



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0045509  
(43) 공개일자 2025년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/195 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/195 (2013.01)  
C12N 15/70 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2023-0127653  
(22) 출원일자 2023년09월25일  
심사청구일자 2023년09월25일

(71) 출원인  
경상국립대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
조병훈  
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 107동 1301호  
(가좌동, 가좌그린빌주공아파트)  
안도영  
경상남도 거제시 제산로 86, 104동 1802호 (양정동, 거제더샵)  
(74) 대리인  
최규환

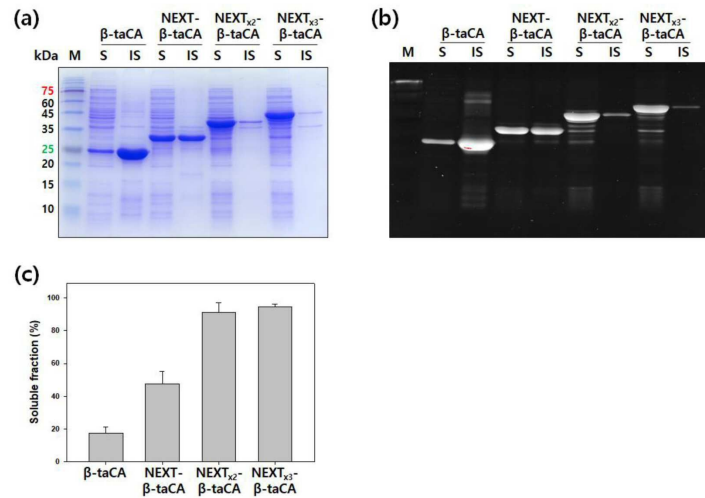
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 목적 단백질의 수용성 발현 증가를 위한 다중 NEXT 태그 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 목적 단백질의 수용성 발현 증가를 위한 다중 NEXT 태그 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 NEXT 태그 서열이 반복되어 연결된 융합 태그는 크기가 작아 목적 단백질의 기능에 영향을 미치지 않으면서 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시키는 효과가 우수하므로, 본 발명의 융합 태그는 의약품, 산업용 및 연구용 등의 재조합 단백질 발현을 위한 벡터 시스템의 기본 구성요소로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12Y 402/01001** (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711182426

과제번호 2021R1F1A1057310

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 높은 예측 정확도를 지닌 이황화결합 엔지니어링을 통한 환경 정화용 친환경 생촉매  
의 안정성 강화

기 여 율 2/10

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181092

과제번호 2021R1A5A8029490

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터

기 여 율 5/10

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711196340

과제번호 00235511

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발

연구과제명 먹장어 후천면역을 활용한 치료용/진단용 차세대 유사항체 발굴, 엔지니어링 및 대  
량생산시스템 구축

기 여 율 3/10

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2023.04.01 ~ 2023.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복 이상으로 이루어진 융합 태그.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 2반복 이상은 2반복 내지 5반복 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 태그.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 융합 태그는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 태그.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 각 융합 태그의 C-말단에 (GGGGS)<sub>2</sub> 링커 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 태그.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 또는 6의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 7

서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 목적 단백질은 효소, 항원, 항체, 세포수용체, 구조단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 목적 단백질은 C-말단에 6XHis 서열을 추가로 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

#### 청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

#### 청구항 11

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는, 숙주세포에서 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 숙주세포에서 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산 방법.

## 청구항 13

서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산용 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 목적 단백질의 수용성 발현 증가를 위한 다중 NEXT 태그 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 유전자 재조합 기술이 발달되면서 동물세포, 효모와 같은 진핵생물(eukaryote) 및 대장균과 같은 원핵생물(prokaryote) 등을 이용하여 유용한 목적 단백질이 많이 생산되고 있으며, 생산된 재조합 단백질은 의약품 등의 생물공학 산업에 널리 이용되고 있다.

