



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0076573

(43) 공개일자

2007년07월24일

(21) 출원번호 10-2007-0056478(분할)

(22) 출원일자 2007년06월11일

심사청구일자 2007년06월11일

(62) 원출원 특허10-2005-0113841

원출원일자 : 2005년11월26일

심사청구일자

2005년11월26일

(71) 출원인 부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자 최태진

부산 해운대구 좌동 1288 대동타운 508동 2202호

정혜경

부산 남구 대연1동 884-11 태승빌라 502호

(74) 대리인 최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 한국에서 분리한 클로렐라 바이러스 에스에스-2 유래 초기발현 유전자 프로모터 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 충남 서산 지방의 담수에서 분리한 클로렐라 바이러스 SS-2에서 유래한 프로모터 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 바이러스의 복제에 필요한 단백질을 코딩하고 있고, 숙주의 전사 기관에 의하여 바이러스가 복제되기 이전에 발현하는 초기 발현 유전자로부터 분리한 프로모터 5종과, 이를 함유하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 미세조류를 이용한 목적단백질의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 초기 발현 유전자 프로모터는 클로렐라에서 외래 유전자를 강력하게 발현하는 기능을 가지고 있어, 클로렐라 및 식물에서 고농도의 재조합단백질을 제조할 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

클로렐라 바이러스 SS-2 유래 초기 발현 유전자로부터 분리한, 서열번호1을 갖는 조절 단백질 프로모터.

청구항 2.

제 1항의 프로모터(서열번호1)를 포함하는 재조합 벡터를 박테리아, 곰팡이 및 효모로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 숙주에 도입시켜 수득되는 형질전환 미생물.

청구항 3.

제 1항의 프로모터(서열번호1)를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류.

청구항 4.

제 3항의 형질전환된 미세조류를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 제조 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 국내에서 분리된 클로렐라 바이러스 SS-2 균주 유래의 프로모터 및 그 용도에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 바이러스의 복제에 필요한 단백질을 코딩하고 있고 숙주의 전사 기관에 의하여 바이러스가 복제되기 이전에 발현하는 초기 발현 유전자로부터 분리한 프로싸이클린(procyclin precursor) 전구물질 프로모터, 아스파르트-tRNA(aspartyl-tRNA)합성효소 프로모터, 조절 단백질 프로모터, 헬리케이스 프로모터에 관한 것이다. 클로렐라 바이러스 SS-2 균주 유래의 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하고 있는 유전자 프로모터와 이를 함유하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 미세조류를 이용한 목적단백질의 제조방법에 관한 것이다.

형질전환 식물을 이용하여 단백질을 생산하는 것은 응용식물 생명공학의 새로운 분야로서 분자유전학, 식물세포생리학, 식물형질전환 기법을 이용한 분자농업이라고 할 수 있다. 형질전환 기술의 발전으로 1980년대부터 형질전환 식물의 조직으로부터 외래 단백질의 생산과 정제에 관한 보고가 있었으며(참조: Hiatt, A. et al., Nature., 76-78, 1989; Salmon, V. et al., Protein Expr Purif., 127-135, 1998), 형질전환 식물을 이용하여 외래 단백질을 생산하는 방법은 기존의 다른 단백질 발현 시스템보다 이용 가능성이 높은 고가의 단백질을 산업화 수준으로 생산할 수가 있다(참조: Zhong, R. et al., Plant Physiol., 53-64, 1999).

이중에서도 최근 단세포 진핵 녹조류인 클로렐라가 생물반응기로서의 활용이 각광받고 있는데, 이는 클로렐라가 이중 단백질 발현에 적합한 시스템을 지녔기 때문이다. 일정량의 빛과 탄소원만 있으면 값싸게 대량 배양이 가능하며 하루에 2~9번 분열하기 때문에 성장속도가 빠르다 (참조: Sorokin, C. et al., Plant Physiol., 179-183, 1958). 또한 진핵생물인 클로렐라는 일반 진핵생물들과 마찬가지로 유전자를 전사한 후 변형 과정을 거치므로, 이중 진핵생물의 유전자로 형질전환시킬 경우, 생물학적 활성을 지닌 단백질을 만들 수 있는 등의 이점이 있다. 클로렐라에서의 동종 또는 이중 구성형 단백질의 일시적인 발현은 1990년대부터 보고되었으며(참조: Javis, E. E. et al., Curr Genet., 317-321, 1991; Dowson, H.N. et al., Curr Microbiol., 356-362, 1997; Hawkins, R.L. et al., Curr Microbiol., 335-341, 1999), 최근에는 클로렐라에서 넙치 성장 호르몬을 안정적으로 발현시킨 연구가 보고되었다 (참조: Kim, D.H. et al., Mar. Biotechnol., 63-73, 2002).

