

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0088014 (43) 공개일자 2016년07월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/62 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 C12N 15/62 (2013.01) C07K 19/00 (2013.01)	(72) 발명자 이지원 서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)	
(21) 출원번호 10-2015-0007134	이종환 경기도 부천시 소사구 소안로 20, 206동 1105호 (괴안동, 삼익세라믹아파트)	
(22) 출원일자 2015년01월15일	이보람 서울특별시 성북구 인촌로30길 6, 2층 (안암동5가)	
심사청구일자 2015년01월15일	(74) 대리인 이처영, 장제환	

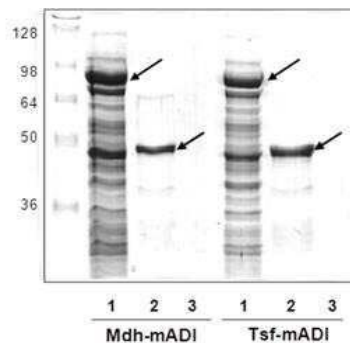
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **활성형 아르기닌 탈아민효소의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 Mdh (Malate dehydrogenase) 또는 Tsf (Elongation factor Ts)를 융합파트너로 이용한 활성형 아르기닌 탈아민효소 (ADI; arginine deiminase)의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 Mdh 또는 Tsf 유전자를 융합파트너로 포함하는 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct)를 이용하여 수용성 및 접힘(folding)이 향상된 활성형 아르기닌 탈아민효소 (ADI)의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 Mdh 또는 Tsf를 융합파트너로 이용한 아르기닌 탈아민효소 (ADI)의 제조방법은 난발현 ADI의 수용성 및 발현율을 향상시켜 본원의 항암 효소 활성을 유지할 수 있어, 이를 이용한 항암 치료제 개발 및 생산에 유용하다.

대표도 - 도4



M, 분자량 표지 마커

- 1, 융합파트너 융합발현 된 아르기닌 탈아민효소의 수용성 분석
- 2, 융합파트너가 제거 된 아르기닌 탈아민효소의 수용성 분석
- 3, 융합파트너가 제거 된 아르기닌 탈아민효소의 불용성 분석

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C12Y 305/03006 (2013.01)

C07K 2319/20 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014023207

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구

연구과제명 의료기능 맞춤형 단백질 나노입자 기반 차세대 나노의료 혁신기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

ADI 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ADI 유전자와 상기 Mdh 유전자 또는 상기 Tsf 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 유전자 구조체(gene construct).

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ADI 유전자와 상기 Mdh 유전자 또는 Tsf 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 유전자 구조체(gene construct).

청구항 4

ADI 유전자와 융합파트너로 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자를 포함하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 ADI 유전자와 융합파트너로 Mdh 유전자 또는 Tsf 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 ADI 유전자와 융합파트너로 Mdh 유전자 또는 Tsf 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 ADI 유전자는 서열번호 13으로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터.

청구항 8

제1항의 유전자 구조체(gene construct) 또는 제4항의 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유전자 구조체(gene construct)는 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 것을 특징으로

하는 재조합 미생물.

청구항 10

제8항의 재조합 미생물을 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 ADI 단백질의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 재조합 단백질로부터 Mdh 또는 Tsf를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 ADI 단백질의 제조방법.

청구항 12

제10항의 방법에 의해 제조되고, Mdh 또는 Tsf와 ADI가 융합된 재조합 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Mdh (Malate dehydrogenase) 또는 Tsf (Elongation factor Ts)를 융합파트너로 이용한 활성형 아르기닌 탈아민효소 (ADI: arginine deiminase)의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 Mdh 또는 Tsf 유전자를 융합파트너로 포함하는 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct)를 이용하여 수용성 및 접힘(folding)이 향상된 활성형 아르기닌 탈아민효소 (ADI)의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명공학 기술에 의해 생산되는 단백질에는 일반적으로 면역 조절 및 효소 저해제 및 호르몬 같은 의약 및 연구용 단백질과 진단용 단백질이나 반응 첨가 효소와 같은 산업용 단백질로 대별될 수 있으며, 이 두 가지 단백질들을 중심으로 생산 공정 기술 개발 및 산업화가 추진되고 있다.

[0003] 아르기닌 탈아민효소(ADI; arginine deiminase)는 암세포 대사에 핵심적인 아미노산인 아르기닌(arginine)을 분해하여 시트룰린(citrulline)과 암모니아(ammonia)를 생성시키는 박테리아 효소이다. 아르기닌 탈아민효소는 암 괴사(apoptosis)와 암 신생혈관생성(angiogenesis)저해 그리고 일산화질소 합성 저해를 통한 내독소(endotoxin)의 중성화 작용 등으로 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 흑색종(melanoma), 백혈병(leukemia), 전립선암(prostate cancer)에 항암기능을 하는 것으로 알려져 있다. 기존의 연구결과에 따르면 아르기닌 탈아민효소로 암세포에서 아르기닌(arginine)을 박탈하면 미토콘드리아 기능이상, 활성 산소종, 핵 DNA유출, 염색질 자가소화(autophagy)가 유발되어서 암세포를 사멸시킨다고 알려져 있다 (Chun A. Changou *et al.*, *PNAS*, 111(39) 14147-14152). 암 증식 억제 및 암 신생혈관생성과 같은 항암작용들로 인하여 아르기닌 탈아민효소는 암을 치료하는데 있어 효과적인 효소로 주목받고 있다. 실제로 현재 미국 샌디에고의 Polaris Pharmaceuticals에서 아르기닌 탈아민효소(arginine deiminase)에 평균 분자량이 20kDa인 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol) 사슬을 부착시켜서 ADI-PEG20 약물을 만들고 이를 통하여 현재 간암(임상 3상), 흑색종(임상 2상), 전립선암, 폐암, 전립선암, 구강암 (이하 임상 1상)과 같은 다양한 암치료를 위한 임상실험에 적용되고 있다. 따라서, 유전 정보가 잘 알려져 있으며 다양한 벡터 시스템을 적용할 수 있고, 비교적 값싼 배지에서 빠르게 고농도로 배양할 수 있는 장점을 갖는 대장균과 같은 미생물을 이용하여 아르기닌 탈아민효소(ADI) 등과 같이 의학적, 산업적으로 유용한 재조합 단백질을 생산할 수 있는 시스템의 구축이 필요하다.