[0003] 특히 대장균은 세포의 성장 속도가 빠르고 그의 유전자에 대한 규명이 다른 생물체에 비해 잘 연구되고 있기 때문에 유전자 재조합 기술에서 목적 단백질을 생산하기 위한 숙주세포로 많이 이용되고 있다. 그러나 숙주세포로 대장균을 사용할 경우 제조하고자 하는 단백질이 대장균 내의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 수율이 낮아지는 경우가 많았으며, 특히 분자량이 10 kDa 이하인 작은 크기의 폴리펩타이드 발현에서 이러한 경향이 심한 것으로 알려져 있다. 재조합 단백질이 대장균에서 과다 발현되면 불용성 응집체(Insoluble aggregate)의 형태로 세포질 내에 축적될 수 있으며, 이러한 단백질을 활성형으로 만들기 위해서는 고농도의 우레아(urea) 또는 구아니딘-하이드로클로라이드(guanidine hydrochloride)와 같은 변성제(denaturant)를 사용하여 응집체를 녹여 1차 구조로 풀어주어야 하고, 상기에서 사용한 시약을 제거하여 풀어진 단백질을 정확하게 재접힘(refolding)시켜야만 한다. 그러나 단백질마다 재접힘 조건이 다르고, 효율적인 재접힘 조건을 알아내는데 많은 시간과 비용이 요구되며, 재접힘 자체가 불가능한 경우도 많다.

[0004] 가장 효율적인 재조합 단백질의 생산법은 감지할 수 있는 이상의 양으로 과발현되면서 가용성(solubility)이 높은 형태를 갖도록 하는 것이다. 재조합 단백질의 발현 효율을 높이기 위해 벡터, 숙주, ORF(open reading frame) 수준에서 다양한 엔지니어링을 시도하였다. 벡터는 전사, 번역인자와 복제인자 등으로 구성되어 있으며 각 인자들은 여러 변이체가 만들어져 있다. 최근에는 전형적인 이들 요소 외에 새로운 조절인자들이 발굴되어 발현 효율의 증가를 위한 다양한 조합 조절이 시도되고 있다. 이러한 과정에서 단백질 접힘이나 회수(recovery)를 돕는 기능성 태그(tag)를 장착한 벡터를 이용해 단백질의 가용성을 높여주거나 정제과정의 용이성을 높일 수 있다. 태그의 사용은 가장 보편적이고 간단한 방식일 뿐만 아니라, 재조합 단백질 기능에 미치는 영향이 적은 비-간섭성도 담보되기 때문에 많이 시도되는 방법이다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제2021-0034527호에는 Oct-1 단백질을 포함하는 '목적 단백질의 수용성 및 열안정성을 증가시키기 위한 태그 단백질 및 이를 포함하는 융합 단백질'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2106773호에는 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*), 하이드로게노비브리오 크루노제누스(*H. crunogenus*) 또는 하이드로게노비브리오 쿠에네니(*H. kuenenii*) 유래 α-탄산무수화효소의 N-말단에 존재하는 PLX<sub>1</sub>DLGX<sub>2</sub>E 도메인을 포함하는 '목적 단백질의 수용성 및 발현량 증가를 위한 융합 태그 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 목적 단백질의 수용성 발현 증가를 위한 다중 NEXT 태그 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*) 유래 α-탄산무수화효소의 N-말단에서 유래된 53개의 아미노산으로 이루어진 단일 NEXT 태그(NEXT<sub>x1</sub>; 한국등록특허 제2106773호)가 이중(NEXT<sub>x2</sub>) 또는 삼중(NEXT<sub>x3</sub>)으로 반복되어 연결된 '다중 NEXT 태그'를 제조하였다. 또한, 상기 '다중 NEXT 태그' 코딩 서열과 목적 단백질코딩 서열이 순차적으로 연결되어 포함된 재조합 벡터로 대장균 균주를 형질전환하여 재조합 단백질을 발현시킨 결과, 단일 NEXT 태그 코딩 서열이 포함된 재조합 벡터로 형질전환하여 얻어진 재조합 단백질 보다 다중 NEXT 태그 코딩 서열이 포함된 재

