



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0094109

(43) 공개일자 2015년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0014989

(22) 출원일자 2014년02월10일

심사청구일자 2014년02월10일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

이우일

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
308동 303호

김준수

인천 부평구 아트센터로 118, 109동 1501호 (십정
동, 동암신동아아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김대영

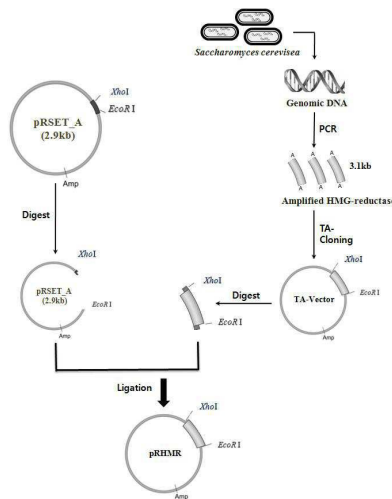
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 HMG-CoA 환원효소의 발현을 위한 재조합 발현 벡터

(57) 요약

본 발명은, HMG-CoA 환원효소의 발현 벡터를 구축함으로써 메발로노락톤(Mevalonolactone) 합성 공정을 위한 HMG-CoA 환원효소 단백질의 대량 발현 시스템에 필수 요소로 응용될 수 있는 HMG-CoA 환원효소의 발현을 위한 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 이러한 본 발명은 효모의 염색체로부터 HMG-CoA 환원효소에 해당하는 특정 프라이머를 사용하여 PCR 과정을 통해 상기 염색체로부터 분리 및 증폭되고 N-말단(terminal)에 8개의 아미노산이 추가된 HMG-CoA 환원효소 유전자를 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이슬기

경기 파주시 파주읍 통일로1546번길 79,

전희수

경기도 남양주시 오남읍 진건오남로 735-10 한국아파트 101동 1803호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-B-7193-010103

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학협력 선도대학 육성사업

연구과제명 재조합 HMG(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl)-CoA reductase 다량발현 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

효모의 염색체로부터 HMG-CoA 환원효소에 해당하는 특정 프라이머를 사용하여 PCR 과정을 통해 상기 염색체로부터 분리 및 증폭되고 N-terminal에 8개의 아미노산이 추가된 HMG-CoA 환원효소 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 HMG-CoA 환원효소 발현을 위한 재조합 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프라이머는, Forward primer로 5'-ctcgagatgccgccgtattcaag이고 Reverse primer로 5'-gaattcttaggatttaatgcaggtgacg인 것을 특징으로 하는 HMG-CoA 환원효소 발현을 위한 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 PCR 반응은,

150 μ l 마이크로 튜브에 1ng 주형가닥 DNA, 각각 10pM의 프라이머, PCR 반응 완충용액, 10mM의 dNTP, 5U의 Taq DNA polymerase를 혼합하고 Thermal cycler를 이용하여 반응을 진행하되,

상기 Thermal cycler는, 먼저 94℃에서 5분간 반응시키고 그 이후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 3분 10초의 cycle을 30번 반복하고, cycle이 완전히 끝난 후 추가로 72℃에서 10분간 반응하는 것을 특징으로 하는 HMG-CoA 환원효소 발현을 위한 재조합 발현 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아미노산은 Asp, Arg, Trp, Gly, Ser, Glu, Leu 및 Glu이고,

Asp-Arg-Trp-Gly-Ser-Glu-Leu-Glu 순으로 배열되는 것을 특징으로 하는 HMG-CoA 환원효소 발현을 위한 재조합 발현 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 효모는 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae)인 것을 특징으로 하는 HMG-CoA 환원효소 발현을 위한 재조합 발현 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 HMG-CoA 환원효소의 발현을 위한 재조합 발현 벡터에 관한 것으로, 보다 상세하게는, HMG-CoA 환원효소의 발현 벡터를 구축함으로써 메발로노락톤(Mevalonolactone) 합성 공정을 위한 HMG-CoA 환원효소 단백질의 대량 발현 시스템에 필수 요소로 응용될 수 있는 HMG-CoA 환원효소의 발현을 위한 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

메발로노락톤은 mevalonic acid의 에스터화 화합물로 인체 내에서 일어나는 Mevalonate pathway를 통해 생성되는 생리적 물질이다. 특히 메발로노락톤은 피부 건강 물질로써 여러 효능을 지니고 있는데 노화된 피부 장벽을

빠르게 회복시켜주는 기능과 더불어 세포의 콜레스테롤 합성에 영향을 주어 LDL-콜레스테롤의 hypercholesterolemia(과콜레스테롤혈증)을 억제함에 따라 결과적으로 피부의 노화방지와 보습효과가 동시에 나타나게 된다. 현재 메발로노락톤은 고유의 생리적 활성 기능을 인정받아 기능성 화장품의 원료로써 고부가 가치를 인정받고 있으며 피부의 항노화 물질로써 산업적으로 많이 활용되고 있다.

