



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097298
(43) 공개일자 2011년08월31일

(51) Int. Cl.

C12N 15/69 (2006.01) *C12N 15/75* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0017071

(22) 출원일자 2010년02월25일

심사청구일자 2010년09월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김영완

서울특별시 송파구 삼전동 52-26번지 301호

(74) 대리인

구현서

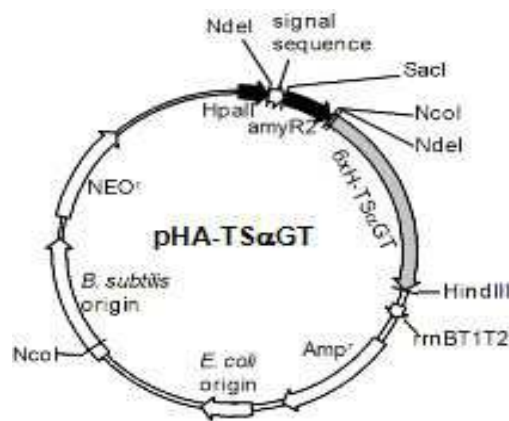
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 이중프로모터를 포함하는 발현 시스템 및 그 시스템을 이용한 유전자 과다 발현 방법

(57) 요약

본 발명은 이중프로모터를 포함하는 발현 시스템 및 그 시스템을 이용한 유전자 과다 발현 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 이중 프로모터 및 이를 포함하는 발현 시스템, 상기 이중 프로모터 또는 발현 시스템을 포함하는 벡터, 상기 벡터 및/또는 발현시스템을 포함하는 유전적으로 변형된 미생물 및 상기 유전적으로 변형된 미생물의 배양에 의한 이중단백질 또는 펩타이드의 제조 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K000743 / 200901010300090010300

부처명 한국과학재단 / 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업 / 농업과학기술개발공동연구사업

연구과제명 생체모방과 분자진화를 통한 맞춤형 당쇄 가공 생물 촉매 개발 / [2차년도]쌀전분 신소재 생산을 위한 식품용 효소의 개발

기여율

주관기관 가천의과대학 / 서울대학교 산학협력단

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일 / 2009년 01월 01일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 및 서열번호 3(BLMA 프로모터)에 기재된 유전자 서열을 가지는 프로모터 중 두 개의 프로모터를 5'에서 3' 방향으로 연속적으로 배열한 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프로모터는 바실러스에서 작동하는 재조합 핵산 구축물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 프로모터는 대장균에서 작동하는 재조합 핵산 구축물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 이중 프로모터는 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 또는 서열번호 3(BLMA 프로모터) 프로모터 성분을 개별적으로 사용하였을 때보다 원하는 폴리펩타이드를 더 다량으로 발현시키는 재조합 핵산 구축물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 이중 핵산이 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는

- a) 탄수화물의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질;
- b) 지질 및 지방산의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질; 및
- c) 단백질 및 펩타이드의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩타이드인 재조합 핵산 구축물.

청구항 7

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈, 또는 브랜칭 효소, 말토제닉 아밀레이즈 (EC 3.2.1.133), 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(EC 2.4.1.19), α -아밀레이즈 (EC 3.2.1.1), 풀룰라나아제 (EC 3.2.1.41), 시알산분해효소(sialidase; EC 3.2.1.18), 엔도-1,4- β -자일라네이즈 (EC 3.2.1.8), 엔도- β -1,4-글루카네이즈 (EC 3.2.1.4), 아밀로수크레이즈 (EC 2.4.1.4), 엔도글루카네이즈 (EC 3.2.1.4); 자일로글루칸 하이드로레이즈 (EC 3.2.1.151), 글루칸 엔도-1,3- β -글루코시데이즈 (EC 3.2.1.39), 리체니네이즈 (licheninase; EC 3.2.1.73), 폴리갈락투로네이즈 (EC 3.2.1.16), β -아밀레이즈 (EC 3.2.1.2), 및 아라비네이즈 (EC 3.2.1.99)로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 재조합 핵산 구축물.

청구항 8

원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 및 서열번호 3(BLMA 프로모터)에 기재된 유전자 서열을 가지는 프로모터 중 두 개의 프로모터를 5'에서 3' 방향으로 연속적으로 배열한 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물 및 선택적 표지 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 선택적 표지 유전자가 앰피실린 저항성 유전자 및 가나마이신 저항성 유전자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자인 발현 벡터.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 벡터는 바실러스에서 작용하는 복제 서열의 기원을 추가로 포함하는 발현 벡터.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 벡터는 대장균(E.coli)에서 작용하는 복제 서열의 기원을 추가로 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 도 1b 또는 1c의 개열지도를 가지는 발현 벡터.

청구항 13

제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 4b의 개열지도를 가지는 발현 벡터.

청구항 14

원하는 폴리펩타이드가 발현될 수 있는 조건하에, 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 및 서열번호 3(BLMA 프로모터)에 기재된 유전자 서열을 가지는 프로모터 중 두 개의 프로모터를 5 '에서 3' 방향으로 연속적으로 배열한 프로모터를 포함하는 재조합 발현 카세트를 포함하는 박테리아 세포를 적당한 배지에서 배양함을 포함하는 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 박테리아 세포가 바실러스인 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 박테리아 세포를 가나마이신을 포함하는 배지에서 배양하는 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는

- a) 탄수화물의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질;
- b) 지질 및 지방산의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질; 및
- c) 단백질 및 펩타이드의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩타이드인 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 18

제 14항 또는 제 17항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈, 또는 브랜칭 효소, 말토제닉 아밀레이즈 (EC 3.2.1.133), 사이클로말토덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(EC 2.4.1.19), α-아밀레이즈(EC 3.2.1.1), 풀룰라나아제 (EC 3.2.1.41), 시알산분해효소(sialidase;EC 3.2.1.18), 엔도-1,4-β-자일라레이즈(EC 3.2.1.8), 엔도-β-1,4-글루카네이즈(EC 3.2.1.4), 아밀로수크레이즈 (EC 2.4.1.4), 엔도글루카네이즈(EC 3.2.1.4); 자일로글루칸 하이드로레이즈(EC 3.2.1.151), 글루칸 엔도-1,3-β-글루코시데이즈(EC 3.2.1.39), 리체니네이즈(licheninase;EC 3.2.1.73), 폴리갈락투로네이즈(EC 3.2.1.16), β-아밀레이즈(EC 3.2.1.2), 및 아라비네이즈(EC 3.2.1.99)로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 19

제 14항에 있어서, 상기 방법은 배양 후 원하는 폴리펩타이드 생성물을 배양액 또는 균체 내에서 생산하는 단계를 더욱 포함하는 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 이중프로모터를 포함하는 발현 시스템 및 그 시스템을 이용한 유전자 과다 발현 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 이중 프로모터 및 이를 포함하는 발현 시스템, 상기 이중 프로모터 또는 발현 시스템을 포함하는 벡터, 상기 벡터 및/또는 발현시스템을 포함하는 유전적으로 변형된 미생물 및 상기 유전적으로 변형된 미생물의 배양에 의한 이중단백질 또는 펩타이드의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드 및 단백질의 생산은 인간 및 동물용 약학 제제, 효소 및 기타 특정 화학물질의 제조를 위해 경제적으로 중요하다. 발현 숙주로서 박테리아 세포, 진균류 세포, 포유류 세포 또는 곤충류 세포를 사용하는 재조합 DNA 기법은 다량의 폴리펩타이드 생산을 위해 특히 유용한 수단이다.

[0003] 일반적으로, 원하는 단백질의 재조합 생산은 단백질을 코딩하는 유전자에 조작될 수 있게 연결된 경우 유전자의 발현을 조절하는 신호를 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질감염시킴을 포함한다. 세포는 재조합 단백질의 발현에 적합한 조건하에 성장된다. 발현 조절 신호는 전형적으로 프로모터의 다운스트림에 위치한 유전자가 RNA로 전사되는 속도에 영향을 주고, 전사 출발 부위를 결정하는 프로모터를 포함한다. 발현 조절 신호는 원하는 단백질을 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포내에서 기능적이도록 선택된다. 예컨대, 박테리아인 이. 콜라이(E. coli)가 통상 높은 수율로 재조합 단백질을 생산하는데 이용된다. 다수의 문헌에 재조합적으로 단백질을 생산하는 이. 콜라이 및 그 외의 박테리아를 사용하는 방법이 개시되어 있다. (예컨대, 미국 특허 제 4,565,785호, 미국 특허 제 4,673,641호, 미국 특허 제 4,738,921호, 미국 특허 제 4,795,706호 및 미국 특허 제 4,710,473호 참조).

