



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0088012
(43) 공개일자 2016년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/62 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/62 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0007132
(22) 출원일자 2015년01월15일
심사청구일자 2015년01월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이지원
서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)
이종환
경기도 부천시 소사구 소안로 20, 206동 1105호 (괴안동, 삼익세라믹아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

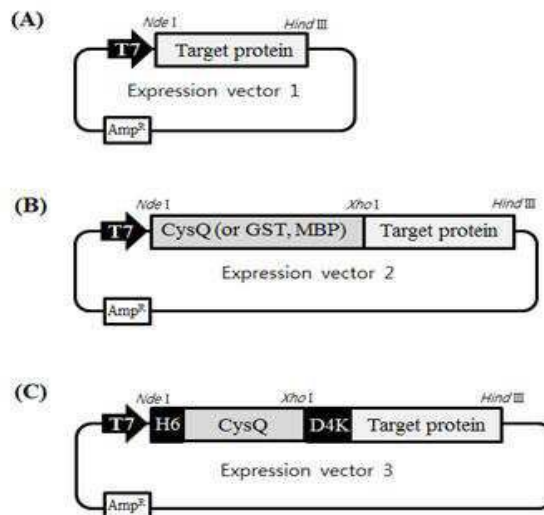
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 CysQ를 융합파트너로 이용한 재조합 단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 CysQ (Protein cysQ)를 융합파트너로 이용한 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct) 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CysQ를 융합파트너로 이용한 재조합 단백질의 제조방법은 난발현 단백질의 활성 발현을 유도하고, 목적 단백질의 수용성 및 발현율을 향상시켜, 다양한 목적 단백질의 의약품 및 산업용으로 개발 및 생산하는데 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C07K 2319/20 (2013.01)

(72) 발명자

이지윤

서울특별시 동대문구 무학로 193, 301호 (용두동, 삼영 오피스텔)

송중암

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교자연계캠퍼스 제2공학관 251호

강윤식

서울특별시 강남구 도산대로101길 29, 102동 403호 (청담동, 청담현대3차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014023207

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구

연구과제명 의료기능 맞춤형 단백질 나노입자 기반 차세대 나노의료 혁신기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

목적 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct).

청구항 2

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

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 상기 CysQ 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 유전자 구조체(gene construct).

청구항 4

목적 단백질 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 목적 단백질 생산용 발현 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 융합파트너로 CysQ 유전자가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 목적 단백질 생산용 발현벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 융합파트너로 CysQ 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 목적 단백질 생산용 발현벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 융합파트너로 CysQ 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 목적 단백질 생산용 발현벡터.

청구항 8

제4항에 있어서, 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 목적 단백질 생산용 발현벡터.

청구항 9

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

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 유전자 구조체(gene construct)는 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 11

제9항의 재조합 미생물을 배양하여 목적 단백질의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 목적 단백질의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 재조합 단백질로부터 CysQ를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 단백질의 제조방법.

청구항 13

제11항의 방법에 의해 제조되고, CysQ와 목적 단백질이 융합된 재조합 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CysQ (Protein cysQ)를 융합파트너로 이용한 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct) 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명공학 기술에 의해 생산되는 단백질에는 일반적으로 면역 조절 및 효소 저해제 및 호르몬 같은 의약 및 연구용 단백질과 진단용 단백질이나 반응 첨가 효소와 같은 산업용 단백질로 대별될 수 있으며, 이 두 가지 단백질들을 중심으로 생산 공정 기술 개발 및 산업화가 추진되고 있다. 특히 재조합 미생물 기술을 이용하여 유용한 재조합 단백질을 생산할 때, 유전정보가 잘 알려져 있으며 다양한 벡터 시스템을 구축하고 있고, 비교적 값싼 배지에서 빠르게 고농도로 배양할 수 있는 장점을 갖는 대장균이 연구 또는 상업적 목적으로 다양하게 사용되고 있다.

[0003] 대장균에서 재조합 단백질을 생산함에 있어, 강력한 유도성(inducible) 프로모터를 갖춘 다양한 발현벡터가 개발되어 외래단백질의 생산에 이용되어 왔다. 그러나 숙주세포로 대장균을 이용하는 경우 제조하고자 하는 단백질이 대장균 내의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 수율이 낮아지는 경우가 많으며, 특히 분자량이 10kDa 이하의 작은 크기의 폴리펩타이드의 발현에서 이러한 경향이 심한 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 일반적으로 대장균은 단백질의 전사(transcription)와 전이(translation)가 거의 동시에 일어나기 때문에 재조합 단백질의 과다 발현시 불용성 응집체(inclusion body)를 형성하는 경우가 많으며, 응집체로 발현된 폴리펩타이드의 경우 접힘(folding) 중간체가 분자 상호간의 다이설파이드 결합(inter-molecular disulfide bond) 또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 숙주세포의 다른 단백질 불순물들[샤페론(chaperon), 라이보솜(ribosome), 초기인자 등]과 비선택적으로 결합함으로써 목적 폴리펩타이드의 응집체 내 순도가 떨어지는 단점이 있다. 또한 이렇게 발현된 단백질을 활성형으로 만들기 위해서는 구아니딘-하이드로클로라이드(Guanidine

hychloride)나 우레아(urea) 같은 변성체를 사용하여 용해시킨 후 회식하는 재접힘(refolding) 과정을 거쳐야 하는데 이때 단백질이 활성형으로 접히지 않는 등 생산 수율이 감소하는 문제점이 있다 (Marston FA *et al.*, *Biochem J* 240(1):1-12, 1986).

[0004] 대장균 내에서 활성형의 재조합 단백질을 고수율로 얻기 위해 대장균의 단백질 발현 속도를 늦추어 목적 단백질의 수용도를 높여주는 저온 발현방법(Hammarstrom *et al.*, *Protein Sci.* 11:313-321, 2002), mRNA의 친화력을 높힐 수 있는 진보된 형태의 프로모터를 사용하거나 유도(induction) 조건의 최적화하는 방법 (Qing *et al.*, *Nat Biotechnol.* 22:877-882, 2004) 및 분자 샤페론 또는 단백질 접힘 조절자와 목적 단백질을 동시 발현시키는 방법(de Marco & De Marco, *J Biotechnol.* 109:45-52, 2004) 등이 시도되고 있지만, 목적 단백질의 아미노 말단에 융합파트너를 융합시켜서 발현시키는 방법이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 융합파트너를 융합시켜 발현할 경우 목적 단백질을 수용성으로 유도할 수 있는 장점이 있으며, 또한 엔테로카이네이즈(enterokinase)와 같은 효소를 이용하여 융합파트너를 제거함으로써 아미노 말단의 메티오닌 문제를 해결할 수 있다.

[0005] 실제로 대장균 내에서 외래단백질의 수용성 높은 발현을 유도하는 여러 융합파트너가 지난 수년 동안 연구되고 보고되어왔다 (Esposito & Chatterjee, *Curr Opin Biotechnol.* 17:353-358 2006; Kapust & Waugh, *Protein Sci.* 8:1668-1674, 1999; Sachdev & Chirgwin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:933-937, 1998). 가장 많이 연구된 대표적인 융합파트너로는 말토오스 결합 단백질 (Maltose binding protein; MBP), 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase; GST), 티오레독신 (Thioredoxin; Trx), NusA 등이 있다. 말토오스 결합 단백질의 경우 이량체 형성에 관여하는 부분에 소수성을 띠는 아미노산이 모여 만들어진 넓은 소수성 틈새가 새로 합성되는 단백질의 소수성 부위를 효과적으로 감춰주어 목적단백질이 불용성 응집체가 되는 것을 방지해 주며, 티오레독신은 목적단백질의 다이설파이드 결합을 도와주고, NusA의 경우 대장균에서 과량으로 발현되었을 때 활성형으로 접히는 능력이 매우 뛰어나므로 뒤따라 발현되는 목적단백질의 올바른 접힘을 유도한다고 알려져 있다 (Bach H *et al.*, *J Mol Biol* 312:79-93, 2001; Edward RL *et al.*, *Nat Biotechnol* 11:187-193, 1993; Davis GD *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 65:382-388, 1999).

[0006] 이러한 융합파트너는 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 방법을 이용하여 융합발현 된 목적단백질을 쉽게 정제할 수 있다는 장점이 있으며, 각기 다른 분자생물학적 특성을 이용하여 목적단백질의 접힘을 돕는다고 알려져 있다. 하지만 이러한 융합파트너들은 목적단백질에 비해 상대적으로 크기가 크기 때문에 융합 부분의 크기에 따라 목적단백질의 수율이 현저히 떨어진다는 단점과 의료목적 또는 산업적으로 유용한 단백질들에 모두 범용적으로 작용하지 않는다는 단점이 있다. 또한, 이합체(dimer)를 형성하여 목적 단백질 또한 이합체(dimer)형태로 생산되는 경우도 있을뿐 아니라, 목적단백질을 수용성으로 발현을 유도하더라도 고유한 기능을 수행하는 활성형으로 발현을 유도하는 데는 실패하는 경우가 많고, 적합한 용도로 이용되기 위하여 융합파트너의 제거 과정이 추가되어야 하는 공정상의 불합리성을 지닌다는 문제점이 있다.

[0007] 지금까지 생명공학 기술에 의해 산업적으로 생산된 국내의 재조합 단백질은 발현 가능한 재조합 단백질들의 생산 공정개발에 치중되어 있어서 핵심 원천 기술인 발현시스템 개발은 외국에 비해 상대적으로 모방 또는 개량 수준의 부가기술로서 개발되고 있다. 또한, 상업적으로나 의약적으로 매우 중요한 단백질은 분비 단백질(secretory protein) 및 막 단백질(membrane protein)들로서 대장균 내에서 발현 시 불용성 응집체를 만드는 난발현성 단백질(difficult-to-express proteins)이어서 개발이 지연되고 있다. 이를 극복하기 위해서는 다양한 장점을 지니고 있는 대장균 시스템을 활용하여 난발현 단백질의 발현효율을 증대시키기 위한 발현시스템을 개발하여, 이에 관한 원천 기반기술을 확보하는 것이 중요하다. 또한, 대장균에서 재조합 단백질의 과다 발현은 외부 환경으로부터 받는 스트레스(열 충격, 아미노산 고갈 등)와 비슷한 영향을 준다고 알려진바 있다(Hoffman F & Rinas U, *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 89:73-92, 2004).

