

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0155398

(43) 공개일자 2024년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0051136

(22) 출원일자 2023년04월19일

심사청구일자 2023년04월19일

(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

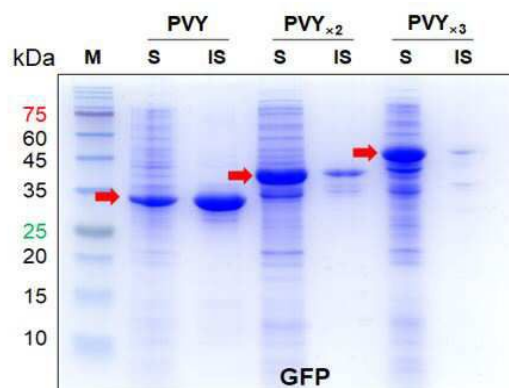
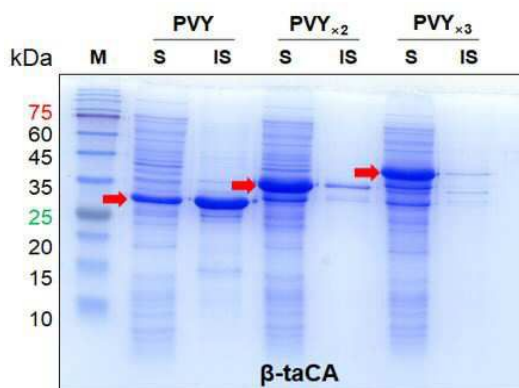
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 목적 단백질의 수용성 발현 증가를 위한 감자 바이러스 Y 유래 융합 태그 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 목적 단백질의 수용성 발현 증가를 위한 감자 바이러스 Y 유래 융합 태그 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 PVY 융합 태그는 융합 태그의 C-말단에 융합되는 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시킬 수 있으므로, 의약품, 산업용 및 연구용 등의 재조합 단백질 발현을 위한 벡터 시스템의 기본 구성요소로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/18 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C12N 2770/40022 (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 1/2

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 1/2

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 서열번호 1의 아미노산 서열의 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 1 내지 서열번호 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 태그.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 각 융합 태그의 C-말단에(GGGGS)₂ 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 4 내지 서열번호 6 중 어느 하나의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 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 1 내지 서열번호 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 감자 바이러스 Y 유래 융합 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 PLX₁DLGX₂E 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 감자 바이러스 Y 유래 융합 태그 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 대장균에서 대부분 불용성으로 발현되는 모델효소 PETase(Polyethylene terephthalate hydrolase), β -taCA(*Thermovibrio ammonificans* carbonic anhydrase) 및 GFP(Green Fluorescent Protein)의 수용성 발현 증진을 위해 PVY(Potato Virus Y) 외피단백질(coat protein)의 N-말단에 존재하는 무정형 서열에서 유래된 신규 융합 태그(이하, PVY 태그)를 개발하였다.

