



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0083249  
(43) 공개일자 2017년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/866 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)  
C12N 5/07 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/866 (2013.01)  
C07K 14/415 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0002468  
(22) 출원일자 2016년01월08일  
심사청구일자 2016년01월08일

(71) 출원인  
경상대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
김명옥  
경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호 (대동아파트)  
(74) 대리인  
최규환

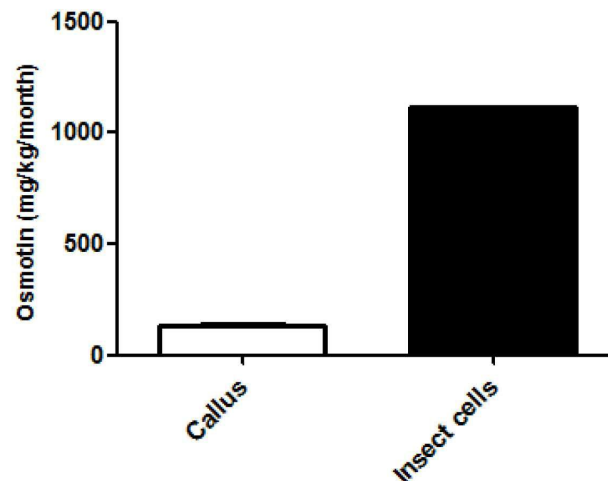
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 곤충세포를 이용한 식물 유래 오스모틴 단백질의 대량 생산 방법

### (57) 요약

본 발명은 곤충세포를 이용한 식물 유래 오스모틴 단백질의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명의 배컬로바 이러스를 이용한 오스모틴 단백질의 곤충세포에서의 생산 방법은 담배 잎 캘러스를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 방법에 비해 시간 및 비용을 절약할 수 있고, 치매 및 대사질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 오스모틴 단백질을 대량으로 생산할 수 있으므로, 오스모틴 단백질을 이용한 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0601** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능향진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 ; 나노담체 적합형 약물 기술개발

기 여 율 2/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015K000129

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 연구성과실용화진흥원

연구사업명 2015년 연구성과사업화지원사업 기술업그레이드 R&D

연구과제명 오스모틴 치매치료제 상용화 위한 생산성의 극대화 및 권리권 확대

기 여 율 8/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2015.04.27 ~ 2017.04.26

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 배큘로바이러스 벡터.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 배큘로바이러스 벡터.

#### 청구항 3

제1항의 재조합 배큘로바이러스 벡터로 감염(infection)되어 오스모틴 단백질을 발현하는 곤충세포.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 곤충세포는 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다의 Sf21 세포, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*)의 LD652Y 세포, 초파리(*Drosophila*)의 Kc1 세포, 초파리의 SL2 세포 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 곤충세포.

#### 청구항 5

- (a) 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 배큘로바이러스 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 재조합 배큘로바이러스 벡터로 곤충세포를 감염시키는 단계; 및
- (c) 상기 감염된 곤충세포를 배양하여 세포 배양액으로부터 오스모틴 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 오스모틴 단백질의 생산 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 곤충세포는 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다의 Sf21 세포, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*)의 LD652Y 세포, 초파리(*Drosophila*)의 Kc1 세포, 초파리의 SL2 세포 및 모기(mosquito) 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 오스모틴 단백질의 생산 방법.

#### 청구항 7

제5항 또는 제6항의 방법에 의해 생산된 오스모틴 단백질.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 곤충세포를 이용한 식물 유래 오스모틴 단백질의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 배큘로바이러스 벡터, 상기 재조합 배큘로바이러스 벡터를 곤충세포에 형질전환하여 오스모틴 단백질을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 오스모틴 단백질에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 식물에서 유래된 오스모틴은 지방산 산화 조절, 글루코오스 수득, 인산화(AMP 키나아제) 및 신호 변환 경로에

관여한다. 오스모틴(24kDa)은 당분-측정 단백질 타우마틴(sweet-testing protein thaumatin)과 상동성을 가지는 PR-5 패밀리에 포함되는 안정한 단백질이고, 효모에서 세포 내 신호 전달을 유도하는 것으로 알려져 있다. 오스모틴은 열, 산성 및 효소에 저항성을 가지며, 따라서 소화에 의해 분쇄될 필요 없이 신체를 순환할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 오스모틴은 동물에 존재하는 아디포넥틴과 상동체로 알려져 있는데, 아디포넥틴의 경우 일부 항-염증, 항-당뇨, 항-죽상경화 능력을 가질 가능성이 있다고 밝혀진 바 있다.

[0003] 재조합 DNA 기술이 개발되었을 때에, 유전학적으로 변형된 박테리아를 사용해서 단백질을 대규모로 생산하는 것에 관하여 기대가 높았었다. 그러나, 상업적으로 매력있는 단백질의 대부분은 이들이 생물학적으로 활성인 단백질로 되기 전에 반드시 후-번역 변형을 겪는다. 그러므로, 현재 동물 세포가 재조합 단백질을 제조하는데 더욱 빈번하게 사용된다.

[0004] 동물세포 중에서, 곤충세포가 재조합 단백질 생산에 그 중요성이 커지고 있다. 곤충세포를 사용하는 편리하고 다재다능한 배큘로바이러스 벡터계가 개발되었다. 그러나, 곤충세포의 생리학에 관한 정보는 오히려 부족해서, 배큘로바이러스 재조합 기술을 통해서 생산한 백신이 일반적으로 양호하게 받아들여진다.

[0005] 곤충세포는 일반적으로 현탁액 중에서뿐 아니라 고체 지지체상에서 증식하지만, 고체 지지체상에서 증식할 때에 더 높은 수율로 바이러스를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 감염은 세포가 대수기에서 감염될 때에 가장 효과적이지만, 세포당 생산된 폴리헤드라 및 바이러스의 양은 세포 사이클에서 상이한 단계 도중 감염된 세포 사이에서는 현저하게 변하지 않는다. 세포 밀도는 바이러스 생산에 대해 크게 영향을 미친다. 곤충세포는 더 높은 세포밀도에서 감소된 바이러스 생산을 유도하는 접촉억제의 형태를 나타낼 수 있다.