[0008] 이에, 본 발명자들은 대장균에 단백질의 올바른 접힘을 저해하는 스트레스를 주어 과발현되는 단백질을 범용성 융합파트너로 이용한 재조합 단백질 발현 시스템을 구축하고자 예의 노력한 결과, CysQ를 융합파트너로 이용하여 목적단백질과 융합 발현시킬 경우, 재조합 단백질의 수용성 발현율이 현저히 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 CysQ 유전자를 융합파트너로 이용하여 목적 단백질의 수용성 및 접힘을 향상시킬 수 있는, 재조합 단백질 생산용 발현벡터 또는 유전자 구조체(gene construct)를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현벡터로 형질전환 되거나 또는 유전자 구조체(gene construct)가 삽입된 재조합 미생물 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct)를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 목적 단백질 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 목적 단백질 생산용 발현벡터를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 유전자 구조체(gene construct) 또는 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 목적 단백질의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, CysQ와 목적 단백질이 융합된 재조합 단백질을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 CysQ를 융합파트너로 이용한 재조합 단백질의 제조방법은 난발현 단백질의 활성 발현을 유도하고, 목적 단백질의 수용성 및 발현율을 향상시켜, 다양한 목적 단백질의 의료용 및 산업용으로 개발 및 생산하는데 유용하다.

[0017]

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 목적 단백질 유전자만을 단독 포함하는 발현벡터(A), CysQ 유전자와 목적 단백질 유전자의 융합 발현벡터(B) 및 CysQ 유전자와 목적 단백질 유전자 사이에 엔테로키나제 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 연결된 융합 발현벡터(C)의 도식도이다.

도 2는 7 종류의 목적 단백질(A: CUT, B: hG-CSF, C: hFTN-L, D: ADI, E: IL2, F: AID, G: GAD448-585)과 3 종류의 융합파트너(CysQ, GST, MBP)와의 융합발현 및 단독발현 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 CysQ의 소수성 (hydrophobic) 아미노산의 무리(cluster)를 확인한 결과이다. (A) 카이트-두리틀 방법을 이용한 CysQ의 소수성 (hydrophobic)을 확인한 그래프이며, (B) CysQ의 소수성 (hydrophobic) 아미노산의 무리 (cluster)의 유전자 변형 후 수용성 발현량 변화를 확인한 결과이다.

도 4는 CysQ와 융합발현된 큐티네이즈(CUT)의 활성도 결과이다 (안쪽 그래프: CUT가 존재하지 않는 경우의 활성도).

도 5 (A)는 CysQ와 융합발현된 hG-CSF와 CysQ가 제거된 hG-CSF의 SDS-PAGE 및 웨스턴블롯 결과이며, (B)는 상업적으로 판매하는 hG-CSF와 CysQ가 제거된 hG-CSF의 원편광 이색성 분광(CD) 분석 그래프 결과이다.

도 6 (A)는 CysQ와 융합발현된 hFTN-L과 CysQ가 제거된 hFTN-L의 SDS-PAGE 결과이며, (B)는 CysQ가 제거된 hFTN-L의 투과전자현미경(TEM) 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0020] 대장균에서 목적 단백질은 불용성 응집체로 발현되는 경우가 많다. 즉, 대장균 발현시스템 내에서는 전사와 전이가 거의 동시에 일어나며, 재조합 단백질의 과다 발현 시, 목적 단백질 또는 대장균 숙주세포 내 다른 단백질들의 접힘(folding) 중간체들 사이의 비특이적인 결합에 의해 인접한 하이드로포빅(hydrophobic) 폴리펩타이드 체인들은 응집체(inclusion body)로 알려진 불용성 응집체를 형성한다고 알려져 있다. 단백질의 접힘을 저해하는 조건에서도 활성이 유지되며 발현량이 우수한 단백질은 단백질의 잘못된 접힘(misfolding)을 극복하기 위한 대장균의 생체 메커니즘에 관여할 수 있고, 단백질 구조가 안정적이며 자체 접힘 능력이 뛰어나므로 융합파트너로서 효과적으로 이용될 수 있다. 대장균 융합발현파트너 중에서 가장 효율성이 높다고 알려진 융합발현파트너는 말토오즈 결합 단백질(Maltose binding protein, 'MBP'; Bedouelle and Duplay, *Eur J Biochem*, 1998)이다. 하지만 상당수의 단백질에 대해서 효과적이라고 알려진 MBP도 많은 단백질에 대해서 수용성 발현 개선 효과를 보이지 못하고 있다 (Hammarstrom *et al.*, *J Struct Funct Genomics*, 2006).
- [0021] 본 발명에서는 CysQ 유전자를 융합파트너로 이용하여 다양한 목적 단백질을 생산함으로써, 범용적으로 적용 가능한 미생물 기반 단백질 활성 발현 시스템을 구축하였다.
- [0022] CysQ는 하이드로포빅(hydrophobic) 아미노산의 무리(cluster)로 이루어져 있으며(도 3A), 이러한 CysQ의 하이드로포빅(hydrophobic) 아미노산의 무리(cluster)는 새로운 단백질의 합성 시, 분자 샤페론(molecular chaperones)이 결합할 수 있는 좋은 위치로 작용하여, 단백질의 수용성 발현 및 알맞은 3차원 접힘(folding)을 가능케 한다. 이에, 본 발명에서는 목적 단백질의 수용성 발현 및 올바른 접힘(folding)을 유도하기 위하여 CysQ를 융합파트너로 사용하였고, 그 결과 재조합 단백질의 수용성 발현이 현저히 향상되었음을 규명하였다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct)에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 상기 CysQ 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 목적 단백질 유전자와 상기 CysQ 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 다른 관점에서, 목적 단백질 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 목적 단백질 생산용 발현벡터에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 융합파트너로 CysQ 유전자가 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 발현벡터는 상기 융합파트너 유전자와 목적 단백질의 유전자를 일련의 순서로 포함함으로써 상기 융합파트너와 목적 단백질을 재조합 단백질로 발현할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질 유전자와 융합파트너로 CysQ 유전자 사이에 단백질 절단 효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 목적 단백질 유전자와 융합파트너로 CysQ 유전자는 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하도록 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본원에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잡채적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수 개에서 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다. 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 칼슘 클로라이드 방법 또는 전기천공법(electroporation) (Neumann, *et al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 등을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다.

- [0031] 본 발명에 따른 유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 벡터는 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a, pET-22b(+) 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0032] 염기서열은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0033] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질전환 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0034] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0035] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct) 또는 상기 목적 단백질 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 목적 단백질 생산용 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 구조체(gene construct)는 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.
- [0039] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법들을 들 수 있다.
- [0040] 융합파트너와 융합할 목적 단백질이 산업용 단백질일 경우, 융합파트너가 목적 단백질의 기능을 저하할 수도 있으며, 의학용 단백질일 경우는 항원항체 반응을 야기할 수 있으므로 융합파트너는 제거되는 것이 바람직하다. 이때, 상기 단백질 절단효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위, 제네나제(Genenase) I 인식부위 또는 퓨린(Furin) 인식부위가 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다.
- [0041] 또한, 재조합 단백질의 분리 정제가 용이하도록, 본 발명의 벡터의 융합파트너 또는 목적 단백질의 유전자에 분

리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 작동 가능하도록 연결할 수 있다. 이때, 상기 분리정제용 태그는 GST, poly-Arg, FLAG, poly-His 및 c-myc 등이 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다. 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 벡터는 pT7 뼈대 벡터에 분리정제용 태그, 상기 융합파트너의 유전자 및 목적 단백질의 유전자를 일련의 순서로 포함함으로써 분리정제용 태그, 상기 융합파트너 및 목적 단백질을 포함하는 재조합 단백질을 발현할 수 있다.

[0042] 상기 목적 단백질의 유전자는 제한효소 부위를 통해 클로닝 될 수 있고, 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 사용된 경우에는 상기 폴리뉴클레오티드와 틀이 맞도록(in frame) 연결되어, 목적 단백질 분비 후 단백질 절단효소로 절단하여, 원래 형태의 목적 단백질을 생산할 수 있도록 할 수 있다.

[0043] 본원의 용어, "목적 단백질(target protein)" 또는 "외래 단백질(heterologous protein)"은 업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.

[0044] 또한, 본 발명에서, "재조합 융합 단백질"이란, 목적단백질과 CysQ가 융합되어 있는 형태의 단백질을 의미한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 당업자가 원하는 모든 단백질에 적용 가능하며, 특히, 의료, 연구용 및 산업용 단백질, 예를 들어, 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청, 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 목적 단백질을 재조합 단백질 형태로 발현할 수 있다.

[0045] 본 발명에서는 CysQ가 목적 단백질의 접힘을 돕는 융합파트너로서의 가능성을 검증하기 위하여, 대장균에서 융합파트너 없이 단독으로 발현하였을 때 불용성 응집체를 형성한다고 알려진 7개의 단백질과 융합 발현시켰다. 즉, 의료, 연구용 및 산업용 단백질로는 대표적으로 수도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 큐티네이스(cutinase, 이하 CUT), 인간 과립구 집락-자극인자(human granulocyte colony-stimulating factor, 이하 G-CSF), 인간 페리틴 가벼운 사슬(human ferritin light chain, 이하 hFTN-L), 아르기닌 디이미나아제(Arginine deiminase, 이하 ADI), 인간 활성화유도 시티딘 디아미네이스(human activation induced cytidine deaminase, 이하 AID), 인간 인터루킨-2(human interleukin-2, 이하 IL-2) 및 인간 글루타메이트 디카르복실레이스(human glutamate decarboxylase, 이하 GAD448-585)를 목적 단백질로 선정하여 각각 CysQ의 카르복실 말단에 삽입한 발현벡터를 제조한 후(도 1), 이를 대장균에 형질전환시키고 이로부터 재조합 단백질 형태로 생산하였다.