상기 PVY 태그를 코딩하는 염기서열과 PETase, β -taCA 또는 GFP 코딩 유전자가 순차적으로 연결된 재조합 벡터로 대장균 균주를 형질전환하여 재조합 단백질을 발현시킨 결과, 44개의 아미노산으로 이루어진 단일 PVY 태그(서열번호 1)의 코딩 서열이 포함된 재조합 벡터로 형질전환할 경우 재조합 단백질의 수용성 발현량이 태깅되지 않은 경우에 비해 증가하였으며, PVY 태그 서열이 이중(PVY_{×2}, 서열번호 2) 또는 삼중(PVY_{×3}, 서열번호 3)으로 연결된 다중 PVY 태그 코딩 서열이 포함된 재조합 벡터로 형질전환할 경우 재조합 단백질의 수용성 발현량이 불용성 발현량에 비해 현저히 증가한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 서열번호 1의 아미노산 서열의 2반복 이상으로 이루어진 융합 태그를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 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 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 PVY 융합 태그는 융합 태그의 C-말단에 융합되는 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시킬 수 있으므로, 본 발명의 태그는 의약품, 산업용 및 연구용 등의 재조합 단백질 발현을 위한 벡터 시스템의 기본 구성요소로 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 PVY 태그와 융합된 목적 단백질(PETase, β -taCA, GFP)과 PVY 태그가 융합되지 않은 목적 단백질(untagged)의 발현 경향을 확인한 것으로 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색 겔 사진이다. S; 수용성(soluble) 분획, IS; 불용성(insoluble) 분획, 화살표; 재조합 단백질.
- 도 2는 본 발명의 PVY 태그, MBP(Maltose-binding protein) 또는 Fh8 태그와 융합된 목적 단백질(PETase, β -taCA, GFP) 및 상기 태그와 융합되지 않은 목적 단백질(untagged)의 발현 경향을 확인한 것으로 쿠마씨 블루 염색 겔 사진이다. S; 수용성(soluble) 분획, IS; 불용성(insoluble) 분획, 화살표; 재조합 단백질.
- 도 3은 본 발명의 PVY 태그를 대상으로 IUPred2A, PONDR 및 DISpro 분석 툴을 이용하여 IDP(Intrinsically disordered protein) 특성을 분석한 결과이다.
- 도 4는 44개의 아미노산으로 이루어진 단일 PVY 태그(서열번호 1)와, PVY 태그 서열을 이중(PVY_{×2}, 서열번호 2) 또는 삼중(PVY_{×3}, 서열번호 3)으로 tandem repeat 형태로 연결한 다중 PVY 태그와 융합된 목적 단백질(β -taCA, GFP)의 발현 경향을 확인한 것으로 쿠마씨 블루 염색 겔 사진이다. S; 수용성(soluble) 분획, IS; 불용성(insoluble) 분획, 화살표; 재조합 단백질.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열; 또는 서열번호 1의 아미노산 서열의 2반복 이상으로 이루어진 융합 태그를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 융합 태그에 있어서, 상기 2반복 이상은 2반복 내지 5반복 중 어느 하나일 수 있으며, 상기 융합 태그는 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제

한되지 않는다.

- [0017] 본 발명의 융합 태그에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 PVY(Potato Virus Y) 외피단백질(coat protein)의 N-말단에 존재하는 무정형 서열에서 유래된 것이다.
- [0018] 본 발명의 융합 태그에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복(PVY_{×2}) 또는 3반복(PVY_{×3})되어 이루어진 융합 태그는 각각 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에 따른 융합 태그의 범위는 서열번호 1, 2 또는 3으로 표시된 아미노산 서열을 갖는 태그 및 이의 기능적 동등물을 포함한다. 본 발명에 있어서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1, 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 1, 2 또는 3으로 표시되는 태그와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 태그를 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 목적 단백질의 수용성 발현량을 증가시키는 활성을 의미한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0021] 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.
- [0022] 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4, 5 또는 6으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 서열번호 4, 5 또는 6의 염기서열은 각각 서열번호 1, 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0023] 본 발명은 또한, 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전술한 것과 같다.
- [0025] 본 발명에 따른 상기 재조합 벡터는 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 본 발명에서 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.
- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0028] 본 발명의 재조합 벡터에 있어서, 상기 목적 단백질은 C-말단에 6XHis 서열을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 명세서에서, 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 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.
- [0030] 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.

- [0031] 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.
- [0032] 본 발명에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복 또는 3반복된 다중 PVY 태그는 단일 PVY 태그에 비해 목적 단백질의 수용성 발현량 증진 효과가 우수한 특징이 있다.
- [0033] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0034] 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 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0035] 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 FiveTM), 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.
- [0036] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포는 대장균, 바람직하게는 *E. coli* BL21(DE3)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 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-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한,
- [0039] 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0040] 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적 단백질을 발현시키는 단계;를 포함하는, 숙주세포에서 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산 방법을 제공한다.
- [0041] 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.
- [0042] 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 아나가 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.
- [0043] 본 발명은 또한, 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 융합 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결된 재조합 벡터를 유효 성분으로 포함하는, 수용성 발현량이 증가된 목적 단백질의 생산용 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열이 2반복 또는 3반복되어 이루어진 융합 태그는 각각 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[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 대장균(*Escherichia coli*) TOP10 균주를 이용하였고, 단백질을 위해 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 이용하였다. *E. coli*는 LB(Luria-Bertani) 배지에서 37℃ 및 180 rpm 조건으로 배양하였으며, 필요에 따라 배양 시 50 µg/ml 암피실린(ampicillin)을 첨가하였다.

