



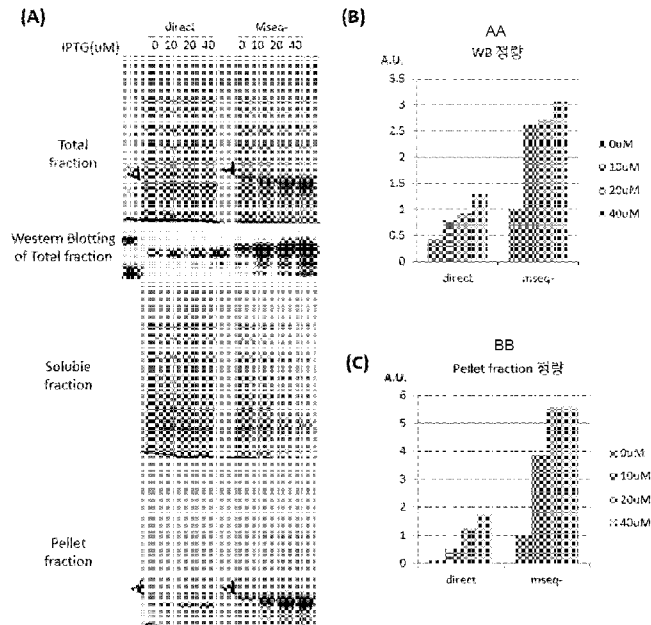
- (51) 국제특허분류: *C07K 5/10* (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002902
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 17일 (17.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0032451 2016년 3월 18일 (18.03.2016) KR
10-2017-0033692 2017년 3월 17일 (17.03.2017) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 성백린 (SEONG, Baik Lin); 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR). 권순빈 (KWON, Soon Bin); 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL PEPTIDE FOR IMPROVING EXPRESSION EFFICIENCY OF TARGET PROTEIN, AND FUSION PROTEIN INCLUDING SAME

(54) 발명의 명칭: 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질

[도 1]



AA ... WB dose
BB ... Pellet fraction dose

(57) Abstract: The present invention relates to a novel peptide for improving the expression efficiency of a target protein, and to a fusion protein including same. A novel peptide according to the present invention may improve the expression efficiency of a target protein, and a fused protein including the peptide may be usefully used in the production of a recombinant target protein by improving not only the expression efficiency but also the water-solubility of a target protein.

(57) 요약서: 본 발명은 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 펩타이드는 목적 단백질의 발현 효율을 향상시킬 수 있으며, 또한 상기 펩타이드를 포함하는 융합 단백질은 목적 단백질의 발현 효율뿐만 아니라 수용성을 향상시킬 수 있으므로, 재조합 목적 단백질의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질

기술분야

- [1] 본 발명은 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 보다 상세하게는, LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드, 및 상기 펩타이드와 이의 융합 파트너로서 hRBD(human LysRS RNA binding domain)를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현대의 생명공학에 있어서 핵심은 재조합 단백질의 생산이며 그 중에서도 중요한 것은 재조합 단백질의 양을 많이 생산하는 것이다. 많이 생산된 재조합 단백질은 활성 외래 단백질의 생산 및 회수, 기능 연구를 위한 결정화, 산업화 등에 매우 중요하다. 현재까지 대장균을 이용한 많은 재조합 단백질 생산 연구가 진행되어 왔는데, 이는 대장균의 조작이 쉽고, 짧은 성장시간, 안전한 발현, 저비용과 규모를 쉽게 바꿀 수 있는 장점이 있기 때문이다. 그러나, 대장균(*E. coli*)에서 생산된 외래 기원의 재조합 단백질은 발현 레벨이 낮거나, 적절한 "전사 후 사파론(post-translational chaperons)"이나 "전사 후 과정(posttranslational processing)"이 없기 때문에, 생산된 재조합 단백질의 불가용성 단백질 응집체(inclusion body)로 형성되는 단점이 지적되고 있다(Francois Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, Current Opinion in Biotechnology (1999), 10:411-421).
- [4] 이러한 문제들을 해결하기 위하여 재조합 단백질에 MBP, NusA, SUMO, Thioresoxin 또는 GST 등과 같은 수용성이 높은 단백질을 융합시켜 발현시키는 방법이 개발되어 있다(Dominic Esposito and Deb K Chatterjee, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, Current Opinion in Biotechnology (2006), 17:353-358). 또한 LysRS(lysyl tRNA synthetase)와 같은 RNA 결합 도메인을 이용하여 재조합 단백질의 수용성을 증가시키는 방법이 시도되고 있다(Choi SI et al., Protein solubility and folding enhancement by interaction with RNA, PLoS ONE (2008), 3:e2677). 그러나, LysRS는 약 100 kDa(monomer size = 약 58 kDa)이 넘는 거대 단백질일 뿐만 아니라 이량체(dimer)를 이루어야 하는 구조적인 한계성으로 인한 입체적 간섭현상(steric hindrance) 때문에, 재조합 단백질이 원하는 활성 형태를 갖도록 3차원 구조 형성, 이량체 이상의 다량체, 또는 단량체로의 형성을 방해할 수 있다(Choi SI et al., Protein solubility and folding enhancement by interaction with

