

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 9/02	(45) 공고일자 2000년01월15일
	(11) 등록번호 10-0236483
	(24) 등록일자 1999년10월01일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-1992-0702610 1992년10월22일
(30) 우선권주장	7/659,975 1991년02월22일 미국(US) 7/767,251 1991년09월27일 미국(US) 7/796,256 1991년11월20일 미국(US)
(73) 특허권자	칼진 인코포레이티드 엘리카베스 라슨 미국 95616 캘리포니아 데이비스 피프쓰 스트리트 1920칼진 인코포레이티드 로이드 쿠니모토 미국 95616 캘리포니아 데이비스 피프쓰 스트리트 1920
(72) 발명자	제임스 조오지메츠 미합중국 95695 캘리포니아 우드랜드 엘우드 스트리트 1326 마이클 로만 플라드 미합중국 53716 위스콘신 매디슨 부키 로우드 5649 이.
(74) 대리인	남상선

심사관 : 이처영

(54) 종자 식물의 지방 아실 환원 효소 단백질 및 유전자

요약

본 발명에 따르면, 부분적으로 정제되고, 지방 아실 기질이 형성되는 중에 활성을 가지는 종자식물 지방 아실 환원효소 단백질이 제공된다. 특별한 관심의 대상은 분자량이 약 54 및 52KD 인 호호바 배의 환원 효소 단백질이다. 또한, 이러한 지방 아실 환원효소로부터 얻을 수 있는 아미노산 및 핵산의 서열도 또한 고려의 대상이 된다.

대표도

AAATCTCTCA CTAATCACT CAGCTCTCT CTCTCTCTA AAGATTTTA 60
TFA GGT GCA AAT TTC TAT TCC TTT TTA TCA GAA AAA GTG ACF GTA GTA 352
Leu Gly Ala Asn Phe Tyr Ser Phe Val Ser Glu Lys Val Thr Val Val
80 85 90
GTAGCAACT TAAGAGAA ATG GAG GAA ATG GCA AOC ATT TTA GAG TTT CTT 112
Met Glu Glu Met Gly Ser Ile Leu Glu Phe Leu
5 10
GAT AAG AAA GGC ATT TTG GTC ACT GGT GCT ACT GGC TCC TTA GCA AAA 140
Asp Asn Lys Ala Ile Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Ser Leu Ala Lys
15 20 25
ATT TTT CTG GAG AAG GTA CTG AGG AGT GAA CCG AAT CTG AAG AAA CTC 208
Ile Phe Val Val Lys Val Leu Arg Ser Val Thr Asn Val Lys Lys Leu
30 35 40
TAT CTT CTT TTG ACA GCA AOC GAT GAC GAG ACA GCT GCT CTA GCG TTG 256
Tyr Leu Leu Leu Arg Ala Thr Asp Asp Glu Thr Ala Ala Leu Arg Leu
45 50 55 60
CAA AAT GAG GTT TTT GCA AAA GAG TTG TTA AAT GTT CTG AAA GAA AAT 304
Gln Asn Glu Val Phe Gly Lys Glu Leu Phe Lys Val Leu Lys Gln Asn
65 70 75
AAG ATA TTT GGT CAT GTA TCF ACT GCT TAT TAT TCF GGA GAG AAA AAT 592
Lys Ile Phe Val His Val Ser Thr Ala Tyr Val Ser Gly Glu Lys Asn
160 165 170
GGG TTA ATA CTG GAG AAG CTT TAT TAT ATG GGC GAG TCA CTT AAT GGA 640
Gly Leu Ile Leu Leu Lys Pro Tyr Tyr Met Gly Glu Ser Leu Asn Gly
175 180 185
AGA TTA GGT CTG GAC AAT AAT GTA GAG AAG AAA CTT GTG GAG GCA AAA 688
Arg Leu Gly Leu Asp Ile Asn Val Ile Lys Lys Leu Val Glu Ala Lys
190 195 200
ATC AAT GAA CTT CAA GCG GCG GCG ACG GAA AAG TCC ATT AAA TCG 736
Ile Asn Glu Leu Glu Ala Glu Gly Ala Thr Glu Lys Ser Ile Lys Ser
205 210 215 220
ACA ATG AAG GAG ATG AGC ATC GAG AAG GCA ACG CAC TCG GGA TGG GCA 784
Thr Met Lys Asp Met Gly Ile Glu Arg Ala Arg His Thr Gly Thr Pro
225 230 235
GTG AAT GCA ACG ATA GTA GGC ATG GCG GCG CAC GCA AAC CAA AAG TAC 1072
Val Asn Ala Thr Ile Val Ala Met Val Ala His Ala Asn Glu Arg Tyr
239 240 245
GTA GAG CCG GTG CAA TAC CAT GTG GGA TCT TCA GCG GCG AAT CCA ATG 1120
Val Glu Lys Val Thr Tyr His Val Gly Ser Ser Ala Ala Asn Pro Met
335 340 345
AAA CTG AAT GCA TTA CCA GAG ATG GCA CAC GAT TAC TTC ACG AAG AAT 1168
Lys Leu Ser Ala Leu Pro Gly Met Ala His Arg Tyr Phe Thr Lys Asn
350 355 360
GCA TGG ATC AAC CCG GAT CCG AAC CCA GTA CAT GTG GGT GCG GCT ATG 1216
Pro Trp Ile Asn Pro Asp Arg Asn Pro Val His Val Gly Arg Ala His
365 370 375 380
GTC TTC TCC TCC TCC ACG TTC CAC CTT TAT CAC ACC CTT AAT TTC 1264
Val Phe Ser Ser Phe Ser Thr Phe His Leu Tyr Leu Thr Leu Asn Phe
385 390 395
GAA GAT TAC TTC TGG AAA ACT CAT TTC CCA GGN GTC GTA GAG CAC GTT 1552
Glu Asp Tyr Thr Leu Lys Thr His Phe Pro Gly Val Val Glu His Val
480 485
CTT AAC TAAGATTAC GGTACAGAAA TGAAGAGTT GGAATCATG CACGAGAGG 1608
Leu Asn
NCACATATAA AGAATGCTT AAAGTCATG TCAGAAAGA AATATAATC AGTAGGTTT 1648
GCTCTGATC TTGATCTT TGTATCTTA CTGTACTTC TGAATCTTT CTCTTTTAT 1728
GAATTCCTC TCTTTTCTT GTGAGAAAA AAAAAAAA GACCTCTCC AGAGCTT 1786

명세서

[발명의 명칭]

종자 식물의 지방 아실 환원 효소 단백질 및 유전자

[발명의 상세한 설명]

본원은 1991년 2월 22일자 출원된 USSN 제07/659,975호의 일부-계속 출원인 1991년 9월 27일자 출원된 USSN 제07/767,251호의 일부-계속출원이고 1991년 11월 20일자 출원된 USSN 제07/796,256호의 일부-계속 출원이다.

[기술 분야]

본 발명은 식물 효소, 그 효소의 정제 및 수득 방법, 그 효소와 관련된 아미노산 및 핵산 서열, 그리고 그러한 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

[서론]

[배경]

지방산은 약 4개 내지 24개의 탄소 원자로 이루어진 탄화수소 사슬을 가지는 유기산이다. 다수의 상이한 종류의 지방산이 알려져 있는데, 서로 사슬의 길이가 다르고, 이중 결합의 존재, 부 및 위치가 다르다. 세포내에서, 지방산은 통상적으로 공유 결합된 형태로 존재하는데, 카르복실 부분을 지방 아실기라 한다. 이러한 분자의 사슬 길이 및 포화도는 종종 식 CX:Y로 나타내는데, 여기에서 “X”는 탄소의 수를 나타내고 “Y”는 이중 결합의 수를 나타낸다. 지방 아실 분자의 탄소 사슬은 항상 짝수개의 탄소 원자를 함유하기 때문에, 탄소 사슬의 길이를 나타내기 위해서는 식 “C_{2x}”를 사용할 수도 있다.

지방 아실기는 다수의 지질의 주요 성분이고, 그것의 길고 비극성인 탄화수소 사슬은 상기 지질 분자의 비수용성의 원인이다. 다른 요소와 지방아실기의 공유결합의 유형은 다양할 수 있다. 예를 들어, 생합성 반응에 있어서, 지방 아실기는 특정 효소 반응에 따라 티오에스테르 결합에 의해, 아실 담체 단백질(ACP) 또는 조효소A(CoA)에 공유 결합될 수 있다. 왁스에 있어서, 지방 아실기는 에스테르 결합에 의해 지방 알코올에 결합되고, 트리아실글리세롤은 에스테르 결합에 의해 글리세롤 분자에 결합된 3개의 지방 아실기를 가진다.

지질을 주로 긴 사슬의(16개 또는 18개의 탄소 원자를 가지는) 지방아실기로 이루어진 트리아실글리세롤로서 저장하는 다수의 식물이 연구되어왔다. 매우 긴 사슬의(20-24개의 탄소 원자를 가지는) 일불포화 지방 아실기는 C18:1로부터 아실-CoA 연장(elongation) 경로에 의해서 형성되고, 다수의 식물 종자, 특히 크루시페리아과(Crucifereae family)의 뽕버에서 발견된다. 호호바(jojoba)로 더 잘 알려져 있는 사막의 관목인 시몬드시아 치넨시스(Simmondsia chinensis)는 다량의 지질 왁스를 그 종자의 저장 지질의 주성분으로서 생성하고 저장하는 능력을 가지는 점에 있어서 고등 식물(종자식물) 중에서 독특하다. 이 간단한 왁스 화합물은 매우 긴 사슬의 모노에논산형(monoenonic) 지방 아실기 및 알코올의 산소 에스테르이다.

다른 유형의 왁스가 몇몇 식물종에 의해서 형성된다. 예컨대, 아시네토박터(Fixter 등 (1586) J. Gen. Microbiol. 132:3147-3157) 및 마이크로코커스(Lloyd (1987) Microbios 52, 29-37)와 같은 박테리아, 및 단세포 녹조류인 유글레나에 의한 왁스의 합성뿐만 아니라, 식물 표피 또는 각피 왁스의 합성이 널리 알려져 있다. 그러나, 이러한 왁스의 조성 및 생합성 경로는 호호바 종자의 왁스와 다르다.

예컨대, 유글레나 저장 왁스의 형성에 있어서, 알코올 부분은 지방 아실-CoA 환원 효소에 의해 촉매되는 지방 아실 화합물의 NADH-의존성 환원에 의해 형성된다는 것이 증명되었다. 호호바의 종자에 있어서는, 반응이 NADPH 의존적이다. 매우 긴 사슬의 지방 아실-CoA가 대응하는 알코올로 환원되는 것은 단일한 효소에 의존하는 것으로 가정되었고, 그 효소의 활성은 발생하는 호호바 종자로부터의 미정제 추출물에서 관찰되었다(Pollard 등(1979) Lipids 14 : 651-662, Wu 등 (1981) Lipids 16 : 897-902). 또한, 비교해 보면, 식물 각피 왁스의 형성의 경우에는, 2단계 과정이 보고된 바 있다(Kolattukudy (1980) in The Biochemistry of Plants(Strumpf, P.K. 및 Conn,E.E. 발행) Vol. 4, p, 571-645). 지방 아실-CoA는 NADPH 의존성 환원 효소의 작용에 의해 유리 알데히드로 변환되고, 계속해서 NADPH 의존성 지방알데히드 환원 효소의 작용에 의해 알코올이 형성된다.

식물에서 왁스 에스테르의 형성을 담당하는 효소의 또 다른 특성은 효소 활성과 관련된 폴리펩티드의 동정을 초래하는 프로토콜(Protocol)의 결여에 의해서 확인되지 못했다. 그러므로, 식물의 지방 아실 환원 효소 단백질을 더욱 연구하기 위해서는, 정제 프로토콜을 고안해내는 것이 바람직하고, 그에 의해 환원 효소 폴리펩티드(들)가 동정될 수 있다. 이와 같은 방법을 확립함으로써, 충분한 양의 식물 지방 아실 환원 효소 단백질이 얻어질 수 있고, 그 단백질의 아미노산 서열이 결정될 수 있으며/있거나 지방 아실 환원 효소에 특이적인 항체가 얻어질 수 있다. 수득한 아미노산 서열은 중합 효소 사슬 반응(PCR) 기술에 있어서, 또는 cDNA나 게놈 라이브러리를 스크리닝하는데 유용할 수 있다. 다른 방법으로서, 항체가 지방 아실 환원효소 단백질을 발현시키는 클론을 확인하기 위하여 발현 라이브러리를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 이런 식으로 얻은 클론을 분석하여 식물 지방아실 환원 효소에 대응하는 핵산 서열을 동정할 수 있다.

[관련 문헌]

발생하는 호호바의 배(embryo)로부터의 무세포 균질화액(homogenale)은 NADPH 의존성 지방 아실-CoA 환원 효소 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다. 그 활성은 분획 원심분리(differential centrifugation) 시에 형성되는 부유 왁스 패드와 관련이 있었다(Pollard 등 (1979) 상기 참조; Wu 등 (1981) 상기

참조).

