(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/67

(45) 공고일자 1999년10월01일
(11) 등록번호 10-0221343
(24) 등록일자 1999년06월28일

(21) 출원번호 10-1992-0015939
(22) 출원일자 1992년09월02일
(65) 공개번호 특1993-0006155
(43) 공개일자 1993년04월20일

(30) 우선권주장 91-221885 1991년09월02일 일본(JP)
(73) 특허권자 교와 핫꼬 고교 가부시키가이샤 히라타 다다시
일본국 도꾜도 찌요다꾸 오떼마찌 1쪼메 6-1
(72) 발명자 가쓰마따 료이찌
일본국 도오꾜도 마찌다시 야마자끼마찌 1380
다까노 유따까
일본국 도오꾜도 마찌다시 나루세 2-10-2
(74) 대리인 박해선, 이준구, 조영원

심사관 : 김형준

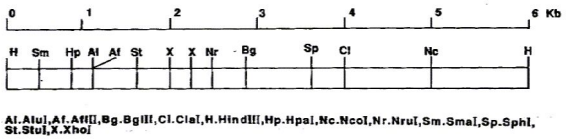
(54) 유전자 발현 조절 DNA

요약

본 발명은 유전자 발현 조절 DNA 및 그것을 사용한 단백질의 제조법을 제공한다.

즉, 코리네형 세균의 이소시트르산 리아제(ICL) 유전자에 유래하는 DNA로서, 단백질을 코딩하는 구조 유전자와 함께 벡터 DNA에 삽입되어서, 숙주 코리네형 세균에 도입되었을 때에 이 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA 및 이 DNA를 사용하여 유용 단백질을 효율 좋게 제조하는 방법을 제공한다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

유전자 발현 조절 DNA

[도면의 간단한 설명]

제1도는 ICL 유전자의 Hind III 6.0kb 클론화 DNA 단편의 제한효소지도를 나타낸다.

제2도는 pKT10의 제작공정을 나타낸다.

제3도는 ICL 유전자의 Hind III 6.0kb 클론화 DNA 단편의 서브클로닝에 있어서의 제한효소지도를 나타낸다.

제4도는 pCGKK27-3의 제작공정을 나타낸다.

제5도는 pKT22의 제작공정을 나타낸다.

제6도는 pKT23의 제작공정을 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 코리네형 세균에 유래하는 DNA이고, 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 신규 DNA 및 이것을 이용하여 유용 단백질을 효율좋게 생산하는 방법에 관한 것이다.

재조합 DNA기술에 발전하고, 이종생물이 만드는 유용한 폴리펩티드를 각종 미생물에 생산시키는 것이 가능해졌다. 그러나 외래 유전자에 의거하여 생산되는 유전자 산물이 숙주가 되어 유해한 경우, 숙주의 증식초기부터 이 외래 유전자를 발현시키면 숙주는 사멸 혹은 증식 저해를 받고, 이 유전자 산물을 다량으로 만드는 것이 곤란하다. 이와 같은 불편을 회피하기 위해서는, 숙주 미생물의 증식이 종료한 후에 외래 유전자의 발현을 유도하는 발현계가 필요해진다. 숙주로서 가장 흔히 쓰이고 있는 대장균에서는, 특정한 화합물 혹은 물리적 조건에 응답하여 행동하는 프로모터를 이용한 유전자의 유도 발현계[Goeddel,

D., et al., Proc. Natl. Acad, Sci., U.S.A., 76, 106 (1979); Edman, J.C., et al., Nature, 291, 503 (1981); Shimatake, H. et al., Nature, 292, 128 (1981)]가 확립되어 있고, 이 계를 사용하여 각종 유용 단백질이 생산되고 있다.

한편, 재조합 DNA 기술은 각종 아미노산 및 퓨린 뉴클레오티드의 발효생산에 사용되고 있는 코리네형 세균에도 적용가능하며, 공업적으로 실적이 있는 이들의 균종으로 유용단백질을 생산시키기 위한 검토가 행하여지고 있다. 지금까지에, 코리네형 세균으로 기능하는 프로모터 검출용 벡터를 사용하여, 리포터 유전자를 구성적으로 발현시키는 이 균종의 프로모터가 얻어지고 있지만 (특개소 63-273469), 발현을 제어할 수 있는 프로모터에 관해서는 알려져 있지 않다. 코리네형 세균으로 인위적으로 외래 유전자의 발현을 조절하는 방법에 관해서는 상술한 대장균에 있어서 외래 유전자의 발현을 유도할 수 있는 대장균이 프로모터를 그대로 코리네형 세균에 적용하고, 이 균종으로 클로람페니콜 아세틸 트란스페라제 유전자를 유도발현 시킨 예가 있다(특개소 62-151184). 그러나 이 발현방법은 대장균을 숙주로 한 경우에 비해서 유전자 산물의 축적량이 적고 충분히 강력한 발현 방법이라 하기 어렵다.

따라서, 코리네형 세균에 있어서 유용 유전자 산물을 효율좋게 생산시키기 위해서는, 이 숙주로 기능하고 인위적으로 구조 유전자의 발현을 조절할 수 있는 작용을 갖는 DNA를 취득할 필요가 있다.

본 발명자들은, 코리네형 세균에 있어서 배지 등의 환경 조건에 따라서 발현이 조절되는 유전자의 예의 검색한 결과, 이 균종이 갖는 이소시트르산리아제(이하 ICL 로 표기함) 유전자의 발현이, 배지중의 탄소원을 글루코오스, 슈크로오스, 말토오스 등의 당질로 한 때에 억제되고, 배지중의 탄소원을 초산, 젖산, 에탄올 등의 비당질로 한 때에 또는 당질 비존재 배지에서 유도되고, 그 발현 레벨이 극히 높은 것을 알아냈다. 이 유전자에 착안하여 ICL 유전자를 코드하는 DNA 단편을 클론화하고, 이 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA의 염기배열을 결정한 바, 이 DNA는 신규 DNA라는 사실 및 이것을 사용하여 소망하는 유전자를 코리네형 세균에서 효율좋게 발현시킬 수 있음을 알아내고, 이에 의거하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은, 코리네형 세균의 ICL 유전자에 유래하는 DNA 이고, 단백질을 코드하는 구조 유전자와 함께 벡터 DNA에 조입되고, 숙주 코리네형 세균에 도입된 때에, 이 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA(이하 ICL 프로모터로 표시함), 및 이 ICL 프로모터와 단백질을 코드하는 구조 유전자가 벡터 DNA에 조입된 재조합 DNA를 함유하는 형질전환체를 배지에 배양하고, 배양물중에 이 단백질을 생성 축적시키고, 이 배양물에서 이 단백질을 채취하는 것을 특징으로 하는 단백질의 제조법에 관한 것이다.

상기의 ICL 프로모터는, 구조 유전자의 발현이 배지중의 탄소원을 당질로한 때에 억제되고, 배지중의 탄소원을 비당질로 한 때 또는 당질 비존재배지에서 유도된다고 하는 발현 제어특성을 갖고 있다.

본 발명에 있어서의 코리네형 세균이란, 코리네박테륨속, 브레비박테륨속, 혹은 미크로박테륨속에 속하는 것을 의미한다.

본 발명의 ICL 프로모터 및 ICL 구조유전자를 함유하는 DNA는, 코리네형 세균에서 분리채취할 수 있지만, 바람직하게는 하기의 균주가 사용된다.

코리네박테륨 글루타미쿰 (Corynebactrium glutamicum) ATCC 13032

코리네박테륨 아세토아시도필룸 (Corynebactrium acetoacidophilum) ATCC 13870

코리네박테륨 아세토글루타미쿰 (Corynebactrium acetoglutamicum) ATCC 15806

코리네박테륨 칼루나에 (Corynebactrium callunae) ATCC 15991

코리네박테륨 헤르쿨리스 (Corynebactrium herculis) ATCC 13868

코리네박테륨 멜랏세콜라 (Corynebactrium melassecola) ATCC 17965

코리네박테륨 릴륨 (Corynebactrium lilium) ATCC 15990

브레비박테륨 이마리오필룸 (Brevibacterium immariophilum) ATCC 14068

브레비박테륨 사카롤리티쿰 (Brevibacterium saccharolyticum) ATCC 14066

브레비박테륨 티오게니탈리스 (Brevibacterium thiogenitalis) ATCC 19240

브레비박테륨 디바리카룸 (Brevibacterium divaricatum) ATCC 14020

브레비박테륨 플라붐 (Brevibacterium flavum) ATCC 14067

브레비박테륨 락토페르멘툼 (Brevibacterium lactofermentum) ATCC 13869

브레비박테륨 로세움 (Brevibacterium reseum) ATCC 13825

미크로박테륨 암모니아필룸 (Microbacterium ammoniaphilum) ATCC 15354

코리네형 세균으로 부터의 염색체 DNA의 추출은, 예를 들면 특개소 58-126789에 기재된 방법, 혹은 이에 준하는 방법에 의하여 행하여진다. 이 염색체 DNA 로부터 ICL 유전자 영역을 함유하는 DNA 단편을 단리하는데에는, 적당한 제한 효소로 처리한 염색체 DNA를, 같는 제한 효소 혹은 동일 접착 말단을 생기게 하는 제한 효소로 처리한 플라스미드 혹은 파지 DNA 에 짜넣은 뒤에, 이 재조합 DNA로 미생물을 형질전환하고, 목적으로 하는 DNA 단편을 함유하는 재조합 DNA을 함유하는 클론을 분리함으로써 달성된다.

예를 들면, 형질 전환 숙주로서 대장균을, 벡터로서 플라스미드를 사용하는 경우에는 콜로니 히브리드화[Hanahan, D. et al., Gene, 10, 63 (1980)]을 사용하고, ICL 아미노산 배열의 일부를 코드하

는 합성 DNA 와 맞먹는 DNA 단편을 함유하는 형질 전환체를 검출함으로써, ICL 유전자를 함유하는 DNA 단편을 플라스미드 벡터상에 갖는 클론을 분리할 수 있다. 프로브로서 사용하는 DNA는, 예를 들면 ICL를 분리 후, N 말단 부분의 아미노산 배열을 결정하고, 그 배열에 대응하는 폴리튜클레오티드를 공지의 방법[M. H. Caruther et al., Chemical Synthesis of Gene Fragments, a Laboratory Manual, Verlag, Chemie (1982)]에서 화학합성한 것을 사용하면 좋다. 이 대장균에서의 클론화에 요하는 일련의 기본 조작은 공지이며[Molecular Cloning, (1982), Cold Spring Harbor Laboratory]에 상세하게 기재되어 있다.

