

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 15/52	(45) 공고일자 1999년04월01일	(11) 등록번호 특0181179
(21) 출원번호 특1991-023053	(65) 공개번호 특1992-012442	(24) 등록일자 1998년12월05일
(22) 출원일자 1991년12월13일	(43) 공개일자 1992년07월27일	
(30) 우선권주장 7/627,539 1990년12월14일 미국(US)		
(73) 특허권자 미합중국 아리조나주 튜크슨시스위트 600 노오스 월모트 로오드 101 리차아드 지이 벅호울즈		게리 엠 먼싱거
(72) 발명자 미합중국 노오스캐로라이나주 27713 듀어햄시 베인브릿지드라이브 2804 차윤근, 차순영		
(74) 대리인 차윤근, 차순영		

심사관 : 김형준

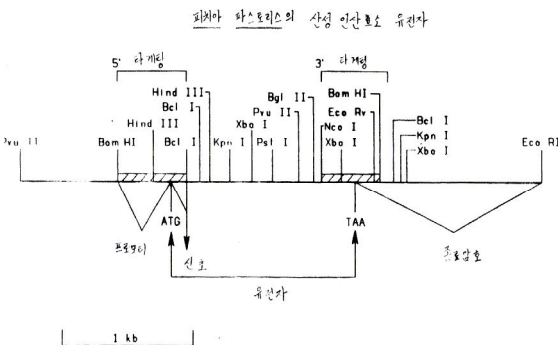
(54) 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자의 디앤에이 단편 및 이를 사용하는 방법

요약

본 발명은 5' 조절영역, 신호서열, 구조유전자, 및 3' 전사종료 서열을 포함하는, 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자를 개시한다. 또한 세포로부터 단백질의 분비 및 DNA의 전사조절을 포함하나 이에 제한되지 않는, 이들 단편을 사용하는 방법이 개시된다.

또한 산성 인산효소 유전자 또는 이의 단편을 함유하는 DNA 벡터 및 이들 벡터로 형질전환된 숙주가 개시된다. 또한, 피치아 파스토리스 PH01 좌에서 통합을 조작하는 통합성 벡터 및 이들 와해체를 확인하는 방법이 개시된다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자의 DNA 단편 및 이를 사용하는 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)의 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1)의 제한지도를 제공한다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 효모숙주시스템과 발현벡터를 이용하는 제조할 생물공학분야에 관한 것이다. 일면으로 본 발명은 효모 피치아 파스토리스의 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1)의 일부 또는 전부를 함유하는 신규의 DNA 단편에 관한 것이다.

다른 면으로 본 발명은 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1)로부터 유래된 DNA 단편을 함유하는 신규의 벡터에 관한 것이다. 그러나 다른 면에서 본 발명은 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1)로부터 유래된 단편을 함유하는 벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다.

다른 면으로 본 발명은 전술한 DNA 단편을 사용하여 효모에서 이중단백질의 발현 및/또는 분비를 용

이하에 하는 것에 관한 것이다.

재조합 DNA 생물공학이 최근에 발전함에 따라, 매우 여러 가지의 유용한 폴리펩티드를 미생물에 의해 조절하여 생산하는 것이 가능하게 되었다. 예컨대, 사람의 성장 호르몬, 백혈구의 인터페론, 사람의 인슐린, 및 사람의 프로인슐린 같은, 많은 폴리펩티드는 이미 여러 가지 미생물에 의해 생산되어 왔다. 이미 연구한 기술을 계속적으로 사용하여 여러 가지 다른 유용한 폴리펩티드 생성물을 생산하는 것이 가능하리라고 예상된다.

재조합 DNA 기술 분야에서 사용되는 기본적 기술은 당분야의 당업자에게 알려져 있다. 재조합 DNA 기술의 실시를 위해 바람직하게 제시되는 요소는, 하기(a - d)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

- (1) 하나 이상의 원하는 폴리펩티드를 암호하고, 숙주생물에서 유전자의 발현에 필요한 적당한 조절서열과 기능적으로 관련된 유전자 ;
- (2) 유전자가 삽입될 수 있는 벡터;
- (3) 유전자 보유 벡터가 형질전환될 수 있는 적당한 숙주생물;
- (4) 이종단백질의 분비가 바람직하면, 이종단백질을 숙주세포의 분비경로로 조작한 이후에 세포로부터 나올 수 있는 산호서열;
- (5) 형질전환 시스템 ; 및
- (6) 형질전환체를 선택하는 방법.

재조합 유전자 구조물은 재조합 단백질이 숙주의 분비경로를 통과하여 생육 배지로 분비되도록 고안될 수 있다. 분비는 수가지 이유로 재조합체 발현의 바람직한 방식이다. 첫째 몇몇 이종단백질은 숙주생물에 유독한 영향을 미친다. 상기 이종유전자 생성물이 숙주내에 축적되지 않고 분비될 때, 이들은 정상적인 세포기능을 덜 방해할 것이다. 둘째 세포내에서 생산될 때 불활성인 몇몇 단백질은 분비될 때 활성이 있다. 셋째 배지로의 분비는 생성물을 회수하기 위하여 숙주세포를 파괴시킬 필요가 없다. 생성물 정제는, 생성물이 생육배지에 존재할 때 훨씬 쉽고 비용 효과적이다. 그리고, 넷째로, 재조합 생성물은 영양배지에 존재하므로, 바람직한 생성물을 계속적으로 제거할 수 있고 배지는 재순환될 수 있다.

대부분의 분비된 단백질은 처음에 신호펩티드라 불리는 부가된 아미노말단 연장물을 함유하는 전구체 또는 전구단백질(pre-protein) 형태로 세포내로 발현된다. 신호펩티드는 부가된 폴리펩티드를 경계의 세포막내로 및/또는 세포막을 통과해 운반하는데 중요한 역할을 한다. 그런 다음 신호펩티드는 분비동안 또는 분비후에 신호펩티다제에 의해 단백질 분해로 절개되어 성숙한 단백질 생성물을 제공한다.

이중 또는 이질 단백질의 분비는 이중 DNA의 암호서열을 신호펩티드 암호 DNA에 연결시켜 수행할 수 있다. 분비를 용이하게 할, 이 신호펩티드를 암호하는 신호서열을 분리하는 것이 바람직할 것이다.

신호서열은 발현벡터의 생성에서 특히 유용하다. 상기 벡터의 사용은 적합한 숙주세포를 형질전환하여 숙주세포가 이종유전자 생성물을 생산하고 분비할 수 있게 한다. 재조합 단백질을 효모숙주로부터 성공적으로 분비시키기 위해 사용된 선두(leader) 서열의 예는 사카로미세스 세레비시아(Saccharomyces Cerevisiae)알파 교배인자, a 교배인자, 및 킬러(killer)독소 유전자로부터의 선두서열을 포함한다. 피치아 파스토리스 같은 메틸로트로픽(methylotrophic) 효모로부터 신호서열의 분비는 기재되지 않았다.

편리하게는, 이종유전자 생성물의 발현을 조절하기 위해 상기 벡터에서 사용되는 프로모터는 신호서열과 본래부터 관련된 프로모터일 수 있다. 신호서열과 본래부터 관련된 프로모터가 높은 수준의 DNA 전사를 제공하고 외인성 환경자극에 반응하면 특히 유익할 것이다. 상기 프로모터의 예는 피치아 파스토리스 산성 인산효소(PH01) 유전자의 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)으로서, 배지내의 인산염 부재에 반응하여 고도로 전사되고, 배지내 인산염 존재에 의해서는 억제된다.

피치아 파스토리스 게놈내의 정확한 위치에 통합될 재조합 DNA 구조물로 피치아 파스토리스 숙주를 형질전환하는 것이 종종 바람직하다. 피치아 파스토리스 PH 01 유전자 측면에 있으며, 각각 제1 및 제2의 삽입성 DNA 단편으로서 알려진 5' 과 3' 서열은 PH01 좌에서 재조합 서열의 통합을 조작하기 위한 발현벡터에서 사용된다. PH01 좌에서 재조합 DNA를 통합시키는 능력은 적어도 2가지 이유로 유익하다 : 1) PH01 좌 또는 다른 피치아 좌에서 다수 복사물의 동일 또는 상이한 발현 카셋트를 갖는 피치아 파스토리스 발현균주의 개발에서, 또는 2) 메탄을 대사경로의 필수유전자 또는 유전자의 와해가 바람직하지 않은 숙주 피치아 파스토리스에서, PH01 좌에서만 하나 이상의 발현 카셋트의 안정한 통합.

PH01 유전자가 와해된 세포는 산성 인산효소의 효소활성의 수반되는 손실을 나타낸다. PH01 유전자 와해의 표시인 Pho 표현형은, 저농도의 인산염 지시 평판 상에서 세포를 배양하고 집락을 하룻밤 동안 증식시킴으로써 선별할 수 있다.

본래의 PH01 유전자를 갖는 집락은 녹색인 반면, PH01 유전자가 와해된 집락은 백색이다. 이 측색법 선별은 PH01 좌에서 발현 카셋트를 용게 통합시켜 PH01 좌를 와해시킨 세포를 검출하기 위한 빠르고 쉬운 방법을 제공한다.

따라서, 숙주세포로부터 단백질 분비를 용이하게 하는 신호서열을 분리하는 것은 당분야에 상당한 기여를 할 것이다.

부가적으로, 고도의 DNA 전사를 제공하고 외인성 환경 자극에 반응할 5' 조절영역을 분리하는 것이 유익할 것이다. 현재 배지내 인산염의 부재에 반응하여 고도로 전사되며 높은 생산성의 발효효모 피치아 파스토리스에서 사용될 수 있는 5' 조절영역은 당분야에서 알려져 있지 않다.

또한 산성 인산효소(AP)의 구조 유전자를 분리하는 것이 유익할 것이다.

또한 산성 인산효소 유전자의 단편을 포함하는 신규의 벡터를 제공하는 것이 유익할 것이다.

또한 3' 전사 종료서열을 분리하는 것이 유익할 것이다.

또한 피치아 파스토리스 PH01 좌에서 통합을 조작할 통합성 벡터를 제공하는 것이 유익할 것이다.

또한 와해체를 확인하는 방법을 제공하는 것이 유익할 것이다.

따라서, 본 발명의 일면에서는 세포로부터 단백질의 분비를 용이하게 하는 신호서열을 제공한다.

부가적인 면은 인산염의 부재에 반응하여 전사되는 5' 조절영역이다.

본 발명의 다른 면은 피치아 파스토리스 산성 인산효소 구조 유전자(SEQ ID NO : 4)의 DNA 서열이다.

본 발명의 부가적인 면은 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호하는 이중 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 조절영역 및/또는, 신호서열을 포함하는 신규의 벡터, 및 상기 이중 DNA 서열의 발현을 용이하게 하는 상기 조절영역을 유발하는 수단에 있다.

다른 면은 산성 인산효소 유전자로부터의 3' 전사 종료서열, 피치아 파스토리스 PH01 좌에서의 통합을 조작할 통합성 벡터 및 와해체를 확인하는 방법을 포함한다.

본 발명의 다른 면, 목적, 및 잇점은 하기 명세서, 실시예, 및 청구범위로부터 명백해 질 것이다.

본 발명에 따라서, 세포에서 단백질 분비를 용이하게 하는 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자로부터의 신호서열(SEQ ID NO : 3)을 포함하는 신규의 DNA 단편이 제공된다.

본 발명의 부가적인 면은 피치아 파스토리스 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)을 포함하는 신규의 DNA 단편을 제공한다.

본 발명의 또 다른 면으로 피치아 파스토리스 산성 인산효소(AP) 구조 유전자(SEQ ID NO : 4)의 DNA 서열을 포함하는 신규의 DNA 단편이 제공된다.

본 발명의 또 다른 면은 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호하는 이중 DNA 서열에 실시가능하게 연결된 조절영역 및/또는 신호서열을 포함하는 신규의 벡터, 및 상기 이중 DNA 서열의 발현을 용이하게 하는 상기 조절영역을 유발하는 수단을 제공한다.

본 발명의 다른 면으로 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자로부터의 3' 전사종료서열(SEQ ID NO : 5)을 포함하는 신규의 DNA 벡터가 제공된다.

본 발명의 다른 면은 피치아 파스토리스 PH01 좌에서의 벡터 통합을 조작하는 통합성 벡터를 제공한다.

본 발명의 또 다른 면은 와해체를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명은 피치아 파스토리스(SEQ ID NO : 1)로부터 유래되는, 프로모터(또는 5' 조절영역), 신호서열, 전사종료서열, 및 측면서열을 포함하는 산성 인산효소 유전자를 포함하는 신규의 분리된 DNA 단편을 제공한다.

산성 인산효소(AP)는 무기 인산염 결핍 조건하에서 피치아 파스토리스 및 다른 효모에 의해 분비되는 세포의 효소이다. 분비된 산성 인산효소는 유기 기질로부터 인산염의 제거를 촉매하여, 세포 증식 및 생존을 위해 인산염을 이용한다.

