



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월14일
(11) 등록번호 10-2613552
(24) 등록일자 2023년12월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 9/0073 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0120518
- (22) 출원일자 2020년09월18일
심사청구일자 2020년09월18일
- (65) 공개번호 10-2021-0034527
- (43) 공개일자 2021년03월30일
- (30) 우선권주장
1020190116019 2019년09월20일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
J. Biosci. Bioeng., 2013, Vol. 116(2), pp. 246-252*
박윤정, 성균관대학교 석사학위논문, 2019.6
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
엠브릭스 주식회사
경기도 화성시 동탄첨단산업1로 27, 비동2944호(영천동, 동탄금강펜테리움아이엑스타워)
- (72) 발명자
권대혁
경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 융합생명공학과(천천동)
박윤정
경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 융합생명공학과(천천동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

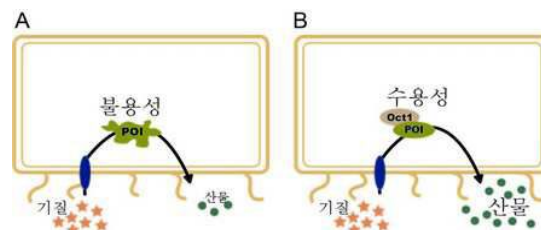
심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 목적 단백질의 수용성 및 열안정성을 증가시키기 위한 태그 단백질 및 이를 포함하는 융합 단백질

(57) 요약

본 발명은 목적 단백질 및 Oct-1 단백질을 포함하는 단백질 태그를 연결한 융합 단백질, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 구조체, 이를 포함하는 제조합 벡터, 및 이를 포함하는 형질전환 세포에 관한 것이다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
C12N 9/1048 (2013.01)
C12Y 114/13 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

배운진

경기도 화성시 영통로50번길 14, 202동 901호 (반월동, 반달마을 두산위브 아파트)

- (72) 발명자

정기준

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생
 명화학공학과 5106A호(구성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711090026
과제번호	2017R1A2B2008211
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	단백질의 활성 비의존적 초고속 대용량 분자 진화 탐색/선별 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	성균관대학교 (자연과학캠퍼스)
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

Oct-1 (Octameric transcription factor-1) 단백질을, 수용성 발현 태그로, 발현하고자 하는 단백질의 아미노 말단 또는 카르복실 말단에 융합시켜, 발현하고자 하는 단백질을 수용성 형태의 융합단백질로 발현시키는 것을 특징으로 하는 발현하고자 하는 단백질을 발현시키는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,
상기 발현하고자 하는 단백질은,
열 안정성이 증대된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 목적 단백질 및 Oct-1 단백질을 포함하는 단백질 태그를 연결한 융합 단백질, 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 구조체, 이를 포함하는 제조용 벡터, 및 이를 포함하는 형질전환 세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 살아있는 세포에서 거대한 다양성을 나타내는 효소는 세포 내에서의 활성을 유지하기 위해 가용성 형태로 발현하는 것이 중요하다. 생산물 형성을 유도하는 대사 경로에 관여하는 효소의 가용성 발현이 문제가 될 때, 효소의 용해도, 즉 수용성을 향상시키기 위해 다양한 방법이 적용될 수 있다.

[0004] 효소와 같은 목적 단백질의 수용성을 높이기 위해 융합 단백질을 이용하는 전략들이 많이 개발되어 있다. 예를 들어, GST (Glutathione S-transferases), MBP (Maltose binding protein) 또는 SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)와 같은 단백질은 그 자체가 수용성이 높기 때문에 목적 단백질과 융합 시 융합 단백질의 수용성 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 수용성을 증가시키는 태그를 부착하여도 단백질의 수용성이 증가하지 않는 경우도 많고, 태그를 부착시켰을 때 목적 단백질의 구조 형성에 영향을 미쳐 단백질 고유의 기능을 잃어버리는 경우도 있기 때문에 특정 태그 단백질이 항상 융합 단백질의 수용성에 도움이 된다고 단정할 수는 없다.

[0005] 즉, 단백질의 수용성 및 활성 발현을 위해서 다양한 태그 단백질을 융합하고자 하는 목적 단백질에 부착해 본 이후에야 그 상황에 적합한 목적 단백질을 선정할 수 있으며, 이러한 이유로 인해 융합 단백질의 수용성 및 활성 향상을 위한 다양한 태그 단백질들이 연구되고 있다.

[0006] 한편, 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 인플루엔자가 세포 내로 침입하는데 중요한 역할을 하는 헤마글루티닌의 구형의 표면 단백질로 면역원성을 나타내며 대장균에서는 수용성 발현이 어려운 것으로 알려져 있다. 인플루엔자 바이러스에 대한 백신(vaccine)의 제조는 전통적으로 불활성화된 바이러스를 사용하거나 바이러스 입자에서 추출한 HA 또는 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 단백질을 사용하고 있으나, 정제 과정에서 완전히 제거되지 못한 viral lipid 등이 함유되어 있어 어린 유아와 노인들에게는 안전성 면에서 아직도 문제가 되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Y. W. Chin 등, Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered Escherichia coli BL21star(DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase, Journal of Biotechnology, 210, 2015, pp 107-115

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 Oct-1이 태그 단백질로서 부가된 융합 단백질의 수용성이 현저히 높아짐을 확인하였고, 이때 Oct-1은 목적 단백질의 아미노 말단이나 카르복실 말단 어느 쪽에 부가되어도 융합 단백질의 수용성이 증대되었으며, 더욱이 부착 서열 (BS)이 플라스미드에 존재하지 않을 때도 융합 단백질의 수용성이 향상됨을 확인하였다.

[0010] 이에 본원에서는, 목적 단백질에 태그 단백질이 부가된 형태의 융합 단백질을 세포 내에 발현시킴으로써 융합 단백질의 수용성 및 열안정성을 증가시키고, 세포 내에서 활성형으로 발현을 유지하게 함으로써 생물전환의 효율을 증대시키는 단백질 태그를 제공하고자 하였다. 상기 목적을 달성하기 위하여, Oct-1을 태그 단백질로 이용하여 목적 단백질의 아미노 말단 또는 카르복실 말단에 부가한 융합 단백질을 제조한 후 융합 단백질의 수용성 및 활성 발현을 확인하고, 이후 활성 발현된 단백질을 이용한 전세포 측매를 제조하여 융합 단백질에 의한 유용 물질의 생산이 증진됨을 확인하고자 하였다.

[0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본원의 제 1 측면은, 목적 단백질; 및 상기 목적 단백질에 연결된, Oct-1 (Octameric transcription factor-1) 단백질을 포함하는 단백질 태그를 포함하는, 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0014] 본원의 제 2 측면은, 제 1 측면에 따른 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 구조체에 관한 것이다.
- [0015] 본원의 제 3 측면은, 제 2 측면에 따른 발현 구조체를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0016] 본원의 제 4 측면은, 제 3 측면에 따른 재조합 벡터를 포함하는 형질전환 세포에 관한 것이다.
- [0017] 상술한 과제 해결 수단은 단지 예시적인 것으로서, 본 발명을 제한하려는 의도로 해석되지 않아야 한다. 상술한 예시적인 구현에 외에도, 도면 및 발명의 상세한 설명에 기재된 추가적인 구현에 및 실시예가 존재할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따르면, Oct-1 단백질을 목적 단백질의 아미노 말단 또는 카르복실 말단에 부착한 융합 단백질을 제조함으로써 목적 단백질의 세포 내 수용성 발현을 향상시킬 수 있고 이에 따라 활성형으로 발현을 유도하고 활성형 구조를 유지할 수 있으며 열안정성이 우수한 단백질을 생성할 수 있으므로, 그러한 단백질을 발현하는 세포를 생물전환에 이용시 유용물질의 생산성을 증대시킬 수 있다. 또한, 목적 단백질이 주요한 반응을 매개하는 대사공학적으로 재설계된 미생물은 고온에서도 전세포 촉매 반응을 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 융합 단백질의 수용성 향상에 따른 전세포촉매 효율 변화에 관한 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된, Oct-1 단백질 태그가 융합된 융합 단백질 발현을 위한 재조합 플라스미드의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에서 제조된 융합 단백질의 수용성 발현을 확인한 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 재조합 플라스미드로부터 발현된 단백질의 열안정성 증대를 확인한 SDS-PAGE 결과이다.
- 도 5는 Oct-1을 포함하는 융합 단백질 발현에 Oct-1의 DNA 부착 서열의 필요성을 조사한 실험 결과이다
- 도 6은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 재조합 플라스미드를 생물전환에 이용하고 최종 산물의 생산량을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석한 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 재조합 플라스미드를 생물전환에 이용하고 최종 산물의 생산량을 고성능 액체 크로마토그래피 분석한 결과이다.
- 도 8은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 재조합 플라스미드를 생물전환에 이용하고 최종 산물의 생산량을 가스 크로마토그래피 (GC) 분석한 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 부착 부위를 포함하지 않는 재조합 플라스미드를 생물전환에 이용하고 최종 산물의 생산량을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석한 결과이다.
- 도 10은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 Oct-1 단백질 태그가 융합된 헤마글루티닌 융합 단백질(Ost1-HA) 발현을 위한 재조합 플라스미드의 모식도이다.
- 도 11은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 Oct1-HA 융합 단백질 및 HA 단백질의 수용성 발현을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 12는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 재조합 플라스미드를 이용하여 정제된 Oct1-HA 단백질의 발현을 확인한 SDS-PAGE 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수

있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였다.