[0004] 대장균에서 재조합 단백질을 생산함에 있어, 강력한 유도성(inducible) 프로모터를 갖춘 다양한 발현벡터가 개발되어 외래단백질의 생산에 이용되어 왔다. 그러나 숙주세포로 대장균을 이용하는 경우 제조하고자 하는 단백

질이 대장균 내의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 수율이 낮아지는 경우가 많으며, 특히 분자량이 10kDa 이하의 작은 크기의 폴리펩타이드의 발현에서 이러한 경향이 심한 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 일반적으로 대장균은 단백질의 전사(transcription)와 전이(translation)가 거의 동시에 일어나기 때문에 재조합 단백질의 과다 발현시 불용성 응집체(inclusion body)를 형성하는 경우가 많으며, 응집체로 발현된 폴리펩타이드의 경우 접힘(folding) 중간체가 분자 상호간의 다이설파이드 결합(inter-molecular disulfide bond) 또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 숙주세포의 다른 단백질 불순물들[샤페론(chaperon), 라이보솜(ribosome), 초기인자 등]과 비선택적으로 결합함으로써 목적 폴리펩타이드의 응집체 내 순도가 떨어지는 단점이 있다. 또한 이렇게 발현된 단백질을 활성형으로 만들기 위해서는 구아니딘-하이드로클로라이드(Guanidine hychloride)나 우레아(urea) 같은 변성체를 사용하여 용해시킨 후 희석하는 재접힘(refolding) 과정을 거쳐야 하는데 이때 단백질이 활성형으로 접히지 않는 등 생산 수율이 감소하는 문제점이 있다 (Marston FA *et al.*, *Biochem J* 240(1):1-12, 1986).

[0005] 대장균 내에서 활성형의 재조합 단백질을 고수율로 얻기 위해 대장균의 단백질 발현 속도를 늦추어 목적 단백질의 수용도를 높여주는 저온 발현방법(Hammarstrom *et al.*, *Protein Sci.* 11:313-321, 2002), mRNA의 친화력을 높일 수 있는 진보된 형태의 프로모터를 사용하거나 유도(induction) 조건의 최적화하는 방법 (Qing *et al.*, *Nat Biotechnol.* 22:877-882, 2004) 및 분자 샤페론 또는 단백질 접힘 조절자와 목적 단백질을 동시 발현시키는 방법(de Marco & De Marco, *J Biotechnol.* 109:45-52, 2004) 등이 시도되고 있지만, 목적 단백질의 아미노 말단에 융합파트너를 융합시켜서 발현시키는 방법이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 융합파트너를 융합시켜 발현할 경우 목적 단백질을 수용성으로 유도할 수 있는 장점이 있으며, 또한 엔테로카이네이즈(enterokinase)와 같은 효소를 이용하여 융합파트너를 제거함으로써 아미노 말단의 메티오닌 문제를 해결할 수 있다.

[0006] 실제로 대장균 내에서 외래단백질의 수용성 높은 발현을 유도하는 여러 융합파트너가 지난 수년 동안 연구되고 보고되어왔다 (Esposito & Chatterjee, *Curr Opin Biotechnol.* 17:353-358 2006; Kapust & Waugh, *Protein Sci.* 8:1668-1674, 1999; Sachdev & Chirgwin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:933-937, 1998). 가장 많이 연구된 대표적인 융합파트너로는 말토오스 결합 단백질 (Maltose binding protein; MBP), 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase; GST), 티오레독신 (Thioredoxin; Trx), NusA 등이 있다. 말토오스 결합 단백질의 경우 이량체 형성에 관여하는 부분에 소수성을 띠는 아미노산이 모여 만들어진 넓은 소수성 틈새가 새로 합성되는 단백질의 소수성 부위를 효과적으로 감춰주어 목적단백질이 불용성 응집체가 되는 것을 방지해 주며, 티오레독신은 목적단백질의 다이설파이드 결합을 도와주고, NusA의 경우 대장균에서 과량으로 발현되었을 때 활성형으로 접히는 능력이 매우 뛰어나므로 뒤따라 발현되는 목적단백질의 올바른 접힘을 유도한다고 알려져 있다 (Bach H *et al.*, *J Mol Biol* 312:79-93, 2001; Edward RL *et al.*, *Nat Biotechnol* 11:187-193, 1993; Davis GD *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 65:382-388, 1999).

[0007] 이러한 융합파트너는 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 방법을 이용하여 융합발현 된 목적단백질을 쉽게 정제할 수 있다는 장점이 있으며, 각기 다른 분자생물학적 특성을 이용하여 목적단백질의 접힘을 돕는다고 알려져 있다. 하지만 이러한 융합파트너들은 목적단백질에 비해 상대적으로 크기가 크기 때문에 융합 부분의 크기에 따라 목적단백질의 수율이 현저히 떨어진다는 단점과 의료목적 또는 산업적으로 유용한 단백질들에 모두 범용적으로 작용하지 않는다는 단점이 있다. 또한, 이합체(dimer)를 형성하여 목적 단백질 또한 이합체(dimer)형태로 생산되는 경우도 있을뿐 아니라, 목적단백질을 수용성으로 발현을 유도하더라도 고유한 기능을 수행하는 활성형으로 발현을 유도하는 데는 실패하는 경우가 많고, 적합한 용도로 이용되기 위하여 융합파트너의 제거 과정이 추가되어야 하는 공정상의 불합리성을 지닌다는 문제점이 있다. 또한, 상업적으로나 의학적으로 매우 중요한 단백질은 분비 단백질(secretory protein) 및 막 단백질(membrane protein)들로서 대장균 내에서 발현 시 불용성 응집체를 만드는 난발현성 단백질(difficult-to-express proteins)이어서 개발이 지연되고 있다. 이를 극복하기 위해서는 다양한 장점을 지니고 있는 대장균 시스템을 활용하여 난발현 단백질의 발현효율을 증대시키기 위한 발현시스템을 개발하여, 이에 관한 원천 기반기술을 확보하는 것이 중요하다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 항암 효능이 있는 난발현 박테리아 효소의 활성형 발현 시스템을 구축하고자 예의 노력한 결과, Mdh 또는 Tsf를 융합파트너로 이용하여 아르기닌 탈아민효소 (ADI: arginine deiminase)와 융합 발현시킬 경우, 아르기닌 탈아민효소의 수용성 및 활성형 발현이 현저히 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 Mdh 또는 Tsf 유전자를 융합파트너로 이용하여 아르기닌 탈아민효소 (ADI; arginine deiminase)의 수용성 및 접힘을 향상시킬 수 있는, 재조합 단백질 생산용 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct)를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct)가 도입되어 있는 재조합 미생물 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 Mdh 또는 Tsf와 아르기닌 탈아민효소(ADI)가 융합된 재조합 단백질을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ADI 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct)를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, ADI 유전자와 융합파트너로 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자를 포함하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 유전자 구조체(gene construct) 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 재조합 ADI 단백질의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, Mdh 또는 Tsf와 ADI가 융합된 재조합 단백질을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 Mdh 또는 Tsf를 융합파트너로 이용한 아르기닌 탈아민효소 (ADI)의 제조방법은 난발현 ADI의 수용성 및 발현율을 향상시켜 본원의 항암 효소 활성을 유지할 수 있어, 이를 이용한 항암 치료제 개발 및 생산에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 ADI 유전자만을 단독 포함하는 발현벡터(A) 및 융합파트너 (Mdh, Tsf 및 GST) 유전자와 ADI 유전자 사이에 엔테로키나제 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 연결된 융합 발현벡터(B)의 도식도이다.
- 도 2는 ADI 단독발현 및 융합파트너 (Mdh, Tsf 및 GST)와 ADI 융합발현 결과를 SDS-PAGE로 나타낸 것이다.
- 도 3은 ADI 단독발현 및 융합파트너 (Mdh, Tsf 및 GST)와 ADI 융합발현의 발현 수준 및 수용성 발현량을 비교한 결과이다.
- 도 4는 융합파트너 (Mdh 및 Tsf)가 제거된 활성형 ADI의 SDS-PAGE 분석 결과이다.
- 도 5는 융합파트너 (Mdh 및 Tsf)가 제거된 활성형 ADI의 활성도를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0020] 대장균에서 목적 단백질은 불용성 응집체로 발현되는 경우가 많다. 즉, 대장균 발현시스템 내에서는 전사와 전

