



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0046392

(43) 공개일자 2007년05월03일

(21) 출원번호 10-2005-0103064

(22) 출원일자 2005년10월31일

심사청구일자 2005년10월31일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 이지원
서울 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교
안지영
서울 성북구 안암동5가 고려대학교
최형
서울 서대문구 홍은3동 미성아파트 1동 805호
한경연
서울 성북구 안암동5가 고려대학교
박진승
서울 성북구 안암동5가 고려대학교
홍지희
부산 부산진구 양정2동 28-36 30/1
이성현
서울 관악구 봉천5동 관악드림타운 140동 401호
이혜원
경기 안양시 만안구 안양9동 프라자아파트 206-1507
서혁성
서울 강동구 고덕동 시영아파트 33동 204호

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) D n a K와 고친화력을 가지는 모티브를 포함하는 주형단백질과 탐침 단백질이 융합된 단백질 나노입자

(57) 요약

본 발명은 DnaK와 고친화력을 가지는 모티브를 포함하는 주형 단백질과 탐침 단백질이 융합된 나노입자에 관한 것으로, 상기 주형 단백질에 항원, 항체, 세포 수용체 또는 효소 등의 탐침 단백질이 융합된다. 본 발명의 융합 단백질을 대장균에서 발현시 수용성이 증가되고, 특히 주형 단백질이 페리틴 무거운 사슬인 경우 입자가 구형을 이루어 표면에 단백질 탐침이 노출되므로 고감도 단백질 칩의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 13

특허청구의 범위

청구항 1.

DnaK와 고친화력을 가지는 펩티드 모티브를 포함하는 주형 단백질과 탐침 단백질이 융합된 단백질 나노입자.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 펩티드 모티브는 $X_1X_2Y_1Y_2Y_3X_3X_4$ 로 구성되며, X_1 내지 X_4 는 극성 아미노산이며, Y_1 내지 Y_3 은 소수성 아미노산인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 3.

제 1항 또는 2항에 있어서 Y_2 는 방향족 곁가지를 가지는 아미노산인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 4.

제 1항 또는 2항에 있어서, 모티브는 GRIFLQD의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자

청구항 5.

제 1항에 있어서, 주형 단백질은 페리틴 무거운 사슬(Ferritin heavy chain)인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 페라틴 무거운 사슬은 서열번호 41로 기재되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 탐침 단백질은 항원, 항체, 세포수용체 또는 효소인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 단백질 나노입자는 주형 단백질인 페리틴 무거운 사슬의 C-터미널에 탐침 단백질이 융합된 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 9.

제 1항에 있어서, 나노입자의 직경이 1-20nm인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 10.

- i) 제 1항의 단백질 나노입자를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계;
 - ii) 상기 재조합 발현 벡터를 형질도입한 대장균 형질전환체를 제작하는 단계; 및
 - iii) 단계 ii)의 형질전환체로부터 단백질 나노입자를 발현하고, 발현된 상기 단백질 나노입자를 정제하는 단계;
- 를 포함하는 단백질 나노입자의 생산 방법.

청구항 11.

제 1항의 단백질 나노입자를 포함하는 단백질 칩.

청구항 12.

제 12항에 있어서, 상기 단백질칩의 고체 기판은 유리, 변형된 실리콘, 테트라플루오로에틸렌, 폴리스티렌, 폴리프로필렌 또는 PDVF 막 등이고, 상기 기판의 표면은 단백질 나노입자의 고정을 위해, 중합체, 플라스틱 수지, 탄수화물, 실리카, 실리카 유도물질, 탄소, 금속 또는 무기 유리로 표면을 처리하거나 표면을 처리하지 않는 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 13.

제 13항에 있어서, 상기 단백질 칩의 기판은 PVDF 막을 사용하는 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 14.

제 12항의 단백질 칩을 포함하는 진단 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 단백질 나노입자에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 DnaK에 고친화력을 제공하는 모티브를 포함하는 주형 단백질과 탐침 단백질이 융합된 단백질 나노입자에 관한 것이다.

대장균에서 재조합 단백질을 대량 생산할 때에는 강력하면서도 유도 가능한 프로모터를 포함한 발현 벡터가 개발되어 이용되어 왔다. 그러나 이러한 재조합 단백질은 대장균에서 과다 발현시 불가용성 단백질 응집체(inclusion body:IB)로 알려진 불가용성 단백질 결합체를 형성한다. 이와 같은 현상은 초기 분리 단계에서 세포 파쇄 후 단순 원심분리 방법만으로도 원하는 단백질을 용이하게 분리할 수 있는 장점이 있으나 비활성 상태의 IB를 다시 활성 단백질로 전환하기 위해서 단백질 변성(denaturation) 및 재접힘(refolding) 과정이 필요한데 이는 고비용이 드는 작업이다(Thomas and Baneyx, *J. Biol. Chem.*, 271(19):11141-11147, 1996).

생체내(in vivo) 대부분의 단백질 분자들은 각자 알맞은 형태로 신속하게 접힘(folding) 과정이 이루어져야 한다. 그렇지 않으면 세포는 기능을 하지 못하는 단백질을 합성하고, 잘못 접히거나 접혀지지 않은 단백질을 없애는데 많은 에너지를 소비하게 되기 때문이다. 세포 내에서 95% 이상의 단백질은 종류가 다양함에도 불구하고 정상적인 형태를 유지하는데 이는 샤프론(chaperone) 때문이다. 샤프론은 박테리아에서 사람에 이르기까지 모든 생물체에 존재하는 단백질 군집으로, 각 세포에 모두 위치해 있다. 일반적으로 샤프론 군집은 두 가지가 있는데, 첫 번째는 분자적 샤프론(Molecular chaperone)으로 접힘이 안되거나 부분적으로 접힘이 되어 있는 단백질과 결합하여, 단백질이 불가용성 응집체를 형성하거나 단백질의 활성이 감소되는 것을 막아주는 역할을 한다. 두 번째 샤프로닌(chaperonin)은 단백질의 접힘을 직접 도와주는 역할을 한다. 분자적 샤프론을 구성하는 단백질 군집 중 대표적인 것은 Hsp70이라는 단백질 군집으로 이루어져 있는데, 여기에는 세포질(cytosol)과 미토콘드리아(mitochondria)에 있는 Hsp70, 소포체(endoplasmic reticulum)에 있는 Bip, 그리고 대장균의 샤프론 DnaK가 포함된다. 이중 DnaK는 샤프론 네트워크의 중심 요소로서 단백질 접힘, 단백질 전위(translocation), 올리고머 분리(oligomer dissociation) 및 스트레스에 의한 단백질의 IB 형성 저해에 관여한다(Gottesman et al., *Genes Dev*, 11(7):815-823, 1997; Hartl and Hayer-Hartl, *Science*, 295(5561):1852-1858, 2002). 또한 접힘이 아직 이루어 지지 않은(unfolded) 단백질에 노출된 짧은 펩티드(peptide) 분절에 ATP-의존 상호작용을 통해 단백질 접힘을 증대한다(Ewalt et al., *Cell*, 90:491-500, 1997). 최근 연구에서는 인터페론 감마/인터페론-10 연관 싸이토카인(interferon- γ /interferon-10 related cytokine)의 상과(superfamily) 중 각각 4개의 헬릭스(helix)로 이루어진 단백질에서 헬릭스 B의 N-터미널과 헬릭스 C의 C-터미널에서 보존된 DnaK-결합 자리를 발견했다(Vandenbroeck et al., *J Biol Chem*, 277(28):25668-25676, 2002). 상기 싸이토카인은 단일사슬 접힘 영역(single-chain folded domain) 내부의 강한 소수성 특성의 노출된 접촉면이 DnaK와 결합하는 동종이합체 단백질(homodimeric protein) 그룹에 속한다. Hsp70 샤프론은 소수성 이합체 접힘 접촉면(hydrophobic dimeric folding interface)과 결합하면서 새로운 접힘 조절 메커니즘을 구성하는 것으로 보인다.

본 발명의 발명자들은 융합 단백질을 발현, 정제 과정 중 페리틴(Ferritin) 무거운 사슬(Heavy chain)에 융합된 많은 단백질이 상기에서 제기된 불가용성 단백질 응집체 형성의 문제점이 현저히 개선됨을 발견하였고, 이에 대한 연구를 계속한 결과 페리틴 무거운 사슬의 특정 모티프가 DnaK와 고친화력을 가짐을 알게 되었다(Choi et al., *BBRC*, 327:604-608, 2005).

페리틴(Ferritin)은 무거운 사슬과 가벼운 사슬로 구성된 24개의 동일한 단백질 서브유닛(subunit)으로 구성되며 생체내에서 중공 외피(hollow shell)를 형성한다. 철분과 결합하는 상기 단백질은 철 저장 기능을 가지며, 철 해독(iron detoxification) 기능을 한다(Harrison et al., *Biochim Biophys Acta*, 1275(3):161-163, 1996). 상기 단백질은 대부분의 조직의 성장과 생존을 위해 세포 내의 철 균형을 유지하고, 세포 내의 철의 결합으로 인한 산소-자유 라디칼 형성을 최소화시키는 세포 보호 단백질로서 기능을 한다(Lawson et al., *Nature*, 349:541-544, 1991). 페리틴의 분자량은 약 500.000Da으로, 무거운 사슬(Heavy chain)과 가벼운 사슬(Light chain)로 구성되어 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성하는 독특한 특성을 나타낸다.

바이오 칩은 핵산, 단백질 등 생물학적 물질이 기판(template surface) 위에 고정되어 있는 것을 특징으로 하며, 최근에 그 개념이 도입되기 시작하였고, 생물학적 배열(biological array)이라고도 불린다. 이 중 단백질 칩이란, 특정 생체물질과 반응할 수 있는 수십 또는 수천 종류 이상의 서로 다른 펩티드 또는 단백질을 고체 표면에 집적화하여 다양한 생체분자와 결합하여 효과적으로 분석하는 바이오칩을 의미한다. 최근에는 질병 진단용 칩, 신약 후보물질 초고속 스크리닝 시스템 구축, 단백질 발현 패턴 연구 및 신규 단백질 마커 발굴이 응용되고 있다. 기판에 고정된 단백질, 항원, 항체, 친화성 리간드인 세포 수용체나 효소, 핵산, 또는 저분자 물질과 함께 결합할 수 있는 핵산 또는 단백질 등이 바이오 칩으로 이용될 수 있다. 바이오 칩 기술은 정보 분석 기술의 발전과 집적의 결과로 생물 연구에 있어서 대형화 및 높은 작업 처리량을 가능하게 하는 중요한 도구가 되고 있다.

단백질 칩 기술에 있어서 중요한 요소는 단백질의 활성화와 활성 부위의 노출, 고집적도, 표적물질과의 특이적 결합이다. 단백질은 확산, 흡착/흡수, 공유 결합, 친화 작용에 의해 다양한 종류의 단백질 칩 고체 기판 표면에 접촉될 수 있다. 그러나 단백질은 일반적으로 기판 표면 위에서 무작위 하게 집적되고, 단백질의 구조가 쉽게 변형되므로 단백질의 활성을 저해하며, 이로 인해 표면 분자와의 결합이 불가능해져 특이적 결합이 효율적이지 못한 큰 문제점을 가지고 있다. 단백질 칩에 적용되는 단백질 탐침과 표적물질 간 결합 특이성은 단백질의 구조에 따라 매우 민감하게 결정되므로 활성형 구조의 단백질을 표적물질의 고감도 인지에 적합한 위치 및 방향성으로 고정화시켜야 한다. 그러나 고정화 단계에서 활성부위가 은폐(masking)되거나 비특이적인 단백질 클러스터링(clustering)에 의한 불안정성, 집적도 저하 등, 비효율적인 고정화 공정이 고감도 탐지의 저해요인으로 인식되어 왔다.

현재, 나노입자를 활용한 바이오 칩 기술 중에서 각광받는 것은 반도체 퀀텀 닷(QD, Quantum dot) 표면에 단백질, 펩티드, 항원, 항체 등을 결합시키는 기술이다. 퀀텀 닷은 좁은 범위의 발광 영역을 가지며, 발광 영역 조절이 용이하다는 장점이 있다. 하지만, 제조 공정이 복잡하며, 제작 비용이 고가이고, 퀀텀 닷 제조 환경이 생물 물질의 안정화 조건과 상이하다는 단점이 있다.

본 발명자는 분자 샤프론 DnaK와 고친화력을 가지는 모티브를 포함하는 페리틴 무거운 사슬이 융합 단백질의 수용성을 증가시키고 자가 조립에 의해 나노입자를 형성하는 것을 확인하여 단백질 칩 생산을 위한 나노입자로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 페리틴 무거운 사슬(Ferritin Heavy chain) 중 분자 샤프론(Molecular chaperone) DnaK와 고친화력을 제공하는 모티브의 아미노산 서열을 제공하는 것이다.

또한, 인간 유래 단백질인 페리틴 무거운 사슬에 단백질 탐침이 융합된 구형 단백질 나노입자를 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 DnaK와 고친화력을 가지는 모티브를 포함하는 주형 단백질과 탐침 단백질이 융합된 단백질 나노입자를 제공한다.

또한, 본 발명은 페리틴 무거운 사슬(Ferritin Heavy Chain: 이하 "FTN-H"라 칭함)의 카르복실 말단에 단백질 탐침이 융합된 단백질 나노입자를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 나노입자의 생산 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 나노입자를 포함하는 단백질 칩을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 칩을 포함하는 진단 키트를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 DnaK와 고친화력을 제공하는 모티브의 아미노산 서열을 제공한다. 상기 아미노산은 3개의 소수성 아미노산인 2개의 극성 아미노산에 의해 둘러싸인 $X_1X_2Y_1Y_2Y_3X_3X_4$ 로 표시된다. X_1 내지 X_4 는 시스테인(Cysteine), 글라이신(Glycine), 아스파라진(Asparagine), 글루타민(Glutamine), 세린(Serine), 트레오닌(Threonine) 및 타이로신(Tyrosine)으로 이루어진 군에서 선택되는 극성 아미노산이며, Y_1 내지 Y_3 은 알라닌(Alanine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 아이소루신(Isoleucine), 루신(Leucine), 메티오닌(Methionine), 프롤린(Proline), 발린(Valine) 및 트립토판(Tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택되는 산성 아미노산이고, Y_2 는 방향족 곁가지(aromatic side chain)를 가지는 것이 바람직하며 더욱 바람직하게는 모티브의 서열이 GRIFLQD인 것이다.

