



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월19일

(11) 등록번호 10-1472956

(24) 등록일자 2014년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0072358

(22) 출원일자 2014년06월13일

심사청구일자 2014년06월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130094313 A

KR1020130011967 A

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김현

서울특별시 성북구 인촌로 73, 고려대학교 의과대학 해부학교실 511호 (안암동5가, 고려대병원)

정수영

서울특별시 성북구 장월로1길 28, 113동 903호 (상월곡동, 동아에코빌아파트)

이동민

미국, 플로리다 33458, 윈 막스 플랑크 웨이 슈피터, 막스 플랑크 플로리다 인스티튜트 포 뉴로사이언스, 권랩

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 10 항

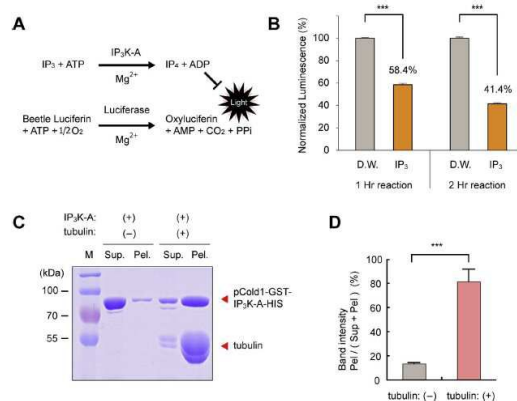
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 목적단백질 발현벡터 및 이를 이용한 목적단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 pCold-GST 벡터에서 N-말단 히스티딘 태그가 제거되어 있고, N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈이 도입되어 있으며, 제1 및 제2제한 효소로 절단된 부위에 목적단백질의 유전자가 삽입되어 목적단백질을 발현시킬 수 있는 벡터에 관한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014029065

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 연합기억 전사 조절 네트워크 규명 (2단계 1차년도)

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013035006

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 특정연구개발사업/차세대응용오믹스 사업

연구과제명 영장류 파킨슨병 모델 검증을 위한 표지자 발굴(1단계 2차년도)

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2014.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

pCold-GST 벡터에서 N-말단 히스티딘 태그가 제거되어 있고, N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈이 도입되어 있으며, 상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 목적단백질의 유전자가 삽입되어 있는 목적단백질 발현벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 N-말단의 히스티딘 태그는 서열번호 1과 2의 프라이머를 이용한 site directed 돌연변이를 통해 제거된 것임을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1 제한효소는 BamHI이고, 상기 제2 제한효소는 HindIII인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈의 도입은 서열번호 3과 4의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 도입된 것임을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 목적단백질은 IP₃ K-A인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 발현벡터가 도입되어 있는 목적단백질 발현능을 가지는 재조합미생물.

청구항 7

제6항에 있어서,

대장균인 것을 특징으로 하는 재조합미생물.

청구항 8

제6항의 재조합미생물을 배양하여 목적단백질을 발현시키는 단계; 및 상기 발현된 목적단백질을 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 목적단백질은 IP₃ K-A인 것을 특징으로 하는 목적단백질의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 회수 단계는 히스티딘 친화성 이온수지를 이용하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 제조방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 목적단백질 발현벡터 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 안정성이 낮아 수득이 어려웠던 IP₃K-A와 같은 단백질을 고수율로 안정적으로 수득할 수 있는 목적단백질 발현벡터 및 이를 이용한 목적단백질의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

대표적인 발현 시스템 중 하나인 대장균을 이용하여 재조합 단백질을 얻는 방법은 낮은 발현량 및 용해도에 의해 실패하는 경우가 많다는 단점이 있다. 발현된 단백질의 낮은 용해도를 해결하기 위한 방법으로 가용성 단백질 태그와 목적 단백질을 융합하는 방법을 사용한다. 글루타티온 S-전이 효소(GST), 말토오스 결합 단백질(MBP), 티오레독신(Trx), 단백질 G의 B1 도메인(GB1)이 가용성 단백질 태그로 많이 사용되고 있으며, 특히 GST 태그는 용해성 단백질 태그이면서 단백질 정제 및 풀다운 분석법등의 실험에 유용하게 사용될 수 있는 장점이 있다.

[0003]

단백질 태그의 역할과 더불어 저온에서의 단백질 생산도 많은 장점이 있다. 불안정한 단백질 단편 발현 및 정제를 목적으로 개발된 저온 충격 벡터인 pCold는 15℃의 낮은 온도에서 목적단백질을 발현시킴으로써 숙주인 대장균 내의 단백질 생산을 억제하고, 발현된 단백질의 수용성 및 안정성은 높일 수 있는 방법이다.

[0004]

Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A(IP₃K-A)는 신호 전달 과정에서 세포내 신호전달물질인 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)를 inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate(IP₄)로 인산화시킴으로써 IP₃수용체를 통한 ER로부터의 세포내 칼슘의 방출을 조절하며 액틴 및 미세소관 단백질과 결합하여 신경세포 미세구조를 유지하는데 중요한 역할을 하는 단백질이다. 구조적으로 IP₃K-A는 N-말단의 활성조절 도메인과 C-말단의 인산화 효소 도메인으로 구성되어 있다. 부분적으로 C-말단 효소 도메인은 몇몇 연구그룹에 의해 구조적인 연구가 진행되었지만, N-말단 부위의 불안정성 및 유연성 때문에 전체 단백질의 구조 및 기능적인 연구가 어려운 실정이다. 또한 최근 IP₃K-A 연구에서 인산화 효소로서의 기능과는 독립적으로 액틴 및 미세소관 단백질과의 결합을 통해 신경세포 골격의 재조직화에 관여한다는 사실이 밝혀지면서 N-말단을 포함하는 전체 단백질의 필요성은 더욱 증가하고 있다.