개발가능성을 가진 유전자의 수는 엄청나며 앞으로는 이들의 분리 및 구조해석과 더불어 삽입 유전자를 어떤 생물체에서 어느 시기 또는 어떤 조직에서 발현시키느냐가 중요한 과제이다. 하지만 외래 유용 유전자의 발현은 목적유전자를 분리하

고, 적합한 형질전환 식물체를 선택하는 것만으로 충족될 수 없다. 형질전환 식물을 이용하여 저비용으로 부가가치가 높은 단백질을 대량으로 생산하기 위해서, 우선적으로 고려되어야 할 여러 조건 가운데 하나가 식물에서 높은 활성을 가지는 프로모터를 개발하는 것이다 (참조: Norre, F. et al., Plant Mol Biol., 699-712, 2002).

지금까지 개발된 프로모터 가운데 식물에서 기원한 프로모터의 수는 많지 않기 때문에 과학자들은 식물 바이러스와 뿌리혹박테리아 Ti플라스미드의 프로모터에 많은 관심을 가져왔다. 식물 단백질 발현 분야에서 최초이자 가장 중요한 발명 중의 하나는 유전자 변형 식물에서 이중 유전자를 강력하고 구성적으로 발현시키는 식물 바이러스 유래의 프로모터를 사용하게 된 것이다. 콜리플라워 모자이크 바이러스[Cauliflower mosaic virus(CaMV)]로 부터의 35S 및 19S 프로모터가 분리되어 널리 이용되고 있으며(유럽특허 제0131623호), 그 밖에 아그로박테리움의 T-DNA에서 유래한 노파린 합성 유전자(nos), 만노핀 합성 유전자(mas) 및 옥토펜 합성 유전자(cos) (유럽특허 제0122791호, 유럽특허 제0126546호, 유럽특허 제0145338호), 그리고 식물 유래 유비퀴틴 프로모터가 이용되고 있다 (유럽특허 제342926호).

이중 모자이크 바이러스(CaMV)의 35S 프로모터는 식물에서 도입시킨 유전자를 지속적이고 효율적으로 발현시키기 위해 가장 널리 사용되고 있는 프로모터 중의 하나로 상기 기재된 외래 유용 단백질의 생산에 대부분 이용되었다. 하지만 이 프로모터는 모든 숙주식물에서 상기 강력한 발현을 유도하는 것은 아니어서, 쌍떡잎 식물에서 보다 유용하게 사용되고 있으며 프로모터의 염기서열 중 21bp가 뿌리에 집중적인 조직발현을 유도한다고 보고되기도 있다 (참조: Lam, E. et al., PANS, 7890-7894, 1989). 이에, 이들 프로모터의 발현 수준을 높이기 위한 시도가 있어 왔는데, 그에 대한 예로는 두 배로 강화된 35S 프로모터(미국특허 제5,164,316) 및 아그로박테리움 프로모터의 부분들을 결합시킨 슈퍼프로모터(유럽특허 제729514호)가 있다.

또한, 최근에는 빛이나 온도, 스트레스에 반응하여 유전자 발현을 조절하는 프로모터들이 분리, 보고되고 있으며, 대표적으로 피옥시다제의 유전자 프로모터가 식물에서 보고되었다 (참조: Kwak, S.S. et al., Plant Mol. Biol., 831-838, 2003.). 피옥시다제는 노화와 질병의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 항산화물질의 일종으로 특히 상처나 저온, 자외선, 오존 등에 의하여 강하게 발현된다. 이 프로모터의 경우 항암제인 택솔 등 고부가가치의 치료용 단백질 및 약리활성물질 등을 생산하는데 활용되며 장기적으로 환경스트레스 조건에서도 잘 자라는 환경내성 식물 개발에도 활용될 전망으로 있다.