본 발명의 주형 단백질은 상기 모티브를 포함하는 단백질로서, 바람직하게는 페리틴 무거운 사슬(Ferritin Heavy Chain: 이하 "FTN-H"라 칭함)이다. FTN-H는 인간 페리틴으로부터 유래한 것이며, 서열번호 42로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다. 상기 단백질 탐침으로는 FTN-H의 자가 조립 능력을 저해하지 않는 펩타이드 또는 단백질은 모두 사용할 수 있으며, 항원, 항체 또는 친화성 리간드 즉 세포수용체와 효소 같은 단백질 단편을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예에서는 인간 비만 대사 관련 단백질인 크기가 약 19,000달톤인 ppGRN, 인슐린 의존형 당뇨병의 조기 진단 마커인 GAD 중 487-585번 아미노산(16,000 달톤)(이하 "GAD448"라 칭함), 487-585번 아미노산(11,000 달톤)(이하 "GAD487"라 칭함), 512-585번의 아미노산(8,000 달톤)(이하 "GAD512"라 칭함), mpINS(mini-proinsulin), 인간 EGF(epidermal growth factor), 인간 IL-2(interleukin-2), *Mycoplasma arginii* 유래의 arginine deiminase 단편(ADI₁₃₂₋₄₁₀)을 클로닝하여 FTN-H의 C-터미널에 융합하였으나 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명에서는 대장균 직접 발현 시스템에서 다양한 상기 단백질을 발현시켜 가용성 단백질 형성 정도를 측정하였고, 이를 FTN-H의 카르복실기 말단(이하 "C-터미널"이라 칭함)에 단백질을 융합한 FTN-H::EGF, FTN-H::IL-2, FTN-H::ppGRN, FTN-H::FTN-L, FTN-H::mpINS, FTN-H::GAD₅₁₂₋₅₈₅ 및 FTN-H::ADI₁₃₂₋₄₁₀의 가용성 단백질 형성 정도와 비교하였다(도 1 참조). 발현 시스템에서 단백질을 발현했을 때 다수의 단백질이 불가용성 단백질 응집체로 형성되거나(도 1A 참조), FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합시키면 불가용성 단백질 응집체 형성은 현저하게 줄어들고 가용성 단백질 형성이 증가됨을 확인하였다(도 1B 참조). 상기 융합 단백질의 생활성도를 확인하기 위해 FTN-H::ADI₁₃₂₋₄₁₀의 효소활성도를 측정하였다. 실시예 결과 FTN-H의 C-터미널에 융합하여 발현하였음에도 아르지닌에 대한 효소 활성도를 나타냄을 확인하였다(도 2A 참조). 본 실시예에서는 단백질 융합시 트롬빈 절단 사이트를 삽입하였다. FTN-H::ppGRN을 트롬빈으로 처리한 결과 융합 단백질에서 성공적으로 ppGRN이 절단되는 것을 확인하였다(도 2B 참조). FTN-H::ppGRN 뿐만 아니라 모든 융합 단백질로부터 트롬빈 절단을 통해 표적 단백질을 분리할 수 있었다. 이를 통해 FTN-H와 원하는 표적 단백질을 융합하여 정제할 경우 불가용성 단백질 응집체 상태가 아닌 가용성 형태의 단백질을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 2-HEDS[2-hydroxyethyl disulfide($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)]는 DDT(dechlorodiphenyltrichloroethane)의 산화형으로 박테리아 세포질에서 단백질의 타이올 산화(thiol oxidation) 유도를 감소시켜 잘못된 이황결합과 단백질 응집 형성을 유도하였다. 2-HEDS가 존재하지 않을 경우 융합 단백질은 80% 이상 가용성 단백질을 형성하였다. 그러나 재조합 대장균의 배양 배지에 2-HEDS[15mM]이 존재할 경우 가용성 단백질을 형성하는 융합 단백질이라 하더라도 대부분의 융합 단백질이 불가용성 단백질 응집체를 형성하였다(도 3A 참조). DnaK의 공동발현을 유도했을 경우 2-HEDS가 존재함에도 불구하고 가용성 단백질 형성이 증가한 반면, 재조합 페리틴 가벼운 사슬(Ferritin Light Chain:이하 "FTN-L"라 칭함)의 경우 DnaK가 공동발현되어도 가용성도가 증가하지 않았다(도 3B 참조). 이를 통해 FTN-H는 DnaK와의 상호작용을 통해 가용성 단백질을 형성하며, FTN-H가 DnaK와 고친화력을 제공하는 모티브로서 특이적 아미노산 잔기를 가지고 있음을 추정할 수 있었다.

DnaK는 폴린 폴리펩티드 체인의 소수성 잔기를 인식하여 결합하므로 먼저 FTN-H 아미노산 서열 중 가상 소수성 프로필(theoretical hydropathy profile)을 조사하여 3개의 아미노산으로 구성된 5개의 소수성 클러스터(34VYL36, 81IFL83, 105LHL107, 133FIE135 및 161APE63) 부분을 추정하였다(도 4A 참조). 그 후 FTN-H의 추정 부분을 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법으로 34VYL36 부분은 RRR로, 81IFL83 부분은 RRR로, 105LHL107 부분은 RHR로, 133FIE135 부분은 RRE로 161APE63 부분은 RRE로 변이하였다. 변이한 유전자를 대장균에 형질전환하여 발현을 유도하고 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법을 통하여 확인하였다. 그 결과 34VYL36, 81IFL83 및 105LHL107를 변이했을 때는 가용성 단백질 형성 정도가 감소하고 단백질 대부분이 불가용성 단백질 응집체를 형성했고, 133FIE135와 161APE63를 변이했을 때는 가용성 단백질 형성 정도가 특이적으로 감소하지 않았다(도 4B 참조). 34VYL36, 81IFL83 및 105LHL107를 변이한 형질전환 대장균에서 DnaK의 공동 발현을 유도한 경우에도 상기 변이체는 불가용성 단백질 응집체를 형성했다(도 5 참조). 이를 통해 DnaK와 친화력을 가지는 모티브가 FTN-H에 융합된 이중 단백질의 가용성 형성을 주도하며, 상기 모티브가 34VYL36, 81IFL83 및 105LHL107 중 하나임을 추정할 수 있다.

더 나아가 DnaK와 결합하는 특이적 모티브의 아미노산 서열을 증명하기 위하여 FTN-L 변이체와 GST 변이체를 제작하였다. FTN-H와 FTN-L의 아미노산 서열 비교를 통하여 FTN-L이 FTN-H의 DnaK 결합 모티브로 추정되는 81IFL83과 동족 서열(cognate sequence)인 77ALF79를 포함하고 있음을 확인하였다(도 6A 참조). FTH-L의 77ALF79 부분을 IFL로 변이하여 벡터에 삽입하였고, DnaK를 클로닝한 벡터와 함께 대장균에 형질전환한 후 배양하여 발현을 유도하고 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법을 통하여 확인하였다. 그 결과 FTN-H 유래 DnaK 결합 모티브를 포함하는 FTN-L 변이체는 FTN-L보다 가용성 단백질 형성 정도가 크게 증가됨을 확인하였다(Fig 6B 참조). 또한 2-HEDS 및 DnaK의 유무에 따른 가용성 단백질 형성 정도 조사에서 2-HEDS가 있을 때 가용성 단백질 형성 정도가 감소하며, 2-HEDS와 DnaK가 함께 존재할 때 가용성 단백질 형성 정도가 증가함을 확인하였다(도 6C 참조). 이는 도 3A의 FTN-H의 가용성 단백질 형성 성향과 유사함을 알 수 있다. 상기 결과를 통해 FTN-H의 모티브(IFL)가 FTN-L에 가용성 단백질 형성을 부여했고, 상기 모티브가 DnaK 샤프론에 결합하는 특이 결합 모티브임을 확인하였다. GST 융합 단백질 GST::ppGRN은 대장균 발현 시스템에서 모두 불가용성 단백질 응집체를 형성하였다. FTN-H 유래 DnaK 결합 모티브를 포함하는 GST 변이체를 형성하기 위해, GST의 N-터미널 지역의 여러 소수성 클러스터의 소수성 아미노산을 아르지닌 잔기로 교체하여 변이시켰다. 그중 85LAP87이 가장 높은 불가용성 단백질 응집체 형성을 보였다(도 7A 참조). 이는 FTN-H 변이체의 결과와 유사하다(도 4B 참조). 이를 통해 소수성 클러스터 85LAP87과 그 주변의 서열이 GST와 DnaK 사이의 결합에 중요한 사이트임을 추정할 수 있다. FTN-H 유래 DnaK 결합 모티브(81IFL83)를 포함하는 GST 변이체를 형성하기 위해, GST의 85LAP87을 85IFL87로 변이하고 GST-m1으로 명명하였고, GST의 84LLAPV88을 84RIFLQ88로 변이하고 GST-m2로 명명하였고, GST의 83QLLAPVN89를 83GRIFLQD89로 변이하고 GST-m3로 명명하였다. 변이한 유전자를 벡터에 삽입하여, DnaK가 클로닝된 pHCE19 벡터를 함께 대장균에 형질전환하여 배양하였고 가용성도를 SDS-PAGE 방법을 사용하여 확인하였다. 상기 변이체 중 GST-m3::ppGRN이 대장균의 세포질에서 50% 이상 가용성 단

백질이 형성됨을 확인하였다(도 7B 참조). 2-HEDS 및 DnaK의 유무에 따른 GST-m3::ppGRN의 가용성도 조사에서 상기 변이체는 FTN-H 및 FTN-L 변이체와 유사한 결과를 나타냄을 확인하였다(도 3A 및 도 6C 참조). GST-m3와 FTN-L (77IFL79) 변이체는 DnaK와 고친화력을 가지는 FTN-H에서 유래한 GRIFLQD 서열을 포함하고 있다. DnaK는 일반적으로 단백질 접힘의 초기 과정 중 접히지 않는 단백질의 연장 폴리펩티드 사슬의 소수성 지역에 결합한다. 그러므로 DnaK 결합을 결정하는 중요 인자는 단백질 구조가 아니라 결합 모티브의 서열 구조이다. GRIFLQD 서열은 극성 아미노산 잔기를 주위에 두고 3개의 소수성 아미노산을 중앙에 두고 있다. 소수성 아미노산의 중앙은 방향족 곁가지를 가지는 아미노산 (Phe)이 위치해 있다(도 8 참조). 이렇게 노출된 폴리펩티드 사슬의 특이 서열이 DnaK와 결합하기 쉽게 한다.

본 발명에서는 2가지 종류의 펩티드(GRIFLQD와 FRALFQD)를 합성하여 DnaK와의 결합력을 측정하였다. 합성한 각각의 펩티드를 PVDF막 위에 고정하고 DnaK와 반응시킨 후 항-DnaK 항체와 웨스턴 블롯을 통해 결합력을 확인하였다. 그 결과 DnaK는 GRIFLQD 펩티드와 결합함을 확인하였다(도 9A 참조). 또한 FTN-L, GRIFLQD서열을 포함하는 FTN-L 변이체, FTN-H와 DnaK와의 결합 어세이를 수행한 결과 GRIFLQD 서열을 포함하는 FTN-L 변이체와 FTN-H는 DnaK와 결합함을 확인하였다(도 9B 참조). 이는 FTN-H에서 유래한 83GRIFLQD89 서열이 DnaK와 높은 결합력을 가짐을 보여준다.

본 발명의 FTN-H의 C 터미널에 단백질 탐침이 융합된 단백질 나노입자는 자가조립능력을 가진다. 상기 단백질 나노입자란 나노미터(nanometer) 크기의 직경을 가지는 구형의 단백질 입자를 의미하며, 자가 조립에 의해 입자가 구형을 이루고 입자 표면에 단백질 탐침이 노출되어 있으므로, 상기 탐침이 유용하게 표적 물질과의 결합 효율을 향상시킨다.

융합된 단백질 나노입자를 투과 전자 현미경(Transmission electron microscope: 이하 "TEM"이라 칭함)으로 관찰한 결과 융합 단백질 중 FTN-H 부분은 자가 조립 능력에 의해 구형을 형성하는 것을 확인하였다(도 13, 도 17, 도 18, 도 19, 도 20, 도 21 및 도 22 참조). 융합된 단백질 탐침이 구형 입자의 표면으로 돌출되었는지 확인하기 위해 자연(Native)-젤 전기영동 후 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과 단백질 탐침 항체에 탐지되는 것을 확인함으로써 융합 단백질 탐침이 구형 입자의 표면에 돌출되어 있음을 확인하였다(도 16 참조). 단백질 나노입자의 주형인 FTN-H가 자가 조립에 의해 구형 입자를 형성하므로 칩 기반 위의 단위면적당 단백질 탐침의 집적도가 향상된다.

본 발명은 i) 페리틴 주형 단백질에 탐침 단백질이 융합된 단백질 나노입자의 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; ii) 상기 재조합 발현 벡터를 형질도입한 대장균 형질전환체를 제작하는 단계; 및 iii) 단계 ii)의 형질전환체로부터 단백질 나노입자를 발현하고 정제하는 단계를 포함하는 단백질 나노입자의 생산 방법을 제공한다. 상기 생산 방법은 미생물을 이용함으로써 비용면에서 효율적이며, 단백질 칩의 대량생산이 가능하게 한다. 본 발명자는 페리틴 무거운 사슬의 자가 조립 능력을 단백질 나노입자의 주형으로 이용하기 위해 유전공학적인 방법으로 유전자를 클로닝하였다. 인간에서 유래한 상기 FTN-H를 클로닝하기 위해 서열번호 19 및 20으로 기재된 프라이머를 이용하여 FTN-H 유전자를 증폭하였고, PCR로 증폭된 FTN-H의 유전자를 T-벡터에 삽입하였고, 융합하고자 하는 각각의 단백질 유전자를 클로닝하였다. 다시 FTN-H 유전자와 단백질 유전자를 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 구축하였고, 상기 발현 벡터를 대장균에 형질전환하여 발현한 후, 발현된 융합 단백질을 정제하여 분석하였다.