이가 거의 동시에 일어나며, 재조합 단백질의 과다 발현 시, 목적 단백질 또는 대장균 숙주세포 내 다른 단백질들의 접힘(folding) 중간체들 사이의 비특이적인 결합에 의해 인접한 하이드로포빅(hydrophobic) 폴리펩타이드 체인들은 응집체(inclusion body)로 알려진 불용성 응집체를 형성한다고 알려져 있다. 단백질의 접힘을 저해하는 조건에서도 활성이 유지되며 발현량이 우수한 단백질은 단백질의 잘못된 접힘(misfolding)을 극복하기 위한 대장균의 생체 메커니즘에 관여할 수 있고, 단백질 구조가 안정적이며 자체 접힘 능력이 뛰어나므로 융합파트너로서 효과적으로 이용될 수 있다. 대장균 융합발현파트너 중에서 가장 효율성이 높다고 알려진 융합발현파트너는 말토오즈 결합 단백질(Maltose binding protein, 'MBP'; Bedouelle and Duplay, *Eur J Biochem*, 1998)이다. 하지만 상당수의 단백질에 대해서 효과적이라고 알려진 MBP도 많은 단백질에 대해서 수용성 발현 개선 효과를 보이지 못하고 있다 (Hammarstrom *et al.*, *J Struct Funct Genomics*, 2006).

- [0021] 본 발명에서는 말산탈수소효소 (Mdh; Malate dehydrogenase) 또는 Tsf (Elongation factor Ts) 유전자를 융합파트너로 이용하여 아르기닌 탈아민효소 (ADI; arginine deiminase)의 활성형을 생산함으로써, 불용성 응집체를 변성제나 활성제를 사용하지 않고 효소 본연의 활성 및 구조를 유지할 수 있는 고부가가치 의약품 단백질 제조 방법을 제공하였다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, ADI 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct)에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 ADI 유전자와 상기 Mdh 유전자 또는 상기 Tsf 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 ADI 유전자와 상기 Mdh 유전자 또는 Tsf 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 다른 관점에서, ADI 유전자와 융합파트너로 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자를 포함하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 ADI 유전자와 융합파트너로 Mdh 유전자 또는 Tsf 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 ADI 유전자와 상기 Mdh 유전자 또는 상기 Tsf 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 ADI 유전자는 서열번호 13으로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 발현벡터는 상기 융합파트너 Mdh 또는 Tsf 유전자와 목적 단백질 ADI 유전자를 일련의 순서로 포함함으로써 상기 융합파트너 Mdh 또는 Tsf와 ADI를 재조합 단백질로 발현할 수 있다.
- [0030] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다. 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 갈슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0032] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으

로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

- [0033] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0034] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0035] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 ADI 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct) 또는 상기 ADI 유전자와 융합파트너로 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자를 포함하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 구조체(gene construct)는 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.
- [0039] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작 방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 ADI 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct) 또는 상기 ADI 유전자와 융합파트너로 서열번호 11로 표시되는 Mdh 유전자 또는 서열번호 12로 표시되는 Tsf 유전자를 포함하는 재조합 ADI 생산용 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 ADI 단백질의 제조방법에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 단백질로부터 Mdh 또는 Tsf를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 융합파트너와 융합할 목적 단백질이 산업용 단백질일 경우, 융합파트너가 목적 단백질의 기능을 저하할 수도 있으며, 의학용 단백질일 경우는 항원항체 반응을 야기할 수 있으므로 융합파트너는 제거되는 것이 바람직하다. 이때, 상기 단백질 절단효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위, 제네나제(Genenase) I 인식부위 또는 퓨린(Furin) 인식부위가 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있

다.

- [0043] 또한, 재조합 단백질의 분리 정제가 용이하도록, 본 발명의 벡터의 융합파트너 또는 목적 단백질의 유전자에 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 작동 가능하도록 연결할 수 있다. 이때, 상기 분리정제용 태그는 GST, poly-Arg, FLAG, poly-His 및 c-myc 등이 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다. 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 벡터는 pT7 벡터에 분리정제용 태그, 상기 융합파트너의 유전자 및 목적 단백질의 유전자를 일련의 순서로 포함함으로써 분리정제용 태그, 상기 융합파트너 및 목적 단백질을 포함하는 재조합 단백질을 발현할 수 있다.
- [0044] 상기 목적 단백질의 유전자는 제한효소 부위를 통해 클로닝 될 수 있고, 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 사용된 경우에는 상기 폴리뉴클레오티드와 틀이 맞도록(in frame) 연결되어, 목적 단백질 분비 후 단백질 절단효소로 절단하여, 원래 형태의 목적 단백질을 생산할 수 있도록 할 수 있다.
- [0045] 본원의 용어, "목적 단백질(target protein)" 또는 "외래 단백질(heterologous protein)"은 업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0046] 또한, 본 발명에서, "재조합 융합 단백질"이란, 목적단백질 ADI와 Mdh 또는 Tsf가 융합되어 있는 형태의 단백질을 의미한다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조되고 Mdh 또는 Tsf와 ADI가 융합된 재조합 단백질에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명의 Mdh 또는 Tsf를 융합파트너로 사용하여 ADI 단백질을 생산하는 방법은 융합 발현된 ADI 고유의 3차 구조 및 본원의 효소 활성을 유지할 수 있으므로, 고부가가치 단백질 의약품 생산에 폭넓게 이용될 수 있는 특징이 있다.

[실시예]

- [0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0051] 실시예 1: 환경 스트레스에 의한 대장균 단백질체 변화 분석

- [0052] 융합파트너가 가져야 할 조건으로는 높은 발현률, 효과적인 3차원 구조형성 등을 들 수 있다. 특히 효과적인 3차원 구조를 형성하기 위해서는 단백질의 구조적 안정성이 전제되어야 한다. 이에, 생산 균주의 발현 환경에 변화를 유도하고 발현량 및 그 기능성이 유지되는 단백질을 분석하였다.