조합 벡터로 형질전환하여 얻어진 재조합 단백질의 수용성 발현량이 현저히 증가한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복 이상으로 이루어진 융합 태그를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는, 숙주세포에서 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 NEXT 태그 서열이 반복되어 연결된 융합 태그는 크기가 작아 목적 단백질의 기능에 영향을 미치지 않으면서 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시키는 효과가 우수하므로, 본 발명의 융합 태그는 의약품, 산업용 및 연구용 등의 재조합 단백질 발현을 위한 벡터 시스템의 기본 구성요소로 활용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 써모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래  $\beta$ -탄산무수화효소( $\beta$ -taCA),  $\beta$ -taCA에 단일 NEXT 태그, NEXT<sub>2</sub> 또는 NEXT<sub>3</sub> 태그가 결합된 융합 단백질(NEXT- $\beta$ -taCA, NEXT<sub>2</sub>- $\beta$ -taCA 또는 NEXT<sub>3</sub>- $\beta$ -taCA)의 발현 수준을 확인한 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색 겔 사진(a), InVision His-tag In-Gel 염색 겔 사진(b), 상기 In-Gel 염색된 겔의 밴드를 정량화한 그래프(c)이다.
- 도 2는 담배식각바이러스 유래 프로테아제(Tobacco etch virus protease, TEVP), TEVP에 단일 NEXT 태그, NEXT<sub>2</sub> 또는 NEXT<sub>3</sub> 태그가 결합된 융합 단백질(NEXT-TEVP, NEXT<sub>2</sub>-TEVP 또는 NEXT<sub>3</sub>-TEVP)의 발현 수준을 확인한 쿠마씨 블루 염색 겔 사진(a), InVision His-tag In-Gel 염색 겔 사진(b), 상기 In-Gel 염색된 겔의 밴드를 정량화한 그래프(c)이다.
- 도 3은 파이어플라이 루시페라아제(Firefly luciferase, Luc)에 단일 NEXT 태그, NEXT<sub>2</sub> 또는 NEXT<sub>3</sub> 태그가 결합된 융합 단백질(NEXT-Luc, NEXT<sub>2</sub>-Luc 또는 NEXT<sub>3</sub>-Luc)의 발현 수준을 확인한 쿠마씨 블루 염색 겔 사진(a), InVision His-tag In-Gel 염색 겔 사진(b), 상기 In-Gel 염색된 겔의 밴드를 정량화한 그래프(c)이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복 이상으로 이루어진 융합 태그를 제공한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*) 유래  $\alpha$ -탄산무수화효소의 N-말단에서 유래된 53개의 아미노산으로 이루어진 단일 NEXT 태그이다(한국 등록특허 제2106773호 참고).
- [0017] 본 발명의 융합 태그에 있어서, 상기 2반복 이상은 2반복 내지 5반복 중 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 2반복 또는 3반복일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 융합 태그에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복(NEXT<sub>2</sub>) 또는 3반복(NEXT<sub>3</sub>)되어 이

루어진 융합 태그는 각각 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0019] 본 발명에 따른 융합 태그의 범위는 서열번호 2 또는 3으로 표시된 아미노산 서열을 갖는 태그 및 이의 기능적 동등물을 포함한다. 본 명세서에서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2 또는 3으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2 또는 3으로 표시되는 태그와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 태그를 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시키는 활성을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 융합 태그에 있어서, 상기 융합 태그는 C-말단에 (GGGGS)<sub>2</sub> 링커 서열을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 (GGGGS)<sub>2</sub> 링커는 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, (GGGGS)<sub>2</sub> 링커를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 14의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 융합 태그를 코딩하는 DNA 또는 RNA일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 또는 인위적인 합성 DNA를 포함하며, DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.
- [0023] 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 또는 6으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 서열번호 5 또는 6의 염기서열은 각각 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0024] 본 발명은 또한, 상기 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전술한 것과 같다.
- [0026] 본 발명에 따른 상기 재조합 벡터는 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 즉, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자는 벡터 내에 있는 프로모터에 의해 그 발현이 조절될 수 있도록 연결될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서, 용어 "목적 단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현 벡터에 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 목적 단백질은 의료, 연구용 및 산업용 단백질, 예들 들어, 효소, 항원, 항체, 세포수용체, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 종류의 단백질일 수 있고, 바람직하게는 효소 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 목적 단백질은 C-말단에 6XHis 서열을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 명세서에서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0031] 본 발명에서, 상기 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.