[0003] HMG-CoA 환원효소는 콜레스테롤과 다른 isoprenoid(유도체)를 만드는 Mevalonate pathway의 속도를 조절하여 HMG-CoA를 Mevalonic acid으로 변환시키는 효소로써 Acetyl-CoA으로부터 메발로노락톤을 합성하는데 결정적인 역할을 수행한다. 이 중 사카로마이세스 세레비지에 유래의 HMG-CoA 환원효소는 1054개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드로 단백질 구조상 이황화결합이 존재하지 않아 단백질의 misfolding 가능성이 회박하기 때문에 대장균에서 대량 발현시 정제 및 활성화 측면에서 용이하다 할 수 있다. 이러한 이유로 미생물로부터 HMG-CoA 환원효소를 생산할 경우 메발로노락톤 합성에 이용할 수 있을 것으로 예상된다.

[0004] 그런데 기존 메발로노락톤의 생산은 HMG-CoA에서 다단계 화학 합성법을 통해

[0005] 주로 이루어졌지만 이는 메발로노락톤의 화학 구조상 카이랄 센터가 존재하여 R-Mevalonolactone과 S-Mevalonolactone의 두 가지 물질로 나누어 각각 50:50 확률로 만들어지기 때문에 실질적으로 생리활성을 띄는 R-Mevalonolactone의 합성 효율이 적어 오랜동안 입체선택적 합성에 대한 많은 연구들이 이루어져 왔다. 이러한 연구의 예로는, Journal of Organic Chemistry(1995, 60, 6148-6153)를 들 수 있다. 하지만 이런 연구결과들의 산업적 적용에는 친환경적 요건이 아니라는 단점들이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 창출된 것으로, 본 발명의 목적은, HMG-CoA 환원효소의 발현 벡터를 구축하기 위한 재조합 발현 벡터를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 위해 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터는, 효모의 염색체로부터 HMG-CoA 환원효소에 해당하는 특정 프라이머를 사용하여 PCR 과정을 통해 상기 염색체로부터 분리 및 증폭되고 N-말단(terminal)에 8개의 아미노산이 추가된 HMG-CoA 환원효소 유전자를 포함한다.

[0008] 이때 상기 프라이머는, Forward primer로 5'-ctcgagatgccgctattcaag이고 Reverse primer로 5'-gaattcttaggatttaatgcaggtgacg인 것이 바람직하다.

[0009] 그리고 상기 PCR 반응은, 150 μ l 마이크로 튜브에 1ng 주형가닥 DNA, 각각 10pM의 프라이머, PCR 반응 완충용액, 10mM의 dNTP, 5U의 Taq DNA polymerase를 혼합하고 Thermal cycler를 이용하여 반응을 진행하되, 상기 Thermal cycler는, 먼저 94℃에서 5분간 반응시키고 그 이후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 3분 10초의 cycle을 30번 반복하고, cycle이 완전히 끝난 후 추가로 72℃에서 10분간 반응한다.

[0010] 또한 상기 아미노산은 Asp, Arg, Trp, Gly, Ser, Glu, Leu 및 Glu이고, Asp-Arg-Trp-Gly-Ser-Glu-Leu-Glu 순으로 배열된다.