[0046] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자가 연결되어 있는 유전자 구조체(gene construct) 또는 상기 목적 단백질 유전자와 서열번호 34로 표시되는 CysQ 유전자를 융합파트너로 포함하는 목적 단백질 생산용 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도한 다음, 이를 회수하는 단계를 포함하는 목적 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 상기 재조합 단백질로부터 CysQ를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0048] 본 발명의 CysQ를 융합파트너로 사용하여 재조합 단백질을 생산하는 방법은 기존의 융합파트너가 가지고 있는 수용성과 접힘에 관한 한계를 극복할 수 있고, 단백질 의약품 및 산업용 생산에 폭넓게 이용될 수 있는 특징이 있다.

[0049] [실시예]

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

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

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

[0053] **1-1 : 단백질체 분석을 위한 수용성 단백질 준비**

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

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

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

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

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

[0059] 단백질 동정을 수행한 결과, GdnHCl 및 2HEDS 스트레스 조건에서 발현량이 각각 2.21배 및 1.90배 이상 증가하고 구조적 안정성을 유지하여, 스트레스 내성을 보이는 단백질은 CysQ로 확인되었다 (표 1).

표 1

[0060]

CysQ 단백질 정보

유전자 이름	유전자 접근 번호 ^a	단백질 이름	등전점(pI)/분자량(kDa)		서열 유사성(%)
			이론값 ^b	실험값 ^c	
CysQ	P22255	Protein cysQ	5.59/27.18	5.58/25.21	20%

[0061]

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

[0062]

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

[0063]

c. 실험값은 이차원 전기영동 젤 이미지로부터 산출하였다.

[0064]

실시예 3 : 아미노 말단에 CysQ를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터의 제조

[0065]

실시예 1 내지 2의 방법으로 선정된 환경 스트레스 하에 수용성 발현량이 증가한 대장균 단백질 CysQ(Protein cysQ)를 융합파트너로 포함하는 발현 벡터를 제조하였다.

[0066]

CysQ 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드를 획득하기 위해, Entrez Nucleotide 데이터베이스의 gi:49175990에서 4436755bp 내지 4437492bp의 서열정보(서열번호 34)를 이용하여 정지 코돈을 제외한 CysQ 유전자의 PCR 증폭을 위한 프라이머쌍을 제작하였다. 또한, 상기 프라이머쌍의 센스 프라이머(서열번호 1: cat atg tta gat caa gta tgc)에는 *NdeI* 제한효소 인식서열을, 안티센스 프라이머(서열번호 2: ctc gag ata aat aga cac tct)에는 *XhoI* 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작하였다. PCR은 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 대장균으로부터 분리한 염색체를 주형 DNA로 100 ng, 서열번호 1 내지 2로 표시되는 프라이머쌍을 각각 50 pmol을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 수행하였다. 반응 조건은 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 수행하였으며, 그 결과 증폭된 DNA절편의 5' 말단에 *NdeI* 제한효소 부위와 3' 말단에 *XhoI* 제한 효소 부위를 포함하는 PCR 산물을 수득하였다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*으로 각각 처리하여 pT7-7(Novagen, USA)의 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*자리에 삽입하였고 이를 pT7-CysQ 라고 명명하였다.

[0067]

실시예 4 : 목적 단백질의 단독발현 벡터 및 CysQ 융합발현 벡터 제조

[0068]

CysQ를 융합발현파트너로 이용하여 다양한 목적 단백질의 수용성 발현 유도를 확인하기 위해 목적 단백질의 단독 발현, 융합 파트너와의 융합 발현을 위한 벡터 및 단백질 절단효소 인식부위를 포함하는 융합 발현 벡터를 제조하였다.

[0069]

4-1 : 목적 단백질의 단독발현 벡터

[0070]

본 발명에 사용된 목적 단백질은 인간 인터루킨-2 (human interleukin-2, 이하 IL-2; 서열번호 35), 인간 활성화 유도 시티딘 디아미네이스 (human activation induced cytidine deaminase, 이하 AID; 서열번호 36), 인간 글루타메이트 디카복실레이스 (human glutamate decarboxylase, 이하 GAD₄₄₈₋₅₈₅; 서열번호 37), 수도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 유래의 큐티네이스 (cutinase, 이하 CUT; 서열번호 38), 인간 페리틴 가벼운 사슬 (human ferritin light chain, 이하 hFTN-L; 서열번호 39), 인간 과립구 집락-자극인자 (human granulocyte colony-stimulating factor, 이하 hG-CSF; 서열번호 40), 및 아르기닌 탈아민효소 (arginine deiminase, 이하 ADI; 서열번호 41) 이다. 목적 단백질의 주형 DNA는 상기 단백질들을 많이 발현하는 인간 조직으로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1μg과 oligo-d(T) 1μl (Invitrogen, USA, 0.5 μg/μl)에 증류수를 50μl 까지 채운 후, AccuPower RTpremix(Bioneer, 한국)에 넣어 RT-PCR(reverse transcription polymerasechain reaction) 반응시켰다. 70℃에서 5분, 4℃에서 5분, 42℃에서 60분, 94℃에서 5분, 4℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성함으로써 수득하였다. 상기 hIL-2, hFTN-L 및 G-CSF는 인간 백혈구, AID는 인간 측두엽 세포 및 GAD₄₄₈₋₅₈₅는 인간 해마 조직에서 각각 클로닝 하였으며, CUT의 경우는 Genomic DNA

Purification. kit(promega, USA)을 슈도모나스 푸티다로부터 이용하여 추출한 DNA를 주형 DNA로 사용하였다.

[0071] 상기 목적 단백질의 단독 발현벡터를 제조하기 위해서 각 목적 단백질의 5'-말단에 *NdeI*, 3'-말단에 *HindIII* 제한효소 인지부위를 포함하도록 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)의 조건은, [표 2]의 프라이머쌍을 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄ 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 PCR을 수행하였다. 구체적으로, hIL-2, hFTN-L, G-CSF, AID, ADI 및 CUT는 시작 코돈을 제외하고 정지 코돈을 포함하는 아미노산 서열을 증폭하였고, GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우에는 448번째 아미노산부터 585번째 아미노산 서열을 증폭하였다. 이때, GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우는 3'-말단에 *ClaI* 제한효소 인식서열을 포함하도록 프라이머를 제작하였다.

표 2

프라이머 서열

유전자명	프라이머	서열번호	염기서열
hIL-2	센스	서열번호 3	cat atg gca cct act tca agt
	안티센스	서열번호 4	aag ctt tta tca agt cag tgt
AID	센스	서열번호 5	cat atg gac agc ctc ttg atg aac
	안티센스	서열번호 6	aag ctt tca taa caa aag tcc ca
GAD ₄₄₈₋₅₈₅	센스	서열번호 7	cat atg cgc cac gtt gat gt
	안티센스	서열번호 8	atc gat tta taa atc ttg tcc
CUT	센스	서열번호 9	cat atg gct ccc ctg ccg gat ac
	안티센스	서열번호 10	aag ctt tta aag ccc gcg gcg ct
hFTN-L	센스	서열번호 11	cat atg agc tcc cag att cgt
	안티센스	서열번호 12	aag ctt tta gtc gtg ctt gag agt
hG-CSF	센스	서열번호 13	cat atg act cca ctc gga cct g
	안티센스	서열번호 14	aag ctt tca tgg ctg tgc aag
ADI	센스	서열번호 15	cat atg tct gta ttt gac agt
	안티센스	서열번호 16	aag ctt cta tca ctt aac atc

[0073] 상기 증폭된 목적 단백질을 코딩하는 *NdeI/HindIII* (GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우는 *NdeI/ClaI*)단편을 잘라낸 후 대장균 발현벡터 pT7(Novagen) 벡터의 *NdeI/HindIII* (GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우는 *NdeI/ClaI*)자리에 삽입하여 단백질 단독발현 벡터를 제작하였다(도 1A).

[0074] 4-2 : 목적 단백질의 융합파트너와의 융합발현 벡터

[0075] IL-2, AID, GAD₄₄₈₋₅₈₅, CUT, hFTN-L, hG-CSF 및 ADI 등의 목적 단백질의 5'-말단에 *XhoI* 제한효소 인식서열과 3'-말단에 *HindIII* 제한효소 인식서열을 포함하도록 제작된 [표 3]의 프라이머쌍을 각각 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응용 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄; 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 PCR을 수행하였다. 구체적으로, hIL-2, hFTN-L, G-CSF, AID, ADI 및 CUT는 시작 코돈을 제외하고 정지 코돈을 포함하는 아미노산 서열을 증폭하였고, GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우에는 448번째 아미노산부터 585번째 아미노산 서열을 증폭하였다. 이때, GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우는 3'-말단에 *ClaI* 제한효소 인식서열을 포함하도록 프라이머를 제작하였다.

표 3

프라이머 서열

유전자명	프라이머	서열번호	염기서열
hIL-2	센스	서열번호 17	ctc gag gca cct act tca agt
	안티센스		

AID	안티센스	서열번호 18	aag ctt tta tca agt cag tgt
	센스	서열번호 19	ctc gag gac agc ctc ttg atg aac
	안티센스	서열번호 20	aag ctt tca taa caa aag tcc ca
GAD ₄₄₈₋₅₈₅	센스	서열번호 21	ctc gag cgc cac gtt gat gt
	안티센스	서열번호 22	atc gat tta taa atc ttg tcc
CUT	센스	서열번호 23	ctc gag gct ccc ctg ccg gat ac
	안티센스	서열번호 24	aag ctt tta aag ccc gcg gcg ct
hFTN-L	센스	서열번호 25	ctc gag agc tcc cag att cgt
	안티센스	서열번호 26	aag ctt tta gtc gtg ctt gag agt
hG-CSF	센스	서열번호 27	ctc gag acc ccc ctg ggc cct gcc
	안티센스	서열번호 28	aag ctt tca tgg ctg tgc aag
ADI	센스	서열번호 29	ctc gag gat gac gat gac aag tct gta ttt ga
	안티센스	서열번호 30	aag ctt cta tca ctt aac atc

[0077] 상기 PCR 증폭 산물을 *XhoI/HindIII*(GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우는 *XhoI/ClaI*) 제한 효소로 처리한 후, 실시예 3의 방법으로 제작한 발현벡터 pT7-CysQ의 *XhoI/HindIII*(GAD₄₄₈₋₅₈₅의 경우는 *NdeI/ClaI*) 자리에 삽입함으로써 외래단백질의 융합파트너와의 융합발현 벡터를 제작하였다(도 1B). 상기의 방법으로 만들어진 플라스미드를 각각 CysQ::hFTN-L, CysQ::IL-2, CysQ::ADI, CysQ::GAD448-585, CysQ::AID, CysQ::CUT, 그리고 CysQ::hG-CSF라고 명명하였다.

