

(11) 공개번호 10-2017-0033609
(43) 공개일자 2017년03월27일

-
- pET-Atg7c**
- 6414 bp
- Hisx-Atg7c
- Hisx-Atg7c linker - TEV cleavage site - MCS

(52) CPC특허분류

C07K 14/395 (2013.01)

C07K 19/00 (2013.01)

C07K 2319/95 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고, 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합단백질 형태로 발현하도록 연결되어 있는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효모 자식작용 활성화 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 융합단백질의 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질 사이에 프로테아제에 의해 절단되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프로테아제는 TEV(tobacco etch virus)인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법:

(a) 제6항의 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및

(b) 상기 생성된 융합단백질을 수득하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, (b) 단계에서 융합단백질은 결정화시킨 후 수득하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, (b) 단계에서 수득된 융합단백질을 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질 사이를 절단할 수 있는 프로테아제로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질.

청구항 11

효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 융합단백질의 결정화 방법:

- (a) 제6항의 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 융합단백질을 결정화시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 재조합 단백질의 결정화 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고, 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합단백질 형태로 발현하도록 연결되어 있는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물에 의하여 생성된 융합단백질을 결정화시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다양한 재조합 유전자의 수용성 발현과 정제를 위해 여러 표지자들이 사용되어왔다. 특히 생화학 및 구조생물학에 크게 기여한 표지자로서 헥사히스티딘, 글루타티온-S-전달효소, 말토즈 결합 단백질 등이 있다. 그러나 발현된 단백질 중 극히 일부만이 결정화에 성공할 수 있으며 이를 통한 구조분석은 매우 힘든 과정으로 알려져 있다. 따라서 결정화에 도움을 줄 수 있는 개발은 중요하다. 현재 알려진 결정화에 도움을 줄 수 있는 표지자는 말토즈 결합 단백질이 있으나 이 표지자는 목적 단백질의 3차원적 접힘 구조를 무시하고 발현되는 경우가 있고 아밀로즈 친화 크로마토그래피로 정제되기 때문에 정제물의 순도를 떨어뜨리며 말토즈 결합 단백질의 큰 크기 (약 40 kDa)로 인해 표지자를 제거할 경우 최종 정제물의 일드(yield)가 낮아지는 문제점이 있다. 따라서 단백질의 수용성 발현과 간편한 정제, 그리고 결정화에 도움을 줄 수 있는 새로운 표지자를 찾는 연구가 시급하다.

[0003] 이에, 본 발명자들은 효모 자식작용 활성화 단백질의 일부(yAtg7c)가 원하는 유전자를 수용성으로 대량 발현시킬 수 있다는 사실을 확인하고, 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질을 융합단백질 형태로 발현시키는 경우, 목적단백질의 대량발현 및 결정화가 가능하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 목적단백질의 대량발현 및 결정화를 위한 재조합 벡터를 제공하는데 있다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 (a) 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 배양하여

효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 융합단백질을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 융합단백질을 결정화시키는 단계를 포함하는 융합단백질의 결정화 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고, 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합단백질 형태로 발현하도록 연결되어 있는 재조합 벡터를 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 융합단백질을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 융합단백질을 결정화시키는 단계를 포함하는 융합단백질의 결정화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 목적 단백질을 대장균 내에서 대량 발현시키면서도, 수용성으로 발현 시킬 수 있으며, 생성된 필요에 따라 용이하게 결정화시킬 수 있어, 목적 단백질의 대량 생산 및 정제에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 기존 유전자와 mutation한 유전자의 DNA 서열을 비교한 것이다.

도 2는 기존 유전자와 mutation한 유전자가 코딩하는 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 3은 pET-yAtg7c 벡터의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 yAtg8과 RavZ에 대한 yAtg7c 융합단백질 정제결과를 나타낸 것이다.

