(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/00
C12N 15/81
C12P21/00

(45) 공고일자 1997년04월14일
(11) 공고번호 특1997-0005250

(21) 출원번호	특1988-0005553	(65) 공개번호	특1989-0010198
(22) 출원일자	1988년05월13일	(43) 공개일자	1989년08월07일

(30) 우선권주장 62-306674 1987년12월02일 일본(JP)
63-45605 1988년02월26일 일본(JP)

가부시끼가이샤 미도리쥬지 수야마 다다가즈
일본국 오사까후 오사까시 히가시꾸 이마바시 1-쪼메 15-1

(72) 발명자 하야수께 나오푸미
일본국 오사까 이바라끼-시 미나미 가수가오까 2-11-15
나까가와 유끼미쯔
일본국 오사까 히라까따-시 구주하 하나조노-쪼 5-2-603
이시다 유따까
일본국 오사까 히라까따-시 마끼노 기따-마찌 5-12-205
오카바야시 켄
일본국 오사까 히라까따-시 구주하 아사히 1-1-6-24
무라까미 코지
일본국 오사까 히라까따-시 마찌 구주하 1-27-11-301
쯔쭈이 기요시
일본국 교또 쭈주끼군 다나베-쪼 마쭈이가오까 1-29-5
이께가야 가주오
일본국 도꾜 기따-꾸 다끼노가와 1-69-10
미나미노 히도시
일본국 오사까 오사까-시 죠또-구 이마부꾸 니시 1-13-8-504
우에다 사다오
일본국 교또 무꼬-시 데라도-쪼 히르유 8-3 룸 8 허르유-소
가와베 하루히다
일본국 오사까 수이따-시 야마따 니시 3-29-14
아리무라 히로부미
일본국 오사까 도요나까-시 우에노자까 2-18-1-401
마사끼 아쯔시
일본국 오사까 히라까따-시 교리가오까 5-3-1, DNA 고리-단찌스 1-4

(74) 대리인 이병호, 최달용

심사관 : 김형준 (책자공조 제4941호)

(54) 효모에서 외래단백질을 제조하는 방법 및 재조합 DNA

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

효모에서 외래단백질을 제조하는 방법 및 재조합 DNA

[도면의 간단한 설명]

제1도는 GAL1,10 프로모터를 함유하는 pGAL11로부터 pGAL12를 제조하는 과정을 나타낸다.

제2도는 pho5 유전자 전부를 함유하는 pAP5 및 pUC9로부터, pho5 터미네이터만을 함유하는 pPT1을 제조하는 과정을 나타낸다.

제3도는 pJDB207로부터 pPT2를 제조하는 과정을 나타낸다

제4도 및 제5도는 프레프로 사람 혈청 알부민 유전자를 함유하는 pGX401의 제한효소 지도를 나타낸다.

제6도는 pGX401 및 pUC19로부터 사람 혈청 암부민 유전자 C-말단 부위를 함유하는, pHSA2를 제조하는 과정을 나타낸다

제7도는 pGX401 및 pUC19로부터 사람 혈청 알부민 유전자 N-말단 부위를 함유하는 pHSA1을 제조하는 과정을 나타낸다.

제8도는 pHSA1, pHSA2 및 합성된 시그널 펩티드 유전자로부터 시그널 펩티드 유전자 및 완전한 사람 혈청 알부민 유전자를 함유하는 pNH001을 제조하는 과정을 나타낸다.

제9도는 pNH001 및 pGAL12로부터, GAL1 프로모터, 시그널 펩티드 유전자 및 완전한 사람 혈청 알부민 유전자를 함유하는 pNH007을 제조하는 과정을 나타낸다.

제10도는 pNH007 및 pPT2로부터 GAL1 프로모터, 시그널 펩티드 유전자, 완전한 사람 혈청 알부민 유전자 및 pho5 터미네이터를 함유하는 pNH008을 제조하는 과정을 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 외래단백질을 암호화하는 DNA에 인접한 혈청 알부민 시그널 펩티드를 암호화하는 DNA를 포함하는 발현 재조합 DNA를 사용하여 호모내에서 외래단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

재조합 DNA 기술에 의한 재조합 숙주의 특정 단백질의 생성에 있어서, 숙주가 목적하는 단백질을 발현하고 분비하는데는 많은 장점이 있다. 즉, 목적하는 단백질이 숙주 세포내에서 직접 발현되었을때, 숙주 세포의 생장을 억제하거나 숙주 세포의 생존을 저해하는 어떠한 독성이 있다면, 단백질을 분비함으로써 이 독성을 제거시킬 수 있다. 독성이 없더라도, 단백질이 숙주 세포내로 축적됨에 따라 단백질은 숙주 세포의 생장을 억제할 수도 있다. 이것 또한 분비성 발현에 의해 제거될 수 있다. 추가로, 숙주 세포내에 단백질을 축적하는 시스템은 단백질을 변성시켜서 불용성화시킬 수 있다. 이러한 문제점 또한 분비성 발현에 의해 제거 될 수 있다. 더우기 세포내에서 목적하는 단백질을 축적시키는 시스템에서 재조합 DNA 기술로써 단백질을 상업적으로 생산하는 경우, 단백질을 정제하기 위하여는 세포를 파괴할 필요가 있고, 세포파괴물의 잔사로부터 정제시켜야만 한다. 이는 고순도의 단백질을 수득하는 것을 어렵게 한다. 반면에, 분비성 발현 시스템에 의해 단백질을 생산할 때, 재조합 숙주로부터 불순물을 분리할때의 문제점을 최소화하면서 배양 브로쓰로부터 단백질만 회수할 수 있다. 이는 큰 장점이다. 최종적으로, 대부분의 단백질은 당 부위의 첨가, 디설파이드화 결합의 형성, 제한된 가수분해에 의한 불활성 프로단백질의 활성화, 특정한 아미노산의 인산화, 또는 활성화전의 카르복실화와 같은 약간의 변형을 받는다. 이들 작용중 몇몇은 그들 스스로가 수행하고 이들 변형중의 몇몇은 분비과정에서 발생한다. 그러므로, 분비성 발현에 의해 단백질을 생산하는 시스템은, 세포내에 단백질을 축적하는 시스템에 비해서 천연단백질과 더 유사한 구조 및 기능을 갖는 단백질을 생산하는 것으로 기대된다.

시그널 펩티드의 특성에 관해서는 공지되어 있고, 이의 아미노산 서열의 특징이 하기와 같이 나타난다. N-말단 근처에는 많은 염기성 아미노산이 있고, C-말단 부위에서 시그널 펩티다제에 의해 분해되는 부위근처에는 많은 극성 아미노산이 있으며, 이들 두 부위 사이의 공간에는 소수성 아미노산 서열이 있다. N-말단 근처 염기성 아미노산은 세포막 내표면의 인지질과 상호작용하고, 중간 부위의 소수성 아미노산 서열은 단백질이 세포막을 통과하는데 중요한 역할을 한다. C-말단에서 극성 아미노산은 시그널 펩티다제에 의한 절단 과정에서 인지에 어떠한 역할을 하는 것으로 사료된다. 이들 특성은 원핵생물에서부터 고등동물에 이르기까지 극히 유사하고 단백질 분비에 대한 통상적인 기작을 암시한다[참고문헌:M.S. Briggs and L.M.Gierasch, Adv. Protein Chem., 38, 109-180(1986):G. Von Heijne, EMBO J., 3, 2315-2318(1984)].

사람 혈청 알부민은 프레프로형 단백질로서 유전자로 암호화되어 있다[참고문헌:일본국 특허원(OPI) 제29985/87호(여기에서 사용된 OPI 용어는 미심사된 공보를 의미한다) 또는 유럽 특허원 제206733호: A. Dugaiczyk et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 79, 71-75(1982)]. 분비에 필수적인 시그널 펩티드로부터 시작되는 완전한 사람 혈청 알부민의 N-말단 근처의 DNA 및 아미노산 서열을 하기 표 1에 나타낸다

[표 1]

	시그널 펩티드			프로펩티드		
−18			−1	−6	−1	+1
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His						
ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT AGC TGG CTT ATT CCA GGG GTG TGT TTC GTC GAG ATG CAC AC						

18개 아미노산으로 구성된 시그널 펩티드는 분비시에 제거된다. 6개 아미노산으로 구성된 프로펩티

드는 프로세싱에 의해 제거되고, 585개 아미노산으로 구성되고 이의 N-말단 아미노산 서열이 Asp-Ala-His-Lys-Ser…인 완전한 사람 혈청 알부민을 수득한다.