- [0032] 본 발명의 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복 또는 3반복된 다중 NEXT 태그는 단일 NEXT 태그에 비해 목적 단백질의 수용성 발현량 증진 효과가 우수한 특징이 있다.
- [0034] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* BL21, *E. coli* JM109, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(예컨대, *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia pastoris*; *Kluyveromyces lactis*; *Kluyveromyces marxianus*; *Yarrowia lipolytica*; *Hansenula polymorpha* 등), 곤충세포(예컨대, *Spodoptera frugiperda* Sf9, Sf21, High Five<sup>TM</sup>), 동물세포 (예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물 세포 등이 이용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포는 대장균, 바람직하게는 *E. coli* BL21(DE3)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, CaCl<sub>2</sub> 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한,
- [0040] 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0041] 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는, 숙주세포에서 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 목적 단백질의 생산 방법에 있어서, 상기 형질전환된 숙주세포의 배양은 공지된 기술을 이용하여 목적 단백질의 생산에 적합한 배지에서 이루어질 수 있다. 적합한 배양 배지는 상업적으로 입수하시거나 예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 목적 단백질의 생산 방법은, 목적 단백질이 발현된 숙주세포로부터 목적 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분리 방법은 예를 들어 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 분리된 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 투석, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하는 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.
- [0044] 본 발명은 또한, 상기 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산용 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 조성물은, 융합되는 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시킬 수 있는 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하고 있어, 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산이 가능하다.

[0047] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **재료 및 방법**

[0050] **1. 균주 및 배양조건**

[0051] 유전자 재조합 플라스미드 벡터 제작을 위해 *E. coli* TOP10 균주를, 단백질 발현을 위해 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 사용하였다. *E. coli*는 LB(Luria-Bertani) 배지에서 37℃, 180 rpm 조건에서 배양하였으며, 필요에 따라 배양 시 50 µg/ml 암피실린(ampicillin)을 첨가하였다.

[0053] **2. 발현 벡터 제작**

[0054] 하이드로게노비브리오 마리누스(*Hydrogenovibrio marinus*) 유래 α-탄산무수화효소의 N-말단에서 유래된 53개의 아미노산으로 이루어진 단일 NEXT 태그의 서열이 2번 반복되어 연결된 NEXT<sub>2</sub> 태그를 제작하기 위해서, 기 구축된 pET-NEXT-taCA 벡터(한국등록특허 제2106773호 참고)를 주형으로 하고 표 1의 서열번호 7 및 10의 프라이머 세트를 이용하여 NEXT 태그 코딩 서열을 PCR 증폭하였으며, 이를 표 1의 서열번호 8 및 9의 프라이머 세트를 이용하여 증폭한 NEXT 태그 코딩 서열과 *Bam*HI-*Bgl*II 제한효소 결합 방식을 이용하여 연결하였다.

[0055] 또한, 단일 NEXT 태그의 서열이 3번 반복되어 연결된 NEXT<sub>3</sub> 태그를 제작하기 위해서, 표 1의 서열번호 7 및 10의 프라이머 세트, 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트, 서열번호 8 및 9의 프라이머 세트를 이용하여 NEXT 태그 코딩 서열을 각각 증폭하였으며, 이들을 *Bam*HI-*Bgl*II 제한효소 결합 방식을 이용하여 연결하였다. 다중 NEXT 태그는 단일 NEXT 태그와 마찬가지로 양 말단에 *Nde*I, *Nco*I 제한효소 서열을 지닌다.

[0056] 본 발명의 다중 NEXT 태그는 재조합 벡터에 삽입 시 제한효소 위치 서열을 추가할 수 있고, 태그의 C-말단에는 (GGGS)<sub>2</sub> 링커 서열을 추가할 수 있다. 상기와 같이 제한효소 위치 서열과 (GGGS)<sub>2</sub> 링커 서열이 추가된 단일 NEXT 태그 및 다중 NEXT 태그의 서열은 하기 표 2에 나타내었다. 또한, 모든 발현 단백질은 C-말단에 His<sub>6</sub> 태그 서열을 지니고 있다.

**표 1**

[0057] 클로닝을 위한 프라이머 서열 정보

| Name                   | Sequence(5'-3') (서열번호)               |
|------------------------|--------------------------------------|
| NEXT-tag               | F: CATATGGCTGTTCAACATAGCAATGCCCC (7) |
|                        | R: CCATGGAGCCTCCAC (8)               |
| NEXT-tag-tandem repeat | F: AGATCTGCTGTTCAACATAGCAATGC (9)    |
|                        | R: GGATCCCACAACGGGTTTGGTTTAG (10)    |
| TEVP                   | F: CCATGGGAGAAAGCTTGTTTAAGGGAC (11)  |
|                        | R: CTCGAGTTGCGAGTACA (12)            |

[0058] 밑줄: 제한효소 위치.