도 5는 SPRY 도메인과 RB 도메인에 대한 단백질 결정화 모델을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 달리 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 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0014] 본 발명자들은 효모 자식작용 활성화 단백질의 일부(yAtg7c)가 원하는 유전자를 수용성으로 대량발현시킬 수 있다는 것을 확인하고, 이를 통해 효모 자식작용 활성화 단백질과 다른 목적 단백질을 융합파트너로 결합하여 결정을 만들어 구조를 풀었다. 이후 심화된 연구로 yAtg7c와 목적 단백질을 쉽게 클로닝할 수 있는 벡터를 개발하는데 성공하였다. 이 단백질은 비교적 작은 크기(30kDa)와 높은 안정성으로 다른 단백질의 침전없이 정제가 가능하며 목적단백질과 융합된 상태에서 결정화를 시도할 수 있도록 제작되었다. 또 한 본 발명에서는 yAtg7c의 아미노 말단에 6x His를 도입하여 친화성크로마토그래피를 통해 쉽게 정제하고자 설계하였다,

[0015] 따라서, 일 관점에서, 본 발명은 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고, 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합단백질 형태로 발현하도록 연결되어 있는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에서 사용된 상기 효모 자식작용 활성화 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 것을 사용할 수 있으며, 상기 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0017] 상기 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하면서 상용되는 제한효소인식 서열이 제거된 서열인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 융합단백질의 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질 사이에 프로테아제에 의해 절단되는 서열을 포함하는 것을 특징으로할 수 있으며, 상기 프로테아제는 TEV(tobacco etch virus)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 양태에서는 대장균의 발현에 적합한 효모 자식작용 활성화 단백질을 코딩하는 yAtg7c 유전자를 클로닝하였다. yAtg7c 유전자를 함유하는 재조합 벡터를 제작하기 위하여, yAtg7c 유전자 내부의 자주 쓰이는 제한효소서열을 제거하여 목적 유전자를 쉽게 클로닝 할 수 있도록 하였다. 가장 강력한 프로모터로 알려진 T7 박테리오파지의 프로모터가 삽입된 카나마이신 내성을 갖는 pET 벡터에 클로닝을 통해 TEV (tobacco etch virus) 프로테아제로 자를 수 있는 서열과 가장 많이 쓰이는 제한효소들을 삽입하였다 (도 3). T7 프로모터 뒤에 6x His 유전자와 yAtg7c 뒤에 제한효소부위가 위치하도록 클로닝하였으며, 제조된 발현벡터는 기존의 발현 벡터들보다 개선된 이상적인 발현 벡터의 기능을 갖추게 된다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에서는 상기 제조된 재조합 벡터를 대장균에 클로닝하였다.
- [0021] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 융합단백질을 수득하는 단계를 포함하는 목적단백질의 제조방법에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 일 양태에서는 목적단백질로 RavZ 단백질을 사용하여, RavZ 단백질을 코딩하는 유전자가 클로닝된 pET-yAtg7c로 형질전환된 대장균에서 yAtg7c-RavZ 융합단백질을 고발현시켰으며, 정제 후, 결정화시켰다(도 4 및 도 5).
- [0023] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 효모 자식작용 활성화 단백질과 목적단백질이 융합된 융합단백질을 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 융합단백질을 결정화시키는 단계를 포함하는 융합단백질의 결정화 방법에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에서 상기 결정화 단계는 21~23 ℃의 조건에서 수행하는 것이 바람직하고 더욱 바람직하게는 22 ℃의 조건에서 온도를 일정하게 유지하는 것이 바람직하다. 결정화 단계에서는 PEG, proline, NaCl, TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) 등의 화합물을 첨가하여 수행할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서, 용어 "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 잡 재적 계놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환 되면, 벡터는 숙주 계놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 계놈 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. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다. 포유동물 세포 배양물 발현을 위한 전형적인 발현 벡터는 예를 들면 pRK5 (EP 307,247호), pSV16B (WO 91/08291호) 및 pVL1392 (Pharmlngen)을 기초로 한다.
- [0026] 본 발명에서 "증폭"이란 해당 유전자의 일부 염기를 변이, 치환, 또는 삭제시키거나, 일부 염기를 도입시키거나, 또는 동일한 효소를 코딩하는 다른 미생물 유래의 유전자를 도입시켜 대응하는 효소의 활성을 증가시키는 것을 포괄하는 개념이다.
- [0027] 본 발명에서 "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고발현용의 프로모터로서 SRα 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.
- [0028] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac

시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 $\Phi 10$ 은 이. 콜라이에서 단백질 NSP를 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0029] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 “작동 가능하게 연결 (operably linked)” 된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, “작동 가능하게 연결된”은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0030] 본원 명세서에 사용된 용어 “발현 벡터”는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0031] 당업계에서 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0032] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질전환”은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질감염”은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

[0033] 발명의 숙주 세포는 원핵 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 또한, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 이. 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 이 숙주 세포의 예이다.