본 발명은 상기 단백질 나노입자를 포함하는 단백질 칩을 제공한다. 단백질 칩 제작 시 기판은 유리, 변형된 실리콘, 테트라플루오로에틸렌, 폴리스티렌, 또는 폴리프로필렌 등의 중합체나 겔을 사용하는 것이 바람직하며 PVDF막을 사용하는 것이 가장 바람직하다. DnaK와 고친화력을 가지는 모티브를 포함하는 주형 단백질과 다양한 탐침 단백질을 융합한 후 대장균에 형질전환하고 대량발현하였다. 발현된 단백질을 정제하여 PVDF 막에 떨어뜨려 닷 블롯팅 방법으로 상기 단백질 나노입자를 고정화하였다. 이후 비특이 결합을 막기 위해 차단 용액으로 처리하고 시료를 처리한 후 항체를 이용하여 발색을 확인하였다. 상기 기재된 단백질 나노입자를 이용하여 제작한 단백질 칩은 바이오 마커 또는 신약 후보물질 스크리닝 시스템으로 사용할 수 있다.

본 발명은 상기 단백질 칩을 포함하는 진단 키트를 제공한다. 상기 진단 키트는 단백질 칩, 완충용액, 표준 항체, 발색 효소 또는 형광 물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 진단키트는 i) 검체로부터 시료를 취득하는 단계; ii) 퀴텐 닷 또는 단백질 칩 상의 단백질 나노입자와 단계 1의 시료간의 결합 반응을 수행하고 세척하는 단계; iii) 형광물질과 접합된 이차 항체와 반응시키고 세척하는 단계; 및 iv) 형광현미경 또는 바이오 칩 스캐너를 이용하여 결과를 판정하는 단계를 통하여 검체를 진단하는데 사용된다. 상기 키트는 단백질 칩 상의 고정된 단백질 탐침과 결합 가능한 표적의 정성 분석 또는 정량 분석에 사용될 수도 있고, 다양한 질병의 진단에도 사용될 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 직접 단백질 발현과 융합 단백질 발현의 가용성 단백질 형성도 비교

<1-1> 재조합 스트레인 및 플라스미드 제작

인간 FTN-H 및 FTN-L, 인간 EGF, 인간 IL-2, prepro-ghrelin(이하 "ppGRN"이라 칭함), minipro-insulin(이하 "mp-INS"라 칭함), 글루탐산 디하이드로게네이스₅₁₂₋₅₈₅(glutamate dehydrogenase: 이하 "GAD₅₁₂₋₅₈₅"이라 칭함) 및 arginine deiminase₁₃₂₋₄₁₀(이하 "ADI₁₃₂₋₄₁₀"이라 칭함) 각각의 유전자를 표 1과 같은 조건으로 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: 이하 "PCR"이라 칭함)을 수행하여 유전자를 증폭하고, 각각의 유전자를 pET28a 벡터(Novagen, USA)의 *NdeI*과 *HindIII* 자리에 삽입하여 발현 벡터를 구성하였다. 또한 발현벡터에 융합 변이체(FTN-H::FTN-L, FTN-H::EGF, FTN-H::IL-2, FTN-H::ppGRN, FTN-H::GAD₅₁₂₋₅₈₅, FTN-H::ADI₁₃₂₋₄₁₀, 및 FTN-H::mpINS)가 되도록 유전자를 함께 삽입하였고, 융합하기 전에 트롬빈 프로테아제(thrombin protease)가 인식할 수 있는 특이 절단 서열을 FTN-H의 C-터미널과 표적 단백질의 N-터미널에 삽입하였다. 젤 전기영동 후 젤 추출 키트(Gel extraction kit, Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하고, 정제한 발현 벡터를 마크로젠사(Korea)에 의뢰하여 서열을 결정하였고 대장균 BL21(DE3)[F-ompThsdSb(rB-mB-)]에 형질전환하였다. 형질전환 방법은 다음과 같다. 대장균 BL21(DE3)을 LB 배지에 배양하여 OD600 값이 0.5가 되었을 때 4℃에서 30분간 냉각한 뒤 원심분리하여 균체를 침전시켰다. 침전된 균체를 50mM 염화칼슘 용액에 용해시킴으로써 형질전환이 가능한 적격 세포(competent cell)를 제작하였다. 이렇게 제작된 BL21(DE3) 적격 세포에 상기 발현벡터 pET28a 5μl를 첨가시켜 4℃에서 30분간 냉각시킨 뒤 42℃에서 1분 30초간 열 충격(heat shock)을 줌으로써 형질전환을 수행하였다. 카나마이신(kanamycin) 저항 유전자를 포함하고 있는 pET28a 벡터의 성질을 이용하여 100μg/l의 카나마이신이 포함된 LB 플레이트에서 37℃, 24시간 동안 형질전환된 대장균을 배양함으로써 카나마이신에 대해 저항성이 있는 콜로니를 선별하였다. 각각의 재조합 단백질과 DnaK 샤프론의 공동 발현(co-expression)을 보기 위해, 대장균 DnaK 유전자를 주형으로 하여 서열번호 39 및 40으로 기재되는 프라이머를 사용하여 증폭하였고, PCR 증폭물을 양립성 암피실린(ampicillin) 저항성 벡터 pHCE19(Bioleaders Inc., Korea)에 클로닝 한 후 대장균 BL21(DE3)에 상기 방법대로 형질전환하고 표적 재조합 유전자와 함께 발현 벡터를 유도하였다. 암피실린(ampicillin) 100μg/l 및 카나마이신 100μg/l가 포함된 LB 배지를 사용하여 암피실린 및 카나마이신 저항 형질전환체를 선별하였다.

【표 1】
재조합 유전자의 PCR 조건

유전자	유래	사용프라이머	PCR 조건
FTN-H	인간 spleen cDNA library (Invitrogen 사, USA)	서열번호 19 서열번호 20	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
EGF	인간 cDNA library (Clontech 사, USA)	서열번호 33 서열번호 34	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
IL-2	KCTC에서 분양	서열번호 35 서열번호 36	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
ppGRN	연세대학교 생화학과 이원태 교수 연구실	서열번호 25 서열번호 26	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
FTN-L	인간 spleen cDNA library (Invitrogen 사, USA)	서열번호 21 서열번호 22	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
mpINS	숭실대학교 신항철 교수 연구실	서열번호 31 서열번호 32	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
GAD ₅₁₂₋₅₈₅	로스앤젤레스 대학(UCLA) 대학 부속 뇌연구소 Tobin 박사팀	서열번호 30 서열번호 26	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
ADI ₁₃₂₋₄₁₀	고려대학교 의대 민본홍 교수 연구실	서열번호 37 서열번호 38	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복
DnaK	대장균 BL21(DE3) 염색체에서 직접 클로닝	서열번호 39 서열번호 40	95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 과정을 25회 반복

<1-2> 재조합 단백질의 발현

100mg/ℓ 카나마이신이 포함된 LB배지를 250ml 플라스크를 이용하여 실시예 1-1에서 선별된 형질전환체를 37℃, 항온배양진탕기(Shaking incubator IB-300)(New Power Eng., Korea)에서 200rpm로 배양하였다. 세포 배양액의 OD600 값이 0.5에 도달했을 때 0.5mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 발현을 유도하였다. 3-4시간 배양 후 재조합 세포를 6,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 수거하였다. 세포는 branson Sonifier(Branson Ultrasonics Copr., Danbury, CT)를 사용하여 파쇄하였다. 상층액(가용성 단백질)과 침전물(불용성 단백질 응집체)을 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리를 수행하여 분리하였다. 분리한 침전물을 1% Triton X-100으로 2회 세척하였다. 상층액과 세척한 침전물을 14% 트리스 글리신(Tri-glycine)젤로 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 방법을 이용하여 초기 20분간 70V로 진행하다가 100V로 전압을 올려서 2시간 동안 분리한 뒤, 코마시(Coomassie brilliant blue) 염색법으로 젤을 염색하여 스캔하고 덴시토미터(densitometer)(Duoscan T1200, Bio-Rad, Hercules, CA)로 분석하였다. 코마시 염색법은 다음과 같다. Coomassie brilliant blue R250(Biorad, USA) 0.25g을 메탄올과 증류수 동량을 혼합하여 90ml과 아세트산(acetic acid) 10ml을 혼합한 염색 용액에 SDS 젤을 담근 후 1시간 동안 염색하였다. 이후 탈색 시약(20% 메탄올, 10% 아세트산)에 염색한 젤을 넣고 탈색시약을 반복하여 교체하면서 젤로부터 단백질 밴드가 선명하게 보일 정도로 탈색하였다.

본 실시예 결과 대장균 직접 발현 시스템에서 불용성 단백질 응집체를 형성하는 단백질(EGF, IL-2, ppGRN, FTN-L, mpINS, GAD₅₁₂₋₅₃₅, ADI₁₃₂₋₄₁₀)이 FTN-H의 C-터미널에 융합하여 발현하였을 때 가용성이 증가하는 것을 확인하였다(도 1 참조).

<1-3> 재조합 단백질의 정제 및 활성도 분석

재조합 단백질의 정제는 금속 친화성 크로마토그래피로 수행하였다. 재조합 유전자는 pET28a 플라스미드 벡터(Novagen, USA)에 삽입되었고, 융합 단백질의 N-터미널에 6개의 히스티딘 잔기를 합성하도록 구축하였다. 폴리 히스티딘 태그(tag)를 가진 융합 단백질은 ProBond resin(Invitrogen, USA)과 고친화력을 보인다. 재조합 단백질은 ProBond resin과 Ni²⁺ 킬럼을 사용하여 정제하였고 아래와 같은 방법으로 수행하였다. 폴리히스티딘 태그를 가진 융합 단백질 1-2mg이 포함된 상층액을 ProBond resin(Ni²⁺) 킬럼에 주입하였다. 시료를 주입하기 전에, resin을 킬럼 부피의 10배 되는 양의 결합 버퍼(50mM potassium phosphate, 300mM KCl, 20mM imidazole, pH7.0)로 2회 세척하였다. 결합 버퍼는 히스티딘 태그가 없는 단백질의 비특적 결합을 최소화하기 위해 20mM 이미다졸(imidazole)을 포함하고 있다. 결합은 4℃ 냉장실에서 수행하였다. 그 후 resin을 5-8ml Tris-HCl(10mM Tris, pH8.0)로 2회 세척하였다. 트롬빈(thrombin) 용액 50μl(1U/μl, Amersham, USA, Catalog no. 27-0846-01)를 트리스(Tris) 버퍼 4950μl과 혼합하고, 실온에서 트롬빈 절단 반응을 16시간 동안 수행하였다. 반응 용액은 microcon YM-10(Milipore, Ireland)을 사용하여 11,800rpm, 4℃에서 10배로 농축하였다.

재조합 ADI의 효소 활성도는 효소 반응 생성물 시트룰린(citrulline)의 비색 측정(colorimetric determination)으로 수행하여 확인하였다. 반응 혼합물(0.1M potassium phosphate, pH6.5, 10mM L-arginine, 0.1ml 효소 용액을 모두 섞어 최종 부피는 1ml이 되도록 재조합)을 37℃에서 5분간 반응하고 시트룰린의 양을 diacetyl-monoxime으로 결정하였다. 시료는 95℃에서 10분간 가열하였고 A540nm에서 측정하였다. 단백질 농도는 protein Assay Kit(Bio-Rad, USA)로 결정하고 BSA를 표준(standard)로 사용하였다. ADI의 1U(unit)는 상기 조건으로 37℃에서 1분간 1μmol의 아르지닌을 촉매하는 것이다.

본 실시예 결과 FTN-H와 융합하여 대장균에서 발현할 때도 ADI는 가용성 단백질로 발현하며 효소활성을 가지고 있음을 확인하였다(도 2A 참조). 또한 ppGRN의 정제를 위해 FTN-H::ppGRN을 트롬빈으로 처리한 결과 융합 단백질에서 성공적으로 절단되는 것을 확인하였다(도 2B 참조). ppGRN 뿐 아니라 모든 융합 단백질로부터 트롬빈을 사용하여 단백질을 분리해 낼 수 있었다.

<실시예 2> FTN-H의 DnaK 추정 결합 모티브 탐색

<2-1> DnaK의 공동발현에 의한 FTN-H 및 FTN-L의 가용성 단백질 형성 조사

실시예 1-1의 방법으로 제작한 FTN-H 및 FTN-L을 삽입한 pET28a 벡터를 서열 결정한 후, 대장균 BL21(DE3)에 발현 벡터를 형질 전환하였고, 카나마이신 저항 형질전환체를 선별하였다. 또한 실시예 1-1에서 유래한 DnaK가 클로닝된 암피실린 저항성 플라스미드 pHCE19를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하여 표적 재조합 유전자와 함께 발현 벡터를 유도하였다. 암피실린 100μg/ℓ 및 카나마이신 100μg/ℓ가 포함된 LB 배지를 사용하여 암피실린 및 카나마이신 저항 형질전환체를 선

별하였다. FTN-H를 발현하는 형질전환체에는 실시예 1-2에서 수행한 배양방법 조건에 15mM 2-HEDS(2-hydroxyethyl disulfide($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$))를 첨가 또는 첨가하지 않은 상태, DnaK의 공동 발현하는 상태 또는 발현하지 않는 상태에서 배양하여 실시예 1-2에서 수행한 SDS-PAGE 방법을 통해 FTN-H의 가용성 단백질 형성 정도를 조사하였다. FTN-L은 DnaK의 공동 발현 상태 또는 발현하지 않는 상태에서 배양하여 실시예 1-2에서 수행한 SDS-PAGE 방법을 통해 FTN-L의 가용성 단백질 형성 정도를 조사하였다.

본 실시예 결과, 대장균 성장 배지에 2-HEDS가 있을 때, 거의 대부분의 재조합 단백질 FTN-H가 불가용성 단백질 응집체를 형성하며, 성장배지에 2-HEDS가 없을 때 80% 이상의 FTN-H가 가용성 단백질을 형성함을 확인하였다. 또한 FTN-H 이 DnaK가 공동발현할 때 2-HEDS가 있음에도 불구하고 가용성 단백질을 형성하는 것을 확인하였다(도 3A 참조). 이와는 대조적으로 재조합 단백질 FTN-L의 경우 DnaK가 공동발현함에도 불구하고 불가용성 단백질 응집체를 형성함을 확인하였다(도 3B 참조). 이를 통해 FTN-H가 DnaK와 상호작용으로 인해 가용성 단백질 형성이 증가하며, 상기 재조합 단백질에 DnaK와 고친화력을 가지는 아미노산 잔기가 존재함을 추정할 수 있다.

