

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/71 (2006.01)

C12N 15/72 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0112843

(43) 공개일자 2006년11월02일

(21) 출원번호 10-2005-0035510

(22) 출원일자 2005년04월28일

(71) 출원인 세종대학교산학협력단
서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자 심재경
서울 서초구 잠원동 대림아파트 8-907

(74) 대리인 양부현
이문섭
윤여강

심사청구 : 있음

(54) 활성 NF 90/NF 45 복합체를 대장균에서 제조하기 위한발현벡터 시스템

요약

본 발명은 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 두 가지 발현벡터를 포함하는 발현벡터 시스템; 그리고 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (a) 대장균에서 작동하는 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로(operatively) 연결된 NF90 유전자 및 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF90 발현용 벡터; 그리고, (b) 대장균에서 작동하며 상기 (a)의 복제원점과 다른 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 NF45 유전자 및 상기 (a)의 항생제-내성 유전자와 다른 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF45 발현용 벡터를 포함하는 발현벡터 시스템; 그리고 상기 발현벡터 시스템을 이용한 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

대표도

도 4

색인어

NF90, NF45, 공동발현, 대장균, 발현벡터

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 본 발명에서 이용된 pGST-NF45의 구축 과정을 보여주는 모식도이다. 인간 간 cDNA 라이브러리를 주형으로 하고 프라이머를 이용하여 NF45 유전자를 PCR 증폭하였다. NF45 유전자의 PCR 산물을 *Bam*HI 및 *Sa*II로 절단하였다. NF45 유전자를 포함하는 단편을 *Bam*HI-*Sa*II-선형화 pGEX-4T-1에 라이게이션하여 플라스미드 pGST-NF45를 제작하였다. pGST-NF45 유전자 지도에서, GST 및 NF45는 각각 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 및 NF45를 코딩하는 유전자이고, Amp^r는 암피실린 내성 유전자, pBR322 ori는 플라스미드 pBR322에서 유래한 복제원점, lac I^q는 *lac* 오페론의 억제자(repressor)를 코딩하는 유전자를 나타낸다. P_{tac}는 *tac* 프로모터를 나타내며, 이 프로모터는 *trp* 프로모터의 -35 부위 및 *lac*UV5 프로모터의 -10 부위로 이루어진 하이브리드 프로모터이다. P_{tac}에 의한 발현은 Lac I^q 단백질에 의해 억제된다.

도 1b는 본 발명에 이용된 pMBP-NF90의 구축 과정을 보여주는 모식도이다. HepG2 세포로부터 총 RNA를 분리한 다음, 조류 근원세포 바이러스(avian myeloblastosis virus)의 역전사효소 이용하여 제1쇄 cDNA를 얻었다. 이어, 반응산물을 주형으로 하여 PCR 증폭하였다. NF90 PCR 산물을 *Eco*RI 및 *Bam*HI로 절단하였다. NF90 유전자를 포함하는 단편을 *Eco*RI-*Bam*HI-선형화 pMAL-c2에 라이게이션하였다. 이어, 벡터를 *Bgl*II 및 *Bam*HI로 절단한 다음 p15A-유래 *ori*를 갖는 pMBPc에 삽입하였다. *Hinc*II-*Eco*RV-선형화 pLysE를 *Msc*I-*Dra*I-선형화 pMAL-c2에 라이게이션하여 구축된 *Bgl*II-*Bam*HI-선형화 pMBPc에 NF90 유전자를 포함하는 단편을 라이게이션하여 플라스미드 pMBP-NF90를 제조하였다. *E. coli*에서의 융합 단백질 발현을 위한 상기 박테리아 벡터는 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 유도의 조절 하에 있다. pMBP-NF90 유전자 지도에서, MBP 및 NF90은 각각 말토스 결합 단백질 및 NF90 단백질을 코딩하는 유전자를 나타내고, p15A ori는 플라스미드 p15A로부터 유래된 복제원점을 나타내며, Cm^r은 클로람페니콜 내성 유전자를 나타낸다.

도 2a는 GST-NF45, MBP-NF90 및 MBP-NF90/GST-NF45의 SDS-PAGE 결과를 보여주는 젤 사진이다. 친화성 컬럼으로 정제된 GST-NF45(레인 1), MBP-NF90(레인 2) 및 공동발현된 MBP-NF90/GST-NF45를 8% SDS-PAGE 하고 쿠마시 브릴런트 블루로 염색하였다. 공동발현된 단백질을 GST 컬럼(MBP-NF90/GST-NF45(G), 레인 3)에 적용한 다음, MBP 컬럼(MBP-NF90/GST-NF45(M), 레인 4)에 로딩하였다. 각각의 단백질의 위치를 화살표로 표시하였다.