[0004] 상업적으로 사용하도록 의도된 재조합적으로 생산된 단백질의 경우, 숙주 세포로부터 원하는 단백질을 높은 수준으로 발현시키는 것이 특히 요망된다. 세포당 생산되는 원하는 단백질의 양이 증가되면 정해진 양의 생성물을 수득하기 위해 성장되어야만 하는 세포의 부피가 감소되므로 생산 비용이 줄어들 수 있고, 또한 원하는 생성물이 숙주 세포에 의해 생산된 총 단백질중 보다 많은 부분을 차지하므로 용이하게 정제할 수 있다. 따라서, 원하는 단백질을 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 발현 조절 신호가 필요하다.

[0005] 이중 단백질의 생산은 바실러스속 세균을 비롯하여 피키아 패스토리스, 아스퍼질러스속 곰팡이에 의한 생산이 다수 보고되어 있다. 이중 단백질의 효율적으로 생산하기 위해서 재조합 DNA 기술을 이용하여 이중단백질 유전자의 발현을 개선하는 방식이 이용되고 있다.

[0006] 유전자의 발현은 단백질 코딩 부위의 5' 상류위치에 존재하는 염기배열인 프로모터의 염기서열과 구성양태에 의해서 결정된다.

[0007] 본 발명의 실시 양태에서 생산되는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈, 말토제닉 아밀레이즈, 브랜칭 효소는 전분에 작용하여 전분의 구조 변형 및 배당체의 당쇄 변형 등에 사용되는 등 상업상 이용성이 높은 효소들이다 (Li et al. 2005. J. Agric. Food Chem. 53:6516-6524; Park et al. 2000. Biochim. Biophys. Acta. 1478:165-185; Choi et al. 2009. Regul Toxicol Pharmacol. 55:281-290).

[0008] 미생물 유래의 상기 효소들을 발현하는데 있어 대장균 또는 바실러스 서브틸리스를 숙주세균으로 이용하여 구조적 프로모터 및 발현유도 프로모터를 이용하여 생산하는 예는 보고된 바 있다 (Seo et al. 2007. J. Food Sci. 72:C331-C336; Lee et al. 2008. J. Agric. Food Chem. 56:126-131).

[0009] 바실러스 서브틸리스에서 외래 유전자를 과다발현하기 위해서 지금까지 다양한 프로모터 탐색이 이루어졌으며, 이를 이용한 식품용, 제약용 및 기타 산업용 효소의 생산이 이루어지고 있다. 다양한 바실러스 속균에서 알파-아밀레이즈, 프로티에이즈 (protease), 및 라이페이즈 (lipase) 유전자의 발현 프로모터를 이용한 많은 벡터 시스템이 개발되어 있지만, 과다 발현을 위한 신규 프로모터의 개발은 지속적으로 이루어지고 있다 (Schumann 2007. Adv. Appl. Microbiol. 153:813-821)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 제공

하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중 프로모터 발현 시스템을 이용하여 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 및 서열번호 3(BLMA 프로모터)에 기재된 유전자 서열을 가지는 프로모터 중 두 개의 프로모터를 5'에서 3' 방향으로 연속적으로 배열한 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 HpaII 프로모터의 경우 바실러스 벡터인 pUB110에 존재하는 recombinase protein의 발현을 조절하는 상시발현 프로모터이다.

[0015] 선택적으로, 목적하는 프로모터 분절의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 문헌에서 기술되어 있는 공지된 기법에 의해 합성할 수 있다(문헌[Carruthers et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418(1982)] 및 문헌[Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 105: 661(1983)] 참고). 그 다음, 상보적인 가닥을 합성하고 적당한 조건하에서 가닥을 함께 어닐링하거나 적당한 프라이머 서열과 함께 DNA 폴리머레이즈를 사용하여 상보적인 가닥을 첨가함으로써 이중 가닥 DNA 분절을 수득할 수 있다.

[0016] 본 발명의 이중 프로모터를 포함하는 프로모터는 야생형 박테리아 세포내의 상응하는 프로모터와 동일하거나, 또는 요구되는 바와 같이, 예를 들어 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환과 같이 개질될 수 있다. 이러한 개질은 프로모터 작용을 위해서 필요한 프로모터 서열의 부분을 유지시킬 것이다. 예를 들어 그람-양성 및 그람-음성 박테리아의 프로모터를 위한 -10 및 -35 컨센서스 서열(문헌

[0017] [Graves et al., J. Biol. Chem. 261:11409-11415(1986); Singer and Berg, Genes & Genoms, University Science Books, Mill Valley, CA, 1991, pp. 140-143] 참고)는 발현하는데 요구되는 정도는 유지될 것이다. 이. 콜라이네 프로모터의 적당한 작용을 위해서 중요한 뉴클레오타이드는 예를 들어 문헌[Singer and Berg, Genes & Genomers, University Science Books, Mill Valley, CA, 1991, pp. 143]에 개시되어 있다. 프로모터 작용에 필수적이지는 않는 프로모터 서열의 부분은 목적하는 바와 같이, 예를 들어 프로모터 부분 내부 또는 인접 부위에 제한 부위를 삽입시킴으로써 클로닝이 용이하도록 개질할 수 있다.

[0018] 본 발명의 명세서에 기재된 프로모터는 서열 번호 1, 2 또는 3에 따른 핵산서열을 갖는 DNA 절편 또는 그 일부에 대하여 서열 동일성, 특히 약 70%, 바람직하게는 약 80%, 특히 약 90%, 특히 약 95%, 가장 바람직하게는 약 98% 이상의 서열동일성을 갖는 프로모터를 지칭한다. 이러한 프로모터는 천연 산출 또는 합성 돌연변이, 특히 특정위치 변이 또는 무작위 변이를 통해 얻어진 프로모터를 포함한다.

[0019] 두개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는, 최대로 상응하도록 배열하였을 때 두개의 서열내의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 서열이 동일한 경우 "동일하다"고 한다. 비교를 위한 최적의 서열 배열은 스미스(Smith) 및 워터맨(Waterman)의 문헌[Adv. Appl. Math 2: 482(1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 니들맨(Needleman) 및 운쉬(Wunsch)의 문헌[J. Mol. Biol. 48:443(1970)]의 상동성 배열 알고리즘, 피슨(pearson) 및 립프만(Lipman)의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 85:2444(1988)]의 유사성 방법에 대한 연구, 이러한 알고리즘의 컴퓨터화 임플러멘테이션(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지의 유전자 컴퓨터 그룹의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA) 또는 조사에 의해서 수행될 수도 있다.

[0020] 핵산 서열에서 적용되고 본 명세서에서 사용되는 "동일성" 또는 "실질적인 서열의 동질성"이라는 용어는, 폴리뉴클레오타이드가 20개 이상의 뉴클레오타이드 위치의 비교 윈도우, 종종 25 내지 50개의 뉴클레오타이드의 비교 윈도우에 걸쳐서, 85% 이상, 바람직하게는 90 내지 95%, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열이 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 서열 동질성의 비율(%)이 참고 서열 비교 윈도우에 걸쳐서 총 20% 이하가 삭제 또는 첨가될 수도 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 기준 서열과 비교함으로써 계산되는 폴리뉴클레오타이드의 특성을 의미한다.

[0021] 뉴클레오타이드 서열이 실질적으로 동일하다는 다른 지표는 두개의 분자가 까다로운 조건하에서 서로 하이브리

드되는 경우이다. 까다로운 조건은 서열에 좌우되지만, 상이한 환경에서는 상이할 것이다. 일반적으로, 까다로운 조건이란, 정해진 이온 세기 및 pH에서 약 5℃ 내지 약 20℃, 일반적으로 약 10℃ 내지 약 15℃, 특정 서열에 대하여 열적 용융점(T_m) 미만에서 선택된다. T_m은 목적 서열의 50%가 완전히 일치되는 프로브에 하이브리드되는 온도(정해진 이온 세기 및 pH 7에서)이다. 전형적으로, 까다로운 조건은 염 농도가 pH에서 약 0.02 몰이고 온도가 약 60℃ 이상인 조건이다. 예를 들어, 표준 써던 하이브리드 방법에서, 까다로운 조건은 42℃에서 6X SSC로 초기 세척 및 약 55℃ 이상, 전형적으로 약 60℃ 및 종종 약 65℃에서 0.2X SSC로 1회 이상의 추가적인 세척을 포함한다.