[0053] 2. 발현 벡터 제작

[0054] 이데오넬라 사카이엔시스(*Ideonella sakaiensis*) 유래의 PETase(polyethylene terephthalate hydrolase)와 GFP(green fluorescent protein)의 단독 발현, 또는 MBP(Maltose-binding protein)나 Fh8 태그와의 융합 발현을 위해 기 구축된 pET-PETase, pET-MBP-PETase, pET-Fh8-PETase, pET-GFP, pET-MBP-GFP, pET-Fh8-GFP 벡터를 사용하였다(Jo BH, Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(7), e00097-22). 썬모비브리오 암모니피칸스(*Thermovibrio ammonificans*) 유래 β-탄산무수화효소(β-taCA)의 발현을 위해, β-taCA의 아미노산 서열에 대한 코돈 최적화 및 유전자 합성을 수행하였으며(표 1), 이때 양 말단에는 NdeI과 XhoI 제한효소 서열을 추가하였다(Genscript, 미국). 합성된 β-TaCA의 각 유전자 DNA를 NdeI과 XhoI 제한효소를 이용하여 절단한 후 이를 동일한 제한효소로 처리된 pET-22b(+) 벡터(Novagen, 미국)에 삽입하였다,

표 1

[0055] 재조합 벡터 제작에 사용된 β-TaCA 단백질 및 이의 코딩 유전자 서열 정보

단백질 서열		(굵은 글씨: Hig ₆ -tag 서열)
β-TaCA	MKRKTPEEVVREIFFDNEKFARAKGREFFEAHIEAQSPVITLVTCSDSRVHPTVFSEKLIDRVFVIRNIGNQIESSAGSVYDYGVIHLQTPVLLILGHVNCGAVKAFKGYADESPFIRNELNHLICIPVSPFKGEGNFEVAVREAVESNVHWQVRVALERYGLLIRRNRLAVIGAIYDFANYYGRGFRIVVVNVNGIREREALLKHRALSLLPEELRREVVVLEHHHHHHH	(서열번호 7)
유전자 서열		(밑줄: 제한효소 부위, 굵은 글씨: Hig ₆ -tag 서열)
β-TaCA	CATATGAAAAGAAAAACACCTGAGGAAGTCGTTTCGAGAAATTTTCTTTGATAACGAAAAGTTCGCCGGGCAAAAGGGAGGAATTTTTCGAGGCCACATTGAAGCTCAAAGTCTGTTATAACCTTGTGACCTGCTCCGATTCGCGTGTTCATCCGACGGTCTTCAGTGAGAAGCTAATCGACAGAGTATTCGTGATTCGCAATATCGGCAATCAGATCGAGAGCAGCGCAGGTTTCAGTAGATTATGGCGTAATCCATCTGCAGACTCCGGTCTCTGCTGATTCTCGGGCACGTCAATTGTGAGAGCTGTAAAGCTTTTGTGAAAGGCTATGCCGATGAGTCTCCATTATTAGGAATGAGCTCAACCAATTTGTGTATTCGGTGAGCCCTTTAAGGGAGAAGGTAATTTGAAGTGGCTGGCGGAAGCGGTTGAGTCAAATGTCCATTGGCAGGTACGCGTGGCACTTGAGCGATACGGTTTACTGATCCGTCCGAACCGTCTTGCGGTTATTGGGGCTATTTATGACTTTGCAAATTACTATGGTCGGGGTTTGGCCGTATAGTGGTGGTTAACGTTAATGGAATACGTGAACGTGAAGCGCTGTTGAAACACCGCGCTCTCTTTATTACCAGAGGAAGTGCAGAGAAGTAGTAGTCTCGAGCACCACCAC	(서열번호 8)