**표 2**

[0059] 단일 NEXT 태그 및 다중 NEXT 태그의 서열 정보

|      |        |                                                                                                                                                                                                            |
|------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NEXT | 단백질 서열 | MAVQHSNAPLIDLGAEMKKQHKEAAPEGAAPAGKAPAAEAKKEEAPKPKPVVGGGSGGGGSM                                                                                                                                             |
|      | 유전자 서열 | <u>CATATGGCTGTTCAACATAGCAATGCCCCATTGATTGACTTGGGCGCGGAAATGAAAAACAGCACAAGGAGGCAGCTCCCGAAGGCGCTGCGCCGGCTCAAGGTAAGGCACCTGCCGCGGAAGCCAAAAAAGAAGAAGCACCTAAACCAAAACCCGTTGTGGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGAGGCTCCATGG</u> |

|                    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NEXT <sub>×2</sub> | 단백질<br>서열 | MAVQHSNAPLIDLGAEMKKQHKEAAPEGAAPAQGKAPAAEAKKEEAPKPKPVVGS <del>AVQHSNAPLIDLGAEM</del><br>KKQHKEAAPEGAAPAQGKAPAAEAKKEEAPKPKPVVGGGSGGGGSM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                    | 유전자<br>서열 | <u>CATATGGCTGTTCAACATAGCAATGCCCCATTGATTGACTTGGGCGCGGAAATGAAAAACAGCACAAAGGA</u><br>GGCAGCTCCCGAAGGCGCTGCGCCGGCTCAAGGTAAGGCACCTGCGCGGAAGCCAAAAAAGAAGAAGCAC<br>CTAAACCAAAACCCGTTGTGGGATCTGCTGTTCAACATAGCAATGCCCCATTGATTGACTTGGGCGCGGAA<br>ATGAAAAACAGCACAAAGGAGGCAGCTCCCGAAGGCGCTGCGCCGGCTCAAGGTAAGGCACCTGCGCGGA<br>AGCCAAAAAAGAAGACCTAAACCAAAACCCGTTGTGGGAGGTGGCAGCGCGGTGGAGGCTCCA<br>TGG                                                                                                                                                                       |
| NEXT <sub>×3</sub> | 단백질<br>서열 | MAVQHSNAPLIDLGAEMKKQHKEAAPEGAAPAQGKAPAAEAKKEEAPKPKPVVGS <del>AVQHSNAPLIDLGAEM</del><br>KKQHKEAAPEGAAPAQGKAPAAEAKKEEAPKPKPVVGS <del>AVQHSNAPLIDLGAEMKKQHKEAAPEGAAPAQG</del><br>KAPAAEAKKEEAPKPKPVVGGGSGGGGSM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                    | 유전자<br>서열 | <u>CATATGGCTGTTCAACATAGCAATGCCCCATTGATTGACTTGGGCGCGGAAATGAAAAACAGCACAAAGGA</u><br>GGCAGCTCCCGAAGGCGCTGCGCCGGCTCAAGGTAAGGCACCTGCGCGGAAGCCAAAAAAGAAGAAGCAC<br>CTAAACCAAAACCCGTTGTGGGATCTGCTGTTCAACATAGCAATGCCCCATTGATTGACTTGGGCGCGGAA<br>ATGAAAAACAGCACAAAGGAGGCAGCTCCCGAAGGCGCTGCGCCGGCTCAAGGTAAGGCACCTGCGCGGA<br>AGCCAAAAAAGAAGACCTAAACCAAAACCCGTTGTGGGATCTGCTGTTCAACATAGCAATGCCCCAT<br>TGATTGACTTGGGCGCGGAAATGAAAAACAGCACAAAGGAGGCAGCTCCCGAAGGCGCTGCGCCGGCTCAA<br>GGTAAGGCACCTGCGCGGAAGCCAAAAAAGAAGCACCTAAACCAAAACCCGTTGTGGGAGGTGG<br>CAGCGCGGTGGAGGCTCCATGG |

[0060] 밀줄: 제한효소 위치.

[0061] 이탤릭체: (GGGS)<sub>2</sub> 링커 서열.

[0062] 굵은 글씨 및 밀줄: 다중 NEXT 태그의 연결 부위(*Bam*HI-*Bgl*II).