효모는 적은량의 세포의 프로테아제를 분비하고, 자신의 분비물에 당 부위를 첨가시킬 수 있기 때문에 외래단백질의 분비발현에 유리하다.

효모이외의 다른 세포에서의 분비성 발현에 기여하면서, 효모에서도 작용하는 시그널 펩티드의 몇몇 경우가 보고되어 있다. 이의 예를 들면 닭 라이소자임 시그널 펩티드를 사용하여 사람 라이소자임을 효모내에서 분비 발현[참조:Jigami, BIOINDUSTRY, 4, 117-123(1987)], 식물 단백질 소마틴의 시그널 펩티드를 사용하여 소마틴을 효모내에서 분비 발현[참조: L. Edens, I. Bom, A.M. Ledeboer, J. Maat, M.Y. Toonen, C. Visser and C.T. Verrips, Cell, 37, 629-633(1984)], 및 사람 인터페론-a의 시그널 펩티드를 사용하여 사람 인터페론의 효모내에서의 분비 발현[참조:R.A. Hitzeman, D.W. Leung, L.J. Perry, W.J. Kohr, H.L. Levine and D.V. Doeddel, Science, 219,620-625(1983)]이 포함된다.

그러나 실제로는 효모이외의 다른 세포에서의 분비 발현에 기여하는 시그널 펩티드가 효모에서 항상 작용을 하지는 않는다.

그러므로, 본 발명의 주목적은 효모내에서 외래단백질을 효율적으로 발현 및 분비시키기 위한 방법, 효모에서 분비 발현시에 작용을 하는 시그널펩티드 유전자, 이 방법에서 사용되는 벡터, 이 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체이다.

상술된 본 발명 목적의 첫번째 양태는 언급된 외래단백질 유전자에 인접한 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자를 포함하는 재조합 DNA로 형질전환된 효모에 의해 전술된 외래단백질을 발현 및 분비함을 특징으로하는 외래단백질의 제조방법이다. 둘째 양태에서, 본 발명은 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자와 이의 유도체에 관한 것이다. 세제 양태에서, 본 발명은 외래단백질을 암호화하는 DNA에 인접한 혈청 알부민 시그널 펩티드를 암호화하는 DNA를 포함하는 효모를 형질전환하기 위한 재조합 DNA에 관한 것이다. 네째 양태에서, 본 발명은 외래단백질을 암호화하는 DNA에 인접한 혈청 알부민 시그널 팹티드를 암호화하는 DNA를 포함하는 재조합 DNA로 형질전환된 효모 균주에 관한 것이다.

본 발명의 재조합 DNA는 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자, 외래단백질 유전자, 프로모터, 터미네이터 및 플라스미드 DNA 또는 염색체 DNA를 포함한다.

혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자의 기원은 포유동물에서 유도되는 한 특정하게 한정되지는 않는다. 실제로, 사람-유도된, 래트-유도된 및 소 유도된 제제가 사용될 수 있다.

이러한 시그널 펩티드 아미노산 서열의 예는 한가지를 포함하는 것으로 공지되어 있다.

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser 사람에게 유도됨.

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Lue Phe Ile Ser Gly Ser Ala Phe Ser 래트에서 유도됨.

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Leu Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser 암소로부터 유도됨.

그러나, 사람 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자를 사용하는 것이 바람직하고, 2번째 아미노산 및 마지막 5개 아미노산은 하기의 서열과 같이 Y 및 Xs로 변화될 수 있다.

Met Y Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe X X X X X

여기에서 Y는 Lys, Arg 또는 His를 나타내고 바람직하게는 Lys를 나타내며; X는 Ala, Pro 또는 Ser를 나타내고; X는 Lys, Gly 또는 Ser를 나타내며; X은 Ala, Val 또는 Cys를 나타내고 바람직하게는 Val 또는 Cys를 나타내며; X는 Tyr, Trp 또는 Ser를 나타내고; X는 Ser, Ala 또는 Gly를 나타내고 바람직하게는 Ala 또는 Gly를 나타낸다. 시그널 펩티드의 아미노산 서열의 바람직한 예를 하기 표 2에 나타낸다.

[표 2]

서열번호	Y	X_5	X_4	X_3	X_2	X_1
서열 1	Lys	Ser	Ser	Val	Tyr	Ala
서열 2	Lys	Ala	Lys	Val	Ser	Ala
서열 3	Lys	Pro	Gly	Cys	Trp	Ala
서열 4	Lys	Pro	Gly	Val	Trp	Ala

혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자는 상기 나타난 아미노산 서열로 발현될 수 있는 DNA 서열을 함유하고, 한 예는 하기의 DNA 서열을 갖는다.

ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTT

CTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCC

각 아미노산에 상응하는 바람직한 코돈을 하기에 나타낸다.

Ala : GCT 또는 GCC,	Cys : TGT,	Asp : GAC,
Glu : GAA,	Phe : TTC,	Gly : GGT,
His : GAC,	Ile : AAT 또는 ATC,	Lys : AAG,
Leu : TTG,	Met : ATG,	Asn : AAC,
Pro : CCA,	Gln : CAA,	Arg : AGA,
Ser : TCT 또는 TCC,	Thr : ACT 또는 ACC,	Val : GTT 또는 GTC,
Trp : TGG,	Tyr : TAC	

본 발명에서는 외래단백질로서, 사람 혈청 알부민, 인터페론-α, -β 또는 -γ, 우로키나제, 성장호르몬, 인슐린, 인자 Ⅷ, EPO, h-ANP, M-CSF 및 여러 가지 림포킨(lymphokine)을 사용할 수 있다.

사람 혈청 알부민의 경우에서, 프레형, 프로형, 또는 프레프로형을 사용할 수 있고 우로키나제의 경우에, 프로형 또는 어떤 다른형을 사용할 수 있다. 외래단백질 중에서, 특히, 완전한 사람 혈청 알부민 유전자가 바람직하다. 본 발명에 따르면, 완전한 사람 혈청 알부민 유전자가 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자에 대하여 바로 하부에 위치할 경우, 실제적인 양의 알부민을 생산할 수 있다.

이러한 외래단백질 유전자는 하기 문헌에 기술되어 있다[참조:일본국 특허원(OPI) 제29985/87호 또는 유럽 특허원 제206733호(사람 혈청 알부민), 일본국 특허원(OPI) 제185189/86호 또는 독일연방공화국 특허원 제3603958(인터페론-α) 일본국 특허원(OPI) 제108397/86호 또는 유럽 특허원 제190686호(인터페론-γ), 일본국 특허원(OPI) 제180591/85호 또는 유럽 특허원 제154272호(우로키나제), 유럽 특허원 제160457호(인자 Ⅷ), 유럽 특허원 제148605호(EPO), WO 85-4670(h-ANP) WO 86-4607(M-CSF), 등)].

상기 공보에서, 발명은 외래단백질 유전자를 함유하는 플라스미드로 기술되어 있다.

본 발명에서 효모 형질전환용 재조합 DNA는 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자에 대하여 하부에 외래단백질 유전자를 결합시키므로써 제조할 수 있다.

프로모터 및 터미네이터는 효모에서 발견되는 것으로 특이적으로 제한되지는 않는다.

허용되는 프로모터는 PGK 프로머터[Nucleic Acid Res., 10(23), 7791(1982)], ADH 프로머터(ibid.), phoE(5) 프로모터(J. Mol. Biol., 163(4), 513(1983)], GAL1 프로모터[Mol. Cell. Biol., 4(11), 2467(1984)], GAL10 프로모터(유럽 특허원 제132309호) 및 GAP-DH 프로모터[J. Biol. Chem., 258, 5291(1983)]를 포함한다. 이러한 프로모터 중에서, GAL1 프로모터가 특히 바람직하다.

프로모터는 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자 상부에 존재한다.

허용되는 터미네이터는 phoE(5) 터미네티어[참조:Cell, 12, 721-732(1977)] 및 GAP-DH 터미네이터[참조:J. Bio. Chem., 254, 9839-9845(1979)]를 포함한다.

터미네이터는 외래단백질에 대하여 하부에 위치한다.

프로모터 및 터미네이터는 이미 플라스미드내에 혼입된 형으로 수득할 수 있다.

플라스미드 DNA는 효모 내에서 자기복제 능력이 있어야 한다.