RNA, PLoS ONE (2008), 3:e2677).

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 단백질의 수용성 및 발현 효율에 대하여 연구하던 중 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드가 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는데 결정적인 역할을 하며, LysRS로부터 유래한 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드와 이의 융합파트너로서 hRBD(human LysRS RNA binding domain)를 포함하는 융합 단백질이 목적 단백질의 발현 효율을 증진시킬 뿐만 아니라 수용성을 높일 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [7] 이에 본 발명은 LysRS로부터 유래한 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 또한, LysRS로부터 유래한 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드와 이의 융합 파트너로서 hRBD를 포함하는 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 제1구현예에 따르면,
- [10] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드를 제공하고자 한다.
- [11] 본 명세서에서 사용된 용어 "아미노아실 tRNA 합성효소(aminoacyl tRNA synthetase)"는 세포 내에서 해당 아미노산과 tRNA를 결합시켜 주고, 이렇게 형성된 아미노아실 tRNA는 신장인자(elongation factor) 또는 리보솜(ribosome)으로 옮겨져서 단백질 합성에 사용된다. 아미노산 및 tRNA에 대한 아미노아실 tRNA 합성효소의 결합 특이성은 단백질 합성과정의 정확성을 유지하는데 중요한 결정인자로서 역할을 한다.
- [12] 본 명세서에서 사용된 용어 "라이실 tRNA 합성효소(lysyl tRNA synthetase; LysRS)"는 아미노아실 tRNA 합성효소의 일 구성원으로서, 몇몇 포유류에서 아미노아실 tRNA 합성효소를 구성하는 단백질의 다양한 기능을 조절하기 위하여 분자 저장소(molecular reservoir)로서 작용하는 거대 분자복합체를 형성한다.
- [13] 본 명세서에서 사용된 용어 "목적 단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현 벡터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 숙주세포에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.

- [14] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합 단백질(recombinant protein)" 또는 "융합 단백질(fusion protein)"은 원래의 목적 단백질 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다.
- [15] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래할 수 있다.
- [16] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드에 있어서, 상기 펩타이드는 목적 단백질의 N-말단에 결합할 수 있다.
- [17] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드에 있어서, 상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택될 수 있다.
- [18]
- [19] 본 발명은 목적 단백질의 N-말단에 결합하고 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드를 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공하고자 한다.
- [20] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현 벡터는 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 결합된 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [21] 본 명세서에서 사용된 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동 가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택 마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [22] 본 명세서에서 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된"은 프로모터에서 전사가 개시하고 암호화 서열을 통해 종료암호로 진행하는데 작용하도록 단편이 배열되는 것을 나타낸다.
- [23] 본 발명에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 파지 입자 또는 게놈 삽입물일 수 있다. 상기 발현 벡터는 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제되거나 숙주세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.
- [24]
- [25] 본 발명은 또한 목적 단백질의 N-말단에 결합하고 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드를 코딩하는 유전자 서열을 포함하는 발현 벡터가 형질전환된 숙주세포를 제공하고자 한다.