[0034] 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서는, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 단세포 숙주는 선정된 벡터, 본 발명의 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물의 독성, 분비 특성, 단백질을 정확하게 폴딩시킬 수 있는 능력, 배양 및 발효 요건들, 본 발명 DNA 서열에 의해 코딩되는 산물을 숙주로부터 정제하는 것의 용이성 등의 인자를 고려하여 선정되어야만 한다.

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0036] **실시예 1: pET-yAtg7c 벡터의 제조방법**

[0037] (1) yAtg7c 유전자 내부의 제한효소의 절단서열 제거

[0038] 효모 S288c 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하여, 서열번호 3~4의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍을 이용하여, yAtg7c 유전자를 클로닝하였다.

[0039] yAtg7c-F: 5'-CATGCCATGGATCGATGAAATGGAGAATCCTTCCTGACTTAAATC-3' (서열번호 3)

[0040] yAtg7c-R: 5'-GAAGATCTCGCTGCCGAGCAATTTTCATCAGATTCATCATCTTCCC-3' (서열번호 4:)

[0041] 상기 클로닝된 yAtg7c 유전자 내부에는 다복제구역에서 목적유전자를 클로닝할 때 자주 쓰이는 EcoRI 과 XhoI 제한효소의 절단서열이 존재하기 때문에 이 유전자를 그대로 사용하면 재조합 단백질을 클로닝하기에 많은 어려움이 있다. 따라서 Site Directed Mutagenesis 기법을 이용하여 아미노산 서열의 변화없이 제한효소 절단서열을 제거하기로 하였다.

[0042] SDM 프라이머-F: 5'-GGATTTAAATTTGAAGCTAATGAAATGGAGAATCCTTCCTGACTTAAATCTA-3' (서열번호 5)

[0043] SDM 프라이머-R: 5'-TAGATTTAAGTCAGGAAGGATTCTCCATTTTCATTAGCTTCAAATTTAAATCC-3' (서열번호 6)

[0044] SDM 프라이머 F2:

[0045] 5'-TTATTGGTGGATTCTCGCGAAAGCAGATGGCTTCC-3' (서열번호 7)

[0046] SDM 프라이머 R2:

[0047] 5'-GGAAGCCATCTGCTTTCGCGAGAATCCACCAATAA-3' (서열번호 8)

[0048] 서열번호 5~8의 프라이머를 사용하여, PCR을 수행한 산물을 DpnI 제한효소를 처리하여 주형을 제거한 후 대장균 DH5a 균주에 형질전환하였다. 이후 형성된 colony군 중 일부를 접종한 후 mini-prep하여 sequencing하였을 때 단백질 서열은 그대로이고 제한효소서열이 제거된 yAtg7c 유전자를 획득할 수 있었다(도 1 및 도 2).

[0049] 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 기존 유전자와 mutation된 유전자의 DNA 서열(A)과 아미노산 서열(B) 비교. EcoRI과 XhoI 제한효소서열이 제거되었음에도 아미노산 서열은 변하지 않았음을 알 수 있다.

[0050] (2) pET-yAtg7c 벡터의 제작

[0051] yAtg7c 벡터를 만들기 위해 NcoI과 BglIII 제한효소가 인식할 수 있는 DNA서열을 포함한 프라이머를 제작하여 yAtg7c를 PCR한 후 pET-His 벡터와 함께 제한효소처리하여 라이게이션하였다.

[0052] purification 과정을 거친 DNA 조각을 37℃에서 NcoI과 BglIII 제한효소로 처리하였으며 마찬가지로 pET-His 벡터도 함께 제한효소로 처리하였다. 이후 벡터는 CIP 효소를 처리하여 self-ligation이 되지 않도록 인산기를 제거하였다. 전기영동을 통하여 수득한 DNA 조각과 벡터를 라이게이션하였으며 상온에서 하루 반응시킨 후 DH5a 균주에 형질전환하였다. 이후 형성된 colony군 중 일부를 콜로니 PCR한 후 PCR된 콜로니를 sequencing하여 pET-yAtg7c 벡터를 제작하였다(도 3).

[0053] pET-yAtg7c 벡터에는 MCS에 다양한 제한효소서열을 두어 목적 단백질을 쉽게 클로닝할수 있도록 되어있으며 단백질 정제에 적합하도록 태그 아미노 말단에 6 X 히스트딘이 부착되어있다. 또한 TEV 프로테아제 절단서열을 두어 필요할 때 목적 단백질을 분리하여 정제할 수 있도록 설계하였다.

