(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0044144
(43) 공개일자 2007년04월27일

(21) 출원번호 10-2005-0100129
(22) 출원일자 2005년10월24일
심사청구일자 2005년10월24일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 장효일
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명공학원 515호
김혜영
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명공학원 515호

(74) 대리인 김동진
강경찬
박경찬

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) ＤＮＡ의 서열 특이적 재조합 방법

(57) 요약

본 발명은 DNA의 서열 특이적 재조합 방법을 개시한다. 구체적으로 본 발명은 장내 구균 용원성 파지 Φ FC1의 인테그라제 MJ1 효소와 그것의 기질인 att 서열을 이용한 DNA의 서열 특이적 재조합 방법을 개시한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

하기 (a) 내지 (b) 서열 중 하나로서, 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있는 attP 서열.

(a) 서열번호 1에 개시된 염기서열 전부를 포함하면서 전장의 attP 서열보다는 짧은 염기서열; 및

(b) 코어서열(AGT)은 보존되면서 상기 (a)의 서열에 실질적으로 유사한 염기서열.

청구항 2.

제1항에 있어서,

상기 attP 서열은 서열번호 1에 개시된 서열로 이루어진 attP 서열.

청구항 3.

하기 (a) 및 (b)의 서열 중 하나로서 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있는 attB 서열

(a) 서열번호 2에 개시된 염기서열 전부를 포함하면서 전장의 attB 서열보다는 짧은 염기서열; 및

(b) 코어 서열은 보존되면서 상기 (a)의 서열에 실질적으로 유사한 염기서열.

청구항 4.

제3항에 있어서,

상기 attB 서열은 서열번호 12에 개시된 서열로 이루어진 attB 서열.

청구항 5.

(a) 제1항의 attP 또는 제3항의 attB를 포함하는 제1의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계;

(b) 제1항의 attP 또는 제3항의 attB를 포함하는 제2의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계; 및

(c) 인테그라제 MJ1에 의하여 서열 특이적 재조합을 수행하는 단계를 포함하되, 상기 제1의 DNA가 attB를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attP를 포함하는 경우이거나, 상기 제1의 DNA가 attP를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attB를 포함하는 경우인, DNA의 서열 특이적 재조합 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서,

상기 제1의 DNA 또는 제2의 DNA 중 하나는 세포의 게놈 속으로 통합되어진 DNA의 서열 특이적 재조합 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서,

상기 제1의 DNA 또는 제2의 DNA 중 하나는 목적 유전자를 포함하는 DNA의 서열 특이적 재조합 방법.

청구항 8.

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 attP 서열은 서열번호 1에 개시된 서열로 이루어진 attP 서열인 DNA의 서열 특이적 재조합 방법.

청구항 9.

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 attB 서열은 서열번호 2에 개시된 서열로 이루어진 attB 서열인 DNA의 서열 특이적 재조합 방법.

청구항 10.

(a) 제1항의 attP 또는 제3항의 attB를 포함하는 제1의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계;

(b) 제1항의 attP 또는 제3항의 attB를 포함하고, 또한 하나 이상의 목적 유전자를 그 유전자가 발현가능하도록 하는 비암호화 서열과 함께 포함하는 제2의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계;

(c) 인테그라제 MJ1에 의하여 서열 특이적 재조합을 수행하는 단계; 및

(d) 상기 유전자가 발현되도록 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 제1의 DNA가 attB를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attP를 포함하는 경우이거나, 상기 제1의 DNA가 attP를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attB를 포함하는 경우인, 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서,

상기 제1의 DNA는 세포 게놈으로 통합되어진 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법.

청구항 12.

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 attP 서열은 서열번호 1에 개시된 서열로 이루어진 attP 서열인 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법.

청구항 13.

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 attB 서열은 서열번호 2에 개시된 서열로 이루어진 attB 서열인 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법.

청구항 14.

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 비암호화 서열은 선별 유전자를 추가로 포함하는 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 서열 특이적 DNA 재조합 방법에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 장내 구균 용원성 파지 Φ FC1의 인테그라제 MJ1 효소에 의한 서열 특이적 DNA 재조합 방법에 관한 것이다.

서열 특이적 재조합(Site-specific recombination)은 목적하는 생물학적 물질을 안정적으로 얻기 위한 용도나 특정 유전자를 사람의 표적 세포의 게놈 내로 통합시키는 유전자 치료 용도로 사용될 수 있는 기술이다.

이러한 서열 특이적 재조합은 서열 특이적 재조합 효소(site-specific recombinase)에 의해서 매개 되는데, 서열 특이적 재조합 효소란 바이러스나 박테리아 등에 존재하는 단백질로서 통상적으로 엔도뉴클레아제(endonuclease)의 특성과 리가제(ligase)의 특성을 동시에 보유하고 있다. 이러한 재조합 효소는 핵산 분자의 재조합 서열(recombination site)을 인식하고 그 서열을 절단·재결합(breakage and reunion)시킴으로써 인접한 핵산 서열을 서로 재조합(recombination)시키는 기능을 수행한다.

서열 특이적 재조합 효소는 2가지 계열로 분류될 수 있다. 제1의 계열은 인테그라제 계열로서, 대부분의 재조합 효소가 여기에 속한다. 인테그라제(integrase) 계열의 재조합 효소는 통상적으로 재조합 서열이 2개의 DNA 분자 상에 존재하는 경우의 분자간 재조합과 재조합 서열이 하나의 DNA 분자 상에 존재하는 경우의 분자내 재조합을 촉매할 수 있다. 제2의 계열은 인버타제/레졸바제(invertase/resolvase) 계열로서 이는 상기 제1의 계열의 재조합 효소가 통상적으로 분자간 재조합과 분자내 재조합을 모두 촉매하는 것과는 달리 분자내 재조합만을 촉매할 수 있다.