[0006] 배큘로바이러스(Baculovirus)는 곤충에만 한정적으로 감염을 일으키는 바이러스로서 약 80-200Kbp 크기의 이중 가닥 DNA가 막대형의 뉴클레오캡시드 외피에 둘러싸여 있다. 일찍부터 생물학적 살충체를 연구하기 위하여 많이 사용되어 왔으며, 최근들어 각종 유용한 단백질을 곤충세포에서 대량으로 생산할 수 있는 발현 벡터로 이용되어 더욱 크게 각광을 받고 있다.

[0007] 배큘로바이러스 속은 바이러스의 형태에 따라 다시 세 개의 아그룹으로 분류될 수 있다. 구체적으로 아그룹 A 바이러스인 핵다각체형 바이러스(nuclear polyhedrosis virus, NPV)는 한 개의 뉴클레오캡시드가 외피에 포함되거나(single nuclear polyhedrosis virus, SNPV) 여러 개의 뉴클레오캡시드가 하나의 외피에 둘러싸인(multiple nuclear polyhedrosis virus, MNPV) 형태를 가지며, 이 바이러스들은 다시 폴리히드라라는 폴리히드린 단백질의 복합체에 봉입되어 있다. 아그룹 B 바이러스는 그레놀로시스바이러스(GV)인데 외피당 단 하나의 뉴클레오캡시드로 구성되고 그레놀린(granulin) 단백질의 복합체에 봉입되어 있다. 아그룹 C 바이러스는 단 하나의 뉴클레오캡시드로 구성되고 단백질 봉입체에 둘러싸여 있지 않다(NO BV, non occluded Baculoviruses).

[0008] 배큘로바이러스가 곤충세포에 감염되는 경우 폴리히드린이라는 단백질이 총단백질 양의 25% 이상에 달할 정도로 발현되므로, 배큘로바이러스의 폴리히드린 프로모터를 이용하면 유용한 외래 단백질을 대량으로 발현시킬 수 있다. 또한, 배큘로바이러스 발현 벡터를 이용하여 곤충세포에서 외래 단백질을 발현시키면 대장균의 발현 시스템과 유사한 정도로 단백질을 대량 생산할 수 있고 대장균이나 효모와는 달리 당의 부가(glycosylation)와 같은 번역후수식(post-translational modification)이 효과적으로 이루어질 수 있다. 따라서 배큘로바이러스 발현 시스템을 이용하면 생물학적으로 활성이 있는 천연형의 단백질과 유사한 단백질을 얻을 수 있어 산업적으로 매우 유용하다.

[0009] 한편, 한국공개특허 제1999-0086091호에는 '곤충세포를 이용한 가용성 CDK 4 /P16 복합체의 대량발현 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0682171호에는 '바큘로바이러스 벡터 발현계에서의 단백질 발현방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 곤충세포를 이용한 식물 유래 오스모틴 단백질의 대량 생산 방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 식물 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 배큘로바이러스 시스템에 클로닝하여 재조합 배큘로바이러스 벡터를 제작하였고, 이를 곤충세포에 감염시켜 감염된 곤충세포로부터 식물 유래 오스모틴과 동일한 기능을 갖는 오스모틴 단백질이 발현되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

## 과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 배칼로바이러스 벡터를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 배칼로바이러스 벡터를 곤충세포에 감염시켜 오스모틴 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 오스모틴 단백질을 제공한다.

## 발명의 효과

- [0014] 본 발명의 곤충세포를 이용한 식물 유래 오스모틴 단백질의 생산 방법은 담배 잎 캘러스를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 방법에 비해 시간 및 비용을 절약할 수 있고, 치매 및 대사질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 오스모틴 단백질을 대장균의 발현 시스템과 유사한 정도로 많은 양의 오스모틴 단백질을 생산할 수 있으므로, 오스모틴 단백질을 이용한 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 *flashBAC* 시스템을 이용한 재조합 배칼로바이러스의 생산 과정을 도식화한 그림이다.
- 도 2는 바이러스 seed stock의 MOI(감염다중도)를 결정하기 위해 엔드 포인트 어세이를 수행한 결과 사진이다.
- 도 3은 다른 농도의 바이러스 처리에 따른 MOI를 보여주는 결과이다.
- 도 4는 바이러스 농도에 따른 감염율을 보여주는 그래프이다.
- 도 5는 오스모틴 유전자를 포함하고 있는 재조합 배칼로바이러스로 감염된 곤충세포로부터 Ni-NTA 아가로스 분리를 통해 정제한 오스모틴 단백질의 겔 로딩 후 쿠마시 염색한 결과이다. SF9 cell lysate, 무감염 Sf9 세포 용해물; viral infected cell whole lysate, 배칼로 바이러스 감염 Sf9 세포 용해물; NiNTA purified osmotin, Ni-NTA 정제한 오스모틴 단백질; osmotin from callus cells, 담배 잎 캘러스에서 생산된 오스모틴 단백질(20  $\mu$ g, 양성 대조군).
- 도 6은 Ni-NTA 아가르스에 의해 정제된 오스모틴 단백질의 웨스턴 블랏 결과이다. Normal cell lysate, 바이러스로 감염하지 않은 Sf9 세포 용해물; Co-transfected cell lysate, 재조합 배칼로바이러스로 감염한 Sf9 세포 용해물; Ni-NTA purified elution, 재조합 배칼로바이러스로 감염한 Sf9 세포 용해물의 Ni-NTA 분리 용출물; Callus derived osmotin, 담배 잎 캘러스로부터 생산한 오스모틴 단백질.
- 도 7은 곤충세포에서 분리 정제한 오스모틴 단백질의 pAMPK 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.
- 도 8은 담배 잎 캘러스를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 방법과 곤충세포를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 방법의 수율을 비교한 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 배칼로바이러스 벡터를 제공한다.
- [0017] 본 발명에 따른 오스모틴 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0018] 또한, 본 발명에 따른 상기 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로는, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지