- [0023] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용 오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0025] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0026] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는, "A, B, 또는, A 및 B"를 의미한다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서, "뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드"란 용어는 핵산, 바람직하게 DNA 또는 RNA를 지칭한다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미하며, 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주 세포 내로 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, 본원 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서, "재조합 플라스미드"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 삽입된 재조합 유전자가 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 발현 벡터의 일종을 의미한다. 상기 재조합 플라스미드는 통상적인 재조합 플라스미드에 포함된 요소로서 프로모터, 오퍼레이터, 개시 코돈, 종결 코돈과 같은 발현조절 요소들을 포함할 수 있고, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 재조합 플라스미드가 숙주 세포에 도입되었을 때 반드시 작용을 나타내야만 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [0031] 이하, 본 발명에 따른 융합 단백질, 발현 구조체, 재조합 벡터 및 형질전환 세포에 대하여 구현에 및 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본원이 이러한 구현에 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본원의 제 1 측면은, 목적 단백질; 및 상기 목적 단백질에 연결된, Oct-1 (Octameric transcription factor-1) 단백질을 포함하는 단백질 태그를 포함하는, 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명의 융합 단백질은 목적 단백질; 및 이에 융합하여 목적 단백질의 수용성 및 활성 발현을 증대시키고 열 안정성을 향상시키는 태그 단백질인 Oct-1;을 포함하여 단백질의 생산 및 대사공학 기술을 통한 유용물질의 대량 생산에 유용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서는 목적 단백질과 oct-1 태그의 융합 단백질인 Oct-1-POI (Octamer transcription factor-1-Protein of interest) 또는 POI-Oct-1 (Protein of interest-Octamer transcription factor-1)을 발현시킴으로써 융합 단백질의 활성형 발현이 증가된다.
- [0037] 본 발명에 따른, Oct-1과 목적 단백질이 결합한 융합 단백질은 세포 내에서 수용성으로 발현됨으로써 수용성 목적 단백질의 생산에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 세포 내에서 활성형으로 발현됨으로써 전세포 촉매 반응을 통한 유용물질의 대량 생산 시 효능이 증진되어 고부가 산물의 생산량 증대 효과가 있다. 본 발명의 일 구현예에 따른 융합 단백질의 수용성 향상에 따른 전세포촉매 효율 변화에 관한 모식도가 도 1에 나타나 있다.
- [0038] 또한 본 발명에 따른 융합 단백질은, 생물전환반응이 일어나는 세포질에서 안정한 상태로 존재하는 플라스미드에 부착됨으로써 플라스미드를 고정화 담체로 사용하는 세포 내 고정화효소를 형성할 수 있으며, 따라서 생물전환에 이용되는 효소에 적용할 경우 산물의 생산량을 효율적으로 증대시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 태그 단백질

질이 부착되지 않은 목적 단백질과 비교하여 산물의 생산량이 약 50% 이상, 약 100% 이상, 약 200% 이상, 약 300% 이상, 또는 약 400% 이상 증가될 수 있다.

- [0039] 또한 본 발명은 세포 내 단백질 안정화를 위하여 개발된 다목적 플랫폼인 세포 내 고정화 효소 시스템 (IIES)을 제공할 수 있다. IIES는 DNA 결합 단백질 및 플라스미드 위의 결합 서열의 영향으로 플라스미드-단백질 복합체를 형성한다. 플라스미드는 세포에서 안정한 물질 중 하나인 것으로 알려져 있으므로, 플라스미드를 고정화 담체로 사용하는 경우 효소는 고체 표면에 결합된 고정화 효소처럼 세포질에서 안정화될 수 있다.
- [0040] IIES가 대사공학을 통해 전세포 생축매를 제조하기 위해 적용될 때 본 발명의 융합 단백질은 고부가산물의 생산성을 실질적으로 증가시킬 수 있으며, 본원의 실시예에서도 2'-푸코실락토오스 및, 3'-푸코실락토오스의 생산량 증가가 확인되었다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질의 생산에 따라 형성되는 플라스미드-단백질 복합체는 고정화 효소를 형성하고, 플라스미드 구조물은 세포 내 고정화 담체로서 작용할 수 있다.
- [0041] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Oct-1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않을 수 있으며, 본 발명의 융합 단백질의 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 삽입, 결실, 치환, 부가, 전위 등의 돌연변이가 포함된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 Oct-1 단백질은 인간 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질 태그는 상기 목적 단백질의 아미노 말단 또는 카르복실 말단에 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 즉, 상기 단백질 태그가 상기 목적 단백질의 아미노 말단 또는 카르복실 말단 중 어디에 연결되어도 상기 단백질 태그로 인해 융합 단백질의 수용성 및/또는 열안정성이 향상될 수 있다.
- [0043] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소 단백질, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 효소 단백질은 푸코스전이효소, 베이어-빌리거 모노옥시다아제 (BVMOs) 및 이들의 조합들로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 항원은 인플루엔자 바이러스의 envelope에 있는 표면 항원 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA), 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA) 및 이들의 조합들로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 용어 "표면 항원(surface antigen)"이란, 세포막항원이라고도 하며, 세포의 세포막에 존재하는 항원성을 나타내는 막결합 단백질을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 표면 항원은 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 지질이중층에 결합된 막결합 단백질을 의미하는 것으로 해석될 수 있는데 상기 표면 항원은 특별히 이에 제한되지 않으나, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스의 표면 항원인 헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA), 뉴라미니다아제(Neuraminidase; NA) 등이 될 수 있다. 본 발명의 용어 "헤마글루티닌(hemagglutinin; HA)"이란, 인플루엔자 바이러스의 표면 항원의 일종인 막투과 단백질로서, 트립신에 의해 절단될 수 있는 HA1 서브유닛과 HA2 서브유닛으로 구성된다. 상기 HA1 서브유닛은 시알산과 결합하고 상기 HA2 서브유닛은 낮은 pH조건에서 세포막융합을 유발시킨다고 알려져 있다.
- [0047] 예를 들어, 상기 푸코스전이효소는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 1,2'-푸코스전이효소 및/또는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 1,3'-푸코스전이효소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 베이어-빌리거 모노옥시다아제는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 헤마글루티닌은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있고, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0048] 목적 단백질로서 푸코스전이효소, 예를 들어 1,2'-푸코스전이효소 또는 1,3'-푸코스전이효소를 사용한 융합 단백질을 숙주 세포 내에서 발현시킬 경우, 탄소원으로서 락토오스를 사용하여 각각 2'-푸코실락토오스 또는 3'-푸코실락토오스를 생성한다. 생성물인 2'-푸코실락토오스 및 3'-푸코실락토오스는 모유 올리고당의 주 성분으로 프리바이오틱스 효과 및 병원성감염을 예방하는 효과 등을 가지는 기능성 물질로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0049] 목적 단백질로서 헤마글루티닌을 사용한 융합 단백질을 대장균 등의 숙주 세포 내에서 발현시킬 경우, 인플루엔자 치료제 또는 백신 개발에 유용하게 사용될 수 있고, 인플루엔자 감염의 분자 메커니즘 연구에도 유용하게 활용될 수 있다.