<2-2> PCR 방법을 바탕으로 한 FTN-H 유래 소수성 아미노산 잔기의 부위 특이적인 서열변이(site-directed mutagenesis)

FTN-H 중 가상 소수성 프로파일(theoretical hydropathy profile)을 통해 3개의 아미노산으로 구성된 5개의 소수성 클러스터(34VYL36, 81IFL83, 105LHL107, 133FIE135, 161APE163) 부분을 추정하였다(도 4A 참조). 상기 추정한 아미노산을 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법을 사용하여 34VYL36은 RRR로, 81IFL83은 RRR로, 105LHL107은 RHR로, 133FIE135는 RRE로, 161APE63은 RRE로 변이하였고 Pogulis 등의 방법으로 중첩 PCR(overlap Polymerase chain reaction: 이하 "overlap PCR" 이라 칭함)을 수행하였다(Pogulis et al., *Methods Mol Biol*, 2002). 변이 프라이머는 표 2와 같이 사용하였다. PCR은 최종부피가 20 μl (20mM Tris-HCl, pH8.3, 100pmol 각각의 프라이머, 200 μM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 2.5U Taq polymerase(BRL, USA))가 되도록 하였다. PCR은 초기 변성과정으로서 94℃에서 5분 처리한 후, 94℃에서 45초 동안 열변성 반응(denaturation), 60℃에서 60초 동안 프라이머 결합 반응(annealing), 72℃에서 120초 동안 길이연장 반응(elongation) 과정으로 총 20회 수행하였다. 20회 반복 후 반응물은 72℃에서 5분 동안 길이연장반응을 수행하였다. 상기 생성물은 1% 아가로오스 젤 전기영동 후 Gel extraction kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였다. 상기 변이체를 각각 FTN-H 변이체 34RRR36, 81RRR83, 105RHR107, 133RRE135 및 161RRE163로 명명하였다. 이 후 실시예 1-1과 같이 발현 벡터를 제작하고 대장균에 형질전환한 후, 실시예 1-2와 같이 배양하고 전기영동을 수행하여 가용성 단백질 형성 정도를 확인하였다. 또한 실시예 1-1과 같이, 상기 변이체가 형질전환된 대장균에 DnaK를 클로닝한 pHCE19 벡터를 함께 형질전환하여 공동 발현시 재조합 단백질의 가용성 단백질 형성 정도를 실시예 3의 방법대로 SDS-PAGE 방법을 수행하여 확인하였다.

본 실시예 결과 34RRR36, 81RRR83, 105RHR107 변이체는 양성대조군과 대조적으로 대장균 세포질 내에서 불가용성 단백질 응집체를 형성하는 것을 확인하였다(도 4B 참조). DnaK를 유도하여 공동발현한 경우에도 상기 변이체는 불가용성 단백질 응집체를 형성하였다(도 5 참조). 이를 통해 FTN-H의 특이적인 모티브가 DnaK와 친화력을 가지며, 상기 모티브가 34VYL36, 81IFL83, 105LHL107 중 하나임을 추정할 수 있다.

[표 2]
부위 특이적인 서열 변이 발생 방법에 사용된 변이 프라이머

변이	사용 변이 프라이머
FTN-H 34VYL36	서열번호 1
	서열번호 2
FTN-H 81IFL83	서열번호 3
	서열번호 4
FTN-H 105LHL107	서열번호 5
	서열번호 6
FTN-H 133FIE135	서열번호 7
	서열번호 8
FTN-H 161APE163	서열번호 9
	서열번호 10

<2-3> FTN-L 변이체 조사

FTN-H와 FTN-L 사이의 아미노산 서열 비교를 통해 FTN-L이 FTN-H의 DnaK 모티브로 추정되는 81IFL83과 동족 서열(cognate sequece)인 77ALF79을 포함하고 있음을 확인하였다(도 6A 참조). 실시예 2-2의 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법을 통해 FTN-L의 77ALF79를 77IFL79로 변이하였다. 변이 프라이머는 서열번호 11 및 12로 기재되는 프라이머를 사용하여 수행하였다. 변이된 벡터를 실시예 1-1의 방법처럼 대장균에 형질전환하여 실시예 1-2과 같이 배양하여 SDS-PAGE 방법으로 가용성 단백질 형성 정도를 조사하였다. 그 결과 FTN-L의 가용성 단백질 형성이 50% 이상 증가하는 것을 확인하였다(도 6B 참조). 상기 변이체를 포함하는 형질전환체 배양시 실시예 2-1과 같이 2-HEDS 첨가 또는 DnaK 공동 발현을 유도하여 FTN-L 변이체의 가용성 정도를 측정하였다.

그 결과 실시예 2-1에서 살펴본 FTN-H와 비슷하게 FTN-L 변이체는 성장 배지에 2-HEDS가 존재함에도 불구하고 DnaK에 의해 가용성 단백질 형성이 증가하는 것을 확인하였다(도 6 참조).

상기 결과를 통해 FTN-H의 모티브(IFL)가 FTN-L에 가용성 단백질 형성능을 부여하였으므로, 상기 모티브가 DnaK 사프론에 결합하는 특이 결합 모티브임을 알 수 있다.

<2-4> GST 변이체::ppGRN 조사

FTN-H에서 유래한 DnaK 결합 모티브를 포함하는 GST 변이체를 만들기 위해, 서열번호 23 및 24로 기재되는 프라이머를 사용하여 실시예 1-1의 방법으로 증폭하고, GST의 N-터미널 지역의 여러 소수성 클러스터의 소수성 아미노산을 서열번호 13 및 14로 기재되는 변이 프라이머를 사용하여 실시예 2-2의 방법대로 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법을 수행하여 아르지닌으로 교체하여 변이시켰다. 이후 재조합 대장균 시스템에서 발현하여 가용성 단백질 형성 정도를 실시예 2-1과 같은 방법으로 측정하였다. GST 변이체 합성 중 85LAP87을 RRR로 교체한 군이 높은 불가용성 단백질 응집체의 응집도를 보였다(도 7A 참조). 이는 FTN-H 변이체의 결과와 유사하다. 이를 통해 소수성 클러스터 85LAP87과 상기 클러스터 근처의 서열이 GST와 DnaK 사이의 결합에 중요한 사이트임을 추정할 수 있었다. FTN-H의 유래 DnaK 결합 모티브(81IFL83)를 포함하는 GST 변이체를 형성하기 위해, GST의 85LAP87을 85IFL87로 변이하였고, 변이시 서열번호 13 및 14로 기재되는 변이 프라이머를 사용하여 실시예 2-2의 방법대로 자리 직접 돌연변이를 수행하였고 GST-m1으로 명명하였다. 또한 GST의 84LLAPV88을 84RIFLQ88로 변이하였고, 변이시 서열번호 15 및 16으로 기재된 변이 프라이머를 사용하여 상기와 같이 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법을 수행하였고 GST-m2라 명명하였다. GST의 83QLLAPVN89를 83GRIFLQD89로 변이하였고, 변이시 서열번호 17 및 18로 기재되는 변이 프라이머를 사용하여 실시예 2-2의 방법대로 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법을 수행하였고 GST-m3라 명명하였다. 실시예 1-2의 방법대로 SDS-PAGE 분석을 통하여 GST-m3::ppGRN이 대장균 세포질에서 50% 이상 가용성 단백질이 형성됨을 확인하였다(도 7B 참조). 또한 2-HEDS가 성장배지에 존재함에도 불구하고 GST-m3::ppGRN이 DnaK 공동발현으로 인해 가용성 단백질을 형성함을 확인하였다(도 7C 참조). 따라서 FTN-H에서 유래한 GRIFLQD 아미노산 서열이 DnaK와 고친화력을 가지는 모티브임을 알 수 있었다.

<2-5> 시험관내 DnaK 결합 어세이

2가지 펩티드(GRIFLQD와 GRALFQD)의 합성 및 정제는 Peptron, Inc. (Taejeon, Korea)에 의뢰하였고 각각 펩티드 A 및 각각 펩티드 B로 명명하였다. 각각의 펩티드는 트리스 버퍼(40mM Tris-HCl, 0.5mM ATP, pH7.8)에 용해되어 있으며, 용액의 펩티드 농도는 10mg/ℓ이다. 각각의 펩티드 용액의 20μℓ를 메탄올이 적혀진 PVDF 막(Millipore Corp., USA) 위에 떨어뜨리고 건조하였다. 폰세우(Ponceu) S 염색용액(1% 아세트산 용액에 0.25% 폰세우 S)에 PVDF 막을 담구고 1-3분간 교반하면서 염색하고 증류수로 3-5회 세척하여 각각의 펩티드 또는 단백질이 PVDF 막에 안정하게 고정되었는지 확인하였다. 건조한 PVDF 막을 0.1% 스킨 밀크(skin milk) 용액에 담그고 30분 동안 천천히 교반하였다. 이 후 PVDF 막을 100nmol DnaK(Stressgen, USA)가 포함된 Tris 버퍼 용액(40mM Tris-HCl, 0.5mM ATP, pH 7.8)에 옮겼다. 1시간 후 막을 PBS로 2회 세척하고 항-DnaK 항체(monoclonal IgG, mouse, Stressgen, USA)를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였고, 항-마우스 면역글로블린 G-호스래디쉬 퍼옥시데이즈(immunoglobulin G-horseradish peroxidase)(Santa Cruz biotechnology Inc., USA)를 2차 항체로 사용하였다.

본 실시예 결과 폰세우 S 염색시 펩티드 A 및 B 모두 PVDF 막에 고정되었다. 그러나 DnaK 용액을 막에 첨가하였을 때 오직 펩티드 A와만 결합됨을 확인하였다(도 9A 참조). 또한 FTN-H, GRIFLQD 서열을 포함하는 FTN-L, GRIFLQD 서열을 포함하지 않는 FTN-L과 결합 어세이를 수행한 결과 FTN-H와 FTN-L 변이체는 DnaK와 결합하나 FTN-L은 결합능을 보이지 않았다(도 9B 참조). 이는 FTN-H 유래한 83GRIFLQD89 서열이 DnaK와 높은 결합 친화력을 가짐을 보여준다.

<실시예 3> FTN-H 유전자의 클로닝

인간 유래 FTN-H는 human spleen cDNA library(invirogen, USA)에서 유래한 것을 사용하였고, 융합 단백질을 라이게이션(ligation)하기 위하여 FTN-H를 코딩하는 염기서열을 5'말단과 3'말단을 인식할 수 있는 서열번호 19 및 서열번호 20으로 기재되는 프라이머를 사용하여 PCR 방법을 통해 증폭하였다. 서열번호 19는 정제를 위하여 HisX6를 포함하였다. PCR은 PCR premix(Bioneer, Korea)에 주형 DNA 100ng, 각각의 프라이머가 50pmol이 되도록 혼합하여 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 30초 동안 열변성 반응, 55℃에서 30초 동안 프라이머 결합 반응, 72℃에서 30초 동안 길이연장 반응 과정을 총 25회 수행하였다. PCR 반응이 종료된 다음 DNA를 1% 아가로오스 겔을 이용하여 분석하였다. 증폭된 DNA를 Gel extraction kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 다음 T-벡터(pGEMR-T EasyVector)(Promega, USA)에 라이게이션 하였다. 라이게이션 조건은 T-벡터 0.5 μ l, 상기 PCR 증폭산물 3.5 μ l, 2 $\times$ T-벡터 라이게이션 버퍼 5 μ l, T4 DNA 라이게아제 1 μ l를 넣어 총 부피를 10 μ l로 하였으며, 이를 16℃에서 4시간 동안 라이게이션 하였다. T-벡터 라이게이션을 통해 제작된 플라스미드를 pT-FTN-H라 명명하고, 염기서열을 분석하였다(Corebio, Korea). 확보한 DNA 염기서열은 서열번호 41로 기재되는 염기서열임을 확인하였다.

<실시예 4> 융합 단백질 유전자의 클로닝

FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합하고자 연세대 생화학과 이원태 교수께서 제공한 ppGRN과 미국 캘리포니아, 로스앤젤레스 대학(UCLA)의 대학 부속 뇌연구소의 Tobin 박사가 제공한 GAD 단편을 클로닝 하였다. GRN은 전체 유전자를 클로닝 하였고, GAD는 총 585개의 아미노산 중 카르복실기 말단에서부터 3가지 단편으로 나누어 클로닝 하였다. 구체적으로 GAD 중 448~585번의 아미노산을 가지는 유전자를 'GAD448'라 명명하였고, 487~585번의 아미노산을 가지는 유전자를 'GAD487'라 명명하였고, 512~585번의 아미노산을 가지는 유전자를 'GAD512'라 명명하였다. ghrelin은 5'말단에 *Bam*HI 제한효소 인식부위를 갖도록 하였고, 3'말단에는 스탑 코돈(Stop codon)과 *Hind*III 제한효소 인식부위를 갖도록 하였다. GAD448, GAD487, GAD512는 5'말단에 *Bam*HI 제한효소 인식부위를 갖도록 하였고, 3'말단에는 스탑 코돈과 *Xho*I 제한효소 인식부위를 갖도록 하였다. 각각의 플라스미드 DNA를 주형으로 표 3와 같이 프라이머를 사용하여 실시예 3과 같이 PCR을 수행하였다. 각각 증폭한 DNA 산물을 T-벡터(pGEMR-T EasyVector)(Promega, USA)에 라이게이션 한 후, 염기서열을 분석하였다.