[0057] PVY 태그는 식물 바이러스인 Potato Virus Y의 외피 단백질(CP_{PVY})의 N-말단 44개 아미노산으로 이루어진 태그(서열번호 1)이다. 기 구축된 pET-SP_{PEIB}-hmcA-CP_{PVY}*(Wi S. et al., Biomacromolecules 2020, 21, 3847-3856)를 주형으로 하여 표 2의 서열번호 9 및 10의 프라이머 세트를 이용하여 PVY 태그 코딩 유전자를 PCR 증폭하였다. pET-MBP-PETase와 pET-MBP-GFP 벡터에 NdeI과 NcoI 제한효소를 처리하여 MBP를 제거하였으며, 동일한 제한효소로 처리한 PVY 태그 코딩 유전자를 삽입하여 pET-PVY-PETase 및 pET-PVY-GFP 벡터를 구축하였다. β-taCA 유전자는 표 2의 서열번호 13 및 14의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하였으며, 이를 NcoI과 XhoI 제한효소를

처리한 pET-MBP-PETase, pET-Fh8-PETase 및 pET-PVY-PETase 벡터에 클로닝하여 pET-MBP- β taCA, pET-Fh8- β taCA 및 pET-PVY- β taCA를 구축하였다.

표 2

본 발명에 사용된 프라이머 세트 정보

Name	Sequence(5'-3') (서열번호)
PVY-tag	F: CATATGGGCAACGACACCATTGACGCG (9)
	R: CCATGGAGCCTCCACCGCGCTGCCACCTCCGCCGGTGTAGGTGCCGCTGGTGC (10)
PVY-tag-tandem repeat	F: AGATCTGGCAACGACACCATTGACGCG (11)
	R: GGATCCGGTGTAGGTGCCGCTGGTGC (12)
β -taCA	F: CCATGGGCAAAAGAAAACACCTGAGGAAGTC (13)
	R: CTCGAGGACTACTTCTCTGCGC (14)

밀줄: 제한효소 위치.

굵은 글씨: (GGGS)₂ 링커(linker) 서열

PVY 태그가 이중으로 연결된 태그(PVY_{x2})를 제작하기 위해 상기 표 2의 서열번호 9 및 12의 프라이머 세트를 이용하여 PVY 태그를 증폭하였으며, 이를 표 2의 서열번호 10 및 11의 프라이머 세트를 이용하여 증폭한 PVY 태그와 *Bam*HI-*Bgl*II 제한효소 결합 방식을 이용하여 연결하였다. PVY 태그가 삼중으로 연결된 태그(PVY_{x3}) 제작을 위해 표 2의 서열번호 9 및 12의 프라이머 세트, 서열번호 11 및 12의 프라이머 세트, 서열번호 10 및 11의 프라이머 세트를 이용하여 PVY 태그를 각각 증폭하였으며, 이들을 *Bam*HI-*Bgl*II 제한효소 결합 방식을 이용하여 연결하였다. 다중 PVY 태그는 단일 PVY 태그와 마찬가지로 양 말단에 *Nde*I 및 *Nco*I 제한효소 서열을 지닌다.

본 발명의 단일 PVY 태그 및 다중 PVY 태그는 재조합 벡터에 삽입 시 제한효소 위치 서열을 추가할 수 있고, 모든 태그의 C말단에는 (GGGS)₂ 링커 서열을 지니며, 모든 발현 단백질은 C-말단에 His₆ 태그 서열을 지니고 있다 (표 3).