그러나 상기 기재된 모든 프로모터들은 분명한 형태의 조직, 또는 생장 특이적인 발현은 나타내지만, 넓은 범위에서 동일한 발현률을 나타내지는 못하므로 각각의 경우 특이적인 프로모터 개발을 필요로 하기 때문에 이상적인 프로모터의 기준을 충족시키지는 못한다. 따라서, 식물뿐만 아니라 형질전환된 미세조류를 이용하여 유용 단백질을 생산하려는 노력이 시도되고 있는 시점에서, 이에 적합한 프로모터의 개발이 동시에 수반되어야 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 형질전환 미세조류에서 이중유전자를 강력하게 발현할 수 있는 프로모터를 개발하고자 예의 노력한 결과, 국내에서 분리된 클로렐라 바이러스 SS-2 균주의 초기 발현 유전자의 프로모터를 분리하고, 이를 이용한 벡터를 제작하여 클로렐라에서 외래 유전자를 강력하게 발현하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 클로렐라 바이러스 유래의 신규 프로모터를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 초기 발현 유전자 프로모터를 포함하는 벡터 및 상기 초기 발현 유전자 벡터로 형질전환된 미세조류를 이용한 목적단백질의 제조방법을 제공하고, 상기 재조합 벡터를 박테리아, 곰팡이 및 효모로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 숙주에 도입시켜 수득되는 형질전환 미생물과 식물체 및 그들을 배양하는 것을 특징으로 하는 목적 단백질의 제조 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명자들은 한국에서 분리된 클로렐라 바이러스 SS-2 균주로부터 유래하는 바이러스의 복제에 필요한 단백질을 코딩하고 있고 숙주의 전사 기관에 의하여 바이러스가 복제되기 이전에 발현하는 초기 발현 유전자 중 5가지인 프로싸이클린 전구물질 (procyclin precursor), 아스파르트릴-tRNA(aspartyl-tRNA) 합성효소, 조절 단백질, 헬리케이스, 그리고 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하고 있는 유전자의 프로모터 부분을 분리하여 그 활성을 조사하고, 상기 초기 발현 유전자 프로모터의 염기서열 분석을 통하여 TATA 박스, CAAT 박스, GATA 박스 그리고 CCAAT 박스를 포함하여 전사에 영향을 미칠 것으로 보이는 시스 활성 요소(cis-acting element)가 존재한다는 것을 확인하였다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

피코드나비리데(*Phycodnaviridae*)에 속하는 클로렐라 바이러스는 330kb이상의 선형 DNA를 지니며, 200-300개의 단백질을 코딩하고 있다. 클로렐라의 형질전환 시스템에 사용될 수 있는 강력한 프로모터를 분리하기 위하여 한국의 담수에서 분리한 클로렐라 바이러스 SS-2의 게놈 DNA를 부분적으로 분석하여 전체 약 340 kb의 선형 DNA 게놈중 각 끝부분에 해당하는 약 20 kb를 제외한 300 kb 이상의 염기 서열을 분석하였다. 클로렐라 바이러스는 유전자의 전사과정에 필요한 DNA 의존형 RNA 중합효소를 가지고 있지 않는 것으로 알려져 있으며, 따라서 바이러스 감염초기에 발현되는 초기 유전자들은 숙주의 효소에 의하여 전사가 일어난다. 따라서 이러한 유전자의 프로모터를 분리하여 형질전환용 벡터를 구축하고 이들 프로모터 뒤에 외래 단백질 유전자를 추가할 경우 형질전환 식물이나 미세조류에서 이들 단백질 생산이 가능하다. 본 발명에서는 SS-2의 초기 유전자 중 프로사이클린 전구물질 (procyclin precursor), aspartyl-tRNA 합성효소, 조절 단백질, 헬리케이스, 그리고 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하고 있는 유전자의 프로모터를 이용하였다. 그리고, 이들 프로모터 부위의 염기서열을 분석한 결과 유전자 발현을 조절하는 단백질들인 전사요소(transcriptional factor)가 결합하는 TATA 박스, CAAT 박스, GATA 박스 그리고 CCAAT 박스 등이 존재함을 확인하였다. 그 중, 서열번호1은 SS-2의 초기 유전자 중 조절 단백질 프로모터를 암호화하는 시퀀스를 나타내는 것이다.