도 2b는 GST-NF45, MBP-NF90 및 MBP-NF90/GST-NF45의 웨스턴 블롯팅 결과를 보여주는 사진이다. GST-NF45(레인 1), MBP-NF90(레인 2), 공동발현 MBP-NF90/GST-NF45(G), 및 (M) (레인 3과 4)를 8% SDS-PAGE 하고, 니트로셀룰로스 막에 옮겼다. 막의 단백질을 항-NF45 항체(아래 패널) 및 항-NF90 항체(위 패널)로 염색하였다.

도 3a-3c는 GST-NF45, MBP-NF90 및 MBP-NF90/GST-NF45의 RNA 결합 분석 결과를 보여준다. 도 3a는 프로브로서 ³²P-표지 HBV ε RNA를 사용하여 각각의 단백질에 대한 UV 교호결합 분석 결과이다. 레인 1, GST; 레인 2, MBP; 레인 3, GST-NF45; 레인 4, MBP-NF90; 레인 5, MBP-NF90/GST-NF45. 각각의 단백질의 위치는 화살표로 표시되어 있다. 도 3b는 HBV ε RNA 결합 활성을 분석한 EMSA 결과이다. 레인 1, GST; 레인 2, MBP; 레인 3, GST-NF45; 레인 4, MBP-NF90; 레인 5, MBP-NF90/GST-NF45. 도 3c는 항-NF45 항체의 존재하에서 MBP-NF90/GST-NF45의 슈퍼전이(supershift)를 보여주는 실험 결과이다. EMSA를 실시한 다음 항-NF45 항체를 첨가하였다. 레인 1, MBP-NF90/GST-NF45; 레인 2, MBP-NF90/GST-NF45 + 항-NF45 항체.

도 4는 GST-NF45, MBP-NF90 및 MBP-NF90/GST-NF45의 반응 특이성을 보여주는 EMSA 결과이다. MBP-NF90(레인 2) 및 MBP-NF90/GST-NF45(레인 6)를 ³²P-표지 HBV ε RNA와 반응시켰다. 저온 HBV ε RNA의 5배(레인 3 및 7) 또는 20배(레인 4 및 8), 또는 경쟁자로서 Poly(I)-Poly(C)(레인 5 및 9)를 이용하였다. 레인 1은 ³²P-표지 HBV ε RNA를 단독 반응시킨 경우이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 활성 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 대장균에서 제조하기 위한 발현벡터 시스템에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 본 발명은 (a) NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장

균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 두 가지 발현백터를 포함하는 발현백터 시스템; 그리고 (b) NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

활성 T-세포의 핵인자(Nuclear factor of activated T-cells: NF-AT)는 초기 T-세포 유전자의 활성화에 필수적이다(1-6). NF-AT는 항원 수용체 요소 2(antigen receptor response element 2: ARRE-2))로 알려진 인터루킨-2(IL-2) 인핸서 내의 한 서열에 결합함으로써, 인터루킨-2(IL-2)의 전사 활성화에 관여를 하며(8), 상기 인터루킨-2는 T-세포 활성화 이후에 처음으로 분비되는 림포카인이다(7). 또한, NF-AT는, 종양괴사인자- α , IL-4, IL-3 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자와 같은 다른 사이토카인 유전자의 조절 위치에 결합한다(9-15).

NF-AT-ARRE-2 DNA 결합 활성화에 관여하는 단백질을 동정하기 위한 많은 시도가 있었다. 현재까지, NF-AT 단백질의 몇 종(NF-AT1, NF-AT_C, NF-AT3 및 NF-AT4)은 면역반응 동안에 사이토카인 유전자와 다른 유전자의 전사에 중요한 역할을 하는 것으로 규명되었다(16-21). 이들 단백질들은 보존성 DNA-결합 도메인을 포함하는 전사인자의 신규 패밀리로 분류된다(16, 17, 19, 21). 상기 신규 패밀리뿐만 아니라, 단백질의 다른 클래스들도 ARRE-2 DNA 인핸서 요소에 결합하여 전사 활성화에 관여를 한다. Cortesy와 Kao는 ARRE-2 결합 활성을 나타내는 헤테로다имер 단백질(NF90/NF45)을 정제하였다. 이 단백질 복합체는 NFAT 전사인자와 유사한 몇 가지 활성을 나타내었지만 또한 다른 특징들, 예컨대 보존성 DNA-결합 도메인의 결여, 인산화 효과 및 세포내 특정 부위 분포와 같은 다른 특징들도 나타내었다(22, 23).

