cumate Operon)을 기반으로 한 단백질 발현시스템은 숙주세포에 독성이 적고 저렴하면서, 높은 효율의 단백질 발현 시스템을 제공하는 것이 가능하다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 큐메이트 오페론에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트를 이용한 단백질 발현시스템은 세포에 독성이 적으면서, 고효율의 단백질의 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1a는 GapA 프로모터, T7 프로모터, 큐메이트 작동유전자, 리보솜 결합부위, T1/TE와 T7 전사 종결부위를 포함하는 pNB1 벡터의 모식도이고, 도 1b는 GapA 프로모터, 리보솜 결합부위, cymR, T1/TE 전사 종결부위, T7 프로모터, 큐메이트 작동유전자, 리보솜 결합부위, GFP, T7 전사 종결부위를 포함하는 pNB1_cymR_GFP 벡터의 모식도이다.

도 2는 pNB1_cymR_GFP 및 pACYCDuet_GFP 발현 벡터를 포함한 재조합 대장균을 배양한 후 녹색형광단백질의 발현을 형광현미경으로 분석한 결과이다.

도 3a와 3b는 pNB1_cymR_GFP, pACYCDuet_GFP, pNB1, pACYCDuet가 도입되어 있는 재조합 대장균을 다양한 농도의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG) 또는 이소프로필벤조산을 포함하는 배지에서 배양한 후 600nm 파장에서 흡광도를 측정한 결과이다.

도 4a와 4b는 pNB1_cymR_GFP, pACYCDuet_GFP, pNB1, pACYCDuet가 도입되어 있는 재조합 대장균을 다양한 농도의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG) 또는 이소프로필벤조산을 포함하는 배지에서 배양한 후 485nm/535nm 파장에서 흡광도를 측정한 결과이다.

도 5a와 5b는 pNB1_cymR_GFP, pACYCDuet_GFP가 도입되어 있는 재조합 대장균을 다양한 농도의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG) 또는 이소프로필벤조산을 포함하는 배지에서 배양한 후 단백질의 발현을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0063] 실시예 1: 발현벡터 삽입용 유전자 카세트의 제조

[0065] 유전자 발현에 필요한 요소인 T7 프로모터, Cumate Operator(CuO), 리보솜 결합부위(Ribosome binding site, RBS) 및 T7 전사종료 부위(T7 transcription terminator site, TTS)의 서열을 Biobrick Library(www.partsregistry.org)로부터 수집하였다. 수집된 정보를 종합하여 Cumate Operon에 의해 조절되는 유전자 발현용 카세트를 디자인하였으며, 이의 유전자 서열을 Bioneer(대전, 한국)에 의뢰하여 화학적으로 합성하여 474 bp의 유전자 가닥(서열번호 1)을 수득하였다. 상기 유전자 단편은 pET-28a(+)(Novagen, USA)벡터의 FspI/BglII에 삽입하여 pNB1(4,039 bp)을 제조하였다 (도 1a).

[0066]

[0067] 실시예 2: cymR 억제 단백질과 녹색형광단백질이 포함된 발현벡터의 제조

표 1

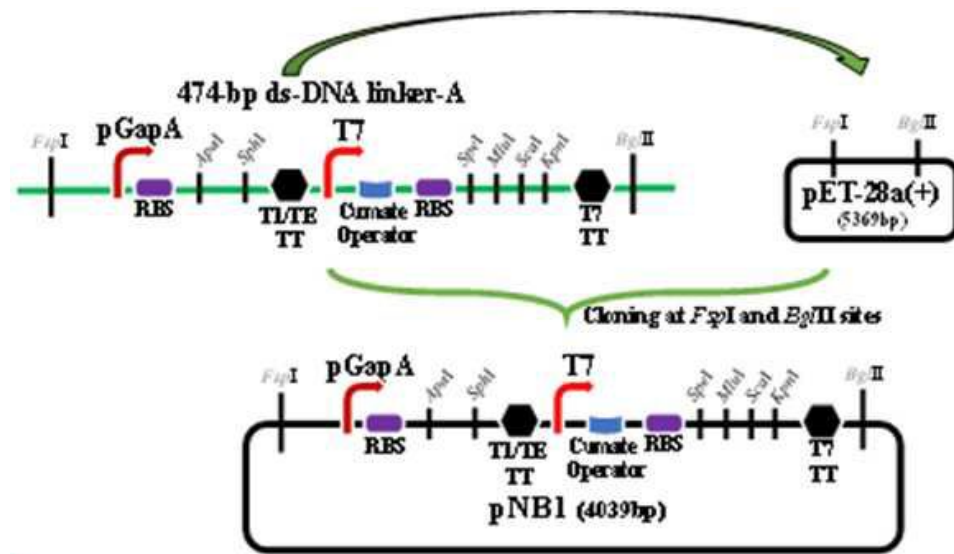
[0069]

