



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0117246
(43) 공개일자 2020년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) A23L 13/40 (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
A23L 13/424 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0039095
(22) 출원일자 2019년04월03일
심사청구일자 2019년04월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
한성욱
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 225동 2802호(
잠실2동,리센즈아파트)
이은혜
서울특별시 중구 퇴계로90길 74 (신당동 래미안신
당하이베르아파트) 103동 802호
(74) 대리인
특허법인 다해

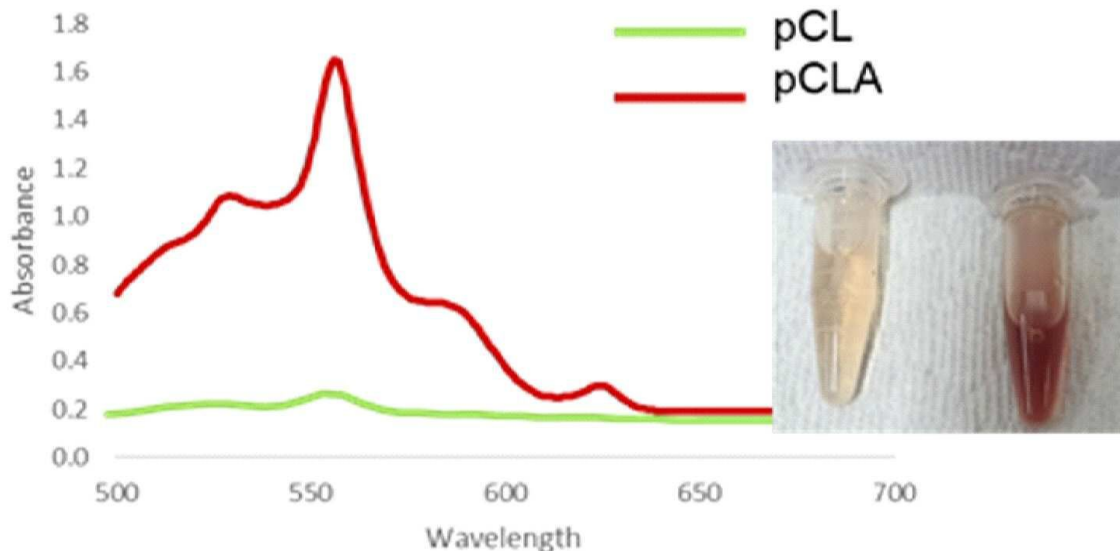
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 제조용 벡터, 형질전환 세포, 및 상기 홀로단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합되어 기능적으로 활성화된 홀로단백질 제조를 위한 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 및 상기 세포를 이용한 상기 홀로단백질의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제공에 의해 추가적인 공정 없이 레그헤모글로빈에 헴 조효소를 결합시켜 기능적으로 활성화된 단백질(홀로단백질)을 제조할 수 있다는 점에서 시간과 비용을 절약할 수 있으며, 본 발명의 헴 조효소가 결합된 레그헤모글로빈은 동물의 헤모글로빈보다 우수한 산소 결합력을 가지면서 안전하게 이용할 수 있는 산소 운반체 물질로서 인공혈액의 상용화에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)
A61K 9/0026 (2013.01)
A61P 7/00 (2018.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/8257 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
C12Y 203/01037 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018003704
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원(3억초과~5억이하)
연구과제명	식물 광호흡 기작 모방 신규 Porphyrin 생합성경로 연구 기반 코리네박테리움을 통
한 태양전지 유기소재 Zinc-Porphyrin 생산 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

레그헤모글로빈(leghemoglobin)을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소(Aminolevulinic acid synthase: ALAS)를 암호화하는 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자는 콩과 식물 유래의 유전자인 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자는 로도박터 캡슐레이터스(*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 비리디스(*Rhodobacter viridis*), 로도박터 메스투아리(*Rhodobacter aestuarii*), 및 로도박터 마리스(*Rhodobacter maris*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 유래의 유전자인 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 벡터는 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자가 작동가능하게 연결된(operatively linked) cspA 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 cspA 프로모터는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 벡터는 pColdII 플라스미드 벡터인 것을 특징으로 하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 9

제1항의 재조합 발현 벡터가 주입된 형질전환 세포.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 세포는 대장균(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는, 형질전환 세포.