[0054] 실시예 2: RavZ 유전자 함유 재조합 벡터의 제조방법

[0055] RavZ 유전자(서열번호 11)는 *Legionella pneumophila* DNA에서 서열번호 9~10의 프라이머를 사용하여 PCR하였으며 BL21(DE3) 대장균에서 발현시켰다.

[0056] 프라이머 F: 5'-CAGGGATCCATGAAAGGCAAGTTAACAGGTAAAG-3' (서열번호 9)

[0057] 프라이머 R:

[0058] 5'-CTCGAGCTATTTTACCTTAATGCCACCATGC-3' (서열번호 10)

[0059] 대장균은 37℃에서 베플 플라스크로 배양하였으며 단백질 발현시에는 특히 18℃에서 18시간 배양하였다. 배양시 종균의 접종은 1/500의 비율로 사용하였으며 항생제는 50 µg/ml 카나마이신을 사용하였다. 단백질 발현시에는 IPTG 0.5 mg/ml로 발현을 유도하였다.

[0060] **실시예 3: RavZ 융합단백질의 정제 및 결정화방법**

[0061] RavZ 융합단백질은 HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) 컬럼을 이용하여 친화 크로마토그래피로 초기 정제를 시도하였고 HiTrap Q FF 5 ml (GE Healthcare) 컬럼을 이용하여 이온교환 크로마토그래피로 다시 한번 정제하였다. 마지막으로 Hiload 16/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare)를 이용한 크기배제 크로마토그래피를 통과하여 순수하게 정제된 융합단백질로 Hanging drop vapor diffusion method로 22℃에서 결정화를 시도하였다.

[0062] **실시예 4: yAtg8 유전자 함유 재조합 벡터의 제조방법**

[0063] yAtg8 유전자는 *Saccharomyces cerevisiae* S288c cDNA에서 서열번호 12 및 13의 프라이머를 사용하여 PCR하였으며 BL21(DE3) 대장균에서 발현시켰다.

[0064] 프라이머 F: 5'-GCAGGGATCCATGAAGTCTACATTTAAGTCTGAATATCCATTGA-3' (서열번호 12)

[0065] 프라이머 R:

[0066] 5'-CTCGAGCTACCTGCCAAATGTATTTTCTCCTGAGTAAGTGACATAC-3' (서열번호 13)

[0067] 대장균은 37℃에서 배플 플라스크로 배양하였으며 단백질 발현시에는 특히 18℃에서 18시간 배양하였다. 배양시 종균의 접종은 1/500의 비율로 사용하였으며 항생제는 50 µg/ml 카나마이신을 사용하였다. 단백질 발현시에는 IPTG 0.5 mg/ml로 발현을 유도하였다.

[0068] **실시예 5: Atg8 융합단백질의 정제 및 결정화방법**

[0069] yAtg8 융합단백질은 HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) 컬럼을 이용하여 친화 크로마토그래피로 초기 정제를 시도하였고 HiTrap Q FF 5 ml (GE Healthcare) 컬럼을 이용하여 이온교환 크로마토그래피로 보다 순수하게 정제하였다. 마지막으로 Hiload 16/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare)를 이용한 크기배제 크로마토그래피를 통과하여 순수하게 정제된 융합단백질로 Hanging drop vapor diffusion method(Alexander McPherson (1982) "Preparation and analysis of protein crystals" John Wiley & Son, New York)로 22℃에서 결정화를 시도하여 결정화하였다. 결정화 조건은 아래와 같다:

[0070] 0.1 M HEPES (pH 7.5), 7~10% (w/v) PEG 3,350, 20 mM proline.