[0005] 따라서 여러 그룹에서 IP₃K-A 단백질을 획득하기 위해 GST, NusA 용해도 증진 태그 및 히스티딘 태그 등을 사용하였으나, 낮은 수율 및 효소 용해도와 대량의 절편화된 단백질 때문에 좋은 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여, 저온 충격 벡터인 pCold를 기반으로 IP₃K-A와 같이 대장균에서 수용성, 안정성 또는 수율이 낮은 단백질을 높은 수율로 발현시킬 수 있는 새로운 발현벡터를 구축하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 수용성, 안정성 또는 수율이 낮은 목적단백질을 고수율로 발현시킬 수 있는 목적단백질 발현 벡터를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입되어 있는 목적단백질 발현능을 가지는 재조합 미생물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합미생물을 배양하여 목적단백질을 발현시키고, 발현된 목적단백질을 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0010]

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 pCold-GST 벡터에서 N-말단 히스티딘 태그가 제거되어 있고, N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈이 도입되어 있으며, 상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 목적단백질의 유전자가 삽입되어 있는 목적단백질 발현 벡터를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 발현벡터가 도입되어 있는 목적단백질 발현능을 가지는 재조합 미생물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 재조합미생물을 배양하여 목적단백질을 발현시키는 단계 및 상기 발현된 목적단백질을 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 기존에 안정성, 수용성 또는 수율이 낮았던 목적단백질을 고수율로 발현시킬 수 있는 발현 벡터를 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명에 사용된 IP₃K-A 단백질 발현을 위해 사용된 벡터의 지도 및 구조를 나타낸 것이다(A: N-말단에 히스티딘 태그를 융합시킨 pProEX-HTA-HIS-IP₃K-A; B: N-말단에 말토오스 결합 단백질을 융합시킨 pMAL-P2-IP₃K-A; C: GST 태그가 융합된 pGEX-5x-1-IP₃K-A; D: N-말단에 GST와 C-말단 히스티딘 이중 태그를 융합한 저온 충격벡터; E: IP₃K-A 단백질의 액틴 및 칼모듈린, 미세소관 결합 부위).

도 2는 대장균에 도 1의 발현 벡터를 도입하여 생산한 IP₃K-A 목적 단백질의 발현도 및 용해도를 나타낸 결과이다(A: 도 1의 발현벡터의 도입에 의한 단백질 생산량 변화 및 용해도; B: 수용성 상층액에서 IP₃K-A 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 시행하여 재조합단백질 양을 비교한 그림(노란색 화살표: 단백질 발현량 비교, 빨

간색 화살표: 절편화된 단백질량의 비교) C: 발현된 단백질의 강도를 측정하여 그래프로 나타낸 결과}.

도 3은 pCold-GST-IP₃K-A-His 벡터에 의해 생산된 단백질에 대한 친화성 정제방법을 비교한 결과이다(A: GST 친화성 글루타티온 결합 수지를 이용한 정제를 통해 획득한 재조합 단백질; B: 칼모듈린 결합수지를 이용한 정제방법을 이용한 정제를 통해 획득한 재조합 단백질; C: 히스티딘 친화성 니켈 이온 수지를 이용한 정제방법을 통해 획득한 재조합 단백질; D: A, B, C에서 최종적으로 용출된 재조합 단백질; E: A에서 용출된 단백질의 band intensity를 수치화한 그래프로 색으로 표시된 부분이 목적 재조합 단백질; F: B에서 용출된 단백질의 band intensity를 수치화한 그래프로 색으로 표시된 부분이 목적 재조합 단백질; G: C에서 용출된 단백질의 band intensity를 수치화한 그래프로 색으로 표시된 부분이 목적 재조합 단백질; H: E, F, G의 결과 전체 용출 단백질 양에서 완전한 IP₃K-A 재조합 단백질이 차지하는 비율을 나타낸 도표).

도 4는 히스티딘 친화성 수지를 이용하여 정제된 IP₃K-A 단백질의 기능을 검증한 결과이다(A: 키나아제 기능 검사 원리; B: IP₃K-A 단백질이 IP₃를 IP₄로 인산화시켜 ADP가 증가하며, 이에 따라 인광 활성이 감소함으로써 키나아제 기능을 수행하고 있다는 것을 확인한 그래프; C: 미세소관 단백질과의 결합능력 검증하기 위해 IP₃K-A와 tubulin이 함께 침강한 것을 나타낸 결과; D: C의 결과를 수치화하여 나타낸 그래프).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에서는 pCold-GST 벡터에서 N-말단 히스티딘 태그를 제거하고, N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈을 도입한 다음, 상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 부위에 목적단백질의 유전자를 삽입한, 목적단백질 발현벡터를 제조하였다. 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 벡터를 숙주세포에 도입하여 목적단백질을 발현시켰으며 본 발명의 또 다른 실시예에서는 목적단백질을 웨스턴 블랏으로 확인하고, 용해도 및 발현량을 측정하여 성능이 우수한 재조합 단백질이 생성됨을 확인하였다.
- [0020] 따라서 본 발명은 일 관점에서, pCold-GST 벡터에서 N-말단 히스티딘 태그가 제거되어 있고, N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈이 도입되어 있으며, 상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 목적단백질의 유전자가 삽입되어 있는 목적단백질 발현벡터에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서는 pCold-GST 벡터에서 N-말단의 히스티딘 제거를 위해 서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머를 도입하여 돌연변이를 유발시켰다. 그 다음, 상기 벡터의 N-말단에 BamHI가 인지할 수 있는 제한효소 부위와 시스테인 프로테아제 절단부위(Tabaco etch virus 유래, TEV), C-말단의 HindIII 제한효소 부위, C-말단의 히스티딘 태그와 정지 코돈을 도입하기 위하여 서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 통해 상기 벡터에 도입하였다.
- [0023] 상기 BamHI 및 HindIII는 핵산 분해 효소인 제한효소 중 하나이다. 제한효소는 DNA의 특정 염기 배열을 식별하여 이것을 절단하는 효소로, 생물 세포에 침투하는 바이러스나 외래 유전자 DNA를 절단하여 제거하는 미생물의

자기방어 기구이다. 상기의 방법으로 완성된 벡터에 제한효소를 이용하여 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 도입하여 목적단백질 발현벡터를 구축한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 용어 "외래 단백질(heterologous protein)" 또는 "목적 단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.