- [26] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환" 또는 "도입"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 발현 벡터를 형질전환시키는 방법은 전기천공법(electrophoration), 인산칼슘(CaPO_4)법, 염화칼슘(CaCl_2)법, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포솜법 또는 초산 리튬-DMSO법을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것을 아니다.
- [27] 본 발명에 따른 숙주세포에 있어서, 상기 숙주세포는 DNA 도입 효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주세포가 바람직하며, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물이 사용될 수 있다. 바람직하기는, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있다.
- [28]
- [29] 제2구현예에 따르면,
- [30] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 및 이의 융합 파트너로서 hRBD(human LysRS RNA binding domain)를 포함하는 목적 단백질의 발현효율 및 수용성을 증진시키기 위한 융합 단백질을 제공하고자 한다.
- [31] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 LysRS RNA 결합 도메인(human LysRS RNA binding domain)"은 인간으로부터 유래한 LysRS의 RNA와 기타 단백질 간의 상호작용에 관여하는 고유한 N-말단(N-terminal) 연장부위를 의미한다.
- [32] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 융합 단백질에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래할 수 있다.
- [33] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 융합 단백질에 있어서, 상기 펩타이드는 목적 단백질의 N-말단에 결합할 수 있다.
- [34] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 융합 단백질에 있어서, 상기 hRBD는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [35] 본 발명에 따른 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 융합 단백질에 있어서, 상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택될 수 있다.
- [36] 본 발명은 또한 목적 단백질의 N-말단에 결합하고 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 및 이의 융합 파트너로서 hRBD를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 융합 단백질을 갖는 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 발현 벡터를 제공하고자 한다.
- [37] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현 벡터는 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 결합된 서열번호 5로 표시되는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터를 제공한다.

- [38] 본 발명에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 과지 입자 또는 게놈 삽입물일 수 있다. 상기 발현 벡터는 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주세포의 게놈과 무관하게 복제되거나 숙주세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.
- [39] 본 발명은 또한 목적 단백질의 N-말단에 결합하고 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 및 이의 융합 파트너로서 hRBD를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 융합 단백질을 갖는 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 발현 벡터가 형질전환된 숙주세포를 제공하고자 한다.
- [40] 본 발명에 따른 숙주세포에 있어서, 상기 숙주세포는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주세포가 바람직하며, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물이 사용될 수 있다. 바람직하기는, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있다.
- [41]
- [42] 본 발명은 또한 발현 효율이 증진된 목적 단백질의 생산 방법을 제공하고자 한다. 상기 목적 단백질의 생산 방법은:
- [43] (A) 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 결합된 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;
- [44] (B) 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- [45] (C) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 목적 단백질의 발현을 유도하고, 이를 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [46] 본 발명에 일실시예에 있어서, 상기 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드는 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열일 수 있다.
- [47] 본 발명의 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드는 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 펩타이드 서열 및 hRBD가 결합된 융합 단백질일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열일 수 있다.

[48]

발명의 효과

- [49] 본 발명에 따른 LysRS로부터 유래한 4개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드는 목적 단백질의 발현 효율을 향상시킬 수 있으며, 또한 상기 펩타이드와 이의 융합 파트너로서 hRBD를 포함하는 융합 단백질은 목적 단백질의 발현 효율뿐만 아니라 수용성을 향상시킴으로써, 재조합 목적 단백질의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[50]

도면의 간단한 설명

[51]

도 1은 실시예 1에 따른 본 발명의 펩타이드가 EGFP-HBx 단백질의 발현 효율에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[52]

도 2는 실시예 2 및 3에 따른 본 발명의 펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질이 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 발현 효율 및 수용성에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[53]

도 3은 실시예 4에 따른 본 발명의 펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질이 CsTA37 및 CsTA422 단백질의 발현 효율 및 수용성에 미치는 영향을 나타내는 SDS-PAGE 결과이다.

[54]

도 4는 본 발명에 따른 펩타이드 서열이 다른 펩타이드 서열에 비해 목적 단백질 발현 효율을 증대시키는 효과를 비교한 실험결과이다.

[55]

발명의 실시를 위한 형태

[56]

이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[57]

[58]

<실험방법>

[59]

1. 단백질 발현 벡터의 제작

[60]

단백질 발현 벡터로 pGE-LysRS 발현 벡터를 사용하였다(Choi SI et al., Protein solubility and folding enhancement by interaction with RNA, PLoS ONE (2008), 3:e2677). pGE-LysRS는 T7 promoter에 의해 발현이 조절되고, LysRS 유전자를 NdeI과 MCS(KpnI-BamHI-EcoRV-SalI-Hind3)에 있는 절단 위치 중 하나를 사용하여 잘라내고, 그 위치에 EGFP-HBx 또는 hRBD, 또는 다른 단백질들을 삽입하였다. 이 때, 삽입된 단백질의 N-말단 위치에 서열번호 1의 아미노산 서열을 삽입하였다. 그 다음, 제조된 hRBD, 또는 서열번호 1의 아미노산 함유 hRBD 벡터의 MCS에 있는 두 개의 절단효소 부위(enzyme site)를 사용하여, 발현하고자 하는 목적 단백질을 삽입하였다.