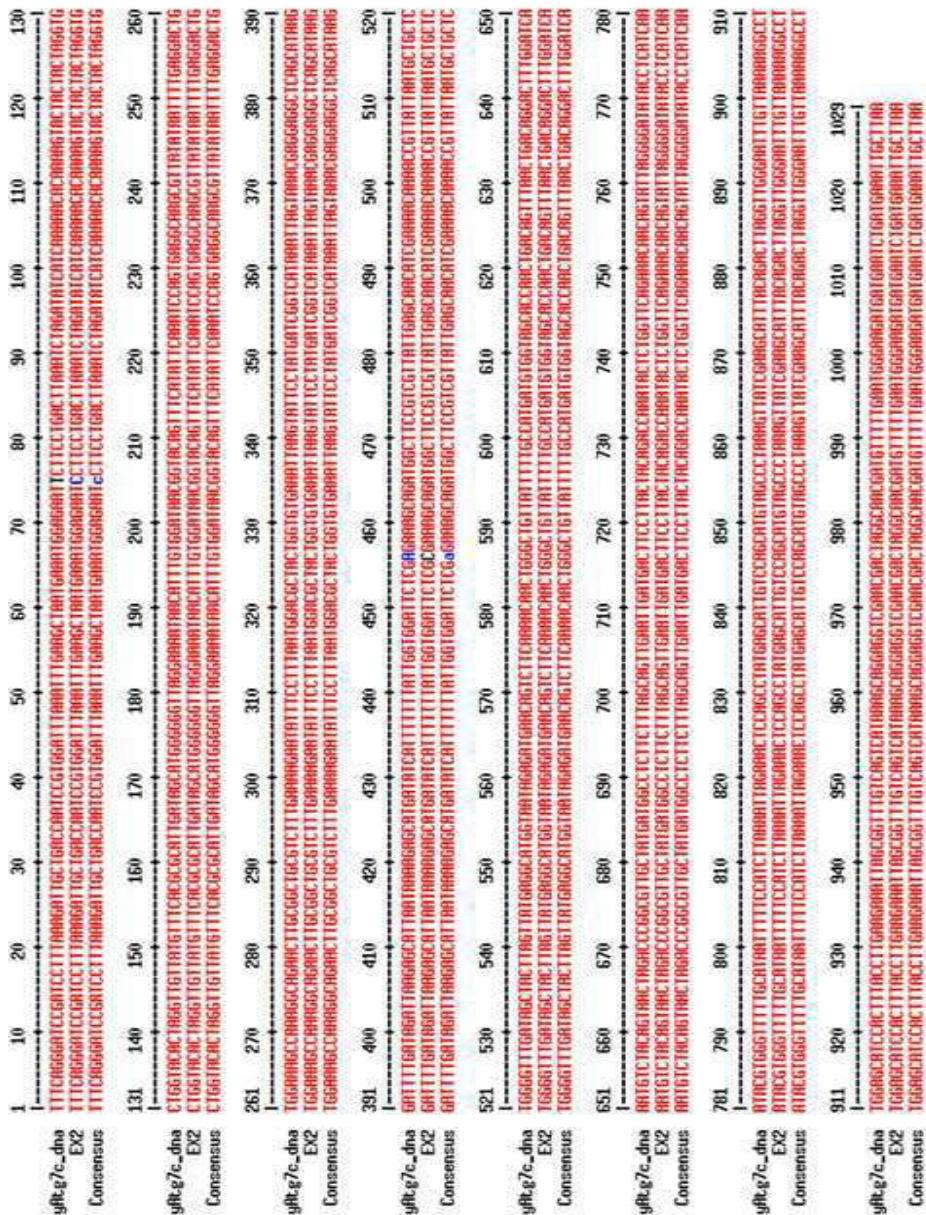
[0071] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 융합 단백질의 크기배제 크로마토그래피를 통과하였을 때의 SDS-PAGE 결과. 높은 순도로 융합단백질이 정제되는 것을 확인할 수 있었다. 도 4의 a는 yAtg7c-RavZ 융합단백질을 나타내고(레인1 분자량 마커, 레인2-4 크기배제 크로마토그래피 후 분획), b는 yAtg7c-yAtg8 융합단백질을 나타낸다(레인1 분자량 마커, 레인2 크기배제 크로마토그래피 전 분획, 레인3-9 크기배제 크로마토그래피 후 분획).

[0072] 도 5의 결정화 구조 모델은 PyMOL 소프트웨어로 만들어졌으며 3차원 결정화 모델을 얻은 yAtg7-yAtg8 융합단백질 모델에 결합 가능한 다른 단백질 모델을 superpose하여 얻었다.