[0078] 또한, 기존에 효과적인 융합파트너라고 알려져 있는 말토오즈 결합 단백질(Maltose binding protein, 이하 'MBP') 및 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase, 이하 'GST')을 각각 7종류의 목적단백질의 아미노 말단에 융합파트너로 삽입한 뒤 MBP::hFTN-L, GST::hFTN-L, MBP::IL-2, GST::IL-2, MBP::ADI, GST::ADI, MBP::GAD448-585, GST::GAD448-585, MBP::AID, GST::AID, MBP::CUT, GST::CUT, MBP::hG-CSF 및 GST::hG-CSF를 제조하였다.

[0079] 4-3 : 6개의 히스티딘 및 단백질 절단효소 부위를 포함하는 정제용 발현 벡터

[0080] CysQ가 융합발현된 CUT, hG-CSF, hFTN-L을 정제하기 위해서, CysQ의 5'-말단에 6개의 히스티딘을 포함하며 CysQ 융합파트너와 목적단백질 사이에 엔테로카이네이즈(enterokinase)에 의해 인지되어 절단될 수 있는 시퀀스를 포함하는, 다음과 같은 정제용 발현벡터를 제작하였다.

[0081] CysQ의 5'-말단에 6개의 히스티딘(histidine, 이하 'His6')과 *NdeI*, 3'-말단에 *XhoI* 제한효소 인지부위를 포함하도록, 센스 프라이머(서열번호 31: cat atg cat atg cat cac cat cac cat cac tta gat caa gta tgc) 및 안티센스 프라이머(서열번호 2: ctc gag ata aat aga cac tct)를 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄ 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 증폭된 정제용 His6-CysQ을 코딩하는 *NdeI/XhoI* 단편을 잘라낸 후 목적 단백질(CUT, hG-CSF, hFTN-L)이 포함되어 있는 발현 벡터의 *NdeI/XhoI* 자리에 삽입하였고, 이를 H6::CysQ::CUT, H6::CysQ::hG-CSF 및 H6::CysQ::hFTN-L로 명명하였다.

[0082] 또한, 융합단백질(CysQ)로부터 목적단백질(hFTN-L, hG-CSF)을 분리해 내기 위하여 목적단백질의 5'-말단에 엔테로카이네이즈(enterokinase)에 의해 인지되어 절단될 수 있는 시퀀스와 *XhoI* 제한효소 인지부위, 3'-말단에 *HindIII* 제한효소 인지부위를 포함하도록, hFTN-L 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편의 센스 프라이머(서열번호 32: ctc gag gat gac gat gac aag agc tcc cag att cgt), 안티센스 프라이머(서열번호 26: aag ctt tta gtc gtg ctt gag agt) 및 hG-CSF 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편의 센스 프라이머(서열번호 33: ctc gag gac gat gac gat aaa acc ccc ctg ggc cct gcc), 안티센스 프라이머(서열번호 28: aag ctt tca tgg ctg tgc aag)를 50 pmol씩 포함한 DNA 중합효소반응 완충용액(0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM Tris-HCl(pH8.8); 2 mM MgSO₄ 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng을 넣은 다음 Taq DNA 중합효소를 이용하여 95℃/30초(변성), 52℃/30초(어닐링), 72℃/60초(신장)로 총 30회 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 증폭된 엔테로카이네이즈(enterokinase) 인지 시퀀스-목적단백질을 코딩하는 *XhoI/HindIII* 단편을 잘라낸 후 H6::CysQ 단백질이 포함되어 있는 발현 벡터의 *XhoI/HindIII* 자리에 삽입하였고, 이를 H6::CysQ::EK::hG-CSF 및 H6::CysQ::EK::hFTN-L로 명명하였다(도 1C).

[0083] 실시예 5 : 재조합 단백질의 수용성 발현

[0084] 실시예 4의 방법으로 제조한 목적단백질의 단독발현 벡터 및 융합파트너와의 융합발현 벡터를 대장균에 형질전환하여 배양한 뒤, IPTG로 재조합 단백질의 발현을 유도함으로써 본 발명의 융합파트너에 의한 수용성 발현의 효과를 확인하였다.

[0085] 5-1 : 단독발현 및 융합발현 목적단백질의 수용성 발현량 분석

[0086] 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, DNA Cloning vol.1 109-135, IRS press, 1985)에 의해 실시예 4의 벡터들을 대장균에 형질전환 하였다. 구체적으로 CaCl₂로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 실시예 4의 벡터들을 열충격 방법으로 형질전환시킨 후, 암피실린(ampicillin)이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 암피실린 저항성을 나타내는 콜로니를 선별하였다. 융합파트너와의 융합발현 벡터 pT7-CysQ로 형질전환된 대장균을 BL21(DE3):pT7-CysQ로 명명하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100 mg/ml 암피실린을 포함하는 LB 배지에 접종한 다음 37℃에서 130 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀이 0.5에 이르렀을 때 IPTG를 첨가(1 mM)하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건(37℃)으로 4시간 더 배양하거나, 20℃에서 130rpm으로 12시간 동안 배양하였다.

[0087] 상기 방법으로 배양한 대장균을 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 ml의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 균체 파쇄물을 분리하였다. 균체 파쇄물은 1% 트리톤 엑스 100 (Triton X-100)을 이용하여 2회 세척하였다. 분리된 상등액의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, USA)를 이용하여 측정하였다. 상등액과 균체 파쇄물을 각각 5 X SDS(0.156 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)과 1:4로 섞어 10% SDS-PAGE 겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 시료를 전개한 다음 겔을 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색하여 각각의 재조합 단백질의 발현량을 밀도계(Densitometer, Duoscan T1200, Bio-Rad, USA)로 확인하고, 수학적 식 1에 따라 용해도(%)를 계산하였다.

수학적 식 1

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

[0089] 그 결과, CysQ와 융합한 목적단백질의 발현이 대부분 불용성 응집체보다 수용성 발현에서 더 많은 것을 확인하였으며, 또한 단독 발현한 외래단백질의 수용성 발현량보다 CysQ와 융합한 외래단백질에서 용해도가 매우 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 단독발현 목적 단백질들과 CysQ를 융합발현 한 목적 단백질들의 수용성 발현 정도를 [표 4]에 도식화 하였다. 도 2와 표 4에서 확인할 수 있듯이 대부분의 목적 단백질의 수용성 발현량이 증가하였으며, 이러한 결과는 단백질체 분석을 통해서 확보한 CysQ가 융합파트너로서의 효과가 크다는 것을 의미한다.

표 4

[0090] 융합발현된 목적 단백질의 수용성 발현량

목적단백질 (M.W)	단독발현	CysQ 융합발현	GST 융합발현	MBP 융합발현	발현조건
CUT (27.5 kDa)	+	++	--	+	37℃
hG-CSF (18.6 kDa)	--	+	--	++	37℃

hFTN-L (19.8 kDa)	--	++	+	++	37℃
ADI (45.7 kDa)	-	++	--	+	37℃
IL2 (15.4 kDa)	-	++	-	++	37℃
AID (25.7 kDa)	+/-	+	+	+/-	20℃
GAD ₄₄₈₋₅₈₅ (16.2kDa)	--	++	-	++	20℃

[0091] (% 수용성 발현량, 20% 이하 : "--", 20-40% : "-", 40-60% : "+/-", 60-80% : "+", 80% 이상 : "++")

[0092] 또한, 기존에 효과적인 융합파트너라고 알려져 있는 말토오즈 결합 단백질 (Maltose binding protein, 이하 'MBP'), 글루타치온-S-전이효소(Glutathione-S-transferase, 이하 'GST')를 각각 7종류의 목적단백질의 아미노 말단에 융합파트너로 삽입한 뒤 (MBP::hFTN-L, GST::hFTN-L, MBP::IL-2, GST::IL-2, MBP::ADI, GST::ADI, MBP::GAD448-585, GST::GAD448-585, MBP::AID, GST::AID, MBP::CUT, GST::CUT, MBP::hG-CSF 및 GST::hG-CSF), 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질전환하여 동일한 방법으로 발현 양상을 확인한 결과, CysQ를 아미노 말단에 융합파트너로 사용한 것이 GST를 융합파트너로 사용한 것 보다 수용성 발현량의 증가 정도가 훨씬 더 뛰어나함을 확인할 수 있었으며, MBP를 융합파트너로 사용하는 경우보다는 뛰어나거나 비슷함을 확인할 수 있었다 (도 2 및 표 4).

[0093] 5-2 : CysQ 융합파트너에 의한 수용성 및 활성형 발현 유도

[0094] 앞서 언급한대로, 대장균 발현시스템 내에선, 전사와 전이가 거의 동시에 일어나며, 재조합 단백질의 과다 발현 시, 목적 단백질 또는 대장균 숙주세포 내 다른 단백질들의 접힘(folding) 중간체들 사이의 비특이적인 결합에 의해 인접한 하이드로포빅(hydrophobic) 폴리펩타이드 체인들은 응집체(inclusion body)로 알려진 불용성 응집체를 형성한다고 알려져 있다.

[0095] 이에, 카이트-두리틀 방법을 이용하여 CysQ가 하이드로포빅(hydrophobic) 아미노산의 무리(cluster)로 이루어져 있음을 확인하였다(도 3A).

[0096] 또한, 이러한 CysQ의 하이드로포빅(hydrophobic) 아미노산의 무리(cluster)는 새로운 단백질의 합성 시, 분자 샤페론 (molecular chaperones)이 결합할 수 있는 좋은 위치로 작용하여, 단백질의 수용성 발현과, 알맞은 3차원 접힘(folding)을 가능케 하는 것을 증명하기 위하여, CysQ 하이드로포빅(hydrophobic) 아미노산의 무리(cluster) 사이의 두 아미노산을 유전자 조작을 통하여 글루탐산(glutamic acid)로 변형시켜주었다.

[0097] 그 결과 CysQ와 융합발현 시 높은 수용성을 보이던, hG-CSF와 hFTN-L 모두의 경우에서 그 수용성 발현량이 급격히 떨어지는 것을 확인하였다 (도 3A, B).