상기의 방법에서 얻어진 클론화 단편이, ICL 프로모터 및 ICL를 코드하는 구조 유전자를 유지하는가의 여부는, 코리네형 세균에 도입함으로써 확인할 수 있다. 그 때문에, 클로화단편을 삽입한 상기 대장균 플라스미드에 코리네형 세균으로 자율복제할 수 있는 벡터를 연결하거나, 혹은 클론화 단편을 이 코리네형 세균용 벡터에 짜넣은 재조합 DNA를 작성한다. 이들의 재조합 DNA는, 시험관 내에 재조합한 후 코리네형 세균을 형질 전환하고, 목적으로 하는 구조를 갖는 플라스미드를 함유하는 형질전환체를 얻음으로써 조제할 수 있다. 또한 코리네형 세균용 벡터로서는, 이 균종에 있어서 자율 복제능을 갖는 것이면 여하한 것도 좋고, 예를 들면 pCG1(특개소 58-134500), pCG2(특개소 58-35197), pCG4(특개소 57-183799), pAM330(특개소 58-67699), pAG1, pAG3, pAG14, pAG50(특개소 62-166890) 혹은 이들로부터 유도되는 플라스미드가 사용가능하다. 코리네형 세균에서 플라스미드를 조제하는 데에는, 예를 들면 특개소 57-134500에 기재된 방법이 사용된다. 또, 코리네형 세균의 형질전환은, 원형질체를 사용하는 방법(예를 들면 특개소 57-186492) 혹은 엘렉트로포레이션 법[Appl. Microbiol, Biotechnol, 30, 283 (1989)]에 의하여 행하여진다.

상기에서 조제한 재조합 DNA로 코리네형 세균의 ICL 활성 결손변이주를 형질전환하고, 이 형질전환주가 ICL 합성능을 획득하고 있으면, 클론화 단편상에 ICL 유전자가 존재하는 것을 확인할 수 있다. ICL 활성을 보유하는 야생주를 형질전환한 경우에도, 형질전환체가 초산, 젖산, 에탄올 등의 비당질을 배지중의 탄소원으로서 배양한 때에, 또는 당질 비존재배지에서 배양한 때에 숙주 자체 보다 고레벨의 ICL 활성을 발현하는 것을 지표로 하여 ICL 유전자의 존재가 확인된다. 이들의 형질전환체로부터 플라스미드를 추출하고, 제한효소로 절단후, 아가로오스 겔 전기 영동에 의하여 삽입된 ICL 유전자를 함유하는 DNA 단편을 단리할 수 있다.

이 ICL 유전자 함유 DNA 단편을 서브클론화하고, 각종의 축소화 단편을 함유하는 결실 플라스미드의 ICL 활성부여능 혹은 증폭능을 조사함으로써 ICL 유전자의 존재를 더욱 한정할 수 있다. ICL 유전자를 함유하는 DNA 단편 염기 배열은 디데옥시뉴클레노티드 합성사슬 정지법[J. Mol. Biol, 94, 441 (1975)] 혹은 막삼-길버트법[Proc. Natl. Acad. Sci, 74, 560 (1977)] 등의 방법을 사용하여 결정할 수 있다. DNA 염기 배열상에서 ICL의 N 말단 아미노산 배열을 코드하는 염기배열을 알아냄으로써, 해독되는 오픈리딩 프레임이 추정된다. 오픈리딩 프레임의 존재에 의거하여, ICL 프로모터 활성을 함유하는 영역은 그 오픈리딩 프레임의 상류에 존재하고 있음을 알 수 있다.

이와 같은 해석에 따라서, 예를 들면 실시예에 나타낸 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 경우, 이 균주의 ICL 프로모터 활성은 배열번호 3에 표시하는 DNA염기 배열중, 제1번째에서 제513번째까지의 배열에 포함되어 있다고 특정할 수 있다. 본 발명의 ICL 프로모터 활성은, 이 DNA 배열에 한정되지 않고, 프로모터 활성을 손상하지 않는 범위에서 일부를 삭제 혹은 개변하여도 무방하다.

ICL 프로모터 활성을 갖는 DNA단편의 하류에, 각종 구조 유전자 또한 전사를 종지시키는 터미네이터를 배치한 DNA를 상술한 코리네형 세균으로 자율복제할 수 있는 플라스미드에 짜넣음으로써 발현벡터가 얻어진다. 터미네이터로서는 ICL 유전자의 터미네이터가 바람직하지만, 코리네형 세균 외의 유전자의 터미네이터 혹은 대장균 및 고초균 유전자의 유래의 ρ-인자비의존성의 터미네이터[Ann. Rev. Genet, 13, 319(1979)] 도 사용할 수 있다. 구조 유전자로서는, β-갈락토시다제, 클로람 페니콜아세틸 트란스페라제, ICL 등의 효소류, 혹은 인슐린, 성장 호르몬, α-, β- 또는 γ-인터페론, 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF) 등의 생리활성 단백질을 들 수 있다.

상기 발현벡터로 숙주를 형질전환하고, 이 형질전환체를 배양함으로써 목적으로 하는 유전자 산물을 취득할 수 있다. 숙주로서는, 상기의 코리네형 세균이 바람직하지만, 기타의 코리네형 세균도 사용할 수 있다.

배지중의 탄소원으로서 초산, 젖산 등의 비당질을 사용하고, 기타의 질소원, 무기물, 비타민 등을 함유하는 배지에서 형질전환체를 배양함으로써, 목적하는 유전자 산물을 배지중에 축적시킬 수 있다. 혹은 형질전환체를 글루코오스, 슈크로오스, 말토오스 등의 당질을 탄소원으로서 함유하는 배지에서 우선 증식시키고, 당질이 소비된 곳에서, 상기의 비당질 탄소원을 첨가 또는 당질 비존재 배지를 사용하여, 다시 배양을 계속해도 유전자 산물을 취득할 수 있다.

배양은 통기 혹은 교반하면서 호기적 조건하에서 실시한다. 통상, 배양중, 배지의 pH를 중성부근으로 유지하는 것이 바람직하다. 배양온도, 시간 등의 조건은 숙주 미생물의 증식 및 형질전환체의 유전자 산물의 생산이 최고가 되도록 설정되지만, 일반적으로 온도는 15-40℃, 시간은 4-72 시간이 바람직하다.

배양물 중에 축적된 유전자 산물은, 공지의 방법, 예를 들면 기계적 파쇄법, 혹은 용균효소를 사용하는 방법등에 의하여 균체를 파쇄하여 추출된다. 추출액으로부터 목적하는 유전자 산물을 분리 정제하는 데에는, 통상 사용되는 단백질의 정제방법, 예를 들면 침전제에 의한 침전법, 투석법, 전기영동법, 이온교환수지 등에 의한 크로마토그래피법, 겔여과법, 항체컬럼을 사용하는 방법등을 조합하여 실시할 수 있다.

이하에, 실시예를 들어서 더욱 구체적으로 본 발명을 설명한다.

[실시예]

[실시예 1]

[코리네형 세균의 ICL 유전자의 발현 양식]

코리네형 세균인 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032, 코리네박테륨 아세토아시도필룸 ATCC 13870, 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991, 코리네박테륨 헤르쿨리스 ATCC 13868, 코리네박테륨 릴륨 ATCC 15990, 브레비박테륨 이마리오필룸 ATCC 14068, 브레비박테륨 디바리카룸 ATCC 14020, 브레비박테륨 플라붐 ATCC 14067, 브레비박테륨 락토페르멘툼 ATCC 13655, 및 미크로박테륨 암모니아필룸 ATCC 15354 각 1백금이를 NB 배지(분말 브이욘 20g, 효모엑스 5g, 글루코오스 10g을 물 1ℓ에 함유, pH 7.2로 조정한 배지)에 식균하고, 30℃에서 16시간 진탕 배양하고 증식시켰다. 이 종배양액 0.8ml를, 초산을 탄소원으로 하는 반합성 배지 MAYE 배지[초산암모늄 20g, $(NH_4)_2SO_4$ 10g, 요소 3g, 효모엑스 1g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2㎎, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2㎎, 비오틴 60㎍, 티아민염산염 2㎎, NaCl 50㎎을 물 1ℓ에 함유시키고 pH 7.2로 조정한 배지] 및 슈크로오스를 탄소원으로 하는 MSYE 배지[슈크로오스 20g, $(NH_4)_2SO_4$ 10g, 요소 3g, 효모엑스 1g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2㎎, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2mhg, 비오틴 60㎍, 티아민염산염 2㎎, NaCl 50㎎을 물 1ℓ에 함유시키고 pH 7.2로 조정한 배지] 에 각각 접종하고, 30℃에서 16시간 배양했다.

균체를 집균하고, 10mM 인산완충액(pH 7.0)에서 2회 세정후, 동완충액 5ml에 현탁했다. 균액을 빙냉하면서 초음파 분쇄기(TOMY 사제 펜실형 소닉크)로 15분간 파쇄처리했다. 처리액을 4℃에서 10분간 원심(14000xg)하고, 상청을 세포추출액으로 회수했다.

이 세포추출액 중의 ICL 활성을, 이오시트르산을 기질로하여 생성하는 글리옥실산을 정량하는 방법[J. Biochem, 64, 355 (1968)]에 의하여 측정했다. 사전에 30℃로 보온한 반응액[Tris-HCl 0.14M(pH 7.5), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20mM, 글루타치온 20mM] 20ml에, 단백질량 30㎎에 해당하는 세포추출액과 20㎕의 0.4M 이소시트르산 용액을 가하여 반응을 개시하고, 30℃에서 10 분간 반응시켰다. 반응액에 1ml의 0.5M 옥살산 용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 또한 0.5ml의 1% 페닐히드라진 용액을 가하여 70℃, 10 분간 가열후, 빙수중에서 5분간 냉각했다. 이어서, 2ml의 진한 염산과 0.5ml의 0.5% 페리시안화 칼륨용액을 더하여 발색시키고, 히다찌 비색계(모델 100-20)로 520nm의 흡광도를 측정했다. 1분간에 1μmol 의 글리옥실산의 생성을 촉매하는 효소활성을 1단위(U)로 하고, 단백질 1㎎ 당의 비활성을 산출하고, 그 결과를 표 1에 나타냈다. 단백질량은, 단백질 분석 키트(BIO-RAD 사제)를 사용하여 정량했다.

그 결과, 어느 균주에 있어서도, MSYE 배지에서 배양한 균체에는 ICL활성은 미약하거나 혹은 검출되지 않았지만 MAYE 배지에서 배양한 균체에는 고레벨의 ICL 활성이 인정되었다. 글루코오스, 말토오스, 글루콘산 등의 당질을 탄소원으로 한 배지에서 배양한 경우에도, 슈크로오스 함유 배지의 경우와 동일하게 ICL 활성은 미약하거나 혹은 검출되지 않았다. 탄소원으로서 젖산, 에탄올, 피루브산 등의 비당질을 함유하는 배지에서 배양한 때에는, 초산함유 배지의 경우와 동 레벨의 ICL 활성이 검출되었다.

이상의 결과에서, 시험에 사용한 모든 코리네형 세균의 ICL 유전자는 배지중, 당질을 탄소원을 하고 배양한 때에는 발현억제되어, 비당질 탄소원에서 배양한 때에 유도 발현되는 것이 판단되었다.

상기의 각종 세포 추출액을[Laemli, Nature, 227, 680 (1970)]의 방법에 의한 SDS- 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(SDS-PAGE)으로 해석했다. 15㎍ 상당의 단백질을 함유하는 세포추출액을 10% 아크릴아미드 겔에 올려놓고, 전기영동후, 겔을 염색액(쿠마시에블루-R250, 0.1% 메탄올 50%)으로 염색하고, 이어서 탈색액(메탄올 40%, 초산 10%)으로 탈색하고, 염색된 단백질을 관찰했다.