[0011] 아울러, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae)인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터에 의하면, HMG-CoA 환원효소의 발현 벡터를 구축함으로써 메발로노락톤(Mevalonolactone) 합성 공정을 위한 HMG-CoA 환원효소 단백질의 대량 발현 시스템에 필수 요소로 응용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 HMG-CoA 환원효소(reductase) 유전자가 삽입된 발현벡터 pRHMR의 유전자 클로닝 과정에 대한 모식도,
 도 2는 HMG-CoA 환원효소 유전자의 증폭을 위한 PCR 과정의 온도 및 시간 조건에 따른 그래프,
 도 3은 HMG-CoA 환원효소 유전자의 증폭에 사용한 프라이머의 염기서열 및 Tm 값에 대한 도표,

도 4는 PCR 과정을 통해 증폭된 HMG-CoA 환원효소 유전자의 아가로스 겔 전기영동 사진,

도 5는 HMG-CoA 환원효소 유전자가 삽입된 발현 벡터 pRHMR의 제한효소 반응 후 아가로스 겔 전기영동 사진,

도 6은 HMG-CoA 환원효소 유전자가 삽입된 발현 벡터 pRHMR의 구조를 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 HMG-CoA 환원효소의 발현을 위한 재조합 발현 벡터의 구성을 자세히 설명한다. 본 명세서에서는 HMG-CoA reductase를 HMG-CoA 환원효소로 기재하였고, 일부 도면에서는 이를 HMG-reductase로도 기재하였으나, 이는 동일한 표현으로 이해되어야 한다.
- [0015] 도 1은 HMG-CoA 환원효소 유전자가 삽입된 발현벡터 pRHMR의 유전자 클로닝 과정에 대한 모식도이고, 도 2는 HMG-CoA 환원효소 유전자의 증폭을 위한 PCR 과정의 온도 및 시간 조건에 따른 그래프이며, 도 3은 HMG-CoA 환원효소 유전자의 증폭에 사용한 프라이머의 염기서열 및 T_m 값에 대한 도표이고, 도 4는 PCR 과정을 통해 증폭된 HMG-CoA 환원효소 유전자의 아가로스 겔 전기영동 사진이며, 도 5는 HMG-CoA 환원효소 유전자가 삽입된 발현 벡터 pRHMR의 제한효소 반응 후 아가로스 겔 전기영동 사진이고, 도 6은 HMG-CoA 환원효소 유전자가 삽입된 발현 벡터 pRHMR의 구조를 도시한 도면이다.
- [0016] 도시된 바와 같이, 효모균주인 사카로마이세스 세레비지에 s288c를 YPD 배지에 배양하고 30℃에서 이틀 동안 배양시킨다. 배양된 균주로부터 염색체를 분리하기 위하여 균체를 원심분리하고 0.2M의 lithium acetate와 1% SDS 으로 현탁시킨 후 70℃에서 20분 동안 반응시켜 세포를 파쇄시킨다. 반응 후 균체를 다시 원심분리하고 100% 에탄올과 70% 에탄올로 충분히 세척한 후 Tris-EDTA 완충용액을 통해 균체를 완전히 녹인다. 용해된 균체는 13,000rpm에서 20초 동안 원심분리를 실시하고 상층액만을 회수하여 PCR 반응의 주형가닥으로 사용한다.
- [0017] PCR 반응에 사용한 프라이머는 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 *saccharomyces cerevisiae* s288c 유래 HMG 1 유전자의 정확한 염기서열을 확보하여 이를 바탕으로 염기서열을 제작한다. 프라이머의 염기서열 및 T_m값은 도 3에 도시된 바와 같다.
- [0018] 각각의 프라이머는 Forward primer : 5'-ctcgagatgccgcccgtattcaag, Reverse primer : 5'-gaattcttaggatttaatgcaggtgacg이며 PCR 반응은 150μl 마이크로 튜브에 1ng 주형가닥 DNA, 각각 10pM의 프라이머, PCR 반응 완충용액, 10mM의 dNTP, 5U의 Taq DNA polymerase를 혼합하고 Thermal cycler를 이용하여 반응을 진행하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 먼저 94℃에서 5분간 반응시키고(pre-denaturation) 그 이후 94℃에서 30초(denaturation), 55℃에서 30초(annealing), 72℃에서 대략 3분(extension)의 cycle을 30번 반복하여 진행하였으며 cycle이 완전히 끝난 후 추가로 72℃에서 10분간 반응시켰다(extension).
- [0019] 반응이 완료된 후 아가로스 겔 전기영동을 통하여 증폭 여부를 확인하였다. 즉 PCR을 통해 증폭된 HMG-CoA 환원효소 유전자는 스핀 컬럼을 통하여 고순도로 정제하고 1.0%의 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 TAE 완충용액 조건에서 100 V, 30분 동안 진행하였으며 EtBr를 이용하여 DNA를 염색하고 UV를 통해 관찰하였다.
- [0020] 도 4에 도시된 바와 같이, Lane 1은 DNA marker이며 Lane 2, 3, 4는 증폭된 HMG-CoA 환원효소이다. 분석 결과 3,000bp 부근에서 단일 밴드가 관찰되어 HMG-CoA 환원효소 유전자가 올바르게 증폭되었다는 것을 확인할 수 있다.
- [0021] 증폭된 HMG-CoA 환원효소의 유전자 1μg과 T-vector 200ng을 혼합하고 T4 DNA ligase와 20℃에서 15분간 반응시킨 후 다량의 플라스미드를 확보하기 위하여 대장균 DH5a에 형질전환한다. SOB 고체 배지에 배양된 DH5a는 역시 같은 SOB 액체 배지에 전배양한 후 1:100 비율로 본배양하고 UV 장치를 통해 OD값이 0.4가 되도록 키운다. 자라난 균주는 CaCl₂를 이용하여 반응능 세포를 제조하고 42℃에서 60초 동안 열충격을 가하여 형질전환을 실시한다. 그 이후 HMG-CoA 환원효소가 삽입된 T-vector를 1mg당 각각 5U의 Xho I과 EcoR I와 혼합하고 37℃에서 2시간 30분 동안 반응시킨 후 스핀 컬럼을 통해 DNA를 binding하고 80% 에탄올로 세척하여 HMG-CoA 환원효소 단편만을 분리하였다. 효소 처리된 HMG-CoA 환원효소 단편은 발현벡터 pRSET_A와 T4 DNA ligase 반응을 16℃에서 12시간 진행하였고 반응 혼합물을 대장균에 형질전환하여 아가로스 겔 전기영동을 통해 유전자 클로닝 여부를 확인하였다.
- [0022] 즉, 발현벡터 pRSET에 증폭된 HMG-CoA 환원효소가 삽입되었는지 확인하기 위하여 pRHMR를 제한효소 Xho I과