[0053] 1-1 : 단백질체 분석을 위한 수용성 단백질 준비

- [0054] 단백질체 분석을 위해 대장균 BL21(DE3) 균주를 선택하고, 하룻밤 동안 배양된 종균 배양액의 일부를 LB 배지에 접종한 다음 37℃, 130 rpm에서 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀이 0.5에 도달했을 때, 단백질의 3차원 접힘을 저해하는 물질인 구아니딘 하이드로클로라이드(guanidine hydrochloride, 이하 'GdnHCl') 및 2-hydroxyethyl disulfide (이하 '2HEDS')를 최종 농도 0.1 mM 및 10 mM로 대장균 배양액에 첨가한 뒤 3시간 더 배양하였으며, 비교 대장균은 GdnHCl와 2HEDS의 첨가 없이 동일 시간 동안 배양하였다. 배양된 대장균 BL21(DE3) 배양액을 6000 rpm, 4℃ 에서 원심분리하여 균체 침전물을 회수하여 pH 8.0, 40 mM 트리스 버퍼 (Tris buffer)로 2회 세척하였다. 세척된 대장균 침전물을 500 μl의 파쇄 용액 (lysis buffer; 8 M 우레아(urea), 4% (w/v) 챔스(CHAPS), 40 mM 트리스(Tris), 단백질 분해효소 제한 혼합물(protease inhibitor cocktail))에 현탁한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 균체 파쇄 후 12,000 rpm, 4℃ 에서 60분간 원심분리 하여 균체 파쇄물을 제거한 뒤 상등액을 분리하였다.

[0055] **1-2 : 단백질체 분석을 위한 2차원 겔 전기영동 (2-dimensional gel electrophoresis)**

[0056] 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트 (Bio-Rad protein assay kit)를 이용하여 측정하였다. 30 mg의 수용성 단백질을 포함하고 있는 상등액을 분획하여 재수화 용액(rehydration solution; 2 M 싸이오우레아(thiourea), 8 M 우레아(urea), 4 % w/v 쉵스(CHAPS), 1 % w/v DTT, 1 % w/v 이동성 양성전해질(carrier ampholyte), pH 4.7)에 현탁 하였다. 1차원 등전점 분리과정은 바이오-라드 단백질 IEF cell 전기영동장치 (Bio-Rad Protein IEF cell electrophoresis system)를 이용하였으며, 선형 pH4-7 범위의 IPG(immobilized pH gradient) 겔 스트립(17 cm, ReadyStrip)을 이용하여 재수화 용액에 포함되어 있는 단백질을 하룻밤 동안 재수화 하였다. 500 V에서 2시간, 1000 V에서 30분, 2000 V에서 30분, 4000 V에서 30분, 8000 V에서 70000 Vhr 동안 진행하였다. 재수화된 IPG 겔 스트립은 1 % DTT를 포함하고 있는 평형화 용액(equilibration solution; 50 mM 트리스(Tris), pH 8.6, 6 M 우레아(urea), 30 % v/v 글리세롤(glycerol), 2 % SDS, 약간의 브로모페놀 블루(bromophenol blue)에서 15분간 반응시킨 뒤 2.5 % 아이오도아세트아마이드(iodoacetamide)가 포함된 평형화 용액에서 15분간 반응시켰다. 평형화된 겔 스트립은 12.5% 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 2차원 전기영동 한 뒤, 은-염색(silver staining)을 통해서 단백질 스팟을 검출한다. 염색된 겔은 GS-710 밀도계(densitometer)를 이용하여 스캐닝 한 후 PDQuest 소프트웨어 버전 6.1을 이용하여 단백질 스팟을 확인하였다. 단백질 스팟의 부피를 측정하여 비교 대장균에서 분리한 단백질을 기준으로 GdnHCl과 2-HEDS가 첨가된 대장균 단백질의 발현량을 상대적으로 비교 분석한 뒤, 스팟 부피가 증가한 단백질을 동정하였다.

[0057] **실시예 2 : MALDI-TOF-MS 분석 및 단백질 동정**

[0058] MALDI-TOF-MS 분석을 위해서 실시예 1에서 선정된 비교 대장균의 단백질 보다 증가한 단백질을 은-염색된 겔로부터 추출하였다. 추출 된 단백질 스팟을 25 nM 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate, pH 8.0) 용액에서 트립신(trypsin, 10.15 mg/ml) 분해 과정을 37℃ 에서 하룻밤 동안 진행하였다. 분해된 펩타이드는 5 % v/v TFA, 50 % v/v ACN 용액을 이용하여 추출하였으며, 이 과정을 세 번 반복한 뒤 진공 원심분리기를 이용하여 건조시켰다. 건조된 펩타이드를 50 % ACN / 0.1 % TFA 용액에 용해시킨 뒤 MALDI-TOF-MS 시스템 (MALDI-TOF-MS system (Voyager DE-STR instrument; Biosystems))을 이용하여 분석하였다. 분석된 펩타이드 질량 지문(peptide mass fingerprints)은 Prospector 웹사이트의 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)을 이용하여 수행하였으며, 단백질 동정을 위한 MS-FIT 데이터 베이스는 Swiss-Prot을 이용하였다.

[0059] 단백질 동정을 수행한 결과, GdnHCl 스트레스 조건에서 발현량이 각각 1.88배 및 3.08배 이상 증가하고 구조적 안정성을 유지하여, 스트레스 내성을 보이는 단백질은 Mdh 및 Tsf로 확인되었다 (표 1).

표 1

[0060] Mdh 및 Tsf 단백질 정보

유전자 이름	유전자 접근 번호 ^a	단백질 이름	등전점(pI)/분자량(kDa)		서열 유사성(%)
			이론값 ^b	실험값 ^c	
Mdh	P61889	Malate dehydrogenase	5.61/32.34	5.63/33.12	18%
Tsf	P0A6P1	Elongation factor Ts	5.22/30.29	5.15/31.62	47%

[0061] a. 유전자 접근 번호 : ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>)에서 유전자 정보를 검색하기 위한 식별번호

[0062] b. 이론값은 Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 수집하였다.

[0063] c. 실험값은 이차원 전기영동 겔 이미지로부터 산출하였다.

[0064] **실시예 3 : 아미노 말단에 Mdh 또는 Tsf를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터의 제조**

[0065] **3-1: Mdh를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터**

[0066] 실시예 1 내지 2의 방법으로 선정된 환경 스트레스 하에 수용성 발현량이 증가한 대장균 단백질 Mdh(Malate dehydrogenase)를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

[0067] Mdh 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드를 획득하기 위해, Entrez Nucleotide 데이터베이스의 gi:49175990에서 3381352bp 내지 3382290bp의 서열정보(서열번호 11)를 이용하여 정지 코돈을 제외한 Mdh 유전자의 PCR 증폭을 위한 프라이머쌍을 제작하였다. 또한, 상기 프라이머쌍의 센스 프라이머(서열번호 1: cat atg aaa gtc gca gtc ctc ggc)에는 *NdeI* 제한효소 인식서열을, 안티센스 프라이머(서열번호 2: ctc gag ctt att aac gaa ctc ttg)에는 *XhoI* 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작하였다. PCR은 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 대장균으로부터 분리한 염색체를 주형 DNA로 100 ng, 서열번호 1 내지 2로 표시되는 프라이머쌍을 각각 50 pmol을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 수행하였다. 반응 조건은 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 수행하였으며, 그 결과 증폭된 DNA절편의 5' 말단에 *NdeI* 제한효소 부위와 3' 말단에 *XhoI* 제한 효소 부위를 포함하는 PCR 산물을 수득하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*으로 각각 처리하여 pT7-7(Novagen, USA)의 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*자리에 삽입하였고 이를 pT7-Mdh라고 명명하였다.