허용되는 예는 pJDB207(Amersham사 제품) 및 PJDB219(Amersham사 제품)이다.

본 발명의 재조합 플라스미드는, 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자-외래단백질 유전자로 구성된 DNA 서열, 프로모터를 함유하는 DNA 서열, 및 터미네이터를 함유하는 DNA 서열을 제한효소를 사용하여 절단한후 그들을 커플링(연결)해서 적당한 플라스미드내로 도입시키거나, 하나의 DNA 서열을 절단한후 그것을 다른 플라스미드내로 혼입하여 수득할 수 있다.

또한, 본 발명의 재조합 염색체는 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자-외래단백질 유전자를 포함하는 DNA 서열, 프로모터를 함유하는 DNA 서열, 및 테미네이터를 함유하는 DNA 서열을 함유하는 DNA 서열을 효모 염색체 내로 삽입함으로써 수득할 수 있다. 상세한 방법은 문헌[참조:Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 78,6354-6358(1981) 및 Method Enzymol., 101, 228-245(1983)]에 기술되어 있다.

플라스미드 또는 염색체 상의 DNA 서열은 상부에서 하부까지 프로모터, 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자, 외래단백질 유전자, 및 터미네이터의 순으로 배열되어 있다.

목적하는 플라스미드를 선별하기 위한 마커(Marker)로서, 항생제(테트라사이클린, 앰피실린, 카나마이신)내성 유전자, 또는 숙주의 영양 요구성을 보충하기 위한 유전자를 삽입하는 것이 가능하다. 이러한 재조합 플라스미드에 의한 형질전환체를 제조하는 방법 또는 외래단백질을 제조하는 방법은 하기와 같다.

재조합 플라스미드를 숙주 세포, 즉 효모내로 도입한다. 실제적으로, 삽입될 플라스미드에 의해 전달되는 선택적 마커 유전자에 의해 보상될 수 있는 변이를 가지는 균주, 예를들어, 루이신-요구성 변봉인 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae) AH22(a, his4, leu2, can1)가 사용가능하다.

숙주 세포(효모)의 형질전환은, 공지된 방법 예를들면, 인산칼슘염 침전 방법, 원형질체-폴리에틸렌글리콜 융합 방법, 전자극단법에 의해 수행된다.

형질전환체는 숙주 세포의 생장을 위한 공지된 배양 배지내에서 배양된다. 배양 배지의 실제적인 예는 YNB 액체 배양 배지[0.7w/v% 효모 질소 기재(Difco사 제품) 및 2w/v% 글루코우스], YPD 액체 배양 배지[1w/v% 효모 추출물(Difco사 제품), 2w/v% 폴리펩톤(Daigo Eiyo sha 제품), 2w/v% 글루코우스]등이다.

배양은 경우에 따라 통기시키거나 교반시키면서, 대개 15 내지 43℃(바람직하게는 약 30℃)에서 20 내지 100시간 동안 수행한다.

배양후에, 배양 상등액을 회수하고 외래단백질을 친화성 크로마토그라피 또는 분별과 같은 공지된 방법으로 정제시킨다.

본 발명의 방법을 사용하여, 목적하는 외래단백질을 분비성 발현에 의해 제조할 수 있다. 세포내 축적 시스템과 비교하여, 천연 단백질과 매우 유사한 구조 및 작용을 갖는 단백질의 생산을 기대할 수 있다.

추가로 세포내 축적 시스템에서, 단백질을 정련하기 위해 세포를 파괴시키고 파편을 함유한 액체로부터 단백질을 정제하는 것이 필요하나, 본 발명의 방법을 사용하면 이런 형의 정제 방법이 불필요하다.

단백질의 발현시 혈청 알부민 시그널 펩티드를 사용하면 신규한 분비성 발현 방법이 개발될 수 있다. 이는 본 발명의 잠재력 있는 용도를 상당히 증가시킨다.

본 발명을 어떤 측면에서도 제한하려는 의도 없이 하기 예를 참고로 하여 더 상세히 하기에 기술한다.

본 발명에서 사용된 기술, 반응 및 분석 방법의 대부분은 본 분야에서 이미 공지되었다. 달리 지적하지 않는한, 모든 효소는 다음과 같은 상업적 공급처로부터 수득할 수 있다:Takara Shuzo, Japan: New England Biolabs(NEB), Massachusetts, USA; Amersham, England: 및 Bethesda Research Laboratories(BRL), Maryland, USA.

효소적 반응을 위한 완충 용액 및 반응 조건은 달리 지적하지 않는한 효소 제조업자의 추천 항목을 따른다.

플라스미드에 의한 이.콜라이(Escherichia coli)의 형질 전환 방법, 콜로니 하이브리드화(hybridization), 전기 영동 및 겔로부터 DNA의 회수 방법은 콜드 스프링 하버 래버러토리(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)의 분바 클로닝에서 언급된 방법에 따라 수행한다. 효모는 콜드 스프링 하버 래버러토리(1981)의 효모 유전학의 방법에서 언급된 방법에 의해 형질 전환된다.

실시예

효모 GAL1, 10 프로모터의 클로닝

(A) 효모 염색체 DNA 라이브러리의 제조

효모 사카로마이세스 세레비지에 GRF18 PH080 cir° 균주[유럽 특허원 제0180958호에서 기술된 바와 같은]의 염색체 DNA를 알.크리어(R. Cryer) 등에 의해 기술된 방법[참조:Method Enzymol., 12, 39(1975)]으로 추출하고 정제한다.

문헌[M. Mohnson and R.W. Davis(Mol. Cell. Biol., 4, 1440-1448(1984)]에 따르면, 효모 GAL1, 10 프로모터 부위는 효모 염색에 상에 위치하고, 그것을 제한효소 EcoR I 및 Xba I 로 절단하면, DNA 단편 약 1kb가 수득된다. 그러므로, 상기 기술된 바와같이, 추출 및 정제된 효모 염색체 DNA를 EcoR I 및 Xba 로 분해하여 약 1kb의 DNA 단편을 전기영동으로 분리한다. 이들 단편을 **EcoR I 및 Xba I** 로 분해한 플라스미드 pUC19(BRL)과 혼합시키고, 송아지 장으로부터 유래된 알칼리성 포스파타제(CIP)를 사용하여 그의 5'말단에서 탈인산화 시킨다. 이들을 결합 키트(kit)(Takara Shuzo사 제품)를 사용하여 결합시킨다. 생성물을 이.콜라이 JM109(Takara Shuzo사 제품)내로 도입시킨다. 형질 전환체를 X-겔(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-갈락토사이드) 0.004w/v% 및 1mM IPTG(이소프로필-β, D- 티오갈락토피라노사이드)를 함유하는 YT 한천 평판상에 붓고 37℃에서 밤새 배양시킨다(한천 평판을 제조하기 위해서 폴리펩톤 8g, 효모 추출물 5g, 염화나트륨 5g을 물에 용해시켜 1ι를 만들고 한천 파우더 12g을 가한다. 오토클레이브에서 멸균후, 혼합물을 플라스틱 페트리디쉬에 붓고 고형화한다: 오토클레이빙 후 일단 배양 배지가 냉각되기 시작하면 X-겔 및 IPTG를 가한다.).

흰식 및 청색 콜로니가 나타나면, DNA가 삽입된 흰식 콜로니만 사용한다(여기에서 삽입된 재조합 플라스미드는 1acZ 유전자를 함유하지 않으므로 목적하는 형질전환체는 흰색 콜로니를 생산한다). 백개의 콜로니를 앰피실린 40㎍/ml을 함유하는 L-한천 평판상에 멸균된 이쑤시개를 사용하여 접종시킨다(한천판을 제조하기 위하여 트리스 베이스(tris base) 0.62g, 폴리펩톤 10g, 효모 추출물 5g 및 염화나트륨 5g을 물에 녹여 1ι를 만들고, 한천 파우더 12g을 가한다. 혼합물을 오토클레이브에서 멸균시키고, 플라스틱 페트리디쉬에 붓고 고형화시킨다;오토클레이빙 후에 일단 배지가 냉각되기 시작하면 앰피실린을 가한다). 이러한 L-한천 평판을 37℃에서 밤새 배양시킨다. 이러한 방법에 의해, 약 5,000개의 콜로니로 조성된 라이브러리(library)를 제조한다. 형성된 콜로니를 니트로 셀룰로즈 필터에 옮기고, 0.5M 수산화나트륨 및 1.5M 염화나트륨 용액에 담가 DNA를 변성시키며, 1.5M 염화나트륨 및 0.5M 트리스-염산 용액을 사용하여 pH 7.5로 중화시킨다. 이.콜라이(E.coli) 파편을 2× SSC(0.3M 염화나트륨, 0.03M 시트르산 나트륨 pH 7.0에서)로 세척하여 제거하고, 공기중에서 필터를 건조시킨후, 80℃에서 2시간 동안 진공건조시킨다.