[표 3]
융합 단백질 유전자의 사용 프라이머

유전자	사용 프라이머
GRN	서열번호 25
	서열번호 26
GAD448	서열번호 27
	서열번호 28
GAD487	서열번호 29
	서열번호 28
GAD512	서열번호 30
	서열번호 28

<실시예 5> 단백질 나노입자 생산 방법

<5-1> 단백질 나노입자 발현 벡터의 제조

상기 실시예 3 및 실시예 4에서 클로닝된 나노입자 주형으로 이용할 FTN-H 유전자, 융합 단백질인 GRN 유전자, GAD 단편 유전자를 이용하여 이를 대량 생산하기 위해 재조합 발현벡터를 제조하였다. 이를 위해 각 유전자를 각각 T-벡터에 삽입하여 재조합 발현벡터를 제조하였다. 구체적으로, 서열번호 41로 기재되는 FTN-H의 제한효소 인식부위(*Nde*I/*Bam*HI)와 pT7-7벡터(Teyeh et al., Protein Expr Purif., 6(6):757-762, 1995)(도 10 참조)의 멀티플 클로닝 사이트(Multiple cloning site)의 제한효소 인식부위(*Nde*I/*Bam*HI)를 이용하여 라이게이션 하였다. 라이게이션된 벡터를 1% 아가로오스 겔 전기영동법을 이용하여 상기 FTN-H 밴드를 확인하여 "pT-FTN-H"라 명명하였다. 이후 pT-FTN-H 벡터의 제한효

소 인식부위(*Bam*HI/*Hind*III)와 ghrelin의 제한효소 인식부위(*Bam*HI/*Hind*III)를 이용하여 라이게이션 하였다. 라이게이션 된 벡터를 1% 아가로오스 젤 전기영동법을 이용하여 상기 ghrelin의 밴드를 확인하여 'pT-FTN-H::GRN'이라 명명하였다. 상기 방법과 마찬가지로 pT-FTN-H 벡터의 제한효소 인식부위(*Bam*HI/*Xho*I)와 GAD448의 제한효소 인식부위(*Bam*HI/*Xho*I)를 이용하여 라이게이션 하였다. 1% 아가로오스 젤 전기영동법을 이용하여 상기 GAD448의 밴드를 확인하여 'pT-FTN-H::GAD448'이라 명명하였다. 상기 방법과 마찬가지로 pT-FTN-H 벡터와 GAD487과 GAD512를 라이게이션 한 것을 'pT-FTN-H::GAD487', 'pT-FTN-H::GAD512'이라 명명하였다.

<5-2> pT-FTN-H::GRN 발현벡터 대장균 형질전환체의 제조 및 단백질 나노입자 합성 확인

대장균 BL21(DE3)을 배양 배지(LB 배지)에 배양하여 OD600 값이 0.5가 되었을 때 4℃에서 30분간 냉각한 뒤 원심분리하여 균체를 침전시켰다. 침전된 균체를 50mM 염화칼슘 용액에 용해시킴으로써 형질전환이 가능한 적격 세포를 제작하였다. 이렇게 제작된 BL21(DE3) 적격세포에 상기 발현벡터 pT7-FTN-H-GRN 5 μ l를 첨가시켜 4℃에서 30분간 냉각시킨 뒤 42℃에서 1분 30초간 열 충격(heat shock)을 줌으로써 형질전환을 수행하였다. 암피실린(ampicillin) 저항 유전자를 포함하고 있는 pT7-7 벡터의 성질을 이용하여 100mg/l의 암피실린이 포함된 배양플레이트(LB 플레이트)에서 37℃, 24시간 동안 형질전환된 대장균을 배양함으로써 암피실린에 대해 저항성이 있는 콜로니를 선별하였다.

상기 발현벡터로 형질전환된 각각의 대장균 BL21(DE3)의 10개 콜로니를 선별한 후, 선별된 콜로니를 중균배양하고, 배양액의 1%를 배양 배지(LB 배지, 100mg/l 암피실린)에 접종한 다음 37℃에서 200rpm의 회전속도로 배양하였다. 배양액의 OD600값이 0.5에 이르렀을 때 IPTG(Isopropylthio- β -D-galactoside)를 1mmol/l 농도로 첨가하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 6시간 더 배양하여 단백질의 발현을 유도시킨 후, 세포배양액을 6,000rpm에서 원심분리하여 균체 침전물을 회수하였다. 회수된 균체 침전물을 용해용액 5ml로 현탁한 다음 초음파 분쇄기(Branson Sonifier, Branson Ultrasonics Copr., USA)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄액을 13,000rpm에서 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 상등액은 수용성 단백질을 포함하며, 침전물은 불용성 단백질을 포함한다. 상등액과 침전물은 12% 트리스 글리신(Tris-Glycine) 젤을 사용하여 SDS-PAGE 방법을 이용하여 초기 20분간 70V로 진행하다가 100V로 전압을 올려서 2시간 동안 분리한 뒤, 발현을 분석하였다(도 11 참조).

상기 발현 벡터 pT-FTN-H::GRN에서 유래한 융합 단백질을 FTN-H::GRN이라 명명하였다. 발현 단백질 FTN-H::GRN은 FTN-H의 아미노기 말단에 HisX6을 포함하고 있다. 이것을 이용하여 Probond purification kit(Invitrogen, USA)로 정제를 한 후, 12% 트리스 글리신 젤을 사용하여 SDS-PAGE 방법으로 초기 20분간 70V로 진행하다가 100V로 전압을 올려서 2시간 동안 분리한 뒤, 정제를 분석하여 융합 단백질의 단일 밴드를 확인하였다(도 12 참조).

TEM 이미지 분석을 위해 정제된 단백질 용액의 염색하지 않은 시료를 탄소 코팅 청동 전자 현미경 그리드(carbon-coated copper electron microscopy grid)에 공기 건조된 시료 용액을 부착하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해 2% 수성 우라닐 아세테이트(aqueous uranyl acetate) 용액에서 실온에서 10분간 방치하고, 증류수로 3, 4회 세척하였다. 단백질 나노입자 이미지는 Philips Technai 120kV 전자 현미경을 사용하여 관찰하였다. 분석을 통하여 본 발명자 FTN-H와 FTN-H::GRN의 구형의 나노입자를 확인하였다(도 13 참조).

<5-3> pT-FTN-H::GAD448, pT-FTN-H::GAD487, pT-FTN-H::GAD512 발현벡터 대장균 형질전환체의 제조 및 단백질 나노입자 분비 확인

실시에 5-1에서 기재된 것과 같이 pT7-FTN-H::GAF448, pT-FTN-H::GAD487, pT-FTN-H::GAD512 발현 벡터를 제조하고 실시에 5-2와 같이 형질전환하였다. 상기 발현 벡터 pT-FTN-H::GAD448, pT-FTN-H::GAD487, pT-FTN-H::GAD512에서 각각 유래한 융합 단백질을 FTN-H::GAD448, FTN-H::GAD487, FTN-H::GAD512라 명명하였다. 상기 실시에 5-2과 마찬가지로 상등액과 침전물을 획득 후, 정제하여 12% 트리스 글리신 젤을 사용하여 SDS-PAGE 방법으로 초기 20분간 70V로 진행하다가 100V로 전압을 올려서 2시간 동안 분리한 뒤, 정제를 분석하였다(도 14 참조). 웨스턴 블롯을 통하여 항체와의 면역반응을 확인하였다(도 15 참조). 이를 좀 더 구체적으로 설명하면, 각각 정제한 단백질 단편을 BCA 용액(Sigma, USA)에 Copper(II)sulfate(Sigma, USA)를 50:1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 50 μ g를 사용하여 12% SDS-PAGE 방법을 시행한 후 PVDF 막에 이동시켰다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 PVDF 막을 각각의 차단 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 1차 항체로 마우스-항-GAD 항체(mouse Anti-GAD antibody)(BD Bioscience, USA)와 60분 동안 반응시켰다. 1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 10분간 2회 세척한 후, 2차 항체와 결합된 항-마우스 IgG-알카라인 포스파테이스(anti-mouse IgG-alkaline phosphatase)(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)로 60분간 처리하였다. 그 후 다시 PBS로 7분 동안 2회 세척하였고, ECL kit(Amersham Biosciences, UK)로 1분 동안 반응시켜 Hyperfilm-MP(Amersham Biosciences, UK)에 노출시켰다. 6%

트리스 클리신 젤을 사용하여 4℃에서 70V로 12시간 동안 Native-PAGE로 분리한 뒤 웨스턴 블롯을 통하여 항체와의 면역반응을 확인하였다(도 16 참조). 이를 통해 상기 단백질 나노입자에 융합된 단백질 탐침이 입자 표면에 돌출되어 있음을 확인하였다.

실시에 5-2의 방법과 같이 TEM 이미지 분석을 통하여, 정제된 FTN-H::GAD448, FTN-H::GAD487, FTN-H::GAD512 단백질이 본 발명자가 목적인 구형의 나노입자임을 확인하였다(도 17 참조).

본 실시예를 통해 자연 상태에서 융합 단백질의 탐침 단백질이 구형의 나노입자 표면에 돌출되어있음을 확인하였다.

<실시예 6> FTN-H::FTN-L 단백질 나노입자 발현 시스템 개발

FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합하고자 FTN-L(Ferritin light chain)을 클로닝하였다. 서열번호 21 및 22로 기재되는 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 95℃에서 30초 동안 열변성 반응(denaturation), 55℃에서 30초 동안 프라이머 결합 반응(annealing), 72℃에서 30초 동안 길이연장 반응(elongation) 과정을 총 25회 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA산물을 FTN-L로 명명하고, T-벡터(pGEMR-T EasyVector)(Promega, USA)에 라이게이션 하였다. FTN-H와 FTN-L이 융합된 단백질의 생산을 위한 발현 벡터의 제조, 이를 도입한 형질전환체, 단백질의 발현 및 정제는 실시예 5-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

실시에 5-2의 방법과 같이 TEM 분석을 통해 정제된 FTN-H::FTN-L 단백질이 구형의 나노입자임을 확인하였다(도 18 참조).

<실시예 7> FTN-H::mpINS 단백질 나노입자 발현 시스템 개발

FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합하고자 mpINS(mini-proinsulin)를 클로닝하였다. 서열번호 31 및 32로 기재되는 mpINS 프라이머를 사용하여 mpINS 유전자를 주형으로 PCR을 수행하였다. 95℃에서 30초 동안 열변성 반응(denaturation), 55℃에서 30초 동안 프라이머 결합 반응(annealing), 72℃에서 30초 동안 길이연장 반응(elongation) 과정을 총 25회 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA산물을 mpINS로 명명하고, T-벡터(pGEMR-T EasyVector)(Promega, USA)에 라이게이션 하였다. FTN-H와 mpINS가 융합된 단백질의 생산을 위한 발현 벡터의 제조, 이를 도입한 형질전환체, 단백질의 발현 및 정제는 실시예 5-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

실시에 5-2의 방법과 같이 TEM 분석을 통해 정제된 FTN-H::mpINP 단백질이 구형의 나노입자임을 확인하였다(도 19 참조).

<실시예 8> FTN-H::EGF 단백질 나노입자 발현 시스템 개발

FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합하고자 EGF를 클로닝하였다. 서열번호 33 및 34로 기재되는 EGF 프라이머를 사용하여 EGF 유전자를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 95℃에서 30초 동안 열변성 반응(denaturation), 55℃에서 30초 동안 프라이머 결합 반응(annealing), 72℃에서 30초 동안 길이연장 반응(elongation) 과정을 총 25회 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA산물을 EGF로 명명하고, T-벡터(pGEMR-T EasyVector)(Promega, USA)에 라이게이션하였다. FTN-H와 EGF가 융합된 단백질의 생산을 위한 발현 벡터의 제조, 이를 도입한 형질전환체, 단백질의 발현 및 정제는 실시예 5-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

실시에 5-2의 방법과 같이 TEM 분석을 통해 정제된 FTN-H-EGF 단백질이 구형의 나노입자임을 확인하였다(도 20 참조).

<실시예 9> FTN-H::IL-2 단백질 나노입자 발현 시스템 개발

FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합하고자 IL-2를 클로닝 하였다. 서열번호 35 및 36으로 기재되는 IL-2 프라이머를 사용하여 IL-2 유전자를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 95℃에서 30초 동안 열변성 반응(denaturation), 55℃에서 30초 동안 프라이머 결합 반응(annealing), 72℃에서 30초 동안 길이연장 반응(elongation) 과정을 총 25회 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 산물을 IL-2로 명명하고, T-벡터(pGMR-T EasyVector)(Promega, USA)에 라이게이션 하였다. FTN-H와 IL-2가 융합된 단백질의 생산을 위한 발현 벡터의 제조, 이를 도입한 형질전환체, 단백질의 발현 및 정제는 실시예 5-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

실시에 5-2의 방법과 같이 TEM 분석을 통해 정제된 FTN-H::IL-2 단백질이 구형의 나노입자임을 확인하였다(도 21 참조)

<실시에 10> FTN-H::ADI₁₃₂₋₄₁₀ 단백질 나노입자 발현 시스템 개발

FTN-H의 C-터미널에 단백질을 융합하고자 ADI₁₃₂₋₄₁₀을 클로닝하였다. 서열번호 37 및 38로 기재되는 ADI₁₃₂₋₄₁₀ 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 95℃에서 30초 동안 열변성 반응(denaturation), 55℃에서 30초 동안 프라이머 결합 반응(annealing), 72℃에서 30초 동안 길이연장 반응(elongation) 과정을 총 25회 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA산물을 mpINS로 명명하고, T-벡터(pGEMR-T EasyVector)(Promega)에 라이게이션하였다. FTN-H와 ADI₁₃₂₋₄₁₀가 융합된 단백질의 생산을 위한 발현 벡터의 제조, 이를 도입한 형질전환체, 단백질의 발현 및 정제는 실시예 5-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

실시에 5-2의 방법과 같이 TEM 분석을 통해 정제된 FTN-H::ADI₁₃₂₋₄₁₀ 단백질이 구형의 나노입자임을 확인하였다(도 22 참조).