[0068] **3-2: Tsf를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터**

[0069] 실시예 1 내지 2의 방법으로 선정된 환경 스트레스 하에 수용성 발현량이 증가한 대장균 단백질 Tsf(Elongation factor Ts)를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

[0070] Tsf 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드를 획득하기 위해, Entrez Nucleotide 데이터베이스의 gi:49175990에서 190857bp 내지 191708bp의 서열정보(서열번호 12)를 이용하여 정지 코돈을 제외한 Tsf 유전자의 PCR 증폭을 위한 프라이머쌍을 제작하였다. 또한, 상기 프라이머쌍의 센스 프라이머(서열번호 3: cat atg gct gaa att acc gca tcc ctg gta aaa)에는 *NdeI* 제한효소 인식서열을, 안티센스 프라이머(서열번호 4: ctc gag aga ctg ctt gga cat cgc agc aac ttc)에는 *XhoI* 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작하였다. PCR은 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 대장균으로부터 분리한 염색체를 주형 DNA로 100 ng, 서열번호 3 내지 4로 표시되는 프라이머쌍을 각각 50 pmol을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 수행하였다. 반응 조건은 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 수행하였으며, 그 결과 증폭된 DNA절편의 5' 말단에 *NdeI* 제한효소 부위와 3' 말단에 *XhoI* 제한 효소 부위를 포함하는 PCR 산물을 수득하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*으로 각각 처리하여 pT7-7(Novagen, USA)의 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*자리에 삽입하였고 이를 pT7-Tsf라고 명명하였다.

[0071] **실시예 4 : ADI의 단독발현 벡터 및 Mdh 또는 Tsf 융합발현 벡터 제조**

[0072] Mdh 또는 Tsf를 융합발현파트너로 이용하여 아르기닌 탈아민효소(ADI)의 수용성 발현 유도를 확인하기 위해 ADI의 단독발현 및 단백질 절단효소 인식부위를 포함하는 융합발현 벡터를 제조하였다.

[0073] **4-1 : ADI의 단독발현 벡터**

[0074] 본 발명에 사용된 목적 단백질은 아르기닌 탈아민효소 (arginine deiminase, 이하 ADI; 서열번호 13)이다. 목적 단백질의 주형 DNA는 상기 단백질들을 많이 발현하는 인간 조직으로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1μg과 oligo-d(T) 1μl (Invitrogen, USA, 0.5 μg/μl)에 증류수를 50μl 까지 채운 후, AccuPower RTpremix(Bioneer, 한국)에 넣어 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 반응시켰다. 70℃에서 5분, 4℃에서 5분, 42℃에서 60분, 94℃에서 5분, 4℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성함으로써 수득하였다.

[0075] 상기 ADI의 단독 발현벡터를 제조하기 위해서 ADI의 5'-말단에 *NdeI*, 3'-말단에 *HindIII* 제한효소 인식부위를 포함하도록 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain

reaction)의 조건은, 센스 프라이머(서열번호 5: ctc atg tct gta ttt gac agt), 안티센스 프라이머(서열번호 6: aag ctt cta tca ctt aac atc)를 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 PCR을 수행하였다. 구체적으로, ADI는 시작 코돈을 제외하고 정지 코돈을 포함하는 아미노산 서열을 증폭하였다.

[0076] 상기 증폭된 ADI를 코딩하는 *NdeI/HindIII* 단편을 잘라낸 후 대장균 발현벡터 pT7(Novagen) 벡터의 *NdeI/HindIII* 자리에 삽입하여 단백질 단독발현 벡터를 제작하였다(도 1A).

[0077] 4-2 : ADI의 융합파트너와의 융합발현 벡터

[0078] ADI의 5'-말단에 *XhoI* 제한효소 인식서열과 3'-말단에 *HindIII* 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작된 센스 프라이머(서열번호 7: ctc gag gat gac gat gac aag tct gta ttt ga), 안티센스 프라이머(서열번호 6: aag ctt cta tca ctt aac atc)를 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 PCR을 수행하였다. 구체적으로, ADI는 시작 코돈을 제외하고 정지 코돈을 포함하는 아미노산 서열을 증폭하였다.

[0079] 상기 PCR 증폭 산물을 *XhoI/HindIII* 제한 효소로 처리한 후, 실시예 3의 방법으로 제작한 발현벡터 pT7-Mdh 또는 pT7-Tsf의 *XhoI/HindIII* 자리에 삽입함으로써 외래단백질의 융합파트너와의 융합발현 벡터를 제작하였다. 상기의 방법으로 만들어진 플라스미드를 각각 Mdh::ADI 및 Tsf::ADI 라고 명명하였다.

[0080] 또한, 기존에 효과적인 융합파트너라고 알려져 있는 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase, 이하 'GST')를 ADI의 아미노 말단에 융합파트너로 삽입한 뒤 GST::ADI를 제조하였다.

[0081] 4-3 : 6개의 히스티딘 및 단백질 절단효소 부위를 포함하는 정제용 발현 벡터

[0082] Mdh 또는 Tsf가 융합발현된 ADI를 정제하기 위해서, Mdh 또는 Tsf의 5'-말단에 6개의 히스티딘을 포함하며 Mdh 또는 Tsf 융합파트너와 ADI 사이에 엔테로카이네이즈(enterokinase)에 의해 인지되어 절단될 수 있는 시퀀스를 포함하는, 다음과 같은 정제용 발현벡터를 제작하였다.

[0083] Mdh의 5'-말단에 6개의 히스티딘(histidine, 이하 'His6')과 *NdeI*, 3'-말단에 *XhoI* 제한효소 인지부위를 포함하도록, 센스 프라이머(서열번호 8: cat atg cac cat cac cat cac cat aaa gtc gca gtc ctc ggc) 및 안티센스 프라이머(서열번호 2: ctc gag ctt att aac gaa ctc ttg)를 제작하였으며, Tsf의 5'-말단에 6개의 히스티딘(histidine, 이하 'His6')과 *NdeI*, 3'-말단에 *XhoI* 제한효소 인지부위를 포함하도록, 센스 프라이머(서열번호 9: cat atg cac cat cac cat cac cat gct gaa att acc gca tcc ctg gta aaa) 및 안티센스 프라이머(서열번호 4: ctc gag aga ctg ctt gga cat cgc agc aac ttc)를 제작하였다. 상기 제작한 프라이머를 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄ 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 증폭된 정제용 His6-Mdh 및 His6-Tsf를 코딩하는 *NdeI/XhoI* 단편을 잘라낸 후 ADI가 포함되어 있는 발현 벡터의 *NdeI/XhoI* 자리에 삽입하였고, 이를 H6::Mdh::ADI 및 H6::Tsf::ADI로 명명하였다.