현재 대부분의 서열 특이적 재조합 효소는 인테그라제 계열에 속한다(Argos, et al., EMBO J. 5:433-440(1986); Voziyanov, et al., Nucl. Acids Res. 27:930(1999)) 이러한 인테그라제 계열에 속하는 서열 특이적 재조합 효소로서 가장 활발하게 연구가 된 것이 아마 박테리오파지 람다 Int 재조합 효소(Landy, A. Current Opinions in Genetics and Devel. 3:699-707 (1993)), 박테리오파지 *P1*의 Cre 재조합 효소(Hoess and Abremski (1990) In Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 4. Eds.: Eckstein and Lilley, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; pp. 90-109), 그리고 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 2Φ 환형 플라스미드의 Flp 재조합 효소(Broach, et al., Cell 29:227-234 (1982))일 것이다.

상기 예시된 효소들은 DNA를 삽입시키는 재조합 기능과 삽입된 DNA를 절단시키는 기능을 보유하며, 그 활성에 보조 인자(cofactor)나 보조 단백질(auxilary protein)(예컨대, IHF, FIS, XIS 등) 등을 필요로 한다.

한편, 박테리오파지 람다 Int 재조합 효소가 인식하는 서열은 attB(25bp), attP(240bp), attL 및 attR 서열이라 하며, 박테리오파지 *P1*의 Cre 재조합 효소가 인식하는 서열을 loxP(34bp)라 하고, 효모의 Flp 재조합 효소가 인식하는 서열을 FRT(54bp)라 하는데, 이러한 서열들은 코어 서열을 지니고 있으며, 효소에 따라 특이적이고(예컨대, Cre는 FRT를 재조합시킬 수 없고, Flp는 loxP를 재조합시킬 수 없다), 보조 단백질(auxilary protein)의 결합 부위를 지니기도 한다.

본 발명자(들)는 상기 인테그라제 계열에 속하는 장내 구균 용원성 파지 Φ FC1(Enteococcus temperate bacteriophage Φ FC1)의 인테그라제 MJ1(이하 "인테그라제 MJ1")이 보조 인자나 2가 양이온 등의 도움없이 단독으로 재조합을 촉매하고 또 원형의 DNA 뿐만 아니라 선형의 DNA도 촉매함을 확인한 바 있으며, 분자간 재조합뿐만 아니라 분자내 재조합도 촉매함을 확인한 바 있다(대한민국 공개특허 제2003-0062800호; Kim et al., J. Biochem. Mol. Biol. Vol.29, No.5 pp.448~454; Yang et al., Journal of Bacteriology, Apr, 2002, p.1859~1864). 한편, 상기 인테그라제 MJ1에 의한 재조합을 매개할 수 있는 전장의 att 서열은 (김영우, Genetic study of Bacteriophage FC1 from Enterococcus faecalis, 1996, 고려대학교)에서 확인할 수 있다.

본 발명은 인테그라제 MJ1이 전장의 att 서열보다 짧은 att 서열에 대해서 그 활성이 더 높음을 확인함으로써 완성된 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 인테그라제 MJ1의 재조합 서열로서 재조합 효율이 높은 짧은 att 서열을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 짧은 att 서열을 이용하여 인테그라제 MJ1에 의한 DNA의 서열 특이적 재조합 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 서열 특이적 재조합 방법을 이용하여 목적하는 생물학적 물질을 용이하게 얻을 수 있는 목적 유전자의 발현 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 기타의 목적이나 구체적인 양태 등은 이하에서 제시될 것이다.

발명의 구성

일 측면에 있어서, 본 발명은 인테그라제 MJ1의 재조합 서열로서 att 서열에 관한 것이다.

구체적인 양태에 있어서, 본 발명의 재조합 서열인 att 서열은 attP 서열과 attB 서열로 나누어 살펴볼 수 있다.

본 발명의 attP 서열은 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있는 하기 (a) 내지 (b) 서열 중 하나이다.

(a) 서열번호 1에 개시된 염기서열 전부를 포함하면서 전장의 attP 서열보다는 짧은 염기서열; 및

(b) 코어 서열(AGT)은 보존되면서 상기 (a)의 서열에 실질적으로 유사한 염기서열.

상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "인테그라제 MJ1"은 대한민국 공개특허 제2003-0062800호(본 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다)의 서열번호 4에 개시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드와 그것의 유도체를 포함하는 의미로서 이해될 수 있다. 여기서 상기 "유도체"란 상기 서열번호 4에 개시된 아미노산 서열에서 그 일부가 치환 또는 결실되거나 일정 길이의 아미노산 서열이 추가되었으면서 여전히 인테그라제로서의 기능을 보유하는 임의의 폴리펩티드로서 정의될 수 있다. 당업자는 하기에서 설명하는 방법 즉 국제공개특허 WO 01/16345에 개시된 방법을 응용하는 한, 상기 유도체 즉 상기 서열번호 4에 개시된 아미노산 서열에서 그 일부가 치환 또는 결실되거나 일정 길이의 아미노산 서열이 추가된 폴리펩티드가 여전히 인테그라제로서의 기능을 보유하는가를 그의 통상의 능력 범위 내에서 극히 용이하게 확인할 수 있음이 분명하다. 그러므로 인테그라제 MJ1은 대한민국 공개특허 제2003-0062800호(본 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다)의 서열번호 4에 개시된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드만으로 한정하여 이해되어서는 안 되며, 그것의 유도체를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "전장의 attP 서열"이란 상기 김(Kim)의 문헌(본 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다)에서 특정된 전장의 attP 서열(하기 서열목록의 서열번호 11 참조)로서 이해될 수 있다.