- [0022] 또한, 뉴클레오타이드 서열은, 이들이 코딩하는 폴리펩타이드가 실질적으로 동일한 경우 본 발명의 목적을 위해 실질적으로 동일하다. 따라서, 한개의 핵산 서열이 실질적으로 동일한 폴리펩타이드를 제 2 핵산 서열로서 코딩하는 경우, 유전자 코드에 의해 허용되는 묵음(silence) 치환에 때문에 까다로운 조건하에서 하이브리드되지 않는 경우에도, 두개의 핵산 서열은 실질적으로 동일하다(코돈 디제너러시(degeneracy) 및 유전자 코드의 설명에 대해서는 다넬(Darnell) 등의 문헌[Molecular Cell Biology, Second Edition Scientific American Books W. H. Freeman and Company New York 참고]).
- [0023] 본 발명의 명세서에 기재된 이중 프로모터는 바실러스에서 작동하는 프로모터 두 개의 연결, 바람직하게는 1 내지 1000개의 핵산서열, 바람직하게는 1 내지 500개의 핵산서열, 가장 바람직하게는 직접 연결을 통해 제작될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 이중 프로모터에 의해 발현되는 이중단백질을 숙주 세포의 분비 경로속으로 유도하기 위해, 분비 신호 서열(또한 리더 서열, 프리프로 서열 또는 프리 서열로서 알려짐)이 재조합 벡터 내에 제공될 수 있다. 분비 신호 서열은 올바른 관독 플레임 내의 효소를 코딩하는 DNA서열로 연결된다. 분비 신호 서열은 보통 효소를 코딩하는 DNA 서열에서 5'에 위치된다. 분비 신호 서열은 정상적으로 효소와 관련된 것 일 수 있고 또는 다른 분비 단백질을 코딩하는 유전자로부터 올 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 프로모터는 바실러스 또는 대장균에서 작동하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 이중 프로모터는 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 또는 서열번호 3(BLMA 프로모터) 프로모터 성분을 개별적으로 사용하였을 때보다 원하는 폴리펩타이드를 더 다량으로 발현시키는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 이중 핵산이 폴리펩타이드를 코딩하고, 상기 폴리펩타이드는 a) 탄수화물의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질; b) 지질 및 지방산의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질; 및 c) 단백질 및 펩타이드의 생합성 또는 대사에 관여하는 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈, 또는 브랜칭 효소, 말토제닉 아밀레이즈 (EC 3.2.1.133), cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19), α-amylase (EC 3.2.1.1), pullulanase (EC 3.2.1.41), sialidase (EC 3.2.1.18), endo-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8), endo-β-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), amylosucrase (EC 2.4.1.4), endoglucanase (EC 3.2.1.4); xyloglucan hydrolase (EC 3.2.1.151), glucan endo-1,3-β-glucosidase (EC 3.2.1.39), licheninase (EC 3.2.1.73), polygalacturonase (EC 3.2.1.16), β-amylase (EC 3.2.1.2), 또는 arabinase (EC 3.2.1.99)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다. 상기 본 발명에 기재된 효소는 당업계에서 공지되어 있다.
- [0028] 또한 본 발명은 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 및 서열번호 3(BLMA 프로모터)에 기재된 유전자 서열을 가지는 프로모터 중 두 개의 프로모터를 5'에서 3' 방향으로 연속적으로 배열한 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물 및 선택적 표지 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 선택적 표지 유전자가 앰피실린 저항성 유전자 및 가나마이신 저항성 유전자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 벡터는 바실러스에서 작용하는 복제 서열의 기원을 추가로 포함하고,
- [0031] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 벡터는 대장균(E.coli)에서 작용하는 복제 서열의 기원을 추가로 포함하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0032] 본 발명의 바람직한 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 도 1b 또는 도 1c의 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0033] 본 발명의 벡터는 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 독립적으로 복제되도록 할 수 있는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 일반적으로, 이 서열은 숙주 크로모솜 DNA에 상관없이 벡터가 복제되도록 할 수 있으며 복제의 기원 또는 자동적으로 복제되는 서열을 포함한다. 이러한 서열은 각종 박테리아에 대해 널리 공지되어 있다. 예컨대, 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기원은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하다.
- [0034] 또한, 원하는 구축물을 함유한 박테리아 세포의 선별을 가능케하는 선택적 표지 유전자를 포함한다. 이러한 유전자는 선택적 배양 배지에서 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 생장에 필요한 단백질을 코딩한다. 선택 유전자를 함유한 벡터에 의해 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존하지 않는다. 전형적인 선택 유전자는 암피실린, 네오마이신, 카나마이신, 클로르ampenicol 또는 테트라사이클린과 같은 항생물질 또는 기타 독소에 대한 내성을 제공하는 단백질을 코딩한다. 또는, 선택성 표지는 보조적 영양결핍을 보충하거나 또는 복합 배지로부터 입수할 수 없는 중요한 영양물을 공급하는 단백질, 예컨대 바실러스의 경우 D-알라닌 라세메이즈를 코딩할 수 있다. 다수의 선택성 표지가 당해 분야의 숙련자들에게 공지되어 있으며, 예컨대 전술한 삼브룩 등의 문헌에 기재되어 있다. 원하는 폴리펩타이드를 발현시키는 이중 프로모터에 사용되기 위한 바람직한 선택적 표지는 카나마이신 내성 표지이다(바이어라(Viera)와 메싱(Messing)의 문헌[Gene 19:259(1982)]). 암피실린은 배양 배지에서 β -락타메이즈에 의해 신속하게 분해되어서 선택 압력을 제거하고 벡터를 함유하지 않는 세포와 함께 배양물이 과성장되도록 하므로, 카나마이신을 선택하는 것이 암피실린을 선택하는 것보다 유리하다.
- [0035] 전술한 성분 중 하나 이상을 사용한 적합한 벡터의 구축은 전술한 문헌에 기술된 바와 같은 표준 연결법을 사용한다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편을 절단하고 재단하고 원하는 형태로 재연결하여서 필요한 플라스미드를 발생시킨다. 구축된 플라스미드 중 정확한 서열을 확인하기 위하여 제한 엔도뉴클레아제 분해 및/또는 공지된 방법에 따른 서열화와 같은 표준 기법에 의해 플라스미드를 분석한다.
- [0036] 본 발명의 벡터를 갖는 다수의 박테리아 숙주 세포를 사용할 수 있다. 유용한 박테리아의 예는 바실러스(Bacillus), 에스케리치아(Escherichia), 엔테로박터(Enterobacter), 아조토박터(Azotobacter), 에르위니아(Erwinia), 슈도모나스(Pseudomonas), 클렙실리아(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 세라티아(Serratia), 시겔라(Shigella), 리조비아(Rhizobia), 비트레오실라(Vitreoscilla) 및 파라코커스(Paracoccus)를 포함하나 이에 한정되지 아니하며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 바실러스를 사용하였다.
- [0037] 사용된 숙주 세포에 따라, 이러한 세포에 적절한 표준기법을 이용하여 형질전환이 실시된다. 적합한 기법은 염화칼슘을 비롯한 칼슘 처리, 폴리에틸렌 글리콜 또는 전기천공을 포함한다.
- [0038] 본 발명은 또한 원하는 폴리펩타이드의 고도의 발현을 얻기 위하여 이중 프로모터를 사용하는 방법을 제공한다. 숙주 세포는 이중 프로모터 발현 카세트를 함유하는 벡터에 의해 형질전환되며 원하는 폴리펩타이드의 발현에 적절한 조건하의 배양 배지에서 배양된다. 세포는 교반 플라스크 또는 그 밖의 용기에서 성장할 수 있으나, 폴리펩타이드를 대규모로 제조하는 경우에는 발효기에서의 성장이 바람직하다.
- [0039] 단백질의 순도 또는 균질성은 당 분야에 공지되어 있는 다수의 방법, 예를 들어 단백질 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동시키고, 착색시킴으로써 가시화함으로써 밝힐 수 있다. 특정 목적을 위해서는 높은 해상도가 필요하고 정제를 위해서는 HPLC 또는 유사한 수단이 사용된다.
- [0040] 본 발명의 수행은 재조합 핵산의 구축 및 형질감염된 박테리아 세포내의 유전자 발현을 포함한다. 이러한 목적을 달성시킬 수 있는 분자의 클로닝 기법은 당 분야에 공지되어 있다. 다수의 클로닝, 및 재조합 핵산, 예를 들어 발현 벡터의 구축을 위해 적당한 시험관내 증폭 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 다수의 클로닝 시험을 통해 당 분야의 직접적인 숙련자들을 지도하기에 충분한 이러한 기법 및 기구의 예는 버거(Berger) 및 김멜(Kimmel)의 문헌[Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA(버거)] 및 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement)(Ausubel)]에서 발견할 수 있다.
- [0041] 본 발명은 박테리아 세포, 예를 들어 바실러스에서 고도로 발현 되는 재조합 유전자를 위해 유용한 발현 카세트를 제공한다. 또한, 발현 카세트를 포함하는 벡터 뿐만 아니라 목적하는 이중 단백질의 발현을 수득할 수 있는 발현 카세트를 사용하기 위한 발효 프로토콜을 제공한다. 본 발명의 발현 카세트는 목적하는 유전자 생성물, 전

형적으로 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 프로모터를 함유한다.