[0084] 또한, 융합단백질로부터 ADI를 분리해 내기 위하여 ADI의 5'-말단에 엔테로카이네이즈(enterokinase)에 의해 인지되어 절단될 수 있는 시퀀스(DDDDK, 이하 D_K)와 *XhoI* 제한효소 인지부위, 3'-말단에 *HindIII* 제한효소 인지부위를 포함하도록, ADI 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편의 센스 프라이머(서열번호 10: ctc gag gat gac gat gac aag tct gta ttt gac agt), 안티센스 프라이머(서열번호 6: aag ctt cta tca ctt aac atc)를 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄ 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 증폭된 엔테로카이네이즈(enterokinase) 인지 시퀀스-목적단백질을 코딩하는 *XhoI/HindIII* 단편을 잘라낸 후 H6::Mdh 및 H6::Tsf가 포함되어 있는 발현 벡터의 *XhoI/HindIII* 자리에 삽입하

였고, 이를 H6::Mdh::EK::ADI 및 H6::Tsf::EK::ADI로 명명하였다(도 1B).

[0085] 실시예 5 : ADI 재조합 단백질의 수용성 발현

[0086] 실시예 4의 방법으로 제조한 ADI의 단독발현 벡터 및 융합파트너와의 융합발현 벡터를 대장균에 형질전환하여 배양한 뒤, IPTG로 재조합 ADI의 발현을 유도함으로써 Mdh 또는 Tsf 융합파트너에 의한 수용성 발현의 효과를 확인하였다.

[0087] 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, DNA Cloning vol.1 109-135, IRS press, 1985)에 의해 실시예 4의 벡터들을 대장균에 형질전환 하였다. 구체적으로 CaCl₂로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 실시예 4의 벡터들을 열충격 방법으로 형질전환시킨 후, 앰피실린(ampicillin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 앰피실린 저항성을 나타내는 콜로니를 선별하였다. 융합파트너와의 융합발현 벡터 pT7-Mdh 및 pT7-Tsf로 형질전환된 대장균을 BL21(DE3):pT7-Mdh 및 BL21(DE3):pT7-Tsf로 명명하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100 mg/ml 앰피실린을 포함하는 LB 배지에 접종한 다음 37℃에서 130 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀이 0.5에 이르렀을 때 IPTG를 첨가(1 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건(37℃)으로 4시간 더 배양하거나, 20℃에서 130rpm으로 12시간 동안 배양하였다.

[0088] 상기 방법으로 배양한 대장균을 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 ml의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 균체 파쇄물을 분리하였다. 균체 파쇄물은 1% 트리톤 엑스 100 (Triton X-100)을 이용하여 2회 세척하였다. 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, USA)를 이용하여 측정하였다. 상등액과 균체 파쇄물을 각각 5 X SDS(0.156 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 10% SDS-PAGE 겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색하여 각각의 재조합 단백질의 발현량을 밀도계(Densitometer, Duoscan T1200, Bio-Rad, USA)로 확인하고, 수확식 1에 따라 용해도(%)를 계산하였다.

수확식 1

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{상등액단백질총량}(\mu\text{g}) \times 100}{\text{상등액단백질총량}(\mu\text{g}) + \text{침전물단백질총량}(\mu\text{g})}$$

[0089]

[0090] 그 결과, Mdh 또는 Tsf와 융합한 ADI의 발현이 대부분 불용성 응집체보다 수용성 발현에서 더 많은 것을 확인하였으며, 또한 단독 발현한 ADI의 수용성 발현량보다 Mdh 또는 Tsf와 융합한 외ADI에서 용해도가 매우 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 단독발현 ADI와 Mdh 또는 Tsf를 융합발현 한 ADI의 수용성 발현 수준은 도 3에서 확인할 수 있듯이 ADI의 수용성 발현량이 증가하였다. 이러한 결과는 융합파트너로서 Mdh 또는 Tsf가 의료 기능성 효소인 ADI의 활성 발현 및 생산효율 증대에 효과가 크다는 것을 의미한다.

[0091] 또한, 기존에 효과적인 융합파트너라고 알려져 있는 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase, 이하 'GST')을 ADI의 아미노 말단에 융합파트너로 삽입한 뒤 (GST::ADI), 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질전환하여 동일한 방법으로 발현 양상을 확인한 결과, Mdh 또는 Tsf를 아미노 말단에 융합파트너로 사용한 것이 GST를 융합파트너로 사용한 것 보다 수용성 발현량의 증가 정도가 훨씬 더 뛰어남을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0092] 실시예 6 : ADI 재조합 단백질의 활성화

[0093] 6-1 : Mdh 또는 Tsf 융합발현을 통해 생산된 ADI의 정제 및 분석

[0094] 상기 실시예 4를 통하여 구축한 발현 벡터 Mdh::ADI와 Tsf::ADI로 형질전환 된 대장균 BL21(DE3)를 이용하여 상기 실시예 5의 초음파 파쇄 단계까지 동일하게 시행하였다. 융합파트너(Mdh, Tsf) N-말단 쪽에는 6개의 histidine이 위치하게 되고 histidin과 Ni⁺² 금속의 친화력을 이용한 크로마토그래피를 통해 정제가 가능하게

하였다. Ni-NTA Agarose bead(QIAGEN)를 사용하여 Ni^{+2} 금속 친화 크로마토그래피를 수행하였으며, 이를 통해, Mdh::ADI와 Tsf::ADI 만을 각각 성공적으로 정제할 수 있다.

[0095] 정제과정은 세포를 파쇄한 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 분리된 상등액을 금속친화를 이용한 정제를 위해서 Ni-NTA Agarose bead (QIAGEN) 500mL과 결합시켰다. Ni-NTA Agarose bead와 반응시키기 전에 결합 완충액 [binding buffer, pH 8.0, 50 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 300 mM 염화 나트륨 (NaCl), 10 mM 이미다졸(imidazole)]을 사용하여 세척하였다. His6-Mdh-D4K-ADI 또는 His6-Tsf-D4K-ADI가 포함되어 있는 상등액과 Ni-NTA Agarose bead의 결합은 4℃에서 진행하고 2시간 이상 충분히 결합시킨 후 8 mL의 세척 완충액 [washing buffer, pH 8.0, 50 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 300 mM 염화 나트륨 (NaCl), 50 mM 이미다졸(imidazole)]을 이용하여 두 번 세척하였다. 다음 단계로 PBS 완충용액 [PBS buffer, 137 mM 염화 나트륨 (NaCl), 2.7 mM 염화 칼륨(KCl), 10 mM 제1인산나트륨(Na_2HPO_4), 2 mM 제1인산칼륨(KH_2PO_4), pH 7.4]을 이용하여 한번 더 추가 세척하였다. Agarose bead에 붙어 있는 His6-Mdh-D4K-ADI 또는 His6-Tsf-D4K-ADI에 테로카이네이즈 용액[enterokinase 5 μ L, 10 X enterokinase buffer 50 μ L, PBS 445 μ L (Invitrogen)] 500 μ L을 첨가하여 22℃에서 12시간 반응시키고 elution fraction을 받아 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 수용성과 불용성 용액을 분리하였다. 분리한 샘플은 SDS-PAGE 분석을 통해 융합파트너 Mdh 또는 Tsf가 제거된 후에도 아르기닌 탈 이민효소가 여전히 수용성 상태로 남아 있음을 확인하였다 (도 4).