상기 헤테로다имер의 큰 서브유닛인 NF90은 명확한 DNA-결합 도메인을 가지고 있지 않으나, 이중쇄 RNA 결합에 관여하는 것으로 알려진 모티프와 유사한 두 개의 부위를 가지고 있다(23). Liao 등은 인간 293세포로부터 NF90 단백질을 정제하였고, 이 단백질이 dsRNA에 대한 결합능을 갖고 또한 아데노바이러스 VA RNAs와 같은 고도로 구조화된 ssRNAs에 대하여도 결합능을 갖는다는 것을 노스웨스턴 블롯팅으로 분석하였으며, NF45는 이러한 결합능이 없다는 것도 규명하였다(24). 또한, Langland 등은, NF90의 dsRNA-결합 특성을 분석하였고 비면역 HeLa 세포에서 NF90을 동정하였으며 PKR에 의한 NF90의 인산화를 규명하였다(25). 최근에, NF90과 같이 이중쇄 RNA 결합 모티프(double strand RNA binding motif: dsRBM)를 가지는 많은 단백질들이 다양한 루트로 동정되었다(26-30). 이러한 단백질의 한 그룹으로서, NF90 단백질 패밀리는 유전자발현 조절과 같은 몇 가지의 생물학적 과정에 관여를 하는 것으로 보고 되었다(25, 26, 28-38). 그의 파트너로서, NF45는 다른 유전자좌로부터 유래되며, dsRBM을 갖지는 않지만 NF90 패밀리 멤버와 유사한 약 150 아미노산 잔기의 부위를 포함한다(39). NF90의 RNA 결합은 이미 규명되었고, 그의 기능도 많은 연구가 이루어졌으나, NF45의 RNA 결합 특성과 그의 역할은 아직 알려진 바 없다. 보다 최근에, Shin 등은 HepG2 세포에서의 HBV ϵ RNA 결합 단백질로서 NF90/NF45 헤테로다имер 복합체를 정제하고 그 특성을 연구하였으며, 이 연구결과는 HBV 중합 효소의 단백질 프라이밍에 상기 헤테로다имер 인자가 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다(40).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자는 활성 상태의 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 대장균(*E. coli*)에서 효율적으로 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, *E. coli*에서 양립하는 두 가지 발현백터를 구축하고 이를 이용하여 *E. coli*에서 NF90과 NF45를 공동발현하는 경우에는 활성 상태의 NF90/NF45 복합체를 효율적으로 제조할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 두 가지 발현백터를 포함하는 발현백터 시스템을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 다음의 두 가지 발현백터를 포함하는 발현백터 시스템을 제공한다:

(a) 대장균에서 작동하는 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로(operatively) 연결된 NF90 유전자 및 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF90 발현용 벡터; 그리고,

(b) 대장균에서 작동하며 상기 (a)의 복제원점과 다른 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 NF45 유전자 및 상기 (a)의 항생제-내성 유전자와 다른 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF45 발현용 벡터.

본 발명자들은 활성 상태의 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체(complex)를 대장균(*E. coli*)에서 효율적으로 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 심도 있는 연구를 하였고, 그 결과 *E. coli*에서 양립하는(compatible) 두 가지 발현벡터를 구축하고 이를 이용하여 *E. coli*에서 NF90와 NF45를 공동발현하는 경우에는 활성 상태의 NF90/NF45 복합체를 효율적으로 제조할 수 있음을 확인하였다.

본 명세서에서, 용어 “활성 상태의 NF90/NF45 복합체”는 HBV ε RNA에 대하여 결합 활성을 갖는 HBV NF90/NF45 복합체를 의미한다.