않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

- [0019] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0020] 용어 "벡터"는 DNA 단편(들), 유전자 분자를 세포 내로 전달할 수 있는 수단을 지칭할 때 사용된다. 벡터는 숙주세포에서 독립적으로 DNA를 복제시키고, 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 유전자 서열을 포함하는 재조합 벡터를 의미한다.
- [0021] 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한, 상기 재조합 배콜로바이러스 벡터로 감염되어 오스모틴 단백질을 발현하는 곤충세포를 제공한다.
- [0023] 본 발명에 따른 상기 곤충세포는 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)의 Sf9 세포, 스포도프테라 프루기페르다의 Sf21 세포, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)의 BT1-Tn-5B1-4 세포, 리만트리아 디스파(*Lymantria dispar*)의 LD652Y 세포, 초파리(*Drosophila*)의 Kc1 세포, 초파리의 SL2 세포 및 모기(mosquito) 세포주일 수 있고, 바람직하게는 스포도프테라 프루기페르다의 Sf9 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 배콜로바이러스 벡터를 곤충세포에 감염시켜 오스모틴 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 구체적으로는, (a) 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 배콜로바이러스 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 재조합 배콜로바이러스 벡터로 곤충세포를 감염시키는 단계; 및 (c) 상기 감염된 곤충세포를 배양하여 세포 배양액으로부터 오스모틴 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 상기 오스모틴 단백질의 아미노산 서열과 염기서열은 전술한 바와 같다.
- [0026] 상기 오스모틴 단백질의 생산 방법에서 감염된 곤충세포의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 곤충세포가 증식하는데 있어서 가장 널리 사용하는 배지는 TNM-FH, BML-TC/10, 및 IPL-41이다. 이들 배지는 통상으로 다소 한정된 성분들, 예를 들면 포유류 혈청, 특히 태아 송아지 혈청으로 보충한다. 혈청 대체물이 또한 곤충세포 배양에 사용되며, Ex-cell 400TM 및 sf900 등의 혈청없는 배지가 시판되고 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조성하여 사용할 수 있다.
- [0027] 세포 배양액은 일반적으로 세포 배양배지와 세포를 모두 포함하는 것을 의미하며, 세포 배양배지란 일반적으로 세포 배양액으로부터 세포를 제거한 것을 의미한다.
- [0028] 형질전환 곤충세포를 배양하여 수득한 오스모틴은 다양한 통상의 방법, 예를 들면 크로마토그래피, 원심분리, 전기영동, 투석, 염 침전 등을 이용하여 분리 및 정제할 수 있으며, 이들을 단독 또는 조합하여 이용할 수 있다. 그 중에서 크로마토그래피가 가장 많이 사용되며, 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등이 있다.
- [0029] 본 발명의 형질전환된 곤충세포를 이용한 식물 유래 오스모틴 단백질의 생산 방법은 기존의 캘러스를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 방법에 비해 그 생산 기간이 길지 않은 장점이 있다. 또한, 곤충 세포주와 배콜로바이러스 조합에 의한 배콜로바이러스 발현 벡터계는 외래 유전자를 대량으로 발현할 수 있다는 큰 장점과 함께 고등 진핵 세포인 곤충세포주를 이용하기 때문에, 생산된 재조합 단백질의 생물학적 및 면역학적 기능과 활성이 원래의 단백질과 거의 유사하다는 장점 또한 가지고 있어 다양한 부분에서 응용과 함께 주목을 받고 있다.
- [0030] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 생산된 오스모틴 단백질을 제공한다.
- [0031] 상기 오스모틴 단백질은 생체 내의 에너지 인식 및 항상성 조절, 당과 지방의 대사에 있어서 중요한 역할을 하는 AMPK(AMP-activated protein kinase)를 인산화(phosphorylation)하는 활성을 가진 단백질로, 담배 오스모틴

단백질과 기능적으로 동일한 단백질이다.

[0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **재료 및 방법**

[0034] **1. 오스모틴 DNA**

[0035] 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 유전자의 cDNA 전장 서열 정보는 GenBank(accession 번호: M29279.1)를 참고하였다.

[0036] **2. RNA 추출**

[0037] 담배 식물체 잎으로부터 RNeasy 식물체 미니 키트(Qiagen, 독일)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 간단하게, 100mg의 식물체 잎을 액체 질소에 넣고 곱게 갈은 후, 450 $\mu$ l의 RTL 버퍼(용해버퍼)를 넣고 볼텍싱하였다. 용해물을 QIAshredder 스핀 컬럼에 옮기고 13,000rpm으로 2분간 원심분리한 후, 상층액을 멸균된 1.5ml 튜브로 옮기고 무수에탄올(absolute ethanol) 225 $\mu$ l을 첨가하였다. 반응물을 RNeasy 미니 스핀 컬럼으로 옮기고 10,000rpm에서 15초간 스핀다운시켰다. 700 $\mu$ l의 RW1 버퍼를 컬럼에 통과시키고 500 $\mu$ l RPE 버퍼로 두 번 세척하였다. RNA는 40 $\mu$ l의 RNA 분해효소가 없는 물을 컬럼에 넣고 10,000rpm으로 원심분리하여 용출시켰다.

[0038] **3. cDNA 합성 및 오스모틴 유전자 합성**

[0039] 상기에서 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성에는 QuantiTect 역전사 키트(Qiagen)를 사용하였고, 추출한 총 RNA에 gDNA 와이프아웃(wipeout) 버퍼를 첨가하여 42℃에서 2분간 반응시켜 게노믹 DNA를 제거하였다. 역전사 효소를 프라이머 및 버퍼와 함께 첨가하고 42℃에서 20분간 반응시켜 cDNA 합성을 유도한 후, 역전사 효소를 불활성화시키기 위해 95℃에서 3분간 가열하였다. 합성된 cDNA 전사체는 오스모틴 유전자의 증폭을 위해 프라이머 서열 디자인에 사용되었다. 오스모틴 유전자의 전체 전사체를 증폭시키기 위해 *EcoRI* 과 *Bgl* II 제한효소 자리가 첨가된 프라이머는 VectorNT111 프로그램을 사용하여 디자인하였고, 본 발명에는 정방향 프라이머 5'-CCGGGCTGCAGAATTCATGGCAACTTGAGATCTTC-3'(서열번호 3)와 역방향 프라이머 5'-TCGAGAGCTCGAATTCCTACTTAGCCACTTCATCAC-3'(서열번호 4)를 사용하였다.