[0064] 그 다음, 목적 단백질 중 하나인 썬모비리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 β-탄산무수화효소(β-taCA)의 발현을 위해서, 기 구축된 pET-β taCA 벡터(특허출원 제2022-0041638호 참고)를 사용하였다. 단일 NEXT 태그 및 다중 NEXT 태그가 연결된 β-taCA의 발현 벡터 구축을 위해 기 구축된 pET-PVY-β taCA(특허출원 제2023-0051136호)로부터 *Nde*I, *Nco*I 제한효소 서열을 이용하여 PVY(Potato Virus Y) 외피단백질(coat protein)의 N-말단에 존재하는 무정형 서열에서 유래된 PVY 태그를 제거 후 동일한 제한효소서열 위치에 단일 NEXT 태그 또는 다중 NEXT 태그를 삽입하였다. 이를 통해 pET-NEXT-β taCA, pET-NEXT<sub>×2</sub>-β taCA 및 pET-NEXT<sub>×3</sub>-β taCA를 구축하였다.

[0065] 또한, 파이어플라이 루시페라아제(Firefly luciferase, Luc)의 발현을 위해서, 기 합성되어 pUC 벡터에 삽입된 luciferase 코딩 유전자를 *Nde*I, *Xho*I 제한효소 서열을 이용하여 pET-22b(+) 벡터에 도입하여 pET-luciferase를 구축하였다. 단일 NEXT 태그가 연결된 luciferase의 발현을 위해 기 구축된 pET-NEXT-luciferase(한국특허등록 제2106773호 참고)를 이용하였다. 다중 NEXT 태그가 연결된 luciferase의 발현을 위해 pET-NEXT-luciferase로부터 *Nde*I, *Nco*I 제한효소 서열을 이용하여 NEXT 태그를 제거한 후 동일한 제한효소 서열 위치에 다중 NEXT 태그를 삽입하여 pET-NEXT<sub>×2</sub>-luciferase 및 pET-NEXT<sub>×3</sub>-luciferase를 구축하였다.

[0066] 또한, 담배식각바이러스 유래 프로테아제(Tobacco etch virus protease, TEVP)의 발현을 위해서, 기 합성되어 pUC 벡터에 삽입된 TEVP 유전자를 *Nde*I, *Xho*I 제한효소 서열을 이용하여 pET-22b(+) 벡터에 도입하여 pET-TEVP를 구축하였다. 단일 NEXT 태그 또는 다중 NEXT 태그가 연결된 TEVP의 발현을 위해 TEVP 유전자를 표 1의 서열 번호 11 및 12의 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였으며, 이를 *Nco*I, *Xho*I 제한효소를 처리하여 동일한 제한효소 처리된 pET-NEXT-luciferase, pET-NEXT<sub>×2</sub>-luciferase, pET-NEXT<sub>×3</sub>-luciferase에 삽입하여 pET-NEXT-TEVP, pET-NEXT<sub>×2</sub>-TEVP, pET-NEXT<sub>×3</sub>-TEVP를 구축하였다. 본 발명에서 사용된 모든 발현 단백질은 C-말단에 His<sub>6</sub> 태그 서열을 지닌다.

### [0068] 3. 단백질 발현 및 세포 분획

[0069] 발현 벡터는 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 도입되었다. 재조합 균주는 37℃, 180 rpm 조건으로 50 μg/ml 암피실린이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. OD<sub>600</sub> 값이 0.6~0.8에 도달했을 때 1 mM의 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하였으며, 이후 동일 조건에서 추가로 12시간 배양하였다. 배양을 마친 후 세포

를 4℃에서 4,000 g 조건으로 10분간 원심분리하여 회수하였고, 용해버퍼(lysis buffer; 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)로 재현탁하였다. 재현탁된 세포는 초음파 처리를 통해 파쇄하였고, 세포 파쇄액은 4℃, 10,000 g 조건으로 10분간 원심분리하였다. 이후 상등액은 수용성 분획(soluble fraction, S)으로, 침전된 펠렛은 동일한 부피의 용해버퍼로 재현탁하여 불용성 분획(insoluble fraction, I S)으로 명명하였다.