- [0042] 클로닝된 유전자의 다량의 발현을 수득하기 위해서, 발현 카세트는 그밖의 서열, 예를 들어 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위 및 전사/번역 종결 서열을 포함한다. 구축물을 포함하는 세포의 선택성을 위해서, 1종 이상의 선택적 표지 유전자(예: 항생제-내성 유전자)가 발현 벡터에 편의상 포함된다. 벡터는, 벡터를 원핵세포 숙주, 예를 들어 폭넓은 숙주 범위의 원핵세포의 복제 기원에 클로닝시킬 수 있는 그밖의 서열을 포함할 수도 있다. 당 분야의 숙련자라면 이러한 벡터 성분의 각각이 실질적으로 이들의 작용에 영향을 미치지 않고 개질될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0043] 또한 본 발명은 원하는 폴리펩타이드가 발현될 수 있는 조건하에, 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 서열번호 1(HpaII 프로모터), 서열번호 2(amyR2 프로모터) 및 서열번호 3(BLMA 프로모터)에 기재된 유전자 서열을 가지는 프로모터 중 두 개의 프로모터를 5'에서 3' 방향으로 연속적으로 배열한 프로모터를 포함하는 재조합 발현 카세트를 포함하는 박테리아 세포를 적당한 배지에서 배양함을 포함하는 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 박테리아 세포를 가나마이신을 포함하는 배지에서 배양하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법은 배양 후 원하는 폴리펩타이드 생성물을 배양액 또는 균체 내에서 생산하는 단계를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0046] 본 발명의 이중 프로모터는 매우 높은 수율의 원하는 폴리펩타이드 또는 단백질 발현에 유용하다. 폴리펩타이드는 박테리아 숙주 세포와 동종일 수 있거나, 바람직하게는 숙주 세포와 이종이다. 예컨대, 이중 프로모터를 사용하여 매우 높은 정도로 효모, 진균, 포유동물 및 식물의 단백질을 발현시킬 수 있다. 청구된 이중 프로모터를 사용하여 생성된 다수의 폴리펩타이드는 효소적 활성을 갖는다. 활성에 대해 글리코실화 또는 그 밖의 진핵세포-특이적 가공을 필요로 하는 일부 폴리펩타이드는 박테리아 숙주 세포에서 활성 형태로 생성되지 않을 수 있으나, 이러한 경우에도 불활성 폴리펩타이드는 예컨대, 항체 유도 면역원, 분자량 표지 등으로서의 용도를 갖는다.
- [0047] 몇몇 양태에서, 관심이 있는 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA는 다른 폴리펩타이드, 바람직하게는 성숙된 폴리펩타이드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드 또는 신호 서열과 함께 융합체로서 발현될 수 있다.
- [0048] 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분이거나 또는 벡터에 삽입되는 폴리펩타이드 DNA의 일부일 수 있다. 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되어 처리된(즉, 신호 펩티다아제에 의해 절단된) 것이어야 한다. 천연 폴리펩타이드 신호 서열을 인식 및 처리하지 않은 박테리아 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 박테리아 신호 서열로 치환된다. 신호 서열은 원하는 단백질을 세포로부터 세포외 배지로 분비시키므로써 원하는 폴리펩타이드의 정제를 촉진시킬 수 있다.
- [0049] 원핵 세포에 의해 생성되는 폴리펩타이드는 적절히 절첩될 필요는 없다. 이.콜라이로부터의 정제 동안, 발현된 폴리펩타이드는 처음에 변성된 후에 재변성될 수 있다. 이는 구아니딘 HCl과 같은 차오토로픽(chaotropic)제 중에서 박테리아에 의해 생성된 단백질을 용해시킨 후 모든 시스테인 잔기를 β -머캅토에탄올과 같은 환원제로 환원시키므로써 이루어질 수 있다. 이어서, 느린 투석 또는 겔 여과에 의해 폴리펩타이드를 재변성시킨다. 미국 특허 제 4,511,503호를 참조.
- [0050] 본 명세서에서 요구되는 많은 명명법 및 일반적인 실험 절차는 삼브룩(Sambrook) 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual(제 2 판), 제 1 내지 제 3 권, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에서 찾아볼 수 있다. 이후, 매뉴얼은 "삼브룩 등"으로서 지칭된다.
- [0051] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련자에 의해 통상 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 싱글레톤(Singleton) 등의 문헌[Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 제 2 판, John Wiley and Sons(New York)]에는 본 발명에 사용된 많은 용어의 일반적인 사전적 의미가 제공되어 있다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기술되어 있다. 본 발명을 위해, 하

기 용어들을 다음과 같이 정의한다.

- [0052] "핵산"이란 용어는 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 지칭하고, 별도의 제한이 없는한 천연적으로 발생하는 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 핵산에 하이브리드 형성되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함한다. 별도의 지시가 없는한, 특정 핵산 서열은 그의 상보적 서열을 포함한다.
- [0053] "조작될 수 있게 연결된"이란 용어는 핵산 발현 조절 서열(예컨대, 프로모터, 신호 서열 또는 일련의 전사 인자 결합 부위)과 제 2 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하고, 이 때 발현 조절 서열은 제 2 서열에 상응하는 핵산의 전사 및/또는 번역에 영향을 준다.
- [0054] 세포에 대해 사용될 경우 "재조합"이란 용어는 세포가 이중 핵산을 복제하거나, 이중 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현함을 의미한다. 재조합 세포는 세포의 천연(재조합되지 않은) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현시킬 수 있다. 재조합 세포는 또한 세포의 천연 형태에서 발현되는 유전자를 발현할 수도 있으나, 이때 유전자는 인공적인 수단에 의해 개질되고 세포 내로 재도입된다.
- [0055] 본원에서 "이중 서열" 또는 "이중 핵산"이란 외래 공급원(또는 중)으로부터 기원되거나, 또는 동일한 공급원으로부터 기원될 경우 그의 고유 형태로부터 개질된 것이다. 따라서, 프로모터에 조작될 수 있게 연결된 이중 핵산은 프로모터가 유도되는 공급원과는 상이한 공급원으로부터 유도되거나, 또는 동일한 공급원일 경우 그의 고유의 형태로부터 개질된다. 예를 들면, 알파-아밀레이즈 유전자 프로모터(amyR2 promoter)는 천연 알파-아밀레이즈와는 다른 폴리펩타이드를 코딩하는 구조 유전자에 연결될 수 있다.
- [0056] 이중 서열은, 예컨대 DNA를 제한 효소로 처리하여 프로모터에 조작될 수 있게 연결될 수 있는 DNA 단편을 생성함으로써 개질될 수 있다. 부위-지향된 돌연변이유발 등의 기법 또한 이중 서열을 개질하기 위해 유용하다.
- [0057] "재조합 발현 카세트" 또는 단순히 "발현 카세트"라 함은 서열과 상용성인 숙주에서 구조 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 핵산 요소가 있는, 재조합적으로 또는 합성적으로 만들어진 핵산 구축물이다. 발현 카세트는 적어도 프로모터 및 선택적으로 전사 종결 신호를 포함한다. 전형적으로, 재조합 발현 카세트는 전사될 핵산(예컨대, 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산) 및 프로모터(예컨대, amyR2 프로모터) 및 BLMA 프로모터를 함유하는 이중 프로모터를 포함한다. 발현을 수행하는데 요구되거나 이에 도움을 주는 추가의 인자는 또한 본원에 설명된 바와 같이 사용될 수 있다. 예컨대, 발현 카세트는 숙주 세포로부터 발현된 단백질의 분비를 유도하는 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수도 있다.
- [0058] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0059] 본 발명자들은 식품용 혹은 의약품 재조합 단백질의 생산에 있어 필수적인 효과적인 프로모터의 개발을 위하여 바실러스에서 작동하는 두 개의 프로모터를 5'에서 3' 방향으로 연속적인 배열하여 제작된 이중 프로모터 시스템이 이중단백질을 효과적으로 생산함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 효과