그 결과, 상기 코리네형 세균중 일례를 제외한 모든 균주에 있어서, MAYE 배지에서 배양한 균체중에서, 약 48킬로달톤(KDa)의 크기를 갖는 ICL 단백이 현저한 량 존재하는 것이 확인되었다. 한편, 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991에 관해서도 MAYE 배지에서 배양한 균체중에만 ICL 단백질이 현저한 량 생성이 인정되었지만, 그 단백질의 크기는 약 52KDa 였다. 그러나, 어느 균주의 경우에도, MSYE 배지에서 배양한 균체증에는 48KDa 혹은 52KDa의 ICL 단백질은 거의 존재하지 않았다.

또한, 생성된 48KDa 혹은 52KDa의 ICL 단백질의 전균체 단백질에 차지하는 비율을 구하기 위하여, 일차원의 비중계(Shimadzu Seisakusho 사제 model UV 265)를 사용하여 염색 겔을 1 방향으로 주사하고, 색소농도의 분포를 가시 흡수(560nm)의 정도로 측정했다. 그 결과, MAYE 배지에서 배양한 균체중에, 48KDa 혹은 52KDa의 ICL 단백질이 전균체 단백질의 5-10% 상당량 차지하는 것을 알았다. 또한, MSYE 배지에서 배양한 균체중에는 이들이 단백질의 존재는 거의 검출되지 않았다.

또, 상기의 각종 세포 추출액을 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 ICL 단백질에 대한 항체를 사용한 웨스턴 블로트법[Towbin, H., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 76, 4350 (1979)]에 의한 해석을 실시했다. 상기에서 조제한 각종 코리네형 세균의 세포추출액을 SDS-폴리아크릴아미드겔에 올려놓고, 영동을 실시한 후, 겔의 위에 블로팅 완충액[25 mM Tris-HCl, 192mM 글리신(pH 8.3)]에 적신 멤브레인 필터(Clear Blotting P Membrane, ATO 사제)를 놓았다. 이것을 블로팅 완충액에 적신 여지(Watman 사제 3MU)로 끼우고, 전사장치(ATO 사제)에 세트하고, 180mA 정전류로 1시간 전사를 행했다. 전사후, 필터를 1% BSA(소혈청 알부민)을 함유하는 TBS 완충액[20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl(pH 7.5)]에 적시고, 실온에서 1시간 두었다.

한편, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032를 MAYE 배지에서 생육시킨 균체의 세포추출액을 SDS-폴리아크릴아미드겔에 올려놓고 영동을 실시한 후, 겔에서 46KDa 단백질에 상당하는 위치를 잘라내고, 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 완충액에 현탁시켰다. 이 현탁액의 상청을 분취하고, 마우스에 주사하여 다클론성 항체(48KDa 단백질항체)를 제작했다.

상기의 전사처리한 필터를 48KDa 단백질 항체 및 1% BSA를 함유하는 TBS 완충액에 적시고, 4℃에 하룻밤 두었다. 다시, 필터를 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 완충액으로 3회 씻은 후, 항마우스 IgG-퍼옥시다제(Daco 사제) 및 1% BSA 함유를 함유하는 TBS 완충액에 실온에서 진탕하면서 침지했다. 1시간 후, 필터

를 0.05% Tween 20을 함유하는 TBS 완충액으로 세정했다. 이 필터를 4-클로로-1-나프톨(BIO-RAD 사제) 60㎎을 용해한 20㎖의 메탄올과, 60㎕의 과산화수소수를 함유하는 100㎖의 TBS 완충액과를 혼합한 액에 침지하고 발색 반응을 실시했다. 48KDa 단백질항체는, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032 뿐만 아니라 코리네박테륨 아세토아시도필룸 ATCC 13870, 코리네박테륨 헤르쿨리스 ATCC 13868, 코리네박테륨 릴륨 ATCC 15990, 브레비박테륨 이마리오필룸 ATCC 14068, 브레비박테륨 디바리카룸 ATCC 14020, 브레비박테륨 플라붐 ATCC 14067, 브레비박테륨 락토페르멘툼 ATCC 13655, 및 미크로박테륨 암모니아필룸 ATCC 15354의 48KDa의 ICL 단백질 및 코리네박테륨 칼로나에 ATCC 15991의 52KDa의 ICL 단백질과 반응시켰다. 이 사실로부터, 이들 단백질이 동일 혹은 극히 유사성이 있는 것을 알았다.

[실시예 2]

[코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 ICL 유전자의 클로닝]

(1) ICL 단백질의 N 말단 아미노산 배열의 결정

코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 세포추출액에는, 48KDa 부근에 기타의 단백질이 거의 검출되지 않으므로, SDS-PAGE에서 48KDa 의 ICL 단백질을 분리후, N 말단 아미노산 배열을 결정했다.

실시예 1과 동일하게, MAYE 배지에서 배양한 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 균체 추출액을 조제하고, 그 3㎕를 SDS-PAGE에 걸었다. 영동후, 겔을 전사용 완충액[10mM 3-시클로헥실아미노-1-프로판술폰산, 10% 메탄올(pH 11.0)]에 실온에서 5분간 침지했다. [Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 76, 4530 (1970)]의 방법에 따라서 겔의 단백질을 사전에 메탄올에 담근 PVDF 막(Millipore 사제, 0.45nm 공극 크기)에 전사했다. PVDF 막을 탈이온수로 5분간 세정후, 쿠마시 염색액(0.1% 쿠마시 블루 R250, 50% 메탄올) 중에서 5분간 염색하고, 이어서 탈색액(40% 메탄올, 10% 초산)에 5분간 침지하여 탈색했다. PVDF 막을 탈이온수에 5분간 침지하여 세정한 후, 풍건했다. 이 막상에서 염색된 48KDa의 ICL 단백을 잘라내고,[Matsudaira et al., J. Biol. Chem., 262, 10035 (1987)]의 방법에 따라, N 말단 아미노산 배열의 결정을 실시했다.

즉, 막상에 전사된 ICL 단백질을 사용하여 단백질 시퀀서(Applied Biosystems 사제 model 470)에 의한 에드만 분해를 실시하고, 이 단백질의 N 말단 아미노산 배열과 분석한 결과, 배열 번호 1로 표시되는 아미노산 배열이 동정되었다.

(2) 올리고 뉴클레오티드 프로브의 합성

상기에서 결정한 아미노산 배열에 대응하는 염기배열(배열번호 2)을 갖는 올리고뉴클레오티드를 올리고뉴클레오티드 합성기(Applied Biosystems 사제 model 380A)를 사용한 포스포라미다이트법[M. H. Caruther et al., Chemical Synthesis of Gene Fragments, a Laboratory Manual, Verlag, Chemi (1982)]에 의하여 합성했다.

이 50mer 올리고뉴클레오티드 프로브를 [γ^{32}] ATP(Amersham 3000 Ci/mmol)을 사용하여 이하의 방법에 의하여 5'- 표지화 했다. 15㎕의 키나제 완충액[50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 5mM DTT, 0.1 mA EDTA(pH 7.6)]에 0.2㎍의 프로브 DNA와 [γ^{32}] ATP(150μCi)를 가했다. 다시 10 단위의 T4 폴리뉴클레오티드 키나제(Takara Shuzo 사제)를 첨가하고, 37℃에서 30분간 반응시켰다. 다시, 페놀 추출한 반응액을 세파덱스 G50을 사용한 겔 여과에 공여하고, 5' 말단이 표지화된 프로브를 얻었다.

(3) 콜로니 히브리드화에 의한 ICL 유전자 함유 단편의 클로닝

NB 배지에서 배양한 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 종배양액 0.8㎖를 40㎖ SSM배지[글루코오스 20g, $(NH_4)_2SO_4$ 10g, 요소 3g, 효소엑스 1g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_20$ 0.4g, $FeSO_4 \cdot 7H_20$ 2㎎, $MnSO_4 \cdot 4H_20$ 2㎎, 비오틴 60㎍, 티아민염산염 2㎎, NaCl 50㎎을 물 1ℓ에 함유시키고 pH 7.2로 조정한 배지] 에 접종하고, 30℃에서 진탕배양했다. 히다찌 비색계(model 100-20)로 660nm에 있어서의 흡광도(OD)를 측정하고, OD가 0.2가 된 시점에서 배양액으로 0.5단위/㎖의 농도가 되도록 페니실린 G를 첨가했다. 다시, 배양을 계속하고, OD가 0.6이 될 때까지 생육시켰다. 배양액에서 균체를 집균하고, TES 완충액[0.03M Tris-HCl, 0.005M EDTA, 0.05M NaCl(pH 8.0)]에서 세정후, 리소짐액[25% 슈크로오스, 0.1M NaCl, 0.05M Tris-HCl, 0.8㎎/㎖ 리소짐(pH 8.0)] 10㎖에 현탁하고, 37℃에서 2시간 보온했다. 집균한 균체에서 [Saito et al., Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)]의 방법에 따라서 고분자 염색체 DNA를 단리했다. 한편, pUC19(Takara Shuzo 사)를 보유하는 이.콜리(E. coli) ATCC 33694에서 상법에 따라서[Birnboim et al., Nucleic, Acids. Res., 7, 1513 (1979)]의 방법에 의하여 pUC19를 조제했다.

코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 염색체 DNA 5㎍을 함유하는 완충액 B[10mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT] 98㎕에 20단위의 Hind III을 첨가하고, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 한편, pUC19 플라스미드 DNA 1㎍을 함유하는 완충액 B, 48.5㎕에 5단위의 Hind III을 첨가하고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이들 반응물을 혼합한 후, 페놀추출, 에탄올 침전을 실시하고 DNA를 회수했다. 이 DNA 전량을 결찰 완충액[20mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 10mM ATP] 59㎕에 용해하고 다시 350 단위의 T4 리가제를 첨가후, 16℃에서 15시간 반응시켜 연결처리했다.

이 DNA 반응액을 사용하여 [Dagert et al., Gene, 6, 23 (1979)]의 방법에 이하여 이.콜리 ATCC 33694를 형질 전환했다. 암피실린 100㎍/㎖를 함유하는 LB 플레이트[1% 트립톤, 0.5% 효모엑스, 0.5% NaCl(pH 7.4)]상에 니트로셀룰로우스 필터(Gelman Science 사제, Bio. Trace™ NT)를 씌우고, 그 표면에 형질전환

세포를 도포했다. 플레이트를 37℃에서 16시간 방치후, 필터 상에 형성된 콜로니를 2 매의 니트로셀루로우스 필터에 복제하고, 계 3매의 필터를 암피실린 100㎍/㎖를 함유하는 LB 플레이트 상에 옮기고 37℃에서 6시간 증식시켰다. 복제한 2매의 니트로셀룰로우스 필터를, 다시 250㎍/㎖의 클로람페니콜 및 100㎍/㎖의 암피실린을 함유하는 LB 플레이트로 옮기고, 37℃에서 16시간 배양후, 0.5M NaOH액, 1.0M Tris-HCl(pH 7.5)액, 1.5M NaCl-0.5M Tris-HCl(pH 7.5)액 및 2 x SSC 액 [0.3M NaCl, 0.03M Na_3-시트레이트(pH 7.0)]를 적신 왓트만 3MM 여지 위에 축차 옮겨가고, 콜로니에서 노출한 DNA를 변성시켰다. 다시 풍건후, 80℃에서 3시간 가열하여, 필터상에 DNA를 고정시켰다. 한편, 나머지 1매의 필터는 플레이트에 올려 놓은 채로 4℃에서 보존했다.