청구항 11

(1) 레그헤모글로빈(leghemoglobin)을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소(Aminolevulinic acid synthase: ALAS)를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된 세포를 배양하는 단계;

(2) 상기 세포의 배양물을 수득하는 단계; 및

(3) 상기 배양물로부터 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 레그헤모글로빈(leghemoglobin)과 헴 조효소(heme cofactor)가 결합된 홀로단백질(holoprotein) 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (1) 단계에서 세포의 배양은 회분배양(Batch culture)인 것을 특징으로 하는, 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 (3) 단계의 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 분리는 상기 배양물을 원심분리하여 그 상등액을 수득함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는, 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 제조방법.

청구항 14

제11항의 방법으로 제조된 레그헤모글로빈(leghemoglobin)과 헴 조효소(heme cofactor)가 결합된 홀로단백질(holoprotein)을 유효성분으로 포함하는, 산소 운반성 혈장 증량제.

청구항 15

제11항의 방법으로 제조된 레그헤모글로빈(leghemoglobin)과 헴 조효소(heme cofactor)가 결합된 홀로단백질

(holoprotein)을 유효성분으로 포함하는, 철분제.

청구항 16

제11항의 방법으로 제조된 레그헤모글로빈(leghemoglobin)과 헴 조효소(heme cofactor)가 결합된 홀로단백질(holoprotein)을 유효성분으로 포함하는, 식물성 인공 고기 첨가물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합되어 기능적으로 활성화된 홀로단백질 제조를 위한 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 및 상기 세포를 이용한 상기 홀로단백질의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 레그헤모글로빈은 주로 콩과 식물의 뿌리혹에 존재하고 있으며, 생물학적으로 동물의 헤모글로빈과 유사한 기능(Symbiotic hemoglobin)을 한다. 산소친화성이 강한 미오글로빈형 단위체인데 산소와의 결합력이 인간의 헤모글로빈보다 10배 정도 높아 질소 고정화 효소가 잘 작동하도록 산소 농도를 낮추는 역할과 호흡이 필요한 부위에 산소를 제공하는 2가지 역할을 동시에 수행한다. 레그헤모글로빈은 단량체로써 헴 한 분자를 조효소(cofactor)로 함유하고, 미오글로빈과 구조적으로 유사하며, 산소를 비롯하여 다양한 가스 분자를 운반하는 기능을 갖고 있다.

[0003] 헴은 프로토포르피린(protoporphyrin) 구조에 배위 결합한 제1철이온(Fe^{2+})을 포함하는 적혈구의 색소이다. 헴 구조 중 철이 비-헴철(non-heme iron)보다 훨씬 높은 생체 이용률을 가지며 헴 철 흡수는 다른 식이 성분에 의해 영향받지 않기 때문에, 헴이 식품 또는 동물 사료 첨가제로써 이용될 수 있었다. 식용헴은 생물학적 가용성 때문에 비-헴철보다 중요시되는데, 수용성이거나 pH 7.0 이상인 환경에서는 비헴철이 석출되어 ferric hydroxide가 되거나 hydroxyl-iron dimer를 형성하여 바로 흡수가 되지 않는다. 게다가 다른 식용 물질들이 철과 배위결합을 해버려 사용할 수 없게 만든다. 흡수율은 단백질의 존재에 의해 상당히 증가하게 되며, 이때 단백질 가수분해 소화를 통하여 나온 글로빈 분해 부산물이 흡수를 돕는다.

[0004] 동물의 혈액에서 유래하는 헤모글로빈을 사용한 제제는 미지 바이러스의 혼입 등의 우려가 있어서, 안전면에서 인체への 사용에 대해서는 문제가 있었다. 그러나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 형질 전환한 미생물에 의해서 안전한 헤모글로빈 제제를 제공할 수 있을 가능성이 있다.