몇 개의 환원 효소 단백질의 공지된 디뉴클레오티드 결합 폴드(fold)에서 기능성 잔기의 보존 방법이 Karpus 등에 의해 개시되어 있다(Science(1991) 251 : 60-66).

지방 아실-CoA 환원 효소 활성을 가지는 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*)로부터 다효소 복합체(multienzyme complex)를 가용화시키는 방법이 Wildner 및 Hallick에 의해서 보고되었다(Abstract from The Southwest Consortium Fifth Annual Meeting, April 22-24, 1990, Las Cruces, NM).

호호바 환원 효소 단백질의 3000배 정제 방법이 Pushnik 등에 의해 보고되었다(Abstract from The Southwest Consortium Fourth Annual Meetings, February 7, 1989, Riverside, Ca.).

[도면의 간단한 설명]

제1도는 호호바 지방 아실 환원 효소의 핵산 서열 및 번역(translation)된 아미노산 서열(서열번호:19)을 도시한다.

[발명의 요약]

본 발명은 부분적으로 정제된 지방 아실 환원 효소 단백질을 제공하며, 상기 단백질은 지방 아실 기질로부터 지방 알코올의 형성에 활성이다. 본 발명의 환원 효소는 아실-CoA와 아실-ACP를 포함하는 다양한 지방 아실기질에 활성일 수 있다. 이러한 기질의 탄소 사슬의 길이는 다양할 수 있지만, 일정한 환원 효소는 특정 사슬 길이의 아실 기질을 더 선호하거나, 광범위한 탄소 사슬 길이를 가지는 아실 기질에 대하여 활성을 가질 수 있다.

일반적으로, 다른 아실 기질이 시험되고 추가의 활성이 발견될 수 있지만, 본 발명의 환원 효소는 최소한 16개 내지 24개의 탄소 사슬 길이를 가지는 아실 기질에 대해 활성을 가지는데, 이 탄소 사슬 길이는 식 "C_{2x}"로 나타낼 수 있고, 여기에서 "x"는 8 내지 12의 수이다. 또한, 본 발명의 환원효소 단백질을 수득하는 경우, 이하 상세히 설명하는 바와 같이 또 다른 조작이 가능하다. 이와 같은 조작에 의해 다른 관련 환원 효소가 제조 또는 발견될 수 있다.

그러므로, 제1면에 있어서, 본 발명은 지방 아실 환원 효소의 효소활성을 나타내는 단백질의 제조에 관한 것이며, 종자 식물 단백질의 제조에 의해서 예시된다. 그러한 제조물은 호호바의 배(embryo)를 분획화(fractionation)하여, 마이크로조용 막 제조물을 제조하고, 이 막 제조물로부터 환원 효소 단백질을 가용화한 다음, 크로마토그래피 방법에 의해 더욱 정제하여 제조한다. 호호바 환원 효소는 다른 아실 기질에 대한 활성도 관찰되지만, 매우 긴 사슬의 아실-CoA 기질을 더 선호하는 것으로 나타났으며, NADPH 의존성인 것으로 확인되었다.

이러한 방법에 의해서, 폴리아크릴아미드 겔 상에서 이중 밴드로서 이동하고, 대략 54 및 52 kD의 외견 분자량을 가지는 2개의 현저한 폴리펩티드를 함유하는 부분적으로 정제된 환원 효소 제조물이 얻어진다. 이와 같이, 종자 식물로부터 정제에 의해 아실 환원 효소 단백질을 얻는 방법뿐만 아니라, 이 환원 효소 단백질의 아미노산 서열을 얻는 방법이 제공된다.

본 발명의 다른 면에 있어서는, 본 발명의 환원 효소와 관련된 핵산서열이 고려의 대상이 된다. 이러한 서열을 본 발명의 환원 효소 단백질의 아미노산 서열로부터 동정하고 수득할 수 있는 방법이 설명된다. 숙주 세포에서 환원 효소 핵산 서열의 전사 및/또는 환원 효소 단백질의 발현을 위한 재조합 구조물에 있어서 뿐만 아니라, 다른 환원 효소 서열의 분리를 위한 구조 유전자 서열의 사용이 개시된다. 예컨대, 5' 및 3' 비코딩(noncoding)영역의 사용과 같은, 환원 효소 단백질과 관련된 다른 핵산 서열의 사용도 고려된다.

본 발명의 또 다른 면에 있어서는, 본 발명의 재조합 구조물을 함유한 세포가 고려된다. 특히, 예컨대 브라시카(*Brassica*) 식물의 배 세포와 같은, 호호바 환원 효소의 바람직한 기질을 함유한 세포가 고려의 대상이 된다.

또한, 본 발명의 재조합 구조물로부터의 발현 결과인 본 발명의 환원효소 단백질을 함유하는 세포도 고려의 대상이 되며, 숙주 세포에서 환원 효소를 제조하는 방법이 제공된다. 따라서, 숙주 세포에서 환원 효소 단백질의 발현의 결과로서 회수되는 환원 효소 단백질도 또한 본 발명에서 고려의 대상이 된다. 아울러, 본 발명의 환원 효소는 상기 숙주 세포에서 지방 알코올을 제조하는데 사용될 수도 있다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명의 지방 아실 환원 효소는 지방 아실기의 대응 알코올로의 환원을 촉매하는데 활성이 있는, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드 단편과 같은 모든 아미노산의 서열을 포함한다. 지방 아실기는 예컨대 ACP 또는 조효소A와 같은 담체에 공유 결합된 모든 지방 아실기를 의미한다.

지방 아실기를 알코올로 환원시키는 데는 다른 효소들이 필요할 수도 있고 필요하지 않을 수도 있는데, 그것은 이 효소 반응이 2단계로 수행될 수 있는 4 전자 환원 반응을 포함하기 때문이다. 제1단계에서, 아실기는 차후 대응 알코올로 환원될 알데히드로 변환될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 환원 효소는 아실로부터 알코올까지 전체 4 전자 환원 반응 동안 내내 활성일 수도 있고, 제2효소에 의해 알코올로 더욱 환원되는 알데히드로의 환원만을 촉매할 수도 있다. 지금까지 수집된 증거에 의하면, 단일 효소가 아실CoA로부터 알코올로의 완전한 환원 반응을 수행한다. 이하, 본 발명의 지방 아실 환원 효소를 "아실 환원 효소" 또는 "환원 효소"라고도 한다.

따라서, 본 발명은 지방 아실기를 알코올로 변환시키는 종자 식물의 지방 아실 환원 효소에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 NADPH 의존성 환원 효소에 관한 것이다. 아울러, 본 발명의 식물 지방 아실 환원효소는 지방 아실-CoA 또는 지방 아실-ACP 분자 모두에 대해 활성을 가질 수 있으며, 관찰되는 활성은 이용 가능한 기질에 따라 다를 수 있다. 그러나, 지방산 합성 효소(FAS) 아실-CoA 연장 경로의

조작을 위해서는 매우 긴 사슬의 아실-CoA 기질에 대한 선택적인 활성이 요구된다.

본 발명에 의해서, 종자 식물의 지방 아실 환원 효소 단백질이 구성(integral) 막 단백질임이 증명되었다. 일반적으로, 막 관련 단백질은 가용화되는 경우, 즉 정상적으로 기능하는 막 환경으로부터 분리되는 경우, 효소활성을 상실하는 경향이 있기 때문에 정제하기가 어렵다. 그러나, 효소 활성을 여전히 보유한 종자 식물의 가용화된 지방 아실 환원 효소를 얻는다면, 막에 결합된 단백질로는 불가능한 여러 가지 용도로 사용될 수 있다.

예를 들어, 일단 정제되거나 부분적으로 정제된 아실 환원 효소 단백질이 얻어지면, 이것을 반응기 시스템 내에 고정시키고 사용하여, 환원된 피리딘 뉴클레오타이드 재생 시스템의 존재 하에 지방 알코올을 제조할 수 있다.

또한, 환원 효소 단백질에 관한 연구는 부위-특이적 돌연변이 유발 연구에 의해 상기 단백질의 촉매 특성을 더욱 확인하고 개선시키거나, 그것의 아실기질 특성을 변경시킬 수 있도록 한다. 기질 특이성이 변경된 환원 효소는 다른 FAS 효소와 함께 새로운 용도를 가질 수 있다. 예를 들어, 중간정도의 사슬(C12-C14)을 선호하는 식물 티오에스테라제(thioesterase)(본원과 공동 계류 중인 미합중국 특허출원 제 07/662,007호 참조) 및 적합한 아실 전이 효소를 변경된 환원 효소와 함께 사용하여 중간-사슬 알코올을 제조한 다음, 이것을 지방산으로 에스테르화시켜서 에스테르를 수득할 수 있다.

막 결합 단백질을 사용하여 작업을 할 때 고려해야 할 한가지 중요한 요소는 막과 단백질의 결합 정도이다. 주변(peripheral) 및 구성(integral) 막단백질 모두가 공지되어 있다. 주변 단백질은 통상적으로 약간 친수성이고, 막과 단지 약하게 결합되어 있으며, 용이하게 가용화된다. 반면, 구성 단백질은 지질 막에 삽입되는 고도의 소수성 영역을 가지고, 종종 효소 활성을 보유하려면 지질과 결합되어야 한다.

구성 막 단백질을 가용화시키는데 사용되어 온 기술로서는, 적합한 막 분획의 제조물에 세제 또는 유기 용매를 첨가하는 방법이 있다. 그런 다음, 침전법, 이온-교환법, 겔-여과법 및 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 정제 기술을 추가로 사용할 수도 있으며, 이때는 목적하는 단백질이 특이적 효소 분석법을 사용하여 측정될 수 있는 기능적 활성을 여전히 보유한다는 가정이 전제된다.

통상적으로, 가용화된 단백질 제조물을 얻기 위한 제1단계로서, 아실 환원 효소 활성을 갖는 종자 식물 조직의 마이크로조용 막 제조물이 요구된다. 표준 마이크로조용 막 제조물은 무세포 균질화액(CFH)의 분획 원심분리법을 이용하여 전세포, 핵 및 가용성 단백질이 없는 막 분획을 수득함으로써 제조된다(예를 들어, Moore 등 (1987) *Biological Membranes: A Practical Approach*, pp. 37-72, 발행 Finalay 및 Evans 참조). 지유종자(oilseed)를 사용하는 경우에는, 최초의 원심분리 단계에서 통상적으로 펠릿, 상층액 및 부유 지방 패드가 수득되고, 그 다음에 상층액을 더욱 원심 분리하여 마이크로조용 막을 회수할 수 있다.

1991년 2월 22일자 출원되어 본원과 공동 계류 중인 USSN 07/659,975 호에는 아실 환원 효소 단백질 활성을 함유하는 막 분획을 CFH에서 보다 우수한 회수율의 환원 효소 활성으로 얻을 수 있는 프로토콜이 설명되어 있다. 종자의 외피에는 효소학적 측정을 방해하는 요소(들)가 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으므로, 이 공정에 있어서 결정적인 단계는 호호바의 배(embryo)로부터 종자의 외피를 제거하는 것이었다. 이 방법은 프로토콜의 초반부에서 고농도의 염 용액을 사용하는데, 각 단계를 이하에서 특히 실시예에서 상세하게 설명한다.

호호바 배 샘플로부터 분말을 제조하고, 분말을 고농도의 염(3M NaCl) 수크로오스 (0.3M) 용액에서 배 20mg 당 용액 80ml의 비로 균질화시켜 균질화 액을 제조한다. 그 다음에, 균질화액을 여과시키고 약 1시간 동안 100,000 × g로 원심 분리시켜, 펠릿, 상층액 및 부유 지방 패드를 수득한다.

상기 패드를 제거하고 상층액을 수거하여 100mM의 HEPES (pH 7.5), 2mM DTT 및 0.5mM의 EDTA가 함유된 1M NaCl 용액에 대하여 투석시킨다. 그 다음에, 투석물을 약 1시간 동안 100,000 × g, 더욱 바람직하게는 200,000 × g로 원심 분리시키는데, 여기에서 아실-CoA 환원 효소 활성을 가진 마이크로조용 막을 포함하는 펠릿 DP2가 얻어진다.

마이크로조용 막 제조물에 있어서 및 이것을 더욱 정제하는 과정 동안에 아실 환원 효소 활성의 특성을 더욱 확인하는 것은 아실 환원 효소에 대하여 최적화된 특이적인 분석법을 개발함으로써 용이하게 될 수 있다. 예를 들어, 호호바를 사용할 경우에는 매우 긴 사슬의 아실-CoA 분자를 기질로서 이용하고 검출 가능한 아실-CoA 환원 효소 활성을 현저하게 증가시키는 것으로 알려진 고농도의 염(0.2M 내지 0.5M NaCl) 조건 하에서 수행되는 분석법이 활용된다. 이 분석법은 실시예 1에 상세하게 설명되어 있다.

효소를 더욱 특성 확인 및 정제하기 위한 다른 결정적인 단계는 천연지질 이중층 막 환경으로부터 분리되었으나, 실질적인 양의 측정 가능한 환원효소의 활성을 보유하는 가용화된 환원 효소 단백질을 수득하는 단계이다.