또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "(a)의 염기서열"은, 보다 구체적으로는, 서열번호 1에 개시된 염기서열의 전부를 포함하지만, 전장의 attP 서열에서 1bp 이상 결실된 염기서열로서 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있는 기능을 보유하는 염기서열로서 이해될 수 있다.

하기 본 발명의 실시예에서 서열번호 1에 개시된 염기서열로 이루어진 attP 서열이, 전장의 attP 서열보다 짧은 염기서열로 이루어짐에도 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 재조합을 99.16%의 재조합 빈도로서 매개한다는 사실이 확인되는 이상, 당업자라면 그의 통상의 능력을 활용하는 한 상기 정의된 (a) 염기서열를 포함하면서 전장의 attP 서열보다 1bp 이상 결실된 염기서열도 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 것이라고 예측할 것이며, 당업계에 공지된 방법이나 본 발명의 하기 실시예의 방법을 사용하여 이를 극히 용이하게 확인할 수 있을 것으로 기대된다. 상기 공지된 방법으로서 예컨대, 국제공개특허 WO 01/16345(본 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다)에 개시된 방법을 들 수 있는데, 이 방법은 인테그라제를 암호화하는 발현벡터와, 이러한 인테그라제에 의하여 재조합 서열 사이에 재조합되었을 때 발현되거나 또는 발현되지 않도록 위치한 레포터 유전자(예컨대, GFP와 같은 형광성 단백질)를 이용한 방법인데, 이때 재조합 여부는 재조합된 기질 벡터를 회수하고 서던 블럿이나 재조합된 영역의 서열을 분석함으로써 DNA 수준에서 확인하거나, 또는 웨스턴 블럿이나 형광성 단백질의 FACS-분석에 의해서 단백질 수준에서 확인할 수 있게 된다. 이처럼 상기

(a)의 서열로서 언급되는 바의 재조합 서열이 인테그라제 MJ1에 의해 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있는지의 여부의 확인이 당업자가 통상의 능력 범위 내에 속하기 때문에, 상기 본 발명의 attP 서열에는, 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 있는 한, 전장의 attP 서열보다는 짧으면서 서열번호 1에 개시된 염기서열 전부를 포함하는 임의의 서열도 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "(b)의 염기서열"은, 상기 (a)의 염기서열과 비교하였을 때 코어 서열(AGT) 부분 이외의 다른 부분에서 하나 이상의 치환된 뉴클레오티드를 갖는 염기서열로서 이해될 수 있다. 일반적으로 당업계에는 어떤 염기서열(그 염기서열이 단백질을 암호화하는 염기서열이든, 또는 유전자의 전사를 촉진하는 프로모터 또는 인핸서의 염기서열이든, 또는 본 발명에서처럼 재조합을 매개하는 염기서열이든)에서 하나 이상의 뉴클레오티드가 치환되더라도 그 염기서열이 가지는 본래의 기능이 그 기능상의 효율은 낮을지라도 그대로 유지될 수 있음이 알려져 있다. 그러므로 당업자는 본 발명의 attP 서열에서도 하나 이상의 뉴클레오티드가 치환됨에도 불구하고 그 치환된 뉴클레오티드를 갖는 attP 서열은 여전히 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있다고 기대할 것이고, 앞서 예시된 방법 즉 국제공개특허 WO 01/16345에 개시된 방법 또는 본 발명의 하기 실시예의 방법을 사용하는 한 그의 통상의 능력 범위 내에서 이를 극히 용이하게 확인할 수 있을 것으로 보여진다.

그러므로 본 발명의 attP 염기서열은 상기 (a)의 염기서열과 비교하였을 때 코어 서열(AGT) 부분 이외의 다른 부분에서 하나 이상의 치환된 뉴클레오티드를 갖는 임의의 염기서열을 포함하는 것으로서 이해되어야 할 것이다.

그럼에도 바람직하게는 상기 (b)의 염기서열은 상기 (a)의 염기서열과 비교하였을 때 10개 이하의 치환된 뉴클레오티드를 갖는 염기서열, 더 바람직하게는 5개의 이하의 치환된 뉴클레오티드를 갖는 염기서열, 가장 바람직하게는 3개 이하의 치환된 뉴클레오티드를 갖는 염기서열로서 이해될 수 있다.

한편, 상기 "코어 서열"이란 재조합이 일어나는 서열로서 AGT 서열을 의미하며(대한민국 공개특허 제2003-0062800호 참조), 상기 "코어 서열이 보존된다"는 것의 의미는 코어 서열에 있어서는 치환이 일어나지 않는다는 의미이다.

한편, 본 발명의 attB 서열은 상기 본 발명의 attP 서열에서와 비슷하게 인테그라제 MJ1에 의해 유도되는 서열 특이적 재조합을 매개할 수 있는 하기 (a) 및 (b)의 염기 서열 중 하나로서 정의될 수 있다.

(a) 서열번호 2에 개시된 염기서열 전부를 포함하면서 전장의 attB 서열보다는 짧은 염기서열; 및

(b) 코어 서열은 보존되면서 상기 (a)의 서열에 실질적으로 유사한 염기서열.

상기에서 "인테그라제 MJ1"의 의미, "전장의 attB"의 의미 "(a)의 서열"의 의미, "(b)의 염기서열"의 의미, "코어 서열"의 의미, 그리고 "코어 서열이 보존된다"는 것 등의 의미에 대해서는 앞서 본 발명의 attP 서열과 관련하여 설명한 바가 준용된다. 여기서 전장의 attB 서열은 하기 서열목록의 서열번호 12에서 참고적으로 확인할 수 있다.