- [0060] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 B.subtilis에서 작동하는 프로모터 두 개를 일렬로 배열한 프로모터 구조를 통해 외래 유전자를 과다발현할 수 있는 새로운 바실러스 발현시스템을 개발하였다. 상기 이중 프로모터 시스템을 Bacillus용 vector 또는 shuttle vector등에 장착하여 이중단백질을 Bacillus subtilis에서 높은 수율로 생산하므로, 식품용 또는 의약품 효소 생산에 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 재조합 벡터 pHpa-TSaGT (1a), pHa-TSaGT (1b) 및 pHb-TSaGT (1c)의 벡터의 개열지도이다.
- 도 2는 재조합 벡터 pHpa-TSaGT (A), pHa-TSaGT (B) 및 pHb-TSaGT (C)로 형질전환된 B. subtilis를 A 배지에서 배양하면서 균체 성장 (○) 및 조효소액 내 TSaGT의 활성(●)을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 재조합 벡터 pHpa-TSaGT (A), pHa-TSaGT (B) 및 pHb-TSaGT (C)로 형질전환된 B. subtilis를 A 배지에서 배양하면서 조효소액내 TSaGT의 활성이 최고일 때의 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.
- 도 4는 재조합 벡터 pHpa-BBE (4a)와 pHb-BBE (4b)의 벡터의 개열지도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0062] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0063] 실시예 1: E. coli 형질전환
- [0064] 형질전환을 위하여, 5 ml LB 액체 배지에 숙주 세포인 E. coli MC1016(New England Biolab(NEB), USA)를 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0 ml을 새로운 LB 액체 배지 50 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하였다.
- [0065] 상기 흡광도를 확인한 배양액 1.5 ml를 4℃에서 7000 x g의 조건으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 뒤, 0.75 ml의 형질전환용액I(50 mM CaCl₂)으로 현탁하고 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 이후 4℃에서 6000 x g의 조건으로 2분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 회수된 균체를 0.15 ml의 형질전환용액II(100 mM CaCl₂)로 현탁하여 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 형질전환할 DNA 시료를 상기 형질전환용 E. coli MC1061 0.2 ml과 혼합하고, 1시간 방치한 후 42℃에서 2분간 열 충격을 주었다. 상기 열 충격을 준 혼합액에 0.8 ml의 LB 액체 배지를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 배양시켰다. 상기 1시간 동안 배양한 배양액을 암피실린(최종농도 20 µg/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.
- [0066] 실시예 2: B. subtilis 형질전환
- [0067] B. subtilis ISW1214(Takara. Co. 일본)를 5 ml의 LB배지에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액 1.0 ml을 새로운 SP I 배지 (0.5% glucose, 0.02% casamino acid, 0.05% yeast extract, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% Na-citrate, 0.02% MgSO₄, pH7.5) 50 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도를 측정하면서 균체의 성장이 대수기에 접어들 때까지 교반하며 배양하였다. 상기 배양액 1mL을 5mL의 SP II 배지(0.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂를 포함하는 SP I 배지)에 접종하고 다시 37℃에서 90분간 교반하며 배양하였다. 상기 배양액 1mL을 4℃에서 7000 x g의 조건으로 5분간 원심분리한 후, 0.8 ml의 상등액을 제거하고, 균체를 남은 0.2 ml에 현탁하였다. 형질전환할 DNA 시료를 상기 형질전환용 B. subtilis 50 µl와 혼합하고, 37℃에서 30분간 교반 배양하였다. 상기 준 혼합액에 0.8 ml의 LB 액체 배지를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 배양시켰다. 상기 1시간 동안 배양한 배양액을 가나마이신(최종농도 20 µg/ml)을 함유한 LB 한천 배지에 평판 도말하여 내성을 보이는 균주를 1차 선별하였다.
- [0068] 실시예 3: Thermus scotoductus 4-α-glucanotransferase (TSaGT)의 발현
- [0069] 3-1. HpaII 프로모터 하류에 TSaGT 유전자의 클로닝
- [0070] p6xHTSaGT 벡터 (Seo et al. 2007. J. Food Sci. 72:C331-C336)를 NdeI과 HindIII로 절단하여 1.5 kb 크기의 TSaGT 유전자를 확보하였다. 확보된 TSaGT 유전자를 상기 두 제한효소로 절단한 pLIP 플라스미드(바이오리더스, 대전, 한국)에 라이게이션 시킨 후, 상기 실시예 1에서와 같이 E. coli에 형질전환하였다. 암피실린 저항성 형질전환체를 1차로 선별하였다. 1차 선별된 형질전환체를 암피실린을 함유한 3 mL LB 배지에 접종하고 12시간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (10,000 rpm, 10분)하여 균체를 회수한 후, QUAGEN 플라스미드 분리 kit를 이용하여 배양된 균체로부터 플라스미드를 분리한 후, 상기과 동일한 제한 효소 NdeI과 HindIII를 이용하여 절단하여, 약 1.5kb의 크기의 TSaGT 유전자가 포함되어 있음을 확인하였다.
- [0071] 상기 라이게이션을 통하여 하여 pHpa-TSaGT를 제조하였으며, 상기 재조합 벡터는 pLIP 벡터가 함유하는 HpaII 프로모터 (서열번호 1)에 의해 TSaGT 유전자의 발현이 이루어진다. 상기 재조합 벡터 pHpa-TSaGT의 벡터의 개열 지도를 도 1a에 나타내었다.
- [0072] 3-2. HpaII-amyR2 이중 프로모터 하류에 TSaGT 유전자의 클로닝
- [0073] Bacillus subtilis NA64 알파-아밀레이즈 유전자의 프로모터 (이하 amyR2 프로모터, 서열번호 3)를 분리하기 위하여 정방향 프라이머 M13 forward primer (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3', 서열번호 4)와 역방향 프라이머 R-NdeI (5'-AATCTTCATATGGTATACCTCCTCATCGTA-3', 서열번호 5)를 각각 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0074]

	서열	서열번호
정방향 프라이머 M13 forward primer	5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'	4
역방향 프라이머 R-NdeI	5'-AATCTTCATATGGTATACCTCCTCATCGTA-3'	5

[0075]

상기 amyR 프로모터를 분리하기 위하여 상기 amyR 프로모터를 함유하는 pR2CGTI-5 플라스미드 벡터 (Shim et al., 2004, Protein Engineering Design and Selection, 17:205-211)에 대해 상기 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하여 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 0.3 kb임을 확인하였다. 상기 PCR의 조건은 하기 표 2 에 기재된 바와 같다.

표 2

[0076]

단계(STEP)	온도	반응시간
First(1st) denaturation	95 °C	5 min
Second(2st) denaturation	95 °C	1 min
Annealing	55 °C	30 sec
Extension	72 °C	1min 30sec
Cycle	go to denaturation	33 cycles
Final extension	72 °C	7 min

[0077]

상기 amyR 프로모터를 포함하는 PCR 산물을 제한효소 SacI과 NcoI으로 절단하였다. 상기 TSaGT 유전자는 p6xHTSaGT를 제한효소 NcoI과 HindIII로 절단하여 1.5 kb 크기의 DNA 절편을 확보하였다. 상기 두 DNA 절편들을 SacI과 HindIII로 절단된 pLIP 벡터와 동시에 라이게이션하여, 상기 실시예 3-1과 같이 플라스미드를 선별하고, EcoRI과 HindIII로 절단하여 BLMA 프로모터와 TSaGT 유전자를 포함하는 1.7 kb 의 DNA 절편을 함유한 플라스미드를 선별하였다. 상기 라이게이션을 통하여 하여 pHa-TSaGT를 제조하였으며, 상기 재조합 벡터는 pLIP 벡터가 함유하는 HpaII 프로모터와 amyR 프로모터로 구성된 이중 프로모터에 의해 TSaGT 유전자의 발현이 이루어진다. 상기 재조합 벡터 pHa-TSaGT의 벡터의 개열지도를 도 1b에 나타내었다.

[0078]

3-3. HpaII-BLMA 이중 프로모터 하류에 TSaGT 유전자의 클로닝

[0079]

상기 p6xHTSaGT를 EcoRI과 HindIII로 절단하여, B. licheniformis maltogenic amylase (US patent 05583039) 유전자의 프로모터(이하 BLMA 프로모터, 서열번호 2)와 TSaGT 유전자를 모두 함유한 1.7 kb의 DNA 절편을 얻었다. 상기 DNA 절편을 EcoRI과 HindIII로 절단한 pLIP 벡터에 라이게이션하여, 상기 실시예 3-1과 같이 플라스미드를 선별하고, EcoRI과 HindIII로 절단하여 1.7 kb 의 DNA 절편을 포함하는 플라스미드를 선별하였다. 상기 라이게이션을 통하여 하여 pHb-TSaGT를 제조하였으며, 상기 재조합 벡터는 pLIP 벡터가 함유하는 HpaII 프로모터와 BLMA 프로모터로 구성된 이중 프로모터에 의해 TSaGT 유전자의 발현이 이루어진다. 상기 재조합 벡터 pHb-TSaGT의 벡터의 개열지도를 도 1c에 나타내었다.

[0080]

3-4. B. subtilis로의 TSaGT 유전자 형질전환

[0081]

상기 실시예 3-1에서 3-3을 통해 제작한 TSaGT 유전자를 함유하는 세 개의 플라스미드 벡터 (pHpa-TSaGT, pHb-TSaGT, 및 pHa-TSaGT)를 각각 상기 실시예 2에 따라 B. subtilis ISW1214로 형질전환후 카나마이신 내성여부를 확인하여 상기 벡터가 형질전환된 균주 즉, 형질전환체를 선별하였다.