지질 이중층으로부터 구성 막 단백질을 제거하는 것은 전형적으로 수용액중의 양친매성(amphiphilic) 세제를 사용하여 수행되나, 드물게 유기 용매가 사용되는 경우도 있다. 해리 효과, 임계 미셀(micelle) 농도(CMC), 효소 활성 및 추가의 정제에 대한 효과, 및 용액으로부터의 제거 가능성이 다른, 이온성 및 비이온성의 많은 다양한 세제를 이용할 수 있다. 막 단백질을 가용화시키기 위한 다수의 상이한 세제 및 방법이 당업자에게 공지되어 있고, 또한 개관 논문도 발표된 바 있다[Neugebauer, *Methods Enzymol* (1990) 182 : 239-253 및 Hjelmiland, *Methods Enzymol*. (1990) 182 : 253-264].

막 단백질을 가용화시키는데 사용되는 세제는 종종 목적하는 단백질의 효소 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 호호바 아실 환원 효소의 가용화에 대하여 광범위한 특성을 나타내는 몇 가지 세제를 시험하였고, 그 결과 모두가 억제성인 것으로 발견되었다. 그러나, 환원 효소의 활성에 대한 세제의 외견상의 억제 작용은 효소의 비가역적 억제가 아닌 어떤 영향에 기인할 수 있기 때문에, CHAPS에 의한 억제의 가역성을 검사하였다.

CMC 초과 농도에서 세제 CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)-디메틸-아미노]-1-프로판술포네이트)에 의한 강한 억제 작용이 관찰되었으나, 만일 효소가 얼음 위에서 CHAPS에 노출되고 나서, CMC 이하의 CHAPS 농도로 환원된다면, 환원 효소 활성의 완전한 회복이 이루어지는 것으로 발견되었다. 따라서, 환원 효소는 세제 CHAPS에 의해 비가역적으로 억제되지 않는다. 세제 CHAPS를 이용하여 호호바의 아실 환원 효소 활성을 가용화시키기 위한 프로토콜이 고안되었는데, 이 프로토콜에 따르면 마이크로조용 막제조물로부터 약 85%의 환원 효소 활성을 얻을 수 있다. 이 방법은 실시예 2에서 상세하게 설명한다. 유사하게, 호호바 환원 효소 또는 다른 후보 환원 효소에 있어서 아실 환원 효소 활성의 가용화를 위한 다른 유용한 세제를 확인하기 위해서, 다른 세제에 의한 외견상의 환원 효소 억제 작용의 가역성에 관한 연구가 수행될 수 있다.

가용화된 아실 환원 효소 단백질을 얻었기 때문에, 이제 기질 특이성, 보조인자(cofactor) 요건 및 가능한 활성 억제인자에 관한 효소의 특성을 확인하기 위한 실험을 더 수행할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 호호바 아실환원 효소는 ACP 및 CoA 기질을 포함하여 광범위한 기질을 갖는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 18개 이상의 탄소 원자를 가지는 아실-CoA 기질에 대한 활성뿐만 아니라, 16개 이상의 탄소 원자를 가지는 아실-ACP 기질에 대한 활성도 관찰되었다. [C15]-15-테트라코세노일-CoA(C24:1)에 대한 우선적인 활성이 관찰되었다.

단백질 제조물은 예를 들어 고정된 반응성 염료에서의 크로마토그래피에 의해, 후보 식물 아실 환원 효소 단백질에 관하여 더욱 농후하게 될 수 있다. 그러한 많은 반응성 염료 매트릭스는 본 발명에서 사용되는 Cibacron Blue F3GA(Blue A)를 포함하여 공지되어 있다. 본 발명에 따르면, 호호바의 아실 환원 효소 활성은 약 0.2M NaCl, 바람직하게는 0.5M NaCl, 더욱 바람직하게는 0.4M NaCl을 함유하는 완충액으로 로딩되었을 때 그러한 컬럼에 결합되고, 다른 단백질의 약 85% 초과는 통과하거나 그 다음의 세척 단계에서 제거된다. 그 다음에, 호호바의 아실 환원 효소 활성은 Blue A 컬럼으로부터 약 1.0M의 NaCl이 함유된 완충액으로 용출시킴으로써 회수될 수 있다.

아실 환원 효소 활성은 Blue A로부터의 농후화된 단백질 제조물을 겔 여과 컬럼이라고도 불리는 크기 배제 매트릭스(size exclusion matrix)로 채워진 컬럼에 적용시킴으로써 더욱 정제된다. 또한, 크기 배제 컬럼은 천연 환원 효소의 크기를 평가할 수 있게 해준다. 특히, Ultrageel AcA54 또는 Sephacryl 5100과 같이 좁은 범위를 분리(sizing)하는 매트릭스는 더욱 정제된 호호바 아실 환원 효소 분획을 얻는데 유용하다. 특히 흥미있는 것은 하나의 주 피크(Peak)로, 크기 배제 컬럼 또는 그의 균등물에 로딩되는 환원효소 활성의 약 40-60% 보다 큰 회수율을 얻기 위해 사용될 수 있는 방법 및 완충액이다.

크기 배제 컬럼으로부터의 환원 효소 활성을 친화성 컬럼에 적용시키면 환원 효소 단백질을 더욱 정제할 수 있다. 예를 들어, 활성 분획을 약 0.1M NaCl로 팔미토일 CoA 아가로스 컬럼에 적용시킬 수 있다. 그 다음에, 약 70%의 환원 효소 활성을 호호바로부터의 환원 효소의 보조인자인 NADPH 15mM를 가지는 완충액으로 용출시킬 수 있다.

정제 과정의 전반에 걸쳐서, 본 발명의 아실 환원 효소 활성을 함유하는 분획은 예컨대 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동시키고, 그 다음에 염색시키는 것과 같은 추가의 기술을 거칠 수도 있다, 이러한 방법으로, 환원 효소 활성을 가지는 상기 분획 내에서 현저한 폴리펩티드 밴드가 확인될 수 있다. 예를 들어, 팔미토일 CoA 아가로스 컬럼으로부터의 부분적으로 정제된 호호바 환원 효소 제조물에 있어서는, 외견 분자량이 약 53kD, 더욱 바람직하게는 54 및 52kD인 폴리펩티드들을 나타내는 2개의 밴드가 확인되는데, 이것은 상기 제조물 내 단백질의 95% 초과를 구성한다. 상이한 마커(marker)를 사용하는 다른 SDS-PAGE 분석법에 의하면, 이 환원 효소 단백질의 외견 분자량이 더욱 정확하게는 54 및 56kD 또는 약 55kD 일 수 있는 것으로 나타난다.

천연 환원 효소의 외견 크기는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 증명된 바에 따르면 약 49kD이므로, 이 밴드들은 한 환원 효소의 상이한 2개의 서브유니트를 나타내는 것 같지는 않다. 오히려, 환원 효소 활성은 이 폴리펩티드들 중의 어느 하나, 또는 2가지 모두와 결부되어 있다. 음이온 교환, 색소 컬럼, 핵사노일-CoA 친화성 컬럼, 겔 여과, 헤파린 컬럼 및 티올 상호작용(interactive) 크로마토그래피를 포함하는 시험에서는 부가의 정보를 얻지 못했다.

이 정제 방법에 사용된 호호바 종자는 다양한 집단의 호호바 식물로부터 수집되었으므로, 이 폴리펩티드들은 동일한 효소의 밀접하게 관련된 변이체, 즉 동위효소(isozyme)를 나타낼 수 있다. 본원에서 설명되는 바와 같이, 두 폴리펩티드의 트립신 분해 및 아미노산 서열 분석이 54 및 52kD 밴드의 특성을 더욱 확인하기 위해 사용될 수 있다.

실질적으로 정제된 환원 효소 단백질의 회수는 다양한 방법으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 방법을 수행하고, 예컨대 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF)와 같은 막 지지체로 단백질을 이동시킬 수 있다. 그런 다음, 확인된 단백질에 실질적으로 다른 단백질이 배제될 수 있도록, 확인된 단백질을 함유하는 이러한 막의 부분을 얻을 수 있다. 당해 기술 분야에 공지되어 있고 또한 이하의 실시예에 설명된 기술을 사용하여, 단백질을 그들의 아미노산 서열이 결정될 수 있도록 막으로부터 분리하고 더욱 조작할 수 있다.

예를 들어, 아미노산 서열은 전체 단백질의 N-말단 아미노산 영역을 서열화하거나, 브롬화 시안으로 화학적으로 절단하거나 프로테아제를 사용하여 효소적으로 절단하여 원하는 단백질의 단편을 제조함으로써 결정될 수 있다. 사용할 수 있는 프로테아제의 예로서는 엔도프로테이나제(endoproteinase) lys C, glu C, Asp N 및 트립신이 있다. 그런 다음, 이 방법으로 얻어진 단편을 당업자에게 주지된 방법에 따라 정제 및 서열화할 수 있다.

54 및 52kD 후보 폴리펩티드에 대한 특성 확인은, 예를 들어 대장균 내에서 각각의 단백질의 발현 및 그 다음의 환원 효소 활성의 확인에 유용할 수 있다. 다른 시험 방법에는 면역학적 분석법이 포함될 수 있으며, 이에 의해 후보 단백질에 특이적인 항체가 제조되고 단백질 제조물의 환원 효소 활성을 억제하는 것으로 발견되었다.

또한, 아실 환원 효소 단백질의 동일성을 확인하고 원핵 또는 진핵속주 세포내에서 서열의 전사 및/또는 단백질의 발현을 제공하기 위해서, 아실 환원 효소 활성과 관련된 단백질에 대하여 결정된 아미노산 서열로부터 핵산 서열을 분리하는 것이 바람직하다. 세포 내에서 환원 효소를 발현시키기 위해서는 다양한 조작이 필요할 수 있다. 예를 들어, 단백질은 예컨대 대장균과 같은 원핵 생물에서 높은 수준으로 제조되는 경우에는, 세포막에 삽입되어 파괴적이거나 심지어 유독할 수 있다. 그러므로, 약한 프로모터(promotor)를 사용한 낮은 수준의 발현이 바람직할 수 있다. 다른 방법으로는, 만일 막 삽입의 원인인 리더 펩티드가 발견된다면, 성숙한 환원 효소 단백질을 코드화하는 핵산 서열만이 함유된 구조물을 제조할 수 있다. 이러한 방식으로, 환원 효소 단백질이 대장균 세포에서 제조될 수 있다. 만일 환원 효소 활성이 대장균에서 검출가능하지 않다면, 예컨대 단백질이 막이중층으로 삽입되지 않는다면, 대장균 세포에서 환원 효소 단백질의 존재는 예컨대 항체 구조물을 사용하는 것과 같은 다른 수단에 의해서 확인할 수 있다.

아실 환원 효소는 막 결합 단백질이기 때문에, 환원 효소 활성을 입증하기 위해서는 식물 세포에서 후보 단백질을 발현시키는 것이 바람직할 수 있다.

일시적 발현을 위한 식물 조직의 일렉트로포레이션(electroporation) 또는 충격(bombardment)이 이러한 목적을 위하여 유용할 수 있다. 궁극적으로, 상기 효소에 의해 인식되는 기질을 생산하는, 예컨대 브라시카(Brassica) 속의 멤버와 같은 식물에서 환원 효소 단백질의 안정한 발현이 요구된다. 이러한 방식으로, 제약, 화장품, 세제, 플라스틱 및 윤활유에 사용되는 아실 알코올 생성물을 얻을 수 있다.

본 발명의 환원 효소 핵산은 게놈 DNA 또는 cDNA일 수 있고, cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터 분리하거나 분리된 식물 DNA로부터 직접 분리할 수 있다. 일단 단백질이 분리되고/되거나 단백질의 아미노산 서열이 얻어지면, 유전자 서열의 분리 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

예를 들어, 항체는 분리된 단백질로 증가될 수 있고 발현 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용됨으로써 식물 아실 환원 효소 단백질이나 그것의 항원 단편을 생산하는 클론을 확인할 수 있다. 다른 방법으로는, 아미노산 서열로부터 올리고뉴클레오타이드를 합성하고 핵산 서열의 분리에 사용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 핵산 단편을 생성시키기 위해 PCR에서 사용될 수 있는데, 핵산 단편은 그 다음에 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 다른 접근 방법으로는, 올리고뉴클레오타이드를 직접 사용하여 노던 블롯(Northern blot) 또는 서던 블롯(Southern blot)을 분석함으로써, 유용한 프로브(probe) 및 상기 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝할 수 있는 혼성화 조건을 확인할 수 있다.