- [0050] 본 발명의 융합 단백질은 기능을 나타내기 위해 Oct-1 서열 외부에 존재하는 DNA 부착 서열 (binding sequence)을 반드시 필요로 하지 않는다. 구체적으로, 위에서 설명된 바와 같이 본 발명의 융합 단백질은 플라스미드-단백질 복합체를 형성함으로써 플라스미드를 고정화 담체로 사용한다. Oct-1이 플라스미드 DNA에 부착되기 위해서는 Oct-1의 부착 서열 (BS, binding sequence)이 필요한 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러나 본 발명의 융합 단백질이 플라스미드에 결합하여 복합체를 형성하는 데에는 Oct-1 부착 서열이 필수적이지 않으므로, 융합 단백질의 설계, 생산 및 이어지는 생물전환이 더욱 용이하게 수행될 수 있다.
- [0052] 본원의 제 2 측면은, 제 1 측면에 따른 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 구조체에 관한 것이다. 본원의 다른 측면과 관련하여 기술된 내용은, 특별한 언급이 없는 한 본원의 제 2 측면에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다.
- [0054] 본원의 제 3 측면은, 제 2 측면에 따른 발현 구조체를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다. 본원의 다른 측면과 관련하여 기술된 내용은, 특별한 언급이 없는 한 본원의 제 3 측면에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다.
- [0055] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 Oct-1 유전자의 외부에 Oct-1의 부착 서열 (binding sequence)을 포함하지 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0056] 예를 들어, 본 발명의 재조합 벡터는 유전자를 발현시키고 및 정상적인 기능을 가지는 단백질을 생산하는 데에 기여할 수 있는 기타 뉴클레오티드 서열들을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 재조합 벡터에 추가적으로 포함될 수 있는 뉴클레오티드 서열은 인핸서 및 폴리A 신호를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고, 또한 생성된 융합 단백질을 정제하기 위한 태그, 예를 들어 히스티딘 태그를 암호화하는 서열 또한 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0058] 본원의 제 4 측면은, 제 3 측면에 따른 재조합 벡터를 포함하는 형질전환 세포에 관한 것이다. 본원의 다른 측면과 관련하여 기술된 내용은, 특별한 언급이 없는 한 본원의 제 4 측면에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다.
- [0059] 여기서 "형질전환"이란 상기 발현 구조체 또는 재조합 벡터가 숙주 세포의 게놈 안으로 이동하여 목적하는 융합 단백질을 발현할 수 있도록, 유전적으로 안정한 유전을 일으키는 모든 행위를 의미한다. 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 방법에 DMSO (dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.
- [0060] 형질전환의 대상이 되는 숙주 세포는 미생물 중에서 제한 없이 선택될 수 있으며, 에스처리키아(*Escherichia*) 속, 맨하이미아(*Mannheimia*) 속, 로도박테리아(*Rhodobacter*) 속 또는 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) 속 미생물을 이용할 수 있고, 바람직하게는 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0061] 상기 세포들은 임의의 공지된 배양 방법, 예컨대 회분식 배양, 연속 배양 및 공급-회분식 배양으로 배양될 수 있다. 선택된 숙주 세포들에 대해 적합한 배양 조건들은 통상의 기술자에 의해 쉽게 조정될 수 있으며, 사용되는 배지는 세포들의 성장 및 생존에 필수적인 모든 영양소들을 함유해야 한다.
- [0063] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.
- [0065] **[실시예]**
- [0066] **실시예 1: 융합 단백질 제조를 위한 재조합 플라스미드 제작**
- [0067] 융합 단백질 제조를 위해 재조합 플라스미드를 제작하였다. 클로닝을 위한 균주로는 *E. coli* Top10 균주를 사용하였고, 재조합 플라스미드 구축에 사용되는 목적 유전자로는 *Pedobacter saltans*에서 유래한 1,2-푸코스전이효소 (1,2'-fucosyltransferase, 1,2-FT)를 인코딩하는 유전자 (서열번호 2로 표시됨)를 사용하였다. 또한, DNA 결합 단백질 (binding protein)으로써 인간 유래 옥타머 전사 인자-1 (Octamer transcription factor-1, Oct-1) 유전자 (서열번호 1로 표시됨)를 이용하였다. 그 외에도, 재조합 플라스미드 구축을 위해 *H. pylori*에서 유래한 1,3-푸코스전이효소 (1,3'-fucosyltransferase, 1,3-FT)를 인코딩하는 유전자 (서열번호 3으로 표시됨) 또는 *Pseudomonas putida* KT2440에서 유래한 베이어-빌리거 모노옥시다아제 (Baeyer-Villiger monooxygenases, BVMOs)를 인코딩하는 유전자 (서열번호 4로 표시됨)를 사용하였다.

- [0068] Oct-1 단백질 태그가 융합된 융합 단백질 발현을 위한 재조합 플라스미드의 모식도가 도 2에 나타나 있다. POI (protein of interest)는 활성 발현을 목표로 하는 단백질이며, 여기서 Oct-1은 POI의 N 말단 (도 2의 A) 또는 C 말단 (도 2의 B)에 부착될 수 있다.
- [0070] **실시예 2: E. coli에서 융합 단백질 발현**
- [0071] 상기 실시예 1에서 제작된 재조합 플라스미드로부터 융합 단백질을 발현시키기 위해 *E. coli* BL21 (DE3) 가 사용되었다. POI로는 *Pedobactor saltans* (PS)로부터 유래한 푸코스전이효소의 일종인 1,2-푸코스전이효소 (1,2-FT) 유전자를 사용하였다.
- [0072] 재조합 플라스미드를 이용해 형질전환된 형질전환체는 50 µg/ml의 카나마이신을 함유하는 LB 배지 내에서 37°C에서 배양하였다. 0.5의 OD₆₀₀에 도달했을 때 0.1 mM IPTG를 첨가하였고 배양물은 25°C에서 4 시간 동안 추가 배양하였다.
- [0073] 추가 분석을 위해 세포를 7000 rpm에서 5 분간 원심분리를 하여 모으고, 침전 세포체는 버그버스터 시약 (Bugbuster reagent)을 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포체 용액으로부터 전세포 용해물 (total cell lysate, T)을 얻었고, 이를 9700 g에서 10 분간 원심분리한 뒤 상등액으로부터 가용성 세포 용해물 (soluble cell lysate, S)를 얻었다. 이후, 12% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)을 이용해 재조합 플라스미드로부터 발현된 융합 단백질을 분석하였다 (도 3).
- [0074] 도 3은 도 2에 따른 플라스미드의 POI로서 1,2-FT 유전자를 삽입한 후 단백질의 수용성 발현을 확인한 SDS-PAGE 결과이다. 단백질이 불활성형으로 나타나면 응집체를 형성하게 되고 불용성으로 나타나기 때문에, 단백질의 활성형 구조를 유지하는 데에 있어서 수용성으로 발현되는 것이 중요하다. 실험 결과, Oct-1 태그 단백질이 부착되지 않은 PS는 대부분 불용성으로 발현되었으나 Oct-1 태그 단백질이 부착된 PS는 단백질의 수용성 발현이 증가하였다. 또한, Oct-1은 PS의 N 말단 또는 C 말단 어느 쪽에 부가하여도 목적 단백질의 수용성 발현 증진 효과를 나타내었다.
- [0076] **실시예 3: 태그 단백질이 부착된 융합 단백질의 생물전환 적용**
- [0077] 상기 실시예 1에서 제작된 재조합 플라스미드에 의해 발현되는 융합 단백질을 이용한 생물전환 적용을 위해, lacZ가 결실된 형태인 dLM15 균주 *E. coli* ΔL M15를 형질전환하였다. POI로는 푸코스전이효소 (PS)의 일종인 1,2-푸코스전이효소 (1,2-FT) 유전자를 사용하였다. 1,2-FT는 형질전환체 내에서 락토오스를 기질로 사용하여 2'-푸코실락토오스 (2-FL)을 산물로 생산한다 (Y. W. Chin 등, Journal of Biotechnology, 210, 2015, pp 107-115).
- [0078] 상기 형질전환체는 50 µg/ml의 카나마이신을 함유하는 LB 배지 10 mL에서, 37°C에서 배양하였다. 본 배양을 위해 일정한 OD₆₀₀에서 LB를 제거한 뒤 적정량의 항생제를 포함하는 50 mL의 R-배지에 접종하였다. 0.5의 OD₆₀₀에 도달했을 때, 0.1 mM IPTG와 5 g/L의 락토오스를 첨가하였고 배양액은 25°C 또는 30°C, 200 rpm 에서 84시간 동안 추가 배양하였다. HPLC 분석을 위해 12시간 간격으로 배양액을 수집하였고, 세포농도를 UV 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 분석표본은 배양액에서 원심분리를 통해 세포를 제거한 뒤 상등액만을 이용하였다.
- [0080] **실시예 4: 태그 단백질이 부착된 융합 단백질의 열안정성 증대 효과**
- [0081] 도 4는 도 2에 따른 플라스미드의 POI로서 1,2-FT 유전자를 삽입한 후 25°C에서 장시간 동안 배양함으로써 단백질의 열안정성 증대 여부를 확인한 SDS-PAGE 결과이다.
- [0082] 재조합 플라스미드로부터 융합 단백질을 발현시키기 위해 *E. coli* BL21 (DE3)를 사용하였다. POI로는 1,2-FT 유전자를 사용하였다. 재조합 플라스미드를 이용해 형질전환된 형질전환체는 50 µg/ml의 카나마이신을 함유하는 LB 배지 내에서 25°C에서 배양하였다. 0.5의 OD₆₀₀에 도달했을 때 0.1 mM IPTG를 첨가하였고 배양물은 25°C에서 28 시간 동안 추가 배양하였다.
- [0083] 도 4의 A는 Oct-1이 부가되지 않은 PS 단백질, B는 PS 단백질의 아미노기 말단에 Oct-1을 부착시킨 융합 단백질, 그리고 C는 PS 단백질의 카르복실 말단에 Oct-1을 부착시킨 융합 단백질을 이용한 실험 결과이다. 도 4에 따르면, Oct-1 태그 단백질이 부착되지 않은 PS는 대부분 불용성으로 발현되었고 지속적으로 불용성으로 존재하였으나, Oct-1 태그 단백질이 부착된 PS는 수용성 발현이 증가하였을 뿐만 아니라 오랜 시간 동안 지속적으로 수용성을 유지하고 있었다. 또한, Oct-1은 PS의 N 말단 또는 C 말단 어느 쪽에 부가되어도 목적 단백질의 열안정성 증진 효과를 제공하였다.