[0073] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

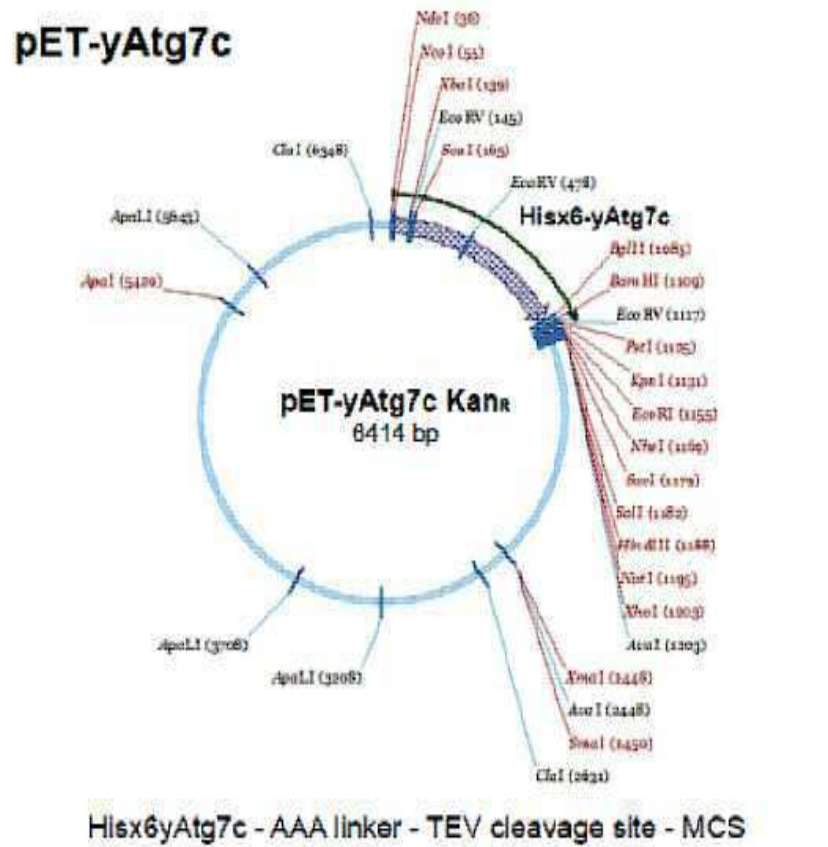
도면1



도면2

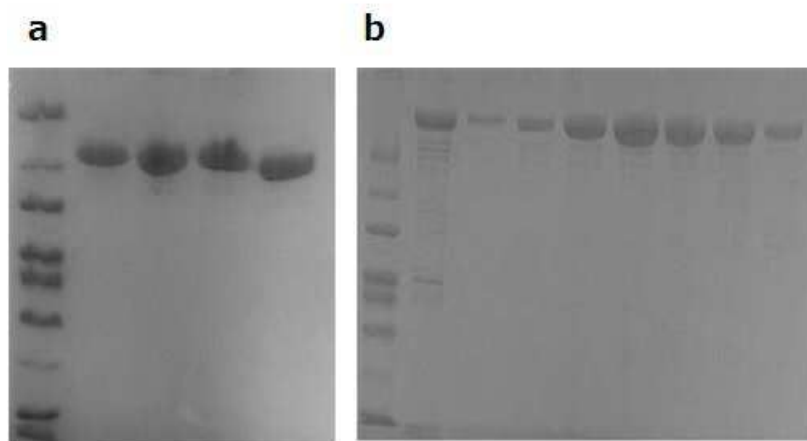


도면3

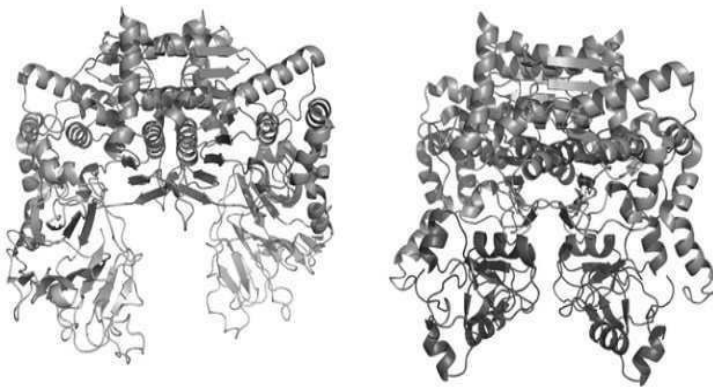


1	ATGAGTTAA ATGAGTTAA AGAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA									
	ATGAGTTAA ATGAGTTAA AGAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA ATAGAGAA									
1001	TCATAGAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA									
	TCATAGAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA GATAGTAA									
1101	TTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA									
	TTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA TTTTCAGAA									
1201	ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA									
	ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA ATGAGTTAA									

도면4



도면5



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY FOUNDATION
- <120> Recombinant Vector Including Gene of Autophagy Activation Protein and Crystallizing Method for Recombinant Protein Using Thereof
- <130> P15-B123
- <160> 13
- <170> KapatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 359
- <212> PRT
- <213> Saccharomyces cerevisiae
- <400> 1