(B) 탐침의 제조

GAL1, 10 프로모터를 암호화하는 유전자의 염기 서열 일부를 Applied Biosystem사의 모델 381A DNA 합성기를 사용하여 포스포르아미다이트 방법으로 합성한다. 그 서열을 하기에 나타낸다.

5'-CTCTATACTTTAACGTCAAG-3'

서열을 7M 우레아-20w/v% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 전기영동시켜서 정제한다. 정제된 DNA 서열의 5'말단을 [r-^{32}P] ATP 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용하여 방사능적으로 표지한다. 합성된 DNA 10pmol, [r-^{32}P] ATP 250μCi 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 8단위를 사용한 반응 결과, 말단이 ^{32}P[2×10^{7} cpm(Cerenkov count)]로 표지된 합성 DNA 탐침을 만들의다. 합성 DNA 탐침은 넨소르브20(NEN SORB 20)(듀퐁사 제품)을 사용하여 정제시킨다.

(C) GAL1, 10 프로모터의 선별방법

단계(A)에서 기술된 바와 같이 고정된 DNA를 가진 니트로셀룰로우스 필터(filter)를 한 세트가 10개의 필터로 이루어진 비닐 포대에 넣고 하기 방법을 수행한다. 6×SSC, 0.1w/v% SDS, 및 100℃에서 5분 동안 가열한후 빙냉 연어 정자 DNA 20㎍/ml으로 조성된 예비하이브리드화 용액 10ml를 봉인된 비닐 포대에 넣고 40℃에서 3시간 동안 배양시킨다. 그후 예비 하이브리드화 용액을 버리고 하이브리드화 용액 10ml을 가하여 40℃에서 밤새 배양시킨다. 하이브리드화 용액은 6×SSC, 0.1w/v% SDS 연어 정자 DNA 100㎍/ml 및 7.5×10^{5} cpm/ml ^{32}P-탐침을 함유한다. 배양후에, 필터를 비이커에 옮기고 50℃에서 30분간 6×SSC, 0.1w/v% SDS로, 50℃에서 30분 동안 2× SSC 및 0.1w/v% SDS로, 50℃에서 30분 동안 2×SSC 및 0.1w/v% SDS로, 최종적으로는 50℃에서 30분 동안 0.1×SSC 및 0.1w/v% SDS로 세척한다. 세척된 필터를 공기중에서 건조시키고 100 내지 200cpm의 점적 표시(spotting marks)후에 방사선 자동 사진법을 적용시킨다. 그 결과, 두개의 양성 클론이 수득된다, 클론중 1개를 앰피실린 40㎍/ml을 함유하는 슈퍼 브로쓰(Super broth)내 37℃에서 밤새 진탕 배양시킨다(슈퍼 브로쓰를 제조하기 위하여 박토 트립톤 12g, 효모 추출물 24g, 및 글리세롤 5ml을 물에 녹여 900ml를 만들고, 이를 오토클레이브로 멸균시켜 용액 A를 수득한다). 그후 인산이수소칼륨 3.81g 및 인산일수소칼륨 12.5g을 물에 녹여 100ml를 만들고, 오토클레이브로 멸균시켜 용액 B를 수득한다. 용액 A 및 B를 부피비 9:1로 혼합시킨다. 그후, 플라스미드 DNA를 추출하고 알칼리성-SDS 방법으로 추출 및 정제시킨다.

이러한 플라스미드 DNA(pGAL11, 제1도)의 염기 서열 부분을 디데옥시 방법으로 시험하면 문허[M, Johnston 및 R.W. Davis, Mol, Cell Biol., 4, 1440-1448(1984)]에 의해 공지된 서열과 일치한다. 즉, pGAL11은 EcoR I 부위로부터 Xba I 부위로 향하는 GAL1 프로모터 및 반대로 향하는 GAL10 프로모터를 함유하는 것으로 밝혀졌다.

(D) pGAL11의 Xba I 부위를 BamH I 부위로 전환시키는 방법

pGAL11상의 프로모터 서열을 시그널 펩티드 및 사람 혈청 알부민을 암호화하는 DNA 서열과 결합시킬 때 사람 혈청 알부민 유전자상에 방해하는 Xba I 부위가 존재하기 때문에 불리하다. 그러므로 Xba I 부위는 하기와 같이 BamH I 부위로 전환시킨다.

pGAL11을 Xba I 으로 분해한 후 점착 말단을 dGTP, dATP, dTTP, dCTp의 존재하에 이.콜라이-유도된 DNA 폴리머라제 I, 클레나우(klenow) 단편에 의해 복구한다. 이러한 DNA 단편에, 인산화된 5' 말단을 지닌 BamH I 링커(linker) pCGGATCCG를 가하고 T4 DNA 리가아제로 결합시킨다. 그후 BamH I으로 분해시킨후 T4 DNA 리가아제를 사용하여 재결합시키고 생성된 플라스미드를 이.콜라이 HB101(유럽 특허원 제13828호)에 도입시킨다. 생성된 형질전환체로부터, 플라스미드 pGAL12(제1도에서 나타낸 바와 같은)를 갖는 클론을 수득한다. pGAL12를 EcoR I 및 BamH I 로 절단시킴으로써, GAL1 및 GAL10 프로모터를 약 1kb의 DNA 단편으로서 분리할 수 있다.

(E) 효모 pho5 터미네이터를 갖는 이.콜라이-효모 셔틀 벡터 pPT2의 제조방법

사카로마이세스 세레비지에 pho5 유전자를 암호화하는 플라스미드 pAP5는 일본국 특허원(OPI) 제151183/87호 또는 유럽 특허원 제216573호에 기술된다. 이러한 플라스미드를 제한효소 BamH I 및 Pst I 으로 절단하고, 약 370개 염기쌍(bp) 인 pho5 터미네이터를 암호화하는 DNA 단편을 전기영동으로 분리시킨다(제2도). 그후 시판되는 pUC9(BRL)을 BamH I 및 Pst I으로 분해하고 알칼리성 포스파타제로 처리하여, 370개 염기쌍(bp)DNA 단편과 결합시킨다. 370개 bp 단편의 Sau3AI 절단 부위에서의 염기서열은

GATCC……

G……

이고 그것을 BamH I 의 점착 말단에 결합시켰을때, BamH I부위가 재생된다. 그러므로, 상기 결합반응에서 수득된 플라스미드 pPT1을 BamH I 및 Pst I 으로 분해시키거나 BamH I 및 HindIII 로 분해시켜 370개 염기쌍(bp)의 pho5 터미네이터를 소유한 DNA 단편을 수득한다.(제2도)

시판되는 셔틀벡터 pJDB207(제3도)는 이콜라이 및 효모에서 자가복제한다.

BamH I 및 HindIII를 사용하여 분해한 후, 알칼리성 포스파타제로 처리한다. pPT1을 BamH I 및 HindIII 를 사용하여 분해한 후, 370개 염기쌍의 pho5 터미네이터를 갖는 DNA 단편을 전기 영동으로 분리시키고, pJDB207과 결합시킨다. 생성된 형질전환체로부터, 플라스미드 pPT2(제3도

에서 나타난)를 갖는 클론을 수득한다. pPT2는 pho5 터미네이터를 함유한 이.콜라이-효모 셔특벡터이다. 이.콜라이에서, pPT2는 β-락타마제 활성을 갖는 앰피실린 내성 마커를 소유하고, 효모에서는 루이신 영양요구성을 보상하는 마커를 갖는다.