[0085] 실시예 5: DNA 부착 서열의 필요성 확인

[0086] 도 5는 Oct-1을 포함하는 융합 단백질 발현을 위한 도 2의 플라스미드에 Oct-1의 DNA 부착 서열 (BS, binding sequence)의 필요성을 조사한 결과이다. 도 5의 A 및 B는 도2의 플라스미드에 BS를 삽입한 플라스미드의 모식도이며, 도 5의 C 내지 E는 Oct-1을 포함하는 융합 단백질이 BS의 유무와 상관없이 플라스미드-단백질 복합체를 형성함을 보여주는 결과이다.

[0087] 히스티딘 태그를 이용하여 융합 단백질을 정제한 후, 히스티딘 태그에 대하여 웨스턴 블롯으로 단백질을 확인하였다 (도 5의 C). 또한, 히스티딘 태그를 통하여 정제한 단백질에 플라스미드가 부착되어 있는지를 확인하기 위해서 단백질-DNA 복합체를 형성하고 있는 DNA를 정제하였고, 이를 증폭하여 아가로스 겔 전기영동을 통해 유전자 크기를 확인하였으며, 그 결과 단백질과 플라스미드가 부착되어 있음을 확인하였다 (도 5의 D). 즉, BS는 Oct-1 단백질의 부착 DNA 서열임에도 불구하고 Oct-1을 포함하는 융합 단백질은 BS의 존재와 상관없이 플라스미드에 부착할 수 있음을 확인하였으며, 이로부터 Oct-1 단백질을 포함하는 융합 단백질은 생물전환반응이 일어나는 세포질에서 안정한 상태로 존재하는 플라스미드에 부착됨으로써 플라스미드를 고정화 담체로 사용하는 세포 내 고정화효소를 형성하고, 따라서 생물전환에 이용되는 효소에 적용할 경우 산물의 생산량을 효율적으로 증대시킬 수 있을 것임을 확인하였다.

[0089] 실시예 6: HPLC를 통한 푸코실락토오스의 생산량 분석

[0090] 1,2-FT (PS로 표시됨)와 Oct-1을 재조합한 플라스미드를 생물전환에 이용하고 25℃에서 발효한 뒤 배양액에서의 생산물인 2'-푸코실락토오스 (2-FL)의 생산량을 HPLC를 통해 분석하여 이를 도 6에 나타내었다. HPLC 분석을 위해 Rezex ROA-유기산 H + 칼럼, 굴절률 (refractive index) (RI) 탐지기를 이용하였다. 분석은 0.01 N 황산 용액을 이동상으로 사용하여 50℃에서 0.6 mL/분의 유속으로 수행되었다.

[0091] 도 6의 A는 대조군, B는 1,2-FT의 아미노 말단에 Oct-1을 융합한 융합 단백질, 그리고 C는 1,2-FT의 카르복실 말단에 Oct-1을 융합한 융합 단백질을 이용한 실험 결과이다. Lactose는 2-FL 생성을 위한 탄소원 (carbon source)인 락토오스를 의미하고, OD₆₀₀은 600 nm에서의 흡광도를 측정된 값으로서 세포 성장 (cell growth)과 밀접한 관련이 있다. 분석 결과, 태그 단백질 Oct-1을 1,2-FT에 부착하였을 때 2-FL 생산량이 최대 2.5 배 증가하였다.

[0093] 실시예 7: HPLC를 통한 푸코실락토오스의 생산량 분석

[0094] 1,3-FT (FT1-1로 표시됨)와 Oct-1을 재조합한 플라스미드를 생물전환에 이용하고 25℃에서 발효한 뒤 배양액에서의 생산물인 3'-푸코실락토오스 (3-FL)의 생산량을 HPLC를 통해 분석하여 이를 도 7에 나타내었다.

[0095] 도 7의 A는 대조군, B는 1,3-FT의 아미노 말단에 Oct-1을 융합한 융합 단백질을 이용한 실험 결과이다. 분석 결과, 태그 단백질 Oct-1을 1,3-FT에 부착하였을 때 3-FL 생산량이 최대 2.5 배 증가하였다.

[0097] 실시예 8: 베이어-빌리거 모노옥시다아제에 의한 에스터 전환효율 분석

[0098] 베이어-빌리거 모노옥시다아제 (BVMO)와 Oct-1을 재조합한 플라스미드를 생물전환에 이용한 뒤, 배양액에서 리시놀레산 (Ricinoleic acid)에서 케토 전환을 가스 크로마토그래피를 통해 분석한 그래프를 도 8에 나타내었다.

[0099] 구체적으로, 형질전환 미생물을 항생제를 포함하는 50 mL R-배지에 접종하였고, OD₆₀₀이 5에 도달했을 때 0.1mM IPTG 를 첨가한 뒤 25℃ 배양액에서 배양하였다. 2 시간 동안 단백질이 발현되도록 유도한 뒤 KOH를 이용해 pH를 8로 맞춰주고 10 mM의 리시놀레산을 첨가하였다. 이후 35℃에서 배양하며 8 시간 동안 2 시간 간격으로 배양액 샘플을 얻어 가스 크로마토그래피를 통해 리시놀레산 (Ricinoleic acid), 에스터 (ester), 케토 (ketooleic acid) 등 3 종류의 물질을 분석하였다.

[0100] BVMO는 리시놀레산을 에스터로 전환하는데 이용되는 효소이고, 효율이 좋지 않을 때 케토가 쌓이게 된다. 야생형 BVMO를 사용한 실험 결과인 도 8의 A에 비해 Oct-1 융합 단백질을 이용한 도 8의 B의 결과에서 리시놀레산이 줄어들면서 에스터는 증가하고 케토가 상대적으로 적었으므로, 본 발명의 융합 단백질의 전환 효율이 상승하였음을 확인할 수 있었다.

[0102] 실시예 9: HPLC를 통한 푸코실락토오스의 생산량 분석

[0103] 결합 부위 (BS)(5'-ATGCAAT-3') 를 삽입하지 않은 상태의 벡터를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 3에 기재된 방법에 따라 *E. coli* ΔL M15를 형질전환하였다. 이후 실시예 6에 기재된 바와 같이 푸코스전이효소를 생

물전환에 이용하였고 72 시간째의 상등액 샘플 내에 존재하는 2-FL 함량을 HPLC를 통해 분석하였다. 분석 결과, 결합 부위가 없어도 산물의 생산량이 증대됨이 확인되었다.

[0105] **실시예 10: Oct1 융합을 이용한 헤마글루티닌 수용성 발현을 위한 플라스미드의 제조**

[0106] 인플루엔자 바이러스의 막단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)이 Oct1과 결합되어 수용성 발현이 가능하도록 만들기 위해서, A/PR8 인플루엔자 바이러스 A형의 HA를 발현하는 플라스미드와 Oct1을 발현하는 플라스미드를 사용하였다. HA 유전자(서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자) 서열 앞에 6개의 히스티딘(histidine)-Oct1-TEV 프로테아제 절단 부위(protease cleavage site) 서열을 삽입하였다. 유전자 클로닝은 오버랩 클로닝을 통해 진행하였으며, 실험에 사용된 프라이머의 서열은 하기 표 1과 같다. 최종적인 플라스미드 (Oct1-HA)의 구조는 도 10과 같다.