다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 att 서열을 이용하는 인테그라제 MJ1에 의한 DNA의 서열 특이적 재조합 방법에 관한 것이다.

본 발명의 DNA의 서열 특이적 재조합 방법은

(a) 상기에서 상술한 바의 attP 또는 attB를 포함하는 제1의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계;

(b) 상기에서 상술한 바의 attP 또는 attB를 포함하는 제2의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계; 및

(c) 인테그라제 MJ1에 의하여 서열 특이적 재조합을 수행하는 단계를 포함하되, 상기 제1의 DNA가 attB를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attP를 포함하는 경우이거나, 상기 제1의 DNA가 attP를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attB를 포함하는 경우인 것을 특징으로 한다.

상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "상기에서 상술한 바의 attP 또는 attB"란 바람직한 양태를 포함하여 전술한 바의 attP 또는 attB 중 임의의 것을 의미하며, 바람직하게는 각각 서열번호 1로 특정되는 염기서열 및 서열번호 2로 특정되는 염기서열을 의미한다.

또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "세포"란 원핵세포(*E, coli* 등)와 진핵세포를 모두 포함하는 의미인데, 바람직하게는 진핵세포를 의미한다. 진핵세포란 주지된 바와 같이 핵막에 의해 둘러싸인 진정한 핵을 가지고 있는 세포인데, 이러한 진핵세포에는 효모, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포가 모두 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 동물 세포는 특히 포유동물 세포, 예컨대 사람 세포, 유인원 세포, 쥐 세포, 랫트 세포, 토끼 세포, 햄스터 세포(BHK21, BHK TK-, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKXBl 및 CHO-DG44 포함), 염소 세포, 소 세포, 양 세포 또는 돼지 세포인 바람직하다.

또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "DNA를 세포 내로 도입한다"는 것은 당업계에 알려진 임의의 방법, 바람직하게는 문헌(Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York or Ausubel, F.M. et al. (1994 updated) Current Protocols in Molecular Biology, New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)(본 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다)에 기술된 방법을 사용하여 DNA를 세포 내로 형질감염 또는 형질전환시키는 것을 의미하는데, 상기 당업계에 알려진 임의의 방법에는 리포펙션(lipofection) 방법, 전기천공 방법, DEAE-덱스트란-매개 형질감염 방법, 원형질 융합 방법, 바이러스 감염 방법, 전기 쇼크 방법, 미세주사 방법 등이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 상기 "(제1 또는 제2의)DNA"는 단일 체인 또는 이중 체인 형태일 수 있고, 선상 또는 환형의 형태일 수 있으며, 발현벡터 또는 클로닝벡터일 수 있고, 게놈 유래의 핵산 서열을 포함하거나 합성된 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 또한 암호화 서열과 비암호화 서열을 포함할 수 있는데, 구체적으로는 플라스미드, 파이지미드, 코스미드 등의 형태를 띨 수 있다.

여기서 상기 "암호화 서열"이란 생물학적으로 기능을 가지는 RNA(예컨대, rRNA, tRNA 등)나 폴리펩티드의 합성에 주형으로 작용하는 일정 길이의 폴리뉴클레오티드로서 정의될 수 있다.

상기 암호화 서열의 구체적인 예로서 목적 유전자를 들 수 있는데, 여기서 "목적 유전자"란 목적하는 생성물(즉 RNA나 폴리펩티드)을 암호하하는 일정 길이의 폴리뉴클레오티드 서열로서 정의될 수 있는데, 이러한 폴리뉴클레오티드 서열은 절단된 형태, 융합된 형태, 태그된 형태일 수 있으며, cDNA 또는 gDNA일 수 있고, 천연 형태의 생성물을 암호화하는 서열이거나 원하는 돌연변이 형태의 생성물을 암호화하는 서열일 수 있다.

상기 목적 유전자는 그것이 발현되어 얻어지는 생성물 즉 목적 생성물이 인간에게 유용한 것이라면 임의의 것이라도 무방한데, 예컨대, 인슐린 유전자, hGH 유전자, tPA 유전자, 사이토키닌 유전자, 인터페론 유전자, 종양괴사인자 유전자, 에리트로포이에틴 유전자 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 DNA 서열 특이적 재조합 방법에 있어, 상기 제1의 DNA 또는 제2의 DNA가 상기 목적 유전자를 포함할 경우에, 상기 목적 유전자가 안정적으로 발현되기 위해서는 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합될 필요가 있다. 목적 유전자가 세포의 게놈 내로 통합되기 위해서는, 본 발명의 재조합 방법에 있어, 상기 재조합 서열을 포함하는 제1의 DNA 및 제2의 DNA 중 하나는 세포의 게놈 내로 통합될 필요가 있으며, 다른 하나는 목적 유전자를 포함할 필요가 있다. 이때 세포의 게놈 내로의 통합은 세포의 게놈 내로 통합되는 상기 DNA에 게놈 내로의 통합을 가능케 하는 추가의 DNA 서열을 포함함으로써 이루어질 수 있다. 이러한 통합은 세포 내부에 존재하는 재조합 메카니즘에 의해서 또는 인위적인 재조합 메카니즘을 만들어 줌으로써 가능할 수 있는데, 이때 세포 내부의 존재하는 재조합 메카니즘을 이용하기 위해서는 당업계에 이미 잘 알려진 바와 같이 상기 추가의 DNA 서열은 그것이 재조합될 세포 게놈의 DNA에 상동성을 갖고 또한 충분한 길이를 갖는 서열이어야 하며, 인위적인 재조합 메카니즘을 이용할 경우에는 상기 추가의 DNA 서열은 loxP 서열이거나 FRT 서열일 수 있다. 이때 인위적인 재조합 메카니즘을 이용하기 위해서는 그 재조합 서열에 작용하는 재조합 효소 예컨대 loxP 서열에 대해서는 Cre 재조합 효소, FRT 서열에 대해서는 Flp 재조합 효소를 세포 내로 도입시킬 필요가 있다. 이러한 효소의 도입은 이미 전술한 바와 같은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 발현벡터에 관련 유전자를 삽입시키고 형질전환시키는 방법을 들 수 있다. 상기 재조합 서열을 포함하는 제1의 DNA 및 제2의 DNA 중 하나가 세포 내의 게놈 내로 통합되게 되면, 목적 유전자를 포함하는 다른 하나의 DNA가 att 재조합 서열을 매개로 그 목적 유전자를 세포의 게놈 내로 통합시킬 수 있다.