유전자 라이브러리가 고정된 레플리카 필터를, 3 x SSC 액[0.45M NaCl, 0.045 Na_3-시트레이트(pH 7.0)]중에서 65℃에서 30분간 담근후, 1 x Denhardt 액 (0.2% 피콜, 0.2% 폴리비닐피롤리돈, 0.2% BSA) 중에 옮기고, 65℃에서 1시간 방치했다. 필터를 예비 히브리드화 완충액[1 x Denhardt 액 1M NaCl, 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM EDTA, 0.1% SDS, 100㎍/㎖ 변성 연어정자 DNA]이 들어 있는 폴리프로필렌제의 주머니에 넣고 65℃에서 3시간 전 처리한 후, 방사 표시된 50mer 올리고뉴클레오티드프로브 [실시예 2(2)] 0.2㎍을 가하고, 40℃에서 16시간 히브리드화 처리했다. 필터를 어느것이나 6 x SSC 액[0.9M NaCl, 0.09 Na_3-시트레이트(pH 7.0)]중에서, 순차, 4℃에서 5분간 처리를 2회, 52℃에서 30분간 처리를 2회, 4℃에서 5분간 처리를 2회씩 하고 세정했다. 필터를 풍건후, X 선 필름(Fuji Photo Film 사제)에 밀착시켜 감광시켰다.

이와 같이 하여, 약 8500 주의 클론 중에서 히브리드화 하는 콜로니를 1 개 발견했다. 다시, 이 콜로니에 대응하는 보존 플레이트 위에서 단집락 분리된 클론에 대해서 재시험한 결과, 6.0 킬로베이스(kb)의 Hind III 단편을 pUC19의 Hind III 분위에 삽입한 구조를 갖고 있었다. 이 플라스미드를 pKT4로 명명했다.

[실시예 3]

[ICL 유전자 증폭주에 있어서의 ICL 유전자의 발현]

(1) 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032 (pKT10)의 ICL 유전자의 발현

상기의 클론화 단편상에 ICL 유전자가 함유되는 것을 명백히 하기 위하여, pKT4를 코리네형 세균의 벡터 pCG 116(특개평 1-265892)에 삽입했다. pCG 116은, pCG 116을 보유하는 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 배양균체로부터 다음의 방법으로 단리했다. 스펙티노마이신 100㎍/㎖를 함유하는 NB 배지에서 증식시킨 pCG 116을 보유하는 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 종배양 8㎖, 스펙티노마이신 100㎍/㎖를 함유하는 400㎖ SSM 배지에 접종하고, 30℃에서 진탕 배양했다. OD가 0.2가 된 시점에서, 배양액으로 0.5 단위/㎖의 농도가 되도록 페니실린 G를 첨가했다. 다시, 배양을 계속하고, OD 가 0.6이 될 때까지 생육시켰다. 균체를 집균하고 TES 완충액으로 세정후, 리소짐액 10㎖에 현탁하고, 37℃에서 4시간 반응시켰다. 반응액에 5M NaCl 2.4㎖, 0.5M EDTA(pH8.5) 0.6㎖, 4% 라우릴 황산나트륨 및 0.7M NaCl로 이루어지는 용액 4.4㎖를 순차 첨가하고, 완만하게 혼화한 후에 방수상에 15분간 방치했다. 용균물을 원심관으로 옮기고, 4℃에서 60분간, 69,400 x g의 원심분리를 하고 상청액을 회수했다. 이에 중량백분율 10% 상당의 폴리에틸렌 글리콜(PEG 6000)을 가하고, 조용하게 혼화하여 용해후 빙수상에 놓았다. 10시간 후, 1,500 x g에서 10분간 원심분리하여 펠렛을 회수했다. TES 완충액 5㎖를 가하여 펠렛을 재용해시킨 뒤에 1.5㎎/㎖ 에티듐 브로마이드 2.0㎖를 첨가하고, 다시 염화세슘 7.5g을 가하여 조용하게 용해하고 밀도를 1580에 맞추었다. 이 용액을 105,000 x g, 18℃에서 48시간 초원심 분리를 하고, 자외선 조사하에 검지되는 원심튜브 아래쪽의 밀도가 높은 밴드를 원심튜브 측면으로부터 주사기로 뽑아냄으로써 pCG 116의 플라스미드 DNA를 분리했다. 이 분획액을 등용량의 이소프로필 알콜액(용량백분률 90% 이소프로필알콜, 10% TES 완충액)으로 5회 처리하여 에티듐 브로마이드를 추출제거하고, 그후에 TES 완충액에 대해서 투석했다.

pCG 116 플라스미드 DNA 1㎍을 함유하는 완충액 C [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT] 19㎕에 5단위의 Bam HI를 첨가하고, 37℃에서 1시간 반응시켰다. 한편, 실시예2(3)에서 사용한 방법에 따라 이.콜리 ATCC 33694 형질전환체의 배양균체에서 단리한 pKT4 플라스미드 DNA 1㎍을 함유하는 완충액 C 49㎕에 5단위의 Bam HI를 첨가하고, 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이들 양 반응액을 0.8% 아가로오스겔 전기영동으로 분리한 후, DNA 회수정제 키트(Asahi Glass 사제)를 사용하여 각각 6.2kb 및 8.7kb의 단편으로서 회수했다. 양 DNA 단편을, 상법의 리가제 처리에 의하여 연결했다. 이 리가제 반응액을 사용해서, 실시예 2(3)에 따라서 이. 콜리 ATCC 33694를 형질 전환하고, 스펙티노 마이신 25㎍을 함유하는 LB 플레이트 상에서 스펙티노 마이신 내성 형질전환체를 분리했다. 이 형질전환체중 하나의 형질전환체에서 제2도에 나타내는 플라스미드 pKT10을 단리했다.

pKT10 DNA 1㎍을 콜리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 원형질체 형질전환[J. Bacteriol. 159, 306 (1984)] 에 공여했다. 원형질체는 다음과 같이 조제했다. NB 배지에서 증식시킨 ATCC 13032주의 종배양액 0.8㎖를 40㎖ SSM 배지에 접종하고 진탕 배양했다. OD가 0.2가 된 시점에서, 배양액으로 0.5 단위/㎖의 농도가 되도록 페니실린 G를 첨가했다. 다시, 배양을 계속하고, OD가 0.6이 될 때까지 생육시켰다. 배양액에서 균체를 집균하고, 10㎖의 RCGP 배지[글루코오스 5g, 카자미노산 5g, 효모엑스 2.5g, K_2HPO_4 3.5g, KH_2PO_4 1.5g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.41g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10㎎, $MnSO_4 \cdot 4\text{-}6H_2O$ 2㎎, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.92㎎,

$(NH_4)_6MN_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.04㎎, 비오틴 30㎍, 티아민염산염 2㎎, 숙신산나트륨 135g, 폴리비닐피롤리돈(분자량 10000) 30g을 물 1ℓ에 함유시키고 pH 7.4로 조정한 배지]에 1㎎/㎖의 리소짐을 함유하는 용액(pH 7.6)으로 현탁한 후, 30℃에서 16시간 정치하고, 원형질체화했다. 이 원형질체 균액을 2,500 x g으로 5분간 원심분리하고, TSMC 완충액 [10mM $MgCl_2$, 30 mM $CaCl_2$, 50mM Tris-HCl, 400mM 슈크로오스(pH 7.5)] 1㎖ 현탁하고 원심 세정후, TSMC 완충액 0.1㎖에 재현탁했다. 이 현탁액에, 상기에 조정한 pKT10 플라스미드 DNA 액 10㎕를 가하여 혼화하고, 이어서 TSMC 완충액 중에 20% PEG 6000을 함유하는 액 0.8㎖를 첨가하여 혼화했다. 빙수중에서 20 분간, 37℃에서 3분간 방치후, 2,500 x g 으로 5분간 원심분리하여 상청액을 제거했다. 침전한 원형질체를 1㎖의 RCGP 배지에 현탁한 후, 이 현탁액 2㎖를 스펙티노 마이신 400㎍/㎖를 함유하는 RCEP 플레이트에 도포하고, 30℃에서 7일간의 배양을 실시하고 형질전환체를 얻었다. 형질전환체에 함유되는 플라스미드를 제한 효소절단 해석한 결과, 형질전환체는 pKT10을 갖는 것이 확인되었다.

또 동일하게 하여, 공지의 방법[J. Appl. Microbiol., 15, 27 (1969)]에 따라서, ㅋ리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032에서 초산 비자화성 변이주로서 취득한 ICL 결손변이주를, pKT10 플라스미드 DNA 액을 사용하여 형질전환했다. pKT10이 도입된 이 ICL 결손 변이주는, 초산을 탄소원으로 하는 MA 배지[초산암모늄 20g, $(NH_4)_2SO_4$ 10g, 요소 3g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2㎎, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2㎎, 비오틴 60㎍, 티아민염산염 2㎎, NaCl 50㎎을 물 1ℓ에 함유시키고 pH 7.2로 조정한 배지] 에서의 증식능을 획득하고, ATCC 13032(pKT10)주와 동일 레벨의 ICL 활성을 갖고 있었다. 이 사실에서, pKT10 위에 존재하는 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032 유래의 6.0kb Hind II DNA 단편은, ICL 유전자를 함유하는 것이 확인되었다.

코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032 및 ATCC 13032(pKT10)를, 슈크로오스를 탄소원으로 하는 MSYE 배지 및 초산을 탄산원으로 하는 MAYE 배지에서 30℃, 16시간 배양하고, 집균후 세포추출액을 조제했다.

이 세포추출액중의 ICL 활성을, 실시예 1에 기재한 방법으로 측정했다. 결과를 표 1에 나타냈다. 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 경우에 동일하게 ATCC 13032(pKT10)에 있어서도 MAYE 배지에서 배양한 균체가 높은 ICL 활성을 나타내고, 그 활성 레벨은 ATCC 13032 에 비해서 약 6배 높았다.

양주의 세포 추출액을 사용하여 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 해석한 바, MAYE 배지에서 배양한 균체에만 다량의 48KDa의 ICL 단백질이 검출되었다. 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032(pKT10)의 단백질 생산량은, 전세포 단백질의 약 33%에 상당하고, ATCC 13032 주에 비해서 5-6 배 많았다. 이상의 결과에서, ICL 유전자는, 복사수를 올렸을 때에도 동일하게 발현 조절되는 것을 판명했다.

(2) 기타 숙주에서의 ICL 유전자의 증폭 발현

상기의 실시예 3(1)과 동일한 방법으로 표 1에 표시하는 코리네형 세균 10 균종에 pKT10을 도입했다. 단 브레브박테륨 암모니아게네스(Brevibacterium ammoniagenes) ATTC 6872에의 플라스미드 pKT10의 도입은, 특개소 63-185372에 기재된 방법에 따라서 실시했다. 즉, NB 배지에서 배양한 본균의 종 배양액 0.8㎖를 40㎖ G III 배지 [글루코오스 15g, $(NH_4)_2SO_4$ 8g, 요소 1.2g, 효모엑스 1.2g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2㎎, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1㎎, $MnSO_4 \cdot 4\text{-}6H_2O$ 1㎎, 비오틴 0.1㎎, 티아민 염산염 2㎎, 판토텐산 칼슘 10㎎, 아데닌 100㎎, 구아닌 100㎎을 물 1ℓ에 함유시키고 pH 7.2로 조정한 배지] 에 접종하고, 30℃에서 진탕 배양했다. 대수 증식기의 초기(균체농도 18^8개/㎖)에 0.3 단위/㎖가 되도록 페니실린 G를 첨가하고, 다시 3시간 배양을 계속했다. 배양액에서 3000rpm, 10분간의 원심분리에 의하여 세포를 회수하고, G III 배지에서 세정 후, P3 고장액[NaCl 70 mM, $MgCl_2$ 5mM, $CaCl_2$ 5mM, Tris-HCl 25mM, D-소르비톨 1.6M (pH 7.6)]에 2.0㎎/㎖ 리소짐 및 0.6㎎/㎖ 아크로모펩티다제를 함유하는 용액 10㎖에 현탁하고, 30℃, 16시간 정치하고 원형질체를 조제했다. 이와 같이 하여 조제한 원형질체를 사용하여, 실시예 3(1)에 따라서 형질 전환체를 얻었다.