본 발명의 특징 중 하나는 하나의 *E. coli* 세포에서 양립하는 두 종의 발현벡터를 이용하는 것이다. 본 명세서에서 발현벡터를 언급하면서 사용되는 용어 “양립하는”은 하나의 세포에 있는 두 종의 벡터가 여러 세대(passage)를 거치는 동안에도 계속적으로 유지되는 특성을 의미한다. 이러한 양립성을 부여하기 위하여, 본 발명에서 두 종의 벡터는 서로 다른 복제원점을 갖는다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 대장균에서 작동하는 복제원점은 pBR322-유래 ori, p15A-유래 ori, pMB1-유래 ori, ColE1-유래 ori, Rldrd19-유래 ori, CloDF13-유래 ori 및 M13-유래 ori로 구성된 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는, pBR322-유래 ori, p15A-유래 ori 또는 pMB1-유래 ori이며, 가장 바람직하게는 pBR322-유래 ori 또는 p15A-유래 ori이다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, NF90 발현용 벡터는 p15A-유래 ori를 포함하고, NF45 발현용 벡터는 pBR322-유래 ori를 포함한다. 이러한 서로 다른 복제원점에 의해 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 여러 세대를 거치는 동안에도 분리(segregation)되지 않고, *E. coli* 세포에서 계속적으로 양립하게 된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 대장균에서 작동하는 프로모터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 프로모터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 및 *lacUV5* 프로모터이며, 가장 바람직하게는 *tac* 프로모터이다. 상기 *tac* 프로모터는 *trp* 프로모터의 -35 부위 및 *lacUV5* 프로모터의 -10 부위로 이루어진 하이브리드 프로모터이다. *tac* 프로모터에 의해 조절되는 발현은 Lac I^q 단백질(Lac 오페론의 억제자(repressor))에 의해 억제되며, IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)에 의해 유도(induction)된다.

NF90 및 NF45 유전자는 프로모터에 작동적(operatively)으로 연결되어 있다. 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열인 프로모터와 NF90 또는 NF45 유전자 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 NF90 또는 NF45 유전자의 전사를 조절하게 된다.

본 발명의 또 다른 특징은 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터가 서로 다른 항생제-내성 유전자를 갖는다는 것이다. 이와 같은 특징을 통하여, 벡터에 의해 형질전환된 세포의 선별(selection)을 용이하게 하고 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터에 의해 발현되는 NF90 및 NF45 단백질을 개별적으로 분리하고 동정할 수 있게 한다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 항생제-내성 유전자는 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 또는 테트라사이클린에 대하여 저항성을 부여하는 유전자이며, 보다 바람직하게는 암피실린 또는 클로람페니콜에 대하여 저항성을 부여하는 유전자이다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, NF90 발현용 벡터는 클로람페니콜-내성 유전자를 가지고, NF45 발현용 벡터는 암피실린 내성 유전자를 갖는다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 또는 *lacUV5* 프로모터를 포함하고, lac I^q 유전자(즉, Lac 오페론의 억제자(repressor)를 코딩하는 유전자)를 추가적으로 포함

하며, 보다 바람직하게는 상기 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 *tac* 프로모터를 포함하고, *lac I^q* 유전자를 추가적으로 포함한다. 이와 같이 프로모터로서 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 또는 *lacUV5* 프로모터를 가지고 추가적으로 *lac I^q* 유전자를 갖게 되면, IPTG에 의한 유도를 통해 NF90 및 NF45 유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있게 된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 발현된 NF90 및 NF45의 정제를 용이하게 하기 위한 융합 파트너를 코딩하는 유전자를 포함한다. 이러한 융합 파트너는 NF90 및 NF45 유전자의 업스트림에 위치하여, 발현시 각각의 N-말단에 융합되어 발현된다. 정제를 용이하게 하기 위한 융합 서열은 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST), 말토스 결합 단백질(MBP), FLAG 및 6x His 등이 있으며, 바람직하게는 GST 및 MBP이다. GST가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온-결합 레진 컬럼, MBP가 융합된 경우에는 아밀로스-결합 레진 컬럼, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼을 이용하여 소망하는 NF90 및 NF45 단백질을 신속하고 용이하게 정제할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, NF90 발현용 벡터는 MBP를 NF90 유전자의 업스트림쪽에 가지며, NF45 발현용 벡터는 GST를 NF45 유전자의 업스트림쪽에 갖는다.

본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 NF90 발현용 벡터는 도 1b에 기재된 유전자 지도를 가지는 벡터이다. 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 NF45 발현용 벡터는 도 1a에 기재된 유전자 지도를 가지는 벡터이다.

NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터를 포함하는 본 발명의 발현벡터 시스템은 하나의 대장균 세포에 공동형질전환(cotransformation)되어 대장균 세포의 여러 세대 동안 안정되게 유지되며, NF90 및 NF45를 발현하여 효율적으로 활성 NF90/NF45 복합체를 제조케 한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 다음의 단계를 포함하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법을 제공한다:

(a) 다음의 두 가지 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;

(i) 대장균에서 작동하는 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로(operatively) 연결된 NF90 유전자 및 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF90 발현용 벡터; 그리고, (ii) 대장균에서 작동하며 상기 (ii)의 복제원점과 다른 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 NF45 유전자 및 상기 (ii)의 항생제-내성 유전자와 다른 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF45 발현용 벡터;

(b) 상기 항생제-내성 유전자에 의해 저항성이 발생된 항생제를 상기 대장균에 처리하여 항생제-내성 특성을 나타내는 대장균을 선별하는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계.