산성 인산효소를 암호하는 유전자를 수개의 효모종에서 분리하고 연구하고, 산성 인산효소 유전자의 발현을 조절할 수 있는 성질은 산성 인산효소 프로모터 요소에 배치되었다. 무기 인산염의 낮은 배지는 농도 조건에서, 산성 인산효소 프로모터(또는 5' 조절영역)는 작동개시되어, 산성 인산효소 유전자가 전사된 후에 산성 인산효소로 번역된다. 새롭게 한정된 산성 인산효소는 유기 기질로부터 인산염을 방출하고 세포에 이용 가능한 인산염을 제공한다. 인산염 농도에서 후속 증가는 산성 인산효소 프로모터를 조절하여, 산성 인산효소 단백질에 대한 감소된 요구와 동반하는 감소된 산성 인산효소 유전자 전사를 초래한다. 따라서, 산성 인산효소 프로모터는 각각, 낮은 또는 높은 인산염 농도에 의해 유발 또는 억제될 수 있다. 피치아 파스토리스 산성 인산효소 프로모터의 확인 및 분리는 중요하다. 산성 인산효소의 발현 조절은 이 발현이 조사되는 효모종에 따라 변하기 때문에, 피치아 파스토리스에서 산성 인산효소 발현에 관해 관찰된 치밀한 조절은 상동 프로모터 서열의 유효성 및 사용에 달려 있음이 예측된다.

피치아 파스토리스 PH01 유전자의 신호서열(SEQ ID NO : 3)의 확인 및 분리는, 그것이 피치아 파스토리스 유전자로부터 분리된 첫번째 신호서열일 뿐 아니라, 메틸로트로픽 효모로부터 분리한 첫번째 신호서열을 나타낸다는 점에서 중요하다. 피치아 파스토리스로부터 이중 단백질, 예컨대 tPA 또는 전화효소(invertase)의 분비를 조작함에 있어서, 본래의 유전자 신호서열과 동일하거나 보다 우수한 것, 예컨대 tPA (조직의 플라시미노겐 활성화제) 또는 전화효소 유전자로부터의 신호서열을 발견하였다.

제조할 발현벡터를 독립적 복제요소로서 유지하는 대신에 숙주 게놈내로 통합시키는 것이 종종 바람직하다. 통합된 벡터는 독립 벡터보다 상당히 안정하고, 본 발명의 실행에 적절하다. 특히, 미합중국 특허 4,882,279호에 기재된 바와 같은 선형 부위 - 특이성 통합 벡터가 적절하다. 상기 벡터는 적어도 1) 제1삽입성 DNA 단편; 2) 선택성 표식 - 유전자; 및 3) 제2삽입성 DNA 단편을 연속적으로 배열한 서열을 포함한다.

제1 및 제2삽입성 DNA 단편은 각각 적어도 약 200뉴클레오타이드 길이이고 형질전환될 종의 게놈 DNA의 일부와 상동인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 통합성 벡터의 여러 가지 성분은 연속적으로 배열되어 DNA

성형 단편을 형성하여 발현 카세트와 선택성 표식 유전자는 제1삽입성 DNA 단편의 3' 말단과 제2 삽입성 DNA 단편의 5' 말단 사이에 위치하도록 한다. 제1 및 제2삽입성 DNA 단편은 양친(parent) 계통에서 배향된 것처럼 서로에 관하여 연속적으로 배열된 선택성단편으로 배향된다.

제1 및 제2삽입성 DNA 단편으로서 유용한 뉴클레오티드 서열은 계통 변이가 일어날 본래의 계통 부위의 별개 부분과 상동인 뉴클레오티드 서열들이다. 따라서, 예컨대, 계통 변이가 산성 인산효소 유전자의 좌에서 발생되어야 하면, 사용되는 제1 및 제2삽입성 DNA 단편은 산성 인산효소 유전자 좌의 별개 부위에 상동인 서열이어야 한다. 계통 변이가 일어나기 위해서, 2개의 삽입성 DNA 단편은 양친 계통에서 존재할 때와 동일한 상대적 배향으로 선택성 단편에서 서로에 관해 배향되어야 한다. 제1 및 제2삽입성 DNA 단편으로서 사용될 수 있는 뉴클레오티드 서열의 예는 산성 인산효소 PH01 유전자, 알코올 옥시다제 AOX1 유전자, 히스티딘올 탈수소 효소 HIS4 유전자, 및 디히드록시아세톤 합성효소 DHAS 유전자로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열이다. 제1삽입성 DNA 단편은 발현 카세트에서 사용된 조절영역을 포함할 수 있는 작동 가능한 조절영역을 함유할 수 있다. 발현 카세트를 위한 조절영역으로서 제1삽입성 DNA 단편의 사용은 본 발명의 적절한 구체예이다. 임의로, 삽입 부위 또는 부위들과 3' 종료서열은 제1삽입성 DNA 단편의 3'에 곧 이어서 배치될 수 있다. 이 선택성 부위 - 특이성 통합 벡터의 형태는 적합한 3' 종료서열의 첨가를 필요로 함이 없이 구조 유전자의 삽입을 위해 준비된 부위를 제공하는 부가적 잇점을 갖는다.

또한 숙주 균주를 형질전환하기 위해 사용되는 DNA에 적어도 하나의 선택성 표식 유전자를 포함하는 것이 필요하다. 이것은 형질전환하는 DNA를 통합시킨 생물의 선택 및 분리를 용이하게 한다. 표식 유전자는 숙주가 갖지 않는 표현 형질, 예컨대, 형질전환 안 된 숙주가 특정한 아미노산 생합성 경로에서 결손을 갖는 특정한 아미노산을 생산하는 능력의 수복 또는 항생 물질에 대한 내성 등을 형질전환된 생물에 수여한다. 예시적인 선택성 표식 유전자는 피치아 파스토리스와 사카로미세스 세레비시야로부터의 HIS4 유전자 및 ARG4 유전자, 사카로미세스 세레비시야로부터 전환효소 유전자(SUG2), 및 이.콜리의 전치성요소 Tn601 또는 Tn903으로부터의 G418R 가나마이신 내성 유전자로 구성되는 군으로부터 선택할 수 있다.

제1삽입성 DNA 단편이 조절영역을 함유하지 않으면, 적당한 조절영역은 작동 가능한 발현 카세트를 제공하기 위해서, 구조 유전자에 작동 가능하게 삽입 연결될 필요가 있을 것이다. 유사하게, 3' 종료서열이 발현 카세트를 완성하기 위해 삽입 부위에서 제공되지 않으면, 3' 종료서열은 삽입될 구조 유전자에 작동 가능하게 연결되어야 할 것이다.

통합은 숙주세포에 해로운 영향을 미치지 않을 계통 내 위치에서 일어나는 것이 중요하다. 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자좌(PH01)에서 제조할 발현 구조물의 통합은 피치아 숙주에 해롭지 않고 제조할 서열의 안정한 통합을 하게 하는 것은 놀라운 발견이었다. PH01 좌에서 조작된 통합은 제조할 발현 벡터내에, 피치아 파스토리스 PH01 유전자 측면에 있는 5' 과 3' 서열(또한 제1 및 제2삽입성 DNA 단편이라 칭함)의 사용에 의해서 수행된다.

부가적인 발견은 PH01 좌를 와해시켜 발현벡터 서열을 통합시킨 것을 확인하기 위해 형질전환된 세포를 선별하는 방법이었다. PH01 유전자가 와해된 세포는 동반되는 산성 인산효소 효소활성의 손실을 나타낸다. PH01 와해를 표시하는 Pho⁻ 표현형은 세포를 저농도 인산염 지시 평판상에서 배양하고 집락을 하룻밤 증식시킴으로써 선별할 수 있다. 본래의 PH01 유전자를 갖는 집락은 녹색인 반면, PH01 유전자가 와해된 집락은 백색이다. 이 측색법 선별은 PH01 좌에서 옳게 통합된 발현 카세트를 갖는 세포를 검출하기 위한 빠르고 쉬운 방법을 제공한다.

피치아 파스토리스의 산성 인산효소 유전자(SEQ IN NO : 1)의 부분적인 제한지도는 제1도에 나타낸다. 이 유전자는 표 1에 제공된 뉴클레오티드 서열에 의해 부가적으로 특성 결정한다.

또한 피치아 파스토리스 산성 인산효소의 5' 조절영역 SEQ ID NO : 2), 신호서열(SEQ IN NO : 3), 구조 유전자(SEQ IN NO : 4) 및 3' 전사 종료서열 SEQ IN NO : 5)을 포함하는 신규의 DNA 단편이 본 발명에 의해 제공된다.

하기 표는 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1)의 서열 및 그의 단편을 나타낸다.

[표 1a]

산성 인산호소 유전자

SEQ ID NO:1:

BamHI -390 -370 -350
 GGATCCCTATTGTTACTTTTGCTTAACATTCCAATATCTTCAACGGTTAATTGATTAAC

 -330 -310 -290
 ACTGTAACCTCTGCCCATGTGCTTCATCCAATCTGGTAATCTGCTTCTATTCTGGCA

 -270 -250 -230
 AAATAGTTAATCTATGAGACATGTGCCCTCAATTGCGCAGTAGATCGAGTGGAACTTTC

 -210 -190 -170
 TTTGCGTAACACTCAAAGTATATCCCTGTAGTCTTTATTACCTGTGTGCTGATTGGTG

 -150 -130 -110
 TCAGTTACCATTATTGTTCCACTGGAAAAGCTTGTTTTTTTTGTAGCAGACAGAAACG

 -90 -70 -50
 TGGGCTCCGATAAGCTAAACTCAACGAGAATATAAAAGCTGAAAAGATTCTTGTCAAGA

 -30 -10 10
 ACTTGTACAACGACCAATAAGTCTTCAAGGCATCAGACATGTTTTCTCTATTCTAAGT
 MetPheSerProIleLeuSer

[표 1b]

210 230 250
 TCTGAAATGAATCCTGTACGATTGATCAGGCTCATCTGTTGATGAGACATGGAGAAAGA
 SerGluIleGluSerCysThrIleAspGlnAlaHisLeuLeuMetArgHisGlyGluArg

 270 290 310
 TACCCAAGTACCAATGTGGGAAACAAGCTTTGTACCAGAACTACTAGATGCT
 TyrProSerThrAsnValGlyLysGlnLeuGluAlaLeuTyrGlnLysLeuLeuAspAla

 330 350 370
 GATGTGGAAGTCCCTACAGACCATTGCTTTTCAAGACTATGATTACTTCGTCTCT
 AspValGluValProThrGlyProLeuSerPhePheGlnAspTyrAspTyrPheValSer

 390 410 430
 GACGCGCTTGGTACGAGCAAGAAACAAGGTTTCTACTCGGGTTAAACACCGCT
 AspAlaAlaTrpTyrGluGlnGluThrThrLysGlyPheTyrSerGlyLeuAsnThrAla

 450 470 490
 TTCGATTTGGTACCACCTTTGAGAGAACGATATGAACATTGATAAACAATAGCGAAGAA
 PheAspPheGlyThrThrLeuArgGluArgTyrGluHisLeuIleAsnAsnSerGluGlu

 510 530 550
 GGAAGAAACTTTCTGTTTGGCTGGCTCTCAAGAAAGAGTTGTGACAACGCAAGTAC
 GlyLysLysLeuSerValTrpAlaGlySerGlnGluArgValValAspAsnAlaLysTyr

 570 590 610
 TTTGCTCAAGGATTTATGAAATCTAAGTACACCGTTATGGTCGAAGTCGTTCCTCTAGAA
 PheAlaGlnGlyPheMetLysSerAsnTyrThrValMetValGluValValAlaLeuGlu

 630 650 670
 GAGGAGAAATCCCAGGACTCAACTCTTAACGGCTCGAATTTTCATGTCCAACTATAAC
 GluGluLysSerGlnGlyLeuAsnSerLeuThrAlaArgIleSerCysProAsnTyrAsn

 690 710 730
 AGCCATATCTACAAGATGGCGACTTGGGAATGACATTGCTCAAAGAGAAGCTGACAGA
 SerHisIleTyrLysAspGlyAspLeuGlyAsnAspIleAlaGlnArgGluAlaAspArg

 750 770 790
 TTGAACACTCTTTCTCCAGGATTTAACAATTACTGCAGATGATATCCAAACAATTGCCCTA
 LeuAsnThrLeuSerProGlyPheAsnIleThrAlaAspAspIleProThrIleAlaLeu

 810 830 850
 TACTGTGGCTTTGAACTAAATGTAAGAGTGAGTCATCCTTCTGTGACGCTTTGTCAAGA
 TyrCysGlyPheGluLeuAsnValArgGlyGluSerSerPheCysAspValLeuSerArg

 870 890 910
 GAGGCTCTACTGTACACTGCTTATCTTAGAGATTTGGGATGGTATTACAATGTTGGAAC
 GluAlaLeuLeuTyrThrAlaTyrLeuArgAspLeuGlyTrpTyrTyrAsnValGlyAsn

[표 1c]

930 950 970
 GGGAACCCACTGGAAAGACAATCGGCTACGTCTATGCCAACGCCACAAGACAGCTGTTG
 GlyAsnProLeuGlyLysThrIleGlyTyrValTyrAlaAsnAlaThrArgGlnLeuLeu

990 1010 1030
 GAAAACACAGAAAGCTGATCCTAGAGATTATCCTTTGTACTTTTCCTTTAGTCATGATACC
 GluAsnThrGluAlaAspProArgAspTyrProLeuTyrPheSerPheSerHisAspThr

1050 1070 1090
 GATCTGCTTCAAGTATCACTTCACTCGGCTTTTCAACGTGACAGATCTGCCATTAGAC
 AspLeuLeuGlnValPheThrSerLeuGlyLeuPheAsnValThrAspLeuProLeuAsp

1110 1130 NcoI
 CAGATTCAATTCCAGACCTCTTTCAAATCTACCGAAATAGTTCCCATGGGAGCAAGATTG
 GlnIleGlnPheGlnThrSerPheLysSerThrGluIleValProMetGlyAlaArgLeu

1170 1190 1210
 CTTACCGAGAGATTATTGTACTGTTGAAGGTGAAGAAAAATACTACGTTAGAAGTATC
 LeuThrGluArgLeuLeuCysThrValGluGlyGluGluLysTyrTyrValArgThrIle