[0025] 본 발명에 있어서, 용어 "재조합 단백질(recombinant protein)" 또는 "융합 단백질(fusion protien)"은 원래의 외래단백질의 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다. 본 발명의 융합발현파트너와 목적단백질이 연결된 재조합 융합 단백질 형태 또는 단백질 절단효소에 의해 융합발현파트너가 재조합 융합 단백질로부터 제거된 목적단백질의 재조합 단백질을 의미한다.

[0026] 본 발명의 방법은 재조합 발현 수준을 높이고자 하는 어떤 목적단백질이라도 사용할 수 있다. 목적단백질은 연구 목적 또는 상업적 목적, 예컨대 치료적 또는 산업적 목적으로 생산하고자 하는 단백질일 수 있다. 목적단백질은 어떤 식물, 동물 또는 미생물로부터라도 유래할 수 있으며, 자연적으로 생산 또는 어떤 방식으로든 변형될 것일 수 있고, 핵산에 의해 코딩될 수 있을 정도의 길이를 가진다. 구체적인 양태로서, 목적단백질은 사이토카인, 혈청 단백질, 콜로니 자극 인자, 성장 인자, 호르몬 또는 효소를 포함한다. 예컨대, 목적단백질은 인터류킨, 응고 인자, 인터페론- α , - β 또는 - γ , 과립구 대식세포 집락 자극인자(GM-CSF), 과립구 집락 자극 인자(G-CSF), 조직 성장 인자, 상피세포 성장 인자(EGF), TGF α , TGF β , 혈소판유래 성장 인자, 섬유아세포성장 인자(FGF), 여포자극호르몬(FSH), 갑상선자극호르몬, 항이노호르몬, 색소 호르몬, 부갑상선 호르몬, 황체형성호르몬방출호르몬, 탄수화물 특이적 효소, 단백질분해효소, 리파아제, 산화환원효소, 트랜스퍼레이즈, 가수분해효소, 탈리효소(Lyases), 이성화효소(Isomerases), 리가아제, 면역글로불린, 사이토카인 수용체, 락토페린, 포스포리파아제 A2-활성화 단백질, 인슐린, 종양괴사인자, 칼시토닌, 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드(CGRP), 엔케팔린, 소마토메딘, 에리스로포이에틴, 시상하부방출인자, 프로락틴, 융모막 성 생식선 자극호르몬, 조직 플라즈미노겐 활성화물질, 성장호르몬 분비 펩티드, 흥선 체액성 인자, 항암 펩타이드, 또는 항생 펩타이드에서 선택될 수 있다. 구체적인 예로서, 인간 인터류킨-2, 인간 인터류킨-1 β , 인간 인터류킨-6, 인간 인터류킨-32 α , -32 β 또는 -32 γ , 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 사람 혈청 알부민, 인간 인터페론- α , - β , - γ , 인간 과립구 집락 자극인자, 과립구 대식세포 집락 자극인자, 인간 성장 호르몬, 인간 혈소판유래 성장인자, 인간 섬유아세포 성장인자, 인간 상피세포 성장 인자, 인간 인슐린 유사 성장 인자, 인간 신경 성장 인자, 인간 변형성 성장 인자 β -1, 인간 여포자극호르몬, 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase), 글루코데이즈(glucodase), 갈락토시데이즈(galactosidase), 글루코세레브로시데이즈(glucocerebrosidase), 글루크로니데이즈(glucuronidase), 아스파라기나아제(asparaginase), 아르기나아제(arginase), 아르기닌 디아미나아제(arginine deaminase), 퍼옥시드 디스무타제(peroxide dismutase), 엔도톡시나아제(endotoxinase), 카탈라아제(catalase), 키모트립신(chymotrypsin), 우리카제(uricase), 아데노신 디포스파타제(adenosine diphosphatase), 티로시나아제(tyrosinase), 빌리루빈 옥시다아제(bilirubin oxidase), 소 GALT (bovine galactose-1-phosphate uridylyltransferase), 해파리 녹색형광단백질, 캔디다 안타크티카 리파아제 B(Candida antarctica lipase B), 캔디다 루고사 리파아제(Candida rugosa lipase), 곰팡이 클로로퍼옥시다제(fungal chloroperoxidase), 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase), 레솔바제(resolvase), 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase), 베타-글루코시다아제(β -glucosidase), 트레할로스 합성효소(trehalose synthase), 사이클로 텍스트린 글리코실 트랜스페라아제(cyclodextrin glycosyl transferase), 자일라네이즈(xylanase), 피타제(phytase), 인간 락토페린, 인간 에리스로포이에틴, 인간 파라옥소나제, 인간 분화성장인자 15(hGDF 15), 인간갈렉틴-3 결합 단백질, 인간 세린 프로테아제 저해제, 쿠니츠 타입 2, 인간 야누스 키나제 2, 인간 FMS-유사티로신 키나아제 3 리간드, 인간 YMI & 2, 인간 CEMI, 인간 DGAT(diacylglycerol acyltransferase), 인간 랩틴, 인간 mL259, 인간 프로테이나아제 3, 인간 리소자임, 인간 DEAD 박스 프로틴 41, 인간 에토포시드 도입 단백질 24, 마우스 캐스페이즈 1, 소 안지오게닌, 및 지렁이 롬브로키나제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 구체적인 일례로서, 목적단백질은 종래의 재조합 생산 방법으로는 생산이 불가능하거나 생산물이 매우 낮은 단백질이다. 또 다른 일례로서, 목적 단백질은 알려진 발현 시스템을 사용하면 용이하게 생산되기는 하나 그 발현율을 높이고자 하는 단백질이다.