[61]

[62]

2. 단백질 발현 및 SDS-PAGE

[63]

제조된 단백질 발현 벡터를 BL21(DE3) 또는 BL21*(DE3)-pLysS 혹은 BL21(DE3)-pLysE competent cell에 형질전환 시켜 배양하였다. 모든 형질전환 된 대장균은 50 µg/ml의 암피실린(Ampicilin)이 포함된 LB 배지에서 배양하였으며, BL21*(DE3)-pLysS 또는 BL21(DE3)-pLysE에 형질전환 된 대장균은 34 µg/ml의 클로람페니콜이 추가되어 있는 배지에서 배양하였다. 배양 온도는 단백질마다 다르며, 25 ~ 37°C의 조건에서 배양하였다. 대장균의 OD₆₀₀ 값이 0.5 이상이 되면,

T7 promoter를 활성화시키기 위해서 IPTG를 0 μ M ~ 1 mM 수준으로 넣어주고, 단백질이 충분히 생산될 수 있도록, IPTG를 넣어준 이후부터 37°C에서는 3시간 또는 25°C에서는 5시간 정도를 배양하였다. 충분히 배양된 대장균은 원심분리하여 상등액을 제거한 후에 보관하였다. 그 다음, LB 배지의 5 ml에 해당되는 대장균 수확물에 PBS 0.3 ml을 넣고 초음파 분쇄를 하여, 용해물(lysate)을 만들었다. 그리고 용해물을 원심분리하여 용해 분획(soluble fraction)과 펠렛 분획(pellet fraction)으로 나누었고, 총 용해물(total lysate), 용해 분획(soluble fraction), 펠렛 분획(pellet fraction)을 구분하여 SDS-PAGE로 분석하였다.

[64]

[65] 3. 웨스턴 블롯팅(Western Blotting)

[66] 분석하고자 하는 샘플을 SDS-PAGE로 시행 후에, 곧바로 PVDF 멤브레인(membrane)으로 이동시켰다. 샘플 단백질로 채워지지 못한, PVDF 멤브레인의 빈 공간들은 5% skim milk in TBST(pH 7.5 Tris-buffered saline, +0.05% tween 20)을 통해 블로킹 시켰다. 그 다음, TBST로 멤브레인을 3회 씻어준 후, Anti-his tag (1:20000) (QIAGEN, 34660)을 16시간 동안 4°C에서 멤브레인에 처리하였다. TBST로 멤브레인을 3회 다시 씻어준 후, 2차 항체로 HRP가 달린 항-마우스(Anti-mouse) 항체(Sigma, A4416)를 사용하여 멤브레인에 1시간 동안 실온에서 처리하였고, TBST로 다시 3회 씻어준 후 WEST-ZOL(인트론, 한국)을 처리하고 필름으로 확인하였다.

[67]

[68] <실시예>

[69] 실시예 1. 본 발명에 따른 펩타이드가 EGFP-HBx 단백질의 발현 효율에 미치는 효과

[70]

[71] (1) SDS-PAGE 분석

[72] pGE LysRS 플라스미드에서 Nde1과 Hind3 제한효소를 사용하여 LysRS를 떼어내고, 그 위치에 EGFP-HBx 유전자 서열(direct form)과 서열번호 1을 코딩하는 유전자 서열(서열번호 2)이 N-말단에 추가된 서열(fusion form) 두 가지를 각각 집어 넣었다. 상기 벡터(vector)는 T7 promoter에 의해 발현되고, lac operator에 의해서 조절되는 형태로 IPTG에 의해서 프로모터 활성화가 조절된다. 두 개의 재조합 플라스미드를 각각 BL21(DE3)-pLysE competent cell에 형질전환 시키고 37°C 조건에서 3시간 동안 단백질을 발현하였다. 이때, IPTG는 0, 10, 20 및 40 μ M 4가지 농도로 처리하였다. 그 결과, EGFP-HBx 유전자의 fusion form의 경우 direct form에 비해 발현이 잘 이루어졌음이 확인되었다(도 1A).