1230 1250 1270
 CTCAAGGATGCAGTCTTCCCACTGAGTCACTGTTCTCTGCGCCCTGGATTCTTGTGCG
 LeuAsnAspAlaValPheProLeuSerAspCysSerSerGlyProGlyPheSerCysPro

1290 1310 1330
 TTGAACGATTATGTTTCTAGACTTGAGGCAATTGAACGAGGACAGTGACTTTCGGAAAAAC
 LeuAsnAspTyrValSerArgLeuGluAlaLeuAsnGluAspSerAspPheAlaGluAsn

1350 1370 1390
 TGTGGAGTTCTAAAAATGCTTCTTACCCACTTGAACATATCATTCTTGGGATGACTTG
 CysGlyValProLysAsnAlaSerTyrProLeuGluLeuSerPhePheTrpAspAspLeu

1410 1430 1450
 TCATAAAAATGGTAAGGAATGTTTTGCATCAGATACGAGTTCAAAACGATTAGAAGAGA
 SerEnd

1470 1490 1510
 ATGCTCTTTTTTTTGTCTATCCAATTGGACTATTTTTCGTTTATTTAAATAGCGTACA

1530 1550 1570
 ACTTTAACTAGATGATATCTTCTTCTCAAACGATACCACTTCTCTCATACTAGGTGGAG

BamHI
 GTTCAATGGATCC

[표 2]

5' 조절영역

SEQ ID NO:2:

BamHI -390 -370 -350
 GGAATCCCTATTGTTACTTTTGGCTTAACATTCCAATATCTTCAACGGTTAATGATTAAC

-330 -310 -290
 ACTGTAACTCTGCCCATGTGCTTCAATCGGTAATCTGCTTCTATTCTGCCA

-270 -250 -230
 AAATAGTTAATCTATGAGACATGTGCCCTCAATTCGCGCAGTAGATCGAGTGGAAAGTCTTC

-210 -190 -170
 TTTGCGTAACACTCAAAGTATATCCCTGTAGTCTTTATTACCTGTTGCTGCATTGGTG

-150 -130 -110
 TCAGTTACCATTATTGTTCCACTTGGAAAAGCTTGTTTTTTTTGTATAGCACAGAAACG

-90 -70 -50
 TGGGCTCCGATAAGCTAACTCAACGAGAATATAAAGCTGAAAAGATTCTGTCAAGA

-30 -10
 ACTTGTACAACGACCAATAAGTCTTTCAAGGCATCAGAC

[표 3]

신호서열

SEQ ID NO:3:

10
 ATGTTTCTCCTATTCTAAGT
 PH01 신호서열 --> MetPheSerProIleLeuSer

30 50
 CTGGAATTATTCTCGCTTTGGCTACTTCCAATCAGTCTTTGCG
 LeuGluIleIleLeuAlaLeuAlaThrLeuGlnSerValPheAla

[표 4a]

산성 인산효소

구조 유전자

SEQ ID NO:4:

70
GTTGAGTTGCAGCAC
ValGluLeuGlnHis

90 110 BclI 130
GTTCTTGGAGTCAACGACAGACCCTATCCTCAGAGGACAGATGATCAGTACAACATTCTG
ValLeuGlyValAsnAspArgProTyrProGlnArgThrAspAspGlnTyrAsnIleLeu

150 170 190
AGACATCTGGGAGGCTTGGGCCCTACATCGGTTACAATGGATGGGAATTGCTGCTGAG
ArgHisLeuGlyGlyLeuGlyProTyrIleGlyTyrAsnGlyTrpGlyIleAlaAlaGlu

210 230 250
TCTGAAATTGAATCCTGTACGATTGATCAGGCTCATCTGTGATGAGACATGGAGAAAGA
SerGluIleGluSerCysThrIleAspGlnAlaHisLeuLeuMetArgHisGlyGluArg

270 290 310
TACCCAAGTACCAATGGGGAAACAAGCTTGTACCAGAACTACTAGATGCT
TyrProSerThrAsnValGlyLysGlnLeuGluAlaLeuTyrGlnLysLeuLeuAspAla

330 350 370
GATGTGGAGTCCCTACAGGACCATGCTTCTTTCACAGACTATGATTACTCGTCTCT
AspValGluValProThrGlyProLeuSerPhePheGlnAspTyrAspTyrPheValSer

390 410 430
GACCCCGCTTGGTACGAGCAAGAAACAATAAGGGTTTCTACTCGGGTTAAACCCGCT
AspAlaAlaTrpTyrGluGlnGluThrThrLysGlyPheTyrSerGlyLeuAsnThrAla

450 470 490
TTCGATTTGGTACCCTTIGAGAGAAGATATGAACATTGATAAACAATAGCGAAGAA
PheAspPheGlyThrThrLeuArgGluArgTyrGluHisLeuIleAsnAsnSerGluGlu

[표 4b]

510 530 550
GGAAAGAACTTTCTGTTGGGCTGGCTCTCAAGAAAGAGTGTGACAAACGCAAAGTAC
GlyLysLysLeuSerValTrpAlaGlySerGlnGluArgValValAspAsnAlaLysTyr

570 590 610
TTTGCTCAAGGATTTATGAAATCTAATACACCGTTATGGTCGAAGTCGTCTGTAGAA
PheAlaGlnGlyPheMetLysSerAsnTyrThrValMetValGluValValAlaLeuGlu

630 650 670
GAGGAGAAATCCCAGGACTCAACTCTTAACGGCTCGAATTTTCATGTCCAAATAAAC
GluGluLysSerGlnGlyLeuAsnSerLeuThrAlaArgIleSerCysProAsnTyrAsn

690 710 730
AGCCATATCTACAAAGATGGCGACTTGGGGAATGACATTGCTCAAAGAGAAGCTGACAGA
SerHisIleTyrLysAspGlyAspLeuGlyAsnAspIleAlaGlnArgGluAlaAspArg

750 770 790
TTGAACACTCTTTCTCCAGGATTTAACATTACTGCAGATGATATTCGAACAATTGCCCTA
LeuAsnThrLeuSerProGlyPheAsnIleThrAlaAspAspIleProThrIleAlaLeu

810 830 850
TACTGTGGCTTTGAACTAAATGTAAGAGGTGAGTCATCCTCTGTGACGCTCTGTCAAGA
TyrCysGlyPheGluLeuAsnValArgGlyGluSerSerPheCysAspValLeuSerArg

870 890 910
GAGGCTCTACTGTACACTGCTTATCTTAGAGATTGGGATGGTATTACAATGTTGAAAC
GluAlaLeuLeuTyrThrAlaTyrLeuArgAspLeuGlyTrpTyrTyrAsnValGlyAsn

930 950 970
GGGAACCCACTTGGAAAGACAATCGGCTACGTCTATGCCAACGCCACAAGACAGCTGTG
GlyAsnProLeuGlyLysThrIleGlyTyrValTyrAlaAsnAlaThrArgGlnLeuLeu

990 1010 1030
GAAACACAGAAGCTGATCCTAGAGATTAATCCTTTGACTTTTCCTTTAGTCATGATACC
GluAsnThrGluAlaAspProArgAspTyrProLeuTyrPheSerPheSerHisAspThr

1050 1070 1090
GATCTGCTTCAAGTATTCACCTTCACTCGGTCCTTTTCAAGTGACAGATCTGCCATTAGAC
AspLeuLeuGlnValPheThrSerLeuGlyLeuPheAsnValThrAspLeuProLeuAsp

1110 1130 NcoI
CAGATTCAAATCCAGACCTCTTCAAATCTACCGAAATAGTTCCTCCATGGGAGCAAGATTG
GlnIleGlnPheGlnThrSerPheLysSerThrGluIleValProMetGlyAlaArgLeu

[표 4c]

```

1170          1190          1210
CTTACCGAGAGATTATTGTGACTGTGAAGGTGAAGAAAAATACTACGTTAGAACTATC
LeuThrGluArgLeuLeuCysThrValGluGlyGluGluLysTyrTyrValIArgThrIle

1230          1250          1270
CTCAACGATGCAGTCITCCGACTGAGTGACTGTTCTCTGGCCCTGATTCCTCTGTGCGG
LeuAsnAspAlaValPheProLeuSerAspCysSerSerGlyProGlyPheSerCysPro

1290          1310          1330
TTGAACGATTATGTTTCTAGACTTGAGGCATTGAACGAGGACAGTGACTTTGCGGAAAAAC
LeuAsnAspTyrValSerArgLeuGluAlaLeuAsnGluAspSerAspPheAlaGluAsn

1350          1370          1390
TGTGGAGTTCTAAATAATGCTTCTACCCACTTGAACATATGATTCTGTGGGATGACTTG
CysGlyValProLysAsnAlaSerTyrProLeuGluLeuSerPhePheTrpAspAspLeu

TCATAA
SerEnd
    
```

[표 5]

3' 전사 종료서열

SEQ ID NO:5:

```

1410          1430          1450
AAATGGTAAGGAATGTTTTGTCATCAGATACGAGTTCAAAACGATTAAGAAGAGA

1470          1490          1510
ATGGTCTTTTTTTTGTCTATCCAATGGACTATTTTCGTTTATTTAAATAGCGTACA

1530          1550          1570
ACTTTAACTAGATGATATCTTCTTCTTCAAACGATACCAGTCTCTCATACTAGGTGGAG

BamHI
GTTCAATGGATCC
    
```

산성 인산효소 유전자는 하기 실시예에서 상술되는 방법에 의해서 피치아 파스토리스 NRRL Y-11430 같은 피치아 파스토리스 배양물로부터 회수한다. (피치아 파스토리스 NRRL Y-11430은 1979년 1월 30일에 미합중국 농산성의 Northern Regional Research Laboratory에 기탁했고 그로부터 입수 가능함). 피치아 파스토리스의 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1)를 회수하는 일반적인 방법은 하기 실시예에서 기재된 저농도 인산염(LP) 표지자 같은 산성 인산효소 표지자를 사용하여, 피치아 파스토리스 DNA의 라이브라리를 선별함으로 구성된다. 다른 표지자는 표 1에서 개시된 서열을 기재로 하여 선택하거나 합성할 수 있다. 표지자의 교잡은 당분야의 당업자에게 알려진 임의의 적당한 방법으로 수행할 수 있다. 피치아 파스토리스 라이브라리는 Gregg 일동(1985), Mol. Cell Bio. 5,3376-3385에 의해 기재된 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당분야에서 알려진 기술에 의해 제조할 수 있다.

대안적으로, 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2), 신호서열((SEQ ID NO : 3), 구조 유전자(SEQ ID NO : 4), 및 3' 전사 종료서열(SEQ ID NO : 5)은 공지의 효소 또는 화학적 방법을 사용하여 표 1-5에서 한정된 적당한 서열을 합성함으로써 얻을 수 있다. 적당한 방법은 포스포트리에스테르, 아인산염 또는 시아노에틸포스포아미드트 화학작용을 기초로 한 화학적 방법을 포함하나 제한되지 않는다.

또한 당분야의 당업자는 다음에 분리된 피치아 파스토리스 산성 인산효소 5' 조절영역, 신호서열, 구조 유전자, 및 3' 전사 종료서열에 비하여 본 발명의 분리된 피치아 파스토리스 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2), 신호서열 (SEQ ID NO : 3), 구조 유전자 (SEQ ID NO : 4), 및 3' 전사 종료서열 (SEQ ID NO : 5)은 일어날 수 있는 클론변형 또는 서열화 실책으로 기인되는 극소수의 뉴클레오타이드 차이를 가질 수 있다.

또한 피치아 파스토리스 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2), 신호서열(SEQ ID NO : 3)구조 유전자(SEQ ID NO : 4), 및 3' 전사 종료서열(SEQ ID NO : 5)의 변이는 링커 DNA를 첨가하거나 돌연변이 유발(예컨대 M13 돌연변이유발)을 수행하여 제한부위(들)를 제공하거나 제거하는 것 등과 같이 수행될 수 있다.

일단 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자가 회수되면, 이 콜리에서 유지되는 pBR322 같은 진핵 생물 또는 원핵생물의 플라스미드-숙주 시스템에서, 또는 당분야에서 알려진 임의의 다른 적당한 시스템에서 유지되거나 복제될 수 있다.

또한 당분야의 당업자는 약간의 대표적인 예를 들면, 세균 플라스미드 DNA, 여러 가지 표식유전자, 박테리오파지 DNA, 독립 복제서열, 및 동원체 DNA 같은 수많은 부가의 DNA 서열이 사용되는 벡터내로 통합될 수 있음을 알 것이다.

산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)은 제1도와 표 2에서 나타낸 바와 같이, 뉴클레오타이드-399에서 뉴클레오타이드 약 0까지 걸쳐 있는 DNA 단편내에 함유된다. 이 단편은 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호하는 이중 DNA 서열의 5' 말단에 작동가능하게 연결하고 배치시킬 때 DNA의 RNA로의 전사를 수행할 수 있다.

본 발명에서 개시된 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)을 사용하기 위해서, 제1도와 표 2에 기

재된 단편은 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호하는 이중 DNA 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 본 명세서의 목적을 위하여 이중 DNA 서열은 숙주에 천연적으로 존재하지 않거나 상기 조절 영역과 관련없이 존재하는 DNA 서열들의 조합물이다. 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)과 작동가능하게 연결될 수 있는 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호하는, 적당한 이중 서열은 조직의 플라스미노겐 활성화제, 사람의 혈청 알부민, 및 전화효소를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용된 이중 DNA 서열은 5'ATG 출발코돈, 3' 정지코돈을 함유해야 하고 mRNA를 안정화 하거나 폴리아데닐화를 조작하는 작용을 하는 뉴클레오티드 서열을 부가적으로 포함할 수 있다.