[0028] 목적단백질을 코딩하는 핵산은 당업계에 널리 알려진 일반적인 공급원, 예컨대 게놈성 DNA 또는 cDNA 라이브러리, PCR 증폭, 또는 화학적 합성법으로 얻을 수 있다.

[0029] 그런데 본 발명의 바람직한 실시예에서 발현된 목적단백질은 IP₃K-A이므로, 본 발명에 있어서 상기 목적단백질은

IP₃K-A인 것을 특징으로 하는 발현벡터일 수 있다.

- [0030] 본 발명의 또 다른 실시예에서 pCold-GST 벡터의 N-말단에 히스티딘 태그가 제거되어 있고, N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈이 도입되어 있으며, 상기 제1 및 제2 제한효소로 절단된 목적단백질의 유전자가 삽입되어 있는 목적단백질 발현벡터에 42℃, 50초간 열충격을 가하여 상기 벡터를 숙주세포에 도입하였다.
- [0031] 따라서 본 발명은 다른 관점에서 상기 발현벡터가 도입되어 있는 목적단백질 발현능을 가지는 재조합미생물에 관한 것이다.
- [0032] 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 목적단백질이 발현될 수 있는바 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 E. coli DH5α, E. coli JM101, E. coli TOP10, E. coli K12, E. coli W3110, E. coli X1776, E. coli XL1-Blue(Stratagene), E. coli B, E. coli BL21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 E. coli 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 E. coli에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium) 또는 세라티아 마르게센스(Serratia marcescens)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(Pseudomonas) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서 사용된 숙주세포는 대장균이다. 대장균(Escherichia coli)은 지금까지 생리학, 생화학, 유전학 연구가 가장 많이 이루어져 있는 세균으로서, 특히 재조합 단백질이나 유용한 대사물질을 생산하는 데 많이 쓰이는 유용한 균주이다. 대장균을 이용하여 재조합 단백질을 생산하면 생산 효율이 높고, 시간과 비용을 단축할 수 있는 등 여러 가지 장점을 가지고 있어, 생물공학의 발전에 중요한 위치를 차지하고 있다. 특히, 왓슨과 크릭에 의해 DNA 이중 나선 구조가 밝혀진 이후, 미생물의 DNA 조작 기술을 여러 유용물질의 생산에 사용하고 있다. 이 DNA 조작 기술은 미생물의 폭넓은 산업적 이용을 가능하게 하였고, 이에 따라 여러 유용물질을 보다 효율적으로 생산하기 위한 기술도 함께 발전하여 왔으며, 단순한 단백질 생산에서 시작된 생물공학 기술은 현재 매우 다양한 분야에서 유용하게 응용하고 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 유전자는 숙주세포 내에서 플라스미드 내에 독립적으로 또는 숙주의 염색체에 삽입되어 존재할 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0035] 본 발명의 다른 실시예에서는 구축된 pCold-GST-IP₃ K-A-His 발현벡터를 숙주세포에 도입한 다음, OD600 측정값이 0.6이 될 때까지 배양하여 목적단백질이 발현되는 것을 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다(도 2A).
- [0036] 따라서 본 발명은 또 다른 관점에서, 목적단백질 발현벡터가 도입되어 있는 재조합미생물을 배양하여 목적단백질을 발현시키는 단계 및 상기 발현된 목적단백질을 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 목적단백질인 IP₃K-A의 기능을 검증해보았다. IP₃K-A는 신호 전달 과정에서 세포내 신호전달물질인 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)를 inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate(IP₄)로 인산화시킴으로써 IP₃수용체를 통한 ER로부터의 세포내 칼슘의 방출을 조절하며 액틴 및 미세소관 단백질과 결합하여 신경세포 미세구조를 유지하는데 중요한 역할을 하는 단백질이므로 이러한 기능을 제대로 수행하는지 여부를 키나아제 기능 검사를 통해 확인해보았다(도 4A).
- [0038] 그 결과, IP₃K-A 단백질이 IP₃를 IP₄로 인산화시켜 ADP를 증가시키며, 이에 따라 인광 활성이 감소함으로써 키나아제 기능을 수행하고 있음을 확인할 수 있었다.
- [0039] IP₃K-A 단백질은 상기 인산화 효소로서의 기능과는 독립적으로 액틴 및 미세소관 단백질과의 결합을 통해 신경세포 골격의 재조직화에 관여하므로 상기 기능의 수행여부를 Microtubule binding protein binding assay kit (Cytoskeleton)를 사용하여 수행한 결과, IP₃K-A 재조합 단백질과 tublin이 함께 침강한 것을 확인함으로써 미세소관 단백질의 결합능력을 확인할 수 있었다(도 4C, 4D).
- [0040] 따라서 본 발명의 목적단백질은 IP₃ K-A인 것을 특징으로 하는 목적단백질의 제조방법일 수 있다.
- [0041] 한편, 상기 과정을 통해 발현된 IP₃ K-A 단백질은 발현량이 높은 것을 확인할 수 있었으나 이와 더불어 절편화된 단백질이 증가했음을 확인할 수 있었다(도 2B).