[73]

[74] (2) 웨스턴 블롯팅 분석

[75] 대장균 자체의 단백질들이 background를 만들기 때문에, 총 분획(total

fraction)의 SDS-PAGE 결과로는 정밀한 정량이 어렵다. 그래서 웨스턴 블롯팅 (Western blotting, WB)을 진행하였고, WB 결과를 가지고 분석용 S/W인 Bio1D를 이용하여 정량 하였다. 그 결과, EGFP-HBx 유전자의 fusion form의 경우 direct form에 비해 발현 레벨이 적어도 2배 이상 증가하는 것으로 확인되었다(도 1B).

- [76] 한편, EGFP-HBx 단백질은 용해 분획에는 거의 없고, 대부분이 펠렛 분획에 있는 것으로 확인이 되는데, 펠렛 분획에는 대장균 단백질들이 많지 않기 때문에 background가 총 분획에 비해 훨씬 적다. 따라서, 펠렛 분획을 이용하여 정량 하여, 포화되기 전 결과인 IPTG 10 μ M(orange bar)와 비교한 결과, EGFP-HBx 유전자의 fusion form의 경우 direct form에 비해 발현 레벨이 적어도 7배 이상 증가하는 것으로 확인되었다(도 1C).

[77]

- [78] 실시예 2. 본 발명에 따른 펩타이드가 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 발현 효율에 미치는 효과

[79]

- [80] 대장균에서 발현이 잘 안 되는 것으로 알려진 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 발현에 본 발명에 따른 펩타이드가 미치는 효과를 알아보기 위하여, 상기 실시예 1과 동일한 방법을 이용하여 상기 두 단백질의 direct form과 fusion form을 pGE LysRS 플라스미드에 각각 삽입하였다. 총 4개의 재조합된 플라스미드를 BL21*(DE3)-pLysS competent cell에 형질전환 시키고, 37°C 조건에서 단백질을 발현하였다. 이 때, IPTG는 1 mM 농도로 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 그 결과, CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 fusion form의 경우 direct form에 비해 발현 레벨이 증가하는 것으로 확인되었다(도 2A 및 2B).

[81]

- [82] 실시예 3. 본 발명에 따른 펩타이드 및 hRBD를 포함하는 융합 단백질이 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 발현 효율 및 수용성에 미치는 효과

[83]

- [84] 실시예 2에 따른 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 수용성을 증가시키기 위하여 융합 파트너로서 hRBD를 사용하였다. hRBD는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되고, hRBD에 서열번호 1의 펩타이드 서열을 결합시킨 융합 단백질(mseq-hRBD)을 서열번호 5의 아미노산 서열로 나타내었다.

- [85] pGE LysRS 플라스미드에서 Nde1과 Kpn1을 이용하여 LysRS를 잘라내었고, 그 위치에 hRBD 및 mseq-hRBD 를 코딩하는 유전자 서열인 서열번호 4 및 서열번호 6의 DNA를 각각 삽입하였다. 그 다음 pGE hRBD 플라스미드 및 pGE mseq-hRBD 플라스미드에 BamH1과 Hind3를 이용하여 CsTA381 유전자 및 CsTA1953 유전자를 각각 삽입하였다.

- [86] 제작된 총 4개의 재조합 단백질을 상기 실시예2와 동일한 발현 조건으로 발현시킨 결과, CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 5' hRBD 결합 form 은 발현 효율이 좋지 않아서 수용성이 개선되었는지 확인이 안되었지만, mseq-hRBD

결합 form의 경우 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 발현 효율과 수용성이 개선된다는 것이 확인되었다(도 2C 및 2D). 또한, hRBD 결합 form과 mseq-hRBD 결합form의 단백질 밴드를 비중 스캐닝(densitometric scanning) 방법으로 측정 비교한 결과 CsTA381 및 CsTA1953 단백질의 mseq-hRBD 결합 form의 발현 레벨이 hRBD 결합 form에 비해 적어도 4배 이상 증가하는 것으로 확인되었다(도 2E 및 2F). 그리고 mseq-hRBD 결합 form의 경우, 서열번호 1 결합 form에 비해 발현 레벨이 훨씬 증가하는 것으로 보아 hybrid 형태의 시너지 효과가 있는 것으로도 확인되었다. 따라서 mseq(서열번호 1) 서열 및 hRBD(서열번호 2) 서열을 hybrid의 형태(mseq-hRBD의 아미노산 서열)로 사용하는 경우 목적 단백질의 수용성뿐만 아니라 발현 효율도 크게 증가될 수 있음이 입증되었다.