<실시에 11> 단백질 나노입자를 이용한 단백질 칩 제작

실시에 5 내지 실시예 10에서 분리정제된 융합 단백질 나노입자를 이용하여 단백질 칩을 제작하였다. 정제된 융합 단백질은 메탄올을 통해 1분간 활성화된 PVDF 막에 떨어뜨리는 닷 블로팅(Dot blotting) 방법을 이용해 고정화시켰다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 PVDF 막을 각각의 차단 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 1차 항체로 마우스-항 융합 단백질 항체와 60분 동안 반응시켰다. 1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 10분간 2회 세척한 뒤, 퀀텀 닷 565/655 항-마우스 IgG-콘주게이트(H+L)(Qdot 565/655 anti-mouse IgG conjugate (H+L))(Quantum Dot Corporation, CA, USA)로 60분간 처리하였다. 그 후 다시 PBS로 7분 동안 2회 세척한 뒤 트랜스일루미네이터(Transiluminator)를 이용하여 퀀텀 닷 발색을 확인하였다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 단백질 나노입자는 DnaK와 고친화력을 가지는 모티프를 포함하므로 대장균에서 과발현시 수용성이 현저히 증가된다. 특히 주형 단백질이 페리틴 무거운 사슬일 경우 자가조립에 의해 구형을 이루어 단백질 칩의 기반 위에서 일정한 방향성을 지닌 활성형 탐침으로서의 안정된 고정화를 제공하고, 단위면적당 탐침의 집적도가 향상되는 효과를 나타냄으로 고감도 단백질 나노 칩 개발과 진단 키트 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 대장균 발현 시스템에서 단백질의 세포질 내 가용성 단백질 형성 정도를 나타낸 것으로, (A)는 직접발현에 의한 단백질의 가용성 단백질 형성 정도를 나타내고, (B)는 FTN-H의 C-터미널에 융합한 이종 단백질의 가용성 단백질 형성 정도를 나타내고, 흰색 막대는 가용성 단백질을, 회색 막대는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고,

도 2는 융합 단백질의 생활성도를 측정한 그림으로, (A)는 FTN-H::ADI₁₃₂₋₁₄₀의 효소 활성을 분석한 그림이고, (B)는 FTN-H::ppGRN을 트롬빈(thrombin)으로 절단한 그림이고, 1은 마커를, 2는 FTN-H::ppGRN을, 3은 ppGRN을 나타내고,

도 3은 대장균 발현 시스템에서 FTN-H 및 FTN-L 단백질의 가용성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 것으로, (A)는 2-HEDS 또는 DnaK의 유무에 따른 FTN-H의 가용성 단백질 형성 정도를 나타내고, (B)는 DnaK의 유무에 따른 FTN-L의 가용성 단백질 형성 정도를 나타낸 것으로서, W는 대조군을, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고,

도 4는 FTN-H의 부위 특이적인 서열 변이 발생 방법(site directed mutagenesis)에 관한 것으로, (A)는 FTN-H의 가상 소수성 프로파일(theoretical hydropathy profile)을 통해 소수성 클러스터 부분을 추정한 그림이고, (B)는 추정한 소수성 잔기를 변이하여 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 그림으로, FTN-H(Wild)는 대조군이고,

34VYL36 →RRR은 VYL을 RRR로 변이한 것이고, 81IFL83 →RRR은 IFL을 RRR로 변이한 것이고, 105LHL107 →RHR은 LHL을 RHR로 변이한 것이고, 133FIE135 →RRE는 FIE를 RRE로 변이한 것이고, 161APE163 →RPE는 APE를 RPE로 변이한 것이고, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고,

도 5는 DnaK와 공동발현할 때 FTN-H 부분 변이시 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 그림으로, 34VYL36 →RRR은 VYL을 RRR로 변이한 것이고, 81IFL83 →RRR은 IFL을 RRR로 변이한 것이고, 105LHL107 →RHR은 LHL을 RHR로 변이한 것이고, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고, 화살표는 DnaK의 공동발현을 나타낸 것이고, 점선은 DnaK의 공동발현이 유도되지 않은 상태, 직선은 DnaK의 공동발현이 유도된 상태를 나타내고,

도 6은 FTN-L의 변이체를 조사한 그림으로, (A)는 FTN-H와 FTN-L 사이의 아미노산 서열을 비교한 그림이고, (B)는 FTN-H의 81IFL83을 FTN-L의 77ALF79로 변이하여 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 그림으로, W는 대조군을, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고, (C)는 2-HEDS 또는 DnaK의 유무에 따른 FTN-L 변이체의 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 그림으로, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고,

도 7은 GST 변이체::ppGRN을 조사한 그림으로, (A)는 GST의 86LAP87을 RRR로 변이하여 대조군과 함께 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석, 비교한 그림으로서, GST(Wild)는 대조군이고, 85LAP87→RRR은 LAP를 RRR로 변이한 것이고, (B)는 GST변이체::ppGRN의 가용성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 것으로, GST::ppGRN은 대조군이고, GST-m1::ppGRN은 85LAP87을 85IFL87로 변이한 것이고, GST-m2::ppGRN은 84LLAPV88을 84RIFLQ88로 변이한 것이고, GST-m3::ppGRN은 83QLLAPVN89를 83GRIFLQD89로 변이한 것이고, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 변이체를 나타내고, (C)는 2-HEDS 또는 DnaK의 유무에 따른 GST-m3::ppGRN의 가용성 단백질 형성 정도를 SDS-PAGE 방법으로 분석한 그림으로, S는 가용성 단백질을, IS는 불가용성 단백질 응집체를 나타내고,

도 8은 DnaK와 고친화력을 제공하는 아미노산 서열을 나타내고,

도 9는 DnaK 결합 어세이를 수행한 그림으로, (A)는 펩티드 A 및 B와 DnaK와의 결합을 나타낸 그림으로, 1은 폰세우(Ponceu) S 용액으로 염색한 그림이고, 2는 항 DnaK 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행한 것이고, (B)는 FTN-L, FTN-L 변이체 및 FTN-H와 DnaK와의 결합을 나타낸 그림이고,

도 10은 단백질 나노입자 발현 벡터의 지도를 나타내고,

도 11은 pT-FTN-H::GRN의 발현을 SDS-PAGE 방법으로 분석한 것으로, M은 마커(marker), 1은 균체 파쇄액의 단백질, 2는 균체 파쇄 후 상등액의 단백질, 3은 균체 파쇄 후 침전물의 단백질을 나타내고,

도 12는 FTN-H::GRN을 정제하여 SDS-PAGE 방법으로 분석한 것으로, M은 마커이고 1은 FTN-H::GRN을 나타내고,

도 13은 FTN-H와 FTN-H::GRN을 TEM으로 분석한 사진이고,

도 14는 FTN-H::GAD448, FTN-H::GAD487, FTN-H::GAD512를 정제하여 SDS-PAGE 방법으로 분석한 것으로, M은 마커, 1은 FTN-H::GAD448, 2는 FTN-H::GAD487, 3은 FTN-H::GAD512를 나타낸 것이고,

도 15는 정제된 FTN-H::GAD 융합 단백질을 웨스턴 블롯으로 분석한 것으로, M은 마커, 1은 FTN-H::GAD448, 2는 FTN-H::GAD487, 3은 FTN-H::GAD512를 나타낸 것이고,

도 16은 정제된 FTN-H::GAD 융합 단백질을 Native-PAGE를 수행한 후 웨스턴 블롯으로 분석한 것으로, M은 마커, 1은 FTN-H::GAD448, 2는 FTN-H::GAD487, 3은 FTN-H::GAD512를 나타낸 것이고,

도 17은 FTN-H::GAD448, FTN-H::GAD487, FTN-H::GAD512의 TEM 분석 결과이고,

도 18은 FTN-H::FTN-L의 TEM 분석 결과이고,

도 19는 FTN-H::mpINS의 TEM 분석 결과이고,

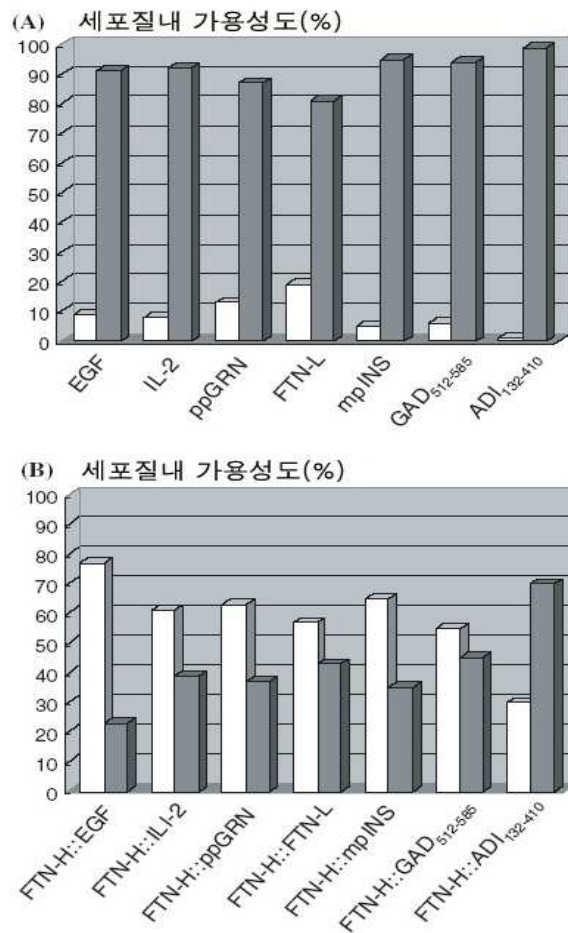
도 20은 FTN-H::EGF의 TEM 분석 결과이고,

도 21은 FTN-H::IL-2의 TEM 분석 결과이고

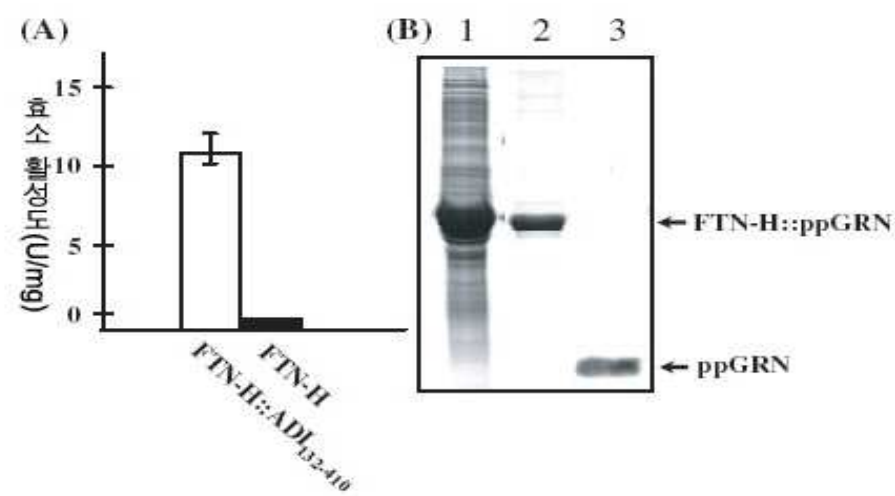
도 22는 FTN-H::ADI₁₃₂₋₄₁₀의 TEM 분석 결과이다.