[0098] 실시예 6 : 재조합 단백질의 고유의 구조 및 활성도 유지

[0099] 6-1 : CysQ 융합발현된 큐티네이즈의 활성도 측정

[0100] 융합발현파트너는 목적 단백질을 수용성의 형태로 발현시키는 것도 중요하지만 고유의 3차 구조를 갖도록 유도하여 기능성을 갖춘 활성형 형태로 발현시키는 것이 무엇보다 중요하다. 이를 확인하기 위해 융합파트너 CysQ와 목적단백질 CUT를 융합발현한 뒤 활성도를 측정하였다.

[0101] 미생물 유래의 CUT는 지방산(fatty acids)인 파라-나이트로페닐 뷰티레이트 (*p*-nitrophenyl butyrate, 이하 'PNB')의 파라-나이트로페닐 에스터 결합(*p*-nitrophenyl esters)에 대해서 선택적으로 가수분해 능력을 갖는다. 하지만 파라-나이트로페닐 파미테이트 (*p*-nitrophenyl phamitate, 이하 'PNP')와 같은 긴 체인 지방산의 결합은 분해하지 못한다 (Lin and Kolattukudy, *Eur J Biochem*, 1980). 이러한 기질 특이성을 이용하여 CysQ 융합발현된 큐티네이즈(이하 'CysQ::CUT') 가수분해 능력을 확인하기 위해서 다음과 같은 분석을 수행하였다.

[0102] 상기 CysQ::CUT 발현 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환한 후 37℃ 온도, LB 앵피실린 배양액에서 배양한 뒤 초음파 파쇄 방법으로 목적 단백질을 함유하는 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 CysQ::CUT 융합발현 단백질에 대해서 PNP와 PNB에 대한 기질 특이적 가수분해 능력을 검증하였다. 106.7 μ l의 포스페이트 버퍼 (phosphate buffer, 0.1 M, pH 8.0)와 13.3 μ l의 트리톤 엑스-100 (Triton X-100, 4 g/l) 혼합액에 80 μ l의 CysQ::CUT 상등액과 비교 실험으로 대장균 BL21 (DE3)의 상등액을 각각 첨가하고, 가수분해 반응은 66.7 μ l의 기질 (PNP; p-nitrophenyl palmitate 및 PNB; p-nitrophenyl butyrate)를 첨가함으로써 시작하였으며, 반응은 37℃ 에서 15 분간 진행하였다. 반응이 완료된 후 415 nm 파장에서 흡광도의 변화를 측정하였다 (Bio-Rad microplate reader, Tecanria).

[0103] 그 결과, 자연에 존재하는 미생물 CUT의 기질 특이성과 마찬가지로 PNB에 대해서는 가수분해 능력을 보이지만 PNP에 대해서는 분해 능력을 보이지 않았다 (도 4).

[0104] 6-2 : CysQ 융합발현을 통해 생산된 hG-CSF와 hFTN-L의 정제 및 분석

[0105] hG-CSF는 의학용으로 주로 사용됨에 따라 항원항체 반응을 피하기 위해 융합발현파트너는 hG-CSF로부터 분리되어야 한다. 또한, hG-CSF와 같은 단백질은 인체 내에서는 먼저 전구체로 만들어지며 이 전구체가 프로티아제에 의한 성숙과정을 거쳐 Thr-Pro-Leu의 N-말단 아미노산 서열을 가지는 hG-CSF로 만들어지지만, 대장균에서 발현시킬 경우 아미노 펩티다아제 효소역가에 따라 시작코돈(start codon)에 해당하는 메티오닌(methionine)이 N-말단에 존재하게 되어 경우에 따라 N-말단의 메티오닌이 제거되지 않은 단백질이 혼재하게 되는데 정제과정 중에 이의 제거가 매우 어렵고, 비활성의 불용성 단백질로 발현될 경우 활성을 가지는 수용성 형태로 만들어주는 과정을 거쳐야 하는데, 이때 수율이 떨어지는 단점이 있다.

[0106] 따라서, 본 발명에서는 엔테로카이네이즈(enterokinase)로 절단 되었을 때 천연형의 hG-CSF와 동일한 DNA를 가질 수 있게 만들어 줌으로서 이러한 단점을 극복할 수 있게 하였다. 상기 실시예 4를 통하여 구축한 발현 벡터 H6::CysQ::EK::hG-CSF 및 H6::CysQ::EK::hFTN-L으로 형질전환 된 대장균 BL21(DE3)를 이용하여 상기 실시예 5의 초음파 파쇄 단계까지 동일하게 시행하였다. CysQ의 N-말단 쪽에는 6개의 histidine이 위치하게 되고 histidin과 Ni⁺² 금속의 친화력을 이용한 크로마토그래피를 통해 정제가 가능하게 하였다. Ni-NTA Agarose bead(QIAGEN)를 사용하여 Ni⁺² 금속 친화 크로마토그래피를 수행하였으며, 이를 통해, CysQ::hG-CSF와 CysQ::hFTN-L 을 각각 성공적으로 정제할 수 있었다.

[0107] 정제과정은 세포를 파쇄한 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 분리된 상등액을 금속친화력을 이용한 정제를 위해서 Ni-NTA Agarose bead (QIAGEN) 500mL과 결합시켰다. Ni-NTA Agarose bead와 반응시키기 전에 결합 완충액 [binding buffer, pH 8.0, 50 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 300 mM 염화 나트륨 (NaCl), 10 mM 이미다졸(imidazole)]을 사용하여 세척하였다. His6-CysQ-Enterokinase site-목적단백질(hG-CSF, hFTN-L)가 포함되어 있는 상등액과 Ni-NTA Agarose bead의 결합은 4℃에서 진행하고 2시간 이상 충분히 결합시킨 후 8 mL의 세척 완충액 [washing buffer, pH 8.0, 50 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 300 mM 염화 나트륨 (NaCl), 50 mM 이미다졸(imidazole)]을 이용하여 두 번 세척하였다. 다음 단계로 PBS 완충용액 [PBS buffer, 137mM 염화 나트륨(NaCl), 2.7 mM 염화 칼륨(KCl), 10 mM 제1인산나트륨(Na₂HPO₄), 2 mM 제1인산칼륨(KH₂PO₄), pH 7.4]을 이용하여 한번 더 추가 세척하였다. Agarose bead에 붙어 있는 His6-CysQ-Enterokinase site-목적단백질(hG-CSF, hFTN-L)에 엔테로카이네이즈 용액[enterokinase 5 μ l, 10 X enterokinase buffer 50 μ l, PBS 445 μ l (Invitrogen)] 500 μ l을 첨가하여 22℃에서 12시간 반응시키고 elution fraction을 받아 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 수용성과 불용성 용액을 분리하였다. 분리한 샘플은 SDS-PAGE 분석을 통해 엔테로카이네이즈를 가하여 발현된 융합단백질(CysQ::hG-CSF)로부터 CysQ을 제거한 후에도 hG-CSF 또는 hFTN-L이 여전히 수용성 상태로 남아 있음을 확인하였고, 이렇게 정제된 hG-CSF는 mouse anti-human G-CSF monoclonal antibody (Clone 3D1, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA)를 사용하여 Western 분석을 통해 hG-CSF가 확실함을 확인하였다(도 5).

[0108] 6-3 : 원평광 이색성 분광(CD) 분석을 통한 단백질 2차 구조 확인

[0109] 융합발현파트너는 hG-CSF를 수용성의 형태로 발현시키는 것도 중요하지만 고유의 구조를 유지하도록 유도하여 발현시키는 것이 무엇보다 중요하기 때문에 이를 확인하기 위해 원평광 이색성 분광(CD) 분석으로 정제된 재조

합 hG-CSF와 천연의 hG-CSF의 단백질 2차 구조의 변형여부를 비교/분석하였다.

[0110] 실시예 6-2에서 정제된 재조합 hG-CSF에서 엔테로카이네이즈를 제거하기 위해, EK-AwayTM resin(Invitrogen, Germany, Cat. No. R180-01)를 사용하였으며, 엔테로카이네이즈가 99%이상 제거된 용액은 microcon YM-10 (Millipore, Ireland)으로 CD 분석을 위해 필요한 양 만큼 농축(0.4167 μ g/L)하여 분석을 위한 샘플을 준비하였다. 준비된 재조합 hG-CSF 샘플은 한국기초과학지원연구원(오창)에 의뢰하여 JASCO J-710 spectropolarimeter에 의해 원편광 이색성 분광(CD) 분석하였다. 상기 방법으로 정제된 재조합 hG-CSF와 천연의 hG-CSF[Grasim Prefilled- Syringe (Filgrastim), Kirin, Japan]]의 단백질 2차구조를 비교분석 결과 정제된 재조합 hG-CSF는 천연형 hG-CSF와 같은 단백질 2차구조를 가짐을 확인하였다 (도 5).

[0111] 6-4 : 투과전자 현미경 이미지 분석에 의한 hFTN-L 나노입자의 생성 확인

[0112] 인간 유래의 웨리틴 단백질(hFTN-L)은 철 저장 단백질로 인간 웨리틴은 중쇄(heavy chain, 21kDa) 및 경쇄(light chain, 19kDa)로 구성되어 있으며, 24개의 단량체가 자가조립 과정을 통해서 12 nm의 균일한 직경을 갖는 구형 입자를 형성한다고 알려져 있다. 본 실시예에서는 융합발현파트너를 제거한 이후에도 구형의 입자를 형성하는지와 수용성 정도를 확인하였다.

[0113] 엔테로카이네이즈를 가하여 발현된 융합단백질(CysQ::hFTN-L)로부터 CysQ을 제거하고 난 뒤 hFTN-L의 수용성 정도를 SDS-PAGE 겔을 통하여 확인하였으며(도 6A), 또한 이렇게 정제된 hFTN-L을 투과전자현미경 (transmission electron microscopy, TEM) 분석을 하였다.