본 발명의 아실 환원 효소 핵산 서열에는 호호바의 단백질이나 핵산서열로부터 얻을 수 있는 서열뿐만 아니라, 호호바 아실-CoA 환원 효소 단백질에 대응하는 서열이 포함된다. “대응”이라는 용어는 DNA 또는 RNA 핵산 서열을 의미하는 것으로서, 여기에는 호호바 아실 환원 효소 단백질이나 그 일부를 코드화하는 핵산 서열, 호호바의 배에서 환원 효소의 전사 또는 전사 및 번역(발현)을 지시하는 상기 코드화 서열에 대해 5' 또는 3'에서 발견되는 조절 서열, cDNA에 존재하지 않는 인트론 서열, 그리고 소포체 막에 삽입되기 위해 필요할 수 있지만 성숙한 또는 가공된 아실 환원 효소에서는 발견되지 않는 환원 효소 단백질 전구체의 모든 리더 펩티드 또는 신호 펩티드를 코드화하는 서열이 포함된다.

호호바 서열이나 단백질로부터 “얻을 수 있는” 서열은, 호호바 아실환원 효소 아미노산 서열로부터 합성되거나, 다른 유기체에서 확인되고 호호바 환원 효소 단백질에 대한 항체 또는 호호바 환원 효소 핵산 서열을 프로브로서 사용하여 분리할 수 있는 원하는 지방산 환원 효소 단백질과 관련된 모든 핵산 서열을 의미한다. 이 방법으로, 핵산 혼성화 방법이나 항원 방법에 의해 호호바 서열을 사용하여 원하는 유기체로부터 분리되는 다른 아실환원 효소의 서열은 다른 아실 환원 효소를 분리하기 위해 유사하게 사용될 수 있다는 것을 알 수 있다. 호호바 환원 효소를 거쳐서 분리된 종자 식물환원 효소를 통해 유래되는 그러한 환원 효소도 본원에서 “얻을 수 있는” 것으로 간주된다.

핵산 서열의 분리를 위해서, cDNA 또는 게놈 라이브러리를 플라스미드나 바이러스 벡터 및 당업자에게 널리 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 원하는 서열을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있는 유용한 핵산 혼성화 방법 및 면역학적 방법도 또한 당업자에게 널리 공지되어 있다[참조:Maniatis 등, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 제2판(1989) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York].

전형적으로, 핵산 프로브를 사용하여 얻을 수 있는 서열은 표적 서열과 흥미 있는 아실 환원 효소를 코드화하는 일정한 서열 사이에 60-70%의 서열 동일성을 나타낸다. 그러나, 서열 동일성이 50-60% 정도로 작은 긴 서열도 얻을 수 있다. 핵산 프로브는 핵산 서열의 긴 단편이거나, 더 짧은 올리고뉴클레오타이드 프로브일 수 있다. 더 긴 핵산 단편을 프로브로서 사용하는 경우에는(약 100bp 초과), 프로브로서 사용되는 서열로부터 20-50%의 편차(즉, 50-80%의 서열 상동성)를 가지는 서열을 표적 샘플로부터 얻기 위해 덜 엄격하게 스크리닝할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 프로브는 아실 환원 효소를 코드화하는 전체 핵산 서열보다 훨씬 짧을 수 있으나, 뉴클레오타이드가 약 10개 이상, 바람직하게는 약 15개 이상, 더욱 바람직하게는 약 20개 이상이어야 한다. 더 짧은 영역이 더 긴 영역에 대립하는 것으로서 사용되는 경우에는 고도의 서열 동일성이 요구된다. 그러므로, 상동 유전자를 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프로브를 설계하기 위해서는 아미노산 서열 동일성이 큰 효소 활성 부위를 확인하는 것이 바람직할 수 있다.

관련 유전자가 일정한 서열과의 혼성화에 의해 분리될 수 있는지를 결정하기 위하여, 다른 방법을 사용할 수 있으나 전형적으로는 방사성을 이용하여, 검출 가능하도록 서열을 표지화한다. 표지화된 프로브를 혼성화 용액에 가하고, 노던 블롯 또는 서던 블롯의 원하는 핵산이 함유된 필터(원하는 원료의 상동성을 스크리닝하기 위해), 또는 스크리닝할 cDNA 또는 게놈클론이 함유된 필터와 함께 인큐베이션시킨다. 혼성화 및 세척 조건은 프로브와 대상 서열의 혼성화를 최적화하기 위해 다양하게 할 수 있다. 낮은 온도와 높은 염 농도는 거리가 더 먼 서열의 혼성화를 가능하게 한다(낮은 엄격성). 만일 바탕(background) 혼성화가 엄격성이 낮은 조건 하에서 문제라면, 혼성화 또는 세척 단계에서 온도를 상승시키고/시키거나

염 함량을 낮추어 특이적 혼성화 서열의 검출을 개선시킬 수 있다. 혼성화 및 세척 온도는 프로브의 추정 용해 온도를 기초로 조절될 수 있다[Beltz 등, *Methods in Enzymology* (1983) 100 : 266-285].

유용한 프로브, 그리고 적합한 혼성화 및 세척 조건이 전술한 바와 같이 확인되면, cDNA 또는 게놈 라이브러리를 표지화된 서열 및 최적화된 조건을 이용하여 스크리닝한다. 우선, 고체 한천(agar) 배지에 라이브러리를 플레이트팅(plating) 하고, DNA를 적당한 막, 대개 니트로셀룰로오스 또는 나일론 필터로 뽑아낸다. 그 다음에, 이 필터를 전술한 바와 같이 표지화된 프로브와 혼성화시키고 세척하여 관련 서열이 함유된 클론을 확인한다.

면역학적 스크리닝을 위해서, 호호바 아실 환원 효소에 대한 항체를 토끼나 마우스에 정제된 단백질을 주사하여 제조할 수 있고, 그와 같은 항체의 제조 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 전형적으로 다중클론성 항체가 유전자의 분리를 위해서 더 유용하지만, 단일클론성 항체 또는 다중클론성 항체가 제조될 수 있다.

원하는 식물종을 스크리닝하기 위해서는, 웨스턴 분석을 수행하여 원하는 식물종의 미정제 추출물에 호호바 환원 효소에 대한 항체와 교차 반응하는 관련 단백질이 존재하는지를 결정한다. 이 방법은, 예컨대 니트로셀룰로오스와 같은 막에 식물 추출 단백질을 고정시키고 나서, 전기 영동 및 항체와 함께 인큐베이션함으로써 달성된다. 니트로셀룰로오스 필터상의 항체/단백질 복합체를 검출하기 위해서는 많은 상이한 시스템을 이용할 수 있으며, 항체 및 제2항체/효소 컨주게이트 시스템을 방사성 동위원소 표지화하는 것이 여기에 포함된다. 이용 가능한 몇 가지 시스템이 Oberfelder [Focus (1989) BRL/Life Technologies, Inc., 11:1-5]에 의해 설명되었다. 교차 반응성이 관찰될 때, 관련 단백질을 코드화하는 유전자를 원하는 식물종을 나타내는 발현 라이브러리를 스크리닝함으로써 분리한다. 발현 라이브러리는 Maniatis 등(상기 참조)에 의해 설명된 바와 같이, 람다 gt11을 포함하는 시판되는 다양한 벡터 내에 구성될 수 있다.

그 다음으로, DNA 혼성화 기술 또는 면역학적 스크리닝 기술을 사용하여 상기한 바와 같이 확인된 클론을 정제하고, 공지의 기술을 사용하여 DNA를 분리 및 분석한다. 이러한 방식으로, 클론이 관련 아실 환원 효소단백질을 코드화한다는 것이 증명된다. 다른 종자 식물 지방 아실 환원 효소를 호호바 환원 효소를 사용하는 것과 같은 방법으로 상기 환원 효소의 사용에 의해 얻을 수 있다.

당업자라면 본 발명의 아실 환원 효소 핵산 서열이 부위 특이적 돌연변이 또는 PCR의 표준 기술을 사용하여 변형될 수도 있고, 서열의 변형이 합성 핵산 서열을 제조하는데 있어서 달성될 수도 있다는 것을 인정할 것이다. 또한, 이 변형된 서열도 본 발명의 아실 환원 효소 핵산 서열로 간주된다. 예를 들어, 코돈(codon) 내의 동요(wobble) 위치는 핵산 서열이 동일 아미노산 서열을 코드화하도록 변경될 수도 있고, 코돈은 보존적 아미노산 치환이 발생하도록 변경될 수도 있다. 어느 경우이나, 펩티드 또는 단백질은 원하는 효소 활성을 유지하므로, 본 발명의 일부로서 간주된다.

본 발명의 아실 환원 효소의 핵산 서열은 게놈 DNA, cDNA, mRNA로부터 유래된 DNA 서열이나 RNA 서열일 수도 있고, 전체적으로나 부분적으로 합성될 수도 있다. 예를 들어, 유전자 서열은 적합한 원료로부터 게놈 DNA를 분리하고 중합 효소 사슬 반응(PCR)을 이용하여 대상 서열을 증폭 및 클로닝함으로써 클로닝될 수 있다. 다른 방법으로서, 특히 식물-선호 서열을 제공하는 것이 바람직한 경우에는, 유전자 서열이 전체적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있다. 따라서, 원하는 구조 유전자의 전체 또는 부분(환원 효소 단백질을 코드화하는 유전자의 부분)을 선택된 숙주에 의해 선호되는 코돈을 사용하여 합성할 수 있다. 숙주-선호 코돈은 예를 들어 원하는 숙주종에서 발현되는 단백질에서 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로부터 결정될 수 있다.

아실 환원 효소 단백질과 관련된 핵산 서열은 다양한 용도를 가질 수 있다. 예를 들어, 프로브로서 사용될 수 있거나 숙주 세포에서 아실 환원 효소 단백질의 발현을 제공할 수 있는 재조합 구조물을 제조할 수 있다. 목적하는 용도에 따라, 상기 구조물에는 환원 효소 전체 또는 이것의 일부를 코드화하는 서열이 함유될 수 있다. 예를 들어, 활성 부위와 같은 환원 효소의 중요한 영역을 확인할 수 있다. 그러므로, 원하는 환원 효소 활성에 필요한 아미노산을 코드화하는 환원 효소 서열의 일부만을 함유하는 또 다른 구조물을 제조할 수 있다.

아실 환원 효소 단백질의 선호되는 기질이 함유되어 있는 숙주 세포에서의 발현은 대응하는 지방 아실 기질로부터 지방 아실 알코올이 제조될 수 있게 한다. 환원 효소 단백질의 발현에 유용한 시스템으로서, 예컨대 대장균, 효모 세포와 같은 원핵 세포와 식물 세포가 있으며, 관속 및 비관속식물 세포 모두가 목적하는 숙주이다. 이 방법으로, 환원 효소 단백질을 제조할 수 있다. 또한, 코드화 서열의 부위-특이적 돌연변이 유발을 이용하여 환원 효소 단백질의 반응성에 대한 특이적 돌연변이의 효과를 연구할 수 있다.

또한, 아실 환원 효소 코드화 서열이나 이것의 단편의 상보적 서열의 전사를 제공하는 안티센스(antisense) 구조물도 제조할 수 있다. 이 방법으로, 표적 숙주 유기체에서 생성되는 환원 효소 단백질의 양을 감소시킬 수 있다.

본 발명의 아실 환원 효소를 코드화하는 DNA 서열은 다양한 방법으로 외래 DNA 서열과 결합될 수 있다. “외래” DNA 서열은 천연 상태에서 환원 효소에 결합된 상태로 발견되지 않는 모든 DNA서열을 의미하며, 천연상태에서 함께 결합된 상태로 발견되지 않는 동일 유기체로부터의 DNA 서열의 조합물이 여기에 포함된다. 예를 들어, 트랜짓(transit) 펩티드를 코드화하는 서열을 본 발명의 환원 효소 서열에 결합시키는 것이 바람직할 수 있다. 이 방법으로, 환원 효소를 지방 아실 기질, 특히 지방 아실-ACP가 이용 가능한 염록체로 표적화할 수 있다.

본 발명의 아실 환원 효소를 코드화하는 DNA 서열은 그 환원 효소와 일반적으로 관련된 유전자 서열의 전부 또는 일부와 함께 사용할 수 있다. 그것의 구성 요소에 있어서, 환원 효소를 코드화하는 DNA 서열은 5' 에서 3' 로의 전사 방향으로, 숙주 세포에서 전사 및 번역을 촉진할 수 있는 전사 개시 조절 영

역, 환원 효소를 코드화하는 핵산 서열 및 전사 종결 영역을 가지는 재조합 구조물 내에 조합된다.

숙주에 따라 조절 영역은 다를 수 있는데, 바이러스, 플라스미드 또는 염색체 유전자 등으로부터의 영역이 여기에 포함된다. 원핵 또는 진핵 미생물, 특히 단세포 숙주에서의 발현을 위해서, 매우 다양한 구성 또는 조절 가능한 프로모터를 사용할 수 있다. 미생물에서 발현이 이루어지면 식물 효소의 편리한 원료가 제공될 수 있다. 공지된 전사 개시 영역 중에는 예컨대 베타-갈락토시다아제, T7 중합 효소, 트립토판 E 등과 같은 유전자를 포함하여, 예컨대 대장균, 비, 서브틸리스, 삭카로마이세스 세레비시애와 같은 박테리아 및 효모 숙주로부터의 영역이 있다.