이중 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)의 조합물은 적당한 벡터에 삽입될 수 있다. 수많은 효모 벡터-숙주 조합물이 가능하고 당분야의 당업자에게 알려져 있다. 벡터가 세균 또는 효모에서 증식증폭 및 빠른 증식을 할 수 있게 하는 표식 유전자 또는 다른 서열 같은 부가의 서열이 또한 존재할 수 있다.

산성 인산효소 5' 조절영역을 함유하는 벡터로 형질전환될 수 있는 적당한 숙주세포는 사카로미세스, 피치아 및 한세놀라(Hansenula) 숙으로부터의 숙주세포, 바람직하게는 피치아, 및 가장 바람직하게는 피치아 파스토리스 같은 효모를 포함한다.

산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)을 함유하는 벡터로 적당한 숙주세포 형질전환은 당분야에서 알려진 임의의 적당한 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다.

산성 인산효소 5' 조절영역(SEQ ID NO : 2)은 배지내 인산염 농도에 의해 조절된다. 특히, 이 조절영역은 낮은 농도의 인산염에 의해 탈억제된다. 그러므로, 5' 조절영역은 배지에 존재하는 인산염의 농도를 변화시킴으로써 조절한다.

산성 인산효소 신호서열(SEQ ID NO : 3)은 제1도와 표 3에서 나타난 바와 같이 뉴클레오티드 1에서 뉴클레오티드 약 66에 걸쳐 있는 DNA 단편내에 함유된다. 본 발명에서 개시된 산성 인산효소 신호서열(SEQ ID NO : 3)을 활용하기 위해서, 제1도와 표 3에 기재된 단편은 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호하는 이중 DNA 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 적당한 이중 DNA 서열은 조직의 플라스미노겐 활성화제, 사람의 혈청 알부민, 및 전화효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 DNA 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

그런 다음 이중 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 산성 인산효소 신호서열(SEQ ID NO : 3)의 조합물은 적당한 프로모터에 연결될 수 있다. 편리하게는, 사용되는 프로모터는 선두서열과 관련된 프로모터일 수 있다. 대안적으로, 천연적으로 존재하는 PH01 프로모터를, 전사 조절을 하게 하는 다른 이중 프로모터로 대체할 수 있다. 적당한 이중 프로모터의 예는 미합중국 특허 4,808,537에 개시된 피치아 파스토리스 알코올 옥시다제(AOX1) 프로모터(또는 5' 조절영역)이다.

산성 인산효소 신호서열(SEQ ID NO : 3)을 함유하는 이 DNA 단편이 삽입될 수 있는 적당한 벡터는 전술한 바와 같이 얻을 수 있다. 또한, 신호서열을 암호하는 DNA 단편을 함유하는 결과생성의 벡터로 형질전환될 수 있는 적당한 숙주세포는 사카로미세스, 한세놀라 및 피치아 숙으로부터의 숙주세포와 같은 효모를 포함하며, 피치아 파스토리스가 적절하다. 이 숙주세포의 형질전환은 당분야의 당업자에게 알려진 임의의 적당한 방법으로 실현될 수 있다. 이들부터 숙주 시스템 중 하나에 의해 생산된 단백질에 작동가능하게 연결된 신호서열은 숙주세포로부터 상기 단백질의 분비를 조작할 수 있다.

산성 인산효소 구조 유전자(SEQ ID NO : 4)는 제1도와 표 4에서 나타난 바와 같이 뉴클레오티드 67에서 뉴클레오티드 1407에 걸쳐 있는 DNA 단편내에 함유되어있다. 산성 인산효소 구조 유전자 (SEQ ID NO : 4)는 하기 (a)와 (b)를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 가지 목적을 위한 제조할 생물공학에서 사용될 수 있다 : (a)와해성 동종 재조합(산성 인산효소 좌에서 이중 DNA 서열을 피치아 파스토리스 게놈 내로 삽입하여 산성 인산효소 유전자의 활성을 와해시키는 방법)을 수행하기 위한 DNA 구조물, 및 (b) 여러 가지 생물학적 정량에서 사용하기 위한 산성 인산효소 단백질이 생산.

산성 인산효소 3' 전사 종료서열(SEQ ID NO : 5)은 폴리펩티드의 생산을 암호하는 DNA 서열의 3' 말단에 작동가능하게 연결될 때 mRNA의 전사를 종료시키거나 안정화한다. 이 산성 인산효소 3' 전사 종료서열(SEQ ID NO : 5)은 제1도와 표 5에서 나타난 바와 같이 뉴클레오티드 1408에서 뉴클레오티드 약 1594에 걸쳐 있는 DNA 단편내에 함유되어 있다. 산성 인산효소 3' 전사종료서열(SEQ ID NO : 5)은 폴리펩티드를 암호하는 이중 DNA 서열에 작동가능하게 연결될 수 있고, 사카로미세스, 한세놀라, 및 피치아 숙으로부터의 것과 같은 효모에서 mRNA의 전사를 종료하거나 안정화 하기 위해 사용될 수 있으나, 피치아 파스토리스에서 사용하는 것이 특히 적합하다.

하기의 비제한적 실시예는 본 발명의 실시를 상세히 설명하기 위해 제공된다.

[실시예]

(군주)

하기 군주가 이들 실시예에서 사용되었다:

피치아 파스토리스 KM71 (AOX1, his4)

피치아 파스토리스 GS115 (his4) NRRL Y-15851

피치아 파스토리스 GS190(arg4)NRRL Y-18014

피치아 파스토리스 GS247(Ade⁻)

피치아 파스토리스 KM71:GS102(Mut⁻)

피치아 파스토리스 GS115:GS102(Mut⁺)
 피치아 파스토리스 MD100-20(his4, Ade⁻)
 피치아 파스토리스 MB102-26(pho⁻, his4, ade⁻)
 피치아 파스토리스 MB102-28
 피치아 파스토리스 MB102-51
 피치아 파스토리스 KM71:pPSU216(Mut⁻)
 피치아 파스토리스 GS115:pPSU216 (Mut⁺)
 이. 콜리 JM103델타 (lac pro) thi rps1
 (strA) supE end A sbcB hsdR

Bowes 멜라노마 tPA과발현 (over - expressing) 세포계 ATCC번호 C R L 9607(사람의 멜라노마세포)은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection)에서 입수가 가능하다. 피치아 파스토리스 균주 GS115와 GS190은 각각, 1984년 8월 31일과 1985년 10월 17일에 기탁물 NRRL Y-15851 과 Y-18014 로서 미합중국 농산성의 Northern Regional Research Laboratory에 기탁되었다. 이들은 이 공급원으로부터 입수가 가능하다.

(배지, 완충액, 및 용액)

하기 실시예에서 사용되는 배지, 완충액 및 용액은 하기에 표시한 조성물을 갖는다.

(LP 배지(저농도 인산염))

비오틴	2 μ g/L
칼슘 판토테네이트	400 μ g/L
폴산	2 μ g/L
니코틴산	400 μ g/L
p-아미노벤조산	2 μ g/L
피리독신 염산염	400 μ g/L
리보플라빈	200 μ g/L
티아민-HCl	400 μ g/L
붕산	400 μ g/L
황산 제이구리	40 μ g/L
요오드화 칼륨	100 μ g/L
영화 제이철	200 μ g/L
황산 망간	400 μ g/L
황산 아연	400 μ g/L
이노시톨	2mg/L
몰리브덴산 나트륨	200 μ g/L
황산 암모늄	5g/L
일염기 인산칼륨	30mg/L
영화칼륨	1.5g/L
영화나트륨	1.7mM
영화칼슘	0.68mM
황산 마그네슘	4.2mM
(TE 완충액)	
Tris-HCl, pH 8.0	10mM
EDTA	1mM
(SSPE (1X))	
NaCl	180mM

Na ₃ PO ₄ , pH 7.7	10mM	
EDTA	1mM	
(SSC (1X))		
NaCl	150mM	
Na 구연산염	15mM	
(Denhardt's 용액 (1X))		
피콜	200mg/L	
폴리비닐피롤리돈	200mg/L	
소혈청 알부민	200mg/L	
(REB)		
LiCl	100mM	
Tris-HCl, pH 7.4	100mM	
EDTA	0.1mM	
(PCI)		
페놀	500ml/L	
클로로포름	480ml/L	
이소아밀 알코올	20ml/L	
(CI)		
클로로포름	20ml/L	
이소아밀 알코올	40ml/L	
(LP 지지 평판)		
1X LP 배지		
22.5mM 구연산		
pH 4.8		
20g 덱스트로즈		
60mg 5-브로모, 4-클로로,		
3-인돌릴 인산염		
(Sigma)		
25g Noble 한천		
(Difco)		
(SCE 완충액)		
9.1g 소르비톨		
1.47g 구연산 나트륨		
0.168g EDTA		
50ml 에서 HCl 로		
pH를 5.8 로		
dH ₂ O 및 오토클레이브		
(YNB 배지)	물 1리터 내의 아미노산없는 효모 질소기재	
(DIFCO)	6.75g	
[실시예 1]		
(pLP24의 구성)		

피치아 파스토리스로부터의 산성 인산화소 유전자(SEQ ID NO : 1)를 분리하고 특성결정하기 위해서, 하기 실험을 수행하였다. 피치아 파스토리스 GS115(NRRL Y-15851)은 고농도 인산염(HP) 환경[효모질소기재 - 아미노산(DIFCO), 2% 덱스트로오즈, 및 20mg/l 히스티딘으로 구성됨]과 저농도 인산염(LP) 환경[LP배지, 2% 덱스트로오즈, 및 20mg/l 히스티딘으로 구성됨] 각각 300ml의 전체 부피에서 증식시켰다. 세포를 펠렛화하고, 10ml REB로 1회 세척하고, 30ml Corex 시험관에서 4ml REB에 재현탁하였다. 그런 다음

8g의 유리구슬과 4ml의 PCI를 첨가하였다. 현탁액을 와동혼합기에서, 각각 20초로 8회 혼합하고, 혼합사이에 20 초동안 얼음 위에서 냉각시켰다. 그런 다음 현탁액을 10,000 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 수성(최상부)층을 4ml PCI와 4ml CI로 2회 추출하였다. RNA는 0.1 부피의 3M 아세트산 칼륨, pH 5.2와 2.5 부피의 에탄올로, -20°C에서, 수성층으로부터 침전시켰다. 폴리 A⁺ RNA는 NaCl 대신 치환된 LiCl로, Maniatis 일동 (Molecular Cloning, ALabortory Manual)에 의해 선택하였다. 또한 폴리A⁺ RNA 각 유형 2µg을 사용하는, LP 또는 HP mRNA-표지된 cDNA 표지자의 합성은 Maniatis 일동에 따랐다.

YEP13 내의 정제된 피치아 파스토리스 플라스미드 라이브러리 [Broach 일동, Gene : 8121(1979)] 60ng을 사용하여 이.콜리 MC1061(Mandel과 Higa, 1970, J. Mol. Biol. 53 : 154)를 형질전환 하였다. 약 8,000집락이 생성되었다. 집락을 이중 니트로셀룰로오즈 필터 상에서 복제시키고, 100µg/ml 알피실린과 170µg/ml 클로람페니콜을 함유하는 LB 평판 상에서 증폭시키고, 표준 방법(Grunstein and wallis, 1979, Methods in Enzymology 68, 379 - 389)에 의해서 용균시키고, 80°C에서 90분동안 굽고, 별개의 필터를 LP 또는 HP cDNA 표지자와 교잡시켰다. 교잡은 2X SSPE, 1X Denhardt's 용액, 0.2% 도데실 황산 나트륨(SDS), 및 교잡용액 ml 당 2.5×10^5 cpm의 표지된 cDNA 표지자를 사용하여 수행하였다. 교잡은 25ml 전체 부피에서 55°C로 40시간 동안 하였다. 교잡 후에, 필터를 실온으로 2x SSC, 0.1% SDS에서 2회 및 65°C로 0.2x SSC, 0.1% SDS에서 2회 세척한 다음 건조시키고 X선 필름에 노출시켰다.

HP cDNA 표지자보다 LP cDNA 표지자와 강하게 교잡하므로 산성 인산효소 유전자를 암호화한 삼입물을 함유하는 가능한 후보물인 24개 게놈클론이 확인되었다. 이들 24 클론은 전과 같이 LP와 HP 표지자로 재선별하였고 재선별된 14 클론은 다시 LP cDNA 표지자와 보다 강하게 교잡하였다. 플라스미드 DNA를 이들 14 클론 각각으로부터 분리하고, EcoRI로 소화시키고, 아가로오스 겔 전기영동으로 분리하고, 이중 니트로셀룰로오즈 필터에 블로팅하고, 각 필터를 전과 동일한 조건 하에서 LP 또는 HP cDNA와 교잡시켰다. 4개의 별개 클론으로부터의 유전자 단편은 LP cDNA 표지자와 강하게 및 HP cDNA 표지자와는 약하게 또는 거의 없게 교잡하였다. 그런 다음 이들 단편은 EcoRI+HindIII, EcoRI+Sall, 및 EcoRI + BamHI 이중 소화물을 사용하여 제한지도를 작성하고 LP cDNA 표지자와 다시 교잡시켰다. 단편은 그들의 제한지도에서의 차이에 의해 결정된 바와 같이 관련없는 인산염 조절 유전자 분절을 암호화하였다.