#### [0071] 4. 단백질 발현 분석

[0072] 단백질 발현은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분석하였다. SDS-PAGE를 통해 분리된 단백질은 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색(Biorad) 또는 InVision His-tag In-Gel 염색(Invitrogen)을 통해 분석하였다. 수용성/불용성 분획의 발현 비율은 In-Gel 염색된 겔을 대상으로 하여 ImageJ를 이용한 농도 측정(densitometry)을 통해 정량되었다.

#### [0074] 실시예 1. 다중 NEXT 태그를 이용한 목적 단백질의 수용성 향상

[0075] 다중 NEXT 태그의 수용성 발현 향상 효과를 확인하기 위해 대장균에서 불용성으로 발현되는 목적 단백질 3종을 선정하여 테스트하였으며, 목적 단백질로 써모브리오 암모니피칸스 유래  $\beta$ -taCA, TEVP 및 Luc를 선정하였다. 상기 목적 단백질을 단독으로 발현시키거나, 목적 단백질에 단일 또는 다중 NEXT 태그를 융합하고 37℃에서 발현시켜, 겔 상에 나타난 밴드 강도(band intensity)를 기반으로 목적 단백질의 수용성 발현 정도를 분석하였다.

[0076] 먼저, 26.4 kDa의 분자량을 가지는  $\beta$ -taCA에 대해 테스트한 결과,  $\beta$ -taCA의 단독 발현 시 총 발현량은 높았으나 대부분 불용성으로 발현되고 17.7%의 수용성 발현만을 보였으며,  $\beta$ -taCA에 단일 NEXT 태그를 융합한 경우 수용성 발현이 47.7%로 향상되었으나 여전히 절반 이상의 불용성 발현을 보였다. 반면,  $\beta$ -taCA에 NEXT<sub>2</sub> 또는 NEXT<sub>3</sub> 태그를 융합한 경우 각각 91%, 94.4%로 높은 수용성 발현을 보였다(도 1).

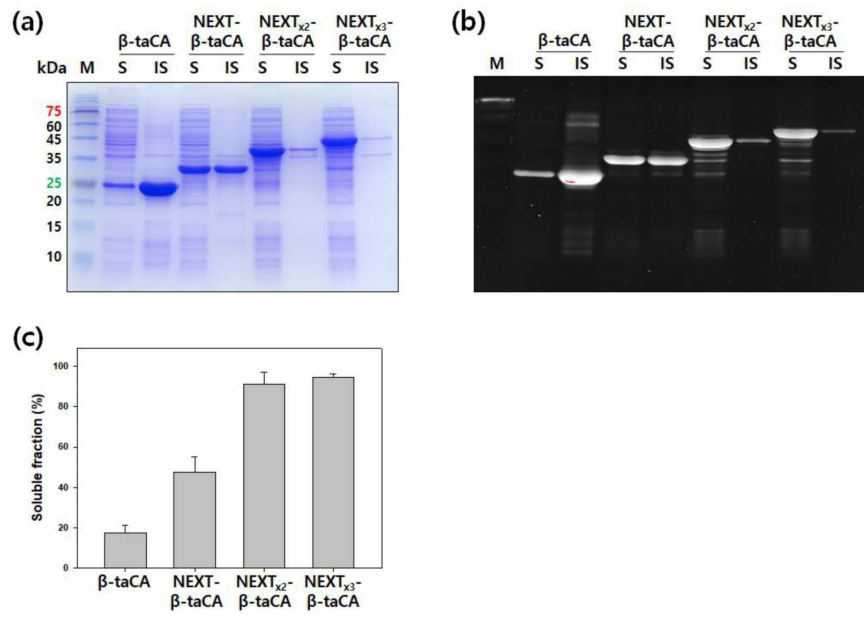
[0077] 또한, 28.7 kDa의 분자량을 가지는 TEVP에 대해 테스트한 결과, TEVP의 단독 발현 시 눈에 띄는 밴드를 찾을 수 없을 정도로 발현량이 매우 낮았으며, TEVP에 단일 NEXT 태그를 융합한 경우 총 발현량은 증가하였으나 대부분 불용성으로 발현되고 수용성 발현이 16.8% 수준밖에 되지 않았다. 반면, TEVP에 NEXT<sub>2</sub> 또는 NEXT<sub>3</sub> 태그를 융합한 경우 각각 84.7%, 87.6%로 높은 수용성 발현을 보였다(도 2).