- [0042] 따라서 상기 문제점을 해결하기 위하여 본 발명의 바람직한 실시예에서는 히스티딘 친화성 니켈 이온 수지를 이용하여 상기 발현된 목적단백질인 IP₃ K-A를 정제하였다.
- [0043] 그 결과, GST 태그에 친화력을 가진 글루타티온 결합 수지, IP₃K-A 단백질의 칼모둘린에 대한 친화성을 이용한 칼모둘린 결합 수지를 사용하였을 때보다, 히스티딘 태그에 친화력을 가진 니켈 이온 수지를 이용하여 정제한 경우가 절편화된 단백질이 배제되어 가장 순도 높은 분획을 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0044] 따라서 본 발명에 있어서, 목적단백질의 회수 단계는 히스티딘 친화성 이온수지를 이용하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 제조방법을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머를 이용하여 site directed 돌연변이를 일으켜 N-말단의 히스티딘 태그를 제거하였고, 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머를 이용하여 N-말단에 BamHI 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 HindIII 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈을 PCR 반응을 통해 도입하여, 본 발명의 목적단백질 발현백터를 완성하였다.
- [0046] 따라서 본 발명은 또 다른 관점에서, pCold-GST 벡터의 N-말단에 히스티딘 태그를 제거하기 위한 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머 및 상기벡터의 N-말단에 제1 제한효소부위, 시스테인 프로테아제 절단부위, C-말단에 제2 제한효소부위, 히스티딘 태그 및 정지코돈을 도입하기 위한 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 중합효소연쇄반응(PCR)에서 이용되는 타겟 핵산에 인접해 있는 5'말단 서열 및 3'말단 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. "전방향(forward) 프라이머" 및 "역방향(reverse) 프라이머"는 중합효소연쇄반응에 의해 증폭되는 유전자의 일정 부위의 3'말단 및 5'말단에 각각 결합하는 프라이머를 의미한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 프라이머로써 이용된 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있으며, 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수도 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 프라이머는 표적 서열에 혼성화되고, 표적 서열을 증폭할 수 있다. 본 발명에 따른 명세서에 있어서, 상기 "혼성화"는 DNA 주형과 비공유적으로 결합하는 것을 의미하며, 보다 상세하게는 프라이머가 DNA 증폭반응에서 본래의 기능을 할 수 있을 정도로 DNA 주형과 비공유적으로 결합되어 있는 상태를 의미하는 것이다. 즉, DNA 주형에 대하여 완전하게 왓슨/크릭 염기쌍을 이루는 것뿐만 아니라, 부분적으로 왓슨/크릭 염기쌍을 이루지 못한 부분이 있다 하더라도, 프라이머로 기능을 할 수 있을 정도로 DNA 주형에 대해 결합한 것을 의미한다.
- [0050] 프라이머를 이용해 표적 핵산을 증폭하는 방법에는 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 가능하다.
- [0051] 상기 중합효소연쇄반응(PCR)은 표적 핵산을 선별적으로 증폭하는 방법으로서 이에 대한 내용은 Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. et al. (EP 329,822)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로써 삽입된다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 중합효소연쇄반응(PCR)에는 DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소, dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), PCR 완충액(buffer) 및 DNA 중합효소 조인자를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 예를 들어, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 32P 또는 35S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.
- [0054] 중합효소연쇄반응은 변성(denaturation) 단계, 어닐링(annealing) 단계 및 신장(elongation) 단계를 포함하는

사이클이 수회 반복되어 행해진다. 본 발명에 따른 명세서에서, "사이클"은 표적 핵산의 1카피(copy)를 생성하는 과정을 의미한다. 상기 변성, 어닐링 및 신장 단계에서의 온도 및 시간 조건은 당업자가 적합한 조건을 선택할 수 있으며 특정의 범위로 한정되지 않는다.

[0055] 중합효소연쇄반응은 정성적인 방법과 정량적인 검출방법으로 나눌 수 있고, 정성적인 PCR법은 구체적으로 screening, 유전자 특이적(gene-specific), 구조 특이적(construct-specific) 및 계통 특이적(event-specific) PCR 검출법으로 구분된다. 또한, 정량적인 PCR법 중 대표적인 것은 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)법이다. 실시간 중합효소연쇄반응은 표적 서열 특이적 프라이머와 형광물질이 연결된 프로브를 이용하여 중합연쇄반응시 프로브로부터 형광체가 해리되어 형광발색의 양을 측정하여 표적 핵산의 양을 정량화하는 원리이다.

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0057] 하기 실시예에서는 수용성, 안정성 또는 수율이 낮은 단백질로 IP₃K-A만을 예시하였으나, 본 발명에 따른 발현 벡터에서 IP₃K-A 유전자 대신에 다른 단백질의 유전자를 도입하여 그 발현효율을 높일 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[0058] 실시예 1: 플라스미드의 제작

[0059] pCold-GST(Takara Bio) 벡터에서 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머를 이용하여 결실 돌연변이를 유도하여 N-말단의 히스티딘 태그가 제거된 벡터를 제조하였다.

[0060] [표 1]

서열번호	목적 부위	염기서열
1	N-말단 히스티딘	ACC ATG AAT CAC AAA GTG CAT ATG GAG CTC ATG TCC
2	N-말단 히스티딘	GGA CAT GAG CTC CAT ATG CAC TTT GTG ATT CAT GGT

[0061]

[0062] N-말단의 BamHI 제한효소 부위, 시스테인 프로테아제 절단 부위(Tabaco etch virus 유래, TEV), C-말단의 HindIII 제한효소 부위, C-말단의 히스티딘 태그와 정지 코돈은 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 통해 상기 벡터에 도입하였다.

[0063] 상기 과정을 통하여 N-말단에 히스티딘 태그가 제거되고 C-말단에 히스티딘 태그가 도입된 목적단백질 발현벡터가 제작되었다.

[0064] [표 2]

서열번호	유전자	염기서열
3	IP ₃ K-A	GAG GGA TCC GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC ATG ACC CTG CCC GGA CAC CCG ACG GGC
4	IP ₃ K-A	GAC AAG CTT TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCT CTC AGC CAG GTT GGC CAA GAT GCC

[0065]

[0066] IP₃K-A 단백질을 코딩하는 유전자를 PCR을 통해 증폭한 뒤, BamHI 과 HindIII를 이용한 제한 효소반응을 거쳐 상기 발현벡터에 도입함으로써 pCold-GST-IP₃K-A-His 발현벡터가 구축되었다. 상기 발현벡터의 지도는 도 1D에 나타나 있다.