LP-조절 유전자를 암호화하는, 이 방법에 의해 확인된 영역은 pUC8 또는 pUC19 (New Englan Biolabs)내로 서브클론하였다. 결과 생성된 플라스미드는 절단 번역(nick translation; Maniatis)에 의해서 32p 로 표지하였다. 표지된 플라스미드를 사용하여 LP와 HP RNA의 RNA 블롯 (5µg/블롯)을 표지하였다. pLP24로서 확인된, 최초의 24 클론 중 하나를, 추후 연구를 위해 선택하였다.

[실시예 II]

(pLP2411의 구성)

실시예 I에서 생성되고 피치아 파스토리스 산성 인산효소 유전자(SEQ ID NO : 1) 또는 그의 단편을 함유 하리라고 생각되는 플라스미드 pLP24는 부가적으로 하기 방법으로 특성결정하였다. pLP24 10µg을 EcoRI/Sall이로 소화시키고 2.1kb 단편을 결정제하였다.

10µg의 pYM25(NRRL B-18015)를 SphI/Sall이로 소화시키고 3.1kb 단편을 결정제하였다. NRRL B18015는 1985년 10월 17일에 미합중국 농산성의 North ern Regional Research Laboratory에 기탁하였고 이로부터 입수가 가능하다. pUC19 5µg을 EcoRI/Sall이로 소화시키고, PCI로 추출하고, CI로 추출하고, EtOH로 침전시켰다. 100ng의 EcoRI/Sall 선형화 pUC19를 20ml의 연결 완충액 + 1mM ATP + 1유닛 T4 DNA 리가아제내의, 200ng의 pLP24의 2.1kb EcoRI/Sall 단편 및 450ng의 pYM25의 3.1kb SphI/Sall 단편과, 3부분 연결로 연결시켰다. 이.콜리 균주 M C 1 0 61을 형질전환시키고 정정된 플라스미드는 2.1kb EcoRI/Sall 단편과 3.1kb SphI/Sall 단편의 존재에 의해 확인하였다. 정정된 플라스미드는 pLP2411이라 칭했다.

[실시예 III]

(pLP2412 PH01 - 와해 백터의 구성과 GS190:pLP2412의 개발)

플라스미드 pLP24(참조, 실시예 II)로부터 유래된 플라스미드 pLP2411을 Xba I 으로 소화시키고, 클레노우 DNA 폴리머라제로 처리하여 절단된 말단을 생성하고, 플라스미드 pYM25로부터의 2.1 kb Hpa I 단편과 연결시켰다. 이 단편은 사카로미세스 세레비시아 ARG4 유전자를 함유했다(플라스미드 pYM25는 NRRL B-18015로서 입수가 가능함). 결과생성된 플라스미드를 pLP2412 라 명명했다.

그런 다음 pLP2412를 EcoRI와 BamHI으로 소화시켰다. 3.3kb 단편을 분리하고 사용하여 피치아 파스토리스 GS190(NRRL Y-18014)를 Arg⁺ 영양요구성균주로 형질전환하였다(형질전환 방법은 실시예 IV에 기재되어 있음). 아르기닌 영양요구성균주는 아르기닌 결핍 배지에서 증식하는 능력으로 확인하였다. 그들을 분리하고 산성 인산효소의 존재에 관해 LP 지시 평판상에 선별하였다. 집락을 LP 지시 평판으로 반복배양하고 30°C에서 하룻밤을 증식시켰다. LP 지시 평판상의 집락은 녹색(PH01) 또는 백색(pho1)이었다. 백색 집락은 상기로부터의 3.3kb 발현 카세트를 함유하는 형질전환체였고, 피치아 파스토리스 게놈의 PH01 좌에서의 와해에 의해 안정하게 통합되었다.

안정한 Arg⁺ 균주로부터의 게놈 DNA는 서던(Southern) 필터교잡에 의해 조사하여 발현 카세트의 위치를 결정하였다.

사카로미세스 세레비시아 ARG4 유전자를 함유하는 3.3kb EcoRI/BamHI 단편은 특징적으로 통합하고 pLP2411에 함유된 DNA 단편과 유사한 게놈서열을 붕괴시켜, 이 좌가 산성 인산효소(PH01)를 암호함을 확인하였다. 이 형질전환체는 GS190 : pLP2412 라 명명했다.

[실시예 IV]

(피치아 파스토리스의 형질전환)

하기 방법은 피치아 파스토리스의 형질전환에서 사용하였다.

효모세포를 YPD 배지 약 10ml 내로 접종시키고 30°C에서 16 - 20 시간 동안 진탕 배양하였다. 그런 다음 세포를 A600 약 0.01 내지 0.1로 희석하고 YPD 배지에서 약 6 - 8 시간 동안 30°C에서 대수기로 유지시켰다. YPD 배지 100ml에 A600 약 0.1의 종자 배양물 0.5ml를 접종하고 30°C에서 약 16 - 20 시간 동안 진탕 배양하였다. 그런 다음 배양물은 DAMON IEC DPR - 6000 원심분리기를 사용하여 1500g에서 5분 동안 원심분리함으로써 A600 약 0.2 내지 0.3(약 16 - 20 시간 후)하에 수확하였다.

스페로플라스트를 제조하기 위하여, 세포를 10ml의 살균수에서 1회(원심분리는 전술한 바와 같은 각각의 세척 후 수행하였음), 10ml의 신선하게 제조된 SED에서 1회, 10ml의 1M 살균 소르비톨에서 1회 세척하고, 5ml의 SCE 완충액에서 재현탁하였다.

5 μ l의 4mg/ml Zymolyase 60,000 (Miles Laboratories로부터 인수 가능)을 첨가하고 세포를 30°C에서 약 30분 동안 배양하였다.

스페로플라스트 형성은 하기와 같이 검사하였다. 100 μ l의 세포 부분표본을 Zymolyase 첨가전 또는 직후에, 및 배양기간 동안 여러 가지 횡수로, 900 μ l의 5% SDS와 900 μ l의 1M 소르비톨에 첨가하였다. 배양은 세포가 SDS에서 용해하나 소르비톨에서는 용해하지 않는 지점에서 정지시켰다. 일단 스페로플라스트가 형성되면, 1,000g에서 5 - 10분동안의 원심분리에 의해 10ml의 1M 살균 소르비톨에서 1회 세척하고, CaS10ml에서 원심분리에 의해 세척하고, CaS에서 0.6ml로 재 현탁했다.

실제의 형질전환을 위해서, 물 또는 TE 완충액 내의 DNA 시료를 12 x 75 mm 살균 폴리프로필렌 시험관에 첨가했다(전체 부피 20 μ l 까지). (소량의 DNA 경우, 최대 형질전환은 각 시료에서 약 1 μ l의 5mg/ml 초음파 처리된 이. 콜리 DNA를 사용하여 발생한다). 100 μ l의 스페로플라스트를 각각의 DNA 시료에 첨가하고 실온에서 약 20분 동안 정치하였다. 1ml의 PEG 용액을 각 시료에 첨가하고 실온에서 약 15분 동안 정치하였다. 시료를 1,000g에서 5 - 10분 동안 원심분리하고 상침액을 버렸다. 펠릿을 150 μ l의 SOS에 재현탁시키고 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 850 μ l의 1M 살균 소르비톨을 각각에 첨가하고, 시료를 하기와 같이 평판배양했다.

10ml의 재생 한천은 형질전환 시료가 준비되기 적어도 30분 전에 평판마다 부었다. 10ml의 재생 한천 부분표본을 또한 형질전환시료가 SOS에 존재하는 시간 동안 45 - 50°C 옥조내의 시험관에 분배시켰다. 그런 다음 시료를 시험관에 첨가하고, 고형물 바닥의 한천층을 함유하는 평판 위에 붓고, 30°C에서 3 - 5 일 동안 정치시켰다.

여러 지점에서의 스페로플라스트 정성은 하기와 같이 측정하였다. 10 μ l의 시료를 따로 떼어 990 μ l의 1M 소르비톨에 첨가하여 110배 희석하였다. 10 μ l의 희석물을 따로 떼어 내고, 부가의 990 μ l의 1M 소르비톨 부분물을 첨가하였다. 100 μ l의 두 희석물을 YPD 한천 배지 상에 살포하여 평판 배양시켜 조제에 남아 있는 스페로플라스트 안 된 전 세포의 농도를 결정하였다. 100 μ l의 각 희석물을 속주에 의해 요구되는 모든 아미노산 40 μ l/ml로 보충된 10ml의 재생 한천에 첨가하여, 전체의 재생가능한 스페로플라스트를 결정하였다. 형질전환 실험에 관한 Godd 값은 $1 - 3 \times 10^7$ 전체의 재생가능한 스페로플라스트/ml의 약 1×10^3 전세포/ml 이었다.

[실시예 V]

(효모 DNA 제조)

하기 방법은 파치아 파스토리스 DNA의 제조에서 사용하였다.

효모세포는 100ml의 YNB 배지 +2% 덱스트로오스에서 30°C로, A600이 1 - 2가 될 때까지 증식시킨 다음 Damon IEC DPR-6000 원심분리기를 2,000g에서 5분 동안 사용하여 펠릿화하였다.

펠릿을 dH2O에서 1회, SED에서 1회, 1M 소르비톨에서 1회 세척한 다음 0.1M Tris-C1, pH7.0과 1M 소르비톨 용액 5ml에 재현탁시켰다. 그런 다음 세포를 50 - 100 μ l의 4mg/ml Zymolyase 60,000용액(Miles Laboratories)과 혼합시키고 30°C에서 1시간 동안 정치하였다. 그런 다음 결과 생성된 스페로플라스트를 1,000g 에서 5 - 10분 동안 원심분리하고 5ml의 용해 완충액[0.1% SDS, 10mM Tris-C1(pH7.4), 5mM EDTA 및 50mM NaCl]에서 현탁시켰다. 프로테이나제 K(Boehringer Mannheim) 및 RNase A(Sigma)를 각각 10 μ l/ml까지 첨가하고 용액을 37°C에서 30분 동안 정치시켰다. DNA는, 조제물을 동일한 부피의 C1와 부드럽게 혼합시켜 달단백하고, 상(phase)들은 12,000g에서 20분 동안 원심분리하여 분리시켰다. 상부(수성)상을 새로운 시험관 안으로 따라내고 동일 부피의 PC1로 추출하였다. 상들을 전과 같이 분리하고 최상부 상을 100% 냉 에탄올 2 - 3 부피를 포함하는 시험관에 넣었다. 시료를 부드럽게 혼합하고 DNA는 플라ستيك 막대로 실감기하여 모았다. DNA를 1ml의 TE 완충액에 즉시 용해시키고 100부피의 TE 완충제에 대해 4°C에서 하룻밤 동안 투석하였다.

[실시예 VI]

(완전한 길이의 PH01 유전자 분리)

전체의 피치아 파스토리스 PH01 유전자(SEQ ID NO : 1)를 함유하는 플라스미드를 분리하기 위해서 MC1061 내의 원래의 피치아 파스토리스 계능 라이브라리를, 전술한 조건하에서, pLP24 로부터의 600bp BamHI 단편과 교잡시켰다. 이 방법은 5개의 양성 클론을 확인시켰다. 플라스미드 DNA를 이들 클론으로부터 제조하고, BamHI으로 소화시키고, 니트로셀룰로오스 필터에 블롯팅하고, 동일한 600bp의 표지자와 교잡시켰다. 5개 클론 각각은 피치아 파스토리스 PH01 유전자를 함유한 2.0kb B amHI 단편을 가졌다. 클론 중 하나는 추후 분석을 위해 선택하고, pLP2420 으로 명명하였다.

pLP2420의 2.0kb BamHI 단편은 M13 (New England Biolabs로부터 입수가 가능)에서 서브클로닝된 제한효소로 소화된 단편의 표준 디데옥시 서열화에 의해서 서열화하였다. 서열분석은 2.0kb BamHI 단편내에 완전히 함유된 468 아미노산의 오픈리딩프레임(open reading frame)을 나타내었다.

[실시예 VII]

(균주 MB102-26 : pLP2430 - T1 및 MB102-26 : pLP2430 - T3의 개발)

PH01 유전자를 함유하는 pLP2420의 2.0kb BamHI 단편은 사카로미세스 세레비시아 HIS4 유전자와 pBR322 서열을 함유하는 플라스미드인, pYM8의 BamHI 부위내로 연결시켰다. [(pYM8은 하기와 같이 제조할 수 있다 : 10 μ l의 pYA2(NRRL B - 15874)를 SphI/Tha I 으로 소화시키고 3.4kb 단편을 절제하였다. 10 μ l의 pBR 322를 SphI/NruI 으로 소화시키고 3.95kb 단편을 절제하였다. NRRL B -15874는 1984년 8월 31일에 미합중국 농산성의 Northern Regional Research Laboratory에 기탁하였고 그로부터 입수가 가능하다. 100ng의 3.96kb pBR322 단편은 표준 조건하에서 250ng의 3.4kb pYA2 단편과 연결하였다. 올바른 플라스미드를 3.1kb XhoI/SphI 단편을 기재로 하여 확인하고, pYM8 이라 칭했다]. 결과생성된 플라스미드는 pLP2430 이라 명명하고, 사카로미세스 세레비시아 HIS4 유전자 서열에 있는 뜻밖의 ARS기능(독립적인 복제 서열)에 의해서 피치아 파스토리스에서 독립적으로 복제하기에 적격이었다.

인산효소 활성이 결여된 피치아 파스토리스 균주인, GS190 : pLP2412 (Pho⁻) (참조, 실시예 III)를 피치아 파스토리스 균주 MD100-20 (his4, Ade⁻)와 짝짓기하였다. 사용된 짝짓기 방법은 미합중국특허 4,812,405에서 개시된 것과 동일하였다. 균주 MD100-20은 하기와 같이 개발하였다 : 피치아 파스토리스 균주 GS115(his4) NRRL Y -15851 세포를, 접합체 형성 및 이배체화(이 방법에 관한 방법은 미합중국 특허 4,812,405에서 나타남)를 촉진하는 공지의 조건하에서 균주 GS247(Ade⁻) 세포와 혼합하고 YNB⁺덱스트로스 평판 상에서 배양하여 영양요구균주 이배체를 선택하였다. 이배체 균주를 MD100이라 칭했다.