표 3

단일 PVY 태그 및 다중 PVY 태그의 서열 정보

PVY	유전자	CATATGGGCAACGACACCATTGACGCGGGCGGCAGCACCAAAAAGGACGCGAAGCAAGAACAAGGCAGCATCCAACCGAACCTGAATAAAGAAAAGGAGAAAGACGTTAACGTCGGCACCAGCGGCACCTACACCGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGAGGCTCCATGG
	단백질	MGNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGYTGGGSGGGGSM
PVY _{x2}	유전자	CATATGGGCAACGACACCATTGACGCGGGCGGCAGCACCAAAAAGGACGCGAAGCAAGAACAAGGCAGCATCCAACCGAACCTGAATAAAGAAAAGGAGAAAGACGTTAACGTCGGCACCAGCGGCACCTACACCGATCTGGCAACGACACCATTTGACGCGGGCGGCAGCACCAAAAAGGACGCGAAGCAAGAACAAGGCAGCATCCAACCGAACCTGAATAAAGAAAAGGAGAAAGACGTTAACGTCGGCACCAGCGGCACCTACACCGGCGGAGGTGGCAGCGGGGTGGAGGCTCCATGG
	단백질	MGNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGYTGSNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGYTGGGSGGGGSM
PVY _{x3}	유전자	CATATGGGCAACGACACCATTGACGCGGGCGGCAGCACCAAAAAGGACGCGAAGCAAGAACAAGGCAGCATCCAACCGAACCTGAATAAAGAAAAGGAGAAAGACGTTAACGTCGGCACCAGCGGCACCTACACCGATCTGGCAACGACACCATTTGACGCGGGCGGCAGCACCAAAAAGGACGCGAAGCAAGAACAAGGCAGCATCCAACCGAACCTGAATAAAGAAAAGGAGAAAGACGTTAACGTCGGCACCAGCGGCACCTACACCGGCGGAGGTGGCAGCGGGGTGGAGGCTCCATGG
	단백질	MGNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGYTGSNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGYTGSNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGYTGGGSGGGGSM

밀줄: 제한효소 위치.

이탤릭체: (GGGS)₂ 링커 서열.

[0067] 짧은 글씨: 다중 PVY 태그의 연결 부위(*Bam*HI-*Bg*II).

[0069] 3. 단백질 발현 및 세포 분획

[0070] 발현 박터는 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 도입되었다. 재조합 균주는 37°C, 180 rpm 조건으로 50 µg/ml 암피실린 이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. OD₆₀₀ 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°C에서 4,000 xg 조건으로 10분 동안 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°C, 10,000 x g 조건으로 10분간 원심분리하였다. 이후 상등액은 수용성 분획(soluble fraction, S)으로, 침전된 펠렛은 동일한 부피의 용해버퍼로 재현탁하여 불용성 분획(insoluble fraction, IS)으로 명명하였다.

[0072] 4. 단백질 발현 분석

[0073] 단백질 발현은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)와 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 염색을 통해 분석하였다.

[0075] 5. IDP 특성 분석

[0076] IDP(Intrinsically disordered protein) 특성을 분석하기 위해 PVY 태그 서열을 이용하여 IUPred2A(<https://iupred2a.elte.hu/>), PONDR(<http://www.pondr.com/>) 및 DISpro(<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) 분석 툴을 이용하였다.

[0078] 실시예 1. 단일 PVY 태그에 의한 목적 단백질의 수용성 발현 향상

[0079] 단일 PVY 태그(PVY_{x1})의 목적 단백질 수용성 발현 향상 효과를 테스트하기 위해서 대장균에서 불용성으로 발현 되는 이데오넬라 사카이엔시스 유래 PETase, 씨모비브리오 암모니피칸스 유래 β-taCA 및 대표적인 형광단백질 인 GFP를 목적 단백질로 선정하였다.

[0080] PVY 태그가 융합된 목적 단백질과 PVY 태그가 융합되지 않은 목적 단백질을 37°C에서 발현시킨 결과, PVY 태그가 융합되지 않은 목적 단백질에 비해 PVY 태그가 융합된 목적 단백질의 수용성 발현이 증가하였고, 특히 목적 단백질 PETase의 경우 PVY 태그가 융합되지 않으면 대부분 불용성으로 발현된 반면 PVY 태그와 융합하면 대부분 수용성으로 발현된 것을 확인하였다(도 1).