[87]

[88] 실시예 4. 본 발명에 따른 펩타이드 및 hRBD를 포함하는 융합 단백질이 CsTA37 및 CsTA422 단백질의 발현 효율 및 수용성에 미치는 효과

[89]

[90] 상기 실시예 2 및 3에서 확인한 mseq-hRBD(서열번호 5) 결합 form의 효과를 다른 단백질에서도 확인을 해보기 위해, CsTA37, CsTA422 두 가지 단백질에도 적용해보았다. 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 direct form과 mseq-hRBD(서열번호 5) 결합 form 플라스미드를 제작하였고, BL21 대장균, 30°C 조건에서 발현을 해보았다. 확인 결과, Direct form은 발현이 거의 나타나지 않았고, 수용성도 좋지 못한 것을 확인할 수 있었으나, mseq-hRBD 결합 form의 경우 수용성 형태로 발현이 매우 잘 되는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[91]

[92] 실시예 5. 본 발명에 따른 펩타이드의 발현 효율 증가 효과 비교

[93]

[94] 본 발명에 따른 mseq(서열번호 1) 펩타이드 서열의 목적 단백질 발현 효율 증가 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1과 동일한 방법을 이용하여 LysRS 유래 다른 펩타이드 서열(서열번호 7)과 비교하였다.

[95]

구체적으로, pGE LysRS 플라스미드에서 Nde1과 Hind3 제한효소를 사용하여 LysRS를 떼어내고, 그 위치에 GFP유전자 서열에 서열번호 1이 N-말단에 추가된 펩타이드를 코딩하는 유전자 서열(서열번호 2, fusion form; Mseq) 및 서열번호 7이 N-말단에 추가된 펩타이드를 코딩하는 유전자 서열(서열번호 8, fufusion form; Mseqhaq) 두 가지를 각각 집어 넣었다. 상기 벡터(vector)는 T7 promoter에 의해 발현되고, lac operator에 의해서 조절되는 형태로 IPTG에 의해서 프로모터 활성화가 조절된다. 상기 세 가지 재조합 플라스미드를 각각 BL21(DE3)-pLysE competent cell에 형질전환 시키고 37°C 조건에서 3시간 동안 단백질을 발현하였다. 이때, IPTG는 0, 10, 20, 40 μ M의 4가지 농도로 처리하였다.

[96]

그 결과, GFP 유전자의 발현이 본 발명에 따른 mseq(서열번호 1) 펩타이드

서열과 함께 발현시켰을 때, Mseqhaq(서열번호 7)의 펩타이드 서열과 함께 발현시켰을 때보다 27% 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[97]

[98] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 목적 단백질의 N-말단에 결합되고 서열번호 1의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키기 위한 펩타이드.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 것인 펩타이드.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 것인 펩타이드.
- [청구항 4] 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및
상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 결합된 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;
를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.
- [청구항 5] 제 4항에 따른 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 숙주세포.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)인 것을 특징으로 하는 것인 숙주세포.
- [청구항 7] 목적 단백질의 N-말단에 결합되고 서열번호 1의 아미노산으로 이루어진 펩타이드; 및
상기 펩타이드의 융합파트너로서 hRBD(human LysRS RNA binding domain)를 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 단백질의 발현 효율 및 수용성을 증진시키기 위한 융합 단백질.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 hRBD는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 것인 융합 단백질.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서,
상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 것인 융합 단백질.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서,
상기 융합 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 11] 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및
상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 결합된 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현백터.

[청구항 12] 제 11항에 따른 발현백터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 숙주세포.

[청구항 13] 제 12항에 있어서,

상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)인 것을 특징으로 하는 것인 숙주세포.

[청구항 14] (A) 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 결합된 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 백터를 제조하는 단계;

(B) 상기 발현 백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

(C) 상기 형질전환체를 배양하여 제조할 목적 단백질의 발현을 유도하고, 이를 수득하는 단계를 포함하는 수용성 목적 단백질의 생산 방법.

[청구항 15] 제 14항에 있어서,

상기 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드는 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 수용성 목적 단백질의 생산 방법.

[청구항 16] 제 14항에 있어서,

상기 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 수용성 목적 단백질의 생산 방법.