표 1

프라이머(primer)	서열	서열번호	
Insert (6xHis-Oct1-TEV protease cleavage site)	forward	AGGAGATATACCATGCATCACCATCATCACCACATGGAGGAGC	6
	backward	CAGTAGGTTTGCCTTGAATTCGGGGATCCCAGGGGC	7
Vector (pET28b-HA-6XHis)	forward	AAGGCAAACCTACTGGTCCTGTTATGTGCAC	8
	backward	CATGGTATATCTCCTTCTAAAGTTAAACAAAATTATTCTAGAGGGG	9

[0109] PCR은 HA이 삽입되어 있는 pET-28b 플라스미드에서 6xHis-Oct1-TEV protease cleavage site는 시작코돈을 포함한 pET-28b 벡터 3' 말단과 그 뒤쪽 시작코돈을 제외한 HA 유전자의 5'말단에 각각 15bp가 상호간 상보적으로 (complementary) 디자인된 프라이머들을 이용해 수행되었다. PCR 완료 후 메틸화가 되어 있는 template (plasmid)를 digestion하기 위해 37°C에서 1시간 동안 Dpn1 용액을 처리하였고, PCR Preparation Kit를 사용하여 DNA 외의 PCR 산물을 제거하였다. 이후, 인서트(insert)에만 5' 인산화(phosphorylation)를 위해 37°C에서 30분동안 T4 kinase를 처리한 후, PCR Preparation Kit를 한번 더 사용하였다. 벡터 (Vector, pET28b-HA-6xHis)와 인서트 (insert, 6xHis-Oct1-TEV protease cleavage site)를 라이게이션(ligation)하기 위해 엑소뉴클리에이스(exonuclease) 기능을 하는 T4 DNA polymerase를 2분 30초동안 처리하고 얼음에 10분동안 처리하여 벡터와 인서트들 간의 수소결합을 유도하였다. 상기 클로닝과정을 통해 얻어진 DNA용액 8 µl를 competent *E. coli* TOP 10 용액 100 µl에 넣고 얼음에서 30분 배양 후 42°C에서 45초간 열처리해 주었다. 상기 반응 액에 LB(Luria-Bertani) 액체배지 900 µl를 넣어 배양(37°C, 1시간) 후 원심분리(7,000 rpm, 5분)를 통해 세포를 수집하였다. 수집된 세포용액(0.1 ml)을 카나마이신 LB 고체배지에 도말/배양(37°C)후 형성된 콜로니 중 하나를 0.1% 카나마이신이 함유된 10 ml LB 액체배지에 넣어 18시간(37°C) 배양하였다. 배양액을 원심분리(4,000 rpm, 10분)을 통해 세포를 수집하여 Plasmid DNA Miniprep Kits를 사용하여 결과물로서의 플라스미드를 얻었다. 상기의 플라스미드의 시퀀스는 업체(코스모진텍, 한국)를 통해 확인하였다. 상기과정에서 사용된 프라이머의 서열은 상기 표 1에 언급했으며 자세한 조성과 반응 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

PCR 조성	증류수 32.5 µl, 5X Phusion GC buffer 10 µl, 10 mM dNTPs 1 µl, 10 µM Forward Primer 2.5 µl, 10 µM Backward Primer 2.5 µl, Template DNA 1 µl, Phusion DNA Polymerase 0.5 µl
벡터 PCR 조건	최초 denaturation(98°C, 30초) 35회 반복: denaturation(98°C, 10초) → annealing(61°C, 30초) → extension(72°C, 3분) 마지막 extension(72°C, 10분)
인서트 PCR 조건	최초 denaturation(98°C, 30초) 35회 반복: denaturation(98°C, 10초) → annealing(61°C, 30초) → extension(72°C, 30초) 마지막 extension(72°C, 10분)
Dpn1 처리조건	37°C, 1시간, 5 µl (10X reaction buffer4) + 44 µl (벡터 또는 insert의 PCR 산물) + 1 µl (Dpn1 용액)
ligation	1 µl (벡터 용액) + 7.5 µl (insert 용액) + 1 µl (10X reaction buffer) + 1 µl (overlap cloner 용액)

[0112] **실시예 11: Oct1 융합을 이용한 헤마글루티닌 수용성 발현 테스트**

[0113] 상기 제작된 플라스미드는 단백질이 발현되는지 테스트하기 위해 BL21(DE3) 수용성 세포에 열충격 방법을 통해

형질전환되었다. 50 µg/ml의 카나마이신 (kanamycin)이 포함된 고체 배지에서 자란 콜로니를 50 µg/ml의 카나마이신이 포함된 10 ml의 액체 배지(Terrific Broth, TB배지)에 접종하였으며, 37°C 셰이킹 인큐베이터(shaking incubator)에서 16시간 배양 후 15% glycerol이 포함된 cell stock을 만들었다. 5 µl cell stock을 50 µg/ml의 카나마이신이 포함된 5 ml의 액체 배지(Terrific Broth, TB배지)에 접종하였으며, 37°C 셰이킹 인큐베이터에서 15시간 배양 후 250 µl을 새로운 25ml의 동일 배지에 2차 접종을 하였다. 37°C, 180 rpm의 셰이킹 인큐베이터에서 OD₆₀₀이 0.4~0.6까지 대장균이 자랐을 때 1 mM의 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 처리하여 단백질 발현을 진행하였다. 25°C, 120 rpm에서 6시간 발현한 후 TB배지로 10분의 1로 희석하여 OD₆₀₀ 값을 측정하였다. 희석배수 10을 곱해 측정값을 얻어냈다. 1ml씩 분주하여 7000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배지를 제거하고 세포만 얻어냈다. 이를 OD₆₀₀이 7이 되도록 PBS (pH 7.4)로 풀고 최종적으로 250 µl를 얻어내 초음파를 이용해 세포를 파쇄하였다. 원심분리하여 100 µl의 수용성 부분을 얻어 20 µl의 6X SDS sample buffer와 섞어 샘플링하였다.

[0114] Oct1 융합 되지 않은 A/PR8 인플루엔자 바이러스 A형의 HA를 발현하는 플라스미드를 이용한 것을 제외하고는, 상기 동일한 방법으로 형질전환하여 Oct1 융합이 되지 않은 HA를 샘플링 하였다.

[0115] 본 발명에 따른 방법으로 수득된 Oct1-HA 융합 단백질과 HA(Oct1 비융합) 단백질의 수용성 발현을 웨스턴 블랏(western blot)을 이용하여 비교하였다.

[0116] 도 11은 Oct1-HA 융합 단백질 및 HA 단백질의 수용성 발현을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

[0117] HA는 수용성으로 발현되지 않았고, Oct1-HA만 수용성으로 발현되는 것을 확인하여, 본 발명에 따른 방법으로 제작된 Oct1-HA 융합 단백질은 정제 이후 추가적인 단계 없이도 단백질 활성을 발현하는 상태로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0119] **실시예 12: Oct1-HA 융합 단백질의 정제**

[0120] 상기 실시예 11에서 Oct1-HA 융합 단백질이 수용성으로 발현됨을 확인하고 동일한 조건으로 정제를 진행하였다. 상기 형질전환된 BL21(DE3)의 7 µl를 50 µg/ml의 카나마이신이 포함된 7 ml의 액체 배지(Terrific Broth, TB 배지)에 접종하였으며, 37°C 셰이킹 인큐베이터에서 15시간 배양 후 6 ml를 새로운 600ml의 동일 배지에 2차 접종을 하였다. 37°C, 180 rpm의 셰이킹 인큐베이터에서 OD₆₀₀이 0.4~0.6까지 대장균이 자랐을 때 1 mM의 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 처리하여 단백질 발현을 진행하였다. 25°C, 120 rpm에서 6시간 발현한 후 8000rpm에서 5분간 원심분리하여 배지를 제거하고 세포만 얻어냈다. Triton X-100, N-Lauroylsarcosine sodium salt, EDTA 및 저농도의 imidazole이 포함된 완충액을 사용하여 세포를 재부유(resuspension)시키고, 초음파를 이용해 세포를 파쇄하였다. 원심분리를 통해 세포기질만 분리한 후 Ni-NTA 아가로스 비드(agarose bead)에 처리하였다. 동일한 완충액을 이용하여 비드에 결합하지 못한 물질들을 제거하였고, N-Lauroylsarcosine sodium salt이 제거된 고농도의 이미다졸(imidazole)이 포함된 완충액을 통해 정제하려는 단백질(Oct1-HA 융합 단백질)을 얻어냈다.

[0121] 도 12는 상기 제조한 플라스미드를 이용하여 정제된 Oct1-HA 단백질의 발현을 확인한 SDS-PAGE 결과이다.