한편, 상기 암호화 서열의 또 다른 구체예로서 상기 목적 유전자를 보유하는 세포만을 용이하게 선별될 수 있도록 하거나 형질전환 세포를 용이하게 선별할 수 있도록 하는 선별 유전자를 들 수 있다. 선별 유전자는 항생물질 유전자나 형광물질의 유전자일 수 있는데, 선별 유전자가 항생물질 유전자일 경우에는 선별 시약으로서 항생물질을 사용하여 형질전환 세포를 용이하게 선별할 수 있고, 선별 유전자가 형광물질의 유전자인 경우에는 FACS 분석 등을 통하여 형질전환 세포를 용이하게 선별할 수 있다. 당업계에는 많은 선별 유전자가 공지되어 있는데, 예컨대 형광물질의 선별 유전자로서는 GFP라는

형광성 단백질의 유전자 등을 들 수 있고, 항생 물질의 선별 유전자로서는 APH(aminoglycoside phosphotransferase)(선별 시약으로 사용되는 항생물질은 케네티신(Geneticin)이다), 본 발명의 하기 실시예에 사용된 암피실린 저항 유전자(선별 시약은 암피실린이다), 테트라사이클린 저항 유전자(선별 시약은 테트라사이클린이다) 등을 들 수 있다.

한편, 앞서 전술한 바와 같이, 본 발명의 재조합 서열을 포함하는 제1의 DNA 및/또는 제2의 DNA는 암호화 서열 이외에 비암호화 서열을 포함할 수 있는데, 비암호화 서열이란 암호화 서열에 작동 가능하게 결합하는 기능성 및/또는 조절성 서열을 말한다. 이러한 기능성 및/또는 조절성 서열로서 예컨대 프로모터, 인핸서, 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 서열, 복제원, 스플라이싱 시그널 서열, 리더 서열 등이 예시될 수 있다.

상기에서 "작동가능하게 연결된"이란 2개의 핵산 서열이 그것들이 의도된 바대로 기능하도록 연결된 것을 의미한다. 예컨대, 프로모터나 인핸서의 경우는 이들이 시스(cis) 방식으로 작용하여 그것들에 연결된 암호화 서열의 전사를 제어하는 경우에 작동가능하게 결합하였다고 볼 수 있다.

한편, 본 발명의 DNA의 서열 특이적 재조합 방법에 있어, 재조합 서열을 포함하는 상기 제1의 DNA와 제2의 DNA는 하나의 DNA 분자 상에 존재하거나 각각 다른 DNA 분자 상에 존재할 수 있다. 본 발명의 재조합 방법에 있어서, 제1의 DNA와 제2의 DNA가 하나의 DNA 상에 존재하는 경우에 분자내 재조합이 일어날 수 있고, 제1의 DNA와 제2의 DNA가 각각 다른 DNA 상에 존재하는 경우에 분자간 재조합이 일어날 수 있는데, 여기서 특히 분자내 재조합은 특정 DNA 절편을 역위시키거나 결실시킴으로써 특정 폴리펩티드의 기능의 연구에 유용할 수 있다.

한편, 본 발명의 DNA의 서열 특이적 재조합 방법에 있어, 인테그라제 MJ1은 상기 제1의 DNA와 제2의 DNA 모두와 함께 하나의 DNA 분자 상에 존재하거나, 제1의 DNA와 제2의 DNA 중 하나와 함께 하나의 DNA 분자 상에 존재할 수 있으며, 제1의 DNA와 제2의 DNA와 상관없이 별개의 DNA 분자 상에 존재할 수도 있다.

인테그라제 MJ1이 서열 특이적 재조합을 수행하기 위해서는 그것이 세포로 도입되어 발현될 필요가 있는데, 도입되는 세포에 적합한 발현벡터의 작제는 당업자의 통상의 능력 범위에서 가능하다. 예컨대, 동물 세포에 도입될 인테그라제 MJ1 발현벡터는 적어도 인테그라제 MJ1 유전자에 작동적으로 연결된 프로모터, 복제원, 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 서열을 기본적으로 포함하여야 할 것이며, 필요에 따라서 리더 서열, 선별 유전자 등을 포함할 것이다.

또 다른 측면에 있어, 본 발명은 세포에서 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법은

(a) 상기에서 상술한 바의 attP 또는 attB를 포함하는 제1의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계;

(b) 상기에서 상술한 바의 attP 또는 attB를 포함하고, 또한 하나 이상의 목적 유전자를 그 유전자가 발현가능하도록 하는 비암호화 서열과 함께 포함하는 제2의 DNA를 세포 내로 도입하는 단계;

(c) 인테그라제 MJ1에 의하여 서열 특이적 재조합을 수행하는 단계; 및

(d) 상기 유전자가 발현되도록 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 제1의 DNA가 attB를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attP를 포함하는 경우이거나, 상기 제1의 DNA가 attP를 포함할 경우에는 제2의 DNA가 attB를 포함하는 경우인 것을 특징으로 한다.