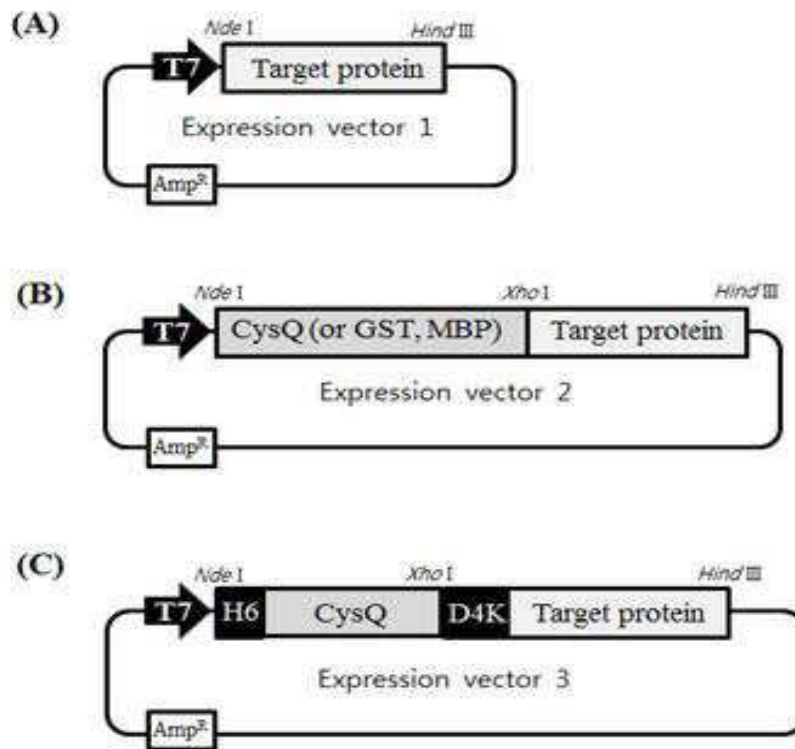
[0114] 투과전자현미경(transmission Electron Microscope, 이하 'TEM') 이미지 분석을 위해 상기 실시예 6-1에서 정제된 단백질 용액의 염색하지 않은 시료를 탄소 코팅 청동 전자 현미경 그리드(carbon-coated copper electron microscopy grid)에 공기 건조시킨 후 부착하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해 2% 수성 우라닐 아세테이트(aqueous uranyl acetate) 용액(Ted Pella, 미국)에서 실온에서 10분간 방치하고, 증류수로 3 내지 4회 세척한 후, 단백질 나노입자 이미지는 Philips Technai 120kV 전자 현미경을 사용하여 관찰 하였다.

[0115] 그 결과, 융합발현파트너(CysQ)가 제거 된 이후에도, hFTN-L은 직경 12 nm 가량의 구형의 나노입자를 형성함을 확인할 수 있었다 (도 6B).

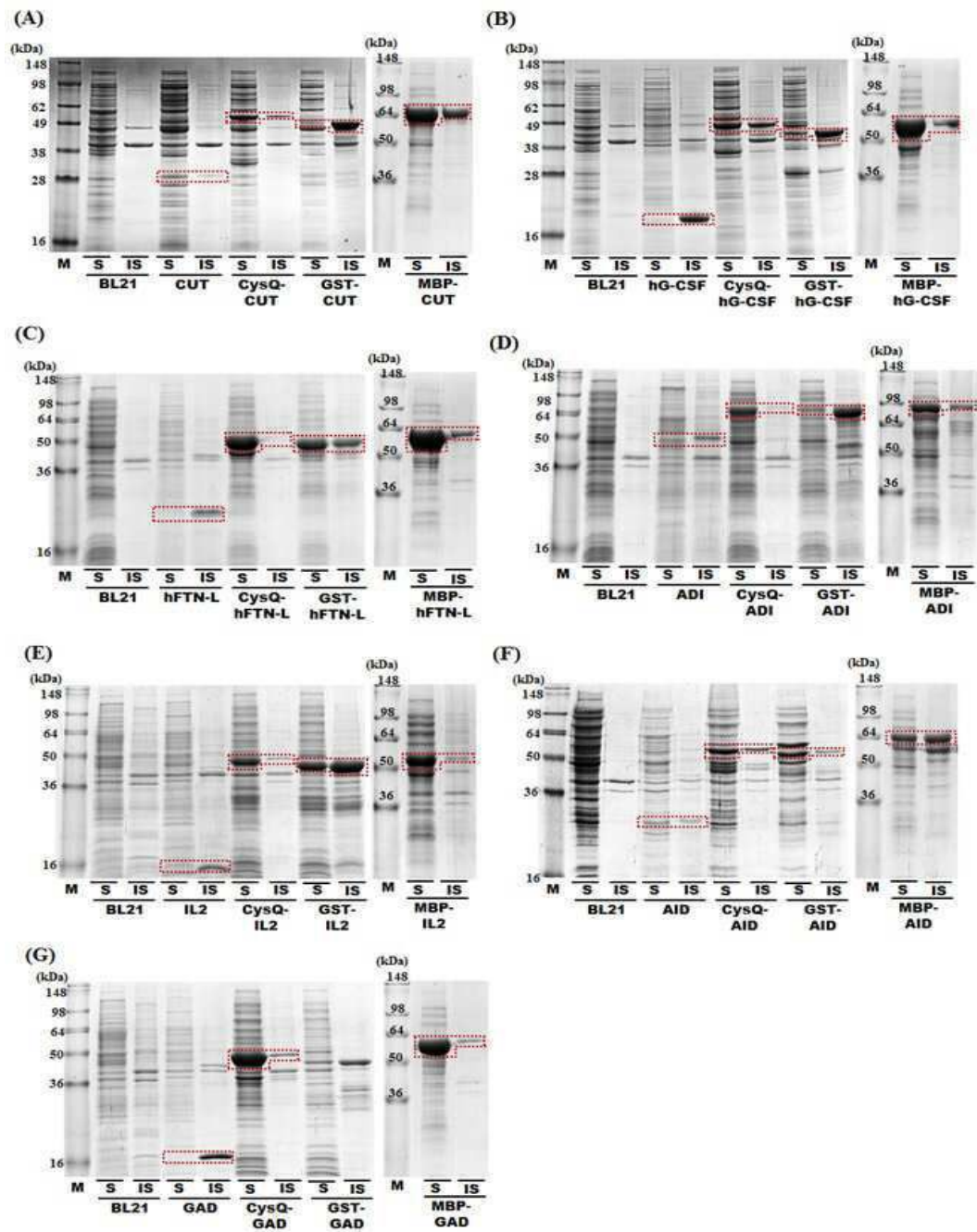
[0116] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

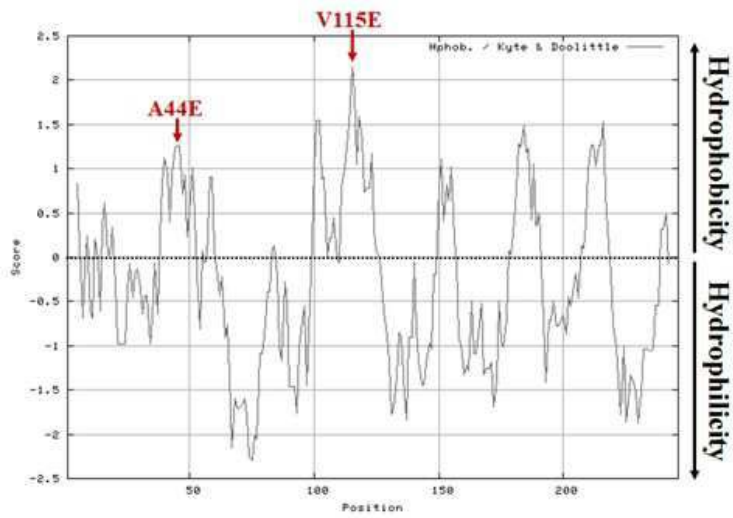


도면2

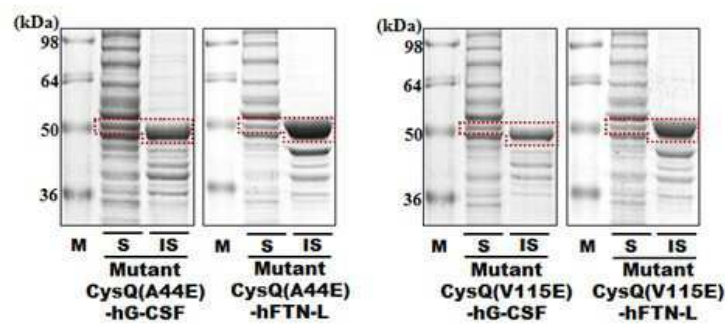


도면3

(A)

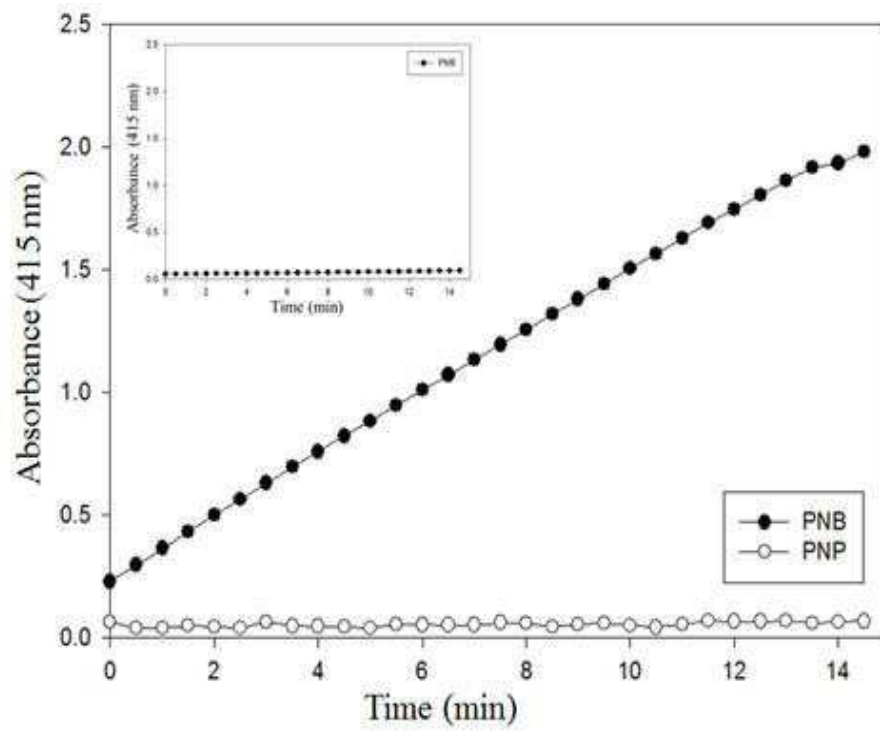


(B)