도면

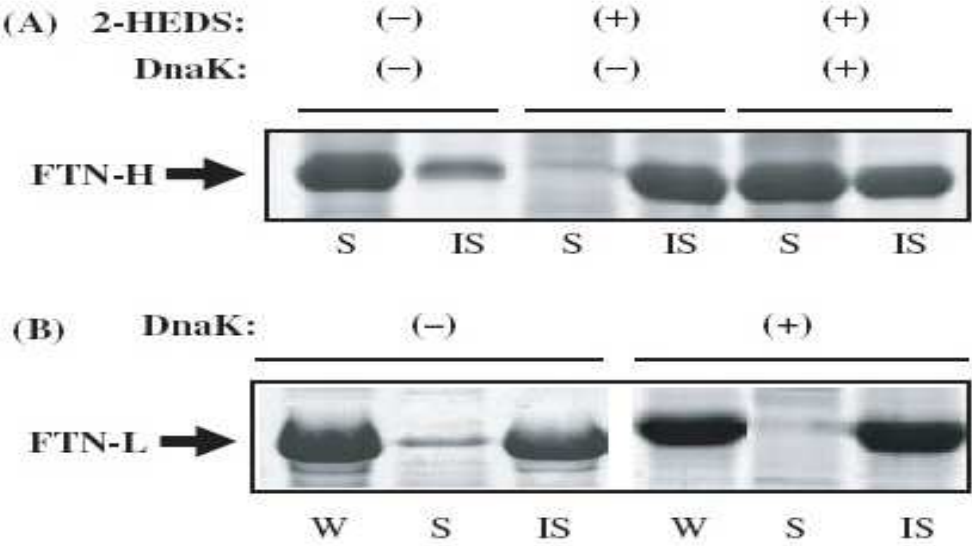
도면1



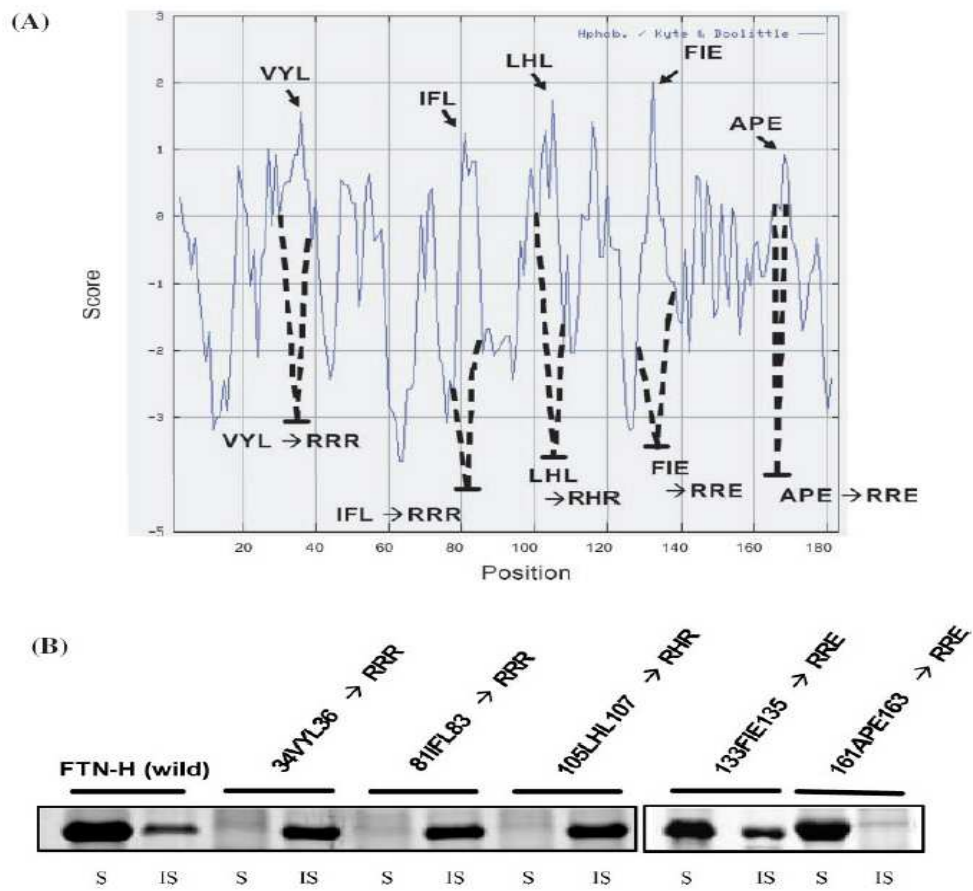
도면2



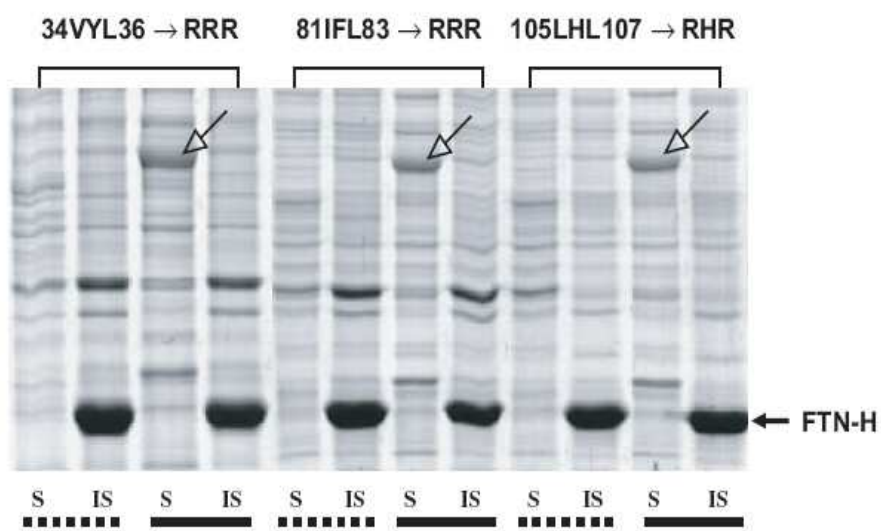
도면3



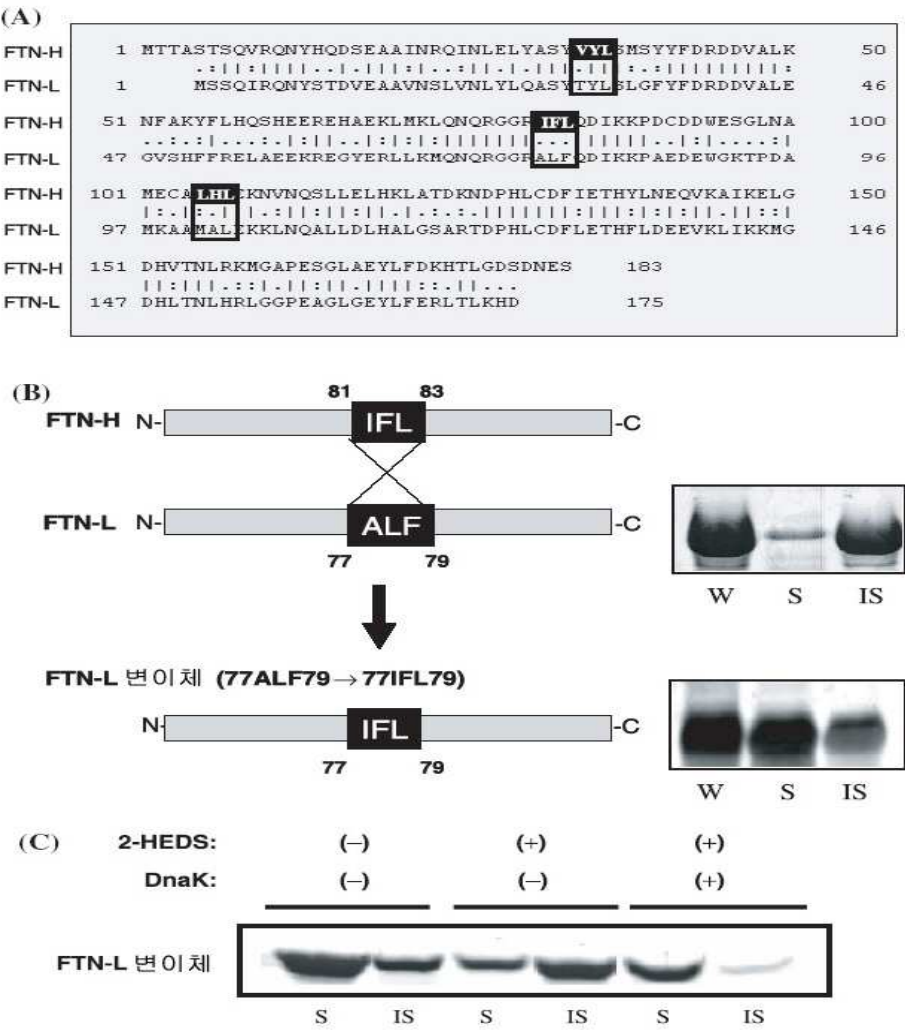
도면4



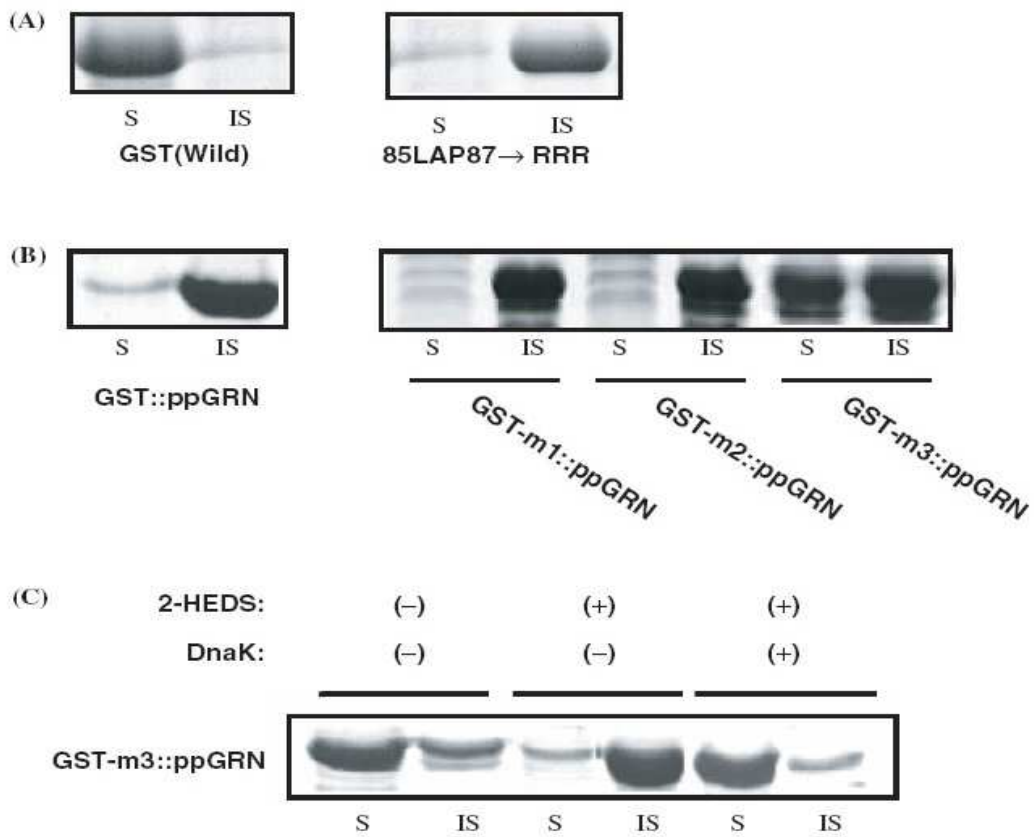
도면5



도면6



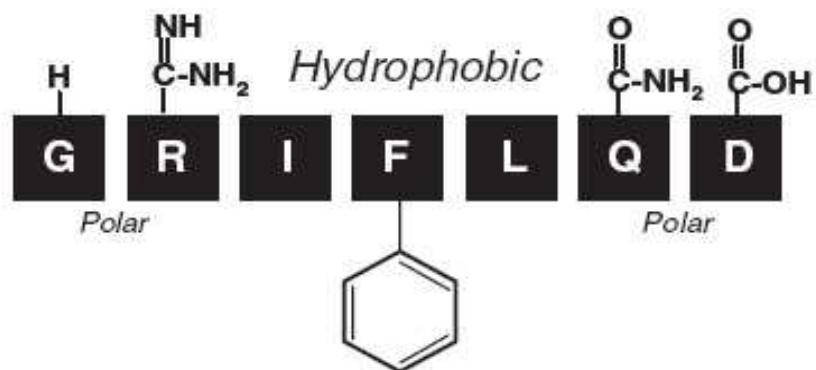
도면7



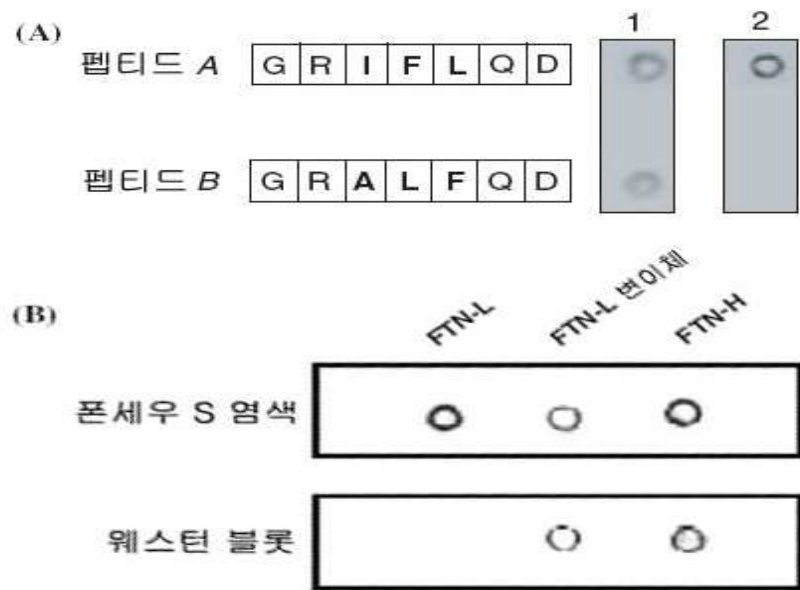
도면8

FTN-L 변이체 : 79 GRIFLQD 85

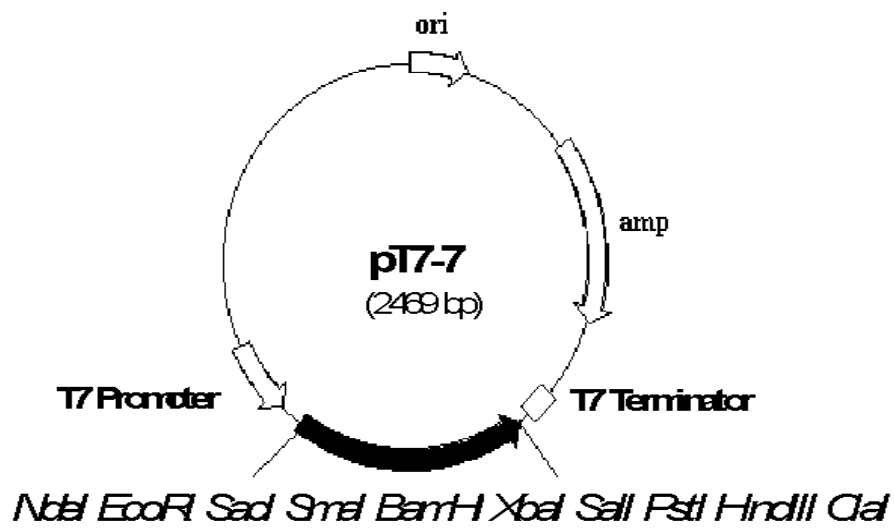
GST 변이체 (GST-m3) : 83 GRIFLQD 89



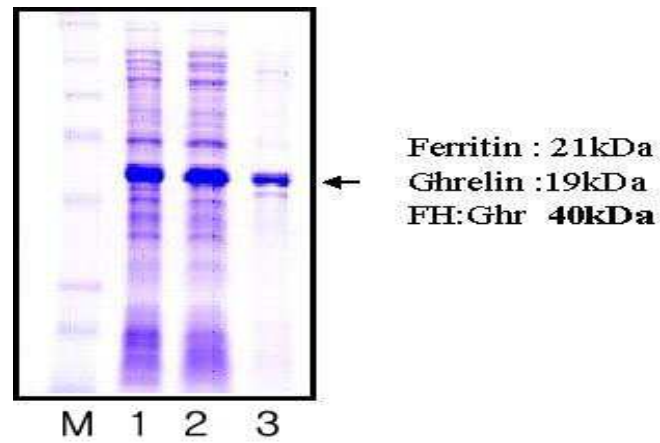
도면9



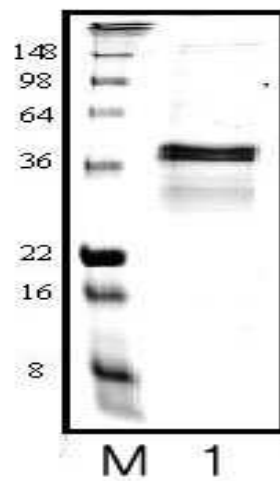
도면10



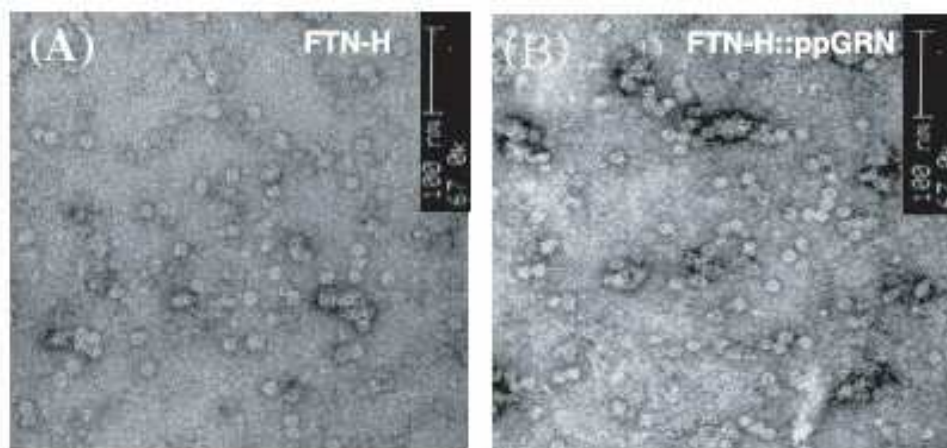
도면11



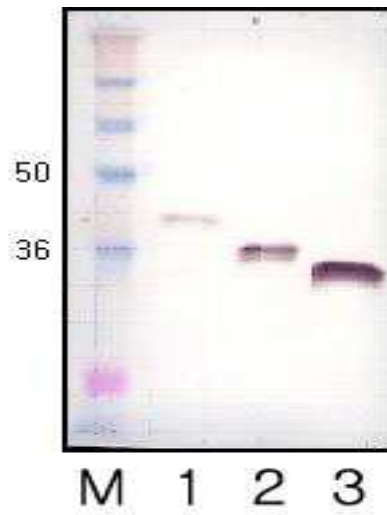
도면12



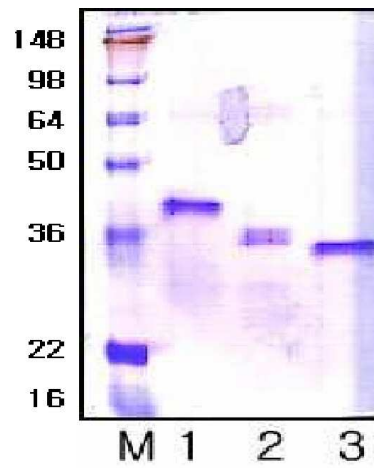
도면13



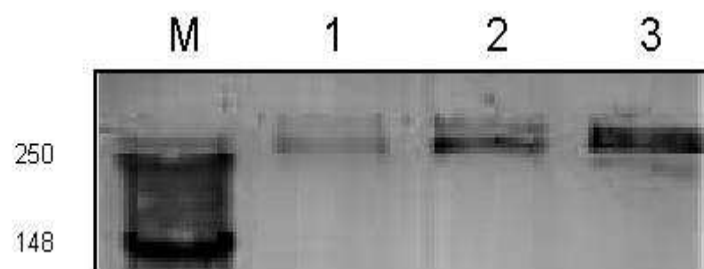
도면14



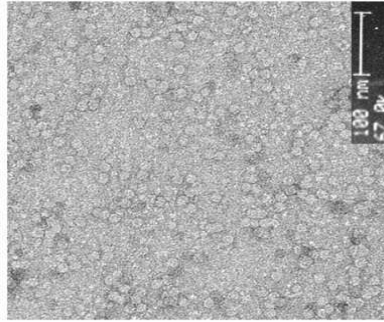
도면15



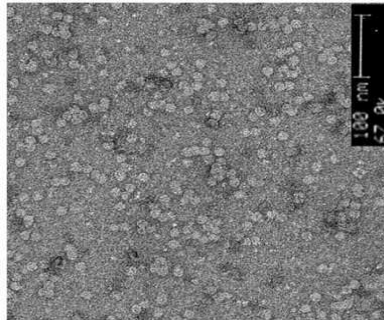
도면16



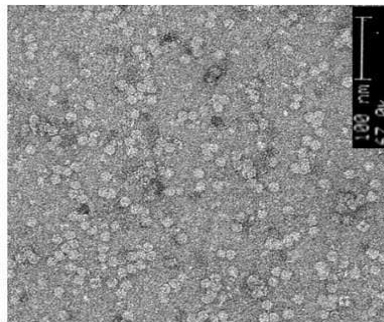
도면17



FTN-H::GAD448



FTN-H::GAD485

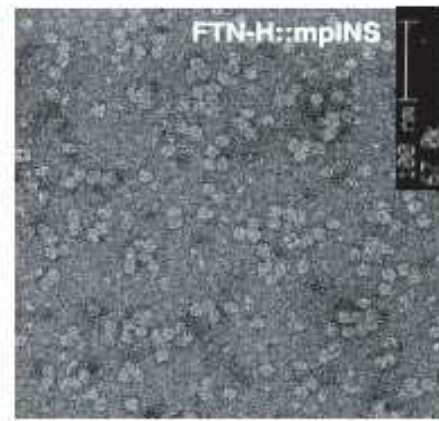


FTN-H-GAD512

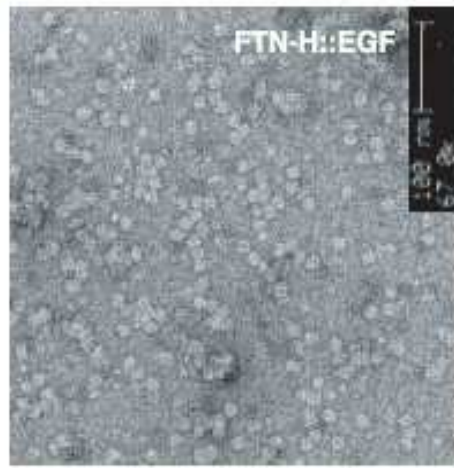
도면18



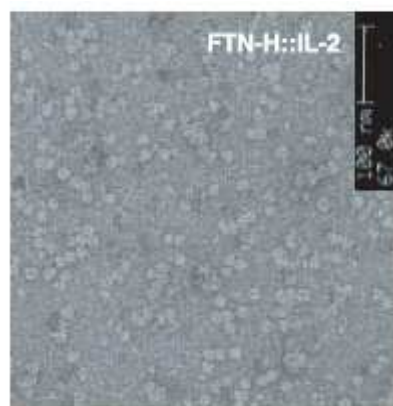
도면19



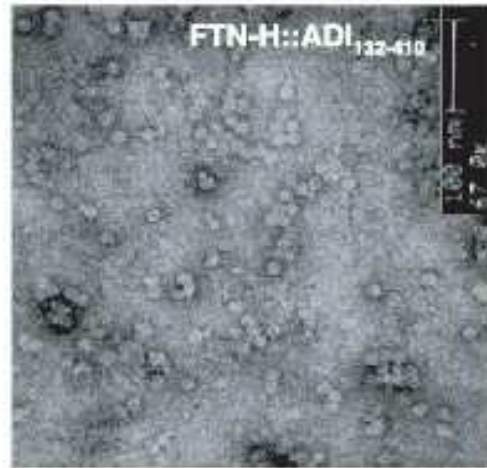
도면20



도면21



도면22



서열목록

<110>	Korea University	
<120>	The protein nano-particles that are formed by fusing probe protein to template protein with high affinity for DnaK	
<130>	5p-07-15	
<160>	42	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	FTN-H 34VYL36 site directed mutagenesis sense primer	
<400>	1	
	tacgcctcct accgtcgtcg ttccatgtct	30
<210>	2	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	FTN-H 34VYL36 site directed mutagenesis antisense primer	
<400>	2	
	agacatggaa cgacgacggt aggaggcgta	30
<210>	3	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	FTN-H 81IFL88 site directed mutagenesis sense primer	

<400> 3
cgaggtggcc gacgacgacg acaggatatc aag 33

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> FTN-H 81IFL88 site directed metagenesis antisense primer

<400> 4
cttgatatcc tgtcgtcgtc ggccacctcg 30

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> FTN-H 105LHL107 site directed mutagenesis sense primer

<400> 5
atggagtgtg cacgacgaga cgaaaaaat gtgaat 36

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> FTN-H 105LHL107 site directed mutagenesis antisense primer

<400> 6
attcacattt ttttcgtctc gtcgtcgaca ctccat 36

<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> FTN-H 133FIE135 site directed mutagenesis sense primer

<400> 7
catttggtg accgacgaga gacacattac ctgaat 36

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> FTN-H 133FIE135 site directed mutagenesis antisense primer

<400> 8
attcaggtaa tgtgtctctc gtcggtcaca caaatg 36

<210> 9
<211> 39
<212> DNA

<213> FTN-H 161APE163 site directed mutagenesis sense primer

<400> 9
 ttgcgcaaga tgggacgacg tcgatctggc ttggcggaa 39

<210> 10
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> FTN-H 161APE163 site directed mutagenesis antisense primer

<400> 10
 ttccgccaag ccagatcgac gtcgtcccat cttgcgcaa 39

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> FTN-L 77ALF79 site directed mutagenesis sense primer

<400> 11
 cgtggcggcc gcattcttct tcaggacatc aag 33

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> FTN-L 77ALF79 site directed mutagenesis antisense primer

<400> 12
 cttgatgtcc tgaaggaaga tgcggccgcc acg 33

<210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> GST-m1 site directed mutagenesis sense primer

<400> 13
 cccgaccgcc agttgatctt ccttgtaaac agtatt 36

<210> 14
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> GST-m1 site directed mutagenesis antisense primer

<400> 14
 aatactgttt acaaggaaga tcaactggcg gtcggg 36

<210> 15

<211> 36
 <212> DNA
 <213> GST-m2 site directed mutagenesis sense primer

 <400> 15
 cccgaccgcc gattgatctt ccttcagaac agtatt 36

 <210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> GST-m2 site directed mutagenesis antisense primer

 <400> 16
 aatactgttc tgaaggaaga tcaatcggcg gtcggg 36

 <210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> GST-m3 site directed mutagenesis sense primer

 <400> 17
 cccgacggcc agttgatctt ccttgtagac agtatt 36

 <210> 18
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> GST-m3 site directed mutagenesis antisense primer

 <400> 18
 aatactgtct agaaggaaga tcaatcgccg gtcggg 36

 <210> 19
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> FTN-H sense primer