[0040] 상기 프라이머 세트를 이용한 PCR 반응은 Amplitaq Gold 360 중합효소를 사용하여 수행하였고, PCR 수행 조건은 하기와 같다: 98℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 45초의 과정을 35회 반복하고 최종 72℃, 5분을 1회 수행.

[0041] **4. 제한효소 처리**

[0042] PCR 증폭 산물을 분리 정제하고, 분리된 PCR 산물과 벡터 DNA 1 $\mu$ g을 FlashBAC 벡터로 접합(ligation)하기 위한 접착성 말단(sticky end)을 생성하기 위해 두 개의 제한효소를 처리하였다. 제한효소 처리 반응은 멀티 코어 버퍼와 아세틸화(acetylated) BSA와 함께 *EcoRI* 과 *Bgl* II 제한효소를 이용하여 37℃에서 3시간 동안 수행되었다. 그 후 1.5% 아가로스 겔 전기영동을 통해 PCR 산물과 벡터 DNA의 절단을 확인하였다.

[0043] **5. T4 리가제(ligase)를 통한 접합**

[0044] 상기에서 제한효소로 처리한 PCR 산물과 벡터 DNA의 접합 반응을 진행하였다. T4 접합 반응은 총 반응 용량이 10 $\mu$ l이 되도록 25ng의 벡터 DNA, 75ng 삽입 DNA, 2 $\mu$ l 리가제 버퍼 및 0.5-1 $\mu$ l T4 DNA 리가제를 혼합하여 수행하였다.

[0045] **6. 곤충세포 배양**

[0046] 냉동된 Sf9 세포 앰플(Gibco, 미국)을 37℃ 항온수조에서 신속히 녹인 후, 25ml 신선 배양 배지(baculoGROW)가 들어있는 멸균된 진탕 플라스크(shake flask)에 넣어주고, 130-140rpm, 27-28℃의 조건으로 1-2일 동안 배양하였다. 세포수가  $2 \times 10^6$  세포/ml에 도달하면 계대배양하였다.

## [0047] 7. 재조합 배큘로바이러스 준비

[0048] 공동 트랜스펙션(co-transfection)을 위해, 바이러스 처리 1시간 전에 Sf9 곤충세포를 35mm 배양접시에 플레이팅하였다. 1ml의 TC100 배지(무혈청 및 무항생제)를 멸균된 튜브에 넣고, 5 $\mu$ l의 *baculo*FECTIN 시약을 첨가하여 혼합하고, 100ng의 flashBAC DNA 및 500ng 전이 벡터(transfer vector)를 첨가하고 섞어주었다. 그 후 상온에서 15-30분 동안 반응시켜 DNA 혼합물을 형성시켰다. 상기 반응이 끝나기 직전에, Sf9 배양접시에서 세포 단일층(monolayer)이 파괴되지 않도록 조심히 세포 배지를 제거하고, 상기 DNA 혼합물 1ml을 넣어주었다. 그 후 배양접시를 플라스틱 샌드위치 상자에 넣고 28℃에서 최소 5시간 또는 밤새 배양하였다. 그 후, 곤충세포 배양배지 1ml을 각 배양접시에 첨가하고 추가로 5일 동안 배양을 지속하였다. 5일 후, 재조합 바이러스를 포함하고 있는 배양배지를 수확하여 멸균된 튜브로 옮기고, 사용 전까지 4℃에서 보관하였다. 상기 용액을 재조합 배큘로바이러스 seed stock이라고 명명하였다.

## [0049] 8. 재조합 flashBAC 바이러스의 증폭

[0050] Sf9 세포를  $2 \times 10^6$  세포/ml로 준비하고 0.5ml의 재조합 바이러스 seed stock을 세포 배양액에 첨가하여 3-4일 동안 130-140rpm의 속도로 흔들어주면서 배양하였다. 세포가 바이러스에 감염되면 3,000rpm, 4℃, 15분의 조건으로 원심분리하여 세포 배양액을 회수하였고, 재조합 바이러스(수거된 세포 배양액)는 4℃의 암조건에서 보관하였다. 바이러스 접종원(inoculum)은 4℃의 암조건에서 6-12개월 또는 그 이상 보관가능하다.

## [0051] 9. 재조합 flashBAC 바이러스의 역가 측정을 위한 플라크 분석(Plaque assay)

[0052] Sf9 세포를 10x35mm 배양접시에  $0.9 \times 10^6$  개가 되도록 깔아주고 상온에서 1시간동안 두어 곤충세포들이 단일층(monolayer)을 형성하도록 하였다. 상기 배양 시간 동안, 바이러스 역가 측정을 위해  $10^{-1}$  (50 $\mu$ l의 희석하지 않은 재조합 바이러스 + 450 $\mu$ l 신선한 배지)부터  $10^{-7}$ 까지 바이러스의 로그(1/10) 희석액을 준비하였다. 곤충세포에 바이러스 희석액을 첨가할 준비가 되면, 곤충세포 배양액을 제거하고,  $10^{-4}$ 부터  $10^{-7}$ 까지의 바이러스 희석액으로부터 각 농도별로 100 $\mu$ l씩 곤충세포 배양접시에 첨가하고(각 농도별 두 개씩 준비), 바이러스가 포함되지 않은 배지만 첨가한 대조구 역시 동일한 양의 배지를 넣어주고 바이러스가 세포에 흡착되도록 상온에서 1시간동안 배양시켰다. 반응은 최소 40분 이상이 되도록하며, 한 시간은 넘기지 않도록 하였다. 바이러스 흡착이 끝나기 15분 전에, LGT(low gelling temperature) 아가로즈 오버레이(overlay)를 준비하였다. 미리 준비된 균한 2%(w/v) LGT 아가로즈의 10ml 분취액(aliquot)을 완전히 녹이고, 50℃까지 식힌 후, 동량의 곤충세포 배양액과 거품이 생성되지 않도록 주의하며 섞어주었다.