얻어진 형질전환체를 MSYE 배지 및 MAYE 배지에서 배양하고, 그 세포 추출액중의 ICL 활성을 측정했다. 또한 브레비박테륨 암모니아게네스 ATTC 6872 및 ATCC 6872 (pKT10)의 ICL 활성은, MSYE 배지에서 배양한 균체 및 MSYE 배지에서 배양한 균체를 MAYE 배지에 현탁하고, 30℃, 16시간 보온한 균체의 세포 추출액을 사용하여 측정했다. 표 1의 결과가 나타내는 바와 같이, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032(pKT10)의 경우와 동일하게, 어느 pKT10 형질 전환체에 대해서도 MAYE 배지에서 배양 혹은 보온한 균체에 고레벨의 ICL 활성이 검출되었다.

[표 1]

균 주	ICL 비활성 (U/mg 단백질) MSYE 배지	MAYE 배지
코리네박테륨 글루타미쿰		
ATCC 13032	ND	760
ATCC 13032 (pKT10)	ND	4670
코리네박테륨 아세토아시도필륨		
ATCC 13870	ND	980
ATCC 13870 (pKT10)	170	6050
코리네박테륨 칼루나에		
ATCC 15991	ND	480
ATCC 15991 (pKT10)	ND	4330
코리네박테륨 헤르큘리스		
ATCC 13868	ND	350
ATCC 15990 (pKT10)	160	1830
코리네박테륨 릴륨		
ATCC 15990	ND	300
ATCC 15990 (pKT10)	170	2140
브레비박테륨 이마리오필륨		
ATCC 14068	ND	130
ATCC 14068 (pKT10)	190	6690
브레비박테륨 디바리카툼		
ATCC 14020	ND	430
ATCC 14020 (pKT10)	140	3980
브레비박테륨 플라붐		
ATCC 14067	ND	550
ATCC 14067 (pKT10)	120	2940
브레비박테륨 락토페르멘툼		
ATCC 13655	ND	230
ATCC 13655 (pKT10)	120	2760
미크로박테륨 암모니아필륨		
ATCC 15354	ND	450
ATCC 15354 (pKT10)	50	4000
브레비박테륨 암모니아게네스		
ATCC 6872	ND	ND
ATCC 6872 (pKT10)	ND	1730

ND : 검출할 수 없음

[실시예 4]

[ICL 유전자 함유 단편의 해석]

(1) 클론화 DNA 단편의 제한 효소지도

플라스미드 pKT4 DNA 1㎍을 10-12 단위의 각 제한 효소(Afl II, Alu I, Bgl II, Cla I, Hind III, Hpa I, Nco I, Nru I, Sma I, Sph I, Stu I, Xho I) 단독 또는 2종류를 조합하여 37℃(Sma I 이외의 효소)혹은 30℃(Sma I)에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 0.8% 아가로오스 겔 전기 영동 혹은 5% 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 걸어, 생성된 절단편의 치수를 측정함으로써 클론화된 6.0kb의 Hind III DNA 단편이 제1도에 표시한 제한 효소지도로 이루어진 구조르 갖는다는 것을 알았다.

(2) 서브 클로닝

6.0 kb Hind III DNA 단편상에 클론화된 ICL 유전자의 소재를 특정하기 위하여 몇 개의 영역을 서브클론화 하였다. pKT4 플라스미드 2㎍을 함유하는 완충액 C 48㎕에 10 단위의 Hind III 와 Xho I를 가하여, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 한편 pUC19 2㎍을 함유하는 완충액 C 18㎕에 10단위의 Hind III 와 Xho I를 가하여, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이것들의 양 반응액을 0.8% 아가로오스 겔 전기 영동법으로 분리한 후, DNA 회수 정제 키트를 사용하여 각각 1.9kb 및 2.7 kb 의 단편으로 하여 회수하였다. 양 DNA 단편을 상법의 리가제 처리에 의해 연결하였다. 이 반응액을 이.콜리 ATCC 33694의 형질전환에 제공하고, 플라스미드 pKT5를 얻었다. 또 Kpn I 로 절단한 pKT5를, 같은 제한 효소로 절단한 코리네박테륨 글루타미쿰 벡터 플라스미드 pCG 116과 연결하여 플라스미드 pKT13을 제작하였다. 또 pKT4로부터 Sma I-Bgl II 2.2kb 단편, Hpa I-Bgl II 2.1kb 단편 및 Stu I-Bgl II 1.2kb 단편을 분취후, 각각 pCG 116의 Sma I-Bam HI 링커부분에 삽입연결하고, 플라스미드 pKT19, pKT20, pKT21을 제작하였다. 이것들의 플라스미드 위에 클론화된 DNA 단편을 제3도에 도시하였다.

이것들의 플라스미드 DNA로 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032을 형질전환하였다. 형질 전환주를 MAYE 배지에서 배양하여 얻어진 균체의 ICL 활성을 측정하였다(제3도). pKT19 보유주와 pKT20 보우쥬는 pKT10 보유주와 같은 수준의 고활성을 갖고 있었으나 pKT13 보유주 및 pKT21 보유주는 숙주와 대략 같은 수준의 활성 밖에 주지 못하였다. 이것들의 결과로부터 ICL 유전자는 제3도의 상방에 화살표로 표시한 2.1kb Hpa I-Bgl II DNA 단편내에 위치결정되었다.

(3) ICL 유전자 영역의 염기 배열

ICL을 코딩하는 Hpa I-Bal II 2.1kb DNA 단편을, 그의 단편 위에 존재하는 제한 효소 부분으로 절단하고, 대응하는 제한 효소로 절단한 플라스미드 pUC 118, pUC 119 (Takara Shuzo 사제)에 삽입 연결하였다. 이와 같이 하여 조제한 플라스미드를 사용하여 M13 사슬 터미네이션 개량법[Messing et al., Methods in Enzymology, 101, 20 (1983)]에 따라 염기배열을 결정하였다. 결과를 배열번호 3으로 표시하는 DNA 염기 배열 및 ICL 구조 유전자에 대응하는 아미노산 배열로 표시하였다. 이 염기배열중에는 실시예 2(2)에 표시한 N 말단 18 아미노산 잔기중 17 아미노산 코돈에 대응하는 배열을 포함하는 431 아미노산 잔기로 이루어진 오픈리딩 프레임(1293bp)가 발견되었다. 따라서 ICL 프로모터 활성은 ATG 상류의 DNA 배열로 특정되었다. 또 스톱 코돈 TAG 로부터 27bp 하류에는, 전사 종결에 기능한다고 생각되는 배열 (배열번호 3으로 표시되는 DNA 염기 배열의 1833-1846 및 1850-1863의 위치)가 존재하고 있었다.

[실시예 5]

[코리네형 세균에 있어서의 ICL 유전자의 상동성]

실시예 2(1) 및 (2)에 기재한 ICL의 N 말단 아미노산 배열에 대응하는 50mer 올리고 뉴클레오티드 혹은 5' 비번역 영역인 Hpa I-Afl II 0.5kb 단편(배열번호 3)을 프로브로 하여 각종 코리네 세균의 염색체 DNA 단편의 상동성을 서던 히브리드화법[Read et al., Nucleic Acid Res., 13, 7207 (1985)]에 따라 조사하였다.

Hpa I-Afl II 0.5kb 단편을 조제하기 위하여 플라스미드 pKT10(제2도, 제3도) 2㎍을 포함하는 완충액 E[10mM Tris-HCl (pH 7.5), 4.0mM KCl, 10mM, $MgCl_2$, 1mM DTT] 49㎕에 10단위의 Afl II를 첨가한 후, 37℃에서 1시간 반응시키고, 다시 3㎕의 1M KCl 및 10 단위의 Hpa I를 첨가하고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액을 1.2% 아가로오스 겔에 올려놓고 전기 영동후, DNA 회수정제 키트를 사용하여 Hpa I-Afl II 0.5kb 단편으로서 회수하였다.

50mer 올리고 뉴클레오티드는 실시예 2(2)에 따라 5' 말단을 표지화하고, Hpa I-Afl II 0.5kb 단편은 닉크(Knick) 번역 키트(Takara Shuzo 사제)를 사용하여 [^{32}P]로 표지화 하였다.

코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032, 코리네박테륨 아세토아시도필룸 ATCC 13870, 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991, 코리네박테륨 헤르쿨리스 ATCC 13868, 브레비박테륨 디바리카룸 ATCC 14020, 브레비박테륨 락토페르멘툼 ATCC 13869, 및 미크로박테륨 암모니아필룸 ATCC 15354로부터 실시예 2(3)에 기재한 방법에 따라서 염색체 DNA를 조제하였다. 각각의 염색체 DNA 5㎍을 함유하는 완충액 B 98㎕에 20 단위의 Hind III를 첨가하고, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이것들의 반응액 10㎕를 각각 0.8% 아가로오스 겔에 올려 놓고 전기 영동을 하였다. 영동후의 겔을 0.25M HCl 속에 담구어 15분간 진탕한 후, 탈이온수로 행구고, 0.4M NaCl을 스며들게한 여지(와트만 3MM)의 위에 놓았다. 겔의 위에 나일론 필터(BIO-RAD 사제 제타 프로브 멤브레인), 여지 및 적당한 무게를 순차적으로 올려가면서, 겔의 밑에서부터 여지 너머로 0.4M NaOH를 공급하여 DNA를 필터위에 전사하였다. 필터를 6 x SSC로 세정하고, 바람에 말려서 히브리드화 실험에 제공하였다. 이 필터를, 에비 히브리드화 용액(6 x SSC 0.01M EDTA, 1% 피콜, 1% 폴리비닐피롤리돈, 1% 소혈청 알부민, 0.5% SDS, 0.1㎎/㎖ 변성 연어 정자 DNA) 20㎖에 담구고 68℃에서 3시간 가열하였다. 필터를 예비 히브리드화 용액 20㎖에 표지화한 각각의 프로브 0.2㎍을 가한 히브리드화 용액에 옮겼다. 50mer 올리고 뉴클레오티드를 프로브로한 경우에는 40℃에서 16시간, Hpa I-Afl II 0.5kb 단편을 프로브로한 경우에는 68℃에서 1시간 히브리드화 처리하였다. 처리한 필터는 SWS (0.3 x SSC, 0.05% SDS)속에 담그고, 50mer 올리고 뉴클레오티드 프로브로한 경우에는 52℃, 30분간 처리를 2회 하고, Hpa I-Afl II 0.5kb 를 프로브로한 경우에는 68℃,30분간 처리를 2회 하여 세정하였다. 각각의 필터는 바람에 건조시킨 후, X선 필름(Fuji Photo Film 사제)에 밀착시켜 감광시켰다.