[0005] 대장균을 이용하여 헴을 조효소로 갖고 있는 홀로단백질 형성에 대해서는 다음과 같은 예가 보고되어 있다. 이 예에는 대장균 자신이 갖는 효소에 의해 생성한 헴과의 결합력을 높이기 위하여 헤모글로빈의 발현 속도를 늦추거나, 헴을 외부로부터 수용할 수 있는 단백질을 발현하고 대장균 배양액에 헴을 첨가하여 세포 내에서 결합이 가능하도록 한다. 하지만 종래의 방법은 홀로단백질의 형성 및 생산이 가능하나 헴과 결합하고 있는 레그헤모글로빈의 생산성을 높이기 위한 추가적인 공정이 필요했다. 이에 본 발명자는 재조합 대장균에서 헴 생산 경로에 관여하는 유전자를 발현하고 레그헤모글로빈 코딩 유전자를 발현함으로써 홀로단백질로써의 헴 조효소가 결합된 레그헤모글로빈을 생산할 수 있는 방법을 연구하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-1511361

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 레그헤모글로빈과 헴 조효소를 동시에 발현하여 추가적인 공정 없이도

빠른 시간내에 기능적으로 활성화된 홀로단백질을 대량 생산하기 위한 제조합 발현 벡터와 이를 이용하여 형질 전환된 세포를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 세포를 이용하여 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 홀로단백질을 포함하는 산소 운반용 혈장 증강제와 철분제를 제공하는 것에 그 목적이 있다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 레그헤모글로빈(leghemoglobin)을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소(Aminolevulinic acid synthase: ALAS)를 암호화하는 유전자를 포함하는 제조합 발현 벡터를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자는 콩과 식물 유래의 유전자일 수 있으며, 바람직하게는 콩(*Glycine max*) 유래의 유전자일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자는 로도박터 캡슐레이터스(*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 비리디스(*Rhodobacter viridis*), 로도박터 메스투아리(*Rhodobacter aestuarii*), 및 로도박터 마리시(*Rhodobacter maris*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 유래의 것일 수 있으며, 상기 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 벡터는 cspA 프로모터를 포함할 수 있으며, 상기 프로모터는 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자가 작동가능하게 연결된(operatively linked) 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 cspA 프로모터는 서열번호 3의 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 벡터는 pColdII 플라스미드 벡터일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 제조합 발현 벡터로 형질전환시킨 세포, 즉 형질전환체를 제공할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 세포는 대장균(*Escherichia coli*)일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질의 제조방법을 제공할 수 있다:

[0021] (1) 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자를 포함하는 제조합 발현 벡터로 형질전환된 세포를 배양하는 단계;

[0022] (2) 상기 세포의 배양물을 수득하는 단계; 및

[0023] (3) 상기 배양물로부터 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질을 분리하는 단계.

[0024] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계에서 세포의 배양은 회분배양(Batch culture) 또는 연속배양(Continuous culture)일 수 있으며, 상기 배양 배지는 LB 배지일 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계의 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 분리는 상기 배양물을 원심분리하여 그 상등액을 수득함으로써 달성되는 것일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질을 유효성분으로 포함하는 산소 운반성 혈장 증량제, 즉 인공혈액을 제공할 수 있으며, 이를 유효성분으로 포함하는 철분제 및 식물성 인공 고기 첨가물을 제공할 수도 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 레그헤모글로빈에 헴 조효소를 결합시켜 기능적으로 활성화된 단백질 제조를 위한 추가적인 공정 없이 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질을 대량으로 빠르게 제조할 수 있게 되어 시간과 비용면에서 경제적인 장점이 있다. 또한, 본 발명은 동물의 헤모글로빈과 비교하여 보다 우수한 산소 결합력을 가진 식물의 레그헤모글로빈을 이용함으로써 그 기능면에서도 우수한 산소 운반체 물질로서 제공될 수 있다. 아울러, 본 발명은 유전자 재조합 기술을 이용하는 것으로서 혈액 유래 체제 특유의 이물질(바이러스 등) 혼입의 우려가 없이 안전하게 사용할 수 있다. 이에, 인공혈액의 상용화에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 아울러, 산성 환경에서 흡수율이 높은 헴철분제로서 사용이 가능할 것이고, 식물성 인공고기 맛의 핵심인 피맛을 모방할 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1a는 콩(*Glycine max*) 유래 레그헤모글로빈(LHb) 유전자와 *Rhodobacter capsulatus* 유래 아미노레불린산 합성효소(ALAS) 유전자가 pColdII 플라스미드에 삽입된 재조합벡터 pCLA 모식도이며, 도 1b는 상기 pCLA로 형질 전환된 대장균(pLA)이 LHb와 ALAS 모두 발현하는 것을 확인한 도면이다.