상기 본 발명의 하나 이상의 목적 유전자를 발현시키는 방법에 있어, 상기 제1의 DNA가 세포 내로 삽입되어 세포의 게놈으로 통합될 경우에 하나 이상의 목적 유전자를 포함하는 제2의 DNA가 재조합 서열 및 인테그라제 MJ1을 매개로 세포의 게놈으로 통합될 수 있는데, 이럴 경우에 목적 유전자를 안정적으로 발현시킬 수 있게 된다.

그러므로 상기 본 발명의 방법에 있어서, 상기 제1의 DNA는 세포 게놈으로 통합되는 것이 바람직하다.

상기에서 "세포"의 의미, "DNA의 세포 내로의 도입"의 의미, "목적 유전자"의 의미, "비암호화 서열"의 의미, 그리고 "제1의 DNA를 세포의 게놈으로 통합시키는 방법" 등에 대해서는 앞서 본 발명의 DNA의 서열 특이적 재조합 방법과 관련하여 설명한 바가 그대로 유효하다.

이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 이러한 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<실시예> 짧은 att 서열의 재조합 효율의 측정

<1> 실험에 사용된 박테리아 및 플라스미드

실험에서 사용된 박테리아와 플라스미드는 아래 <표 1>과 같다. 대장균은 (*E. coli*)는 37℃ 쉐이킹 조건에서 배양하였다.

[표 1]
실험에 사용된 박테리아 및 플라스미드

박테리아/플라스미드		특징
Escherichia coli	DH5α	*sup*E44, △lacU169, *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *re*/A1
플라스미드	pGEX4T-1	prokaryotic expression vector, *tac* promoter, replicative ori of pBR322, GST gene, Amp^r, laclq
	pACYC184	Cloning vector, replicative ori of p15A, *tet* gene, *cat* gene
	pFE1	pUC19 carrying 7.7-kbp EcoR I fragment of ΦFC1 DNA
	pUC19	Cloning vector, *lac* promoter, replicative ori of ColE1, Amp^r, *lacZ*,

<2> 플라스미드의 제조

① pGMJ1 제조

서열번호 3의 센스 프라이머와 서열번호 4의 안티 센스프라이머로 약 1500bp(정확히는 1493bp임; 대한민국 공개특허 제 2003-0062800호 참조)의 인테그라제 MJ1유전자를 PCR 방법을 이용하여 합성한 후 합성 생성물(products)의 양쪽 끝에 단 제한효소 염기서열을 이용하여 제한효소인 BamH I과 EcoR I으로 잘랐다. 이것을 똑같이 BamH I과 EcoR I 처리를 한 pGEX4T-1 벡터에 리가제(ligase)를 이용하여 삽입하였다.

② pABLP 제조

재조합(recombination)의 기질(substrate)로 쓰일 pABLP는 각각 attB와 attP를 PCR로 합성한 후에 attB는 EcoR I으로, attP는 Drd I으로 처리하여 pACYC184 벡터에 삽입하였다. 상기 attB는 서열번호 5의 센스 프라이머와 서열번호 6의 안티센스 프라이머로, 상기 attP는 서열번호 7의 센스 프라이머와 서열번호 8의 안티센스 프라이머로 PCR 합성된 것이며, 그 각각의 서열번호는 서열번호 2 및 서열번호 1에 개시되어 있다. 한편, LacZ 유전자는 pUC19 벡터로부터 Drd I으로 잘라낸 후에 클레노우(Klenow)처리하여 블런트(blunt)화 시켰다. 이것을 Sca I 처리한 pACYC184 벡터에 리가제(ligase)로 연결하여 삽입시켰다.

<3> MJ1의 발현 확인을 위한 SDS-PAGE

E, coli DH5α에서 MJ1의 발현을 확인하기 위해서 클로닝한 pGMJ1을 IPTG로 유도한 후 SDS-PAGE를 수행하였다. 먼저 pGMJ1을 *E, coli* DH5α에 형질전환(Transformation) 시켰다. pGMJ1을 가지고 있는 *E, coli* DH5α를 LB 배지에서 37℃로 하룻밤 배양한 후 5㎖ LB 배지(broth)로 1% 접종하였다. 세포를 OD값이 0.4 정도가 될 때까지 키운 후 0.1 mM 농도의 IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다. IPTG로 발현 유도한 세포를 볼링(boiling) 방법으로 깬 후에 10% SDS-폴리아크릴아미드 젤에 걸어 SDS-PAGE를 수행하였다. 벡터의 GST 단백질과 인테그라제 MJ1 융합 산물, 약 80 kDa의 밴드를 젤 상에서 확인하였다(도 1 참조).

<4> 형질전환

MJ1 인테그라제에 의한 재조합을 수행하기 위해서 인테그라제 발현 벡터 pGMJ1과 기질 벡터 pABLP를 DH5α에 함께 공동 형질전환(cotransformationt)시켰다. $CaCl_2$ 법으로 만든 컴피턴트 셀 (competent cell)에 pGMJ1과 pABLP를 함께 섞

어준 후 42℃에서 히트 쇼크를 주었다. LB 배지(broth)에서 37℃ 1시간 배양한 후 트랜스포메이션 된 콜로니(colony)들만 선별하기 위해서 암피실린(ampcillin)과 테트라싸이클린(tetracycline) 항생제와 색깔 선별을 위한 X-GAL이 들어있는 LB 플레이트에 스프레딩(spreading)하였다.

인테그라제 발현 벡터 pGMJ1과 기질 벡터 pABLP로 형질전환된 경우에는 암피실린(ampcillin)과 테트라싸이클린(tetracycline) 항생제에 대해서 저항성을 가지며, 인테그라제 MJ1에 의하여 재조합이 일어나게 되면 LacZ 유전자가 결실되어 불활성화됨으로써 X-GAL을 분해하지 못하여 재조합이 일어난 콜로니는 흰색을 띠게 된다(도 2 참조).