EcoR I으로 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하였다. TAE 완충용액을 사용하였으며, Lane 1은 DNA marker이고 Lane 2~12는 각각의 다른 콜로니에서 분리한 pRHMR이다.

[0023] 도 5에 도시된 바와 같이, 분석결과 Lane 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11에서 3,000bp 부근에 두 개의 밴드가 관찰되었으며 이는 발현벡터 pRSET과 삽입 DNA인 HMG-CoA 환원효소가 절단되어 나타난 것으로 확인된다.

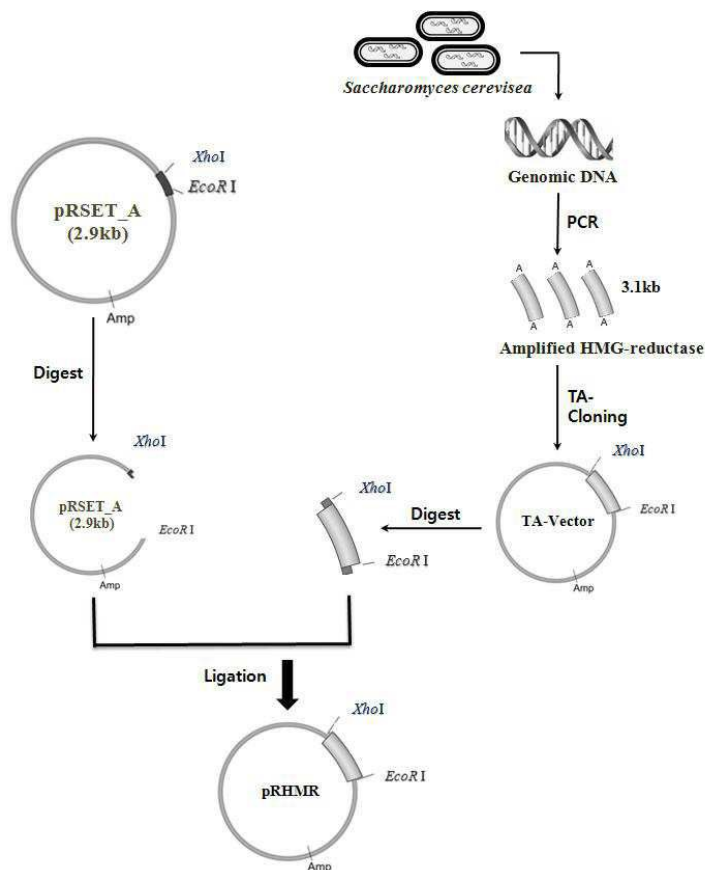
[0024] 발현 벡터 pRHMR은, 도 6에 도시된 바와 같이, pUC 계열의 강력한 T7 promoter 시스템이 결합되어 있어 대장균에서 다량 발현이 용이하며, 두 개의 ori로부터 대장균내에서 다량 복제가 가능하다. 또한 엠펜실린 저항 유전자가 삽입되어 형질전환체의 선별이 간단하며 N-말단(terminal)에 6개의 히스티딘이 tagging되어 단백질 발현 후 단일 물질로 정제할 시 Ni-NTA를 이용한 친화성 크로마토그래피를 통해 효율적으로 이루어 지게 된다. 또한 pRSET_A 벡터의 EK 절단 부위로부터 pRHMR의 유전자 재조합 시 사용한 Xho I 인식부위를 포함하여 N-말단에 총 8개의 아미노산 (Asp-Arg-Trp-Gly-Ser-Glus-Leu-Glu)이 추가적으로 발현된다.