(F) 사람 혈청 알부민 유전자

사람 혈청 알부민을 암호화하는 DNA 서열은 일본국 특허원(OPI) 제29985/87호 또는 유럽 특허원 제206733호에 기술되어 있는 플라스미드 pGX401(제4도 및 제5도)로 부터 하기와 같이 유도한다.

pGX401을 제한효소 Xba I 및 HindIII 로 분해하고 3'비해독된 영역을 포함하는, 사람 혈청 알부민의 C-말단측 ^{357}Leu 내지 ^{585}Leu의 아미노산 서열을 암호화하는 약 750개 염기쌍(bp)의 DNA 단편(HSA2)을 전기영동으로 분리시킨다. 시판되는 플라스미드 pUS19를 Xba I 및 HindIII 로 분해하고, 알칼리성 포스파타제로 처리하여 5'발단을 탈인산화시키며, HSA2와 T4 DNA 리가아제를 사용하여 결합시킨다. 이것을 이.콜라이 HB101내로 도입시키고, 생성된 형질전환체로부터, 플라스미드 pHSA2(제6도에서 나타낸 바와 같은)를 갖는 클론을 수득한다.

pGX401을 Dra I 및 Xba I 으로 분해하면, 전기영동에 의해 약 1kb의 DNA단편을 분리시킬 수 있다. 이러한 DNA 단편은 사람 혈청 알부민의 N-말단 측의 $_{12}$Lys 내지 ^{356}Thr 아미노산 서열을 암호화하는 DNA서열이다.

Applied Biosystem 모델 38A DNA 합성기를 사용하여, 완전한 사람 혈청 알부민의 N-말단 ^{1}Asp 내지 ^{11}Phe의 아미노산 서열을 암호화하는 하기의 DNA 서열을 포스포르아미다이트 방법으로 형성시킨다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe
TC	GAC	GCA	CAC	AAG	AGT	GAG	GTT	GCT	CAT	CGG	TTT
	G	CGT	GTG	TTC	TCA	CTC	CAA	CGA	GTA	GCC	AAA

pGX401에서 아스파르트산(Asp)의 코돈은 GAT이나, 여기에서는 GAC를 사용한다. 결과로, pGX401로부터 유도된 1kb DNA 단편과 합성된 DNA를 결합시킨 후에, 그것을 pUC19의 Sal I – Xba I 부위내로 삽입시켰을때 Sal I 부위가 재생된다. 더우기, HincII로 분해했을때 완전한 사람 혈청 알부민의 N-말단 Asp 로부터 출발되는 아미노산 서열을 암호화할 수 있는 DNA 서열을 수득할 수 있다.

합성된 DNA의 5'말단을 ATP 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제로 인산화시킨다. pGX401을 Dra I 및 Xba I 으로 분해하고, 전기영동으로 1kb DNA 단편을 분리시킨다. 이러한 단편 및 포스포릴화된 합성 DNA를 T4 리가아제로 연결시키고, Sal I – Xba I 으로 분해한 다음 CIP로 탈인산시킨 pUC19와 결합시킨다. 생성된 DNA를 이.콜라이 HB101내로 도입하고 형질전환체로부터, 플라스미드 pHSA1(제7도에서 나타난 바와 같이)를 갖는 클론을 수득한다.

(G) 효모에서 사람 혈청 알부민을 발현 및 분비하는 플라스미드 DNA의 제조방법

하기 표3에 기재된 사람 혈청 알부민의 시그널 펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 Applied Biosystem 사의 모델 381A DNA 합성기를 사용한 포스포를아미다이트 방법으로 합성한다.

[표 3]

	-18			-15				-10				-5				-1		
	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser
GATCCACA	ATG	AAA	TGG	GTT	ACT	TTC	ATT	TCT	TTG	TTG	TTC	TTG	TTC	TCT	TCT	GCT	TAC	TCT
GTGT	TAC	TTT	ACC	CAA	TGA	AAG	TAA	AGA	AAC	AAC	AAG	AAC	AAG	AGA	AGA	CGA	ATG	AGA

또한 -17, -5, -4, -3,-2 및 -1에서 각각 Arg 또는 His, Ala 또는 Pro, Lys 또는 Gly, Val 또는 Cys, Trp 또는 Ser, Ala 또는 Gly으로 변환된 시그널 펩티드 아미노산을 암호화하는 DNA 서열을 동일한 방법(참조 표2)으로 합성시킬 수 있다. 변화된 DNA 서열은 더 적합한 알부민의 NO말단측을 생산 및 분비할 수 있다.

합성 DNA의 5'말단을 ATP 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용하여 인산화시킨다. pHSA1을 Xba I 및 BamH I 으로 분해하고 사람 혈청 알부민의 N-말단측을 암호화하는 1kb의 HSA1 DNA 단편을 전기영동으로 분리시킨다. 인산화된 합성 DNA 및 HSA1을 혼합하고, T4 DNA 리가아제로 연결시키며, Xba I 및 BamH I 으로 더 분해시킨다. pHSA2를 Xba I 및 BamH I 로 분해한 후, 알칼리성 포스파타제로 처리한다. 혼합시킨후, 이러한 DNA를 T4 DNA 리가아제로 결합시키고 이.콜라이 HB101 세포내로 도입시킨다. 생성된 형질전환체 사이에 플라스미드 pNH001(제8도에서 나타낸 바와 같은)를 갖는 클론을 수득한다.

pNH001을 EcoR I 및 BamH I 로 분해시킨 후에, 알칼리성 포스파타제로 처리한다. 그후 pGAL12를

EcoR I 및 BamH I 으로 분해하고, GAL1 프로모터를 함유한 1kb의 DNA 단편을 전기영동으로 분리시키며, 처리된 pNH001과 혼합시키고 T4 DNA 리가아제로 결합시킨다. 생성된 형질전환체로부터, 플라스미드 pNH007(제9도에서 나타낸 바와 같은)을 가진 클론을 수득한다. pNH007은 GAL1 프로모터로부터 하부에 위치하는 사람 혈청 알부민 시그널 펩티드를 암호화하는 DNA 서열, 이를 따라 바로 하부에 완전한 사람 혈청 알부민 cDNA를 암호화하는 DNA 서열, 및 바로 직후에 사람 혈청 알부민 cDNA로부터 유도된 3' 비해독 영역이 pUC19의 EcoR I-HindIII 부위내로 삽입된 플라스미드 DNA이다.

pNH007을 EcoR I 및 HindIII으로 분해한후 GAL1 프로모터, 시그널 펩티드, 완전한 사람 혈청 알부민 및 비해독 영역을 암호하하는 2.7kb의 DNA 단편을 전기영동으로 분리시킨다. 추가로 pPT2를 BamH I 으로 분해하고 알칼리성 포스파타제로 처리한다. 그것을 2.7kb의 DNA 단편과 혼합시키고 점착성 말단은 dATP, dGTP, dTTP 및 dCTP의 존재하에, DNA 폴리머라제 I, 클레나우 단편에 의해 복구시킨다. T4 DNA 리가아제로 결합시킨후에, 이것을 이.콜라이 HB101내로 도입시킨다. 생성된 형질전환체로부터, 플라스미드pNH008(제10도에서 나타낸 바와 같은)을 갖는 클론을 수득한다.

pNH008은 이.콜라이 및 효모에서 자기-복제 능력을 가진 플라스미드이고, 효모내에서 작용하는 GAL1 프로모터의 조절하에 사람 혈청 알부민 시그널 펩티드 및 계속해서 완전한 사람 혈청 알부민 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 함유한다. 더우기, pNH008은 이.콜라이에서 앰피실린 내성 유전자 및 효모에서 로이신 영양 요구성을 충족시키는 유전자를 함유하며, 이러한 유전자는 형질전환용의 선택적인 마커로 사용될 수 있다.

(H)플라스미드 pNH008을 효모내로 도입하는 방법

사람 혈청 알부민의 분비적 발현을 위해, 플라스미드 pNH008을 하기 방법에 의해 효모 사카로마이세스 세레비지에 AH22[참조:Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929-1933(1978)]내로 도입시킨다.