본 발명에서 사용되는 미세조류는 그 종류가 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면, 클로렐라 엘립소이데아, 클로렐라 소로키니아나, 클로렐라 불가리스 등의 클로렐라, 스피루리나(*spirulina*), 나노클로로프시스(*Nannochloropsis*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 케오세로스(*Cheoceros*) 이소크리오시스(*Isochrysis*), 팔브로바(*Pavlova*), 피오닥티룸(*Phaeodactylum*), 스킴리토네마(*Skeletonema*), 나비쿨라(*Navicula*), 칼로네이즈(*Calonase*) 등이 있다.

이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 이들 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 국한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야 및 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

특히, 하기 실시예에서는 목적단백질로 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP)만을 예시하였지만, GFP 대신에, 효소, 효소저해제, 호르몬, 호르몬 유사체, 항체, 신호전달단백질, 단일사슬항체, 항원, 펩타이드, 폴리펩타이드, 결합단백질, 결합도메인, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 각종 조절 인자 및 그들의 일부분 등을 포함하는 목적단백질을 본 발명의 프로모터를 이용하여 발현시키는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

또한, 본 발명의 벡터를 클로렐라에 형질전환시켜 재조합 단백질의 발현을 확인하였지만, 그 외의 담배, 애기장대, 토마토 등의 식물체에 형질전환시켜 재조합 단백질을 제조할 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

실시예 1: 클로렐라 바이러스의 분리

본 발명에 사용된 클로렐라 바이러스 SS-2 균주는 충남 서산의 연못에서 분리하였다. 먼저, 수집된 민물을 0.22 μm 의 Al_2O_3 필터(Whatman, 미국)를 사용하여 약 20 kPa의 압력으로 여과시켰다. 본 실시예에서는 클로렐라(*Chlorella*) NC64A를 MBBM배지(modified Bold's basal medium)(참조: Van Etten, J.L. *et al.*, *Virology*, 126:117, 1983)에서 배양하였다.

상기 여과시킨 민물시료 5 ml을 100 ml의 클로렐라 NC64A의 배양액 100 ml에 첨가하고, 25°C의 광조건에서 5일간 진탕 배양하였다. 클로렐라 배양액이 완전히 용해된 후, 상층액을 10^{-6} ~ 10^{-7} 배 희석한 후 5 μl 를 취하여, 4 ml의 클로렐라 (4.0×10^8 cells/ml), 2 ml의 0.75% (in MBBM 배지) 아가(agar)와 혼합한 후 1.5% 아가가 첨가된 MBBM 배지가 들어있는 배양접시 위에 깔았다. 배양접시에 형성된 단일 플라크(plaque)를 취하여 100 ml 새로운 클로렐라 배양액에 접종하였다. 상기 클로렐라의 용해액을 새로운 배양접시에 접종하고 단일 플라크를 얻는 과정을 3회 반복하여 순수한 클로렐라 바이러스를 분리하여, 8종의 클로렐라 바이러스를 얻었다.

실시예 2: 클로렐라 바이러스의 정제

실시예 1에서 분리한 바이러스를 포함한 클로렐라 NC64A가 완전히 용해될 때까지 배양한 후, 용해액을 5000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브로 옮겨, 트리톤(Triton) X-100을 최종농도 0.1%가 되도록 첨가한 후, 4°C에서 20분간 섞어주었다. 섞어진 용액을 20,000 rpm에서 60분간 원심분리하여, 바이러스 입자를 침전시켰다. 상기 과정에서

얻어진 침전물을 50 mM Tris-버퍼(buffer)(pH 7.8)에 현탁시켜, 10~40% 비연속 슈크로오스(sucrose) 그라디언트용액에서 4℃, 20,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 바이러스가 포함된 30~40% 구간의 분획을 수득하여, 27,000 rpm에서 3 시간 동안 원심분리하여 침전시킨 후, 50 mM Tris-HCl 버퍼에 현탁시켜 게놈 DNA 분리에 사용하였다.

실시에 3: 클로렐라 바이러스 게놈 DNA의 분리

정제된 클로렐라 바이러스 400 μ l에 60 μ l의 10× TEN 버퍼[100 mM Tris-HCl(pH7.4), 10 mM EDTA, 1 M NaCl], 60 μ l의 1% Na-살코실(salcosyl), 0.6 μ l의 60%(w/w) CsCl 및 소량의 EtBr을 첨가하고, 75℃에서 15분간 반응시킨 후, 반응용액을 40~60%(w/w) CsCl 그라디언트 용액 위에 첨가한 후, 25℃, 35,000 rpm에서 18시간 동안 원심분리 하였다. EtBr로 표지된 바이러스 게놈 DNA를 포함한 부분을 수득한 후, 부탄올을 사용하여 EtBr을 추출하여 제거하였다. 바이러스 게놈 DNA는 에탄올로 침전시켜, 1× TE 버퍼[10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA]에 현탁시켰다.