[0078] 또한, 60.6 kDa의 분자량을 지니는 Luc에 대해 테스트한 결과, Luc의 단독 발현 시 총 발현량은 높았으나 대부분 불용성으로 발현되고 7%의 수용성 발현만을 보였으며, Luc에 단일 NEXT 태그를 융합한 경우에도 수용성 발현은 크게 증가하지 않고 14.6% 수준에 머물렀다. 반면, Luc에 NEXT<sub>2</sub> 또는 NEXT<sub>3</sub> 태그를 융합한 경우 각각 89.7%, 92.6%로 높은 수용성 발현을 보였다(도 3).

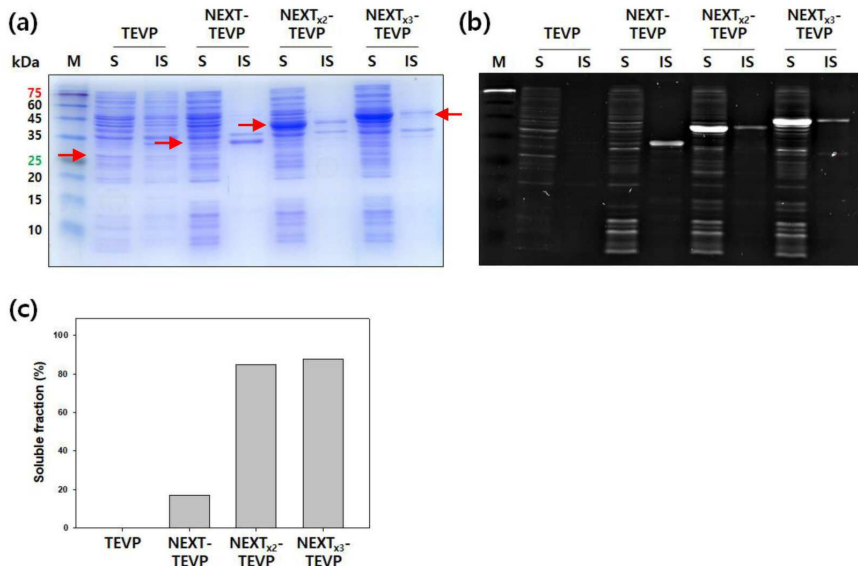
[0079] 상기 결과를 통해, 본 발명의 다중 NEXT 태그는 단일 NEXT 태그 대비 목적 단백질의 수용성 발현을 현저히 향상시킬 수 있으며, 60 kDa 이상의 큰 사이즈의 단백질에도 효과적으로 적용 가능성을 알 수 있었다.

## 도면

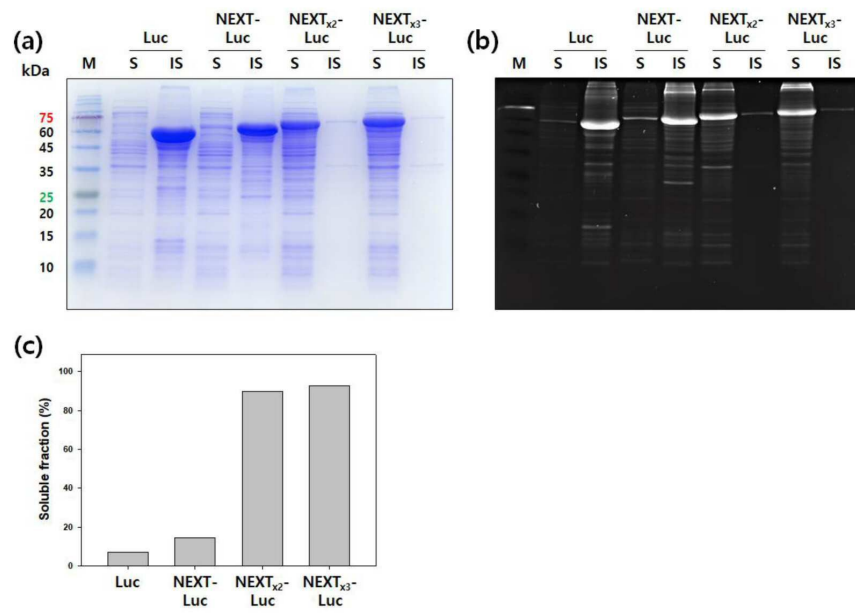
### 도면1



### 도면2



도면3



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.