대부분, 재조합 구조물에는 아실 환원 효소를 생산하는 식물내의 기능적인 조절 영역이 포함된다. 식물의 환원 효소 또는 이것의 기능적 단편을 코드화하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)은 그것의 5' 말단에서 전사 개시 조절 영역과 결합될 것이다. 번역 개시 영역도 또한 바람직할 수 있으며, 이것은 환원 효소 cDNA 서열의 5' 비-코딩 영역으로부터, 또는 천연상태에서 구조물의 전사 개시 영역과 관련된 번역 개시 영역으로부터 제공될 수 있다. 일반적으로, 전사 및 번역 조절 영역의 조합을 프로모터라고 한다. 식물에서 구조 유전자의 매우 다양한 구성적 또는 조절 가능한, 예를 들면 유도성 발현을 제공하는 다수의 프로모터 영역을 사용할 수 있다.

식물에서 구성 유전자 발현을 제공하는데 유용하다고 공지된 서열들 중에는, 예컨대 콜리플라워(cauliflower) 모자이크 바이러스(CaMV)의 35S 및 19S 영역과 같이 바이러스 유전자의 발현을 코드화하는 영역뿐만 아니라, 예컨대 노팔린 신타제(synthase)(Nos), 만노핀 신타제(Mas), 또는 옥토판 신타제(Ocs)에 관한 조절 영역과 같이 아그로박테리움 유전자와 관련된 조절영역이 있다. 본원에서 사용된 “구성적(constitutive)”이라는 용어는 반드시 유전자가 모든 세포 유형에서 동일한 수준으로 발현된다는 것을 의미하는 것이 아니고, 비록 양적으로 약간의 변이가 종종 검출되더라도 유전자가 광범위한 세포 유형에서 발현된다는 것을 의미한다. 다른 유용한 전사 개시영역은 특정 조직이나 특정 성장 조건에서 우선적으로 전사를 제공하며, 이는 나핀(napin), 종자 또는 잎새의 ACP, RUBISCO의 작은 서브유닛 등으로부터의 것을 포함한다.

식물 숙주 내에서 아실 환원 효소 단백질을 발현시키는 구체예에 있어서는, 완전한 식물 아실 환원 효소 유전자의 전부 또는 일부를 사용할 수 있는데, 다시 말해서 5' 업스트림의 비-코딩 영역(프로모터), 구조 유전자 서열 및 3' 다운스트림의 비-코딩 영역을 사용할 수 있다. 다른 프로모터, 예를 들어 대상 식물 숙주 본래의 프로모터, 또는 1개의 유전자원으로부터 유래된 전사 개시 영역들과 다른 유전자원으로부터 유래된 번역 개시 영역들을 가지는 변형된 프로모터, 또는 2중 35S CaMV프로모터와 같은 강화 프로모터가 필요한 경우에는, 표준 기술을 사용하여 서열들을 서로 결합시킬 수 있다.

5' 업스트림 비-코딩 영역을 종자 성숙 동안 조절되는 다른 유전자로부터 얻는 경우에 있어서는, 예컨대 ACP 및 나핀-유래의 전사 개시 조절 영역과 같이 식물 배조직에서 우선적으로 발현되는 것이 바람직하다. 이러한 “종자-특이적 프로모터”는 1988년 1월 25일자 U.S. 일련번호 제 07/147,781호(현재는 1991년 8월 8일자 출원된 U.S. 일련번호 제 07/742,834 호) 및 “종자의 초기 발생시에 우선적으로 발현되는 신규한 서열 및 이와 관련된 방법”이라는 제목의 1990년 3월 16일쯤 출원된 U.S. 일련번호 제 07/494,722호의 교시에 따라 수득 및 사용할 수 있으며, 공동 계류 중인 상기 출원을 모두 본원에서 참조로서 편입한다. 종자의 조직에서 우선적으로 발현되는 전사 개시 영역은 다른 식물 부분에서 유전자 생성물의 파괴적이거나 불리한 영향을 최소화하기 때문에 지방 알코올 제조에 바람직한 것으로 간주된다.

본 발명의 재조합 구조물 내에는 조절 전사 종결 영역도 또한 제공될 수 있다. 전사 종결 영역은 식물의 아실 환원 효소를 코드화하는 DNA 서열 또는 상이한 유전자원으로부터 유래된 편리한 전사 종결 영역, 특히 천연 상태에서 전사 개시 영역과 관련된 전사 종결 영역에 의해 제공될 수 있다. 전사 종결 영역은 전형적으로 종결 영역이 유래되는 구조 유전자의 3' 방향으로 약 0.5kb 이상, 바람직하게는 약 1-3kb의 서열을 함유한다.

식물 아실 환원 효소를 그를 발현시키기 위한 대상 DNA 서열로서 가지는 식물 발현 구조물은 매우 다양한 식물, 특히, 매우 긴 사슬의 지방 아실-CoA 분자를 생산하는 식물, 예컨대 브라시카(Brassica), 특히 평지씨(rapeseed)의 고농도 에루크산(erucic acid) 변종에서 사용할 수 있다. 다른 대상 식물은 예컨대 중간 정도이거나 긴 사슬의 지방 아실 분자와 같은 바람직한 기질을 생산하며, 평지씨(카놀라 변종), 해바라기, 잇꽃(safflower), 목화, 쿠페아(Cuphea), 콩, 땅콩, 코코넛 및 오일 팜, 그리고 옥수수가 여기에 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. DNA 발현 구조물을 숙주 세포에 도입시키는 방법에 따라서, 다른 DNA 서열이 필요할 수도 있다. 중요하게는, 본 발명은 쌍떡잎 식물과 외떡잎 식물종에 적용될 수 있고, 신규 및/또는 개선된 형질전환 및 재생 기술에 용이하게 적용될 것이다.

형질전환 방법은 본 발명에 있어서 중요하지 않으며, 다양한 식물의 형질전환 방법이 현재 이용 가능하다. 더욱 신규한 방법이 작물을 형질전환시키기 위해 이용될 수 있기 때문에, 그것들을 본원에 따라 직접 적용할 수 있다. 예를 들어, 자연 상태에서 아그로박테리움 감염을 받기 쉬운 다수의 식물종은 3자 교배(tripartite mating) 또는 2성분 벡터 아그로박테리움 매개형질전환 방법을 거쳐서 성공적으로 형질전환시킬 수 있다. 핵산 서열을 숙주 식물 세포로 전달시키는데 유용한 다른 서열은 식물의 병원성 바이러스 또는 식물의 전이성 인자로부터 유래될 수 있다. 또한, 미량주사(microinjection), DNA 입자 충격, 일렉트로포레이션 기술이 개발되어 다양한 외떡잎 식물과 쌍떡잎 식물종의 형질전환이 가능하다.

재조합 구조물을 개발하는데 있어서는, 구조물 또는 이것의 단편의 다양한 성분이 일반적으로 박테리아 숙주, 예를 들어 대장균에서 복제될 수 있는 편리한 클로닝 벡터 내로 삽입될 것이다. 많은 벡터들이 존재하며, 문헌에 설명되어 있다. 각각의 클로닝 후에, 플라스미드를 분리한 다음, 예컨대 제한(restriction), 새로운 단편의 삽입, 연결(ligation), 결실(deletion), 삽입, 절단 등의 조작을 하여, 원하는 서열의 성분을 재단할 수 있다. 일단 구조물이 완성되면, 그 다음에는 이것을 숙주 세포의 형질전환 방식에 따라 더욱 조작하기 위하여 적합한 벡터로 이동시킬 수 있다.

일반적으로, 재조합 구조물 내에는 숙주에서의 발현을 위해 필요한 조절 영역을 가지고 형질전환 세포의 선별을 제공하는 구조 유전자가 포함될 것이다. 유전자는 세포 독성제, 예를 들어 항생 물질, 중금속, 독소 등에 대한 내성을 제공할 수 있고, 대응 배열은 영양요구성 숙주에 대한 원형양성, 바이러스 면역성 등을 제공할 수 있다. 마찬가지로, 예컨대 GUS와 같은 색변화에 의해 확인 가능한 화합물 또는 루시페라제(luciferase)와 같은 발광성물질을 생산하는 효소를 코드화하는 유전자가 유용하다. 발현 구조물이 도입되는 상이한 숙주종에 따라, 1종 이상의 마커를 형질전환된 조직의 선별 또는 검출을 위해 사용할 수 있고, 여기서는 선별을 위해 상이한 조건이 상이한 숙주에 대해서 사용된다.

식물의 형질전환을 위해 아그로박테리움을 사용하는 경우에는, 한쪽 말단이나 양쪽 말단에, 특히 좌측 및 우측 경계 영역으로, 보다 특히 적어도 우측 경계 영역으로 T-DNA가 접한 핵산 서열을 다지는 것이 바람직할 수 있다. 이 경계 영역은 또한 다른 형질전환 방법을 사용할 때에도 유용할 수 있다.

식물의 형질전환을 위해 아그로박테리움이나 리조게네스(Rhizogenes)서열을 사용할 때에는, 아그로박테리움 숙주에 존재하는 Ti- 또는 Ri- 플라스미드상의 T-DNA와의 동종 재조합을 위해 숙주 내로 도입될 수 있는 벡터를 사용할 수 있다. 재조합을 위한 T-DNA를 함유하는 Ti- 또는 Ri-는 무장되거나(혹(gall) 형성을 야기할 수 있음), 무장 해제될 수 있는데(혹 형성을 야기할 수 없음), 후자는 DNA를 식물 숙주 세포에 전달시키기 위해 필요한 처리인자를 코드화하는 vir 유전자의 기능성 보체가 형질전환된 아그로박테리움 숙주 내에 존재하는 한 허용된다. 무장된 아그로박테리움 균주를 사용하면 정상 식물 세포(이것의 일부는 원하는 핵산 서열을 함유)와 종양 형성 유전자의 존재로 인해 혹이 형성될 수 있는 식물 세포의 혼합물이 형성된다. 원하는 핵산 서열을 함유하나 종양 유전자가 결여되어 있는 세포를 정상적인 유전자 이식 식물을 얻을 수 있도록 혼합물로부터 선별할 수 있다.

숙주 식물 세포를 형질전환시키기 위한 전파체(vehicle)로서 아그로박테리움을 사용하는 바람직한 방법에 있어서, T-DNA 경계 영역(들)이 접한 발현 또는 전사 구조물은 대장균 및 아그로박테리움에서 복제 가능한 넓은 숙주 범위의 벡터에 삽입될 수 있는데, 이와 같은 넓은 숙주 범위의 벡터는 문헌에 설명되어 있다. 통상적으로는 pRK2 또는 이것의 유도체가 사용된다. 예컨대 문헌[Ditta 등, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. (1980) 77 : 7347-7351] 및 EPA 0 120 515를 참조하며, 이를 본원에 참조로서 편입한다. 다른 방법으로서, 식물 세포에서 발현시킬 서열을 별개의 복제 서열이 함유된 벡터에 삽입시킬 수도 있는데, 상기 복제 서열의 한가지는 대장균에서 벡터를 안정화시키고, 다른 것은 아그로박테리움에서 벡터를 안정화시킨다. 예를 들어, 문헌[McBride 및 Summerfelt, Plant Mol. Biol. (1990) 14 : 269-276]에서는, 복제 기점 pRiHRI(Jouanin, et al., Mol. Gen. Genet. (1985) 201 : 370-374)를 이용하여 숙주 아그로박테리움 세포에서 식물 발현 벡터의 부가된 안정성을 제공한다.

아그로박테리움에서 복제될 수 있는 전술한 바와 같은 벡터를 이용하는 것이 바람직하다. 이 방법에 있어서, 플라스미드의 재조합은 필요하지 않으며, 숙주 아그로박테리움 vir 영역은 T-DNA에 접한 서열을 식물 숙주 세포로 전달시키는데 필요한 처리 인자를 공급할 수 있다.

Brassica 세포의 형질전환을 위해서는, 예를 들어 아그로박테리움 형질전환 방법을 사용할 수 있다. 이와 같은 방법 중의 한가지는 Radke 등(Theor. Appl. Genet. (1988) 75 : 685-694)에 의해 기술되어 있다.

본 발명을 일반적으로 설명하였지만, 하기 실시예에 의해 보다 용이하게 이해할 수 있을 것이다. 하기 실시예는 오직 본 발명을 설명을 위한 것으로서, 그와 같이 기재되어 있지 않는 한 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.

[실시예]

[실시예 1 - 아실-CoA 환원 효소 분석]

이하에서는, 마이크로조움 막 제조물 또는 가공화된 단백질 제조물 내에서 아-CoA 환원 효소 활성을 분석하는 방법을 설명한다.

[A. 방사성 표지 물질]

[14 C] 시안화 칼륨과 대응 알킬 메실레이트의 반응에 이어서, 알킬 니트릴을 유리 지방산으로 염기에 의해 가수분해시킴으로써, 긴 사슬의 [$1-^{14}$ C] 지방산(특이적 활성 51-56 Ci/mole), 즉 11-시스-에이코세논산, 13-시스-도코세논산 및 15-시스-테트라코세논산을 제조하였다.