실시에 4: 클로렐라 바이러스의 초기 발현 유전자 프로모터의 분리 및 분석

본 발명에서 분리한 클로렐라 바이러스 SS-2의 초기 발현 유전자 프로모터를 분리하기 위하여 프로싸이클린 전구물질(procyclin precursor), 아스파르틸-tRNA(aspartyl-tRNA) 합성효소, 조절 단백질, 헬리케이스, 그리고 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하고 있는 유전자의 상류 부분 약 420 bp를 포함하는 DNA 단편이 증폭될 수 있도록 SS-2의 염기 서열을 기본으로 하여 제작한 프라이머로 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)하였다. DNA 단편은 PCR 증폭 혼합액 (50~100 ng DNA, 10× 버퍼 (100 mM Tris-Cl(pH8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTP, 4 μ l Taq polymerase (5 u/ μ l) 그리고 100 pmol의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머)을 PCR 기기에 넣고 35회의 PCR 반응을 수행하였으며 PCR 반응은 94℃에서 10분간의 predenaturation, 94℃에서 1분간 denaturation, 59℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 그리고 72℃에서 7분간의 postextension을 수행하였다. SS-2로부터 분리한 초기 발현 유전자 프로모터는 데이터베이스, 식물 시스 활성 조절 DNA 요소(plant cis-acting regulatory DNA element, PLACE)를 이용하여 분석한 결과, TATA 박스, CAAT, GATA 박스 그리고 CCAAT 박스가 확인되었다 (참조: 도 1).

실시에 6. 클로렐라 형질전환 벡터의 제작

실시에 5에서 수득한 클로렐라 바이러스 유래의 프로모터가 형질전환 벡터에 사용 가능한지를 확인하기 위하여, 상기 SS-2의 초기 발현 유전자 프로모터 부위를 가지는 형질전환 벡터를 제작하였다. 본 실시예의 형질전환 벡터는 도2에 나타난 pCTV 벡터(참조: Kim, D.-H. et al., Mar. Biotechnol. 4(1):63-73)를 변형하여 제작하였다. 상기 pCTV 벡터는 식물 형질전환 벡터를 변형한 것으로, 클라미도모나스 유래의 RBCS2 프로모터를 가지고, 넓치 성장 호르몬 유전자(fGH)와 선택 마커로 플레오마이신 저항성 유전자(sh ble)가 삽입되어 있다. 먼저 pCTV 벡터를 제한효소 *Bam*HI/*Xho*I로 처리하여 fGH 유전자를 제거하고, 상기 제거 위치에 GFP 유전자를 삽입하여 pMinGFPble를 제작하였다. 상기 벡터는 CaMV35S 프로모터의 조절 하에 GFP 유전자를 발현하게 되는데, 이 벡터를 제한효소 *Hind*III/*Bam*HI로 절단하여 CaMV35S 프로모터 부위를 제거하고, 상기 제거 위치에 SS-2의 초기 발현 유전자 프로모터를 삽입하여 클로렐라 형질전환 벡터를 제작하였다 (참조: 도3).

실시에 7. 클로렐라 형질전환 벡터를 이용한 재조합 단백질의 제조

실시에 6에서 제작한 클로렐라 바이러스의 초기 발현 유전자 프로모터를 가지는 벡터는 클로렐라 불가리스 (한국해양미세조류은행 KMCC FC-001)에 형질전환시켰다. 클로렐라 불가리스의 원형질체(1×10^8)를 400 xg에서 5분 동안 원심분리하여, 0.6 M 소르비톨/만니톨이 함유된 MBBM 배양액(배지조성 또는 제조사)으로 침전물을 재현탁시켰다. 클로렐라가 현탁된 튜브는 다시 400 xg에서 5분동안 원심분리하고, 0.05 M CaCl₂가 함유된 0.6 M 소르비톨/만니톨 용액 1 ml로 침전물을 재현탁시켰다. 그런 다음, 1×10^8 세포수의 원형질체를 각각 0.4 ml씩 4개의 새 튜브로 옮기고, 상기 튜브에 각각 4 μ g의 클로렐라 형질전환 벡터와 담체로써 송아지 흉선세포 DNA(Sigma Chemicals) 25 μ g를 첨가하였다. 상기 튜브를 상온에서 15분 동안 반응시킨 후, 200 μ l의 PNC(0.8 M NaCl, 0.05 M CaCl₂, 40% PEG 4000(Sigma))을 첨가하고, 상온에서 30분 동안 혼합하였다.