[0082]

3-5. 시간대별 TSaGT 조효소액 제조

[0083]

상기 실시예 3-4을 통해 얻어진 3종류의 B. subtilis 형질전환체들 (B. subtilis ISW1214/pHpa-TSaGT; B. subtilis ISW1214/pHb-TSaGT; B. subtilis ISW1214/pHa-TSaGT)을 가나마이신 (10 µg/ml)를 함유하는 A 배지

[3.3% (w/v) Bacto tryptone, 2% (w/v) Bacto yeast extract, 0.74% (w/v) NaCl, 0.8% (w/v) Na₂HPO₄, 0.4% (w/v) KH₂PO₄, 2% (w/v) casamino acids, 및 0.06 mM MnCl₂]에 접종하고 37°C에서 36시간 배양하였다.

[0084] 배양과정에서 배양액을 적절한 시간대에 50 mL씩 회수한 후, 4°C에서 7,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 현탁한 후, 상기 현탁한 균체를 초음파 분쇄하였다. 상기 초음파 분쇄를 수행한 배양액을 10,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 조효소액을 제조하였다.

[0085] 3-6. TSaGT 효소 활성 측정

[0086] 상기 실시예 3-5에서 얻어진 배양시간대 별 조효소액을 이용하여 효소활성을 측정하였다. 1% (w/v) maltose와 0.2% (w/v) 아밀로스가 함유된 기질용액 50 μ L와 조효소액 50 μ L를 섞고 75°C에서 20분간 반응시킨 후, 10분간 중탕가열하여 반응을 정지시켰다. 상기 반응액에 0.013 g I₂, 0.13 g KI를 130 mL 물에 녹여 제조한 아이오다인 용액 1 mL를 첨가하고 스펙트로포토미터 (UV-160A, Shimazu, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 분해된 amylose의 함량을 계산하였다. 1 유닛의 TSaGT 활성은 분당 1 μ g/mL의 아밀로스를 분해하는 효소량으로 결정하였다. 상기 실험 결과를 하기 도 2에 나타낸다. 도 2에서 알 수 있듯이 HpaII 프로모터에 의해서 TSaGT가 발현되는 시스템인 pHpa-TSaGT를 함유하는 형질전환체의 경우는 최대 효소활성이 배지 1mL 당 0.5 U에 불과한 반면, 이중 프로모터를 사용하는 시스템인 pHB-TSaGT 및 pHa-TSaGT를 함유하는 형질전환체의 경우는 최대효소활성이 배지 1mL 당 각각 6 U/ml 와 5.4U/ml로 상기 pHpa-TSaGT에 비해 약 10배 이상의 TSaGT가 생산되었음을 확인하였다. 상기 B. subtilis 형질전환체의 조효소액을 SDS-PAGE로 분석한 결과는 도 3과 같다. Lane 1은 pHpa-TSaGT가 형질전환된 B. subtilis에서 얻은 조효소액, Lane 2는 pHa-TSaGT가 형질전환된 B. subtilis에서 얻은 조효소액, Lane 3은 pHB-TSaGT가 형질전환된 B. subtilis에서 얻은 조효소액, Lane 4는 pHa-TSaGT가 형질전환된 B. subtilis에서 얻은 조효소액으로부터 정제된 TSaGT, Lane 5는 pHa-TSaGT가 형질전환된 B. subtilis에서 얻은 조효소액으로부터 정제된 TSaGT이다. 도 3으로부터 TSaGT가 이중 프로모터에 의해서 과다 발현되었음을 확인하였다.

[0087] 실시예 4. B. subtilis branching enzyme의 발현

[0088] 4-1. B. subtilis 염색체 DNA 분리

[0089] B. subtilis 168(ATCC, 미국 ATCC23857)을 LB 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 50ml에 접종하여 37°C에서 배양하고 원심분리하여 균체를 회수하고 염색체 DNA를 분리하였다(Dubnau, D. and R. D. Abenson, 1971, J. Mol. Biol., 56, 209-221). 즉, 회수된 균체에 라이소자임을 처리하여 원형질체 세포로 만든 다음 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 넣어 세포를 완전히 파괴한 후 전체 반응액에 대해 농도가 1몰이 되도록 소듐 클로라이드를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 이것을 원심분리하여 상등액만을 취하고, 페놀:클로로포름:아이소아밀알콜의 혼합액(각 용액의 부피의 비 = 25:24:1)을 상등액과 동일한 부피로 첨가하여 액 중의 단백질을 불순물을 제거하였다. 이 과정을 수회 반복하였다. 두 배 부피의 99%의 에탄올을 첨가하여 침전시키고, 이것을 유리막대로 감아서 분리하여 1/10xSSC 완충용액(3M 소듐 클로라이드, 0.3M 소듐 시트레이트)에 녹였다.

[0090] 4-2. BBE 유전자 클로닝

[0091] B. subtilis branching enzyme (이하 BBE) 유전자를 분리하기 위하여 정방향 프라이머 Bs-GlgB-F (5'-GAAAGGATGATTCCATGGCCGCTGCCAGC-3', 서열번호 6)와 역방향 프라이머 Bs-GlgB-R (5'-CTACACATTGTTAAGCTTTCATCCTTTTATCTC -3', 서열번호 7)를 각각 제작하였으며, 상기 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0092]

	서열	서열번호
정방향 프라이머 Bs-GlgB-F 프라이머	5'-GAAAGGATGATTCCATGGCCGCTGCCAGC-3'	6
역방향 프라이머 RBs-GlgB-R 프라이머	5'-CTACACATTGTTAAGCTTTCATCCTTTTATCTC-3'	7

[0093]

상기 BBE 유전자를 분리하기 위하여 상기 실시예 4-1의 *B. subtilis* 염색체 DNA에 대해 상기 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하여 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 2.2 kb임을 확인하였다. 상기 PCR의 조건은 상기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0094]

상기 PCR 산물을 제한효소 *Nco*I로 절단후 *Klenow* 효소로 말단을 평활말단으로 가공한 후 *Hind*III로 절단하였다. 제한효소 *Nde*I로 절단된 상기 pLIP 벡터의 말단을 *Klenow* 효소 처리를 통해 평활말단으로 가공하고, *Hind*III로 절단한 후, 상기 PCR 산물과 라이게이션하였다. 상기 라이게이션 용액을 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 *E. coli*에 형질전환하고, 상기 실시예 3-1과 같이 플라스미드를 분리하고, 상기 분리된 플라스미드를 *Nco*I과 *Hind*III로 절단하여 2.2 kb 의 DNA 절편을 포함하는 플라스미드를 선별하였다. 상기 라이게이션을 통하여 하여 재조합 벡터 pHpa-BBE 벡터를 제조하였다. 상기 재조합 벡터 pHpa-BBE의 벡터의 개열지도를 도 4a에 나타내었다.

[0095]

상기 PCR 산물을 제한효소 *Nco*I과 *Hind*III로 절단하고, p6xHis119 (Kim et al. 1999. Appl Environ Microbiol. 65:1644-51)를 제한효소 *Eco*RI과 *Nco*I로 절단하여 BLMA 프로모터를 함유한 DNA 절편을 얻었다. 상기 pLIP 벡터를 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단 한 후, 상기 PCR 산물과 BLMA 프로모터를 함유한 DNA 조각을 동시에 라이게이션 하였다. 상기 라이게이션 용액을 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 *E. coli*에 형질전환하고, 상기 실시예 3-1과 같이 플라스미드를 분리하고, 상기 분리된 플라스미드를 *Nco*I과 *Hind*III로 절단하여 2.2 kb 의 DNA 절편을 포함하는 플라스미드를 선별하였다. 상기 라이게이션을 통하여 하여 재조합 벡터 pBBE 벡터를 제조하였다. 상기 재조합 pBBE 벡터를 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하여 BLMA 프로모터와 BBE 유전자를 포함하는 2.5 kb DNA 절편을 회수한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pLIP 벡터와 라이게이션하였다. 상기 라이게이션 용액을 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 *E. coli*에 형질전환하고, 상기 실시예 3-1과 같이 플라스미드를 분리하고, 상기 분리된 플라스미드를 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하여 2.5 kb 의 DNA 절편을 포함하는 플라스미드를 선별하였다. 상기 라이게이션을 통하여 하여 재조합 벡터 pHB-BBE 벡터를 제조하였다. 상기 재조합 벡터 pHB-BBE 내의 BBE 유전자는 *Hpa*II와 BLMA 프로모터로 구성된 이중 프로모터에 의해 발현이 이루어진다. 상기 재조합 벡터 pHB-BBE의 벡터의 개열지도를 도 4b에 나타내었다.