도 2는 본 발명의 형질전환 대장균(pLA)으로부터 정제된 레그헤모글로빈이 인간 헤모글로빈과 유사한 광학적 특성(540nm, 555nm에서 피크)을 나타내는 것과, ALAS가 있는 경우 인간의 혈액과 유사하게 붉은 색을 나타내지만 ALAS가 결핍되어 있는 경우 상대적으로 투명한 것을 확인한 도면이다.

도 3은 배양한 pLA 균주를 배양하여 수확한 정제된 레그헤모글로빈에 부착된 헴조효소의 양을 측정한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명자들은 인공혈액 등에 이용할 수 있는 산소 결합 능력이 우수한 단백질의 대량생산 방법에 대해 예의 연구한 결과, 동물혈액의 헤모글로빈보다 산소 친화도(affinity)가 약 10배 이상 높은 레그헤모글로빈을 헴 조효소와 결합된 형태로 대량생산이 가능한 재조합 발현 벡터와 이를 이용한 형질전환체 등을 포함한 본 발명을 완성하게 되었다.

[0030] 이에, 본 발명은 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자 및 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0031] 본 발명이 이용하고자 하는 레그헤모글로빈(leghemoglobin: LHb)은 식물체의 뿌리혹에서 발현하는 단백질로서 동물의 헤모글로빈보다 약 10배 이상의 산소친화도를 갖는다. 이에, 본 발명에서 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자는 콩과 식물 유래일 수 있으며, 바람직하게는 콩(*Glycine max*) 유래의 유전자일 수 있고, 이는 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 유전자일 수 있다. 그러나, DNA 서열 또는 유전 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 유전자의 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자를 이용할 수도 있다.

[0032] 한편, 본 발명은 헴 조효소(heme cofactor)로서 그의 전구체인 아미노레불린산(Aminolevulinic acid: ALA)을 이용하고자 하며, 아미노레불린산 획득을 위하여 이를 합성하는 효소의 유전자를 박테리아로부터 획득하였다. 아미노레불린산 합성효소(Aminolevulinic acid synthase: ALAS)는 아미노레불린산을 합성하기 위하여 2가지 대사 경로를 이용하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 박테리아 유래의 아미노레불린산 합성효소는 비교적 짧은 대사경로를 이용하여 빠른 아미노레불린산의 생산이 가능하므로 대량생산에 보다 적합하다. 따라서, 본 발명의 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자는 로도박터 박테리아 유래의 유전자일 수 있으며, 구체적으로는 로도박터 캡슐레이터스(*Rhodobacter capsulatus*), 로도박터 비리디스(*Rhodobacter viridis*), 로도박터 메스투아리(*Rhodobacter aestuarii*), 및 로도박터 마리스(*Rhodobacter maris*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 균주 유래의 유전자 일 수 있으나, 바람직하게는 로도박터 캡슐레이터스(*Rhodobacter capsulatus*) 유래의 유전자 일 수 있고, 이는 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 유전자 일 수 있다. 그러나, DNA 서열 또는 유전 코드의 디제너러시(degeneracy)를 고려하여 상기 유전자의 염기서열과 80%의 상동성, 바람직하게는 85%의 상동성, 더욱 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 가지는 유전자를 이용할 수도 있다.

[0033] 본 발명의 구체적인 실시예에서 "벡터(vector)"는 pColdII 플라스미드를 이용하고 있으나, 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물이라면 이에

제한되는 것은 아니다. 따라서, 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 형태이고, 본 발명의 구체적인 실시예에서 이용하고 있는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다.

[0034] 또한, 본 명세서에 "재조합 발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0035] 한편, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 레그헤모글로빈을 암호화하는 유전자와 아미노레불린산 합성효소를 암호화하는 유전자와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함할 수 있으며, 상기 프로모터는 cspA 프로모터일 수 있다.

[0036] 또한, 본 명세서에서 "프로모터"는 형질주입하고자 하는 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로서 상기 프로모터에는 전사에 필요한 기본인자(Basal element)뿐만 아니라, 발현의 촉진 및 조절에 사용될 수 있는 인핸서 (enhancer)가 더 포함될 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 다른 측면에 따르면 상기 재조합 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 세포주를 제공할 수 있다. 본 발명의 형질전환 세포(형질전환체)는 레그헤모글로빈과 아미노레불린산 합성효소의 동시 발현을 통해 헴이 결합된 레그헤모글로빈 생산할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 헴이 결합된 레그헤모글로빈은 기능적으로 활성화된 레그헤모글로빈으로서 홀로단백질이라고 볼 수 있다.