그 후, 0.6 M 소르비톨/만니톨, 1% 효모추출액 및 1% 글루코오스가 함유된 MBBM 배양액 0.6 ml를 첨가하고, 25℃의 압 조건 하에서 12시간 동안 배양하여, 클로렐라의 세포벽을 재형성시켰다. 세포들을 선택마커인 플레오마이신(1 μ g/ml)이

함유된 신선한 MBBM 배지에 옮기고, 25℃의 암조건 하에서 배양하였다. 배양 5일 경부터, 클로렐라의 성장을 관찰할 수 있었으며, 15일 경에 세포성장은 정지기(stationary phase)에 도달하였다. 반대로, 형질전환되지 않은 원형질체에서는 성장을 관찰할 수 없었다.

상기 배양된 클로렐라 형질전환 벡터로 형질전환된 클로렐라 불가리스에서 생성되는 GFP의 형광을 측정하여, 본 발명의 초기 발현 유전자 프로모터에 의한 GFP 유전자의 발현능을 확인하였다.

도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 클로렐라 바이러스 유래의 초기 발현 유전자 프로모터를 가지는 클로렐라 형질전환 벡터로 형질전환된 클로렐라가 CaMV35S 프로모터를 가지는 pMinGFPble로 형질전환된 클로렐라와 마찬가지로 GFP를 생성하는 것을 확인할 수 있었고 형광 분광계를 이용하여 GFP의 발현 세기를 측정하여 그 값을 상대적인 수치로 비교하여 보았을 때, aspartyl-tRNA 합성효소 프로모터가 가장 높은 발현율을 나타내었다 (참조: 도5).

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 목적 유전자를 강력하게 발현하는 클로렐라 바이러스 유래의 신규 초기 발현 유전자 프로모터와 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 미세조류를 이용한 목적 단백질의 제조 방법을 제공한다. 또한 본 발명의 프로모터를 이용하면, 클로렐라 및 식물에서 고농도의 재조합 단백질을 제조할 수 있어, 저 비용으로 고부가 가치의 단백질을 대량으로 생산하는 분자농업과 식물에 특정기능을 첨가 또는 개선 시키고자 하는 유전공학분야에도 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 클로렐라 바이러스 SS-2 유래 초기 발현 유전자로부터 분리한 프로싸이클린 전구물질 프로모터의 핵산 염기서열과 각 프로모터의 염기서열을 나타낸 모식도이다.

도 2은 클로렐라 형질전환 재조합 벡터인 pCTV의 모식도이다.

도 3은 조절 단백질 프로모터를 포함하는 재조합 벡터의 모식도이다.

도 4의 (A)는 야생형의 클로렐라, (B)는 벡터 pMinGFPble로 형질전환된 클로렐라, (C)는 프로싸이클린 전구물질 프로모터가 결합된 벡터로 형질전환된 클로렐라, (D)는 aspartyl-tRNA 합성효소 프로모터가 결합된 벡터로 형질전환된 클로렐라, (E)는 조절 단백질 프로모터가 결합된 벡터로 형질전환된 클로렐라, (F)는 헬리케이스 프로모터가 결합한 벡터로 형질전환된 클로렐라, (G)는 기능이 알려지지 않은 단백질을 코딩하고 있는 유전자 프로모터가 결합된 벡터로 형질전환된 클로렐라에서 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현을 형광현미경으로 관찰한 사진이다.