[0096]

4-3. *B. subtilis* 형질전환체로부터 BBE 유전자 발현 및 효소활성 측정

[0097]

상기 실시예 4-2에서 제조한 pHpa-BBE와 pHB-BBE과 대조군으로서 BBE 유전자를 가지지 않는 pLIP 벡터를 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 *B. subtilis* ISW1214에 형질전환시키고, 상기 가나마이신 (10 μ g/ml)를 함유하는 A 배지에 접종하고 37℃에서 30시간 배양하였다. 상기 배양액을 4℃에서 7,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 현탁한 후, 상기 현탁한 균체를 초음파 분쇄하였다. 상기 초음파 분쇄를 수행한 배양액을 10,000 x g의 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 조효소액을 제조하였다.

[0098]

상기 형질전환체들의 배양액에서 제조된 조효소액들을 이용하여 효소활성을 측정하였다. 조효소액 50 μ L와 0.05% (w/v) 아밀로스 기질용액 50 μ L를 섞고 30℃에서 20분간 반응시킨 후, 5분간 중탕가열하여 반응을 정지시켰다. 상기 반응액에 0.013 g I₂, 0.13 g KI를 130 mL 물에 녹여 제조한 아이오다인 용액 1 mL을 첨가하고 스펙트로포토미터 (UV-160A, Shimazu, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 분해된 amylose의 함량을 계산하였다. 1 유닛의 BBE 활성은 분당 1 μ g/mL의 아밀로스를 분해하는 효소량으로 결정하였다. 상기 형질전환체에서 얻어진 조효소액의 효소 총활성을 표 4에 정리하였다.

표 4

[0099]

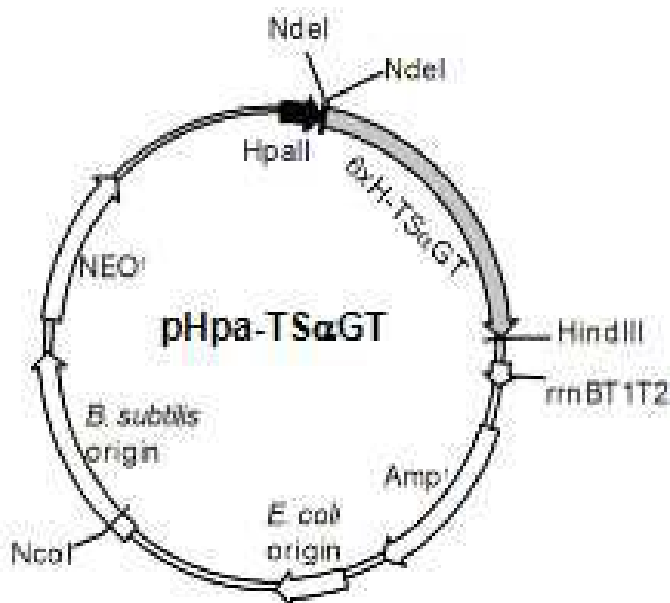
	효소 총활성 (U)
B. subtilis ISW1214/pLIP	14.1×10^4 U
B. subtilis ISW1214/pHpa-BBE	14.6×10^4 U
B. subtilis ISW1214/pHB-BBE	19.3×10^4 U

[0100]

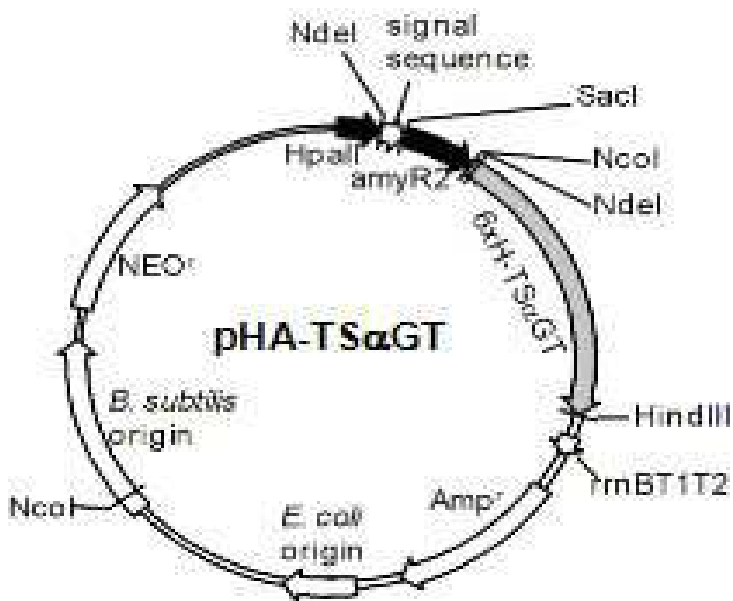
상기 결과로부터 숙주세균으로 사용된 B. subtilis 자체가 생산하는 BBE 활성을 제거하면, 이중 프로모터를 이용하는 pHB-BBE가 단일프로모터를 이용하는 pHpa-BBE에 비해 훨씬 많은 양의 BBE를 생산함을 알 수 있다.