[0096] 6-2 : Mdh 또는 Tsf가 제거된 ADI의 활성도 측정

[0097] 융합발현파트너는 목적 단백질을 수용성의 형태로 발현시키는 것도 중요하지만 고유의 3차 구조를 갖도록 유도하여 기능성을 갖춘 활성형 형태로 발현시키는 것이 무엇보다 중요하다. 이를 확인하기 위해 융합파트너 Mdh 또는 Tsf와 목적단백질 ADI를 융합발현한 다음 융합파트너 Mdh 또는 Tsf를 제거하고 활성도를 측정하였다.

[0098] 미생물 유래의 아르기닌 탈이민효소는 L-아르기닌을 L-시트룰린으로 전환시킨다. 이러한 특성을 이용하여 실시예 6-1을 통해서 확보한 융합파트너 Mdh 또는 Tsf가 제거된 활성형의 ADI의 활성도를 확인하기 위해서 다음과 같은 분석을 수행하였다.

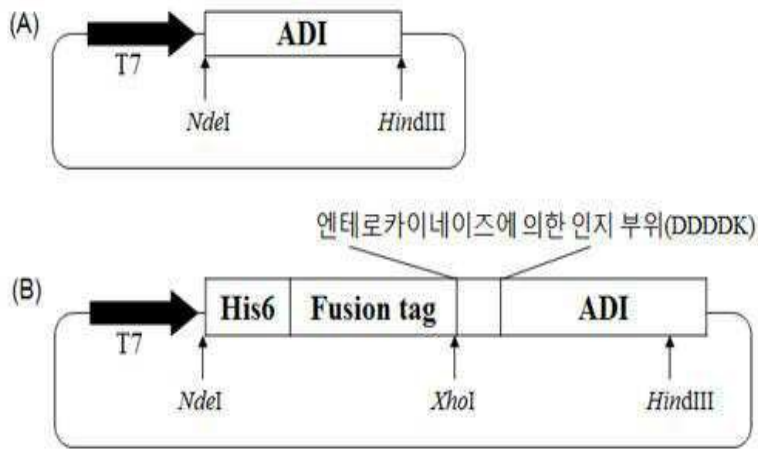
[0099] 100ml의 포스페이트 버퍼 (phosphate buffer, 0.1 M, pH 6.5.0)와 0.1742g L-아르기닌(L-arginine)을 혼합하여 10mM L-아르기닌 혼합액 만든 후, 혼합액 270 μ L에 30 μ L Mdh::ADI 또는 Tsf::ADI 상등액과 비교 실험으로 PBS 버퍼를 각각 첨가하였다. 반응은 첨가한 후 바로 시작되며, 반응이 시작되고 3분 간격으로 12분까지 530nm 파장에서 흡광도의 변화를 측정하였다 (Duoscan T1200, Bio-Rad, Hercules, CA) (도 5).

[0100] 그 결과, Mdh 또는 Tsf가 제거된 활성형의 ADI는 L-아르기닌을 L-시트룰린으로 전환시키는 활성도에 변화가 없는 것을 확인하였다.

[0101] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

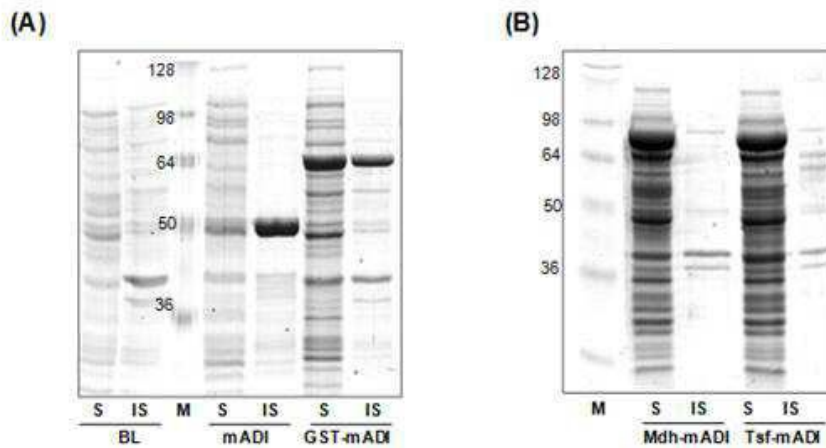
도면

도면1



(A) ADI 단독 발현 벡터,
 (B) 천연형 ADI 정제를 위한 융합발현벡터 구조

도면2

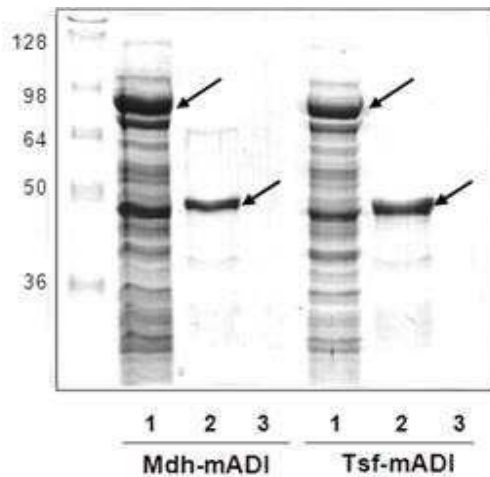


(M, 분자량 표지 마커; S and IS, 각각 E.coli내에서 발현된 단백질의 수용성 분획과 비수용성 분획).