그 결과, 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991 이외의 코리네형 세균에서는 어느 프로브를 사용한 경우에도 약 6.0kb의 염색체 Hind III DNA 절단편과 히브리드를 형성하였다. 한편 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991에 있어서는, 어느 프로브를 사용한 경우에도 약 2.0kb의 Hind III 염색체 DNA 단편과 히브리드를 형성하였다. 이것들의 결과로부터 이것들의 코리네형 세균의 ICL 유전자는 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 ICL 구조 유전자 뿐만 아니라 그의 프로모터 영역에서도 상동성을 갖는 것이 명백하게 되었다.

[실시예 6]

[ICL 프로모터에 의한 클로람페니콜 아세틸트란스페라제 구조 유전자의 발현]

대장균의 플라스미드 pKK232-8은 대장균 유래의 클로람페니콜 아세틸트란 스페라제 유전자 영역중, 프로모터 배열을 제거한 번역개시에 필요한 배열로부터 구조 유전자까지의 영역을 가지며, 그의 하류에 대장균 리보솜 RNA 유전자 유래의 터미네이터 배열 TT를 배치한 DNA 단편을 포함하고 코리네형 세균으로 복제할 수 있는 플라스미드 pCGKK27-3을 제4도에 표시한 바와 같이 제작하였다.

pKK232-8(Pharmacia Fine Chemicals 제) 5㎍을 함유하는 완충액 C 50㎕에 0.3 단위의 Pst I를 첨가하여 37℃에서 1시간 처리한후, 68℃에서 10분간 가온하여 반응을 정지시켰다. 한편, 특개소 57-186489에 기재된 방법으로 보유주로부터 조제한 코리네형 세균 벡터 pCG11(특개소 57-134500) 2㎍을 12 단위의 Pst I를 첨가한 완충액 C 49㎕속에 37℃에서 1시간 반응시키고 다시 가온처리하였다. pKK232-8 및 pCG11의 각 처리액을 0.8% 아가로오스 겔 전기 영동에 걸은 후, DNA 회수 정제 키트를 사용하여 각각 5.1kb 및 6.8kb DNA 단편을 회수하였다. 양 DNA 단편을 혼합하여, T4 리가제를 가하여 연결처리하였다.

이 리가제 반응액을 사용하여, 실시예 2(3)에 따라 이. 콜리 ATCC 33694를 형질전환하여 스펙티노마이신

25㎍/㎖를 함유하는 LB 플레이트 위에서 스펙티노마이신 내성 형질전환체를 분리하였다. 형질전환체로부터 추출한 플라스미드 DNA를 제한 효소로 절단해석하여 이 형질전환체 중의 하나의 주로부터 제4도에 표시한 바와 같이 pKK232-8과 pCG11이 연결된 플라스미드 pCGKK27-3을 취득하였다.

또, pCGKK27-3으로 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032를 실시예 3(1)에 기재한 방법으로 형질 전환하였다. 스펙티노마이신 내성으로 선택된 형질 전환체는 pCGKK27-3을 보유하고 있었으나, 클로람 페니콜 내성을 나타내지 않으며, 클로람페니콜 아세틸트란스페라제 구조 유전자는 ATCC 13032 주에서도 발현되지 않는다는 것을 확인하였다.

다음에, ICL 프로모터 활성을 갖는 DNA 단편을 pCGKK27-3에 삽입하였다(제5도 참조). ICL 프로모터 함유 단편으로서 제3도에 표시한 0.6kb의 Sma I-Alu I단편을 사용하였다. pKT19(5㎍)을 완충액 D[10mM Tris-HCl (pH 7.5), 20mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT] 49㎕중에서 10단위의 Sma I를 첨가하여 30℃, 1시간 처리한 후, 0.2M KCl 6㎕ 및 10 단위의 Afl II를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 1% 아가로오스 겔에 올려 놓고, 전기 영동후 DNA 회수 정제키트를 사용하여 0.8kb의 Sma I-Afl II DNA 단편을 분리하였다. 이 DNA를 함유하는 완충액 A [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT] 49㎕에 10단위의 Alu I를 첨가하여, 37℃, 1시간 반응한후, 68℃, 10분간 가열처리하여 Sma I-Alu I DNA 단편 함유액을 조제하였다.

한편 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032의 형질전환체로부터 분리한 pCGKK27-3(5㎍)을, 완충액 D 49㎕중에서 10 단위의 Sma I를 첨가하여, 30℃, 1시간 반응시키고, 다시 가열처리하였다.

이 pCGKK27-3 함유액과 상기한 Sma I-Alu I DNA 단편 함유액을 혼합하여, 상법에 의해 리가제 처리하였다. 리가제 처리액을 사용하여 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032를 형질전환시켜, 균액을 아세트산암모늄 10㎎/㎖, 스펙티노마이신 400㎍/㎖ 및 클로람페니콜 5㎍/㎖을 함유하는 RCGP 플레이트 위에 도포하였다. 30℃에서 7일간 배양하여 형질 전환체의 콜로니를 얻었다. 그의 1주로부터, 클로람페니콜 아세틸트란스페라제 구조 유전자 함유 DNA 단편의 직전에, Sma I-Alu I DNA 단편을 삽입한 플라스미드 pKT22가 취득되었다(제5도 참조).

이 형질전환주 및 ATCC 13032주를 MSYE 배지 및 MAYE 배지에서 30℃에서 16시간 배양하여 집균하였다. 이 균체를 파쇄하여 얻어진 세포 추출액중의 클로람페니콜 아세틸트란스페라제 활성을 [Shaw et al., Methods in Enzymology, 43, 737 (1975)]에 따라 측정하였다. 1분간에 1μmol의 클로람페니콜의 아세틸화를 촉매하는 효소활성을 1단위라고 정의하였다.

상기와 동일한 방법으로 표 2에 표시한 코리네형 세균 5균종에 pKT22를 각각 도입하고 얻어진 형질전환체를 MSYE 배지 및 MAYE 배지에서 배양하고 그의 세포 추출액중의 클로람페니콜 아세틸트란스페라제 활성을 측정하였다. 결과를 표 2에 표시하였다.

[표 2]

균 주	클로람페니콜 아세틸트란스페라제 비활성(U/㎎ 단백질)	
	MSYE 배지	MAYE 배지
코리네박테륨 글루타미쿰		
ATCC 13032	0	0
ATCC 13032 (pKT22)	0.6	27.4
코리네박테륨 헤르쿨리스		
ATCC 13868	0	0
ATCC 13868 (pKT22)	0.2	13.2
브레비박테륨 디바리카툼		
ATCC 14020	0	0
ATCC 14020 (pKT22)	0.5	25.8
브레비박테륨 락토페르멘툼		
ATCC 13655	0	0
ATCC 13655 (pKT22)	0.3	22.0
브레비박테륨 암모니아게네스		
ATCC 6872	0	0
ATCC 6872 (pKT22)	0.1	12.6

표 2에 표시한 바와 같이 형질 전환주는 MAYE 배지에서 배양하였을 때, 고레벨의 클로람페니콜 아세틸트란스페라제를 생산하고 있다는 것이 인정되었다. 현저한 양의 클로람페니콜 아세틸트란스페라제는 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동 해석에 있어서 24KDa의 단백질로서 관찰되었다.

이상의 결과로부터 클로람페니콜 아세틸트란스페라제 구조 유전자는 ICL 프로모터에 의해 유도적으로 발현하고 있다는 것이 확인되었다.

[실시예 7]

[ICL 프로모터에 의한 β-갈락토시다제 구조 유전자의 발현]

ICL 프로모터에 의한 대장균의 β-갈락토시다제 구조 유전자를 발현하는 발현 벡터의 제작을 시도하였다. 제6도에 공정의 개략을 나타냈다.

ICL 유전자를 함유하는 플라스메드 pKT20(10㎍)을 함유하는 완충액 C 98㎕에 24단위의 Stu I를 첨가하고, 37℃에서 2시간 반응 후, 등량의 페놀로 1회 추출하였다. 또 등량의 클로로포름/이소아밀알콜(24/1, v/v)로 1회 추출하고, 에탄올 침전후 진공건조시켰다. 이 DNA를 킬로 시퀀스 삭제 키트(Takara Shuzo 사제)를 사용하여 엑소뉴클레아제 III에 의한 결실처리를 하였다. 이것들의 결실 단편을 함유하는 완충액 C 48㎕에 20단위의 Xho I를 첨가하여 37℃에서 2시간 반응시켰다.

한편 β-갈락토시다제 구조 유전자 함유 DNA 단편을 플라스미드 pE'lac1(특개소 63-273469)로부터 제조하였다. 이 플라스미드는 대장균 락토오스 오페론중 β-갈락토시다제 구조 유전자의 N 말단으로부터 8번째 아미노산의 코돈으로부터 상류의 배열이 결여 된 DNA 배열을 포함하고 있다. pE'lac1 5㎍을 함유하는 완충액 D 49㎕에 10단위의 Sma I를 첨가하고, 30℃에서 2시간 반응시켰다. 또 1.5㎕의 5M NaCl와 10 단위의 Sal I를 첨가하여, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 플라스미드 pKT20 및 pE'lac1의 절단편을 각각 0.8% 아가로오스겔 전기영동으로 분리시킨후, DNA 회수 정제 키트를 사용하여 각각 약 7.6kb 및 6.2kb의 단편으로 회수하였다. 양자를 상법의 리가제 처리에 의해 연결하였다.

이 리가제 처리액을 사용하여 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032를 실시예 3(1)의 방법에 따라 형질전환 시킨 후, 균액을 스펙티노마이신 400㎍/㎖, 5-브로모-4-클로로-3-인돌리-β-D-갈락토시드(X-gal) 40㎍/㎖ 및 아세트산 암모늄 0.01g/㎖을 함유하는 RCGP 플레이트위에 도포하였다. 30℃, 7일간 배양한 후, 이 플레이트위에서 푸르게 염색된 형질 전환체가 얻어졌다. 이 형질전환체 중의 하나는 6.2kb의 락토오스 오페론 유래 DNA 단편이 ICL 유전자 함유 DNA단편내에 삽입된 플라스미드 pKT23을 보유하고 있었다(제6도 참조).

이 형질전환체와 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032를 MSYE 배지 및 MAYE 배지에서 30℃에서 16시간 배양하여 집균하였다. 균체를 파쇄하여 세포추출액의 β-갈락토시다제 활성을 측정하였다. β-갈락토시다제의 활성은 [Miller et al., Experiments in Molecular Genetics, 352, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)]의 방법에 따라 실시하였다. 1분간의 1μmol의 O-니프로페놀의 생성을 촉매하는 효소활성을 1단위로 하고, 단백질 1㎎당의 비활성을 산출하였다.

상기와 동일한 방법으로 표 3에 표시한 코리네형 세균 4균종에 pKT23을 각각 도입하고, 얻어진 형질 전환체를 MSYE 배지 및 MAYE 배지에서 배양하여, 그의 세포 추출액중의 β-갈락토시다제 활성을 측정하였다. 결과를 표 3에 표시하였다.