에스.세레비지에 AH22를 YPD 배지 50ml중 30℃에서 밤새 진탕배양시킨다(배지를 제조하기 위하여, 효모 추출액 10g 및 박토펩톤 20g을 물에 녹여 900ml를 만들고, 이를 오토클레이브내에서 멸균시키며 오토클레이브에서 별도로 멸균된 20w/v% 글루코우스 100ml와 혼합시킨다). 세포를 원리분리로 침전시키고, 물 20ml중에 재현탁시키며, 다시 원심분리시킨다. 다음, 세포를 pH 8.5의 50mM 디티오트레이톨 10ml, 1.2M 솔비톨, 2mM EDTA 10ml중에 현탁시킨 다음, 다시 원심분리하여 수집한다. 세포를 pH 5.8에서 0.2mg/ml 지몰라아제 100T, 1.2M 솔비톨, 10mM EDTA, 0.1M 시트르산 나트륨 10ml중에 현탁시키고, 30℃에서 1시간동안 서서히 진탕시킨다. 세포를 원심분리하여 수거하고 1.2M 솔비톨, 10mM 염화칼슘 및 1.2M 솔비톨 각각 10ml로 차례로 세척하며, 다시 세포를 원심분리하여 수거한다. 세포를 10mM 염화칼슘 및 1.2M 솔비톨 1ml중에 현탁시킨다. 현탁액 분취량 100㎕을 멸균 시험관에 넣고 pNH008 5㎕(5㎍)과 혼합시킨다:혼합물을 실온에서 15분동안 방치한다. 이후에, 그것을 pH 7.5의 20w/v% 폴리에틸렌글리콜 4,000, 10mM 염화칼슘, 10mM 트리스-하이드로클로라이드 12ml와 혼합시키고, 온화하게 혼합한 후에, 이 혼합물을 실온에서 20분 동안 방치시킨다. 세포를 원심분리하여 수거하고, 1.2M 솔비톨 및 10mM 염화칼슘을 함유하는 YPD 배지 0.1ml중에서 현탁시키며, 30℃에서 30분동안 온화하게 진탕시킨다. 현탁액 1, 5, 10, 20 및 50㎕를 40℃로 조절된 1.2M 솔비톨, 3w/v% 고급한천 2w/v% 글루코우스, 및 0.7w/v% 효모 질소 베이스 10ml 중에 현탁시키고 1.2M 솔비톨, 3w/v% 박토한천 2w/v% 글루코우스, 및 0.7w/v% 효모 질소 베이스로 이루어진 평판 위에 도말한다. 평판이 고형화된 후, 30℃에서 3일 동안 정체 배양시킨다. 형성된 콜로니를 멸균 이쑤시게로 수집하여 0.7w/v% 효모 질소 베이스 및 2W/v% 글루코우스 3ml 중에 현탁시키고 30℃에서 2일 동안 진탕 배양시킨다. 현탁액 1과 1/2ml를 원심분리시키고, 세포를 수집하여 YPG 배지 3ml 중에 현탁시킨다(효모 추출액 10g 및 박토펩톤 20g을 물에 녹여 900ml를 만들고, 오토클레이브내에서 멸균시키며, 오토클레이브내에서 별도로 멸균된 20w/v% 갈라토우스 100ml와 혼합시켜서 배지를 제조한다). 이를 30℃에서 진탕 배양시킨다. 배양 현탁액에서 사람 혈청 알부민 농도를 RPHA 방법(유럽 특허 제122,620호에 기술된 바와 같은)으로 측정하고, 첫째날 최대 양의 사람 혈처 알부민 10㎍/ml을 검출하였다.

(I) 사람 혈청 알부민의 발현 및 분비를 위한 효모 배양

상술한 바와 같이 사람 혈청 알부민을 발현 및 분비하기 위해 pNH008로 형질전환시킨 에스세레비지에 AH22를 하기 방법으로 배양시킨다. 재조합체 효모를 0.7w/v% 효모 질소 베이스. 2w/v% 글루코우스 및 3w/v% 박토 한천을 함유하는 평판에서 생장시키고 백금이로 수집한다. 이것을 0.7w/v% 효모 질소 베이스 및 2w/v% 글루코우스로 조성된 YNB 배지 50ml내에 접종하고 30℃에서 2일 동안 배양시킨다. 전체 용적을 YNB 배지 500ml내에 접종시키고 30℃에서 2일 동안 배양시킨다. 세포를 원심분리하여 수거하고, YPG 배지 500ml중에 현탁시키며, 30℃에서 진탕배양시킨다. 배양브로쓰의 일부분을 배양 0, 3, 6, 24 및 48시간후 수거하고 배양 상등액을 원심분리하여 수득한다. 배약 브로쓰내로 분비된 사람 혈청 알부민 농도를 RPHA 방법으로 측정한다. 사람 혈청 알부민의 분비성 발현은 배양시작후 3시간 후부터 시작되는 것으로 측정되며, 상등액중 사람 혈청 알부민 농도는 6시간에서 0.25mg/l, 24시간에서 20mg/l, 및 48시간에서 160mg/l이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

외래단백질 유전자에 인접한 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자, 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자에 대해 상부에 위치한 프로모터 및 외래 단백질 유전자에 대해 하부에 위치한 터미네이트를 포함하는 재조합 DNA로 형질전환된 효모에 의해 외래단백질을 발현하고 분비시킴을 특징으로 하여 외래단백질을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 혈청 알부민 시그널 펩티드가 사람에서 유래된 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자가 하기 아미노산 서열로 표현되는 방법.

Met Y Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Lue Phe Leu Phe X_5 X_4 X_3 X_2 X_1

상기 서열에서, Y는 Lys, Arg 또는 His를 나타내고; X_5는 Ala, Pro 또는 Ser를 나타내며; X_4는 Lys, Gly 또는 Ser를 나타내고; X_3은 Ala, Val 또는 Cys를 나타내며; X_2는 Tyr, Trp또는 Ser을 나타내고: X1는 Ser, Ala 또는 Gly를 나타낸다.

청구항 4

하기 아미노산 서열을 암호화하는 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자.

Met Y Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe X_5 X_4 X_3 X_2 X_1

상기 서열에서, Y는 Lys, Arg 또는 His를 나타내고 ; X5는 Ala, Pro 또는 Ser을 나타내며 ; X_4는 Lys, Gly 또는 Gly을 나타내며 ; 단, Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser의 아미노산 서열은 제외된다.

청구항 5

외래단백질을 암호화하는 DNA에 인접한 혈청 알부민 시그널 펩티드를 암호화하는 DNA, 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자에 대해 상부에 위치한 프로모터 및 외래단백질 유전자에 대해 하부에 위치한 터미네이터를 포함하는, 효모를 형질전환시키기 위한 제조합 DNA.

청구항 6

제1항에 있어서 혈청 알부민 시그널 펩티드의 아미노산 서열이 하기 그룹으로부터 선택되는 방법:

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuPheLeuPheSerSerAlaTyrSer,

MetLysTrpValThrPheLeuLeuLeuLeuPheIleSerGlySerAlaPheSer,

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuLeuLeuPheSerSerAlaTyrSer,

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuPheLeuPheSerSerVlaTyrAla,

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuPheLeuPheAlaLysVlaSerAla,

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuPheLeuPheProGlyCysTrpAla,

및

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuPheLeuPheProGlyValTrpAla,

청구항 7

제1항에 있어서, 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전자가 하기의 DNA 서열을 갖는 방법:

ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTT

CTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCC

청구항 8

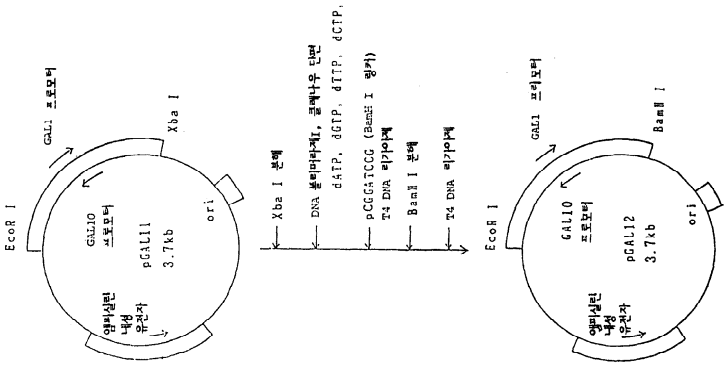
제1항에 있어서, 외래 단백질이 사람 혈청 알부민, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, 우로키나제, 성장 호르몬, 인슐린, 림포킨, h-ANP, 인자 Ⅷ, CSFs 및 EPO로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법.