[청구항 17] 제 14항에 있어서,

상기 목적 단백질의 발현 효율을 증진시키는 펩타이드는 LysRS(Lysyl tRNA synthetase)로부터 유래한 펩타이드 서열 및 hRBD가 결합된 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 수용성 목적 단백질의 생산 방법.

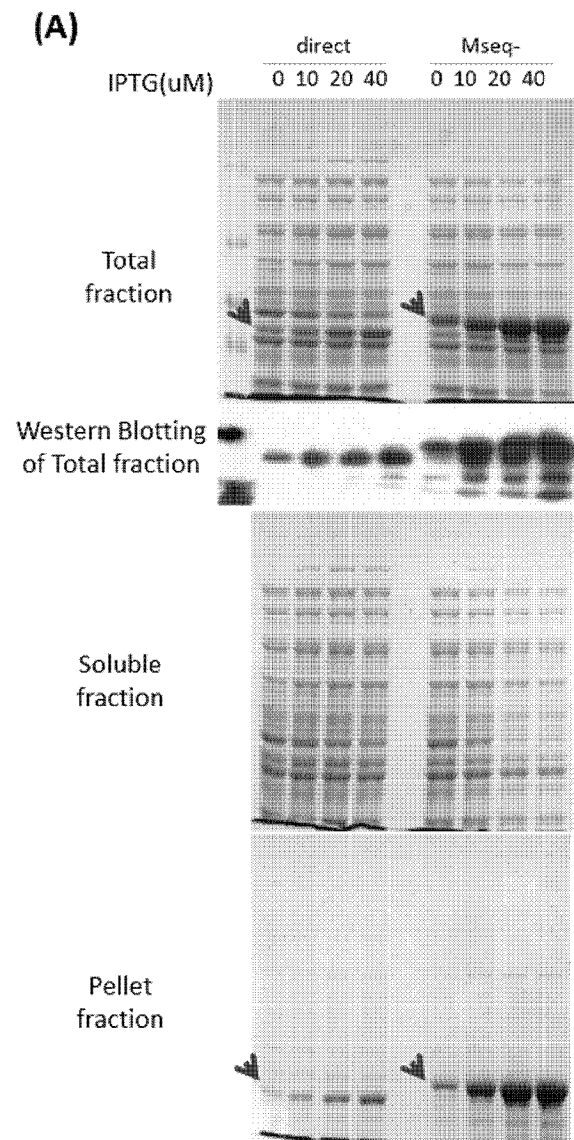
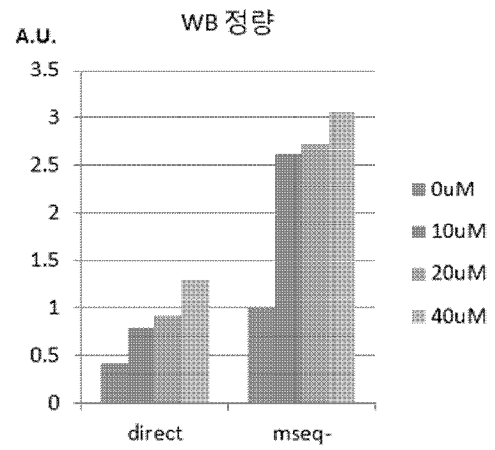
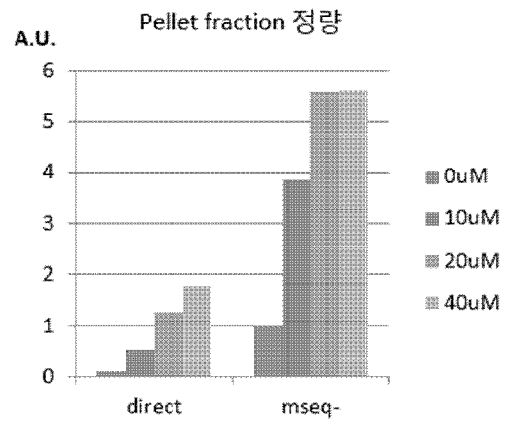
[청구항 18] 제 17항에 있어서,

상기 hRBD는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 수용성 목적 단백질의 생산 방법.