[표 3]

균 주	β-갈락토시다제 비활성 (U/㎎ 단백질)	
	MSYE 배지	MAYE 배지
코리네박테륨 글루타미쿰		
ATCC 13032	0	0
ATCC 13032 (pKT23)	700	30900
코리네박테륨 헤르큘라스		
ATCC 13868	0	0
ATCC 13868 (pKT23)	300	14400
브레비박테륨 디바리카툼		
ATCC 14020	0	0
ATCC 14020 (pKT23)	500	27500
브레비박테륨 락토페르멘툼		
ATCC 13655	0	0
ATCC 13655 (pKT23)	350	22700

그의 결과, 형질 전환체만이 MAYE 배지에서 배양하였을때에 고레벨의 β-갈락토시다제를 생산하고 있었다. 현저한 양의 β-갈락토시다제가 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기 영동해석에 있어서 116KDa 보다 약간 큰 단백질 밴드로서 검출되었다.

또 pKT23 위에서의 ICL 유전자 영역의 5'측의 DNA 단편과 β-갈락토시다제 구조 유전자의 결합위치를 조사하였다. pKT23(2㎍) 및 플라스미드 pUC118(Takara Shuzo 사제) 2㎍을 각각에 함유하는 완충액 A 49㎕에 각각 10 단위의 Kpn I를 첨가하여, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 또 0.5㎕의 5M NaCl과 10단위의 Bam

HI를 가하여 멸균수로 반응액량을 55㎕로 조정하여, 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이것들의 pKT23 및 pUC118 절단편 처리물을 각각 0.8%아가로오스 겔 전기영동에 걸어, 각각 약 0.7kb 및 7.2kb의 단편을 DNA 회수 정제키트를 사용하여 회수하였다. 양자를 상법의 리가제 처리에 의해 연결한 후, 실시예 4(3)에 따라 염기배열을 결정하였다.

그 결과, 배열번호 4로 표시되는 이소시트르산 리아제의 N 말단으로부터 63번째까지의 아미노산을 코딩하는 DNA 단편 N 말단 8 아미노산을 결하는 β-갈락토시다제 구조 유전자가 프레임으로 연결되어 있다는 것을 알았다.

이상의 결과로부터 ICL 프로모터의 지배하에 β-갈락토시다제 융합 단백질이 유도적으로 합성된다는 것을 알았다.

본 발명에 의하면 코리네형 세균에 있어서 유용 유전자 산물을 효율좋게 생산시키기 위한, 유전자 발현 조절 DNA를 제공할 수가 있다.

[배열표]

배열번호 : 1

배열의 길이 : 18

배열의 형 : 아미노산

토포로지 : 직쇄상

배열의 종류 : 펩티드

단편 형 : N 말단 단편

서열 1

배열

```
Ser Asn Val Gly Lys Pro Arg Thr Ala Gln Glu Ile Gln Gln Asp Asp Asp Thr
  1               5                  10                  15
```

배열번호 : 2

배열의 길이 : 50

배열의 형 : 핵산

사슬의 수 : 1개 사슬

토포로지 : 직쇄상

배열의 종류 : 다른 핵산 합성 DNA

하이포세티칼 배열 : 예

안티센스 : 예

단편 형 : N 말단 단편

서열 2

배열

```
GTATCATCAT CCTGCTGGAT TTCCTGGGCG GTGCGTGGCT TGCCAACGTT          50
```

배열번호 : 3

배열의 길이 : 2135

배열의 형 : 핵산

사슬의 수 : 2개 사슬

토포로지 : 직쇄상

배열의 종류 : 게놈 DNA

기원

생물명 : 코리네박테륨 글루타미쿰

주명 : ATCC 13032

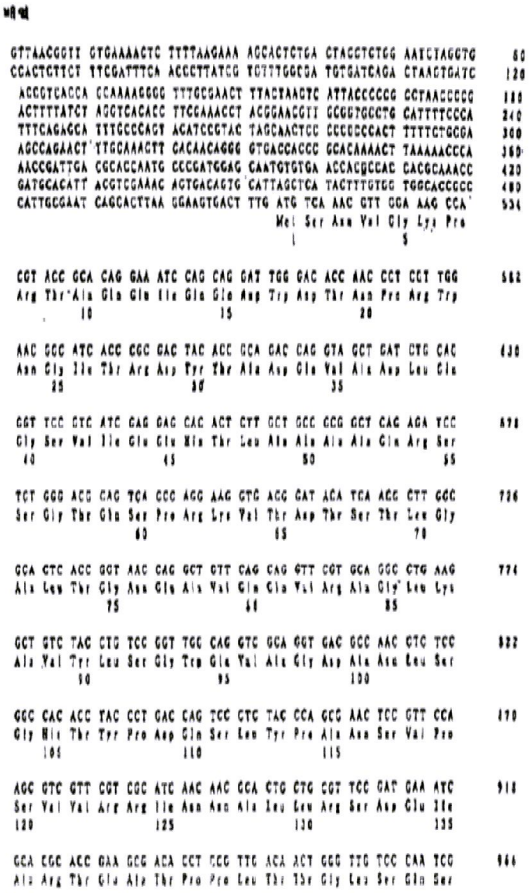
배열의 특징

특징을 나타내는 기호 : mat 펩티드

존재위치 : 514-1806

특징으로 결정한 방법 : E

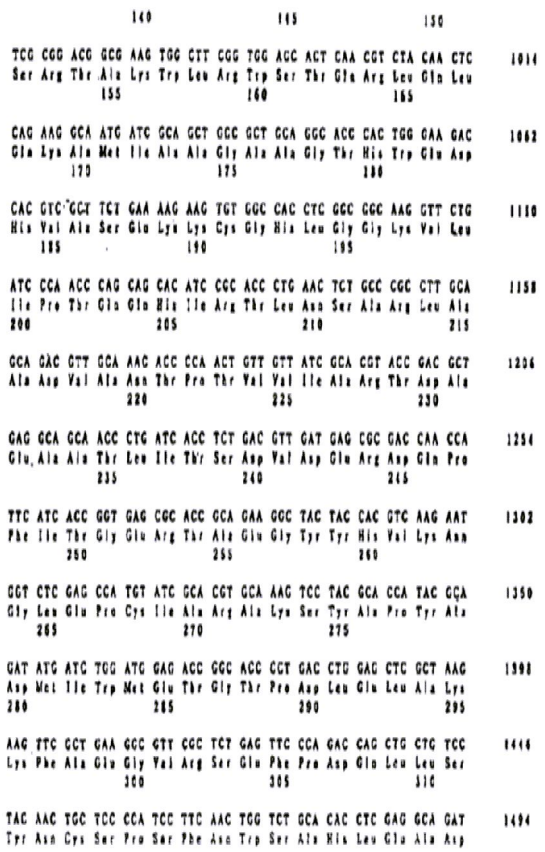
서열 3



서열 3a

```
                  140                 145                 150

TCG CGG ACG GCG AAG TGG CTT CGG TGG AGC ACT CAA CGT CTA CAA CTC    1014
Ser Arg Thr Ala Lys Trp Leu Arg Trp Ser Thr Gln Arg Leu Gln Leu
              155                 160                 165

GAG AAG GCA ATG ATC GCA GCT GGC GCT GGA GGC ACC CAC TGG GAA GAC    1062
Glu Lys Ala Met Ile Ala Ala Gly Ala Ala Gly Thr His Trp Glu Asp
          170                 175                 180

CAC GTC GCT TCT GAA AAG AAG TGT GGC CAC CTC GGC GGC AAG GTT CTG    1110
His Val Ala Ser Glu Lys Lys Cys Gly His Leu Gly Gly Lys Val Leu
      185                 190                 195

ATC CCA ACC CAG CAG CAC ATC CGC ACC CTG AAC TCT GCC CGC CTT GCA    1158
Ile Pro Thr Gln Gln His Ile Arg Thr Leu Asn Ser Ala Arg Leu Ala
  200                 205                 210                 215

GCA GAC GTT GCA AAC ACC CCA ACT GTT GTT ATC GCA CGT ACC GAC GCT    1206
Ala Asp Val Ala Asn Thr Pro Thr Val Val Ile Ala Arg Thr Asp Ala
                  220                 225                 230

GAG GCA GCA ACC CTG ATC ACC TCT GAC GTT GAT GAG CGC GAC CAA CCA    1254
Glu Ala Ala Thr Leu Ile Thr Ser Asp Val Asp Glu Arg Asp Gln Pro
              235                 240                 245

TTC ATC ACC GGT GAG CGC ACC GCA GAA GGC TAC TAC CAC GTC AAG AAT    1302
Phe Ile Thr Gly Glu Arg Thr Ala Glu Gly Tyr Tyr His Val Lys Asn
          250                 255                 260

GGT CTC GAG CCA TGT ATC GCA CGT GCA AAG TCC TAC GCA CCA TAC GCA    1350
Gly Leu Glu Pro Cys Ile Ala Arg Ala Lys Ser Tyr Ala Pro Tyr Ala
      265                 270                 275

GAT ATG ATC TGG ATG GAG ACC GGC ACC CGT GAC CTG GAG CTC GCT AAG    1398
Asp Met Ile Trp Met Glu Thr Gly Thr Pro Asp Leu Glu Leu Ala Lys
  280                 285                 290                 295

AAG TTC GCT GAA GCC GTT CGC TCT GAG TTC CCA GAC CAG CTG CTC TCC    1446
Lys Phe Ala Glu Ala Val Arg Ser Glu Phe Pro Asp Gln Leu Leu Ser
                  300                 305                 310

TAC AAC TGC TCC CCA TCC TTC AAC TGG TCT GCA CAC CTC GAG GCA GAT    1494
Tyr Asn Cys Ser Pro Ser Phe Asn Trp Ser Ala His Leu Glu Ala Asp
```

서열 3b



배열번호 : 4

배열의 길이 : 702

배열의 형 : 핵산

사슬의 수 : 2개 사슬

토포로지 : 직쇄상

배열의 종류 : 게놈 DNA

단편 형 : N 말단 단편

기원

생물명 : 코리네박테륨 글루타미쿰

주명 : ATCC 13032

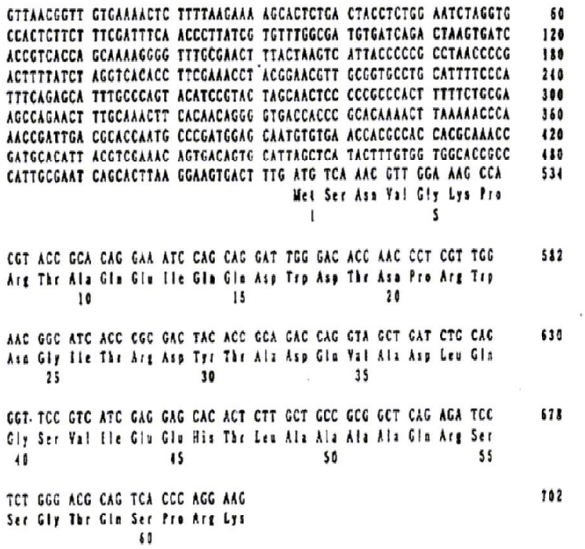
배열의 특징

특징을 나타내는 기호 : transit 펩티드

존재위치 : 514-702

특징으로 결정한 방법 : E

서열 4



(57) 청구의 범위

청구항 1

코리네형 세균의 이소시트르산 리아제 (ICL) 유전자에서 유래하며, 적어도 배열번호 3으로 표시되는 염기배열의 제1번에서 제513번까지의 기능 부분 염기배열을 포함하는 DNA로서, 단백질을 코딩하는 구조 유전자와 함께 벡터 DNA에 삽입되어서, 숙주 코리네형 세균에 도입되었을 때에, 이 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA.