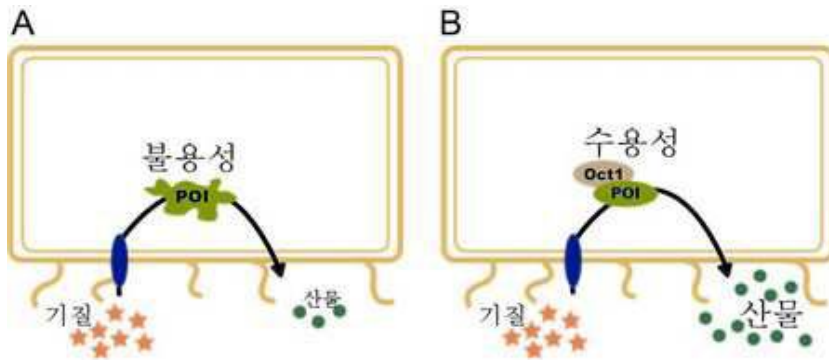
[0122] SDS-PAGE 결과를 통해 Oct1-HA 융합 단백질이 정상적으로 정제되었음을 확인하였다. 또한, E. coli 내에서 활성을 가진 수용성 형태의 HA가 수득되었음을 확인하였다.

[0124] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

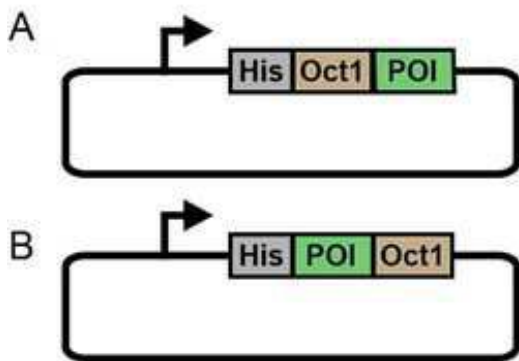
[0126] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