[0053] 바이러스 흡착이 끝난 후, 각 세포배양접시로부터 바이러스 접종원을 조심스럽게 제거하고, 준비된 아가로즈 오버레이 2ml을 세포 단일층이 파괴되지 않도록 조심히 넣어 곤충세포 표면을 모두 덮게 하였다. 그 후 아가로즈가 굳을때까지 상온에서 15분동안 정치시켰다. 아가로즈 오버레이가 굳으면, 곤충세포 배양액 1ml을 세포배양접시에 넣어 액체 오버레이를 만들고, 세포배양접시를 안전한 컨테이너에 넣어 28℃에서 4일동안 배양시켰다. 곤충세포가 배양접시에 완전히 차게되면, 플라크가 보일 수 있도록 뉴트럴 레드(neutral red) 염색을 실시하였다. 오직 살아있는 세포만이 염색약을 흡수하기 때문에, 플라크는 투명한 영역으로 확인된다. 염색 방법은 배양접시로부터 액체 오버레이를 제거하고, 희석된 뉴트럴 레드 염색약 1ml을 첨가하여, 28℃에서 3-4 시간 동안 반응시키고, 염색약을 제거한 후 배양접시를 뒤집은 후 암 조건에 배양접시를 두어 플라크가 투명하게 보이게 하였다.

[0054] 염색 후, 10개에서 30개의 플라크를 가진 동일 농도의 재조합 바이러스를 처리한 한 개의 세트를 선택하여 플라크의 수를 계산하였다. 바이러스 역가(titer)는 하기의 식을 이용하여 계산하였다.

[0055] 바이러스 역가(pfu/ml) = 평균 플라크 수 X 회석률 X 10

## [0056] 10. 유전자 발현 분석

[0057] 공동 트랜스펙션 및 바이러스 seed stock 수거 후, 배양접시로부터 남아있는 세포를 수거하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 수행하였다. 이는 유전자 발현을 확인할 수 있게 하는데, 전이 벡터 DNA의 질에 의존하여 곤충세포에서의 유전자 발현 수준이 매우 다양하게 확인되었다. 이는 발현의 일부가 전이 벡터에 의한 일시적인 발현임을 의미하였다.

## [0058] 11. 재조합 바이러스 stock의 추가 증폭을 위한 세포 감염

[0059] 처음에 생산된 재조합 바이러스(seed stock)가 단지 2ml에 불과하므로, 실험 진행을 위해 높은 역가의 바이러스 stock을 증폭하는 것이 중요하다. 증폭 방법은 셰이커 또는 교반 배양(spinner culture)을 통해 배양되는 감염된 100-200ml의 세포와 같은 다양한 수준에서 수행될 수 있다. 이는 매우 간단하고 저비용으로 이상적인 stock를 생산할 수 있는 방법이다.

[0060] 곤충세포를 배양접시에 준비하고, 배양액을 제거한 후, 1-2ml의 배지로 희석한 0.1-0.2ml의 바이러스 seed stock을 첨가하여 배지가 세포를 덮을 수 있도록 주기적으로 흔들어주면서 한 시간동안 바이러스가 흡착되도록 하였다. 흡착 과정이 끝나면, 배지를 첨가하여 모든 세포가 감염될때까지 바이러스가 복제되도록 3-5일간 두었다. 배지를 수거하고 4℃의 암조건에 보관하였다. 높은 역가의 바이러스를 얻기 위해 중요한 것은 지수증식기(log phase)의 건강한 세포를 사용하는 것과 세포를 감염의 낮은 다중도(multiplicity)로 감염시키는 것이다.

## [0061] 12. 네이티브(native) 조건하에서 배컬로바이러스 감염 곤충세포로부터 His-태그된 단백질의 분리

[0062] 곤충세포에서 세포내(intracellular) 발현된 Hig-태그된 단백질을 분리하고자 하기의 방법을 수행하였다. 일반적으로 배컬로바이러스로 감염된 곤충세포에서 발현된 Hig-태그된 단백질을 분리하기 위해 Ni-NTA 아가로스 및 Ni-NTA Superflow가 이상적으로 사용되는 매트릭스이다. 매트릭스의 사용량은 매트릭스의 결합력(binding capacity, 100μl의 고정된 매트릭스에 500-1,000μg의 단백질 결합)을 고려하여 적정량을 결정하였다. 용해버퍼는 세포 용해를 위한 1% Igepal<sup>®</sup> CA-630(nonidet P40)과 Hig-태그되지 않은 오염된 단백질의 결합을 최소화하기 위한 10mM 이미다졸(imidazole)을 포함하고 있다.

[0063] 바이러스 감염된 세포를 PBS로 세척하고, 1,000 x g의 속도로 5분간 원심분리하여 세포를 수거하고, 1-2X10<sup>7</sup>의 세포당 4ml의 용해버퍼를 넣고, 얼음에 10분 동안 정치시키며 세포를 용해시켰다. 용해물을 10,000 x g, 4℃, 10분 원심분리하여 세포 찌꺼기와 DNA를 포함하는 펠렛과 Hig-태그된 단백질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 그 후 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, 상층액 4ml 당 50% Ni-NTA 슬러리를 200μl 첨가하여 200rpm의 속도로 약하게 흔들어 혼합하였다. 상기 혼합액을 배출구를 막은 컬럼에 로딩한 후, 배출구를 제거하여 컬럼을 통과한 분획물을 수집하였다. 그 후, 컬럼을 800μl의 세척버퍼로 두 번 세척하고 세척 분획물도 수집하였으며, 100μl의 용출버퍼를 주입하는 과정을 4회 반복하여 단백질을 용출(elution)시켰다. 컬럼 통과 분획물, 세척 분획물 및 용출액을 SDS-PAGE를 통해 분석하였다.