[0082] 실시예 2. 단일 PVY 태그와 기존 수용성 태그의 비교

[0083] 단일 PVY 태그의 목적 단백질 수용성 발현 향상 효과를 기존 상용 태그인 MBP 태그 및 Fh8 태그와 비교하였다.

[0084] 그 결과, PETase는 PVY 태그와 융합시키면 대부분 수용성으로 발현되었으나 MBP 또는 Fh8 태그와 융합시키면 대부분 불용성으로 발현되었다. 또한, β-taCA는 Fh8 태그와 융합시키면 가장 높은 수용성 발현량을 보였고, MBP 태그와 융합시키면 태그가 융합되지 않은 β-taCA 단독 발현 보다 오히려 더 낮은 수준의 수용성 발현을 보였으며, PVY 태그와 융합시키면 불용성 발현량이 높았으나 Fh8 태그를 융합시킨 것과 유사한 수준의 수용성 발현량을 보였다. GFP는 태그를 융합시키더라도 대부분 불용성 발현을 보였으나, PVY 태그와 융합시키면 MBP와 Fh8 태그에 비해 수용성 발현이 약간 증가하였다(도 2).

[0086] 실시예 3. 다중 PVY 태그를 이용한 목적 단백질의 수용성 발현 향상

[0087] PVY 태그를 대상으로 IDP 특성을 분석하여, Disorder 값이 높게 나타난 것을 확인하였다(도 3). 이를 통해, 본 발명의 PVY 태그는 IDP(intrinsically disordered protein)이고, 매우 유연한(flexible) 성질을 지니고 있음을

확인하였다. IDP 태그는 융합된 목적 단백질 근처로 접근하는 다른 단백질을 막아주어 수용성을 향상시킬 수 있다. 융합 단백질 대비 IDP 태그의 크기가 상대적으로 작다면 수용성 발현 향상 효과가 적을 수 있으며, 이러한 경우 IDP 태그의 길이를 늘려주어 수용성 발현 향상 효과를 증가시킬 수 있을 것이다.

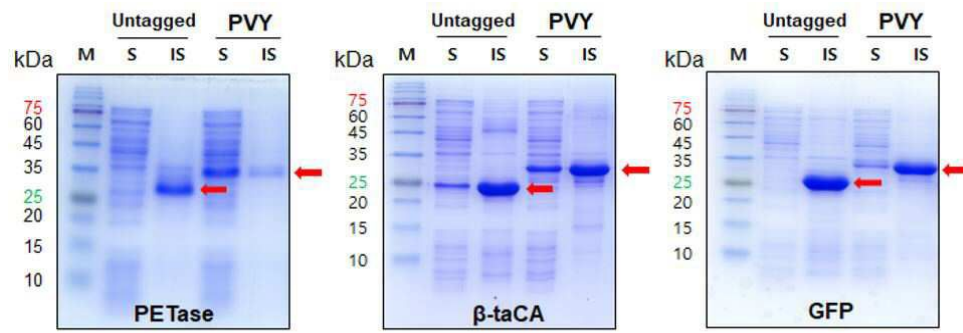
[0088] 본 발명에서는 PVY 태그를 이중(PVY_{×2}) 또는 삼중(PVY_{×3})으로 tandem repeat 형태로 연결한 다중 PVY 태그를 구축하였으며, 이러한 이중 또는 삼중 PVY 태그의 성능을 단일 PVY 태그와 비교하였다.

[0089] 그 결과, 목적 단백질 β-taCA 및 GFP를 단일 PVY 태그(PVY_{×1})와 융합시킨 것보다, 이중 PVY 태그(PVY_{×2}) 또는 삼중 PVY 태그(PVY_{×3})와 융합시킬 경우 목적 단백질의 수용성 발현량이 증가하였고, 특히 삼중 PVY 태그와 융합시키면 목적 단백질의 대부분이 수용성으로 발현된 것을 확인하였다(도 4).