청구항 9

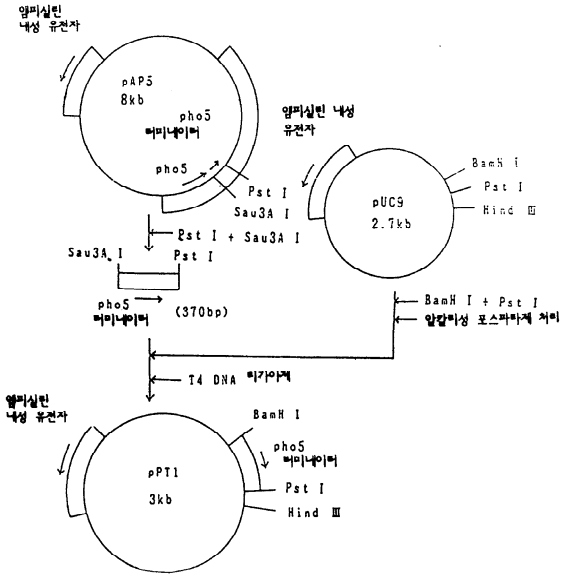
제1항에 있어서, 외래단백질 유전자가 혈청 알부민 시그널 펩티드 유전작의 바로 하부에 위치하는 완전한 사람 혈청 알부민 유전자인 방법.

도면

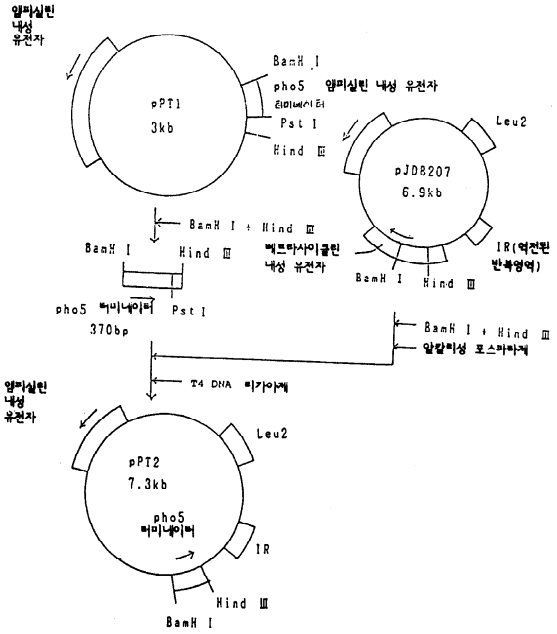
도면1


GAL1 프로모터
Xba I
EcoR I
GAL10
프로모터
pGAL11
3.7kb
ori
암피실린
내성
유전자
Xba I 분해
DNA 폴리머라제, 클레나우 단편
dATP, dGTP, dTTP, dCTP,
pCGGATCCG (BamH I 링커)
T4 DNA 리가아제
BamH I 분해
T4 DNA 리가아제
EcoR I
GAL1 프리모터
BamH I
GAL10
프로모터
pGAL12
3.7kb
ori
암피실린
내성
유전자

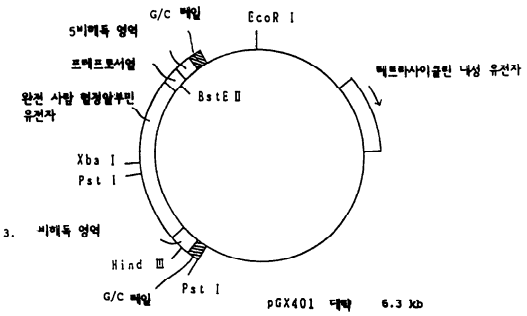
도면2


암피실린
내성 유전자
pAP3
8kb
pho5
터미네이터
pho5
Pst I
Sau3A I
암피실린 내성
유전자
BamH I
Pst I
Hind III
pUC9
2.7kb
Pst I + Sau3A I
Sau3A I
Pst I
pho5
터미네이터
(370bp)
BamH I + Pst I
알칼리성 포스파타제 처리
T4 DNA 리가아제
암피실린
내성 유전자
BamH I
pho5
터미네이터
pPT1
3kb
Pst I
Hind III

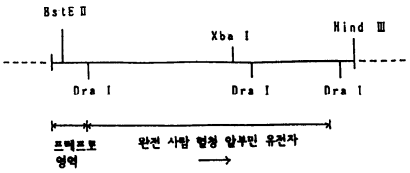
도면3


암피실린
내성
유전자
pPT1
3kb
BamH I
pho5 암피실린 내성 유전자
Pst I
Hind III
Leu2
pJD8207
6.9kb
BamH I + Hind III
BamH I
Hind III
메르타사이클린
내성 유전자
IR(역전된
반복영역)
pho5 터미네이터
Pst I
370bp
BamH I + Hind III
알칼리성 포스파타제
T4 DNA 리가아제
암피실린
내성
유전자
Leu2
pPT2
7.3kb
pho5
터미네이터
IR
Hind III
BamH I

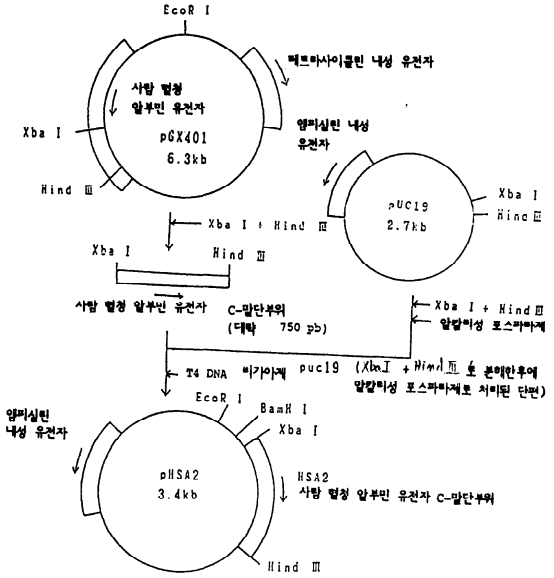
도면4


G/C 테일
EcoR I
5'비해독 영역
프레프로서열
메르타사이클린 내성 유전자
BstE II
완전 사람 혈청알부민
유전자
Xba I
Pst I
3. 비해독 영역
Hind III
Pst I
G/C 테일
pGX401 대략 6.3 Kb

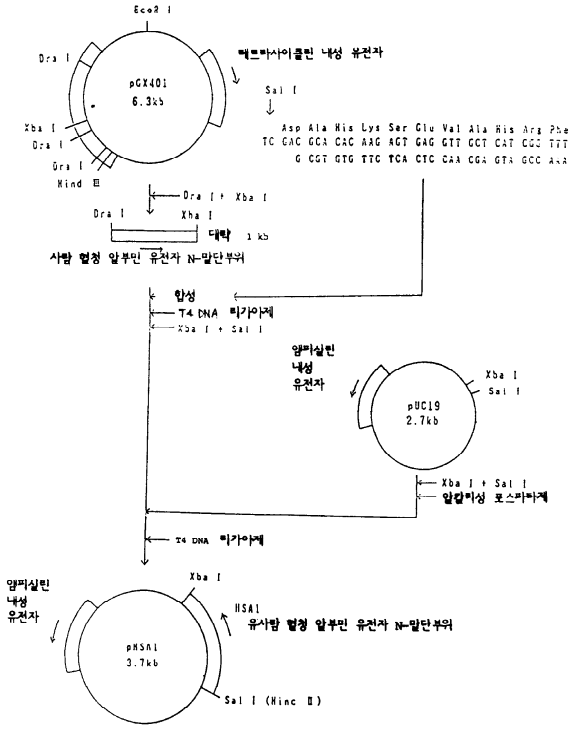
도면5


BstE II
Xba I
Hind III
Dra I
Dra I
Dra I
프레프로
영역
완전 사람 혈청 알부민 유전자

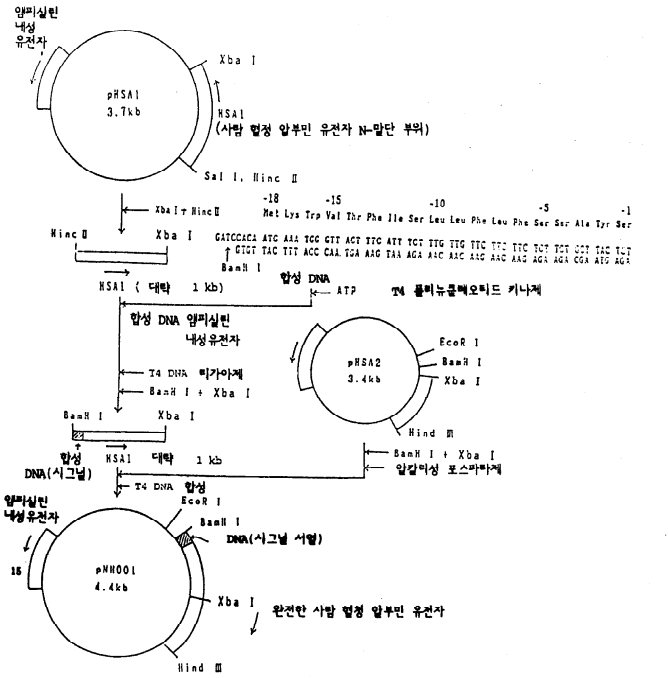
도면6


EcoR I
페트마사이클린 내성 유전자
사람 혈청 알부민 유전자
pGX401
6.3kb
Xba I
Hind III
앰피실린 내성 유전자
pUC19
2.7kb
Xba I
Hinc II
Xba I + Hind III
Xba I
Hind III
사람 혈청 알부민 유전자
C-말단부위
(대략 750 pb)
Xba I + Hind III
알칼리성 포스파타제
T4 DNA 리가아제
puc19 (Xba I + Hind III 로 분해한후에
알칼리성 포스파타제로 처리된 단편)
EcoR I
BamH I
Xba I
앰피실린 내성 유전자
pHSA2
3.4kb
HSA2
사람 혈청 알부민 유전자 C-말단부위
Hind III