유전자	프라이머 (5'→ 3')
cymR (624bp)	GGGCCCAAGATGGTGATCATGAGTCC (ApaI) (서열번호 2)
	GCATGCCCTAGCGCTTSGAATTSTCGCGT (SphI) (서열번호 3)
gfp (734bp)	TCTAGAATGAGTAAAGGAGAAGAAGT (XbaI) (서열번호 4)
	GGTACCTATTSTGTATAGTTSCATCCA (KpnI) (서열번호 5)

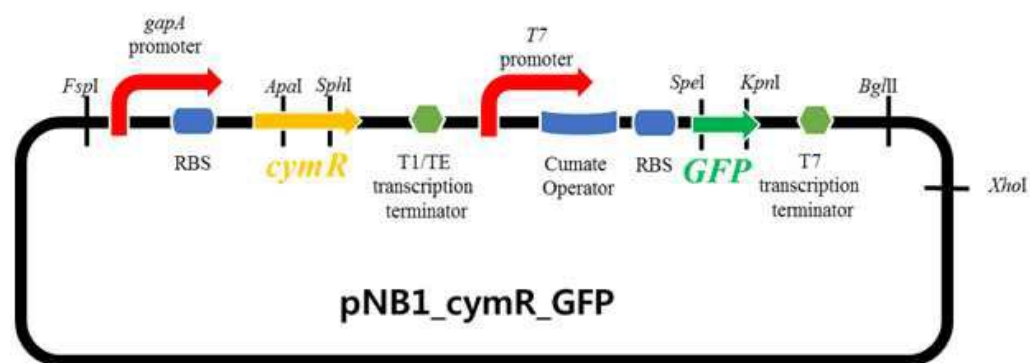
- [0071] T7 프로모터의 조절을 위한 cymR 단백질의 유전자의 서열을 슈도모나스 푸티다 F1으로부터 수집하였다. 수집된 유전자 서열을 Bioneer(대전, 한국)에 의뢰하여 서열번호 2와 서열번호 3에 해당하는 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 화학적으로 합성하여 유전자 발현용 카세트에 적합한 624 bp의 cymR 유전자를 획득하였다.
- [0072] 또한, 동일한 방법으로 서열번호 4와 서열번호 5를 이용하여 734bp의 GFP 유전자를 획득하였다.
- [0073] 상기 cymR 유전자 단편과 도 1a에서 제조한 pNB1을 ApaI 및 SphI으로 제한효소 처리한 후에, 절단부위를 라이게이션시켜 pNB1_cymR을 제조하였으며, 녹색형광단백질(GFP)의 유전자인 GFP와 pNB1-cymR 벡터를 XbaI과 KpnI으로 제한효소 처리한 후에, 절단부위를 라이게이션시켜, 도 1b에 도시된 pNB1_cymR_GFP를 얻었다(도 1b).
- [0074] 양성대조군으로, Lac Operon에 의해 조절되는 pACYCDuet-1 벡터(Novagen, USA)에 GFP를 라이게이션시켜 pACYC_GFP를 제조하였다.
- [0076] **실시예 3: 녹색형광단백질의 발현능 확인**
- [0078] 상기 실시예 2에서 제조된 상기 pACYC_GFP와 pNB1_cymR_GFP에 대하여 1.8kV의 조건으로 마이크로펄서(BioRad, USA)를 사용한 전기천공법(electroporation)으로 E.coli BL21 (DE3)를 형질전환시켰고, 50 μ g/ml의 카나마이신을 첨가한 LB agar 플레이트상에서, 각각 37 $^{\circ}$ C 조건에서 하룻밤 배양하였다.
- [0079] 이후, 이로부터 얻어진 각각의 단일의 콜로니를 각각 5ml의 LB broth에 하룻밤 배양하였다. 각각의 배양액을 20ml의 LB broth에서 GFP 단백질 발현을 유도하기 위하여 양성대조군인 pACYC_GFP가 형질전환된 E.coli BL21 (DE3)를 함유하는 LB broth에는 0.05-5 mM의 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 첨가하였고, pNB1_cymR_GFP가 형질전환된 E.coli BL21 (DE3)를 함유하는 LB broth에는 1-300 μ M의 이소프로필벤조산을 첨가한 후, 25 $^{\circ}$ C, 또는 37 $^{\circ}$ C 조건에서 12시간 동안 배양하였다.
- [0080] 상기 배양액 중 10 μ l의 세포를 이용하여 형광현미경으로 분석하였다(도 2). 그 결과, pACYC_GFP가 형질전환된 E.coli BL21 (DE3)에 비해 pNB1_cymR_GFP가 형질전환된 E.coli BL21 (DE3)의 생장이 증가함을 확인하였다.
- [0081] 또한, 유도물질이 세포생장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 배양액 중 1000 μ l를 취하여 OD₆₀₀값을 측정하였다. 그 결과, 12시간 배양 후 OD₆₀₀에서의 흡광도를 측정한 결과 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)보다 이소프로필벤조산을 유도물질로 사용하였을 때 더 높은 성장률을 보이는 것을 확인하였다(도 3).
- [0082] 또한, 상기 배양액 중 100 μ l를 취하여 PerkinElmer 2030 Multi-label Reader와 micro-titer plate를 사용하여 485nm/535nm에서 녹색형광단백질 발현을 측정하였다. 그 결과, 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 유도물질로 사용한 경우에 비하여, 이소프로필벤조산을 유도물질로 사용한 경우, GFP 단백질의 발현이 약 2.5배 더 높음을 확인하였다(도 4).
- [0083] 아울러, 이러한 단백질의 발현을 12% SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과, GFP 단백질의 발현이 정상적으로 일어나는 것을 확인하였다(도 5). 또한, SDS-PAGE 분석결과 37 $^{\circ}$ C에서 보다 25 $^{\circ}$ C에서 단백질 발현을 유도하였을 때 GFP의 발현이 더 높은 것을 확인하였다(도 5).
- [0085] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