본 발명의 방법은 상기 발현벡터 시스템을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

본 발명의 방법에 있어서 형질전환 단계는 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114 (1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 또는 *lacUV5* 프로모터를 포함하고, *lac I^q* 유전자를 추가적으로 포함하며, 상기 배양된 대장균에 IPTG를 처리하여 NF90 및 NF45 유전자의 발현을 유도하는 단계 (d)를 추가적으로 포함한다. *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 또는 *lacUV5* 프로모터에 의해 조절되는 발현은 *Lac I^q* 단백질에 의해 억제되며, IPTG에 의해 효과적으로 유도된다.

본 발명에 이용되는 벡터가 NF90 및 NF45의 정제를 용이하게 하기 위한 융합 파트너를 코딩하는 유전자를 포함하는 경우, 상기 융합 파트너에 대하여 친화성(affinity)을 나타내는 물질이 결합된 레진을 이용하여 대장균에서 발현된 NF90 및 NF45를 효과적으로 정제할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현에 따르면, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함한다:

- (a) 도 1b의 유전자 지도를 갖는 NF90 발현용 벡터 및 도 1a의 유전자 지도를 갖는 NF45 발현용 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;
- (b) 상기 암피실린 또는 클로람페니콜을 상기 대장균에 처리하여 항생제-내성 특성을 나타내는 대장균을 선별하는 단계;
- (c) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계;
- (d) 상기 배양된 대장균에 IPTG를 처리하여 NF90 및 NF45 유전자의 발현을 유도하는 단계;
- (e) 상기 대장균을 파쇄하는 단계; 및
- (f) 상기 대장균 파쇄물을 글루타티온-결합 레진 컬럼 또는 아밀로스-결합 레진 컬럼에 적용하여 활성 상태의 NF90/NF45 복합체를 수득하는 단계.

본 발명의 방법에 따르면, 활성 상태의 NF90/NF45 복합체를 높은 수율로 효과적으로 얻을 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

실험재료

글루타티온 S-트랜스퍼라아제(glutathione S-transferase: GST)-융합 발현 벡터(pGEX-4T-1) 및 글루타티온-세파로스 4B는 Pharmacia Biotech으로부터 구입하였다. 말토스-결합 단백질(maltose-binding protein: MBP)-융합 발현 벡터(pMAL-c2), 아밀로스, 제한효소 및 DNA-변형 효소들은 New England Biolabs로부터 구입하였다. HBV ϵ 부위의 DNA 단편(nt 1-68)을 pGEM2(Promega)의 T7 RNA 중합효소-특이 프로모터에 융합함으로써, 야생형을 포함하는 벡터를 구축하였다(40). RNA 합성, 표지화 및 정제는 Promega 사의 프로토콜 및 응용 안내(2판)에 기초하여 실시하였다. ^{32}P -방사능 뉴클레오타이드는 Amersham으로부터 구입하였고 다른 모든 시약은 Promega 또는 Sigma로부터 구입하였다.

PCR 및 벡터 구축

PCR 용 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 각각의 단백질의 cDNA 서열에 기초하여 제작하였다. NF45의 경우, 프라이머 40(+)(CGCGGATCCATGAGGGGTGACAGAGGCCGTGGT) 및 1221(-)(ACGCGTCGACTTAGGCTCCAGTCTTTCCCTTGGG)와 인간 간 cDNA 라이브러리 주형을 이용하여, 1.2 kb의 PCR 산물을 생성시켰다(PCR 조건: 94°C for 30 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 2 min, 30 사이클). NF45의 PCR 산물을 *Bam*HI 및 *Sal*I로 절단하였다. NF45 유전자를 포함하는 단편을 *Bam*HI-*Sal*I-선형화 pGEX-4T-1에 라이게이션하여 플라스미드 pGST-NF45를 얻었다. NF90의 경우, 총 RNA를 HepG2 세포로부터 분리하였다. 조류 근원세포 바이러스(avian myeloblastosis virus)의 역전사효소(Promega) 10 유닛을 이용하여 총 RNA 1 μg 을 역전사함으로써 제1쇄 cDNA를 얻었다(42°C for 30 min, 99°C for 5 min, 5°C for 5 min). 이 반응산물을 주형으로 이었고, 프라이머 265(+)(CCGGAATTCATGCGTCCAATGCGAATTTTGTG) 및 2280(-)(CGCGGATCCTCATGTAGCCTCCATGGTTGGCGC)를 이용하여 PCR 하여 2.0 kb의 산물을 얻었다(PCR 조건: 94°C for 30 sec, 60°C for 20 sec 및 68°C for 2 min 20 sec, 28 사이클). NF90의 PCR 산물을 *Eco*RI 및 *Bam*HI로 절단하였다. NF90 유전자를 포함하는 단편을 *Eco*RI-*Bam*HI-선형화 pMAL-c2에 라이게이션하였다. 이어, 벡터를 *Bgl*II 및 *Bam*HI로 절단한 다음 p15A-유래 *ori*를 갖는 pMBPc에 삽입하였다. *Hinc*II-*Eco*RV-선형화 pLysE를 *Msc*I-*Dra*I-선형화 pMAL-c2에 라이게