유리 지방산을 에테르성 디아조메탄을 사용하여 이것의 메틸 에스테르로 변환시키고, 정제 질산은 박막 크로마토그래피(TLC)에 의해 정제하였다. 지방산 메틸 에스테르를 가수분해시켜서 다시 유리 지방산을 제조하였다. 방사화학적 순도를 3가지 TLC 방법으로 측정하였다 : 정상 실리카 TLC, 질산은 TLC 및 C18 역상 TLC. 이들 방법으로 측정된 방사화학적 순도는 92-98%였다. Young과 Lynen의 방법(J. Bio. Chem. (1969) 244:377)에 의해 대응 [$1-^{14}$ C] 유리 지방산으로부터 긴 사슬의 [$1-^{14}$ C] 아실-CoA를 10Ci/mole의 특이적 활성으로 제조하였다. 예컨대, [$1-^{14}$ C] 테트라코세노일-CoA와 같은 다른 [$1-^{14}$ C] 아실-CoA를 Amersham(Arlington Heights, IL)으로부터 구입하였다. Pletcher와 Tate의 방법(Tet. Lett, (1978) 1601-1602)을 마이크로 스케일로 변형시켜, [$1-^{14}$ C] 헥사데칸-1-올의 디크로메이트 산화에 의해 [$1-^{14}$ C] 헥사데칸알을 제조하였다. 생성물을 정제 실리카 TLC에 의해 정제하고, 사용할 때까지 핵산 용액으로서 저장하였다.

[B. 마이크로조움 막 제조물에서 환원 효소 활성의 분석]

1. 분석 1 : 20 μ M [$1-^{14}$ C] 아실-CoA(대개 테트라코세노일-CoA, 특이적 활성 2-5 Ci/mol)을 분석 대상 샘플 및 2mM NADPH와 함께 총 0.25ml의 부피로 하여 인큐베이션시킴으로써, 마이크로조움 막 제조물에서의

환원효소 활성을 측정하였다. 인큐베이션 혼합물은 또한 10% w/v 글리세롤과 1mM DTT를 함유하고, 50mM HEPES(4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄-술폰산)(본원에서, HEPES는 pH가 7.5로 조정된 1M 원액으로부터 첨가되었다)로 완충화되었다.

아실-CoA 기질을 첨가함으로써 분석을 개시하고 30℃에서 1시간 동안 인큐베이션을 수행하였다. 이 분석은 분석 튜브를 얼음 위에 놓고 즉시 0.25ml의 이소프로판올:아세트산(5:1 v/v)을 첨가함으로써 종결시켰다. 표지화되지 않은 왁스 에스테르(0.1mg)와 올레일 알코올(0.1mg)을 담체로서 첨가하였다. [14 C] 기질을 Hara와 Radin(Anal. Biochem. (1978) 90:420)의 축소된(scaled-down) 프로토콜에 의해 추출하였다. 종결된 분석물에 6ml의 헥산/이소프로판올(3:2, v/v)을 첨가하였다. 샘플을 와동(vortex)시키고 2ml의 황산나트륨 수용액(5.5% w/v)을 첨가한 다음, 다시 샘플을 와동시켰다.

2. 분석 2 : 20 μ M [14 C] 아실-CoA(대개 테트라코세노일-CoA, 특이적 활성 2-5 Ci/mol)을 분석 대상 샘플 및 2mM NADPH와 함께 총 0.25ml의 부피로 인큐베이션시킴으로써 마이크로조용 막 제조물에서의 환원 효소활성을 측정하였다. 인큐베이션 혼합물은 또한 10% w/v 글리세롤과 1mM DTT를 함유하고, 50mM HEPES(4-[2-히드록시에틸]-1-피페라진에탄-술폰산)(본원에서, HEPES는 pH가 7.5로 조정된 1M 원액으로부터 첨가되었다)로 완충화되었다. 만일 막 제조물에 역시 존재하는(그리고 환원 효소 반응의 생성물을 소모하는) 아실 CoA : 알코올 아실 전이 효소의 활성을 억제시키고자 한다면, 분석 혼합물에 0.3% w/v CHAPS를 첨가한다. 이 CHAPS의 농도는 환원 효소에 대하여 극미한 영향을 미치지만 아실 전이 효소 반응을 완전히 억제하기 때문에, 환원 효소의 활성에 대한 정량을 단순화한다. 아실-CoA 기질을 첨가함으로써 분석을 개시하고, 30℃에서 1시간 동안 인큐베이션을 수행하였다. 이 분석은 분석 튜브를 얼음 위에 놓고 즉시 0.25ml의 이소프로판올:아세트산(4:1 v/v)을 첨가함으로써 종결시켰다. 표지화되지 않은 왁스 에스테르(25 μ g), 올레일 알코올(50 μ s) 및 올레산(50 μ s)을 담체로서 첨가하였다. [14 C] 기질을 Hara와 Radin(Anal. Biochem. (1978)90:420)의 축소된(scaled-down) 프로토콜에 의해 추출하였다. 종결된 분석물에 4ml의 헥산/이소프로판올(3:2, v/v)을 첨가하였다. 샘플을 와동시키고, 2ml의 황산나트륨 수용액(6.7%, w/v)을 첨가한 다음, 다시 샘플을 와동시켰다.

[C. 가용화된 환원 효소 활성의 분석]

가용화된 환원 효소 활성을 분석하기 위해서는 효소의 활성화를 위한 염의 첨가를 포함하여 몇 가지 변경이 필요하다. 가용화된 환원 효소 분석을 위한 분석 완충액은 마이크로조용 막 제조물의 분석에 대하여 전술한 바와 같으나, 다음 사항들이 변경되었다:

- a. NaCl을 0.3 내지 0.5M 사이의 최종 농도로 첨가한다.
- b. EDTA를 ~1mM로 포함시킨다.
- c. 전형적으로 0.75%의 CHAPS를 함유하는 분석 대상 효소 샘플을 $\leq 0.3\%$ 로 희석시킨다(CHAPS에 대한 CMC는 ~0.5%이다).

[D. 분석 생성물에 대한 분석]

마이크로조용 막 제조물 환원 효소 분석 또는 가용화된 환원 효소 분석의 생성물을 분석하기 위해서, 2가지 프로토콜이 개발되었다. 이하 “광범위 분석법”이라고 하는 한 프로토콜은 보다 시간 소모적이지만 보다 고도한 정량적 결과를 제공한다. 이하 “신속 분석법”이라고 하는 다른 프로토콜도 또한 환원 효소 활성에 대한 측정을 제공하지만, 더 신속하고 보다 편리하며 덜 정량적이다.

1. 광범위 분석법 : 황산나트륨을 첨가하고 샘플을 와동시킨 다음, 상층 유기상을 제거하고 하층 수성상을 4ml 헥산/이소프로판올(7:2 V/V)로 세척하였다. 유기상을 모으고 질소 기류 하에 증발시켜서 건조시켰다. 지질잔류물을 소량의 헵탄에 재현탁시키고 분석을 액체 섬광 계수법에 의해 방사성 분석하였다. 샘플의 나머지를 사용하여 표지화된 클래스에 대하여 TLC 분석하거나 왁스 에스테르를 절단시키기 위해 유도함으로써 생성된 총알코올의 측정을 제공할 수 있다.

지질류 분석을 위하여 샘플을 실리카 TLC 플레이트에 적용하고, 이 플레이트를 헥산/디에틸에테르/아세트산(예컨대 80:20:1 또는 70:30:1 v/v/v)으로 전개시켰다. 지질류, 주로 왁스 에스테르(마이크로조용 막 제조물 분석법에 있어서와 같이 리가아제가 존재할 때), 유리 지방산, 지방 알코올, 및 원점의 극성 지질들간의 방사성 분포를 AMBIS 방사성 분석 영상화 시스템(AMBIS System Inc., San Diego, CA)을 이용하여 측정하였다. 필요하다면 각각의 지질류를 더욱 분석하기 위해 TLC플레이트로부터 회수할 수 있다.

왁스 에스테르의 절단을 위해서는, Pina 등(Lipids (1987) 22:358-361)의 Grignard 유도 프로토콜을 기초로 한 축소된 프로토콜을 사용하였다. 200 μ g의 담체 왁스 에스테르가 첨가된 샘플을 테플론(teflon)으로 라이닝된 나사 마개가 장착된 유리관내에서 건조시켰다. 그 다음에, 순서대로 건조 디에틸에테르(0.4ml), 에틸 아세테이트(3 μ l), 그리고 디에틸에테르(0.1ml)내의 3M 브롬화 에틸 마그네슘을 첨가하였다. 샘플을 와동시키고 실온에서 2시간 이상 동안 방치한 후, 수포화 디에틸에테르를 조심스럽게 첨가하여 여분의 시약을 분해하였다. 1M HCl과 헥산을 각각 2ml씩 첨가하고 튜브를 와동시켰다. 상층 유기상을 물로 세척(2 \times 2ml)하고, 50-100 μ l의 에탄올의 존재 하에 증발시켜서 건조시켰다.

샘플을 50-100 μ l의 헥산에 재현탁시키고 TLC 플레이트에 적용하였다. 정상 및 역상 TLC 시스템 둘 다를 사용하여 분석하였다. 정상 TLC에서는 실리카 TLC 플레이트를 사용하고, 헥산/디에틸에테르/아세트산(70:30:2v/v/v)을 사용하여 전개시켰다. 역상 시스템에서는 메탄올로 전개시키는 C18 플레이트를 사용하였다.

2. 신속 분석법: 황산나트륨을 첨가하고 샘플을 와동시킨 다음, 공지의 백분율의 유기상을 취하여 액체 섬광 계수법에 의해 계수하였다. 계산에 의해 유기상 내의 총 계수를 평가하였다. 그 다음에는 유기상의 다른 부분을 취하여 질소 하에서 건조시킨 후, 헵탄에 재현탁시켜 TLC 플레이트에 스폿팅(spottting)하고 전개시키고 나서, 상세한 분석법에 설명된 바와 같이 스캐닝(Scanning)하였다. 이와 같은 방법으로, 알

코울에 혼입된 총 계수의 백분율을 결정하였다.

[실시에 2- 호호바 아실-CoA 환원 효소의 특성 확인]

여기에서는, 환원 효소 활성을 가지는 호호바 단백질 제조물을 얻기 위한 방법 및 이 효소 활성에 대한 연구 결과를 제공한다.

[A. 종자의 발생 및 아실-CoA 환원 효소 활성의 프로파일]

미국 캘리포니아주 데이비스시에서 5개 식물에 대하여 두 번의 여름에 걸쳐서 배의 발생을 추적하였다. 배의 신생 건조 중량은 약 80일째부터 약 130일째까지 아주 고른 속도로 증가하는 것으로 밝혀졌다. 지질 추출에서는, 배의 신생 중량이 약 300mg(약 80일째)에 도달했을 때, 건조 중량에 대한 지질 중량의 비율이 50%의 최고 수준에 치르는 것으로 밝혀졌다.

실시에 1에 설명된 바와 같이 발생하는 배에서 아실-CoA 환원 효소 활성을 측정하였다. 호호바 종자의 피막이 억제 인자인 것으로 결정되었기 때문에, -70℃로 저장하기 위해 배를 액체 질소 내에서 동결시키기에 앞서서 종자의 피막을 제거하였다.

무세포 균질화액 또는 막 분획에서 측정된 아실-CoA 환원 효소 활성에 대한 발생 프로파일은 환원 효소 활성에 있어서의 큰 유도 작용을 나타내는데, 이는 개화 후 약 115일째에 최고조(peak)를 이루었다. 그러므로, 효소학 연구를 위한 배를 개화 후 약 90일 내지 110일째 사이에 채취하였는데, 그 기간에는 환원 효소 활성이 높고, 지질의 침착이 최고 수준에 도달하지 않았고, 종자의 피막이 용이하게 제거된다. 환원 효소 활성 증가의 최고속도는 개화 후 80 내지 90일째 사이에 나타났다. 그러므로, cDNA 라이브러리 제조를 위한 배를 환원 효소 단백질의 합성 속도가 아마 최고조일 개화 후 약 80 내지 90일 사이에 채취하였다. 이에 대응하여, 아실-CoA 환원 효소를 코드화하는 mRNA의 수준이 이 단계에서 최고인 것으로 추정된다.

[B. 분획화 연구]

호호바 배 샘플을 분획화하기 위한 초기의 시도에서는 원심분리에서 유래되는 지방 패드, 상층액, 및 미립자 분획에 있어서 환원 효소 활성의 다양한 분포가 초래되었다. 예컨대 초음파 처리, 부유화 구배, 그리고 추출 완충액에 대한 다양한 작용제의 첨가와 같이, 활성의 분포에 영향을 미칠 수 있는 다수의 처리 방법이 시험되었다. 추출 완충액에 염을 포함시키면, 100,000 × g로 1시간 동안 원심분리시켰을 때 상층액 분획에서 리가아제 활성의 회수에 있어서 최대의 개선이 이루어졌다. 추출 완충액은 3M NaCl, 0.3M 수크로오스, 100mM HEPES, 2mM DTT, 그리고 프로테아제 억제인자, 1mM EDTA, 0.7 μg/ml의 로이펍틴(leupeptin), 0.5 μg/ml의 펩스타틴(pepstatin) 및 17 μg/ml의 페닐메탄술폰닐 플루오라이드(PMSF)로 이루어진다.