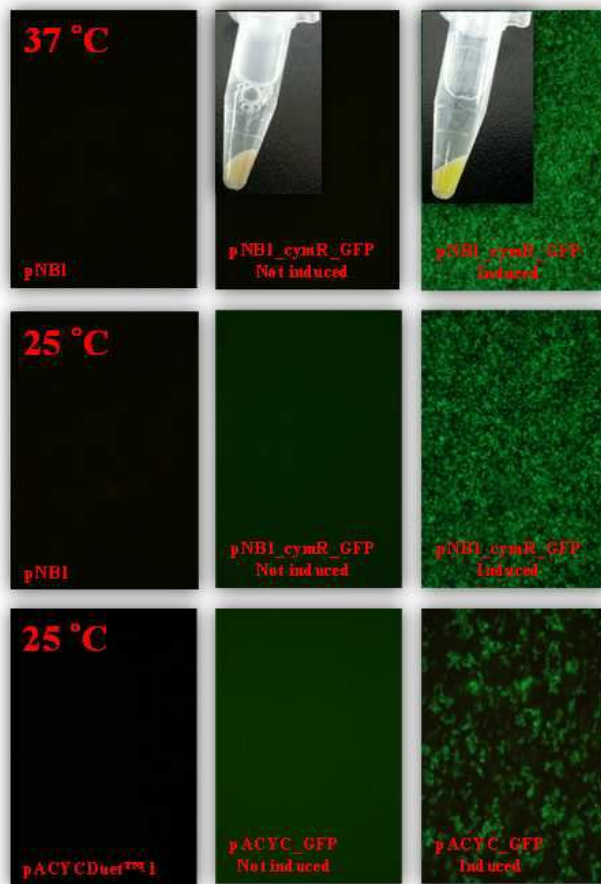
도면1a



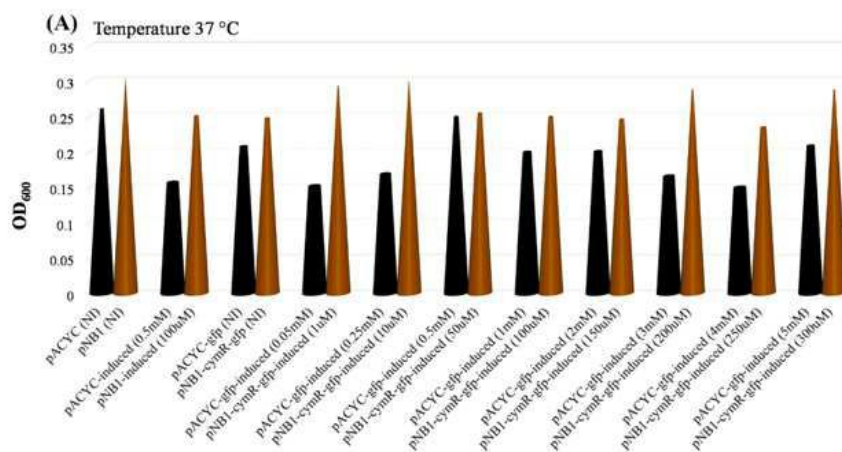
도면1b



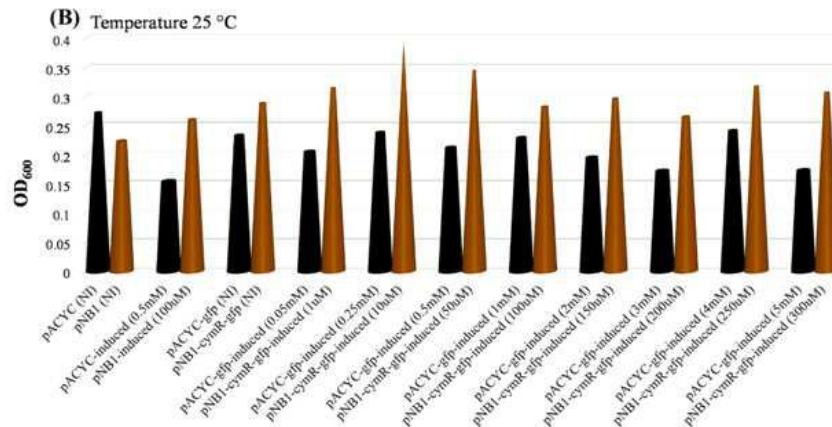
도면2



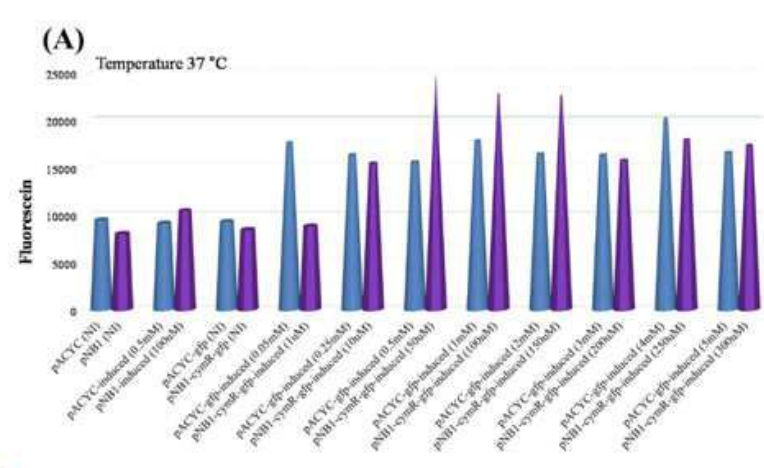
도면3a



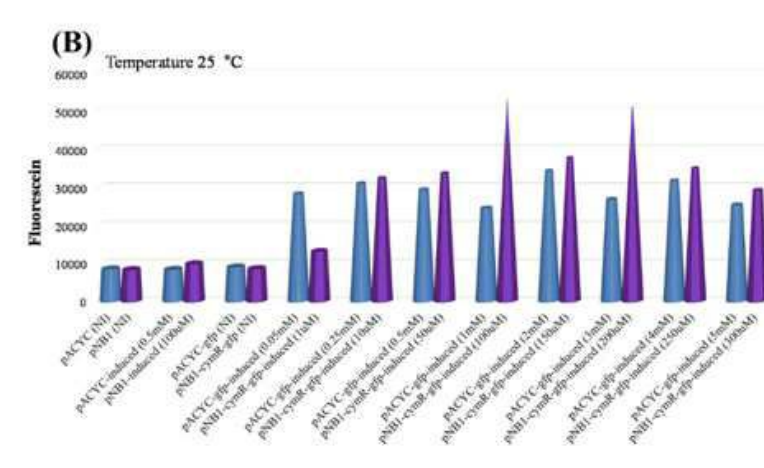
도면3b



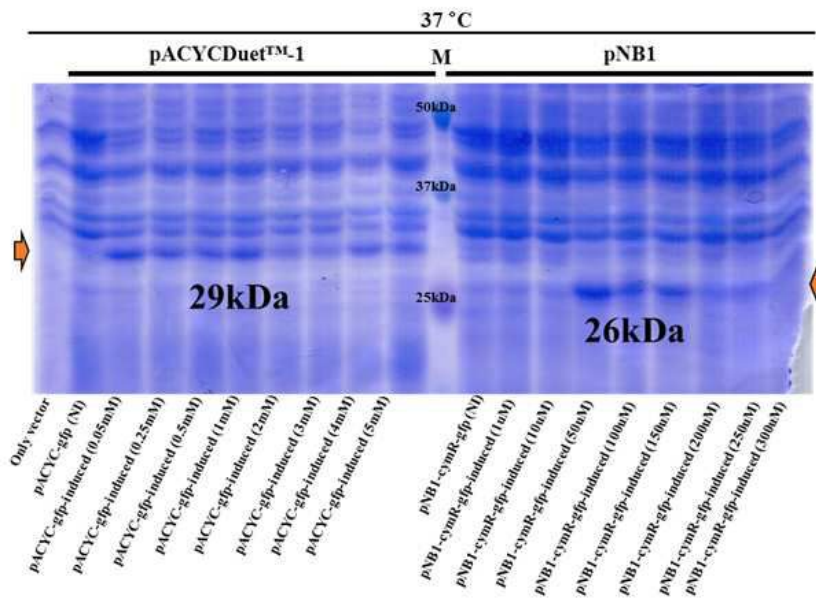
도면4a



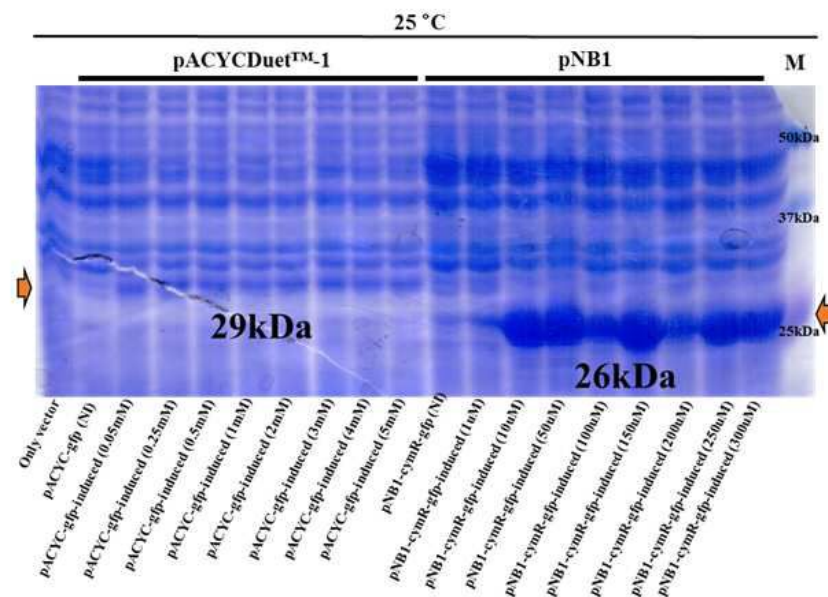
도면4b



도면5a



도면5b



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Cassette for gene expression regulated by Cumate Operon
- <130> KPA150619KR
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cassette for gene expression

<400> 1

tgcgcaggaa gagtgaggcg agtcagtcgc gtaatgctta ggcacaggat tgatttgcg	60
caatgattga cacgattccg cttgacgtg cgtaaggttt ttgtaatttt acaggcaacc	120
ttttattcac taacaaatag ctgggtggaat atgaaggaga tataggggccc gcatgcaata	180
atcgagccag gcatcaaata aaacgaaagg ctcagtcgaa agactgggcc ttctgtttta	240
tctgtttttg tcggtgaacg ctctctacta gagtcacact ggctcacctt cgggtgggcc	300
tttctgcgtt tatacgatcc cgcgaaaata atacgactca ctataggaac aaacagacaa	360
tctggtctgt ttgtattatg aaggagatat aactagtacg cgtagtactg gtaccaataa	420
ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgag atct	474