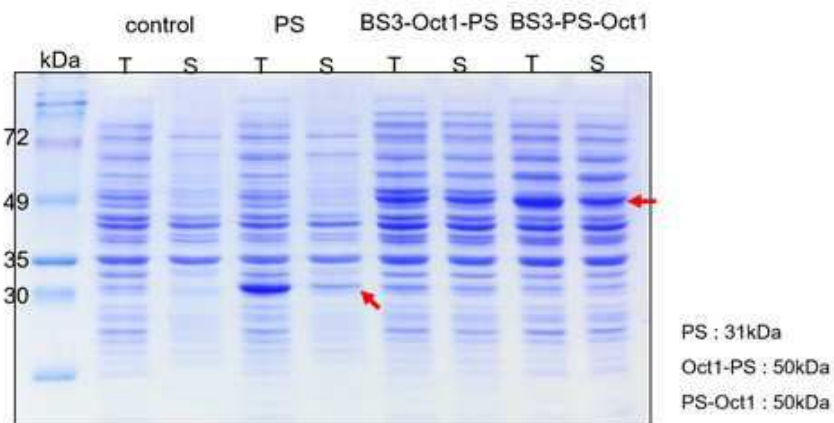
도면1



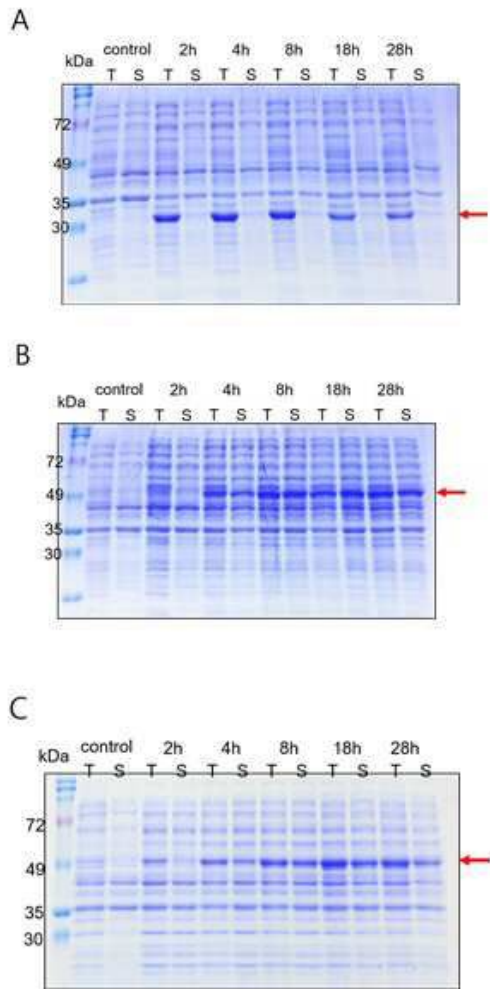
도면2



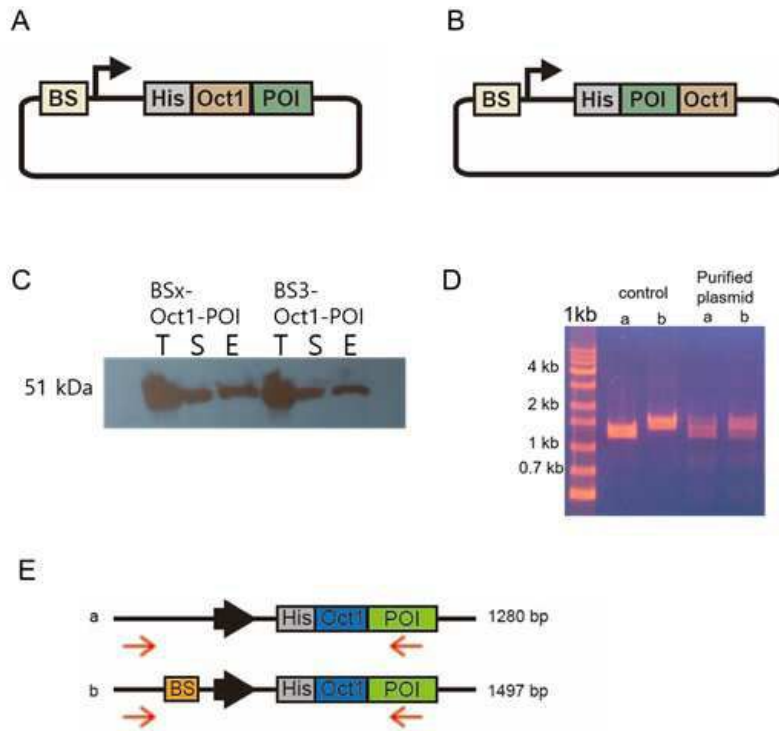
도면3



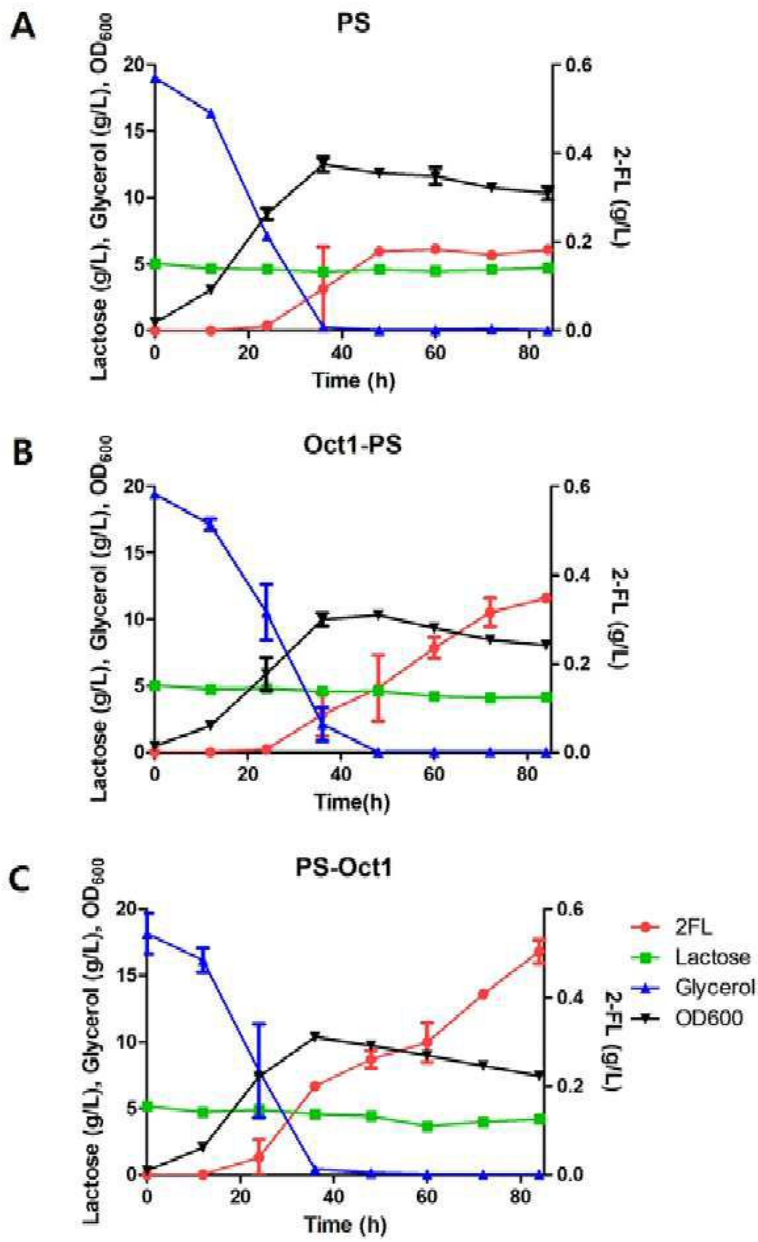
도면4



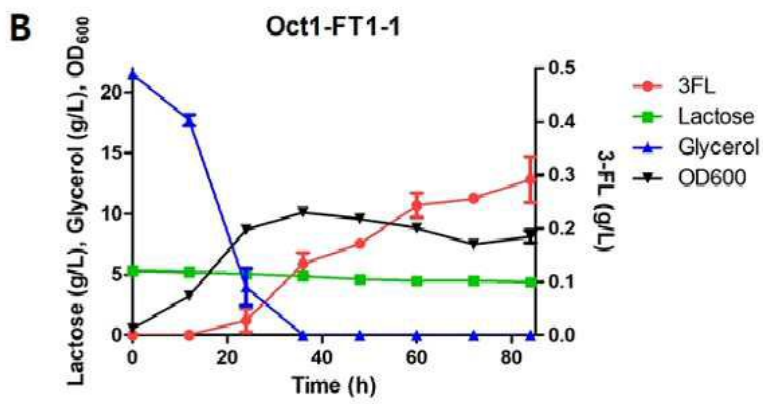
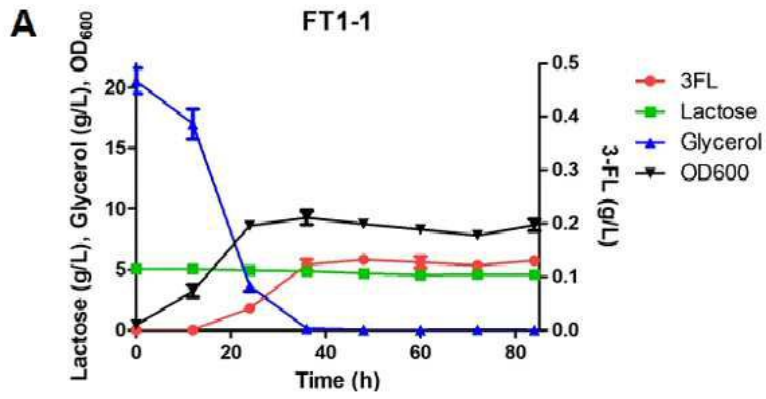
도면5