도면

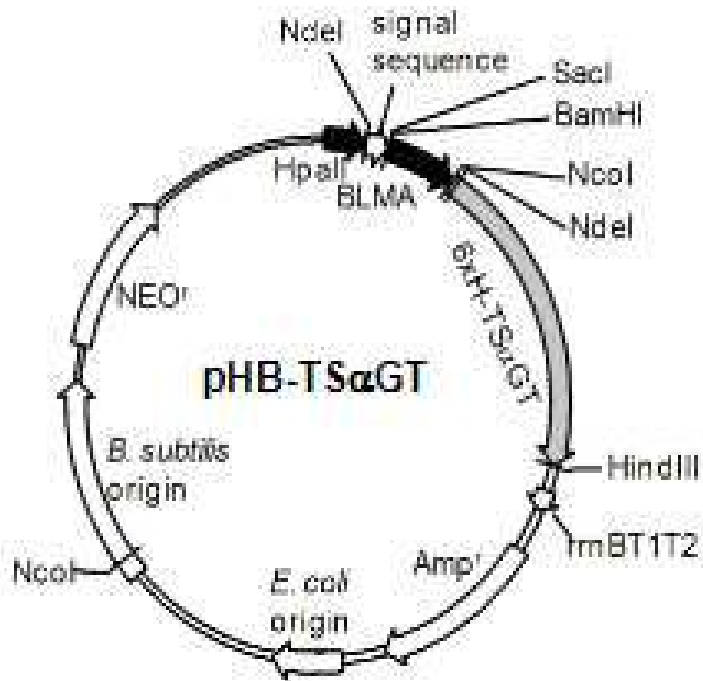
도면1a



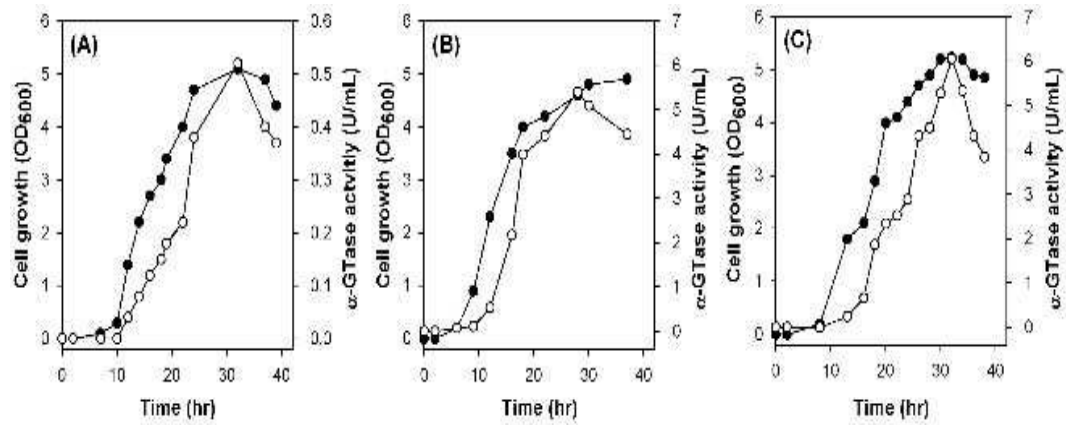
도면1b



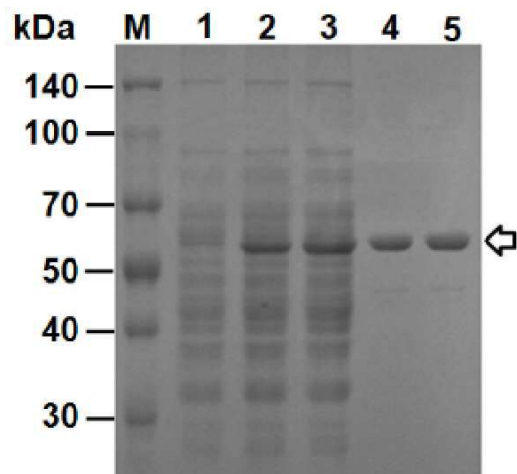
도면1c



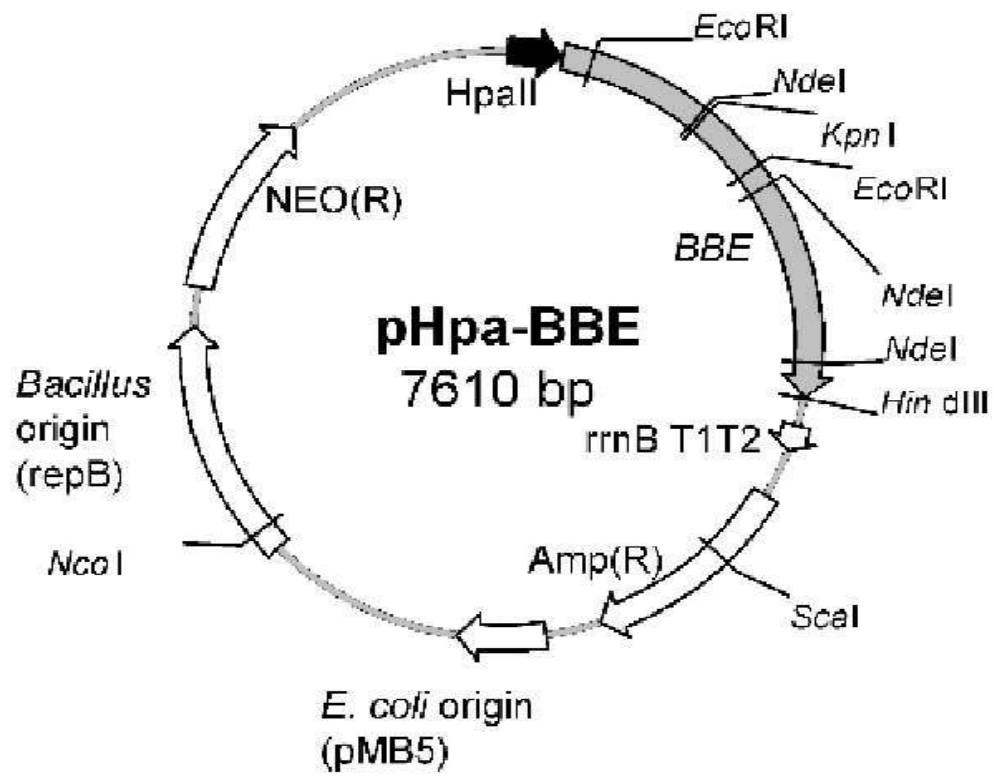
도면2



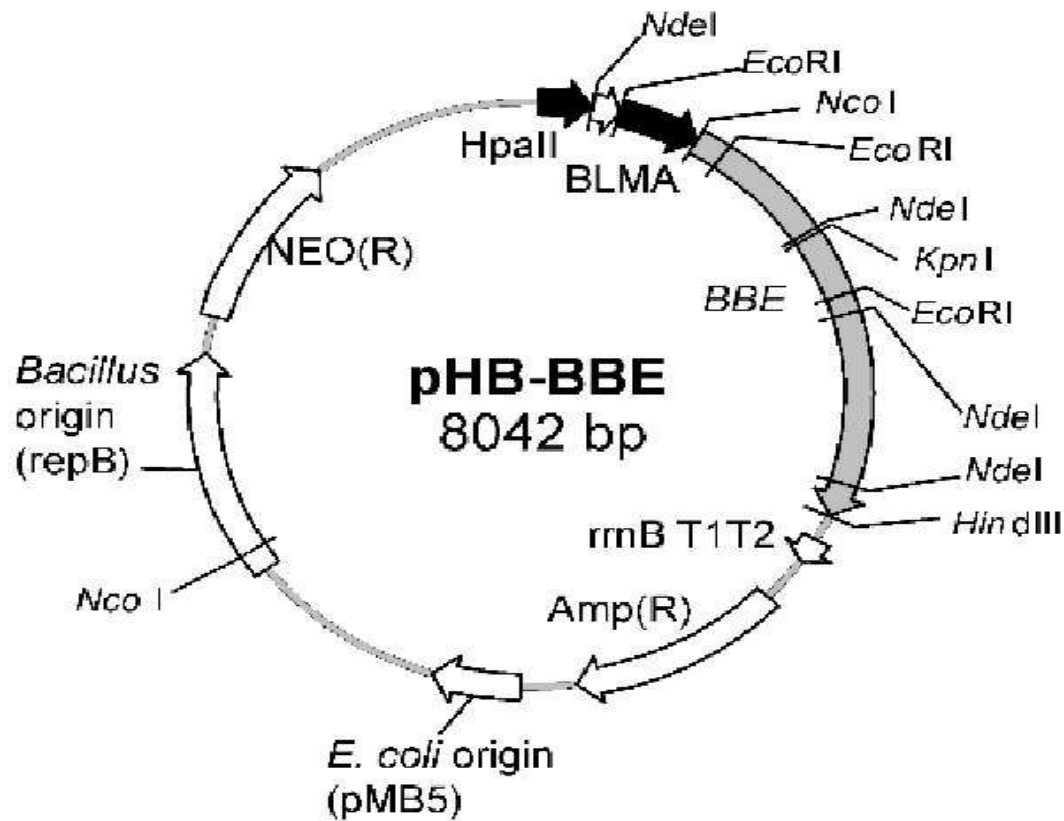
도면3



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Expression System Comprising Dual Promoters And Overexpression of Foreign Genes Using The Same
- <160> 7
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 512
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> HpaII promoter
- <400> 1

taaaatctat tattaatctg ttcagcaatc gggcgcgatt gctgaataaa agatacgaga	60
gacctctctt gtatcttttt tatittgagt ggttttgtcc gttacactag aaaaccgaaa	120
gacaataaaa attttattct tgctgagtct ggctttcggt aagctagaca aaacggacaa	180
aataaaaatt ggcaagggtt taaagggtga gattttttga gtgatcttct caaaaaatac	240
tacctgtccc ttgctgattt ttaaacgagc acgagagcaa aacccccctt tgctgaggtg	300

gcagagggca ggTTTTTTTg tttctTTTTt ctcgtaaaaa aaagaaaggt cttaaaggtt 360
 ttatggTTTT ggtcggcact gccgacagcc tcgcagagca cacactttat gaataataag 420
 tatagtgtgt tatactttac ttggaagtgg ttgccggaaa gagcgaaaat gcctcacatt 480
 tgtgccacct aaaaaggagc gatttacata tg 512

<210> 2

<211> 329

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BLMA

<400> 2

gaattcggaa gatgtcgcgg tcaccggcta tgacgggtgt ttctcgaccg gatcgcttcg 60
 cctcgcctga caaccgtcag acagcctgtt gttgaaatgg gagaggcttg cgcgagaatc 120
 ctgctgaaaa aaatcaatga agacggagag cgccgcaacg aatcaatttt ttaaccgga 180
 gcttatgtgc cgcgaatcga cttttagggg tgtctcattc tgttaccgtt aacagctgaa 240
 aatgattgtt ccgtttaccg ccgtcatgat aatttcagaa taaaagccgg tttatcacag 300
 ccggacaacc aaaaggggga aaccatatg 329

<210> 3

<211> 349

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amyR2

<400> 3

ccccattctt ctttttatcg tctgcggcgg cgttctgttt ctgcttcggt atgtgattgt 60
 gaagctggct tacagaagag cggtaaaaga agaaataaaa aagaatcat cttgaaaaat 120
 agatggTTTT ttttttTgtt tggaaagcga gggaaacagt ctcgggcagt tttttatagg 180
 accattgatt tgiattcact ctgccaagtt gttttgatag agtgattgtg ataatttaaa 240
 atgtaagcgt aaacaaaatt ctccagtctt cgcacagtt tgaaaggagg aagcggaaga 300
 atgaagtaag agggattttt gactgggtca tacgatgagg aggtatagt 349

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M13 forward primer
 <400> 4
 gtaaaacgac ggccagt 17
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> R-NdeI
 <400> 5
 aatcttcata tggatatacct cctcatcgta 30
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bs-GlgB-F
 <400> 6
 gaaaggatga ttccatggcc gctgccagc 29
 <210> 7
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RBs-GlgB-R
 <400> 7
 ctacacattg ttaagctttc atccttttta tctc 34