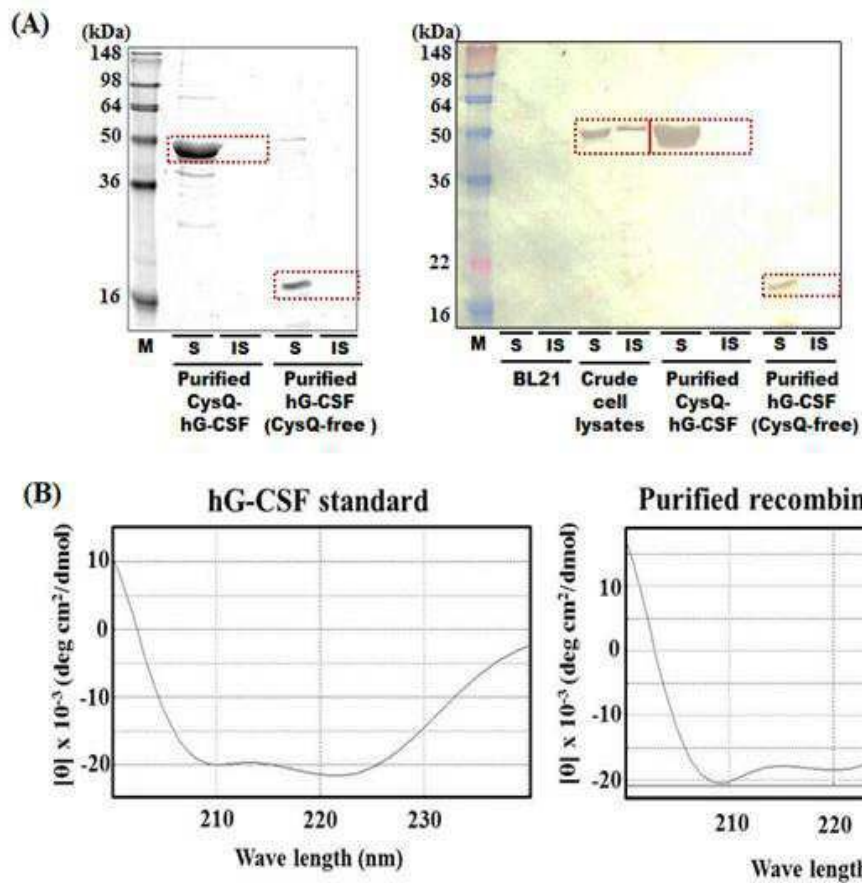


Target proteins	CysQ fusion expression	Mutant CysQ (A44E) fusion expression	Mutant CysQ (V115E) fusion expression
	Solubility (%)	Solubility (%)	Solubility (%)
hG-CSF	65	34	32
hFTN-L	99	20	18

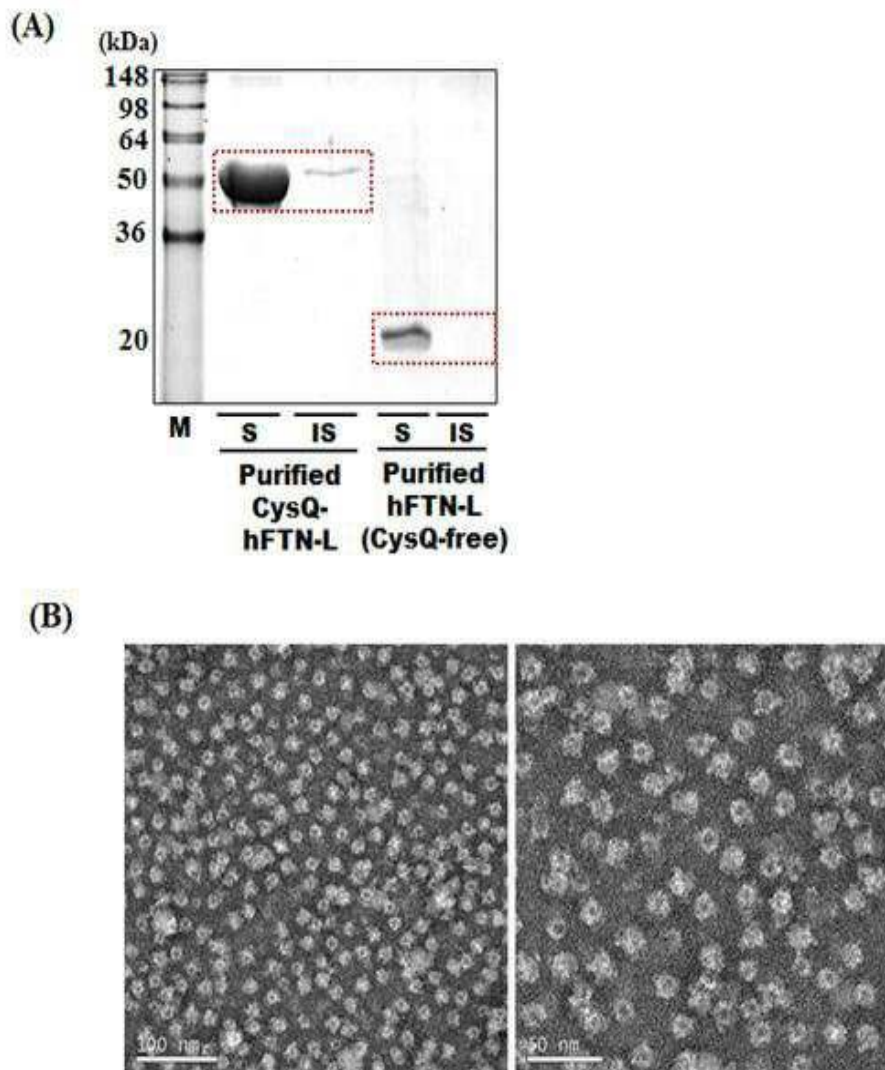
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Preparing Recombinant Protein Using CysQ as a Fusion Expression Partner
- <130> P15-B009
- <160> 41
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CysQ-S
- <400> 1

catatgttag atcaagtatg c	21
<210> 2	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CysQ-AS	
<400	
> 2	
ctcgagataa atagacactc t	21
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIL-2-S-NdeI	
<400> 3	
catatggcac ctacttcaag t	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hIL-2-AS-HindIII	
<400> 4	
aagcttttat caagtcagtg t	21
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AID-S-NdeI	
<400> 5	
catatggaca gcctcttgat gaac	24
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> AID-AS-HindIII

<400> 6

aagctttcat aacaaaagtc cca

23

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAD-S-NdeI

<400> 7

catatgcgcc acgttgatgt

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAD-AS-HindIII

<400> 8

atcgatttat aaatcttgtc c

21

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CUT-S-NdeI

<400> 9

catatggctc ccctgccgga tac

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CUT-AS-HindIII

<400> 10

aagcttttaa agcccgcggc gct

23

<210> 11

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hFTN-L-S-NdeI
 <400> 11
 catatgagct cccagattcg t 21
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hFTN-L-AS-HindIII
 <400> 12
 aagcttttag tcgtgcttga gagt 24
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hG-CSF-S-NdeI
 <400> 13

 catatgactc cactcggacc tg 22
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hG-CSF-AS-HindIII
 <400> 14
 aagctttcat ggctgtgcaa g 21
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADI-S-NdeI
 <400> 15
 catatgtctg tatttgacag t 21
 <210> 16

<211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> ADI-AS-HindIII
 <400> 16
 aagcttctat cacttaacat c 21
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIL-2-S-XhoI
 <400> 17
 ctcgaggcac ctacttcaag t 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIL-2-AS
 <400> 18
 aagcttttat caagtcagtg t 21

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AID-S-XhoI
 <400> 19
 ctcgaggaca gcctcttgat gaac 24
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AID-AS
 <400> 20

aagctttcat aacaaaagtc cca	23
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAD-S-XhoI	
<400> 21	
ctcgagcgcc acgttgatgt	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAD-AS	
<400> 22	
atcgatttat aaatcttgtc c	21
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CUT-S-XhoI	
<400> 23	
ctcgaggctc ccctgccgga tac	23
<210> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CUT-AS	
<400> 24	
aagcttttaa agccccgggc gct	23
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> hFTN-L-S-XhoI
 <400> 25
 ctcgagagct cccagattcg t 21
 <210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hFTN-L-AS
 <400> 26
 aagcttttag tcgtgcttga gagt 24
 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hG-CSF-S-XhoI
 <400> 27
 ctcgagaccc ccctgggccc tgcc 24
 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hG-CSF-AS
 <400> 28
 aagctttcat ggctgtgcaa g 21
 <210> 29
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADI-S-XhoI
 <400> 29
 ctcgaggatg acgatgacaa gtctgtattt ga 32
 <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ADI-AS	
<400>	30	
aagcttctat cacttaacat c		21
<210>	31	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CysQ-S-H6	
<400>	31	
catatgcata tgcataacca tcacatcac ttagatcaag tatgc		45
<210>	32	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hFTN-L-S-D4K	
<400>	32	
ctcgaggatg acgatgacaa gagctcccag attcgt		36
<210>	33	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hG-CSF-S-D4K	
<400>	33	
ctcgaggacg atgacgataa aacccccctg ggccctgcc		39
<210>	34	
<211>	738	
<212>	DNA	
<213>	CysQ	
<400>	34	
atgttagatc aagtatgcca gcttgacagg aatgcaggcg atgccattat gcaggcttac		60
gacgggacga aaccgatgga cgctgctcagc aaagcggaca attctccggt aacggcagcg		120
gatattgccg ctcacacctg tatcatggac ggtttacgta cgctgacacc ggatattccg		180

gtcctttctg aagaagatcc tcccggttgg gaagtccgtc agcactggca gcgttactgg 240
ctggttagacc cgctggatgg tactaaagag tttattaaac gtaatggcga attcaccgtt 300
aacattgcgc tcattgacca tggcaaaccg attttaggtg tgggtgatgc gccggtaatg 360

aacataatgt acagcgcggc agaaggcaag gcctggaaag aagagtgcgg tgtgcgcaag 420
cagattcagg tccgcgatgc gcgcccgcg ctggtggtta tcagccgttc ccatgcagat 480
gcggagctga aagagtaict gcaacagctt ggcgaaacatc agaccacgtc catcggtctt 540
tcgctgaaat tctgcctggt ggcggaaggg caggcgcagc tgtaccgcg cttcggacca 600
acgaatattt gggataccgc cgctggatcat gctgtggctg cagctgccgg agcgcacgtt 660
catgactggc agggtaaacc gctggattac actccgcgcg agtcgttctt gaatccggga 720
ttcagagtgt ctatttat 738