도면3

제조합 아르기닌탈아민효소	발현 수준 (%)	세포질 내 수용성 발현량(%)
mADI	25.7±4.2	2.3±5.1
GST-mADI	26.5±5.5	63.2±3.6
Mdh-mADI	28.9±4.6	92.4±3.3
Tsf-mADI	27.8±3.8	94.6±1.6

도면4



M_r 분자량 표지 마커

- 1, 융합파트너 융합발현 된 아르기닌 탈아민효소의 수용성 분획
- 2, 융합파트너가 제거 된 아르기닌 탈아민효소의 수용성 분획
- 3, 융합파트너가 제거 된 아르기닌 탈아민효소의 불용성 분획

도면5

	Mdh가 제거된 활성형의 아르기닌 탈아민효소의 활성도	Tsf가 제거된 활성형의 아르기닌 탈아민효소의 활성도
활성 단위(U/mg)	15.52	11.44

서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation
 <120> Method for Preparing Active Arginine Deiminase
 <130> P15-B011
 <160> 13
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mdh-S
 <400> 1
 catatgaaag tcgcagtcct cggc 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mdh-AS
 <400> 2
 ctcgagctta ttaacgaact cttg 24
 <210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tsf-S
 <400> 3
 catatggctg aaattaccgc atccctggta aaa 33
 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tsf-AS
 <400> 4
 ctcgagagac tgcttgaca tcgcagcaac ttc 33
 <210> 5
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADI-S
 <400> 5
 ctcatgtctg tatttgacag t 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADI-AS
 <400> 6
 aagcttctat cacttaacat c 21

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADI-S-XhoI
 <400> 7
 ctcgaggatg acgatgacaa gtctgtat t ga 32

<210> 8
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mdh-S-H6
 <400> 8
 catatgcacc atcaccatca ccataaagtc gcagtcctcg gc 42

<210> 9
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Tsf-S-H6
 <400> 9
 catatgcacc atcaccatca ccatgctgaa attaccgcat ccctggtaaa a 51

<210>	10	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ADI-S-D4K	
<400>	10	
	ctcgaggatg acgatgacaa gtctgtatatt gacagt	36
<210>	11	
<211>	939	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli Mdh	
<400>	11	
	ttacttatta acgaactctt cgcccagggc gatatctttc ttcagcgtat ccagcatacc	60
	ttccagcgcg ttctgttcaa atgcgctcag ggtaccgata gatttacgt ctccacgcc	120
	gtttttacc agcagcagcg gttgagagaa gaaacgggcg tactgaccgt cgccttcaac	180
	gtaggcacat tcgacaacgc cttgttcgcc ctgcagtga cgaaccagag acagacaaa	240
	acgtgcagct gcttgccca tagacagggt tgcagaccg ccaccggcct tcgcttcaac	300
	cacttcagta cccgcgttct ggatgcgttt ggtcagatca gccacttct gctcggtaaa	360
	actaacgcca ggaacctgtg acagcagcgg cagaatggta acaccagagt gaccgccaat	420
	aaccggcact tcaacttcgc ctggctgttt gcctttcagt tccgcaacaa aggtgttgga	480
	acgaatgata tccagcgtgg taacccgaa cagtttgttt ttgtcataaa caccggcttt	540
	tttcagcact tcagcagcaa ttgcaactgt ggtgttaacc gggttagtga taataccaat	600
	gcacgctttc gggcaggttt tcgcaacttg ctgtaccagg tttttcacga tgccggcggt	660
	aacgttaaac aggtcggaa gatccatacc cggtttacgc gctacgcctg cagagataag	720
	aacgacatct gcgccttcca gcgccggagt cgcatttca ccagaaaaac ctttgatatt	780
	cacagcagta gggatatggc tcagatcgac agccacaccg ggagtcactg gagcgatatc	840
	atacagagag agttctgaac ctgaaggcag ttgggttttt aacagtagtg caagcgctg	900
	gccaataaccg ccagcagcgc cgaggactgc gactttcat	939
<210>	12	
<211>	852	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli Tsf	

<400> 12

atggctgaaa ttaccgcata cctggtaaaa gagctgcgtg agcgtactgg cgcaggcatg	60
atggattgca aaaaagcact gactgaagct aacggcgaca tcgagctggc aatcgaaaac	120
atgcgtaagt ccggtgctat taaagcagcg aaaaaagcag gcaacgttgc tgctgacggc	180
gtgatcaaaa ccaaatacga cggcaactac ggcatcattc tggaagttaa ctgccagact	240
gatttcgttg caaaagacgc tggtttccag gcgttcgcag acaaagttct ggacgcagct	300
gttgctggca aaatcactga cgttgaagtt ctgaaagcac agttcgaaga agaactgtt	360
gcgctggtag cgaaaattgg tgaataacatc aacattcgcc gcgttgctgc gctggaaggc	420
gacgttctgg gtcttatca gcacggtgcg cgtatcggcg ttctggttgc tgctaaaggc	480
gctgacgaag agctgggttaa acacatcgct atgcacgttg ctgcaagcaa gccagaattc	540
atcaaaccgg aagacgtatc cgctgaagtg gtagaaaaag aataccaggt acagctggat	600
atcgcgatgc agtctggtta gccgaagaa atcgagaga aaatggttga aggccgcatg	660
aagaaattca ccggcgaagt ttctctgacc ggtcagccgt tcgttatgga accaagcaaa	720
actgttggtc agctgctgaa agagcataac gctgaagtga ctggcttcat ccgcttcgaa	780
gtgggtgaag gcatcgagaa agttgagact gactttgcag cagaagttgc tgcatgtcc	840
aagcagtctt aa	852

<210> 13

<211> 1230

<212> DNA

<213> Arginine deiminase (ADI)

<400> 13

atgtctgtgt ttgatagcaa atttaaagga attcacgttt attcagaaat tggatgaatta	60
gaatcagttc tagttcacga accaggacgc gaaattgact atattacacc agctagacta	120
gatgaattat tattctcagc tatcttagaa agccatgatg ctagaaaaga acacaaacaa	180
ttcgtagcag aattaaaagc aaacgacatc aatgttgttg aattaattga tttagttgct	240
gaaacatacg atttagcatc acaagaagct aaagataaat taatcgaaga atttttagaa	300
gactcagaac cagttctatc agaagaacac aaagtagttg taaggaaactt cttaaaagct	360
aaaaaaacat caagagaatt agtagaaatc atgatggcag ggatcacaaa atacgattta	420
ggtatcgaag cagatcacga attaatcgtt gacccaatgc caaacctata cttcacacgt	480
gaccatttg catcagtagg taatgggtgta acaatccact acatgcgtta caaagttaga	540
caacgtgaaa cattattctc aagatttgta ttctcaaac accctaaact aattaacacc	600

ccgtggtact acgacccttc actaaaatta tcaatcgaag gtggagacgt atttatctac	660
aacaatgaca cattagtagt tgggtgttct gaaagaactg acttacaac agttacttta	720
ttagctaaaa gcattgttgc taataaagaa tgtgaattca aacgtattgt tgcaattaac	780
gttccgaaat ggaccaactt aatgcactta gacacctggc tgaccatgtt agacaaggac	840
aaattcctat actcaccaat cgctaacgat gtatttaaatt tctgggatta tgacttagta	900
aacggtggag cagaaccaca accagttgaa aacggattac ctctagaagg attattacaa	960
tcaatcatta acaaaaaacc agttctaatt cctatcgcag gtgaaggtgc ttcacaaatg	1020
gaaatcgaag gagaaacaca cttcgatggt acaaactact tagcaattag accaggtgtt	1080
gtaattgggt actcacgtaa cgaaaaaaca aacgtgctc tagaagctgc aggcattaaa	1140
gttcttccat tccacggtaa ccaattatca ttaggtatgg gtaacgctcg ttgtatgtca	1200
atgcctttat cacgtaaaga tgttaagtgg	1230