[0039] 한편, 본 명세서에서 "형질전환" 또는 "형질주입"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다.

[0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 레그헤모글로빈을 코딩하는 DNA와 아미노레불린산 합성효소를 코딩하는 DNA를 함유하는 발현 벡터와 같은, 복수의 단백질을 코딩하는 DNA를 함유하는 재조합 발현 벡터로, 대장균인 *Escherichia coli* 를 형질전환하여, 얻어진 형질전환체를 LB배지에서 배양함으로써, 헴과 결합한 레그헤모글로빈 또는 펩티드, 특히 헤테로올리고머 단백질 등을 높은 수량으로 회수할 수 있음을 확인하였다.

[0042] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0043] [실시예]

[0044] 실시예 1. 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 생산 재조합 대장균의 제조

[0045] 1-1. 레그헤모글로빈(LHb) 유전자 확보

[0046] 쿡 유래의 LHb 유전자를 합성하고, 이를 pTOP_bIunt_V2 플라스미드에 도입하여 제작된 LHb(Codon-opt) in pTOP_bIunt_V2 플라스미드를 주형으로 하고, LHb-센스 및 안티센스 프라이머(서열번호 4 및 서열번호 5)와 폴리머라아제(KOD-plus)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0047] PCR 반응 조건은 다음과 같다: 전처리(94℃ 2분), [변성(94℃, 15초), 어닐링(65℃, 30초), 및 연장(68℃, 30초)] X 30회.

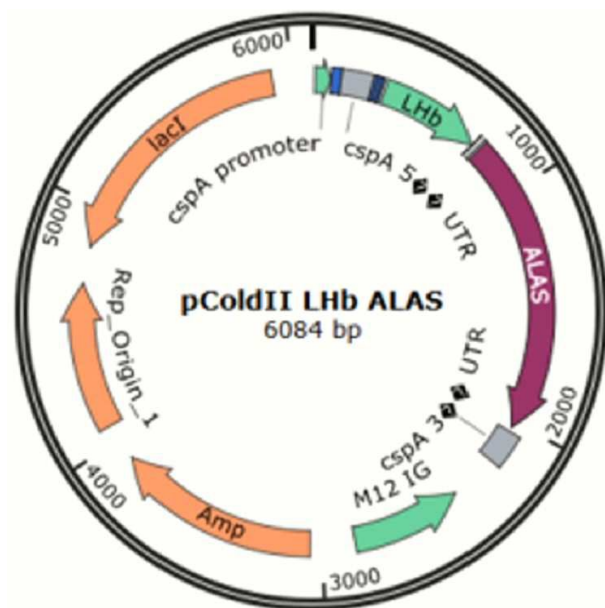
[0048] 상기 PCR 반응 후 5' 말단에는 SacI 제한효소 인식부위가, 3' 말단에는 KpnI 제한효소 인식부위가 부가된 LHb 유전자를 산물로 얻을 수 있었다. 이어서, 상기 반응산물을 페놀 추출 및 에탄올 침전으로 정제하고, SacI 및 KpnI으로 절단하여 LHb 유전자를 확보하였다.