[0025] 재조합 벡터는 발현 균주인 BL21(DE3)pLysS에 동일한 방법으로 형질전환하며, 엠펜실린 및 클로람페니콜이 들어 있는 배지에 배양한다. 동일한 액체 배지에 1:100(v/v) 비율로 본배양한 후 OD 값이 0.8이 되도록 키우고 유도 물질인 IPTG를 최종 농도가 0.5mM이 되도록 추가한다. 27℃에서 8시간 동안 발현을 진행하고 발현이 완료된 균주는 원심분리하여 균체를 수확한다. 이 후 PBS buffer를 통해 균주를 세척하고 초음파세척기를 통하여 세포막을 완전히 파괴하여 발현된 단백질을 수집한다. 발현된 단백질은 원심분리를 통해 수용성과 불용성 단백질로 나누고 SDS-PAGE를 통하여 분석을 실시한다.

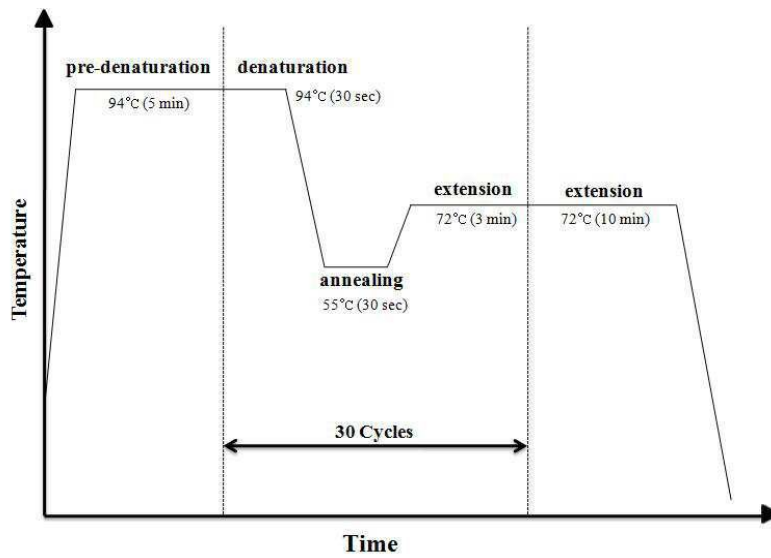
[0026] 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

도면1



도면2



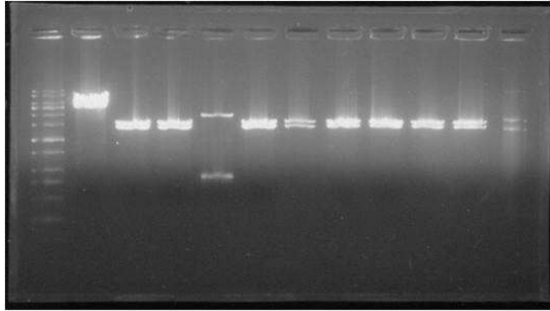
도면3

Target Gene	Strand	Size	Tm (°C)
HMG-reductase	Forward	18 mer	62.21
	Reverse	22 mer	59.14
5' Addition	Primer Sequence		
C T C G A G (BamH I)	A T G C C G C C G C T A T T C A A G		
G A A T T C (EcoR I)	T T A G G A T T T A A T G C A G G T G A C G		

도면4



도면5



도면6