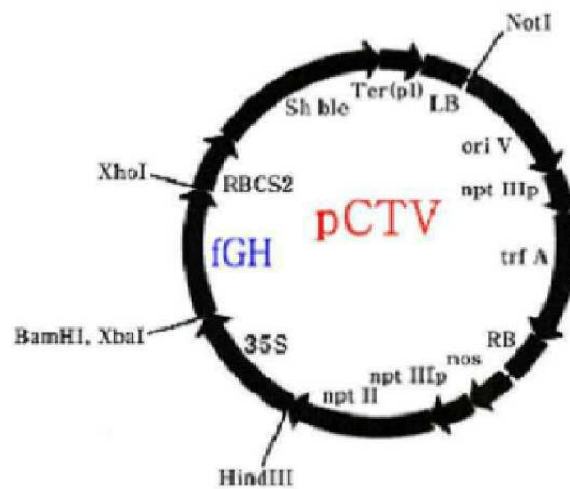
도 5는 상기 도 4의 야생형 클로렐라를 제외한 형질전환된 클로렐라에서 GFP의 발현 세기를 형광 분광계로 측정하고 그 값을 상대적인 수치로 표현하여 비교한 모식도이다.

도면

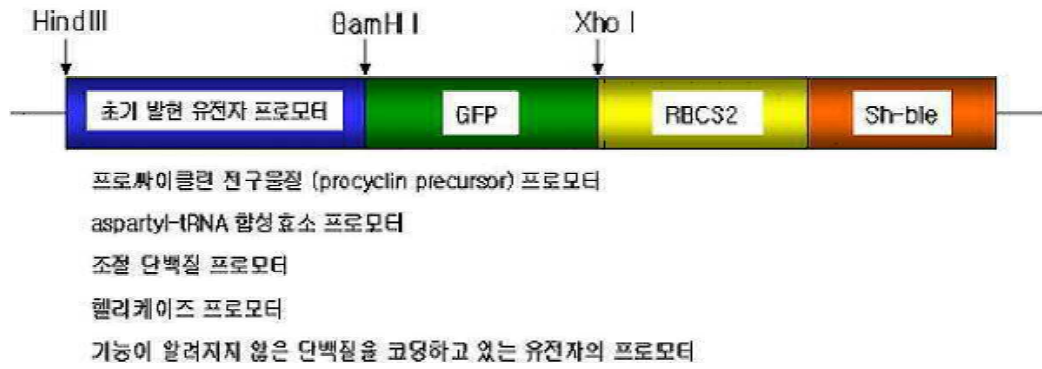
도면1

CCCAAGCTTGTAGAATTAGAGAACGTTTGTAGACCTGTTTATATATCTTCGGTGTGGTA 60
 TATA box (-)
 TATA box (+)
 GGAAAACGAGGTCCAGTACCCGGTTGGGTATTGCCGGCGACGATAGCATCCGTGGTTTTG 120
 CAAT box (-) GATA box (+)
 TTGGTTCTTATATTGATTACCTTGATCAAAATTTACGAGAGTATGACCACTGGAAAGTGC 180
 CAAT box (-) GATA box (+)
 ATGATGTGTGGGACCAATACATAAAAAATGACAAATGACAAATAATGACAACCGTCATATG 240
 CAAT box (+) TATA box (-) GATA box (-)
 AACAAGAAAAGCATTTAAGCAACTGTTTTCACACTAACTCATCTTCCTCCTTCGGGAC 300
 TACCATCTGAACAACTACTGTACAAACAAACAAACAAACAAACGCTCTCCGTAAAC 360
 AAACCTCAATTAACCCTCAAAACAACTCCCAAAGAAAAGAACATATTTACTGGATCCGCG(ATG) 419
 CAAT box (+)