[0067]

[0068] 실시예 2: 목적단백질인 IP₃ K-A의 발현

- [0069] 대장균의 BL21(DE3) 균주에 42℃에서 50초간의 열충격을 가하여 실시예 1에서 제조된 pCold-GST-IP₃K-A-His 발현백터를 도입한 다음, 암피실린이 함유된 배지에서 1일간 배양하였다. 상기 배지에서 단일 콜로니를 선택한 후, 암피실린이 함유된 5ml LB액체 배지에 접종하였다. 성장이 완료된 대장균을 포함한 액체 배지 1ml를 다시 LB 액체 배지 200ml에 접종하여 OD₆₀₀ 측정값이 0.6이 될 때까지 배양하였다.
- [0070] 그 후, 상기 배양액을 15℃의 온도로 사전 냉각된 인큐베이터로 옮겨 10분동안 배양한 다음, 이소프로필 b-D-1-티오갈락토피라노사이드(isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 1.0mM을 첨가하여 16~24시간 배양하여 목적단백질인 IP₃K-A를 발현시켰다.
- [0071] 실시예 3: 발현된 목적단백질인 IP₃K-A를 웨스턴 블랏으로 확인
- [0072] 전기영동을 통해 실시예 2에서 수득된 IP₃K-A 단백질을 분리한 다음, 니트로셀룰로스 막에 옮겨서 비특이적 결합을 방지하기 위해 막을 5% 탈지 분유를 포함한 완충용액(50mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20, TBST)에 1시간 동안 담가 두었다. 그 다음, 니트로셀룰로스 막을 1차 항체를 포함한 TBST로 1시간동안 처리하고 3번 세척하였다. 세척된 막을 horseradish peroxidase(HRP)가 융합된 2차 항체와 30분동안 반응시키고, 3번 세척 후 ECL 시스템을 이용하여 막을 필름에 인화하였다. 1차 항체로는 실험실에서 제작된 생쥐 유래 IP₃K-A항체(II4E, VI5G)와 히스티딘에 대한 항체가 사용되었다.
- [0073] 실시예 2에서 제조된 IP₃K-A 단백질을 실시예 3의 방법에 의해 확인한 결과, 히스티딘 및 말토오스, GST 단일 태그가 융합된 벡터에 IP₃K-A 단백질을 발현시킨 경우보다, 실시예 1 및 2의 방법으로 제조된 본 발명의 발현백터에서 발현된 IP₃K-A 단백질이 용해도 및 발현량이 가장 높음을 확인할 수 있었다(도 2A). 또한 실시예 3에서 확인된 단백질 band의 강도를 측정한 결과, 히스티딘 및 말토오스, GST 단일 태그가 융합된 벡터에 IP₃K-A 단백질을 발현시킨 경우보다 본 발명의 IP₃K-A 단백질의 band 강도가 2~35배 높음을 확인할 수 있었다(도 2C).
- [0074] 그러나 본 발명의 pCold-GST-IP₃K-A-His 발현백터를 사용한 경우, 목적단백질인 IP₃K-A의 발현량이 가장 높지만(도 2B) 이와 더불어, 절편화된 단백질도 증가했음을 확인할 수 있었다(도 2B).
- [0075] 실시예 4: 히스티딘 친화성 니켈 이온 수지를 이용한 단백질 정제
- [0076] 절편화된 단백질이 증가되는 문제를 해결하기 위하여, 실시예 2에서 사용된 200ml의 LB 액체 배지의 배양액으로부터 얻은 대장균에 히스티딘 정제를 위한 완충용액(0.5M NaCl, 20mM imidazole, 20 mM Tris.HCl pH7.9) 20ml와 프로테아제 억제제를 첨가한 후, 초음파 세포 분쇄기에서 35% 진폭, 10초-10초 pulse on-off로 2분간 분쇄하였다. 분쇄된 용해물을 16,100g에서 원심분리하여 수용성 상층액을 분리하였다. 니켈이온 한천수지 2ml를 컬럼에 채운 다음, 완충용액으로 두 번 세척하고, 수용성 상층액을 2ml/min의 속도로 통과시켜 주는 과정을 3번 반복해서 진행하였다. 컬럼을 다시 세척용액(0.5M NaCl, 140 mM imidazole, 및 20mM Tris.HCl, pH 7.9)을 이용하여 OD₂₈₀ 값이 0이 될 때까지 세척하여, 비특이적인 결합 단백질이 컬럼 내에 남지 않도록 하였다. 마지막으로, 용출 완충액(0.5M NaCl, 250 mM imidazole, and 20mM Tris.HCl, pH 7.9) 5ml를 컬럼에 채운 다음 1ml 분획으로 수집하여 정제된 IP₃K-A 단백질을 수득하였다.
- [0077] 그 결과, GST 태그에 친화력을 가진 글루타티온 결합 수지, IP₃K-A 단백질의 칼모듈린에 대한 친화성을 이용한 칼모듈린 결합 수지를 사용하였을 때보다, 히스티딘 태그에 친화력을 가진 니켈 이온 수지를 이용하여 정제한 경우가 절편화된 단백질이 배제되어 가장 순도 높은 분획을 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0078] 실시예 5: 정제된 IP₃K-A 단백질의 기능 검증
- [0079] 실시예 4의 과정을 거쳐 정제된 IP₃K-A 단백질의 인산화 기능을 평가하기 위하여 Kinase-Glo luminescent kinase assay kit(Promega)를 사용하였다. 정제된 IP₃K-A 단백질 5 µg을 100 µl의 완충용액(50mM Tris-HCl pH

7.4, 20mM MgSO₄)에 넣고 100 μM의 IP₃와 10 μM의 ATP를 첨가한 다음, 37℃에서 1-2시간동안 반응시켰다. 반응시킨 액 중 50 μl를 50 μl의 kinase-Glo reagent와 섞어서 37℃에서 10분간 추가 반응시킨 다음, 인광측정기를 통하여 시료내의 인광을 측정하였다.