이전하여 구축된 *Bgl*II-*Bam*HI-선형화 pMBPc에 NF90 유전자를 포함하는 단편을 라이게이션하여 플라스미드 pMBP-NF90를 제조하였다. *E. coli*에서의 융합 단백질 발현을 위한 상기 박테리아 벡터는 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 유도의 조절 하에 있다.

웨스턴 블롯팅 분석

BSA 표준방법으로 그 양이 결정된 융합 단백질 약 1 μg을 5% 스테킹, 8% 분리 SDS-PAGE에서 분리한 다음, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막에 전이시켰다. 상기 막을 5% 비지방 건유로 블로킹한 다음, 제1항 항체와 1:2000 희석 비율로 25℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 제2차 항체(Sigma)와 1:8000 희석비로 25℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 최종적으로 ECL 시스템(Amersham)으로 가시화하였다.

*E. coli*에서 융합 단백질의 발현

플라스미드 pGST-NF45 또는 pMBP-NF90으로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)을 하룻밤 동안 배양하고, 이 배양물을 신선한 YT 배지(암피실린 100 μg/ml 또는 클로람페니콜 68 μg/ml 포함)에 1:100 희석비로 접종하였다. 세포를 29℃ O.D.₆₀₀ 1.0까지 성장시킨 다음, 최종 농도 0.5 mM까지 IPTG를 첨가하여 융합 컨스트럭트를 유도한 후, 격렬하게 셰이킹 하면서 29℃에서 5시간 동안 배양하였다. 유도된 세포를 2,500 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 수집하였다. 수집된 세포를 완충액 A (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20% 글라이세롤)의 원래 부피에 1/20 비율로 현탁한 다음, 5분 동안 음과파쇄를 실시하였다. 현탁액을 20,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음 상등액을 수거하였다.

융합 단백질의 정제

글루타티온 S-트랜스퍼라아제-표지된 NF45(GST-NF45)를 선택적으로 정제하기 위한 글루타티온-세파로스 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 완충액 A로 평형화된 글루타티온 세파로스 4B(Pharmacia) 50% 슬러리를 *E. coli* 분쇄물에 첨가한 다음, 4℃에서 1시간 30분 동안 부드럽게 교반하였다. 흡착된 융합 단백질을 갖는 매트릭스를 컬럼에 팩킹한 다음, 완충액 A의 100 베드 부피로 세척하였다. 컬럼을 20 mM 환원 글루타티온을 포함하는 완충액 B(100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20% 글라이세롤)로 용출하였다. 말토스-결합 단백질-표지된 NF90(MBP-NF90)을 선택적으로 정제하기 위한 아밀로스 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다(50). 세포 분쇄물을 아밀로스 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을 완충액 A로 세척하고 10 mM 말토스를 포함하는 완충액 A로 용출하였다.