[C. 마이크로조용 막 제조물]

투석 후 100,000 × g로 원심분리하거나 황산암모늄 분획화하여, 상기 상층액 분획으로부터 높은 수준의 환원 효소 활성을 가진 입자를 얻을 수 있었다. 투석 방법은 실시에 3에 상세하게 설명되어 있다. 예컨대, 밀도 구배 원심분리, 겔 투과 크로마토그래피, 및 단백질/인지질 분석법과 같은 환원 효소 활성을 가진 상기 입자에 대한 추가의 분석에서는, 상기 입자들이 막 분획을 나타낸다는 점을 확인하였다. 이 막 제조물은 또한 높은 시토크롬 C 환원 효소 활성을 가지는데, 이 활성은 소포체(ER) 막의 마커로서 사용된다. 따라서, 이러한 연구에서는 환원 효소 단백질이 막과 결합되어 있다는 것을 확인할 수 있다.

황산암모늄 분획화에 있어서는, 100,000 × g의 상층액을 본질적으로 실시에 3에 설명된 바와 같이 호호바 배로부터 얻었다. 같은 부피의 황산암모늄 용액(33.2g/100ml)을 상층액 분획에 서서히 첨가(교반하면서)하여 황산암모늄의 농도를 30%에 이르게 하였는데, 이 농도는 환원 효소를 효과적으로 침전시킨다. 다시 30분 동안 교반한 다음, 현탁액을 26,000 × g로 30분간 원심분리시키고, 25mM HEPES, 1M NaCl, 1mM DTT, 0.1M PMSF로 구성된 용액을 사용하여, 제1상층액 분획 S1의 1/10 부피에 펠릿을 재현탁시켰다. 현탁액을 100,000 × g로 1시간 동안 원심분리시키고, 수득한 펠릿을 25mM HEPES, 10% 글리세롤(S1 부피의 1/10)에 재현탁시켰다. 이 현탁액을 100,000 × g로 원심분리시켜서 세척된 마이크로조용 펠릿 P4를 수득한 다음, 이것을 25mM HEPES와 10% 글리세롤로 이루어진 S1 부피의 1/20에 재현탁시켜서 약 3-4mg/ml 농도의 단백질을 수득하였다. 나중에 사용을 위해 분액들을 -70℃로 동결시켰다.

[D. 환원 효소 활성의 막 관련에 대한 연구]

Bordier(J. Biol. Chem. (1981) 256 : 1604-1607)의 Triton X144 상 분획화 방법을 사용하여, 호호바 환원 효소가 구성 막 단백질인지, 아니면 막층에 보다 느슨하게 결합되었는지(보다 고친수성 단백질인지)를 결정하였다. 이 기술에는 본질적으로 얼음 위에서 1% Triton X144와 함께 막을 인큐베이션시키고 나서 혼합물의 온도를 이 조건에서 세제의 흐림점 초과로 상승시키는 것이 포함된다(흐림점이란 매우 큰 미셀(micell)이 자발적으로 형성되기 시작하는 온도로서, 1% Triton)(144에 대하여 ~20℃이다). 원심분리하면, 세제가 농후한 하층상과 세제가 없는 상층상(이하, 수성상이라고 한다)으로 이루어진 2개의 뚜렷한 상을 관찰할 수 있다. 구성 막 단백질은 세제가 농후한 상 안으로 우선적으로 분배되는 반면, 친수성이 더 큰 단백질은 수성상에서 회수되는 것으로 나타났다. 호호바 막 제조물을 이 Triton × 144 상 분획화 프로토콜에 적용시키는 경우, 환원 효소 활성은 세제가 농후한 상과 결부되고, 수성상에서는 환원 효소 활성이 전혀 검출되지 않았다. 이것은 환원 효소가 구성 막 단백질이라는 증거이다.

[E. 환원 효소에 대한 추가의 특성 확인]

전술한 마이크로조용 막 단백질을 이용하여 환원 효소의 특성을 더 확인한다. 환원 효소는 pH 5-9의 범위에 걸쳐서 활성인 것으로 나타났다. 세포질의 추정된 생리적 pH에 근접한 pH 7.5에서 특성 확인 실험을 수행하였다.

1. 염의 효과 : 환원 효소의 활성에 대한 다양한 염의 효과를 1염기 염에 대하여 0.5M의 표준 농도를 사

용하여 시험하였다. 2가의 양이온 또는 음이온을 가진 염을 0.167M(0.5M의 1/3)의 염과 동일한 이온 농도를 제공) 및 0.5M에서 시험하였다. 15배까지의 자극이 0.5M NaCl의 첨가에서 관찰되었다. 1가 및 2가의 다른 염(예컨대, LiCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ 및 Na₂SO₄)도 NaCl 자극에 비해 일반적으로 적은 수준이지만 역시 환원 효소 활성을 자극하는 것으로 나타났다. 매우 카오트로픽(chaotropic)한 염인 KSCN과 NaSCN은 환원 효소 활성을 전혀 자극하지 않거나 최저로 자극한다.

2. 기타 작용인자 : 디티오프레이톨(DTT)은 환원 효소 활성에 대하여 자극적이지만 반드시 그럴지는 않은 반면, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)은 어느 정도의 자극을 주고, 최적 농도는 2.5mM인 것으로 발견되었다. 낮은(0.02-0.075mg/ml) BSA(소 혈청 알부민) 농도에서는 적은 활성의 자극이 관찰된 반면, 0.2mg/ml 이상의 BSA 농도에서는 활성의 억제가 관찰되었다.

아실-CoA 환원 효소가 NADPH 특이적 활성이라는 초기의 관찰(Pollard 등, 상기 참조)을 확인할 수 있었다. 어떠한 NADH-의존성 활성도 바탕값(NADPH-의존성 활성의 2% 미만) 초과로 측정가능하지 않았다. 또한, 환원 효소 반응의 수용성 최종 생성물 CoA 및 NADPH는 활성의 현저한 억제(mM 농도에서)를 제공하는 반면, NADH 및 NAD⁺는 활성에 영향을 거의 미치지 않았다.

3. 기질 특이성 : 다양한 사슬 길이의 지방산의 티오에스테르인 아실-ACP 및 아실-CoA를 환원 효소에 대한 기질로서 비교하였다. 테트라코세노일-CoA(24:1-CoA) 기질은 더 높은 농도에서 강한 기질 억제 작용을 나타내기 때문에, 10 μ M의 기질 농도에서 시험을 수행하였다. 이 분석에 있어서 NaCl 농도는 0.5M이었다. 기질 특이성 실험의 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

환원 효소의 아실 특이성

아실기	환원 효소 활성 (pmoles/min/ μ l)	
	아실-ACP (10 μ M)	아실-CoA (10 μ M)
12:0	<0.01	<0.15
16:0	2.9	<0.4
18:0	-	1.4
18:1	1.05	0.75
20:1	-	1.0
22:1	-	1.0
24:1	-	19.9

테트라코세노일-CoA가 시험한 것들 중에서 기질 활성이 가장 높았기 때문에, 추가의 효소 정제 및 특성 확인 실험에서 환원 효소 분석을 위해 사용하였다. 팔미토일-CoA(C16:0-CoA) 및 팔미토일-ACP(C16:0-ACP)를 기질로서 직접 비교하였다. 팔미토일-CoA에 대한 활성은 거의 바탕값 초과인적이 없었지만, 팔미토일-ACP에 대한 활성은 높았다. 이전에는, 스테아로일-ACP(C18:0-ACP)가 기질로서 활성을 가지는 것으로 나타났다(Pollard 등, 상기 참조).

또한, 팔미토일-CoA가 환원 효소에 대한 열등한 기질인 것으로 나타났지만, 표지화되지 않은 팔미토일-CoA(0-30 μ M)와 [¹⁴C] 테트라코세노일-CoA(20 μ M)를 사용하여 수행된 경쟁 억제 실험에 있어서는, 테트라코세노일-CoA에 대한 환원 효소 활성의 50% 억제 작용이 5 μ M 팔미토일-CoA에서 발생하였다. 따라서, 팔미토일-CoA는 분석 조건에서 열등한 기질이지만, 효과적인 억제인자이다.

4. 환원 효소의 억제인자 분석 : 다른 유형의 환원 효소 단백질의 몇 가지 공지된 억제인자를 호호바 아실-CoA 환원 효소 활성에 대한 효과에 관하여 시험하였다. HMG-CoA 환원 효소(3-히드록실-3-메틸글루타릴-조효소A 환원 효소)의 강한 억제인자인 메비놀린(Mevinolin)만이 HMG-CoA 환원 효소에 대하여 억제성인 농도(약 1nM의 K_i)에 비해 비교적 높은 농도(100 μ M)에서 효과적이었다. 세룰리닌(Cerulinen)은 β -케토아실 티오에스테르 신타제에 공유 결합하는 것으로 널리 공지되어 있지만, 호호바 아실-CoA 환원 효소에 대한 강한 억제 효과는 전혀 가지지 않는다.

술피드릴 차단제를 또한 환원 효소 활성에 대한 작용에 관하여 스크리닝하였다. N-에틸말레이미드는 활성을 강하게 억제하며, 파라-히드록시머큐리벤조에이트도 또한 약간의 억제 효과를 가지고, 요오도아세트아미드는 효과가 전혀 없는 것으로 나타났다. 이러한 증거로부터, 아실-CoA 환원 효소가 다양한 술피드릴 차단 시약에 대해 상당한 선택성을 나타내는 본질적인 술피드릴기를 가진다는 결론이 유도되었다.

[실시예3-아실-CoA 환원 효소의 정제]

환원 효소 활성을 가진 호호바 막 제조물의 분리, 환원 효소 활성의 가용화, 및 환원 효소 단백질의 추가의 정제를 위하여 사용될 수 있는 방법을 설명한다.

[A. 마이크로조용 막 제조물]

배의 수분 함량(45-70%)을 측정함으로써 추정되는, 개화 후 약 90-110일째에 호호바의 배를 채취하였다.

외피 및 종자의 피막을 제거하고 떡잎을 나중에 사용하기 위해 액체 질소 내에서 급속히 동결시켜 -70°C 로 저장하였다. 초기의 단백질 제조물을 위해, 동결된 배를 강철 모르타르 내에서 분쇄시킴으로써 분말화하고 액체 질소의 온도에서 마쇄하였다. 전형적인 실험에서, 70g의 배가 처리되었다.

70g의 배당 280ml의 용액의 비율로 분말을 다음의 고염 용액에 첨가하였다: 3M NaCl, 0.3M 수크로오스, 100mM HEPES, 2mM DTT, 그리고 프로테아제 억제인자, 1mM EDTA, $0.7\mu\text{g/ml}$ 의 로이펩틴, $0.5\mu\text{g/ml}$ 의 펩스타틴 및 $17\mu\text{g/ml}$ 의 PMSF. Polytron 조직 균질화기를 약 30초 동안 사용하여 분말화된 배를 완충액에 분산시킴으로써 무세포 균질화액(CFH)을 제조하였다. 3개 층의 Miracloth (CalB ioChem, LaJolla, CA)를 통해 균질화액을 여과시키고, 여과물을 $100,000 \times g$ 로 1시간 동안 원심분리시켰다.

수득한 샘플은 펠릿, 상층액 및 부유 지방 패드로 구성되었다. 지방패드를 제거하고 상층액 분획을 수집하여, 1M NaCl, 100mM HEPES, 2mM DTT 및 1mM EDTA가 함유된 용액에 대하여 밤새 투석하였다(완충 용액을 3회 교환하였다). 투석물을 $200,000 \times g$ 로 1시간 동안 원심분리시켜서 펠릿 DP2를 수득하였다. 이 펠릿을 25mM HEPES(pH 7.5), 10%(w/v) 글리세롤, 1mM EDTA 및 0.5M NaCl에 원래 CHF 부피의 약 1/20로 분산시켜서 마이크로조용 막 제조물을 수득하였다.

실시에 1에 기술된 바와 같이 활성을 분석하였다. 아실-CoA 환원효소 활성의 회수율은 무세포 균질화액에서 원래의 활성의 약 30%로 측정되었다. 이 제조물에서 아실-CoA 환원 효소 활성은 -70°C 로 저장되었을 때 안정하였다.

[B. 환원 효소 단백질의 가용화]

고체 CHAPS (3-[(3-콜라미도프로필)-디메틸-암모니오]-1-프로판술포네이트)를 마이크로조용 막 제조물에 첨가하여 2%(w/v)의 최종 농도를 수득하였다, 샘플을 얼음 위에서 약 1시간 동안 천천히 진동시키면서 인큐베이션한 다음, 25mM HEPES(pH 7.5), 10% 글리세롤, 0.34M NaCl, 1mM EDTA로 희석시켜서 CHAPS 농도를 0.75%까지, 그리고 NaCl 농도를 약 0.4M까지 감소시켰다. 그 다음에는 샘플을 $200,000 \times g$ 로 1시간 동안 원심분리시키고 상층액을 회수하여 실시예 1의 설명대로 환원 효소 활성을 분석하였다. 전형적으로는, 마이크로조용 막 제조물로부터 환원 효소 활성의 85%가 상층액 분획에서 회수되었다. 가용화된 환원 효소의 활성은 -70°C 로 저장되었을 때 안정하였다.