- [0050] 1-2. 아미노르볼린산 신테이즈(ALAS) 유전자 확보
- [0051] 로도박터 캡슐레이터스(*Rhodobacter capsulatus*) 게놈 DNA를 주형으로 하고, ALAS-센스 및 안티센스 프라이머 (서열번호 6 및 서열번호 7)와 폴리머라제(KOD-plus)를 이용하여 PCR을 수행하였다.
- [0052] PCR 반응 조건은 다음과 같다: 전처리(94℃ 2분), [변성(94℃ 15초), 어닐링(52℃90초), 및 연장(68℃90초)] X 30회.
- [0053] 상기 PCR 반응 후 5'말단에는 BamHI 제한효소 인식부위가, 3' 말단에는 PstI 제한효소 인식부위가 부가된 ALAS 유전자를 산물로 얻을 수 있었다. 이어서, 상기 반응산물을 페놀 추출 및 에탄올 침전으로 정제하고, BamHI 및 PstI으로 절단하여 ALAS 유전자를 확보하였다.
- [0055] 1-3. 재조합 발현 벡터의 제작
- [0056] 대장균에서 발현벡터로 기능하는 pColdII를 *E. coli* DH5a에 도입한 후, 상기 DH5a를 암피실린(ampicillin)이 첨가된 배지에서 배양하여 형질전환체를 스크리닝 하고, 상기 형질전환체로부터 플라스미드를 정제하였다. 정제된 플라스미드는 SacI 및 KpnI 제한효소로 절단하고, 상기 실시예 1-1에서 확보한 Lhb 유전자와 결합시켜 pColdII::Lhb를 제작하였다.
- [0057] 이어서, 상기 pColdII::Lhb를 *E. coli* DH5a에 주입한 후, 상기 DH5a를 암피실린이 첨가된 배지에서 배양하여 형질전환체를 스크리닝하고, 상기 형질전환체로부터 플라스미드를 정제하였다. 정제된 플라스미드는 colony PCR을 이용하여 pColdII::Lhb임을 확인하였다.
- [0058] 상기 pColdII::Lhb는 다시 BamHI 및 PstI을 처리하여 절단하고 상기 실시예 1-2에서 확보한 ALAS 유전자와 결합시켜 pCold::Lhb-ALAS(이하, pCLA이라 함)을 제작하였다.
- [0059] 이어서, 상기 pCLA를 *E. coli* DH5a에 주입한 후, 상기 DH5a를 암피실린이 첨가된 배지에서 배양하여 형질전환체를 스크리닝하고, colony PCR을 이용하여 pCLA가 주입된 형질전환체임을 재확인하였다. 또한, 상기 형질전환체로부터 플라스미드를 정제하고, 마크로젠(Macrogen, 서울, 한국)에 의뢰하여 상기 플라스미드에 도입된 Lhb 및 ALAS 유전자의 전체 서열을 확인하였다.
- [0061] 1-4. 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질 생산용 형질전환체의 제조
- [0062] 상기 실시예 1-3에서 pCLA가 주입된 DH5a를 배양하여 증식시킨 후 플라스미드를 정제하였다. 정제된 pCLA를 *E. coli* BL21에 주입하여 레그헤모글로빈과 헴 조효소가 결합된 홀로단백질을 생산할 수 있는 형질전환체(pLA)를 제조하였다. 상기 형질전환된 BL21(pLA)은 암피실린이 첨가된 배지에서 배양하고 Lhb 발현을 확인한 후 글리세롤을 이용하여 저장하였다.
- [0064] **실시예 2. 형질전환 대장균의 레그헤모글로빈과 헴 조효소의 동시 생산 확인**
- [0065] 실시예 1에서 수득한 재조합 대장균 pLA를 배양하여 Lhb 및 ALAS의 동시 발현에 의한 홀로단백질 생산 여부 및 그 정도를 확인하였다.
- [0067] 2-1. 형질전환 대장균(pLA)의 배양
- [0068] Lhb 생산용 배지는 LB(Luria-Bertani) 배지로서, 재조합 대장균에 포함된 벡터에 따라, LB배지에 최종농도가 암피실린 항생제는 50 ug/ml이 되도록, 이소프로필-b-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)는 0.5mM이 되도록 첨가했다.
- [0069] 배양하고자 하는 재조합 대장균의 단일 콜로니를 LB배지를 담은 15ml 시험관에 접종하고 회전식 진탕 배양기(37℃, 200rpm)에서 16시간 동안 배양하였다. 수득된 배양액은 LB 배지(100ml)가 담긴 baffled flask(500ml)에 OD0.1에 맞추어 접종하였고, 37℃ 200rpm으로 24시간 배양하였다.