Met His His His His His His Gly Asp Pro Leu Lys Ile Ala Asp Gln

1 5 10 15
 Ser Val Asp Leu Asn Leu Lys Leu Met Lys Trp Arg Ile Leu Pro Asp

 20 25 30
 Leu Asn Leu Asp Ile Ile Lys Asn Thr Lys Val Leu Leu Leu Gly Ala
 35 40 45
 Gly Thr Leu Gly Cys Tyr Val Ser Arg Ala Leu Ile Ala Trp Gly Val
 50 55 60
 Arg Lys Ile Thr Phe Val Asp Asn Gly Thr Val Ser Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80
 Val Arg Gln Ala Leu Tyr Asn Phe Glu Asp Cys Gly Lys Pro Lys Ala
 85 90 95

 Glu Leu Ala Ala Ala Ser Leu Lys Arg Ile Phe Pro Leu Met Asp Ala
 100 105 110
 Thr Gly Val Lys Leu Ser Ile Pro Met Ile Gly His Lys Leu Val Asn
 115 120 125
 Glu Glu Ala Gln His Lys Asp Phe Asp Arg Leu Arg Ala Leu Ile Lys
 130 135 140
 Glu His Asp Ile Ile Phe Leu Leu Val Asp Ser Arg Glu Ser Arg Trp
 145 150 155 160
 Leu Pro Ser Leu Leu Ser Asn Ile Glu Asn Lys Thr Val Ile Asn Ala

 165 170 175
 Ala Leu Gly Phe Asp Ser Tyr Leu Val Met Arg His Gly Asn Arg Asp
 180 185 190
 Glu Gln Ser Ser Lys Gln Leu Gly Cys Tyr Phe Cys His Asp Val Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Asp Ser Leu Thr Asp Arg Thr Leu Asp Gln Met Ser Thr
 210 215 220
 Val Thr Arg Pro Gly Val Ala Met Met Ala Ser Ser Leu Ala Val Glu
 225 230 235 240

 Leu Met Thr Ser Leu Leu Gln Thr Lys Tyr Ser Gly Ser Glu Thr Thr
 245 250 255

Val Leu Gly Asp Ile Pro His Gln Ile Arg Gly Phe Leu His Asn Phe
 260 265 270
 Ser Ile Leu Lys Leu Glu Thr Pro Ala Tyr Glu His Cys Pro Ala Cys
 275 280 285
 Ser Pro Lys Val Ile Glu Ala Phe Thr Asp Leu Gly Trp Glu Phe Val
 290 295 300
 Lys Lys Ala Leu Glu His Pro Leu Tyr Leu Glu Glu Ile Ser Gly Leu

305 310 315 320
 Ser Val Ile Lys Gln Glu Val Glu Arg Leu Gly Asn Asp Val Phe Glu
 325 330 335
 Trp Glu Asp Asp Glu Ser Asp Glu Ile Ala Ala Ala Ala Arg Ser Glu
 340 345 350
 Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser
 355