공동발현 및 정제

MBP-NF90과 GST-NF45를 공동발현시키기 위하여, 플라스미드 pMBP-NF90를 *E. coli* 균주 BL21(DE3)에 CaCl₂ 방법으로 형질전환시킨 다음, 68 μg/ml 클로람페니콜을 함유하는 2 x YT 플레이트에서 클로람페니콜-내성 클론을 선별하였다. 이어, pMBP-NF90를 갖는 *E. coli* BL21(DE3)를 pGST-NF45로 CaCl₂ 방법으로 형질전환시켰다. 68 μg/ml 클로람페니콜과 100 μg/ml 암피실린을 함유하는 2 x YT 배지에서 암피실린과 클로람페니콜 모두에 내성을 나타내는 클론을 선별하였고, 이를 중균 배양에 이용하였다. 하룻밤 배양한 배양물을 68 μg/ml 클로람페니콜과 100 μg/ml 암피실린을 함유하는 2 x YT 배지에서 1:100 비율로 희석하였다. 세포를 O.D.₆₀₀ 1.0까지 성장시킨 다음, IPTG를 최종농도 0.5 mM까지 첨가하고 29℃에서 5시간 동안 셰이킹 하면서 배양하였다. 유도된 세포를 2,500 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 수집하였다. 수집된 세포를 완충액 A (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20% 글라이세롤)에 1/20 비율로 현탁한 다음, 5분 동안 음과파쇄를 실시하였다. 현탁액을 20,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음 상등액을 4℃에서 2시간 동안 글루타티온-세파로스 4B 비드와 혼합시켰다. 혼합물을 컬럼에 패킹하고 완충액 A의 10 베드 부피로 5회 세척하였다. 결합된 단백질을 20 mM 환원 글루타티온을 포함하는 완충액 B(100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20% 글라이세롤)로 용출하였다. 그리고 나서, 용출액을 아밀로스 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을 완충액 A로 세척한 후, 10 mM 말토스를 포함하는 완충액 A로 용출하였다.

RNA-단백질 상호작용의 UV 교호결합 분석

결합 완충액[10 mM Tris (pH 7.9), 5% 글라이세롤, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA]에서 과량의 tRNA(3 μg)의 존재 하에서 균일하게 레이블링된 RNA 4 ng과 *E. coli* 발현 단백질 2 μl를 반응시켰다(50). 실온에서 10분 동안 반응시킨 다음, 반응 혼합물을 96-웰 플레이트에 옮긴 다음, CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (Hofer)를 이용하여 약 10

cm의 UV 램프 이격거리로 20분 동안 UV 교호 결합시켰다. RNase A 및 RNase T1 (Sigma) 혼합물을 각각 최종 농도 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 및 0.5 U/ μl 가 되도록 첨가한 후, 각각의 반응 혼합물을 30°C에서 20분 동안 반응시켰다. 최종적으로, 단백질 시료 완충액[50 mM Tris (pH 6.8), 10% 글라이세롤, 2% SDS, 100 mM DTT, 0.01% 브로모페놀 블루]을 첨가하고, 복합체를 8% SDS-PAGE에서 분석하였다(40).

전기영동 이동성 전이(Electrophoretic mobility shift) 분석

RNA 결합 반응을 결합 완충액에서 4 ng의 [α - ^{32}P]UTP-표지된 HBV ϵ RNA ($2-3 \times 10^3$ cps)로 15 μl 부피에서 실시하였고, 이 때 *E. coli* 발현 단백질에서 RNA 결합 단백질에 대한 비특이적 경쟁자로서 tRNA (3 μg)을 이용하였다. 이어, 단백질을 최종적으로 첨가하였다. 실온에서 20분 동안 반응시킨 다음, 0.5 x TBE (pH 8.5) 내의 1 x Tris-보레이트-EDTA, TBE (pH 8.5)에서 중합된 5% 비변성 폴리아크릴아미드 젤(29:1의 아크릴아미드-비스아크릴아미드 중량비)에서 상기 반응 시료를 분석하였다. 전기영동을 150 V/16-18 mA에서 2시간 동안 실온에서 실시하였다. 그런 다음, 젤을 Whatman No. 3MM 페이퍼에 옮기고, 건조시킨 후, -70°C에서 인텐시파잉 스크린을 가지고 오토라디오그래피를 하였다. 경쟁 실험으로서, *E. coli* 발현 단백질을 비표지된 HBV ϵ RNA의 증가량 또는 과량의 폴리(I)-폴리(C)와 반응시켰다. 항체를 이용한 슈퍼전이(supershift) 분석을 위하여, 단백질 A(단백질 A-세파로스)에 대한 흡착성을 이용하여 항-NF45-항체를 토끼 면역혈청으로부터 정제하였다.