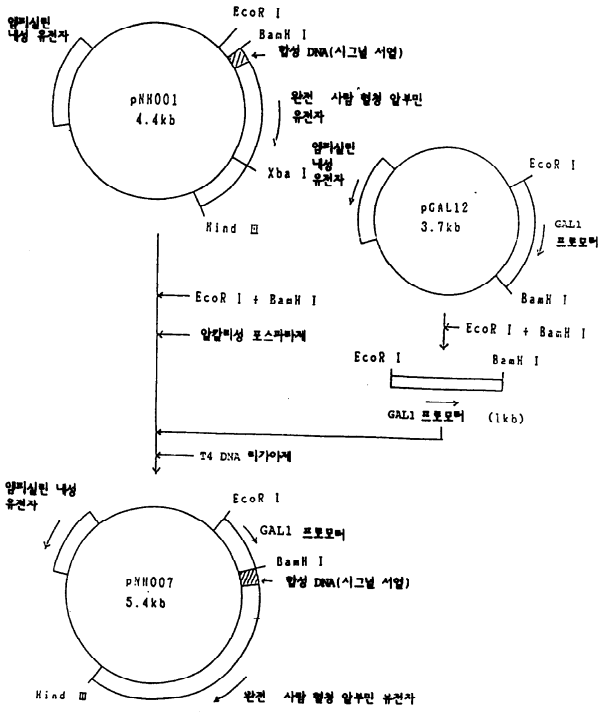
도면7


Eco2 I
Dra I
pGX401
6.3kb
페트마사이클린 내성 유전자
Sal I
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
TC GAC GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGC TTT
G CGT GTG TTC TCA CTC CAA CGA GTA GCC AAA
Xba I
Dra I
Dra I
Hind III
Dra I + Xba I
Dra I
Xba I
대략 1 kb
사람 혈청 알부민 유전자 N-말단부위
합성
T4 DNA 리가아제
Xba I + Sal I
앰피실린 내성 유전자
pUC19
2.7kb
Xba I
Sal I
Xba I + Sal I
알칼리성 포스파타제
T4 DNA 리가아제
앰피실린 내성 유전자
Xba I
pHSA1
3.7kb
HSA1
유사람 혈청 알부민 유전자 N-말단부위
Sal I (Hinc II)

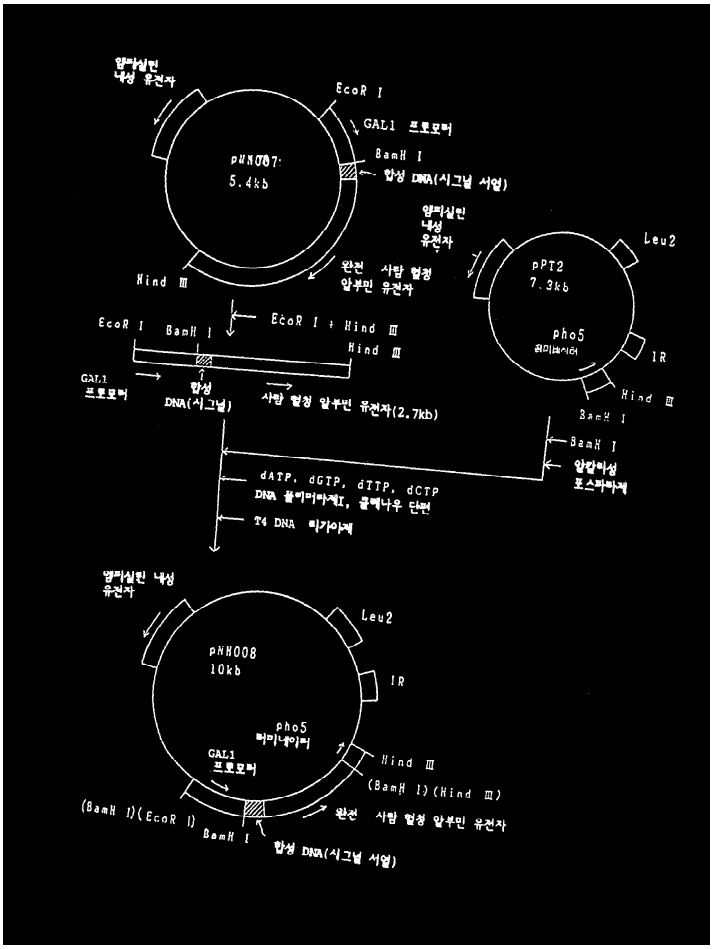
도면8


암피실린
내성
유전자
pHSA1
3.7kb
Xba I
NSA1
(사람 혈청 알부민 유전자 N-말단 부위)
Sal I, Hinc II
-18 -15 -10 -5 -1
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser
Xba I + Hinc II
Hinc II
Xba I
GATCCAACA ATC AAA TCC GTT ACT TTC ATT TCT TTG TTG TTC TTC TCT TCT GCT TAC TCT
CTGT TAC TTT ACC CAA TGA AAG TAA AGA AAC AAC AAC AAG AGA AGA CGA ATG AGA
BamH I
NSA1 (대략 1 kb)
합성 DNA
ATP
T4 폴리뉴클레오티드 키나제
합성 DNA 암피실린
내성유전자
T4 DNA 리가아제
BamH I + Xba I
pHSA2
3.4kb
EcoR I
BamH I
Xba I
Hind III
BamH I
Xba I
합성
DNA(시그널)
NSA1
대략
1 kb
BamH I + Xba I
암칼리성 포스파타제
T4 DNA 합성
암피실린
내성유전자
EcoR I
BamH I
DNA(시그널 서열)
15
pNH001
4.4kb
Xba I
완전한 사람 혈청 알부민 유전자
Hind III

도면9


암피실린
내성 유전자
EcoR I
BamH I
합성 DNA(시그널 서열)
pNH001
4.4kb
완전 사람 혈청 알부민
유전자
암피실린
내성
유전자
Xba I
Hind III
pGAL12
3.7kb
EcoR I
GAL1
프로모터
BamH I
EcoR I + BamH I
암칼리성 포스파타제
EcoR I + BamH I
EcoR I
BamH I
GAL1 프로모터 (1kb)
T4 DNA 리가아제
암피실린 내성
유전자
EcoR I
GAL1 프로모터
BamH I
합성 DNA(시그널 서열)
pNH007
5.4kb
Hind III
완전 사람 혈청 알부민 유전자

도면10


암피실린
내성 유전자
EcoR I
GAL1 프로모터
pNH007
5.4kb
BamH I
합성 DNA(시그널 서열)
암피실린
내성
유전자
Leu2
pPT2
7.3kb
pho5
1R
Hind III
완전 사람 혈청
알부민 유전자
Hind III
EcoR I
BamH I
EcoR I + Hind III
Hind III
GAL1
프로모터
합성
DNA(시그널)
사람 혈청 알부민 유전자(2.7kb)
BamH I
BamH I
dATP, dGTP, dTTP, dCTP
DNA 폴리머라제I, 클레나우 단편
T4 DNA 리가아제
암피실린 내성
유전자
Leu2
pNH008
10kb
1R
pho5
터미네이터
GAL1
프로모터
Hind III
(BamH I)(Hind III)
(BamH I)(EcoR I)
BamH I
완전 사람 혈청 알부민 유전자
합성 DNA(시그널 서열)