MD100은 피치아 파스토리스 이배체의 포자형성을 유발시키는 공지의 조건(미합중국 특허 4,812,405에 개시됨)하에서 배양하고 포자 자손을 YNB 덱스트로스 + 아데닌 + 히스티딘 평판 상에서 배양하였다. 개개의 집락을 아데닌 또는 히스티딘 보충물의 부재하에서 증식하는 능력에 관해 시험하였다. 보충되는 히스티딘 없이 증식할 수 있으나 보충되는 아데닌 없이는 증식할 수 없는 균주를 확인하고 MD100 - 20 이라 칭했다.

이 교차로부터의 이배체 균주, MB102(Pho⁺/Pho⁻, HIS4/his4, Ade⁺/Ade⁻)를 포자형성시켜(미합중국 특허 4,812,405) 일배체 자손을 얻었다. 이들 자손은 히스티딘 또는 아데닌 보충물 존재하에 또는 부재하에, LP 지시 평판 상에서 및 YNB 덱스트로스 평판 상에서 선별하여 균주 MB102-26(Pho⁻, his4, Ade⁻)을 분리하였다. 균주 MB102-26을 실시예 IV에서 기재한 플라스미드 pLP2430으로 형질전환시켰다. His⁺ 형질전환체를 선택하고 LP 지시 평판 상에서 산성 인산효소 발현에 관해 선별하였다(참조, 실시예 III). 5개 형질전환체는 산성 인산효소 발현에 관해 양성이었다.

이들 형질전환체 중 2개, MB102-26 : pLP2430 - T1 및 MB102 - 26 : pLP2430 - T3를 산성 인산효소 발현의 적절한 조절에 관해 조사하였다. 각각의 균주를 HP 또는 LP 배지에서 24시간 동안, A600 2.0까지 증식시켰다. 각 배양물로부터의 세포는 Pho⁻표현형을 갖는 형질전환 안 된 HIS4 세포(MB102-28)와 Pho⁺ 야생형 표현형(표1)을 갖는 HIS4 세포(MB102-51) 9와 병행하여, 산성 인산효소 발현(Bostian 일동, 1980 : Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 4504 - 4508)에 관해 조사하였다. pLP2430 형질전환체의 유발 수준은 야생형 균주의 수준과 실질적으로 동일하였다. 그러므로, pLP2430에 삽입된 PH01 유전자를 함유하는 2.0kb BamHI 은 산성 인산효소의 적절한 인산염 조절 발현을 수여하기에 충분한 서열뿐 아니라 전체의 산성 인산효소 암호영역을 함유했다.

[표 6]

균주	유전자형	유니타입	AP ⁶⁰⁰	유발배수
MB102-26:pLP2430-T1	ade ⁻ , HIS4, hC1	707	30,244	43
MB102-26:pLP2430-T3	ade ⁻ , HIS4, hC1	652	28,198	33
MB102-51	ade ⁻ , HIS4, hC1	61.4	1,975	32
MB102-28	ade ⁻ , HIS4, pho1	0.02	0.03	1.5

[실시예 VIII]

(전화효소의 분비)

이 실시예는 PH01 신호서열(SEQ ID NO : 3)이 이중유전자에 작동가능하게 연결될 때 기능을 발휘함을 입증한다. 사카로미세스 세레비시아의 SUC2 유전자를 함유하는 2.2kb SmaI - PvuII 단편을 pSEY306 [(Johnson 일동, Cell 48, 875(1987))]로부터 분리하고 PA0810 또는 pPSV218 (참조, 이들 양친 플라스미드의 설명에 관한 실시예 XI과 XII의 SmaI 부위내로 클로닝했다. 이 방법은 각각, 플라스미드 pA PINV1 및 pAPINV2를 생성하였다. 이들은 피치아 파스토리스 AOX 1 프로모터를 사용하여 PH01 신호서열(SEQ ID

NO : 3)로부터의 오픈 리딩 프레임의 SUC2 구조 유전자로의 전사를 조절한다.

(PH01 서열)

...GTGTTTCGCT

(pSEYC306으로부터의 링커 서열)

CGA GAA TCC CCC GGG GAT CCG TCG

ACC TGC AGC CCA GCT TTG

(SUC2 서열)

ACA AAC GAA...

10 μ g의 각 플라스미드인, pAPINV1 또는 pAPINV2를 Bgl II로 소화시키고 실시예 IV에서와 같이 GS115를 형질전환하는데 사용하였다. GS115 : pAPINV1으로 명명된, pAPINV1의 Bar I II 단편을 함유하는 형질전환체는 히스티딘 영양요구성균주에 관해 선택하고, AOX 1 좌에서의 적절한 통합 및 와해를 나타내는 Mut 표현형에 관해 선별하였다. Mut은 포도당을 함유하는 배지에서 메탄올을 함유하는 배지로 집락을 레플리카 평판배양하고 메탄올 상에서 증식속도를 평가함으로써 수행하였다. 메탄올 상에서 느린 증식은 Mut 표현형을 나타내었다. GS115 : pAPINV2로 명명된, pAPINV2의 Bal II 단편을 갖는 형질전환체는 히스티딘 영양요구성균주에 관해 선택하고 PH01 좌에서의 적절한 통합 및 와해를 나타내는 Pho1 표현형에 관해 선별하였다(참조, 실시예 11).

각 부류의 형질전환체를 확인하고, SUC2 유전자가 본래의 신호서열을 함유하고 PH01 신호서열이 결여된 것을 제외하고는, pAPINV1과 동일한 통합된 플라스미드를 함유한 피치아 파스토리스 균주 KM71 : GS102(Mut)와 GS115 : GS102(M ut)와 병행하여, YNB+ 2% 글리세롤에서 배양하였다. 이들 두 균주는 EP 256,421에 기재되어 있다. 또한 SUC2 서열이 결여된 것을 제외하고는 pAPINV2와 동일한 통합된 플라스미드를 함유하는 균주 KM71 : pPSV216(Mut)과GS115 : pPSV216(M ut)과 병행하여 배양하였다.

각 배양물을 YNB + 2% 글리세롤에서 A600 약 3.0이 되도록 증식시켰다. 각각의 부분표본을 따로 떼어, 살균수에서 세척하고, 10ml의 YNB + 0.5% MeOH 에서 재현탁하였다.

Mut배양물을 A600=0.02 에서 재현탁하고, Mut배양물은 A600=0.2에서 재현탁하고, 30 $^{\circ}$ C에서 약 A600=0.3 - 0.4 까지 24시간 동안 증식시켰다. 이때에, 약1.0mOD600이 전환효소 활성에 관해 조사되었다. 결과를 표 6에 나타낸다.

[표 7]

배양물	MUT	신호 서열	분비된 전효소 ^a	전체 전효소 ^b	분비 효율 ^c
GS115: pAPINV1	-	PH01	20.3	3.05	0.67
KM71: GS102	-	SUC2	12.5	18.9	0.66
KM71: pPSV216	-	PH01 ^d	0	0	NA
GS115: pAPINV2	+	PH01	6.1	6.7	0.91
GS115: GS102	+	SUC2	5.3	5.7	0.93
GS115: pPSV216	+	PH01 ^d	0	0	NA

a - 분비된 전효소 - Goldstein 및 Lampen^o에 의해 측정함, 트리톤 없이, 전효소 유니트/조사된 배양물의 A600으로 표시됨. 1유니트=37 $^{\circ}$ C에서, 1 μ mole의 방출된 포도당/분.

b - 전체전효소 - 0.2% 트리톤 X-100의 존재하에서 측정함.

c - 분비효율 - 분비된 전효소/조사된 전체 전효소.

d - PH01 신호서열 존재, SUC2 서열 부재

o - Goldstein and Lampen, Methods in Enzymology

42 : 504-511, 1975.

이 결과는 PH01 신호서열이 SUC2 신호서열과 같이 효율적으로 작용하여 피치아파스토리스로부터의 전화 효소 분비를 촉진함을 분명하게 나타낸다.

[실시예 IX]

(tPA (조직의 플라스미노겐 활성화제)의 분비)

이 실시예는 PH01 신호서열(SEQ ID NO : 3)은 이중유전자에 작동가능하게 연결될 때 기능을 발휘함을 입증한다.

1. tPA 암호 cDNA의 분리

Bowes 멜라노마 tPA- 과 발현 세포계, ATCC 번호 CRL9607은 cDNA 라이브라리를 재구성하기 위해 사용된 RNA의 공급원이었다. 이 세포계는 tPA 서열을 클론하기 위해 다른 사람들에 의해 사용되었다(pennica 일동, Nature 301 : 214, 1983 ; Edlund 일동, PNAS 80 : 349, 1983 ; Lemontt 일동, DNA 4 : 419, 1985). 폴리 A+ RNA를 분리하고 Maniatis(Molecular Cloning : A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)의 방법을 따라 올리고 dT를 넣었다. 이 RNA를 사용하여 상업적 cDNA 클로닝 키트(Amersham 으로부터 입수가 가능함)를 사용하는 cDNA를 제조하고, λgt11 클로닝 벡터내로 삽입하였다. 삽입물을 함유하는 λgt11 파지는 상업적 일괄 혼합물(Stratagene 으로부터 입수가 가능함)를 사용하여, 이. 콜리 숙주 Y1088 내로 감염시켰다.

라이브라리를 상중으로 평판배양하고 발표된 사람의 tPA cDNA 서열(Pennica 일동, 상기 참조)로부터 고안된 세계의 상이한 올리고뉴클레오타이드로 표지하였다. 올리고뉴클레오타이드는 cDNA의 5', 중간, 및 3' 분절에 해당하고 하기 서열이었다 : 3'표지자 : 5' GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA 3' 중간 표지자 : 5'TCA CAG TAC TCC CAC GTC AGC CTG CGG TTC 3'5'표지자 : 5'GAC CCC TCT CTT CAT TGC ATC CAT GAT TGC T 3'

모든 3개의 표지자에 교잡된 5개 플라크를 확인하였다.

이들 클론 삽입물의 제한 소화물은 그것들을 발표된 제한 패턴(Pennica일동, 상기 참조)을 기재로 한 암호 tPA 임을 확인시켰다. 클론은 존재하는 5'비암호서열의 범위에서만 상이하였다. 클론 4와 5는 EcoRI 소화시 0.8kb(5'말단), 0.47kb(중간) 및 1.3kb(3' 말단)의 DNA 삽입물을 함유하여, 완전한 길이의 t-PA 암호서열의 존재를 시사하기 때문에 부가적인 특성결정화를 위해 수집했다. 클론 4로부터의 BglII 단편을 Bam HI - 절단 pUC18 내로 서브클로닝하고, 연결물을 이. 콜리 MC1061 세포내로 형질전환하였다. 양성 형질전환체는 EcoRI 소화로 확인하였다. 센스 방향으로 삽입물을 보유하는 클론은 420bp, 624bp, 760bp, 및 2.7kb 단편의 PstI 제한 패턴으로 확인하였고 pUC18#3 이라 칭했다. 역센스 방향으로 삽입물을 보유하는 클론은 420bp, 624bp, 및 3.46kb의 PstI 제한패턴으로 확인하고, pUC18#2라 칭했다. 삽입물은 성숙한 tPA의 첫번째 아미노산 앞의 2개의 뉴클레오타이드에서부터 3'비암호 서열의 1972 뉴클레오타이드에 걸쳐서 암호한다.

2. 벡터 pT37 (PH01ss-tPA-pUC)의 구성

PUC18#2로부터의 tPA 삽입물을 피치아 파스토리스 발현 플라스미드 pA0810 내로 클로닝하였다. 플라스미드 pA0810은 피치아 파스토리스 AOX1 프로모터, 피치아 파스토리스 PH01 신호서열, AOX1 전사 종료서열, 선택을 위한 피치아 파스토리스 HIS4 유전자, 복제의 f1 기시점, 및 세균에서 복제 및 선택에 필요한 서열로 구성된다. pA0810의 구성의 실시예 XI에서 기재한다.

1% 아가로오스겔상에서 앞서 정제한, tPA의 5'부분을 암호하는, pUC18#2의 1600bp SalI/SmaI 단편 2μg을 300ng의 XhoI/SmaI 으로 소화된 pA0910 에 연결하였다. 연결반응물은 이. 콜리 MC1061 세포내로 형질전환시켰고 ampR 집락을 선택하였다. 양성물은 PstI으로 소화시 420bp, 620bp, 2kb 및 6.3kb 단편 패턴에 의해 확인하였다. 결과의 벡터를 pT1 라 칭했다. 부위 조작 돌연변이유발은 복제벡터의 f1 기시점에 관하여 표준 방법에 따라 수행하여, 성숙한 tPA 암호서열의 5'에서 2개의 여분의 뉴클레오타이드를 삭제하였다. 돌연변이를 유발한 올리고뉴클레오타이드는 서열이 하기와 같았다 : 5' CAA TCT GTC TTC GCT TCT TAC CAA GTG ATC 3'

올바른 플라스미드는 Sal I/Sba I 으로 소화된 소형 프레프를 선별하여 확인하였다. 원래의 벡터 pT1은 제한 패턴 1.2, 2.3, 및 6.6kb를 가졌다. 올바르게 돌연변이 유발된 플라스미드는 1.2와 9.8kb의 패턴을 가졌고 pT2 - 3라 칭했다.