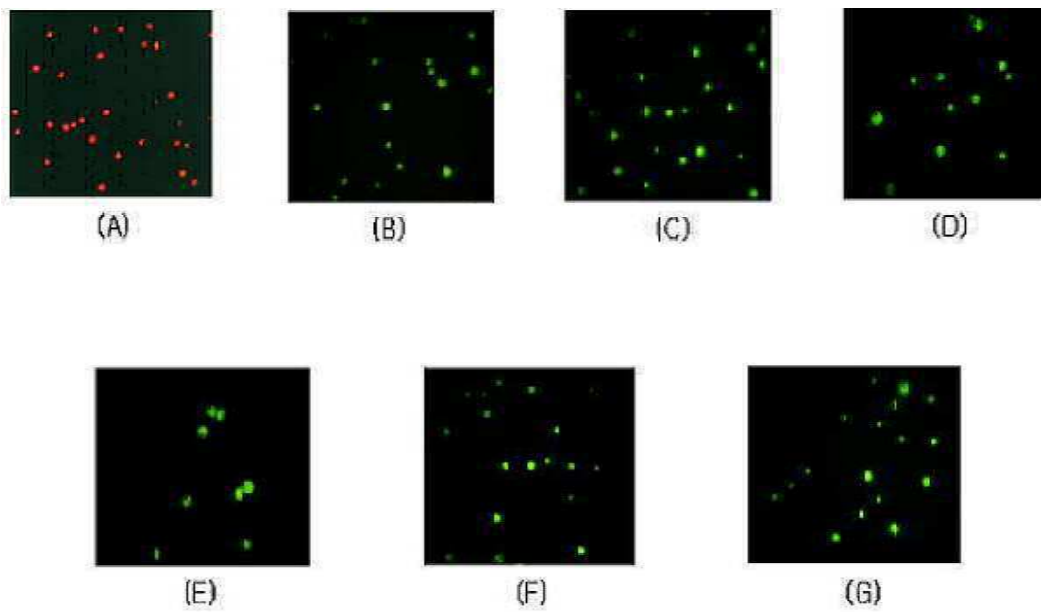
도면2



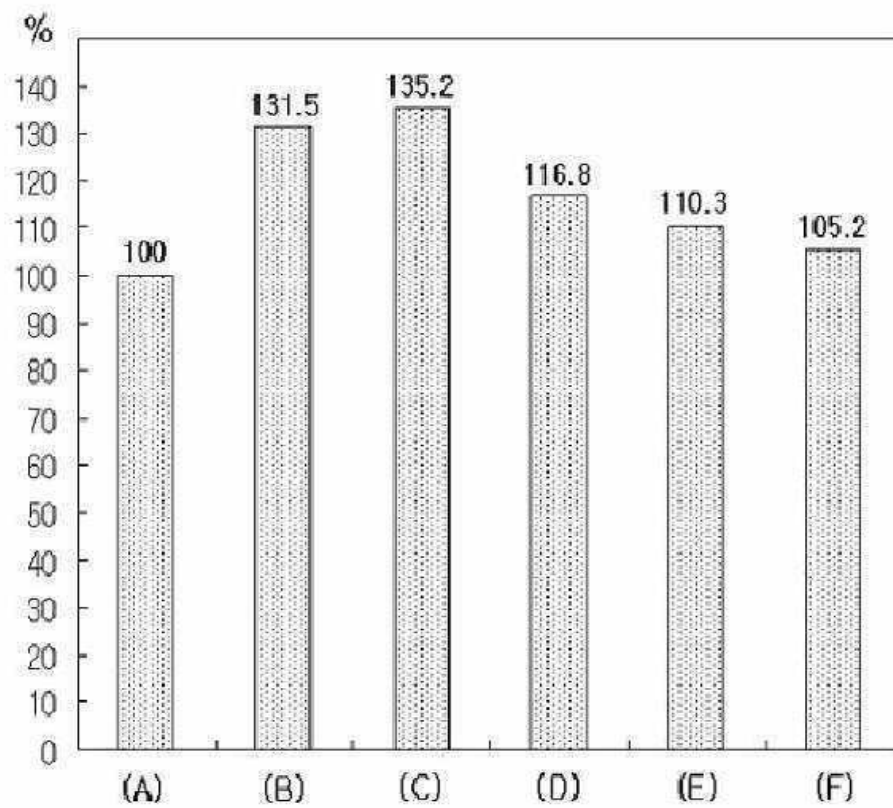
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> Pukyong National University Business Incubator Center

<120> Early gene Promoter Originated from Chlorella Virus SS-2 Isolated in Korea and Use Thereof

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 419

<212> DNA

<213> Chlorella virus SS-2

<400> 1

cccaagcttg tagaattaga gaacgttttg agacctgttt tatataactt cgggtgtgga	60
ggaaaacgag gtccagtacc cggttgggta ttgccggcga cgatagcatc cgtgggttttg	120
ttggttctta tattgattac cttgatcaaa atttacgaga gtatcaccac tggaaagtgc	180
atgatgtgtg ggacaatata taaaaatgac aaatgacaaa taaatgacaa ccgtcatatc	240

aacaagaaaa agcattttaag caactgtttt cacactaaac tcatcttcct ctttcgggac	300
taccatctga acaactactg taaaacaaa caaacaaca aacaaacgct ctccgtaaac	360
aaacctcaat aacctcaaa caaactocca aaaaaagaa catatttact ggatccgcg	419