[0080] 그 결과, 본 발명의 IP₃K-A 단백질이 IP₃를 IP₄로 인산화시켜 ADP가 증가하고, 인광 활성을 감소시킴으로써 키나아제 기능을 수행하고 있음을 확인하였다(도 4B).

[0081] 또한 실시예 4의 과정을 거쳐 정제된 IP₃K-A 단백질의 미세소관 단백질 결합력을 측정하기 위해서 Microtubule binding protein binding assay kit(Cytoskeleton)를 사용하였다. 히스티딘 태그를 이용해 정제된 IP₃K-A 단백질을 효소 및 정제 단백질이 포함된 완충용액(80mM PIPES buffer, pH7.0, 2mM MgCl₂, 0.5mM EGTA)과 섞은 다음, 1mM GTP와 20mM taxol을 첨가하여 30분 동안 상온에서 미세소관 중합반응을 시켰다. 그 다음, 미세소관 쿠션 완충용액 100 μl에 반응 혼합물을 넣고 100,000g로 상온에서 40분 동안 원심분리를 하여 펠렛을 획득하고 이를 전기영동하였다.

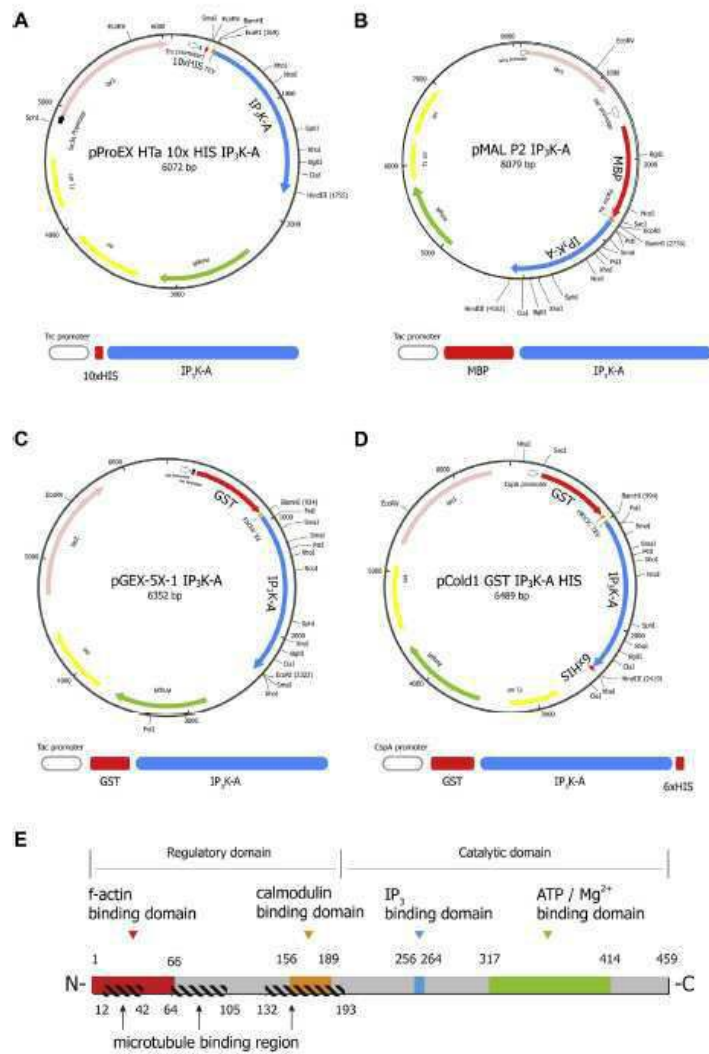
[0082] 그 결과, IP₃K-A 단백질과 tubulin이 함께 침강한 것을 확인함으로써 미세소관 단백질의 결합능력을 확인할 수 있었다(도 4C, 4D).

[0083] 실시예 5의 실험결과를 종합적으로 고려하면, 본 발명의 제조과정을 거쳐 제조된 IP₃K-A 단백질은 단백질 본연의 생리적인 활성을 완전하게 보유하여 우수한 성능을 지닌다는 것을 확인할 수 있었다.

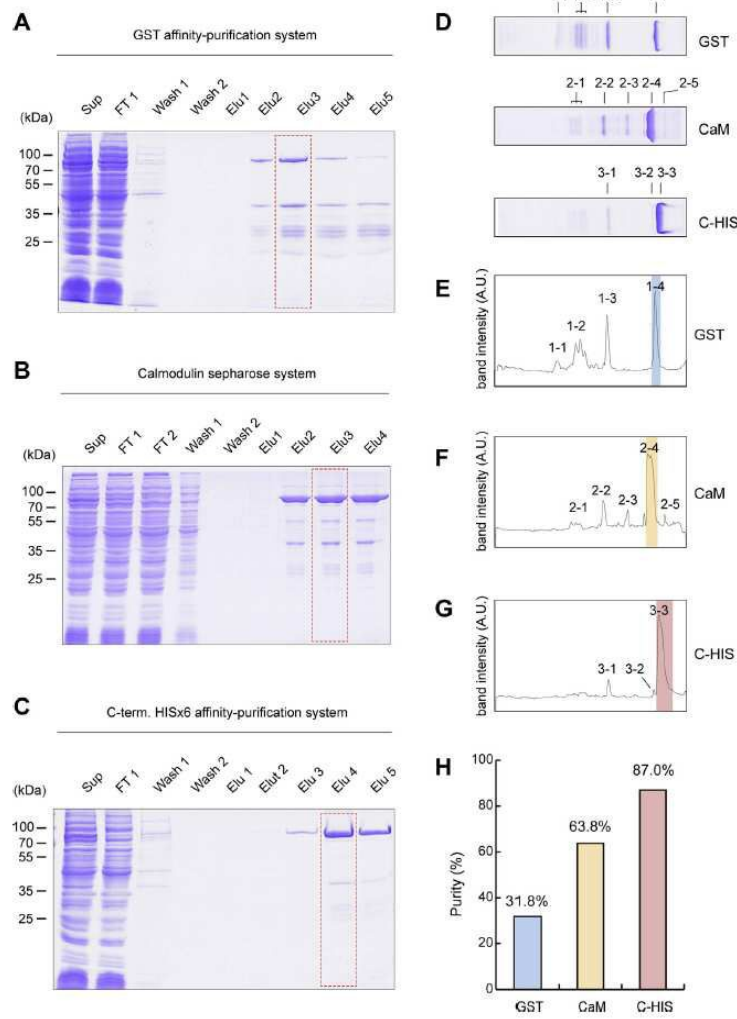
[0084] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