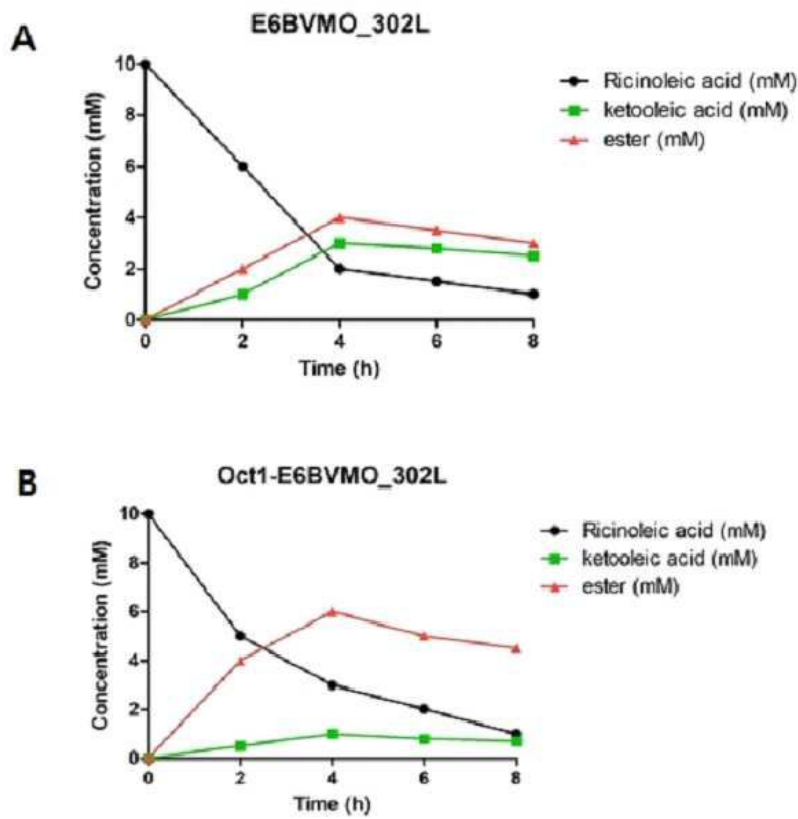
도면6



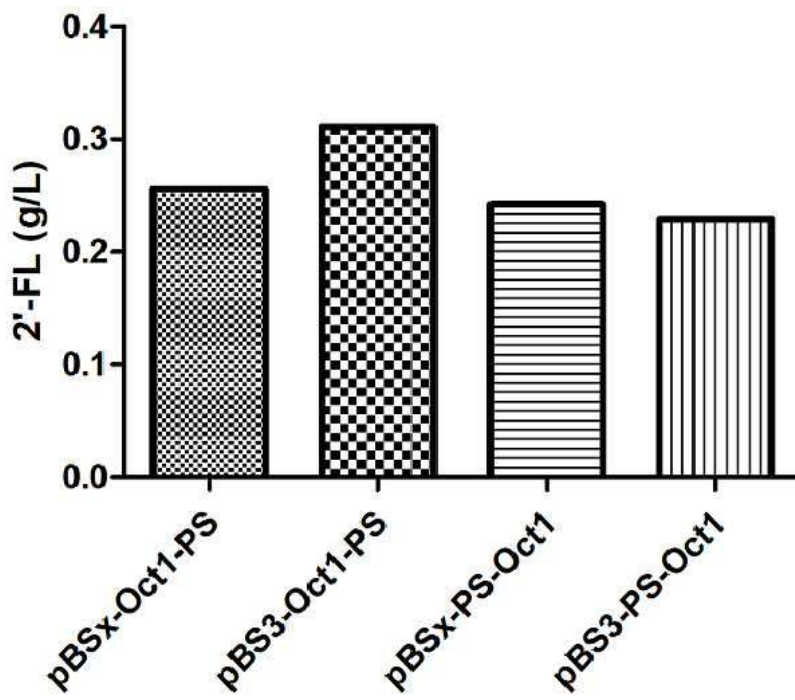
도면7



도면8



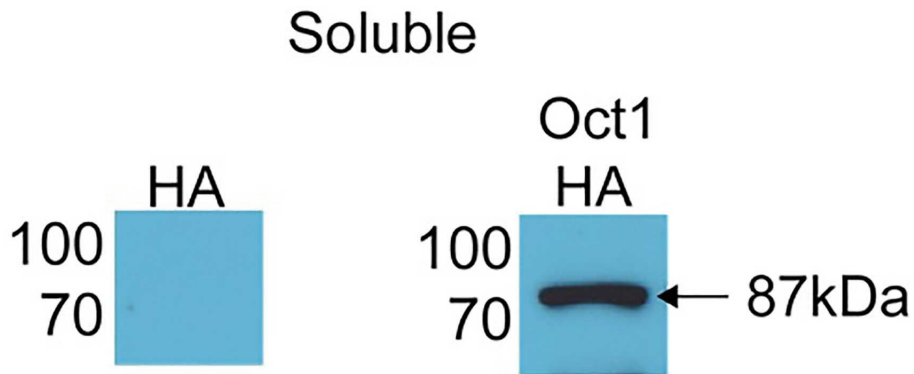
도면9



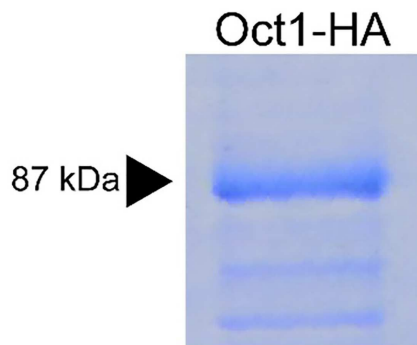
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> Research and Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
- <120> TAG PROTEIN FOR INCREASING SOLUBILITY AND THERMAL STABILITY OF TARGET PROTEIN AND FUSION PROTEIN CONTAINING THE SAME
- <130> PN2009-407
- <150> KR 10-2019-0116019
- <151> 2019-09-20
- <160> 9
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 483
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> human Oct-1 sequence
 <400> 1
 atggaggagc ccagtgacct tgaggagcct gagcagtttg ccaagacctt caaacaaga 60
 cgaatcaaac ttggattcac tcagggtgat gttgggctcg ctatggggaa actatatgga 120
 aatgacttca gccaaactac catctctcgc ttggaagcct tgaacctcag ctttaagaac 180
 atgtgcaagt tgaagccact ttagagaag tggctaaatg atgcagagaa cctctcatct 240
 gattcgtccc tttccagccc aagtgccctg aattctccag gaattgaggg ctigagccgt 300
 aggaggaaga aacgcaccag catagagacc aacatccgtg tggccttaga gaagagtttc 360
 ttggagaatc aaaagcctac ctcggaagag atcactatga ttgctgatca gctcaatag 420
 gaaaaagagg tgattcgtgt ttggttctgt aatcgccgcc agaaagaaaa aagaatcaac 480
 cca 483
 <210> 2
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1,2-FT DNA sequence
 <400> 2
 atgatatttg taaccggata tggccagatg tgaacaaca tccttcaatt tgggcatttc 60
 ttgcttatg caaaaagaaa tggtttaaaa acggttgct tacgtttttg ctacaatac 120
 acttttttca agattagtaa cgaaaaaggc tataattggc cgacctatct ttatgcaaaa 180
 tatggggcaa aaataggact tataaagtct gttgattttg acgaatcatt cgaaggtaca 240
 aatgtagatt ctcttcaatt agacaacaa accgtgttag ccaaaggctg gtattttaga 300
 gactaccagg gatttcttaa ttaccgtaat gagcttaag cacttttcga ctttaagag 360
 catattaaga aaccggtaga acagttttt tcaacgttat caaaagacac catcaaagta 420
 gcctgcata taagacgtgg tgattataag acctggcacc agggtaaata ctttttagc 480
 gacgaagaat acggtcaaat cgtaaattct ttgctaaaa gtttagataa accggtagaa 540
 ttaattattg ttagcaatga tcccaacta aacagcaaaa gtttgaaaa ttaacatcc 600
 tgtaaagtat caatgttaaa tggcaatcct gccgaagatc tttaccttct ttctaaatgt 660
 gattatatta ttggccctcc cagcactttt tctttaatgg cagcttttta cgaagaccgc 720
 ctttatatt ggatatttga taaagaaaa cagcttttag cagaaaactt tgacaagttc 780

gagaatctgt ttcgacacat tatt 804

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1,3-FT DNA sequence

<400> 3

atgttcacg cccttctcga tgccttcata gagagcgc at ccatlgagaa aatggcctct 60

aaatctcccc cgcccctaaa gatcgccgtg gcgaattggg ggggtgatga agaaattaaa 120

gaatttaaga agagcactct gtactttatt cttagtcagc attacacaat cactttacac 180

cgaaaccctg ataaaccagc cgacatcggt tttggtaacc cacttggatc agccccgaaa 240

atcttatctt accaaaacac aaaacgaata ttttacacgg gtgaaaacga atcgcctaata 300

ttcaacctct ttgactatgc cataggcttt gatgaactgg actttagaga tcggtattta 360

cgcatgccgc tttattatga ccgtctgcac cataaggcgg agagcgtgaa tgacactacc 420

gcaccgtata agattaaagg caacagcctt tataccttaa agaaaccag ccattgcttt 480

aaagaaaatc accctaacct gtgcgcactt atcaataatg agagcgtacc actcaaagc 540

gggttcgcaa gttttgtagc gagcaacgcg aacgctccga tgcggaacgc tttttatgat 600

gcattaaact cgatagagcc agttacaggg ggtggagccg tgaaaaacac actgggctat 660

aaggtcggaa acaagagcga atttttaagc cagtacaaat tcaatctgtg ttttgagaat 720

tcacagggct acggttacgt caccgaaaaa atcattgatg catactttag tcatactatc 780

ccgatttatt gggggtcacc gagcgtggcg aaagatttca acccgaaaag ttttgtcaac 840

gttcatgatt tcaacaatit tgacgagcgc attgactacg tgagatacct gcatacgcac 900

cccaacgctt atctggatat gctctatgaa aatccattaa ataccctgga cggcaaagct 960

tacttttacc agaatctgag ttttaaaaaa atcctagatt tctttaaaac gattctggaa 1020

aacgacacga tttatcataa taatectttc atttttatc gtgacctgaa tgagccgctg 1080

glatccattg ataactctcg tatcaactat gataatttgc gggatgaatta tgatgattg 1140

cgcgttaact atgatgactt gcgtgttaac tatgatgact tgcggatcaa ctatgatgat 1200

ctgcgtataa aciatgatga cttgagaatt aattatgagc gccttctgca aaacgettca 1260

ccgctgctgg aattgagcca gaatacctca ttcaaatct accgcaaat ttatcaaaaa 1320

tcctcccggt tacttctgtt aataaggcgt tgggttaaaa agtaa 1365

<210> 4

<211> 1542

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BVMO DNA sequence

<400> 4

```

atggaagaag aagaagaaga atcttctcac accgcactgc ctggtgagcc actcgacgta      60
ctgatcatgg gtgctggtgt ttccggatc  ggcgctgcag cttatctgcg tcgtaaccag      120
ccgaacaaaa ccttcgctat tctggagtct cgcgagcgta tgggcggtac ctgggatctg      180
ttccgctacc cgggcatccg ttctgactcc gacctgtaca ctttcggttt cgacttcaag      240
ccgtggacca aagcgaaatc cctggccgat gctgctgaca tcctggaata cctgtccgaa      300

gcgatcgacg aacaccagct ggcgccgttc atccagtacc agcagaaaagt ctttctgct      360
aactggcaga gcgacaaagg cctgtggtct gttcgtgtag aagacggtcg tactgcacag      420
attcgtaccg ttgaatgccg ctggctgttc tctgcgggtg gttactaccg ttacgatcag      480
ggcttcagcc cgcgtttcga aggtagcgaa cagttcaaag gtcagatcat tcaccgcgac      540
cactggccgg aagatctgga ctacaccggt aaacgtgtgg ttgttatcgg tctggtgctg      600
accgctgtaa cccttatccc ggcgatggca gacaaaattg cttctatcac catgctgcaa      660
cgcactccgt cttacatcat caaccaaccg gcaaacgatg gtgtggcggc gttcctgctg      720

aaagtgctgc cggctcagac cgcctattct ctgaccgtt ataaaaacgc taaaatcact      780
ctggcattct ggggcttttg ccagcgcttc ccgaagctga gcaaaaaact gttgctgtgg      840
ctgactcgta aagaactgcc gaaagactat ccggttgacg ttcacttcaa cccgccgtat      900
aaccctggg accagcgtct gtgctccgta cctgaaggcg acctgtttaa agcaatctcc      960
gcaggcaacg cggatatcgt tactgatcac atcgaaacgt tcaccgagca cggcgtactg      1020
ctgaagagcg gtaaaatgtt gaaagccgac attatcgtca ccgcgactgg cctgaacgtt      1080
cagttgttcg gcggcattac cctgcataaa gatggcaaac cggtagttct gctctgaacc      1140

ctggcttaca aaggatgat gctgctggc gtgccaaact tcgcgtttgc tgttgctat      1200
accaacagct cctggacgct gaaagtttg cctgctgtg accacttctg ccgtctgctg      1260
ggtctgatgg aacgtgaagg ctacaacgtc tgtgaaccga aagctccgga aggcgttgaa      1320
acgcgtccgc tgettattt tggcaggtt tatgtgcagc gtgcgctgga ttccatgccg      1380
cgccagggtc cgcgtgagcc gtgggtgatg agcatggatt acttccgtga tgtgaaactg      1440
ctgcgtcgcg gcgcagtgac cgataaatgc ctgaaattca ctgcggttcc gaacgcaccg      1500
ctgcacgctg atgtacagct gcagcagcaa ggcagccgcc gt      1542

```

<210> 5
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA peptide sequence
 <400> 5

Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val
 20 25 30
 Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
 35 40 45
 Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Thr
 50 55 60
 Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95
 Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
 115 120 125
 Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Thr
 130 135 140
 Thr Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160
 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys
 165 170 175
 Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Lys Leu Tyr
 195 200 205

Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser Asn Tyr Asn Arg
 210 215 220

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala
 225 230 235 240

Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
 260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met
 275 280 285

His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr Gln
 355 360 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
 370 375 380

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415

Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 435 440 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vector primer (pET28b-HA-6XHis) forward sequence

<400> 8

aaggcaaacc tactggtcct gttatgtgca c 31

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vector primer (pET28b-HA-6XHis) backward sequence

<400> 9

catggtatat ctcttctta aagttaaaca aaattatttc tagagggg 48