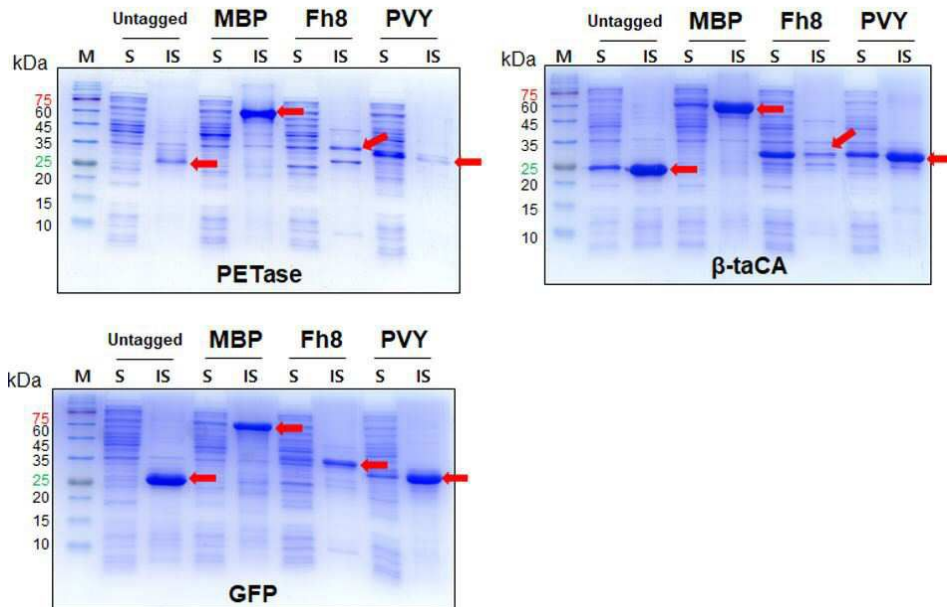
[0090] 본 발명의 융합 태그는 이중 또는 삼중 태그에 국한되지 않으며, 이러한 태그의 다중 연결은 목적 단백질의 수용성 발현에 매우 효과적인 전략이 될 수 있다.

도면

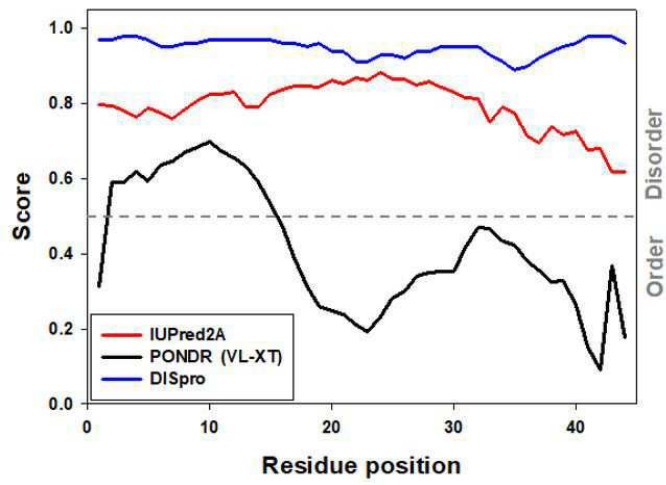
도면1



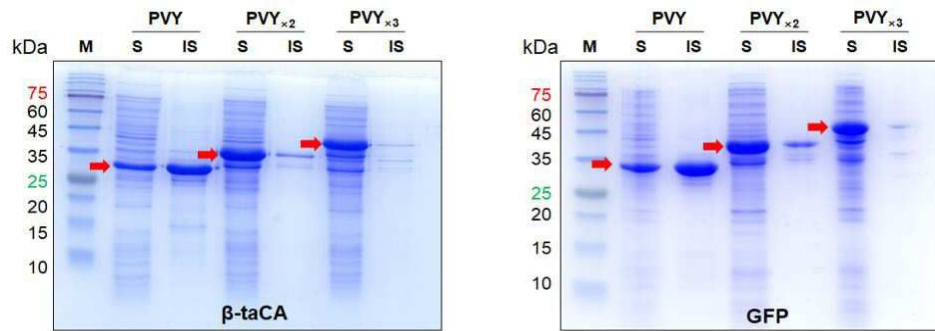
도면2



도면3



도면4



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.