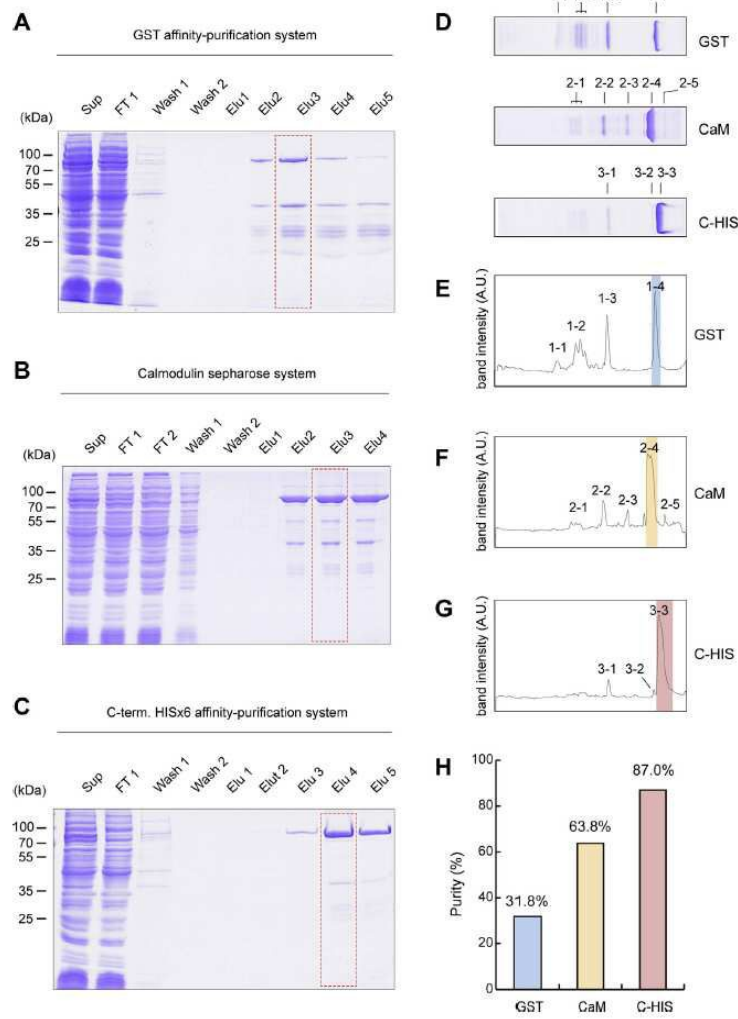
도면1



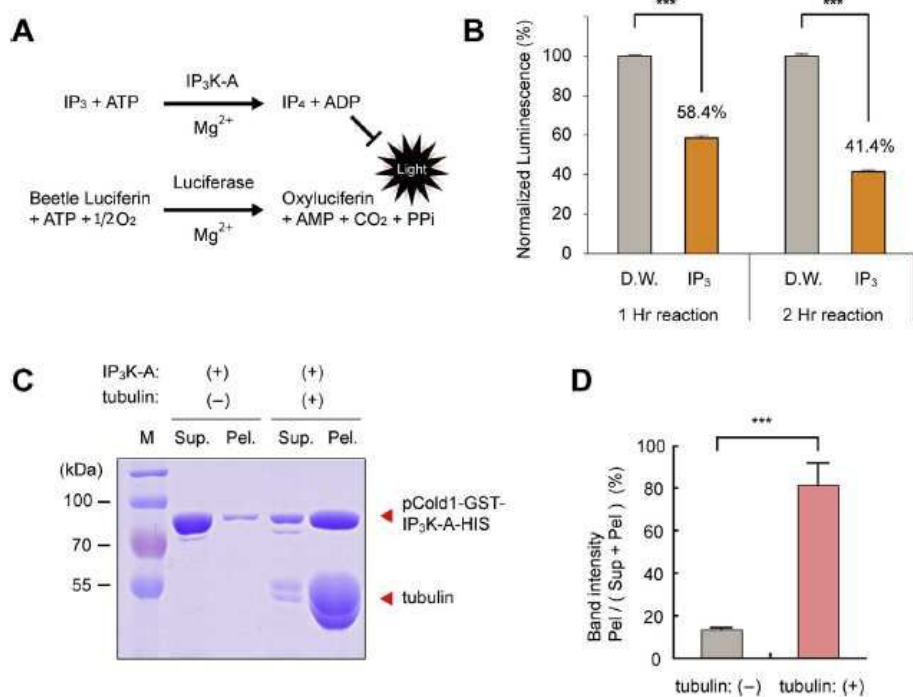
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Korea University Research And Business Foundation

<120> Expression vector for producing a target protein and a method for preparing the target protein using the same

<130> P14-B177

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal Histidine

<400> 1

accatgaatc acaaagtgc a tatggagctc atgtcc

36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

ggacatgagc tccatatgca ctttgtgatt catggt

36

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

gagggatccg aaaacctgta ttttcagggc atgacctgc ccggacaccc gacgggc

57

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

gacaagcttt caatgatgat gatgatgatg tctctcagcc aggttgcca agatgcc

57