<5> 재조합(recombination) 확인을 위한 PCR 분석

실제로 재조합이 일어났는 지를 확인하기 위해서 콜로니 PCR을 수행하여 재조합의 산물인 attL 150bp을 확인하였다. 흰색 콜로니들만 찍어서 콜로니 PCR을 수행하였다. PCR은 서열번호 9의 센스 프라이머와 서열번호 10의 안티센스 프라이머를 사용하여 30 cycle로 95℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 수행되었으며 PCR product는 2% 아가로스 젤(agarose gel)과 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색해서 보았다.

결과는 도 3에서 확인할 수 있다.

<6> 재조합 확인을 위한 서열 분석

상기에서 attL을 PCR로 확인한 후 실제 재조합이 일어났는지를 확인하기 위해서 서열분석(Perkin-Elmer 사 Kit 이용)을 수행하였다.

결과는 도 4에서 확인할 수 있는데, 서열분석을 통하여 확인된 서열은 예상한 바의 서열과 일치하였다.

<7> 재조합 효율 측정

MJ1 인테그라제에 의해 일어난 재조합은 콜로니의 색깔에 의해서 확인(detection)할 수 있다. X-Gal이 함유된 LB 플레이트에 도말 평판 배양하여 재조합이 일어나서 흰색을 띄는 콜로니의 개수를 카운팅하였다.

도 5에서 그 결과를 확인할 수 있는데, 효율이 99.16%로 나타났다.

발명의 효과

전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 인테그라제 MJ1에 의한 재조합을 매개할 수 있는 재조합 효율이 높은 짧은 att 서열이 제공된다.

또한 본 발명에 따르면, 상기 짧은 att 서열을 이용하여 DNA의 서열 특이적 재조합 방법과 목적 유전자의 발현 방법이 제공된다.

본 발명의 상기 방법들은 유전자 치료나 인간이 원하는 특정 생성물을 안정적으로 얻을 수 있는 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 *E, coli* DH5α에서 인테그라제 MJ1의 발현 여부를 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다. 인테그라제 MJ1은 발현벡터의 GST 단백질과 융합되어 발현되었기 때문에 젤상에서 약 80 kDa의 밴드로 확인된다.

도 2는 인테그라제 발현 벡터 pGMJ1과 기질 벡터 pABLP로 *E, coli* DH5α를 형질전환시킨 경우에는 형질전환 콜로니의 선별 기작을 나타낸 것이다.

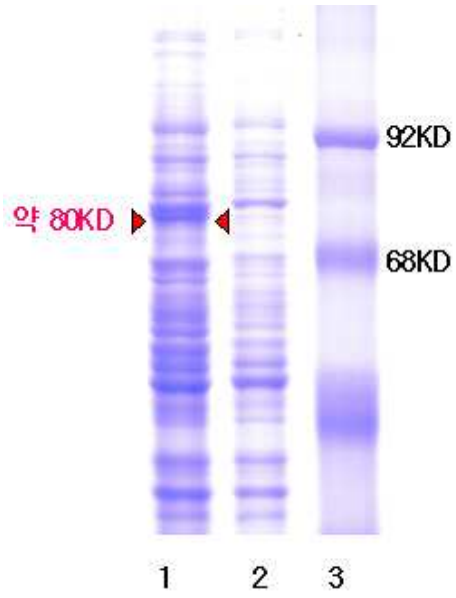
도 3은 재조합(recombination)이 일어난 형질전환 콜로니의 attL 서열(150bp)을 PCR로 증폭시켜 아가로스 젤상에서 에티듐 브로마이드로 염색시켜 확인할 결과이다.

도 4는 attL 서열을 서열분석한 결과이다.

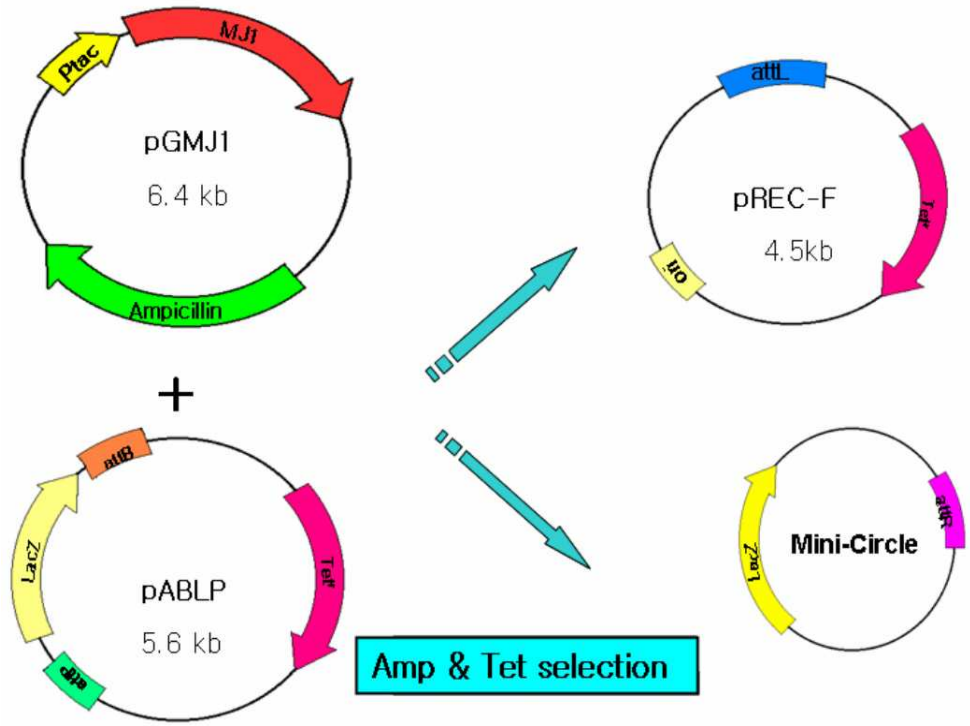
도 5는 인테그라제 MJ1의 재조합 효율을 나타낸 결과이다.