<210> 35
<211> 573
<212> DNA
<213> human IL-2
<400> 35

acctcaactc ctgccacaat gtacaggatg caactcctgt cttgcattgc actaagtctt 60
gcacttgtca caaacagtgc acctacttca agttctacaa agaaaacaca gctacaactg 120
gagcatttac tgctggattt acagatgatt ttgaatggaa ttaataatta caagaatccc 180
aaactcacca ggatgctcac atttaagttt tacatgccc aagaaggccac agaactgaaa 240
catcttcagt gtctagaaga agaactcaaa cctctggagg aagtgctaaa ttagctcaa 300
agcaaaaact ttcacttaag acccagggac ttaatcagca atatcaacgt aatagtcttg 360

gaactaaagg gatctgaaac aacattcatg tgtgaatatg ctgatgagac agcaaccatt 420
gtagaatttc tgaacagatg gattaccttt tgtcaaagca tcatttcaac actgacttga 480
taattaagtg cttcccactt aaaacatatc aggccttcta tttatttaaa tatttaaatt 540
ttatatattt tgttgaatgt atggtttgct acc 573

<210> 36
<211> 594
<212> DNA
<213> human AID
<400> 36

atggacagcc tcttgatgaa ccggaggaag tttctttacc aattcaaaaa tgtccgctgg 60

gctaagggtc ggcgtgagac ctacctgtgc tacgtagtga agaggcgtga cagtgtctaca 120

tccttttcac tggactttgg ttatcttcgc aataagaacg gctgccacgt ggaattgctc 180

ttctccgct acatctcgga ctgggacctc gacctggcc gctgctaccg cgtcacctgg 240

ttcacctcct ggagccctg ctacgactgt gcccgcacatg tggccgactt tctgcgaggg 300

aacccaacc tcagtctgag gatcttcacc gcgcgcctct acttctgtga ggaccgcaag 360

gctgagcccg aggggctcgc gcggctgcac cgcgccgggg tgcaaatagc catcatgacc 420

ttcaaagatt atttttactg ctggaatact tttgtagaaa accatgaaag aactttcaaa 480

gcctgggaag ggctgcatga aaattcagtt cgtctctcca gacagcttcg gcgcacctt 540

ttgccctgt atgaggttga tgacttacga gacgcatttc gtactttggg actt 594

<210> 37

<211> 948

<212> DNA

<213> human GAD

<400> 37

accgtggtgt tccagggggc ggcagggatt gggaaaacaa tcctggcccga gaagatgatg 60

ttggactggg cgtcggggac actctaccaa gacaggtttg actatctgtt ctatatccac 120

tgctgggagg tgagccttgt gacacagagg agcctggggg acctgatcat gagctgctgc 180

cccgacccaa acccaccat ccacaagatc gtgagaaaac cctccagaat cctcttctc 240

atggacggct tcgatgagct gcaaggtgcc ttgacgagc acataggacc gctctgcact 300

gactggcata aggccgagcg gggagacatt ctctgagca gccatcatcag aaagaagctg 360

cttcccagg cctctctgt catcaccacg agacctgtgg ccctggagaa actgcagcac 420

ttgtggacc atcctcgga tgtggagatc ctgggtttct ccgaggccaa aaggaaagag 480

tacttttca agtacttctc tgatgaggcc caagccaggg cagccttcag tctgattcag 540

gagaacgagg tctcttcac catgtgctt atccccctgg tctgttgat cgtgtgcact 600

ggactgaaac agcagatgga gactggcaag agccttgccc agacatcaa gaccaccacc 660

gcggtgtacg tcttcttct ttcagtttg ctgcagcccc ggggagggag ccaggagcac 720

ggcctctgcg ccacctctg ggggctctgc tctttgctg cagatggaat ctggaaccag 780

aaaatcctgt ttgaggagtc cgacctcagg aatcatggac tgcagaaggc ggatgtgtct 840

gctttctga ggatgaacct gttccaaaag gaagtggact gcgagaagtt ctacagcttc 900

atccacatga ctttcagga gttctttgcc gccatgtact acctgctg 948

<210> 38

<211>	780	
<212>	DNA	
<213>	Pseudomonas putida CUT	
<400>	38	
atggctcccc	tgccgatac accgggagcg ccatttcg	60
agtgccccct	acaccaccag cagccagagc gaggggccga	120
	gctgtcgcat ctatcgcccc	
cgcgacctgg	gtcagggggg cgtgcgtcat ccggtgattc	180
gccgggccgt	ccacctatgc cggcttgcta tcgcactggg	240
	caagccacgg ttctgtggtg	
gcggcggcgg	aaacctccaa tgccgtacc gggcgggaaa	300
ctggtacgtg	agaacgacac cccctacggc acctattccg	360
	gcaagctcaa taccgggcga	
gtcggcactt	ctgggcattc ccagggtggt ggcggtcga	420
	tcattggccgg gcagatacg	
aggggtcgta	ccacggcgcc gatccagccc tacacctcg	480
	gcctggggca cgacagcgcc	
tcgcagcggc	ggcagcaggg gccgatgttc ctgatgtccg	540
	gtggcggtga caccatcgcc	
tttccctacc	tcaacgtca gccggtctac cggcgtgcca	600
	atgtgccggt gttctggggc	
gaacggcggt	acgtcagcca cttcgagccg gtcggtagcg	660
	gtggggccta tcgcggcccc	
agcacggcat	ggttcgctt ccagctgatg gatgaccaag	720
	acgcccgcgc taccttctac	
ggcgcgagct	gcagtctgtg caccagcctg ctgtggtcgg	780
	tcgagcgccg cgggctttaa	
		780
<210>	39	
<211>	528	
<212>	DNA	
<213>	human hFTN-L	
<400>	39	
atgagctccc	agattcgta gaattattcc accgacgtgg	60
	aggcagccgt caacagcctg	
gtcaatttgt	acctgcaggc ctctacacc tacctctctc	120
	tgggtttcta ttctgaccgc	
gatgatgtgg	ctctggaagg cgtgagccac ttcttcgcg	180
	aattggccga ggagaagcgc	
gagggtacg	agcgtctcct gaagatgcaa aaccagcgtg	240
	gcggccgcgc tctcttcag	
gacatcaaga	agccagctga agatgagtgg ggtaaaaccc	300
	cagacgcat gaaagctgcc	
atggccctgg	agaaaaagct gaaccaggcc cttttggatc	360
	ttcatgccct gggttctgcc	
cgcacggacc	cccatctctg tgacttctcg gagactcact	420
	tcctagatga ggaagtgaag	
ctcatcaaga	agatgggtga ccacctgacc aacctccaca	480
	ggctgggtgg cccggaggct	

gggctgggcg agtatctctt cgaaaggctc actctcaagc acgactaa 528

<210> 40

<211> 522

<212> DNA

<213> human G-CSF

<400> 40

acccccctgg gccctgccag ctccctgccc cagagcttcc tgcicaagtg cttagagcaa 60

gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag 120

ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc 180

ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc 240

ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt 300

cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccacat ctggcagcag 360

atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg cagccccacc agggtgccat gccggccttc 420

gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg gtccctagtgt cctcccatct gcagagcttc 480

ctggagggtgt cgtaccgcgt tctacgccac cttgccccagc cc 522

<210> 41

<211> 1230

<212> DNA

<213> arginine deiminase

<400> 41

atgtctgtgt ttgatagcaa atttaaagga attcacgttt attcagaaat tggatgaatta 60

gaatcagttc tagttcacga accaggacgc gaaattgact atattacacc agctagacta 120

gatgaattat tattctcagc tatcttagaa agccatgatg ctagaaaaga acacaaacaa 180

ttcgtagcag aattaaaagc aaacgacatc aatgttgttg aattaattga tttagtgtct 240

gaaacatacg atttagcatc acaagaagct aaagataaat taatcgaaga attttttagaa 300

gactcagaac cagtcttctc agaagaacac aaagtagttg taaggaactt cttaaaagct 360

aaaaaaacat caagagaatt agtagaaatc atgatggcag ggatcacaaa atacgattta 420

ggtatcgaag cagatcacga attaatcgtt gacccaatgc caaacctata cttcacacgt 480

gacccatttg catcagtagg taatgggtgta acaatccact acatgcgtta caaagttaga 540

caacgtgaaa cattattctc aagatttgta ttctcaaac accctaaact aattaacacc 600

ccgtgggtact acgacccttc actaaaatta tcaatcgaag gtggagacgt atttatctac 660

aacaatgaca cattagtagt tgggtgttct gaaagaactg acttacaac agttacttta 720

ttagctaaaa gcattgttgc taataaagaa tgtgaattca aacgtattgt tgcaattaac	780
gttccgaaat ggaccaactt aatgcactta gacacctggc tgaccatggt agacaaggac	840
aaattcctat actcaccaat cgctaacgat gtattttaa tctgggatta tgacttagta	900
aacgggtggag cagaaccaca accagttgaa aacggattac ctctagaagg attattacaa	960
tcaatcatta acaaaaaacc agttctaatt cctatcgcag gtgaaggtgc ttcacaaatg	1020
gaaatcgaaa gagaaacaca cttcgatggt acaaactact tagcaattag accaggtgtt	1080
glaattgggt actcacgtaa cgaaaaaca aacgctgctc tagaagctgc aggcattaaa	1140
gttcttccat tccacggtaa ccaattatca ttaggtatgg gtaacgctcg ttgtatgtca	1200
atgcctttat cacgtaaaga tgttaagtgg	1230