 <400> 19
 catatgcatc atcatcatca tcatacgacc gcgtccacc 39

 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> FTN-H antisense primer

 <400> 20
 ggatccgctt tcattatcac tgtc 24

<210>	21	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	FTN-L sense primer	
<400>	21	
	atgagctccc agattcgtca gaatt	25
<210>	22	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	FTN-L antisense primer	
<400>	22	
	ttagtcgtgc ttgagagtga gccttt	26
<210>	23	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	GST sense primer	
<400>	23	
	atgaaattgt tctacaaacc gggcgctgc tctctcgct	39
<210>	24	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	GST antisense primer	
<400>	24	
	ttactttaag cttccgctga cagcgctct tgtac	35
<210>	25	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Ghrelin sense primer	
<400>	25	
	ctcgagggt ccagcttcct gagc	24
<210>	26	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Ghrelin antisense primer	
<400>	26	
	aagcttttac ttgtcggtg gggc	24

<210> 27
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> GAD448 sense primer

 <400> 27
 ggatcccgcc acgttgatgt ttttaaaa 28

 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> GAD antisense primer

 <400> 28
 ctcgagttat aaatcttgct ca 22

 <210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> GAD487 sense primer

 <400> 29
 ggatccaacc gagaaggata tgagatg 27

 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> GAD512 sense primer

 <400> 30
 ggatcctctt tgcgtactct gga 23

 <210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mpINS sense primer

 <400> 31
 ctcgagggca tcgttgaaca gtgt 24

 <210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> mpINS antisense primer

 <400> 32
 aagcttttag ttacatagt 19

<210> 33
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> EGF sense primer

 <400> 33
 ctcgagaact ccgactccga gtgtcct 27

 <210> 34
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> EGF antisense primer

 <400> 34
 aagcttttat ctcagctccc accactt 27

 <210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> IL-2 sense primer

 <400> 35
 ctcgaggcac ctacttctag ttctacaaag 30

 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> IL-2 antisense primer

 <400> 36
 aagcttttaa gttagtgttg agatgatgct 30

 <210> 37
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> ADI132-410 sense primer

 <400> 37
 atggcagggga tcacaaaata cgattta 27

 <210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> ADI132-410 antisense primer

 <400> 38
 ctatcactta acatcttttac gtgataaagg 30

<210>	39	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	DnaK sense primer	
<400>	39	
	atgggtaaaa taattggtat cgacctgggt actacc	36
<210>	40	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	DnaK antisens primer	
<400>	40	
	ttatttttttg tctttgactt cttcaaattc agcgtcgaca ac	42
<210>	41	
<211>	572	
<212>	DNA	
<213>	FTN-H	
<400>	41	
	atgcatcatc atcatcatca tacgaccgcg tccacctcgc aggtgcgcca gaactaccac	60
	caggactcag aggccgccat caaccgccag atcaacctgg agctctacgc ctcttacgtt	120
	tacctgtcca tgtcttacta ctttgaccgc gatgatgtgg ctttgaagaa ctttgccaaa	180
	tactttcttc accaatctca tgaggagagg gaacatgctg agaaactgat gaagctgcag	240
	aaccaacgag gtggccgaat cttccttcag gatatcaaga aaccagactg tgatgactgg	300
	gagagcgggc tgaatgcaat ggagtgtgca ttacatttgg aaaaaaatgt gaatcagtca	360
	ctactggaac tgcacaaact ggccactgac aaaaatgacc ccatttgtg tgacttcatt	420
	gagacacatt acctgaatga gcaggtgaaa gccatcaaag aattgggtga ccacgtgacc	480
	aacttgcgca agatgggagc gcccgaatct ggcttggcgg aatatctctt tgacaagcac	540
	accctgggag acagtgataa tgaaagcgga tc	572
<210>	42	
<211>	182	
<212>	PRT	
<213>	FTN-H	

<400> 42
Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp
1 5 10 15
Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
20 25 30
Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
35 40 45
Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
50 55 60
Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg
65 70 75 80
Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser
85 90 95
Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn
100 105 110
Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro
115 120 125
His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys
130 135 140
Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly
145 150 155 160
Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu
165 170 175
Gly Asp Ser Asp Asn Glu
180