50μg의 pUC18#3을 Sma I/Sau 3A로 소화시켰다. tPA의 3'부분을 암호하는 72와 118bp 사이의 3개 밴드(75,90,110bp)는 8% 폴리악릴아미드 겔상에서 정제하였고 0.5μg의 Sma I/Bam HI -절단 플라스미드 pT 2-3에 연결하였다. 연결물을 이. 콜리 MC1061 세포내로 형질전환시키고 ampR 집락을 선택하였다. 양성물은 Pvu II/Apa I으로 소화된 소형-프레프에 의해 확인하였다. 올바른 플라스미드는 421bp 단편을 나타내었다(잘못된 것은 225bp 단편을 나타냈다). 올바른 벡터는 pT37라 칭했다. 5' 돌연변이유발은 올바른 서열인 것으로 나타났으나, 서열화는 플라스미드가 tPA 3'비암호 서열의 말단 뒤에 pUC18 서열을 함유함을 나타내었고, 플라스미드 pT37은 tPA 서열 바로 뒤에, pUC18로부터의 Sau 3A 단편인, 위치 1894 - 2004를 가짐을 보여 주었다.

10μg의 플라스미드 pT37을 Stu I으로 소화시키고 피치아 파스토리스 균주 KM71(aox 1, his 4)를 형질전환하기 위해 사용하였다. 형질전환체는 히스티딘 영양요구성균주에 관해 선택하였다. 형질전환체 KM71 : pT37은 PH01 신호서열이 본래의 사람 tPA 신호서열로 대체되고 3'말단에서 pUC18 서열이 제거된 것을 제외하고는, pT37과 거의 동일한 플라스미드(pT7)를 함유한 균주 KM71 : pT7와 병행하여, YNB + 2% 글리세롤에서 배양하였다. pT2의 설명은 하기에 제공한다. YNB + 2% 글리세롤에서 증식하는 각 균주 50ml 배양물을 1리터의 발효기에 파종하고 연속방식 또는 일괄공급방식으로 증식시켰다. 이 실험의 결과는 표7에서 나타낸다.

[표 8]

* tPA $\mu\text{g/L}$

실험번호	균주	신호서열	변형	내부	외부	전체	효율**
1	KM71:pT7	tPA	연속	255	60	315	.79
2	KM71:pT7	tPA	인공 공급	651	30	681	.04
3	KM71:pT37	PH01	연속	840	420	1260	.33
4	KM71:pT37	PH01	인공 공급	1856	1200	3056	.39

* 표준물로서 사람의 tPA를 사용하여 ELISA에 의해 조사한 tPA.

** tPA 분비효율 = 외부 tPA/생산된 전체 tPA.

이 실험의 결과는, 발효 방식과 무관하게 PH01 신호서열(SEQ ID NO : 3)은 피치아 파스토리스에서 tPA 분비를 촉진하는데 본래의 신호서열보다 효율적임을 나타낸다.

더우기, 마이크로-에드만 감성분석(micro-Edman degradation analysis)은 재조합체의 N-말단 아미노산 서열인, PH01 신호서열(SEQ ID NO : 3)을 사용하여, 균주 KM71 : pT3으로부터 분비된 tPA는 배양된 사람 조직(멜라노마) 공급원으로부터 정제된 본래의 tPA와 동일함을 입증하였다.

3. pT7 (tPA_{ss} - pUC 없음)의 구성

pUC18#3으로부터의 약 100bp Sma I/Sau 3A 단편 5 μg 을 500ng의 Sma I/Bam HI -절단 pT10에 연결하였다. 연결 반응물을 이. 콜리 MC1061 세포내로 형질전환시키고 ampR 집락을 선택하였다. 양성물은 Apa I/Pvu II로 소화시, 260bp 밴드가 아닌, 360bp 밴드의 존재에 의해 확인하였다. 변이된 3'말단을 서열화하여 여분의 pUC18서열이 없는 올바른 서열임을 나타냈다. 이 플라스미드는 pT49라 칭했다.

믿을 만한 t - PA 신호서열을 암호하는 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pT49의 Xba I 부위에 첨가한 다음, 2가지의 돌연변이유발을 수행하여 1) t - PA 신호서열과, 성숙한 t - PA를 암호하는 서열사이에 존재하는 여분의 8개 올리고뉴클레오타이드 서열을 삭제하고, 2) PH01 신호서열을 삭제하였다. 이들 조작은 하기와 같이 수행하였다.

하기 서열의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다(109개 뉴클레오타이드) :

5' CTA GAT GGA TGC AAT GAA GAG AGG GCT CTG CTG TGT GCT GCT GCT GTG TGG AGC AGT CTT CGT TTC GCC CAG CCA GGA AAT CCA TGC CCG ATT CAG AAG AGG AGG CAG A3'

두번째 가닥에 필요하는 상보 올리고뉴클레오타이드는 하기 서열인, 각각, 길이가 33, 37 및 39 뉴클레오타이드의 3가지 올리고뉴클레오타이드로서 합성하였다 :

5' CTG GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC ACA CAG 3'

5' CTA GTC TGG CTC CTC TTC TGA ATC GGG CAT GGA TTT C 3'

5' CAG CAG CAC ACA GCA GAG CCC TCT CTT CAT TGC ATC CAT 3'

완전한 길이의 올리고뉴클레오타이드와 3개의 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 부활시킨 다음 끓는 물의 욕조에서 3분 동안 가열하여 서로 어니일링시킨 다음, 실온으로 서서히 냉각시켰다. 어니일링된 올리고뉴클레오타이드를 분리하고5% 폴리악릴아미드 겔로부터 분리하였다.

200ng의 부분적으로 Xba I으로 선형화된 pT49를 1 μg 의 어니일링된 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드에 연결시켰다. 연결 반응물을 이. 콜리 MC1061 세포내로 형질전환시키고 ampR 집락을 선택하였다. 옳게 변경된 플라스미드를 함유하는 클론은 Asu II로 소화시 부가적인 700bp 밴드에 의해 확인되었다. 올바른 플라스미드는 pT544 라고 칭했다.

첫번째 돌연변이 유발은 pT544 DNA (5 μg)와 하기 서열 :

5' GA TTC AGA GGA GCC AGA TCT TAC CAA GTG ATC TGC AG 3'의 올리고뉴클레오타이드 (1 μg)를 사용하여 표준 f1 기재의 부위 조작 돌연변이 유발에 의해 수행하였다. 올바른 플라스미드를 Bgl II 소화로 선별하였다. 올바른 제한 패턴(1.1, 2.8 및 5.3kb)은 pT64라 칭하는 올바른 플라스미드를 나타내었다. (올바르지 않은 플라스미드는 2.8과 6.3kb 밴드의 패턴을 나타냈다.)

두번째 돌연변이 유발은 플라스미드 pT64에서 수행하여 PH01신호서열을 삭제하였다. 하기 서열의 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다 :

5'ACT AAT TAT TGG AAA CGA TGG ATG CAA TGA AGA GAG G 3'

3 μg 의 pT64와 0.4 μg 의 상기 올리고뉴클레오타이드를 돌연변이 유발시켰다. 소형 프레프를 Bgl II로 소화시켜 선별하였다. 올바른 플라스미드는 크기 1, 2.8 및 5.3kb의 3개 DNA 단편에 의해 확인되었다(올바르지 않은 플라스미드는 1kb 대신 1.1kb의 최소 밴드를 나타냈다. 돌연변이 유발은 서열화에 의해 확인하였고, 올바른 플라스미드는 pT7라 칭했다.

[실시예 X]

(pAPB101 : PH01 프로모터 - lacZ 발현 플라스미드의 구성)

이 실시예는 PH01 프로모터(또는 5' 조절 영역) (SEQ ID NO : 2)가 이중 유전자에 작동가능하게 연결될 때 기능을 발휘함을 입증한다. 1 μ g의 lacZ -함유 플라스미드 pSAOH5 (NRRL B-15862)를 Eco RI과 Bam HI 으로 소화시키고, 10.1kb 벡터 단편을 0.8% 아가로오스겔로부터 분리하였다. 5 μ g의 pLP 2420을 Eco RI과 Bcl I 으로 소화시키고 375bp의 pBR322 DNA PH01 프로모터(SEQ ID NO : 2)를 포함하여 PH01 5' 측면의 DNA ~1075bp, 및 123bp의 PH01 암호서열을 함유하는 1.6kb 단편을 1% 아가로오스겔로부터 분리하였다. pSAOH5의 Eco RI - Bam HI 단편 100ng과 pLP2420의 1.6kb Eco RI - Bcl I 단편 60ng을, 1mM ATP와 1유니트의 T4 DNA 리가아제(Boehringer Mannheim으로부터 입수 가능함)를 함유하는 20 μ l의 리가아제 완충액 혼합물에서 연결시켰다. 연결 혼합물을 이. 콜리 JM103 내로 형질전환시키고, 형질전환된 세포를, 40 μ g/ml X-gal을 함유한 LB Amp 평판 상에서 평판배양하였다. LB Amp에서 증식한 청색 집락을 선택하고 플라스미드 DNA를 분리하였다. DNA를 Eco RI과 Sma I으로 소화시키고 올바른 플라스미드를 1450bp 단편의 방출에 의해 확인하였다. 올바른 플라스미드는 pAPB101라 칭했다. 피치아 파스토리스 PH01 프로모터 요소(SEQ ID NO : 2)의 조절하에 놓인 이. 콜리 lacZ 유전자로 구성된 발현 카세트는 pAPB101에 함유되었다.

10 μ g의 절단 안 된 pAPB101 을 GS115 스페로플라스트내로 형질전환시키고 히스티딘 영양 요구성 균주를 선택하였다. 12개의 His⁺ 집락을 선택하고, 균주를 액체 고농도 인산염(Hp)과 LP 배지에서 증식시키고, β -갈락토시다제 활성을 조사하였다. 양성형질전환체 균주는 Lp 배지에서 증식시킨 후 β -갈락토시다제 발현 및 HP 배지에서 증식시킨 후 β -갈락토시다제 결여를 기초로 하여 확인하였다. β -갈락토시다제는 J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, NY 1972에 의해서 조사하였다. 청색 집락은 LP - X - gal 평판에서 나타났고 백색 집락은 HP - X - gal 평판에서 나타났다.

[실시예 XI]

하기 플라스미드는 본 출원에서 다른 실시예에 사용하기 위해 구성하였다.

1. 플라스미드 pA0810의 구성

M13mp 19 Δ RI은 1 μ g의 M13mp19를 Eco RI으로 소화시키고, 클레노우로 충전하고 충전된 단편을 그 자신에 연결시켜 구성하고, 연결물을 사용하여 이. 콜리 JM103 세포를 형질전환하고, 올바른 파지는 DNA를 분리하고 Eco RI로 소화시켜 확인 하였다. 올바른 파지는 Eco RI으로 절단되지 않았고 M13mp 19 Δ RI라 칭했다. 플라스미드 pA0804 (W089/04320에서 기재된 구성)를 Sst I과 Eco RV로 소화시키고 약 1.2kb 단편을 0.8% 아가로오스겔에서 분리시켰다. (이 구성에서 모든 단편은 0.8 - 1.0% 아가로오스겔로부터 분리되었다) 100ng의 단편을 500ng의 Sst I - 과 Sma I - 소화 M13mp19 Δ RI에 연결시켰다. 연결물을 사용하여 이. 콜리 JM103 세포를 형질전환하고, 올바른 파지는, DNA를 분리하고 그것을 Sst I과 Pvu II로 소화시켜 확인하였다. 올바른 파지는 950bp 단편의 존재에 의해 확인하였고, pPSV101 라 칭했다.

1 pmol의 pPSV101은 하기 서열 :

5'CCA GGA ATT CCC CGG GAT CCT TAG ACA T 3'

의 올리고뉴클레오티드 20pmol을 사용하여 시험관에서 올리고뉴클레오티드가 조작용, 부위 - 특이성 돌연변이유발시켰다. 반응 혼합물을 사용하여 이. 콜리 JM103 세포를 형질전환하였다. 올바른 파지는 Bal II와 Bam HI으로 소형-프레프 DNA를 소화시켜 확인하여, 1.4kb와 0.5kb의 DNA 단편의 존재는 나타내었다. 올바른 파지는 pPSV120 라 칭했다.

플라스미드 pPSV102는 Eco RI으로 소화시키고 500ng의 8.5kb 단편을, 하기의 최고로 활용되는 피치아 코돈 :

5'- AATTC ATG TTC TCT CCA ATT TTG TCC TTG GAA ATT ATT TTA GCT TTG GCT ACT

3'- G TAC AAG AGA GGT TAA AAC AGG AAC CTT TAA TAA AAT CGA AAC CGA TGA

TTG CAA TCT GTC TTC GCT GGA G - 3'

AAC GTT AGA CAG AAG CGA GCT C TTAA - 5'

을 사용하여 피치아 파스토리스 PH01 신호서열(SEQ ID NO : 3)을 암호하는 하기의 이중 가닥 합성 DNA 단편 50ng에 연결시켰다. 연결 혼합물을 이. 콜리 CJ236 세포내로 형질전환시키고, 올바른 파지 DNA는 32p로 표지된 효모의 신호서열 가닥을 암호하는 것과 플라크 교잡시키고, 교잡하는 DNA를 Sst I과 Bam HI으로 소화시켜 700bp 단편임을 확인하였다. 이 플라스미드는 pPSV103라 칭했다.

1 pmol의 pPSV103을 20pmol의 서열 :

5'CTAA TTA TTC GAA ACG ATG TTC TCT CCA ATT 3'

의 올리고뉴클레오티드로 시험관에서 돌연변이를 유발시켰다.