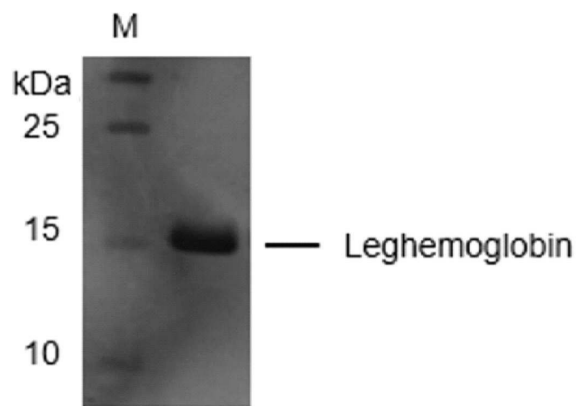
- [0071] 2-2. 동시 발현의 효과
- [0072] 600nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 바이오매스를 측정하고, 1 OD= 0.3g/l의 흡광계수를 이용하여 건조 세포 중량(dcw)으로 환산하였다.
- [0073] (1)헴의 생성
- [0074] 헴의 농도는 배양액으로부터 아세트나이트릴-산 처리방법으로 헴을 추출 후, UV 검출기(400nm)가 구비된 구배 HPLC에 의해 분석하였다.
- [0075] 상기 실시예 2-1에 수득된 세포배양액을 1분간 원심분리(13,000 rpm)하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 아세트나이트릴-산 용액에 재현탁한 후 다시 1분간 원심분리(13,000 rpm)하여 상층액을 취하여 HPLC 분석에 사용하였다.
- [0076] (2)레그헤모글로빈의 생성
- [0077] 상기 실시예 2-1에서 수득된 세포배양액을 원심분리(10,000rpm x 10분간)에 의해 대장균을 침전시키고, 파쇄 완충액에 재현탁 후, Sonicator를 이용하여 대장균을 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 13,000rpm으로 30분간 원심분리하여 상청을 회수하였다. 회수한 상청은 니켈분리방법을 이용하여 레그헤모글로빈을 정제하였다.
- [0078] (3) 레그헤모글로빈의 확인
- [0079] 최종 시료를 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 걸어, 예상되는 분자량 약 15kD의 단일 밴드를 검출하였다. 또한 헴 분자와 결합되어있는 상태로 정제되었음을 확인하였다.
- [0081] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 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

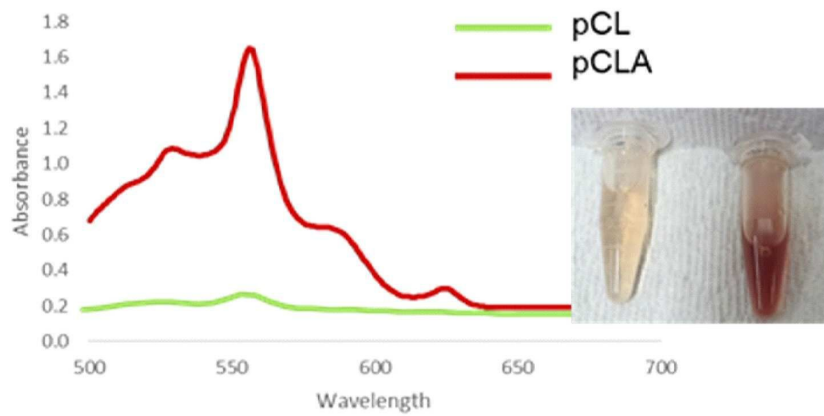
도면1a



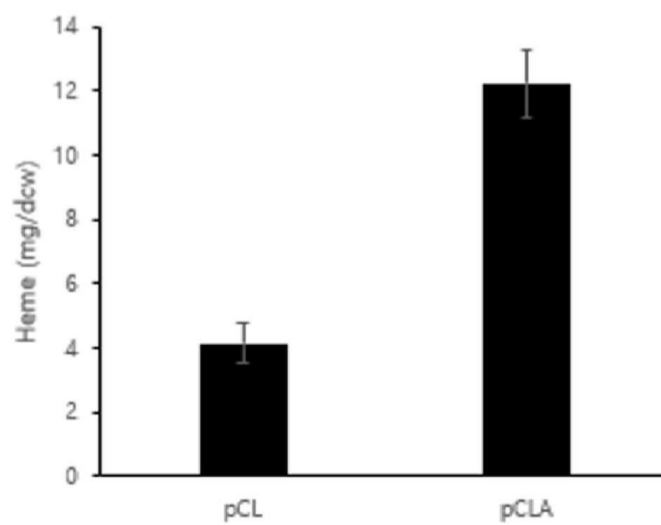
도면1b



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> A vector and transformed cell for producing a holoprotein in

which leghemoglobin and heme cofactor are combined, and a method
for producing the holoprotein