[C. 블루 A 컬럼 크로마토그래피]

블루 A(Cibacron Blue F3GA; Amicon Division, W.R. Grace & Co.)를 함유하고 베드 부피가 약 25ml인 컬럼($1.8 \times 10\text{cm}$)을 제조하고, 이 컬럼을 0.4M NaCl이 함유된 완충액 A(25mM HEPES(pH 7.5), 20%(W/V) 글리세롤, 0.75% CHAPS, 1mM EDTA)로 평형시켰다. 상기 가용화된 환원 효소제조물을 블루 A 컬럼에 로딩하였다.

컬럼을 0.4M NaCl이 함유된 몇 컬럼 부피의 완충액 A로 세척시키고 나서, 0.5M NaCl이 함유된 완충액 A로 더욱 세척하였다. 90% 초과와 환원효소 활성이 컬럼에 결합되었고, 다른 단백질의 85% 초과가 통과하였다. 1.0M NaCl이 함유된 완충액 A를 사용하여 컬럼으로부터 환원 효소 활성을 용출시켰다. 분획을 수집하고 실시예 1에 설명된 대로 환원 효소 활성을 분석하였다. 환원 효소 활성을 함유하는 분획을 모아서 -70°C 로 저장하였다. 전형적으로, 로딩된 환원 효소 활성의 30-50%를 1.0M NaCl 완충액으로 용출시켜서 회수하였다.

[D. 크기 배제 크로마토그래피]

블루 A 컬럼으로부터 모은 활성 분획을 YM30 막(Amicon Division, W.R. Grace)이 구비된 압력 셀(cell)에서 한외 여과에 의해 약 10배 농축시켰다. 전형적으로, 활성을 블루 A 컬럼으로부터 $\sim 90\text{ml}$ 로 용출시키고 $\sim 8\text{ml}$ 로 농축시킨 다음, 다음과 같이 2개의 세파크릴 S100 컬럼에 적용시켰다. 컬럼($2.5 \times 75\text{cm}$)을 S100HR 매질(Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ)로 패키징하고, 0.5M NaCl이 함유된 완충액 A로 평형시켰다. 컬럼을 다음의 표준 단백질을 이용하여 크기 검정하였다: 소 혈청 알부민(66kD), 탄소탈수 효소(28kD), 시토크롬 C(12.4kD), 및 청색 덱스트란(공극 부피를 결정하기 위해 사용됨). 농축된 샘플의 4ml 분액을 각각의 S100 컬럼에 적용시키고, 이것을 약 17cm/hr 의 선형 유속으로 전개시켰다. 약 4시간 동안 분획을 수집하고, 분획들의 환원 효소 활성을 실시예 1에 설명된 바와 같이 측정하였다.

로딩된 활성의 60% 초과를 약 49kD의 외견 분자량으로 용출되는 1개의 주된 피이크로 회수하였다. 모은 활성 분획의 부피는 $\sim 30\text{--}35\text{ml}$ /컬럼이었다.

[E. 친화성 크로마토그래피]

컬럼($1.5\text{cm} \times 2\text{cm}$)을 팔미토일-CoA 아가로스(Sigma Chemical Co., St. Louis MO)로 패키징하고 완충액 B(0.1M NaCl이 함유된 완충액 A)와 평형시켰다. 겔 여과 컬럼으로부터 모은 활성 분획을 상기와 같이 한외 여과에 의해 16배 농축시켰다. 농축된 샘플내의 NaCl 수준을 완충액 A로 희석시켜 0.5M에서 $\sim 0.1\text{M}$ 로 감소시켰다. 희석된 샘플을 컬럼에 적용하고 나서 몇 컬럼 부피의 완충액 B로 세척하였다. 그 다음에, 컬럼을 15mM NADH가 함유된 10ml의 완충액 B로 세척하고, 완충액 B로 더욱 세척하였다. 컬럼을 통해 15ml 완충액 B내의 15mM NADPH를 통과시켜서 환원 효소 활성을 용출시켰다. 전형적으로, 1회에 1개의 겔 여과 컬럼으로부터의 물질을 친화성 컬럼상에서 처리하여, 컬럼에 적용된 활성의 70% 초과를 NADPH로 용출시킴으로써 회수하였다. 활성 분획을 모으고, 환원 효소 활성, 단백질 농도 및 폴리펩티드 조성에 대하여 분석하였다. Bradford(Anal. Biochem, (1976)72:248-254)의 염료 결합 방법을 기초로 한 시판 키트(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. BSA를 기준단백질로 사용하였다.

[F. SDS PAGE 분석]

SDS PAGE(Laemmli, U.K. (1970) Nature(London) 227:680-685)에 의해서 샘플의 폴리펩티드 조성을 분석하였다. SDS 및 디티오프레이톨을 원액으로부터 각각 2% 및 30mM의 최종 농도로 첨가함으로써, 전기 영

동을 위한 샘플을 제조하였다. 12%의 분리 겔을 가지는 아크릴아미드 겔(NOVEX, San Diego, CA)의 웰에 약 50 μ l의 샘플을 로딩하였다. Bio-Rad Laboratories 사로부터 분자량 표준을 구입하였다. 은 염색법(Blum 등, Electrophoresis (1987) 8:93-99)에 의해 단백질을 검출하였다.

약 52 및 54kD의 외견 분자량을 가지는 2개의 현저한 폴리펩티드 밴드가 친화성 컬럼으로부터의 활성 샘플에서 검출되었고, 이들은 함께 이 제조물에서 95% 초과 단백질의 나타낸다. 천연 상태에서 환원 효소의 외견크기가 약 49kD이므로(크기 배제 크로마토그래피 및 상기한 바에 따라 측정), 이 밴드들은 아마도 한 효소의 다른 2개의 서브유닛 보다는 환원 효소의 관련 형태를 나타낸다.

[G. 단백질을 막에 블로팅]

상기 환원 효소 폴리펩티드를 SDS-PAGE 후에 니트로셀룰로오스 또는 PVDF, Immobilon-P(Millipore; Bedford, MA) 또는 ProBlott(Applied Biosystems; Foster City, CA) 막에 이동시킴으로써, 아미노산 서열화를 위해 더욱 분리하였다. 단백질을 그 후에 효소적으로 절단시킬 때에는 니트로셀룰로오스가 바람직한 반면, N-말단 서열화 방법 및 브롬화시안 절단으로부터의 펩티드 서열화를 위해서는 PVDF가 유용하다.

1. 니트로셀룰로오스로 블로팅 : 단백질을 니트로셀룰로오스로 일렉트로블로팅할 때, 블로팅 시간은 전형적으로 예컨대 5-20% 메탄올 내의 25mM Tris, 192mM 글리신과 같은 완충액에서 1-5시간이다. 일렉트로블로팅 후에, 막을 1%(v/v) 아세트산내의 0.1%(w/v) Ponceau S에서 2분간 염색시키고, 2-3회 교환되는 0.1%(v/v) 아세트산에서 각 교환마다 2분간 염색을 제거하였다. 그 다음에는, 이 막을 -20°C의 열-접착 플라스틱 백에서 습윤상태로 저장하였다. 만일 시간이 허용되면, 불꽃을 동결시키지 않고 이하 설명되는 아미노산 서열의 결정을 위한 펩티드를 생성시키기 위해 절단에 즉시 사용한다.

2. PVDF로 블로팅 : 단백질을 Immobilon P PVDF로 일렉트로블로팅할 때, 블로팅 시간은 일반적으로 예컨대 10%(v/v) 메탄올내의 12.5mM Tris/5mM 글리신과 같은 완충액에서 약 1-2시간이었다. PVDF로의 일렉트로블로팅 후에, 막을 50%(v/v) 메탄올/10%(v/v) 아세트산내의 0.1%(w/v) 쿠마시에 블루(Coomassie Blue)에서 5분간 염색시키고, 2-3회 교환되는 50%(v/v)메탄올/10%(v/v) 아세트산에서 각 교환마다 2분간 염색을 제거하였다. 그 다음에는, 막을 30분간 공기 건조시키고 나서 -20°C의 열-접착 플라스틱 백에서 건조상태로 저장하였다. 예컨대, ProBlott와 같은 PVDF 막에 블로팅된 단백질을 직접 사용하여 완전한 단백질의 N-말단 서열을 결정할 수 있다. 이하, 실시예 4A에서는 ProBlott에 단백질을 일렉트로블로팅시키기 위한 프로토콜을 설명한다.

[실시예 4-아미노산 서열의 결정]

본 실시예에서는, 아실-CoA 환원 효소 활성과 관련된 식물 단백질의 아미노산 서열 결정 방법을 설명한다.

[A. 단백질의 브롬화시안 절단 및 펩티드의 분리]

Promega, Inc.(Madison, WI)의 Probe-Design Peptide Separation System Technical Manual에 설명된 방법을 이용하여, 대상 단백질에 대하여 브롬화시안 절단을 수행하였다. 상기 PVDF 막에 환원 효소 단백질을 블로팅하였다. 불꽃으로부터 단백질 밴드를 잘라내어 70%(v/v) 포름산내의 브롬화시안 용액에 넣고, 이 용액에서 실온으로 밤새 인큐베이션하였다. 이 인큐베이션 후에 브롬화시안 용액을 제거하고 모은 다음, Reach-Vap Evaporator(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 연속 질소 스트림 하에 건조시켰다. 예컨대, 70%(v/v) 이소프로판올, 0.2%(v/v) 트리플루오로아세트산, 0.1mM 리신 및 0.1mM 티오글리콜산과 같은 펩티드 용출 용매를 사용하여, 브롬화시안 단백질의 추가적 용출을 수행함으로써 완전한 제거를 확실하게 할 수 있었다. 그런 다음, 용출 용매를 제거하여 건조된 브롬화시안 용액이 함유된 튜브에 첨가하고 상기와 같이 건조시켰다. 새로운 용출 용매를 사용하여 용출 과정을 반복할 수 있다. 그 다음에는, 50 μ l의 HPLC급 물을 건조된 펩티드에 첨가하고, 물을 Speed-Vac(Savant, Inc., Farmingdale, NY)에서 증발에 의해 건조시켰다.

Schaeffer 및 von Jagow(Anal. Biochem, (1987) 166:368-379)에 의해 개시된 것과 비슷한 Tris/Tricine SDS-PAGE 시스템을 이용하여 펩티드를 분리하였다. 겔을 125-150볼트의 일정 전압으로 약 1시간 동안 또는 추적염료가 겔의 바닥 가장자리로부터 흘러나오기 시작할 때까지 작동시켰다. 이동시키기 전에, 겔을 15-30분 동안 이동 완충액(125mM Tris, 50mM 글리신, 10%(v/v) 메탄올)에 침지시켰다. 겔을 ProBlott 서열화 막(Appried Biosystems, Foster City CA)으로 2시간 동안 50볼트의 일정 전압으로 블로팅하였다. 막을 쿠마시에 블루(50%(v/v) 메탄올/10%(v/v) 아세트산 내에 0.1%)로 염색시키고, 50%(v/v) 메탄올/10%(v/v) 아세트산에서 2분씩 3회 염색 제거하였다. 막을 -20°C로 건조 저장하기 전에 30-45분 동안 공기 건조시켰다.

ProBlott에 블로팅된 펩티드를 Polybrene-피복된 유리 섬유 필터의 첨가 없이 단백질 서열화기의 서열화기 카트리지에 직접 로딩할 수 있다. 펩티드를 Applied Biosystem에 의해 공급되는 약간 변형된 반응 사이클 BL0T-1을 이용하여 서열화하였다. 또한, 용액 S3(염화부틸)을 S1과 S2(n-헵탄 및 에틸 아세테이트)의 50:50 혼합물로 교체하였다. ProBlott에 블로팅된 샘플을 서열화할 때마다 상기의 2가지 변형을 이용하였다.

[B. 프로테아제 절단 및 펩티드의 분리]

서열화를 위한 펩티드를 얻기 위해, 니트로셀룰로오스에 블로팅된 단백질을 프로테아제로 절단시킬 수 있다. 사용된 방법은 Aebersold 등의 방법(PNAS (1987) 84:6970)이었다. 환원 효소 단백질, 및 대조구로서 사용될 동일량의 바탕(blank) 니트로셀룰로오스를 니트로셀룰로오스 막으로부터 절단하고 Ponceau S를 제거하기 위해 HPLC급 물로 수회 세척하였다. 이 세척 후에, 0.5% 아세트산내의 0.5% 폴리비닐피롤리돈(PVP-40, Aldrich, Milwaukee, WI) 1.0ml를 막 조각에 첨가하고, 이 혼합물을 37°C로 30분간 인큐베이션하였다. PVP-40을 완전히 제거하기 위해, 니트로셀룰로오스 조각을 많은 양의 HPLC급물로 세척(8×5