## [0064] 실시예 1. 담배 유래 오스모틴 유전자를 포함하고 있는 재조합 배컬로바이러스의 곤충세포 감염을 위한 MOI 분석

[0065] 곤충세포에 재조합 배컬로바이러스를 감염시키기 위해, 재조합 배컬로 바이러스의 감염다중도(MOI)를 검사하였다.

[0066] 재조합 배컬로바이러스를 1배, 10배 및 100배의 농도로 처리했을 시에 세포 내 감염 정도를 엔드 포인트 어세이를 통해 확인하였다(도 2, 도 3 및 도 4). 그 결과, 배컬로바이러스 농도 의존적으로 세포의 감염 정도가 증가함을 알 수 있었고, 이를 통해 감염 정도의 유의성을 확인할 수 있었다. 본 발명에서 담배 유래 오스모틴 단백질의 곤충세포에서의 생산을 위해 Sf9 세포에 감염시킨 재조합 배컬로바이러스의 MOI는 6으로 결정하였다.

[0067] 실시예 2. 담배 유래 오스모틴 유전자를 포함하고 있는 재조합 배큘로바이러스로 감염된 곤충세포에서의 오스모틴 단백질 발현 확인

[0068] 오스모틴 유전자를 포함하고 있는 재조합 배큘로바이러스로 감염된 Sf9 곤충세포를 배양한 후, 세포를 회수하여 오스모틴 단백질을 Ni-NTA 아가로스 컬럼을 이용하여 분리 및 정제하였다. 그리고 감염되지 않은 곤충세포, 바이러스에 감염된 곤충세포의 용해물과 비교하였다.

[0069] 그 결과, 도 5에서와 같이 재조합 바이러스로 감염하지 않은 Sf9 세포의 용해물에서는 오스모틴 단백질이 확인되지 않았고, 바이러스로 감염된 Sf9 세포의 용해물에서는 오스모틴 단백질의 발현이 확인되었으며, Ni-NTA 정제를 통해 순수한 오스모틴 단백질을 확인할 수 있었다. 또한, 오스모틴 항체를 이용한 웨스턴 블랏 결과에서도 동일한 결과를 확인하였다(도 6).

[0070] 실시예 3. 곤충세포에서 생산한 오스모틴 단백질의 기능적 분석

[0071] 상기에서 분리 정제한 곤충세포에서 생산한 오스모틴 단백질의 기능적 분석(functional analysis)를 수행하였다. 방법은, Shsy5y 세포를 6-웰 플레이트에 준비하고, 세포가 웰 면적의 70-80%를 차지할 때 오스모틴 단백질을 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 5.0, 10, 15 및 20 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하였다. 5분 후 세포 배양액을 제거하고, 각 세포들을 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

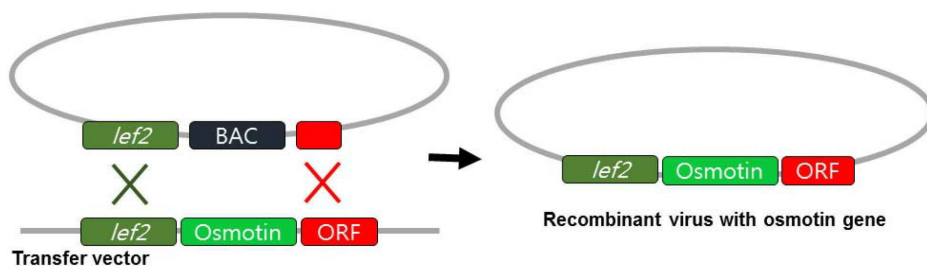
[0072] 그 결과, 도 7에서와 같이 곤충세포 유래 오스모틴의 처리 농도 의존적으로 세포 내에서 생체 내의 에너지 인식 및 항상성 조절, 당과 지방의 대사에 있어서 중요한 역할을 하는 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 인산화 형태인 pAMPK의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0073] 실시예 4. 오스모틴 단백질 생산의 수율 비교

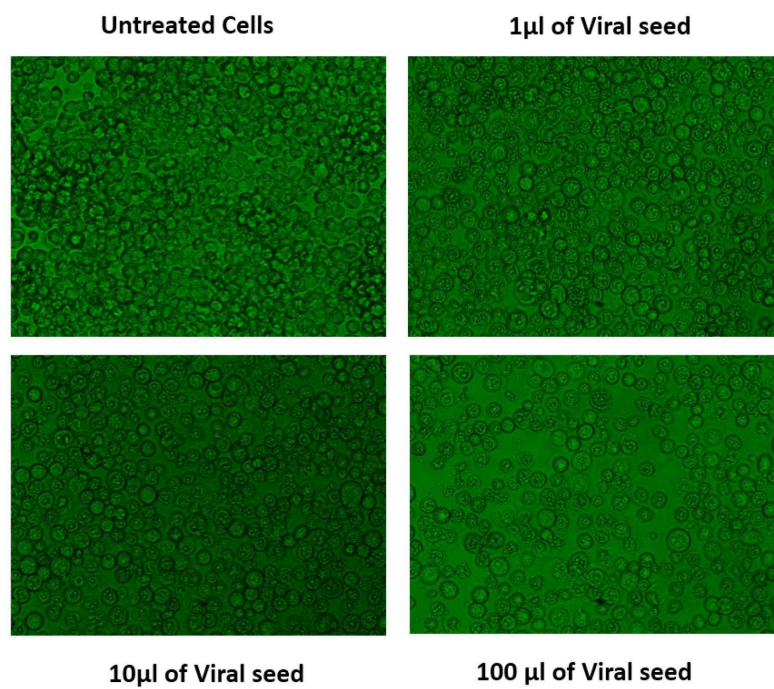
[0074] 본 발명의 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래 오스모틴 유전자로 형질전환된 곤충세포를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 수율을 담배 잎 캘러스를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 수율과 비교하였다. 그 결과, 도 8에서와 같이 담배 잎 캘러스를 통해 생산된 오스모틴 단백질의 양은 약 106mg/kg인 반면, 곤충세포를 이용하여 생산된 오스모틴 단백질의 양은 1,200mg/kg으로 확인되었다. 상기 결과는 모든 세포들이 kg 단위로 저장되어 있는 경우의 결과로, 세포들이 따로 저장되어 있지 않고 처음부터 키워서 분리 및 정제하는 과정까지의 시간 및 수율을 고려하면 곤충세포를 이용한 오스모틴 단백질의 생산 방법이 캘러스를 이용한 경우보다 120배 이상 높은 수율로 오스모틴 단백질을 생산할 것으로 예상되었다. 또한, 본 실험에서는 6 MOI로 곤충세포를 감염시켜 수행하였기 때문에, MOI의 증가를 통해 오스모틴 단백질의 생산 수율 역시 증가할 수 있음을 고려할 수 있다.