도면

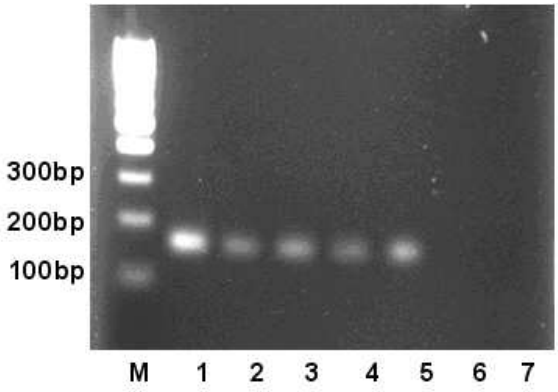
도면1



도면2



도면3



도면4

attB core attP

#1 ATTTTCAAAGGTTCACTGAATCAAAGTGTAAATAACACTATGTACCTAAAAT

#2 ATTTTCAAAGGTTCACTGAATCAAAGTGTAAATAACACTATGTACCTAAAAT

#3 ATTTTCAAAGGTTCACTGAATCAAAGTGTAAATAACACTATGTACCTAAAAT

도면5

Cells	Plasmid	Colonies			Intramolecular Integration Frequency, %
		White	Blue	Total	
E. coli (DH5α)	pGMJ1	1,305	0	1,305	NA
	pABLP	0	3,792	3,792	< 0.01
	pGMJ1+pABLP	1,664	14	1,678	99.16

서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
<120> Site-Specific DNA Recombination Method
<160> 12
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 221
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> attP sequence
<400> 1
taaaatccat gtatcacaat aaatgtgatt atttgtttta gtatatggat tttataatgt 60
aaatatgttt ggatatctgt tatgcttgta cgtaagccat attaacataa tgatcctccg 120
gctataatac ttttgattaa tacatcctca tcaacttttc taatcttaca attcatacat 180
gggtttttac gatcaagcta agagtaatca ttgtgtcctg c 221

<210> 2
<211> 200
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> attB sequence
<400> 2
tccaagagat gaaggggctg caacaagaac atttaatttg tatttacttg aataccaaga 60
atgacattat ccaacagaaa acgattttca aaggatcact gaatcaaagt attgctcatc 120
cacgcgaaat ttttcgggaa gcggttaaat attcttctgc tcgcatacta ttagctcata 180
atcatccatc tggcaatccg 200
<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sense primer
<400> 3
cgggatccat gaaacgtgca gcattg 26
<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Anti-sense primer
<400> 4
cggaattcac cgaatgcatg ttcgta 26
<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sense primer
<400> 5
atctagacga ccgggtcatt ttaggtacat agtgt 35
<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Anti-sense primer
<400> 6
atctagaccc ggtcgtcgtc ctgtgttact aatga 35
<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sense primer
<400> 7
cagaattctc caagagatga aggggct 27
<210> 8

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Anti-sense primer
<400> 8
cagaattccg gattgccaga tggatga 27
<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sense primer
<400> 9
cagaattctc caagagatga aggggct 27
<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Anti-sense primer
<400> 10
atctagacga ccgggtcatt ttaggtacat agtgt 35
<210> 11
<211> 739
<212> DNA
<213> Enterococcus temperate bacteriophage phi FC1
<400> 11
cgcaattgac ggttatatcg tttgaatctt ccatggtttt cactcagtaa ttaattattc 60
gaactttgca atttttgaaa attaaccctt tgactttgat gtcttttatt ttaggaatag 120
tagtttctca aacaacttgc atatcttgat aaactactac tccattaata atttatattt 180
aaaatccatg tatcacaata aatgtgatta tttgttttag tatatggatt ttataatgta 240
aatatgtttg gatatctgtt atgcttgtac gtaagccata ttaacataat gatcctccgg 300
ctataatact tttgattaat acatcctcat caacttttct aatcttacaa ttcatacatg 360
ggtttttacg atcaagctaa gagtaatcat tgtgtcctgc tttgatattt gacatagcag 420
aggtttatgc ttaatcgttt atacaatgat tacgatgggc tttttagact tgatcgacag 480
ataccagtaa acttattttc tttagttgag cattaactta tttacgaaca ttccttttga 540
aactaatcac gtatttttct ataaatttaa accagtataa tgacaagaat ggatatctta 600
ccatattaat ttggttataa ttaatatata aaatttcctc ctggtctaaa cagttagtta 660
tcaaatgttg tttttctttt cagagataat agtctatatt gttttgaact tcctctgata 720
cgagctcttg ttctagaag 739
<210> 12
<211> 290
<212> DNA
<213> Enterococcus faecalis
<400> 12
cggccattga attagggtgt cgaatttatc aaagtagtca aatcaaattt ggcaaagtta 60
cgtccagtca acaagtcgct caacgattac tccaagagat gaaggggctg caacaagaac 120
atttaatttg tatttacttg aataccaaga atgacattat ccaacagaaa acgattttca 180
aaggatcact gaatcaaagt attgctcatc cacgcgaaat ttttcgggaa gcggttaaat 240
attcttctgc tcgcatacta ttagctcata atcatccatc tggcaatccg 290