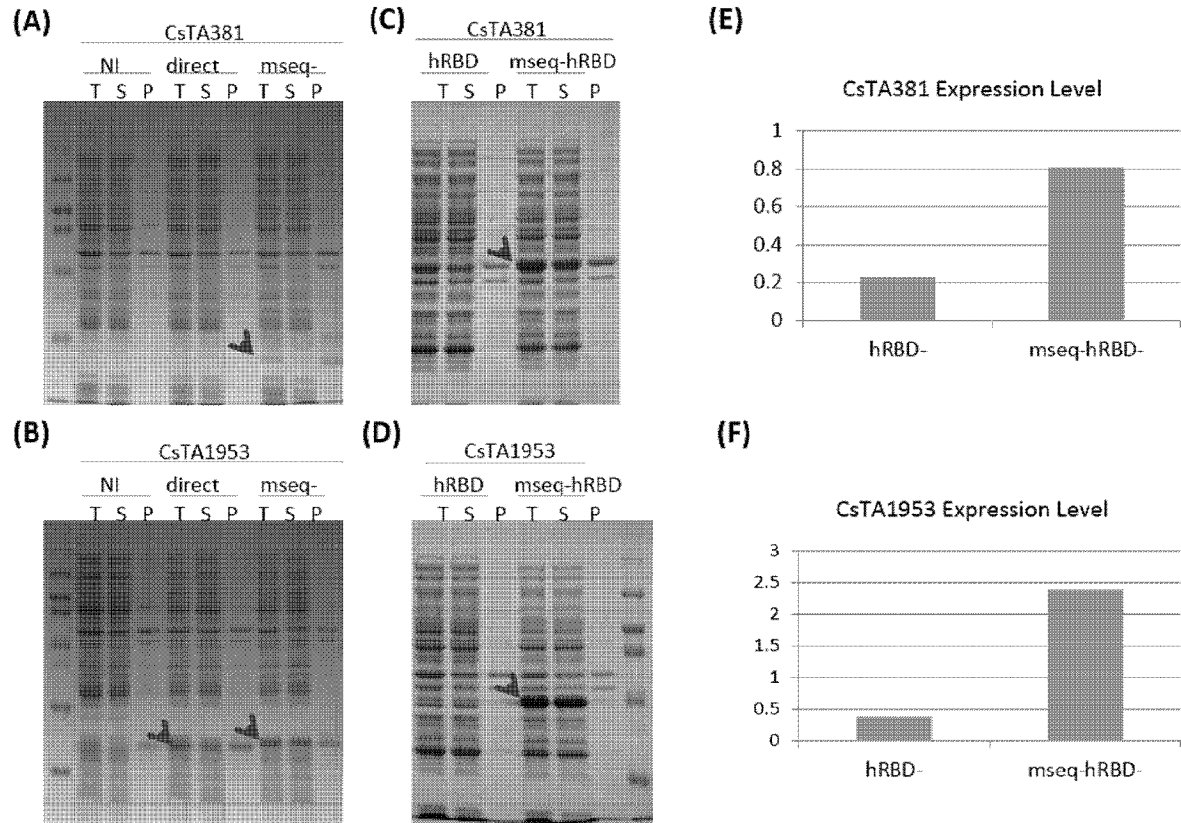
[청구항 19] 제 17항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호 5로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 수용성 목적 단백질의 생산 방법.

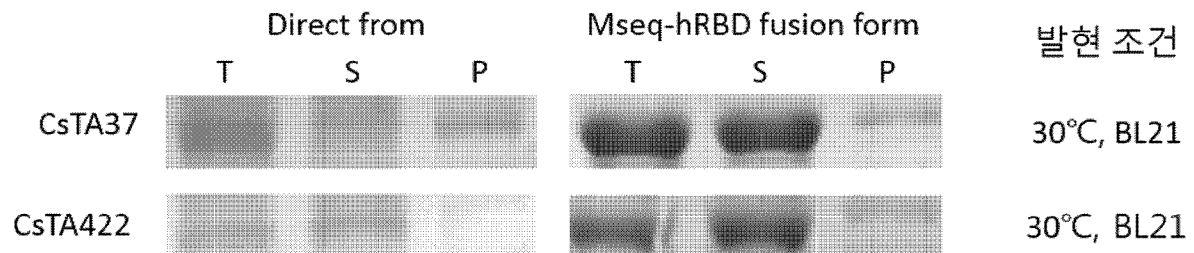
[도1]

**(B)****(C)**

[도2]



[도3]



[도4]

(A)



(B)