## 도면

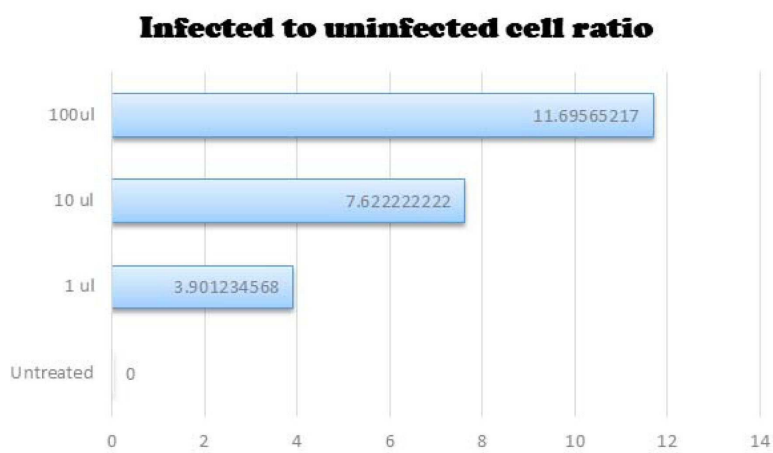
### 도면1



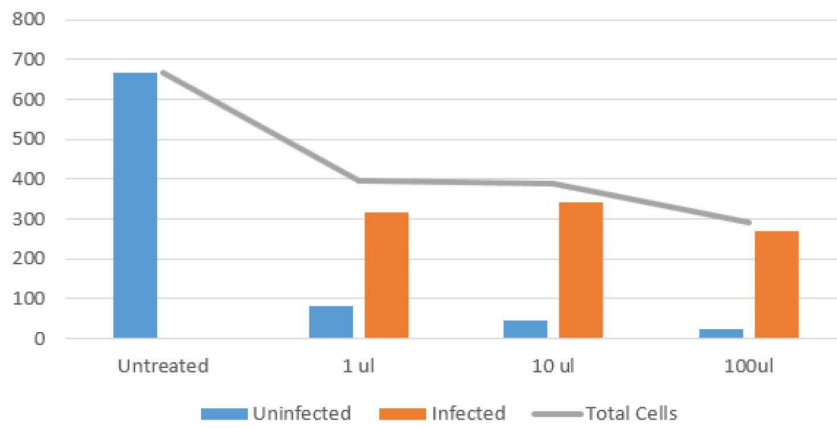
도면2



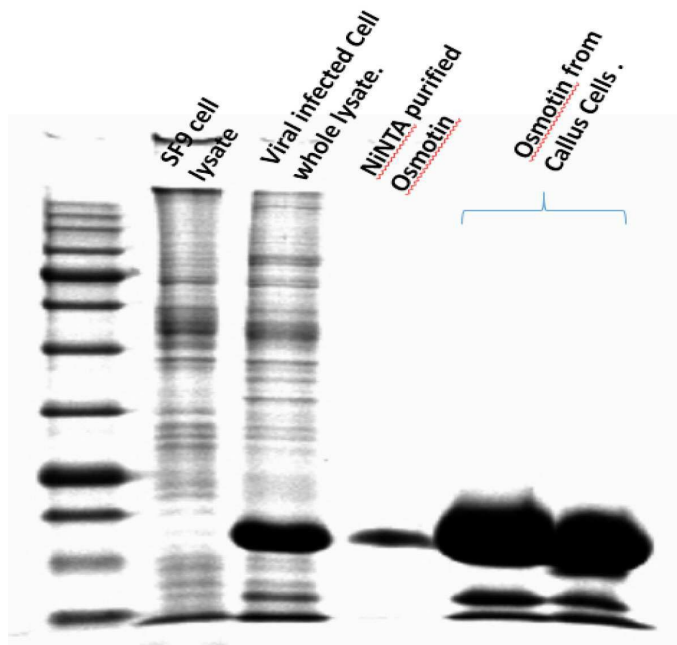
도면3



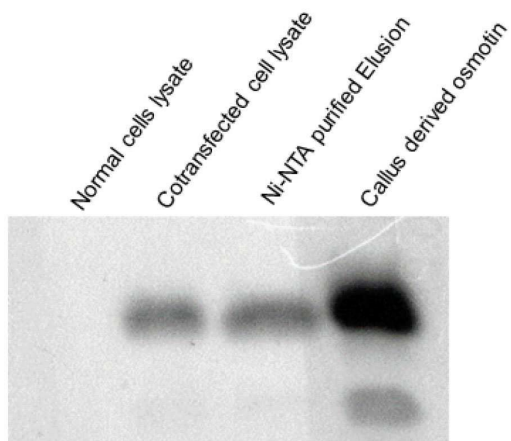
도면4



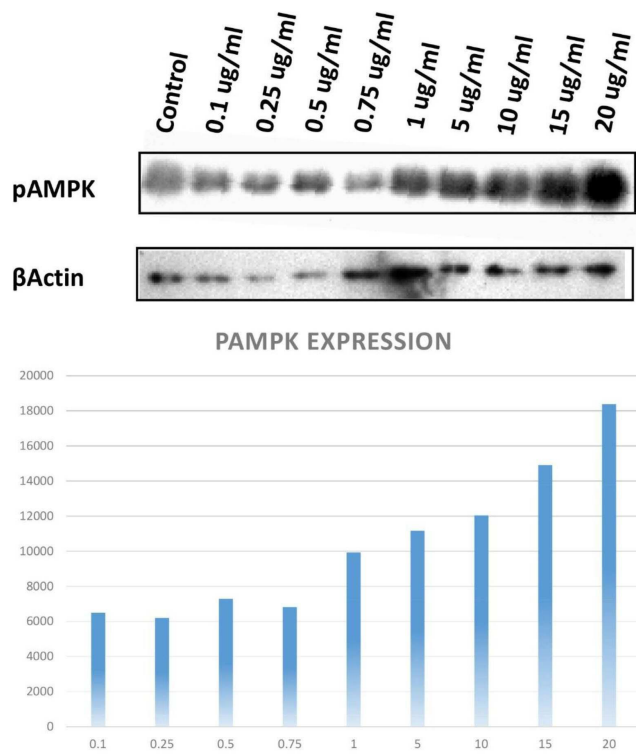
도면5



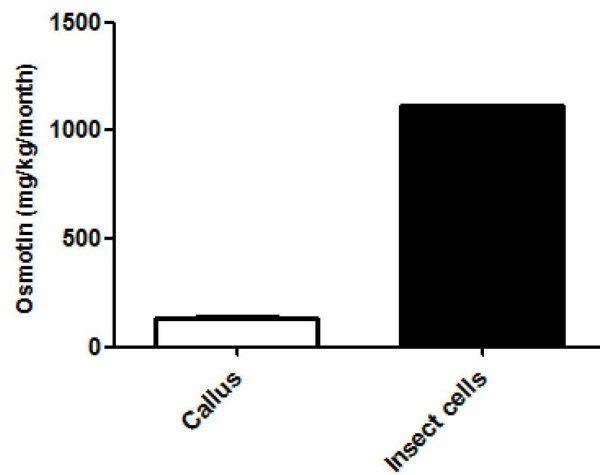
도면6



도면7



도면8



## 서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for mass producing plant-derived osmotin protein using  
insect cell

<130> PN15345

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 732

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 1

atgggcaact tgagatcttc tttgttttc ttctccttg ccttggtgac ttatacttat 60

gctgcgacta tcgaggtccg aaacaactgt ccgtacaccg tttgggcggc gtcgacaccc 120

ataggcggtg gccggcgtct cgatcgaggc caaacttggg tgatcaatgc accacgaggt 180

actaaaatgg cactgtatg gggccgtact aattgtaact tcaatgctgc tggtaggggt 240

acgtgccaaa ccggtgactg tggtaggagtc ctacagtga ccgggtgggg taaaccacca 300

aacaccttgg ctgaatacgc tttggaccaa ttcagtgggt tagatttctg ggacatttct 360

ttacttgatg gattcaacat tccgatact ttcccacta accctagtgg agggaaatgc 420

catgcattat gtacggctat aaacggcgaa tgtcccgcgg aacttagggt tcctggagga 480

tgtaataacc ctgtactac attcggagga caacaatatt gttgcacaca aagaccttgt 540

ggtectacat ttttctcaaa atttttcaaa caaagatgcc ctgatgccta tagctacca 600

caagatgata ctactagcac ttttacttgc cctgggtgta gtacaaatta tagggttatc 660

ttttgtccta atggtcaagc tcacccaaat tttcccttgg aaatgcctgg aagtgatgaa 720

gtggctaagt ag 732

<210> 2

<211> 243