<210> 2

<211> 1077

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

atgcatcacc accatcacca tggagatcct ttaaagattg ctgaccaatc cgtggattta 60

aatttgaagc taatgaaatg gagaatcctt cctgacttaa atctagatat catcaaaaac 120

acaaaagtac tactactagg tgctggtaca ctaggttgtt atgtttcacg cgcattgata 180

gcatgggggg ttaggaaaat aacattttgtg gataacggtg cagtttcata ttcaaatcca 240

gtgaggcaag cgttatataa tttttaggac tgtggaaagc caaaggcaga acttgccggt 300

gcgtctttga aaagaatatt tcctttaatg gacgctactg gtgtgaaatt aagtattcct 360

atgatcggtc ataaattagt aaacgaggag gctcagcata aggattttga tagattaaga 420

gcattaataa aagagcatga tatcatTTTT ttattggtgg attctcgcga aagcagatgg 480

cttccgtcgt tattgagcaa catcgaaaac aaaaccgtta ttaatgctgc tctggggttt 540

gatagctact tagttatgag gcatggtaat agagatgaac agtcttcaa acaactgggc 600

tgttatTTTT gccatgatgt ggtagcacca actgacagtt taactgacag gactttggat 660

caaatgtcta cagtaactag acccgcggtt gctatgatgg cctcttcttt agcagttgaa 720

ttgatgactt cttactaca gaccaatac tctggttcag aaacaacagt attaggggat 780

atacctcatc aaatacgtgg gtttttgcac aatttttcca tcttaaaatt agaaactcca 840

gcctatgagc attgtccagc atgtagccct aaagttatcg aagcatttac agacttaggt 900

tggaatttg ttaaaaaggc cttggagcat ccactttacc ttgaagaaat tagcggtttg 960

tcagtcataa agcaggaggt cgaacgacta ggcaacgatg tttttgaatg ggaagatgat 1020

gaatctgatg aaattgctgc ggcagcgaga tctgaaaacc tgtattttca gggatcc 1077

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

catgccatgg atcgatgaaa tggagaatcc ttcctgactt aaatc 45

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gaagatctcg ctgccgcagc aatttcatca gattcatcat cttccc 46

<210> 5

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggattttaat ttgaagctaa tgaaatggag aatccttcct gacttaaatc ta 52

<210> 6

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tagatttaag tcaggaagga ttctccattt cattagcttc aaattttaat cc 52

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 ttattggtgg attctcgca aagcagatgg cttcc 35
 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ggaagccatc tgctttcgcg agaatccacc aataa 35
 <210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 cagggatcca tgaaaggcaa gttaacaggt aaag 34
 <210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 ctcgagctat tttaacctaa tgccaccatg c 31
 <210> 11
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> Legionella pneumophila
 <400> 11

atgaaaggca agttaacagg taaagacaaa ttaatagtagg atgagtttga agaactggga	60
gaacaggaat ccgatatcga tgaatttgat ctctctgaag gtgatgagaa attgcctggc	120
gactcagagc ttgacaaaac tacatctatt tatcctcccc aaaccagctg ggaagtgaat	180
aaagggatga acagttctcg ttgcataaa ctatacagtt tattctttga caaaagticc	240
gccttttatac ttggcgatga tgttagtgta ttggaagaca agcctttaac aggtgcctat	300
ggttttcaga gtaaaaaaaaa tgatcaacaa atttttttat tcagaccgga ttctgattat	360
gttcaggat atcacgttga tgcaaatca gacgctggat gggtaaatga caaactcgat	420
cgctgtttat ctgagattag tgaattttgt agtaaggcca ctcaacctgc aacgtttata	480
cttctttttg ttgaaatgcc cactgacatt accaaagggg ttcaacacca ggtattgtta	540
actattagct acgatccaaa aagtaaaca ctcactccca ctgtctatga ctccattgga	600
cgagatacct actctgaatc gttatcatcc tattttaaag gcaaatatag aacaacttgc	660
gatgaaattt tgacccaaag tattgaaaaa gctattaaga gcactgattt tactcttggt	720
aaatttacac gagctgctta taaccatcaa aaccgcctca ccgaaggcaa ttgcgggtct	780
tataccttca ggacgattaa agaggttatt tcatactcag cacaaggtag tgaagtaaaa	840
attcctggct caggatatat tacttctaac agttatttaa caagtcagca cgtacaagac	900
attgaaagtt gcattaaata tagaaatttg ggggttggtg atatcgaaag tgctttgact	960
gaaggtaaaa cattaccggt acagctttct gaattttattg ttgccttgga agattatggg	1020
aaattacgaa gtcaacaatc tgaaaaaagc atgttgaatt ttattggcta cagcaagaca	1080
gcaaaattga ccgctgttga gctgctaata ggcattttta atgatatcaa aggcaaaaat	1140
gaaatcagtg aatctcaata tgataaatta gtaaaggaag tcgattgttt aatggattca	1200
tctttaggaa agttggtaca atttcacctt aaaaatttag gcgctgaatc actacaaaaa	1260
ctggtacttc cgtgtgtcaa gtttgatgat acgatagatg attttgtgac tatcgaaaaa	1320
gacgaactat tcgatgtacc cgatattaca ggggaagagc ttgcctctaa aaaagggtt	1380
gagcaagggtg ctctggataa agaggcttta ctaaaacaaa aacagattaa aacggatttg	1440
ttagaccttc gcgaagaaga taaaaccggt ctgaaaaaac cattgcatgg tggcattaag	1500
gtaaaatag	1509
<210> 12	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	12	
gcagggatcc atgaagtcta catttaagtc tgaatatcca ttgga		45
<210>	13	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
ctcgagctac ctgccaaatg tattttctcc tgagtaagtg acatac		46