청구항 2

제1항에 있어서, 구조 유전자의 발현이 배지중의 탄소원을 당질로 하였을 때에 억제되고, 배지중의 탄소원을 비당질로 하였을 때 또는 당질 비존재 배지에서 유도되는 것인 DNA.

청구항 3

제1항에 있어서, 구조 유전자가 ICL, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트란스페라제, 인슐린, 성장호르몬, 인터페론 및 과립구 콜로니 자극 호르몬으로부터 선택되는 효소 또는 단백질을 코딩하는 유전자인 DNA.

청구항 4

제1항에 있어서, ICL 유전자를 채취하는 코리네형 세균이 코리네박테륨 속, 브레비박테륨 속, 및 미크로박테륨 속으로부터 선택되는 것인 DNA.

청구항 5

제4항에 있어서, 코리네형 세균이 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032, 코리네박테륨 아세토아시도필룸 ATCC 13870, 코리네박테륨 아세토글루타미쿰 ATCC 15806, 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991, 코리네박테륨 헤르쿨리스 ATCC 13868, 코리네박테륨 멜랏세콜라 ATCC 17965, 코리네박테륨 릴륨 ATCC 15990, 브레비박테륨 이마리오필룸 ATCC 14068, 브레비박테륨 사카롤리티쿰 ATCC 14066, 브레비박테륨 티오게니탈리스 ATCC 19240, 브레비박테륨 디바리카룸 ATCC 14020, 브레비박테륨 플라붐 ATCC 14067, 브레비박테륨 락토페르멘툼 ATCC 13869, 브레비박테륨 로세움 ATCC 13825, 및 미크로박테륨 암모니아필룸 ATCC 15354로부터 선택되는 DNA.

청구항 6

제1항에 있어서, 숙주 코리네형 세균이 코리네박테륨 속, 브레비박테륨 속, 및 미크로박테륨 속으로부터 선택되는 것인 DNA.

청구항 7

제6항에 있어서, 숙주 코리네형 세균이, 코리네박테륨 글루타미쿰 ATCC 13032, 코리네박테륨 아세토아시도필룸 ATCC 13870, 코리네박테륨 아세토글루타미쿰 ATCC 15806, 코리네박테륨 칼루나에 ATCC 15991, 코리네박테륨 헤르쿨리스 ATCC 13868, 코리네박테륨 멜랏세콜라 ATCC 17965, 코리네박테륨 릴륨 ATCC 15990, 브레비박테륨 이마리오필룸 ATCC 14068, 브레비박테륨 사카롤리티쿰 ATCC 14066, 브레비박테륨 티오게니탈리스 ATCC 19240, 브레비박테륨 디바리카룸 ATCC 14020, 브레비박테륨 플라붐 ATCC 14067, 브레비박테륨 락토페르멘툼 ATCC 13869, 브레비박테륨 로세움 ATCC 13825, 및 미크로박테륨 암모니아필룸

ATCC 15354로부터 선택되는 DNA.

청구항 8

(1) 코리네형 세균의 이소시트르산 리아제 (ICL) 유전자에서 유래하며, 적어도 배열번호 3으로 표시되는 염기배열의 제1번에서 제513번까지의 기능 부분 염기배열을 포함하는 DNA로서, 단백질을 코딩하는 구조 유전자와 함께 벡터 DNA에 삽입되어서, 숙주 코리네형 세균에 도입되었을 때에, 이 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA 및 (2) 단백질을 코딩하는 구조유전자가 벡터 DNA에 삽입된 재조합 DNA.

청구항 9

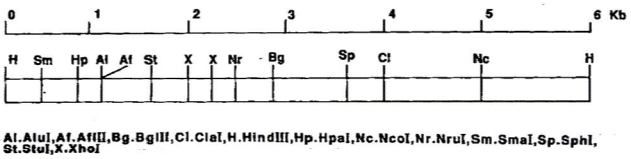
(1) 코리네형 세균의 이소시트르산 리아제 (ICL) 유전자에서 유래하며, 적어도 배열번호 3으로 표시되는 염기배열의 제1번에서 제513번까지의 기능 부분 염기배열을 포함하는 DNA로서, 단백질을 코딩하는 구조 유전자와 함께 벡터 DNA에 삽입되어서, 숙주 코리네형 세균에 도입되었을 때에, 이 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA 및 (2) 단백질을 코딩하는 구조유전자가 숙주에서 자동복제 가능한 벡터 DNA에 삽입된 재조합 DNA를 함유하는 코리네형 세균 형질전환체.

청구항 10

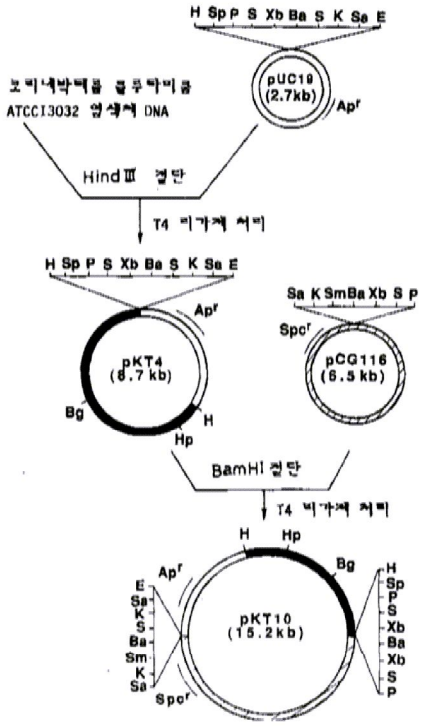
(1) 코리네형 세균의 이소시트르산 리아제 (ICL) 유전자에서 유래하며, 적어도 배열번호 3으로 표시되는 염기배열의 제1번에서 제513번까지의 기능 부분 염기배열을 포함하는 DNA로서, 단백질을 코딩하는 구조 유전자와 함께 벡터 DNA에 삽입되어서, 숙주 코리네형 세균에 도입되었을 때에, 이 구조 유전자의 발현을 조절하는 작용을 갖는 DNA 및 (2) 단백질을 코딩하는 구조유전자가 숙주에서 자동복제 가능한 벡터 DNA에 삽입된 재조합 DNA를 함유하는 코리네형 세균 형질전환체를 배지에 배양하여, 배양물중에 해당 단백질을 생성 축적시켜, 이 배양물로부터 해당 단백질을 채취하는 것을 특징으로 하는 단백질의 제조법.

도면

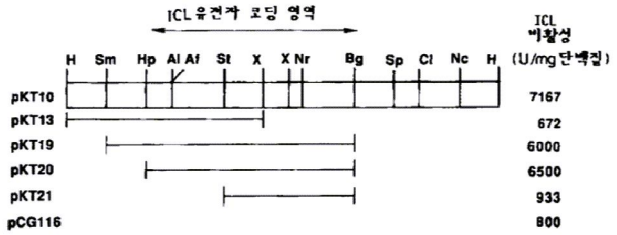
도면1



도면2

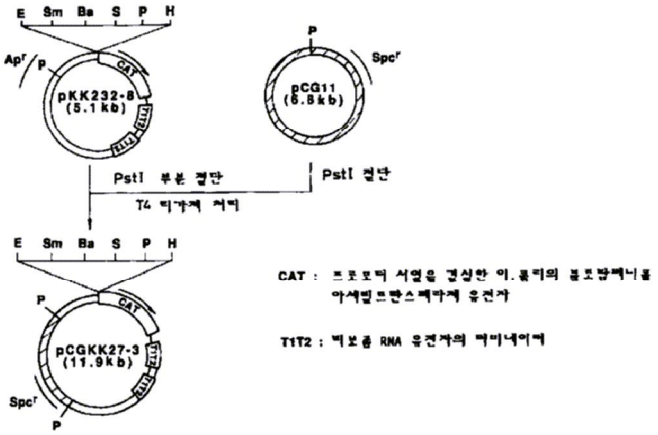


도면3



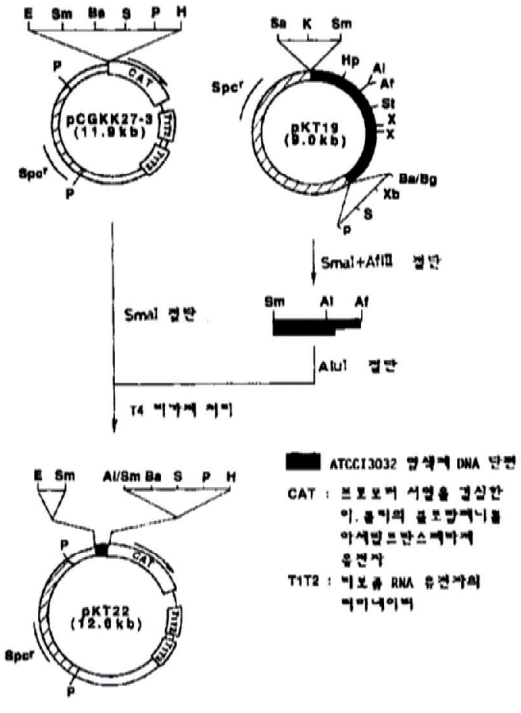
Al.AluI,Af.AflII,Bg.BglII,Cl.ClaI,H.HindIII,Hp.HpaI,Nc.NcoI,Nr.NruI,Sm.SmaI,Sp.SphI, St.StuI,X.XhoI

도면4



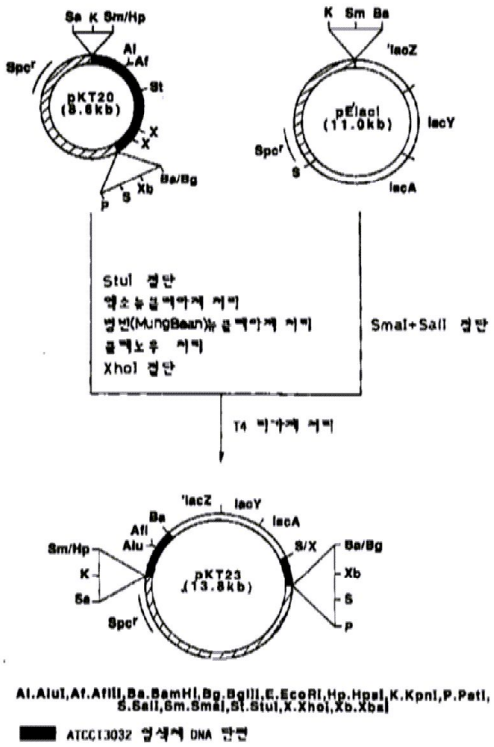
Ba.BamHI,E.EcoRI,H.HindIII,S.SalI,Sm.SmaI,P.PstI

도면5



Al,AluI,Af.AflII.Ba.BamHI,Bg.BglII,E.EcoRI,H.HindIII,Hp.HpaI K.KpnI,S.SalI,Sm.SmaI,St.StuI,P.PstI,X.XhoI.Xb.XbaI

도면6



Al.AluI,Af.AflII,Ba.BamHI,Bg.BglII,E.EcoRI,Hp.HpaI,K.KpnI,P.PstI, S.SalI,Sm.SmaI,St.StuI,X.XhoI,Xb.XbaI

ATCC13032 염색체 DNA 단편