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Gly Asn Leu Arg Ser Ser Phe Val Phe Phe Leu Leu Ala Leu Val

1 5 10 15

Thr Tyr Thr Tyr Ala Ala Thr Ile Glu Val Arg Asn Asn Cys Pro Tyr

20 25 30

Thr Val Trp Ala Ala Ser Thr Pro Ile Gly Gly Gly Arg Arg Leu Asp

35 40 45

Arg Gly Gln Thr Trp Val Ile Asn Ala Pro Arg Gly Thr Lys Met Ala

50 55 60

Arg Val Trp Gly Arg Thr Asn Cys Asn Phe Asn Ala Ala Gly Arg Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Cys Gln Thr Gly Asp Cys Gly Gly Val Leu Gln Cys Thr Gly Trp  
 85 90 95

Gly Lys Pro Pro Asn Thr Leu Ala Glu Tyr Ala Leu Asp Gln Phe Ser  
 100 105 110  
 Gly Leu Asp Phe Trp Asp Ile Ser Leu Leu Asp Gly Phe Asn Ile Pro  
 115 120 125  
 Ile Thr Phe Pro Thr Asn Pro Ser Gly Gly Lys Cys His Ala Leu Cys  
 130 135 140  
 Thr Ala Ile Asn Gly Glu Cys Pro Ala Glu Leu Arg Val Pro Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Cys Asn Asn Pro Cys Thr Thr Phe Gly Gly Gln Gln Tyr Cys Cys Thr

165 170 175  
 Gln Arg Pro Cys Gly Pro Thr Phe Phe Ser Lys Phe Phe Lys Gln Arg  
 180 185 190  
 Cys Pro Asp Ala Tyr Ser Tyr Pro Gln Asp Asp Pro Thr Ser Thr Phe  
 195 200 205  
 Thr Cys Pro Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Arg Val Ile Phe Cys Pro Asn  
 210 215 220  
 Gly Gln Ala His Pro Asn Phe Pro Leu Glu Met Pro Gly Ser Asp Glu  
 225 230 235 240

Val Ala Lys

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ccgggctgca gaattcatgg gcaacttgag atcttc

<210> 4

36

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tcgagagctc gaattcctac ttagccactt catcac

36