<130> DHP19-181

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 435

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 1

atgggcgcat tcaccgagaa gcaggaggca ctggtttcct cctccttcga ggcattcaag 60

gcaaacatcc cacagtactc cgttgttttc tacacctcca tctggagaa ggcaccagca 120

gcaaaggacc tgtttctcctt cctgtccaac ggcggtgacc catccaaccc aaagctgacc 180

ggccacgcag agaagctgtt cggcctggtt cgcgactccg caggccagct gaaggcaaac 240

ggcaccgttg ttgcagacgc agcactgggc tccatccacg cacagaaggc aatcaccgac 300

ccacagttag ttgtgttaa ggaggcactg ctgaagacca tcaaggaggc agttggcgac 360

aagtgtccg acgagctgtc ctccgatgg gaggttgcac acgacgagct ggcagcagca 420

atcaagaagg cattc 435

<210> 2

<211> 1227

<212> DNA

<213> Rhodobacter capsulatus

<400> 2

atggactaca atctcgctcg cgacaaagcg atccagaagc tccacgacga gggacgttac 60

cgcacgttca tcgacatcga acgcgagaag ggcgcttcc ccaaggcgca gtggaaccgc 120

cccgatggcg gcaagcagga catcaccgtc tgggtcggca acgactatct gggcatgggc 180

cagcaccggc tcgttctggc cgcgatgcat gaggcgtgg aagcggtcgg ggccgggtcg 240

ggtggcaccc gcaacatctc gggcaccacg gcctatcacc gccgccttga ggccgagatc 300

gccgatctgc accagaaaga agccgcgtcg gtcttttctc cggcctacaa cgccaatgac 360

gccacgcttt cgacctgcg cgtgtctctc cccggcctga tcatttatc cgacagcctg 420

aaccacgcct cgatgatcga ggggatcaag cgcaatgccg ggccgaagcg gatcttccgt 480

cacaatgacg tcgcgatctc gcgcgagctg atcgccgccg atgatccggc cgcgccgaag 540

ctgatcgctt tcgaatcggg ctattcgatg gatggcgact tcggcccgat caaggaaatc 600
 tgcgacatcg ccgaggaatt cggcgcgctg acctatatcg acgaagtcca tgccgtcggc 660
 atgtatggcc cccgcggcgc gggcgtggcg gaacgcgacg gtctgatgca tcgcatcgac 720
 atcttcaacg gcacgctggc gaaagcctac ggcgtcttcg gcggctatat cgccgcttcg 780

gcgcggatgg tcgatgccgt gcgctcctat gcgccgggct tcattcttctc gacctcgtg 840
 ccgccggcga tcgccgaggc gcgcgaggcc tcgatcgctt tctgaaaac cgccgaaggg 900
 cagaagctgc gcgacgcgca acagatgcac gccaaaggctc tcaagatgcg gctcaaggcg 960
 ctccgcatgc cgatcatcga ccacggcagc cacatcgctt cgggtggtcat cggcgacccc 1020
 gtgcacacca aggcgggtgc ggacatgctc ttgtcggatt acggcggtta cgtgcagccg 1080
 atcaacttcc cgacgggtgc gcgcggcacc gaacgggtgc gcttcacccc ctcccggtg 1140
 catgatctca agcagatcga cgggctcgtt catgccatgg atctgctctg ggcgcgctgt 1200

gcgctgaatc gcgccgaggc ctctgcc 1227

<210> 3

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cspA promoter

<400> 3

ccgattaatc ataaatatga aaaataattg ttgcatcacc cgccaatgcg tggettaatg 60

cacatca 67

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LHb_primer_F

<400> 4

aattgagctc ggcgcatcca ccgagaag 28

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LHb_primer_R

<400> 5
atggcctagg ctagaatgcc ttcttgattg ctg 33

<210> 6
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ALAS_primer_F
<400> 6
aatggatcc aggaggacag ctatggacta caatctcgcg ctcgac 46

<210> 7
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ALAS_primer_R
<400> 7
atactgcagt caatgatgat gatgatgatg ggcagaggcc tcggcg 46

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> pColdII_seq_F
<400> 8
caaaatctgt aaagcacgcc 20

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> pColdII_seq_R
<400> 9
agattttatt acgcgatcga ttatt 25