올바른 파지는 상기에서 사용된 것과 동일한 올리고뉴클레오티드와 플라크 교잡시켜확인하였다. 올바른 플라스미드는 pPSV104라 칭했다.

플라스미드 pA0810은 10 μ g의 pPSV104를 Hind III로 소화시키고, 1.2% 아가로오스겔로부터 400bp의 DNA 단편을 분리함으로써 제조하였다. 50ng의 이 단편을 0.8% 아가로오스겔로부터 분리한 pA0807의 7.9kb Hind III 소화 생성물(제법은 하기에서 설명됨) 250ng과 연결시켰다. 연결물을 이. 콜리 MC1061 세포내

로 형질전환시키고 ampR 집락을 선택하였다. 올바른 플라스미드는 Bam HI 과 Eco RV로 소화시 450bp 밴드의 존재에 의해 확인하였고, pA0810 이라 칭했다.

2. pA0 807의 생성

a. f1 - 복제기시점 DNA의 제조

f1박테리오파지 DNA(50 μ g)를 Rsa I과 Dra I 50유닛으로 소화시켜(제조업자의 지시에 따름) f1 복제 기시점(ori)을 함유하는 ~ 458bp DNA 단편을 방출시켰다. 소화 생성물을 동일 부피의 PCI로 추출한 후 수성 층을 동일 부피의 CI로 추출하고 최종적으로 수성상내의 DNA는 NaCl 농도를 0.2M로 조정하고 무수에탄올 2.5 부피를 첨가함으로써 침전시켰다. 혼합물을 얼음(4 $^{\circ}$ C)에서 10분 동안 정치시키고 DNA 침전물은 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리기로 10,000 x g에서 30분 동안 원심분리하여 모았다.

DNA 펠렛을 70% 수성 에탄올로 2회 세척하였다. 세척된 펠렛을 진공건조시키고 25 μ l의 TE 완충액에서 용해시켰다. 이 DNA를 1.5% 아가로오스겔상에서 전기영동시키고 ~ 458bp f1 - 복제기 시점 단편을 함유하는 겔부분을 잘라내고 겔내의 DNA를 DE81(Whatman)용지 상에서 전기용리하고 1M NaCl에서 용지로부터 용리하였다. DNA 용액을 전술한 바와 같이 침전시키고 DNA 침전물을 25 μ l의 TE 완충액에 용해시켰다(f1 - 복제기시점 단편).

b. f1 - 복제기시점을 pBR322의 Dra I 부위내로 클로닝 :

pBR322 (2 μ g)을 2 유닛의 Dra I으로 부분적으로 소화시켰다(제조업자의 지시에 따름). 반응은 PCI 추출 후 상기 단계에서 상술한 바와 같이 DNA 침전시켜 종료시켰다. DNA 펠렛을 20 μ l의 TE 완충액에 용해시켰다. 약 100ng의 이 DNA를 14 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 1유닛의 T4 DNA 리가아제와 함께 정치시킴으로써 20 μ l의 연결 완충액내의 100ng의 f1 - 복제기시점 단편(단계 a)과 연결시켰다. 연결은 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열시킴으로써 종결시킨 다음 pBR 322의 Dra I 부위(뉴클레오티드 위치 3232와 3251)내로 클론된 f1-복제기시점을 함유하는 pBRf1 - 복제기시점을 얻도록 이. 콜리 균주 JM103을 형질전환하는데 사용하였다.

c. pA0807의 생성 :

pBRf1 - 복제기시점(10 μ g)을 Pst I과 Nde I 각각 10유닛으로 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 소화시켰다. 소화된 DNA를 PCI 추출하고, 침전시키고 상기 단계 1에서 상술된 바와 같이 25 μ l의 TE 완충액에 용해시켰다. 이 물질을 1.2% 아가로오스겔상에서 전기영동시키고 f1-복제기시점을 함유하는 Nde I - Pst I 단편 (약 0.8kb)을 분리하고 상기 단계에서 상술된 바와 같이 20 μ l의 TE 완충액에서 용해시켰다. 약 100ng의 이 DNA를 Pst I과 Nde I으로 소화시키고 인산효소로 처리한 100ng의 pA0804와 혼합하였다. pA0804의 설명은 w089/04320에서 제공된다. 이 혼합물은 14 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 1유닛의 T4 DNA 리가아제와 함께 정치시킴으로써 20 μ l의 연결 완충액에서 연결시켰다. 연결 반응은 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열함으로써 종료시켰다. 이 DNA를 사용하여 이. 콜리 균주 JM103을 형질전환시켜pA0807을 얻었다.

[실시예 XII]

(pPSV 218의 구성)

pLP2420의 1.6kb EcoRI/Bcl I 단편 200ng, pPG 2.5(참조, 하기 설명)의 0.8 kb Bgl II/Hin dIII단편 100ng, 및 pUC8(New England Biolabs, Inc.)의 2.6kb Eco RI/Hin d III 단편 100ng을 20 μ l 부피의 연결 완충액, 1mM ATP, 1유닛 T4 리가아제내의 3부분 연결물에서 연결시키고 Amp 내성을 위해 이. 콜리 균주 MC1061 내로 형질전환시켰다[플라스미드 pPG 2.5는 알코올 옥시다제 프로모터를 함유하는, pBR 322에 배치된 pPG4.0(NRRL B -15868)의 2.5kb Eco RI - Sal I 단편임]. 내성 클론은 2.4kb Eco RI+Hind III 단편을 함유한 플라스미드에 관해 조사하고, 올바른 플라스미드는 pPSV201 이라 칭했다. 50ng의 pPSV201을 Bam HI으로 소화시키고, 탈인산시키고, Bam HI 부위를 Bgl II 부위로 전환시키는 하기 서열 :

5'- GATCAGATCT - 3'

을 갖는 50배물 과량의 올리고뉴클레오티드와 연결시켰다. 양성 클론은 이것을 기재로 하여 확인하였고 플라스미드는 pPSV203이라 칭했다. 10ng의 pPSV203을 제한량의 Hin d III로 부분적으로 소화시키고 클레노우로 절단시켰다. 선형의 완전한 길이의 플라스미드 단편을 겔 정제하고 100 μ l부피에서 자기-연결시켰다. 올바른 클론은 1350bp Bgl II/Hin a III 단편을 함유하는 플라스미드 DNA를 기재로 하여 확인하였고 올바른 플라스미드는 pPSV210 이라 칭했다.

pLP2420의 500bp Bgl II - Bam HI 단편 60ng을 100ng의 Bam HI 으로 소화된 pUC 8과 연결시켰다. 올바른 플라스미드는 422bp Eco I - Bam HI 단편을 기재로 하여 확인하였고, 결과의 플라스미드는 pPSV202 라 칭했다.

50ng의 pPSV202을 Bam HI 으로 소화시키고, 탈인산하고, Bam HI 부위를 Bgl II 부위로 전환시키는 서열 5'- GATCAGATCT - 3'을 갖는 50배물 과량의 올리고뉴클레오티드와 연결시켰다. 올바른 플라스미드는 422bp Nco I / Bgl II 단편을 기재로 하여 확인하였고, pPSV204 라 칭했다.

10 μ g의 pPSV210을 Bgl II 와 Sac I으로 소화시키고, 700bp 단편을 겔로 정제하였다. 25ng의 이 단편을 pA0810의 겔정제된, 8200bp Bgl II/ Sac I 단편 100ng과 연결시켰다. 올바른 플라스미드는 700bp Bgl II/Sca I 단편의 존재에 의해 확인하고 pPSV212라 칭했다. 10 μ g의 pPSV212를 Sph I으로 소화시키고, T4 DNA 폴리머라제(Maniatis 일동제 의해)로 끝을 절단하고, Bgl II로 부분적으로 소화시키고, 8000bp 단편을 겔정제하였다. 10 μ g의 pPSV204를 Nco I으로 소화시키고, 콜레노우로 끝을 절단하고, Bgl II로 소화시키고, 440bp 단편을 겔로 정제하였다. pPSV212로부터의 전술한 8kb 단편 100ng을 pPSV204로부터의 440bp 단편 15ng에 연결하였다. 올바른 플라스미드는 5500bp Bgl II 단편을 기재로 하여 확인하고 pPSV218 라 칭했다.

실시예들은 단지 본 발명의 실시를 설명하기 위해 제공되었고 본 발명의 범위 또는 첨부되는 청구범위를 제한하도록 읽혀져서는 안 된다.

본 발명의 정수 및 정신을 이탈함이 없는, 타당한 변이 및 변형은 원하고 추구되는 특허 보호의 범위내 인 것으로 속고된다.

서열 리스팅

(1) 일반적인 정보 :

(i) APPLICANT: Richard G. Buckholz

(ii) TITLE OF INVENTION: Pichia pastoris Acid Phosphatase Gene

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: RICHMOND, PHILLIPS, HITCHCOCK & UMPHLETT

(B) STREET: P.O. Box 2443

(C) CITY: Bartlesville

(D) STATE: OK.

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 74005

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: diskette

(B) COMPUTER: IBM PC

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Display Write 4

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 07/627,539

(B) FILING DATE: December 14, 1990

(C) CLASSIFICATION:

(vii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Jack E. Phillips

(B) REGISTRATION NUMBER: 19,903

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 32427

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) Telephone: 1-918-661-0520

(2) SEQ ID NO : 1에 관한 정보 :

(i) 서열 특성

(A) 길이 : 1994 bp

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥 : 단일

(D) 위상 : 선형

(ii) 분자 유형 : 게놈 DNA

(xi) 서열 설명 : SEQ ID NO : 1 :

GGATCCCTAT TGTTACTTTT GCTTAACATT CGAATATTCT TCAACGGTTA ATTSATTAAC 60
 ACTGTAACCT CTGCCCATGT GCTTGATCCA AATCTGGTAA TCTGCTTTCT ATTTCTGCCA 120
 AAATAGTTAA TCTATGAGAC ATGTGCCCTC AATTGCGCAG TAGATCGAGT GGAAGTCTTC 180
 TTTCGCTAAC ACTCAAAGTA TATCCCTGTT AGTCTTTATT CACCTGTTCG TGCATTGGTG 240
 TCAGTTACCA TTATTGTTTC CACTTGAAA AGCTTGTTTT TTTTGATAG CACAGAAACG 300
 TGGGCTCCGA TAAGCTAAAC TTCAACGAGA ATATAAAGC TGAAAAGATT CTGTCAAGA 360
 ACTTGTAACA CGACCAATAA GTCTTCAAG GCATCAGAC ATG TTT TCT CCT ATT CTA 417
 Met Phe Ser Pro Ile Leu
 -20

AGT CTG GAA ATT ATT CTC GCT TTG GCT ACT CTC CAA TCA GTC TTT GCG GTT 468
 Ser Leu Glu Ile Ile Leu Ala Leu Ala Thr Leu Gln Ser Val Phe Ala Val
 -15 -10 -5 1

GAG TTG CAG CAC GTT CTT GGA GTC AAC GAC AGA CCC TAT CCT CAG AGG ACA 519
 Glu Leu Gln His Val Leu Gly Val Asn Asp Arg Pro Tyr Pro Gln Arg Thr
 5 10 15

GAT GAT CAG TAC AAC ATT CTG AGA CAT CTG GGA GGC TTG GGC CCC TAC ATC 570
 Asp Asp Gln Tyr Asn Ile Leu Arg His Leu Gly Gly Leu Gly Pro Tyr Ile
 20 25 30 35

GGT TAC AAT GGA TGG GGA AIT GCT GCT GAG TCT GAA AIT GAA TCC TGT ACG 621
 Gly Tyr Asn Gly Trp Gly Ile Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Ser Cys Thr
 40 45 50

ATT GAT CAG GCT CAT CTG TTG ATG AGA CAT GGA GAA AGA TAC CCA AGT ACC 672
 Ile Asp Gln Ala His Leu Leu Met Arg His Gly Glu Arg Tyr Pro Ser Thr
 55 60 65

AAT GTG GGG AAA CAA CTA GAA GCT TTG TAC CAG AAA CTA CTA GAT GCT GAT 723
 Asn Val Gly Lys Gln Leu Glu Ala Leu Tyr Gln Lys Leu Leu Asp Ala Asp
 70 75 80 85

GTG GAA GTC CCT ACA GGA CCA TTG TCT TTC TTT CAA GAC TAT GAT TAC TTC 774
 Val Glu Val Pro Thr Gly Pro Leu Ser Phe Phe Gln Asp Tyr Asp Tyr Phe
 90 95 100

GTC TCT GAC GCC GCT TGG TAC GAG CAA GAA ACA ACT AAG GGT TTC TAC TCG 825
 Val Ser Asp Ala Ala Trp Tyr Glu Gln Glu Thr Thr Lys Gly Phe Tyr Ser
 105 110 115 120

GGG TTA AAC ACC GCT TTC GAT TTT GGT ACC ACT TTG AGA GAA CGA TAT GAA 876
 Gly Leu Asn Thr Ala Phe Asp Phe Gly Thr Thr Leu Arg Glu Arg Tyr Glu
 125 130 135

CAT TTG ATA AAC AAT AGC GAA GAA GGA AAG AAA CTT TCT GTT TGG GCT GGC 927
 His Leu Ile Asn Asn Ser Glu Glu Gly Lys Lys Leu Ser Val Trp Ala Gly
 140 145 150

TCT CAA GAA AGA GTT GTT GAC AAC GCA AAG TAC TTT GCT CAA GGA TTT ATG 978
 Ser Gln Glu Arg Val Val Asp Asn Ala Lys Tyr Phe Ala Gln Gly Phe Met
 155 160 165 170