실험 결과

공동발현 시스템의 구축

RNA 결합 단백질, NF45와 NF90 헤테로다имер에 대한 정밀한 분석을 위하여, 각각의 유전자를 PCR 증폭하였다. 이어, NF45 및 NF90를 발현시키기 위하여 각각 pGEX 및 pMAL-c 발현 벡터를 이용하였다. 친환성 크로마토그래피로 정제된 NF45 및 NF90를 이용하여, 각각의 단백질의 RNA 결합 특성을 분석하였다. 실험 결과, MBP-NF 90은 RNA에 결합하였으나, GST-NF45는 결합하지 않았다. 사실 헤테로다имер 단백질들은 바이너리 단백질 복합체 상태에서만 활성을 나타내는 것이 일반적이다(51). 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 공동발현 시스템을 응용하여, 서로 다른 두 종류의 발현 벡터를 이용하여 *E. coli*에서 단백질을 공동발현시켰다. 두 종류의 서로 다른 발현 벡터는 다른 *ori*를 요구하는데, 이는 플라스미드의 분리(segregation)를 억제함으로써 세포에서 하나의 플라스미드가 손실되는 것을 막기 위한 것이며, 또한 상기 벡터 시스템은 서로 다른 항생물질에 대한 내성을 요구하는데, 이는 선별을 용이하게 하고 서로 다른 융합 시스템이 개별적으로 분리되고 동정될 수 있도록 하기 위한 것이다. 우선, 본 발명자들은 pBR322로부터 유래된 복제원점, 암피실린 내성 유전자 및 pGEX-4T-1 유래 GST 및 NF45 유전자를 갖는 tac-계열의 발현 플라스미드 pGST-NF45를 구축하였다(도 1a). 이어, 상기 구축된 플라스미드와 양립되는 tac-계열의 발현벡터 pMBP-NF90을 구축하였는데, 이는 p15A-유래 *ori*, pLysE로부터 유래된 클로람페니콜 내성 유전자, pMAL-c2 유래 MBP 및 NF90 유전자를 포함한다(도 1b).

GST-NF45 및 MBP-NF90의 공동발현 및 정제

단백질의 공동발현을 위하여, *E. coli* BL21(DE3) 세포를 pMBPc-NF90 컨스트럭트로 형질전환하고 클로람페니콜 내성 세포를 선별한 다음, pGST-NF45로 다시 형질전환하고 클로람페니콜 내성 세포를 선별하였다. 선별된 세포를 37°C에서 배양한 다음, IPTG로 유도하여 GST-NF45 및 MBP-NF90를 공동발현시켰다. 이어, 단백질의 안정성 및 용해성을 위하여 배양물을 29°C로 온도를 하강시켰다. 글루타티온 S-트랜스퍼라아제-표지 NF45(GST-NF45)의 정제를 위한 글루타티온-세파로스 컬럼 크로마토그래피, 그리고 말토스-결합 단백질-표지 NF90(MBP-NF90)의 정제를 위한 아밀로스 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그런 다음, 정제된 GST-표지 NF45 및 MBP-표지 NF90을 8% SDS-PAGE하고 쿠마시 브릴런트 블루로 염색하였다(도 2a). GST-NF45 및 MBP-NF90은 각각 66 kDa 및 126 kDa의 어퍼런트 분자량을 나타내었다(도 2a, 라인 1과 2). 공동발현 MBP-NF90 및 GST-NF45를 GST-표지 NF45 정제용 글루타티온-세파로스 컬럼에 적용시켰다. 그 결과, GST-NF45 뿐만 아니라 MBP-NF90도 용출되었다(도 2a, 라인 3). 또한, GST 용출된 단백질을 아밀로스 컬럼에 적용한 경우, MBP-NF90 뿐만 아니라 GST-NF45도 용출되었다(도 2a, 라인 4). 상기 결과를 항-NF45 항체(도 2b)와 항-NF90 항체(도 2c)를 이용하여 웨스턴 블롯팅 분석으로 재확인하였다. 또한, 100 kDa의 다른 단백질이 항-NF90 항체와 반응하였는데, 이 단백질은 MBP-NF90의 과쇄물 또는 불완전 산물로 판단된다. 공동발현된 MBP-NF90과 GST-NF45를 젤 여과 크로마토그래피에 적용한 경우, 상기 두 단백질은 동시에 용출되었다. 이 결과를 통하여, NF90과 NF45가 후-변형 없이 단백질-단백질 상호작용을 통하여 헤테로다имер를 형성한다는 것을 알 수 있다.

공동발현 GST-NF45와 MBP-NF90의 RNA 결합능 분석

HepG2 세포에서 정제된 공지의 헤테로다이머 NF90/NF43와 같이, *E. coli*에서 공동발현된 본 발명의 단백질이 HBV ϵ RNA에 결합하는 지 여부를 결정하기 위하여, UV-교호결합 분석 및 EMSA를 실시하였다(40). 이용된 프로브는 68-nt 인/5'트로 전사체(HE1-68)인데, 이는 HBV ϵ 스템-루프 구조를 갖는다. 각각의 단백질을 균일하게 표지된 HE1-68 RNA와 30°C에서 반응시켰고, 이 때 과량의 이스트 tRNA를 이용하여 비특이적 상호작용에 의한 백그라운드를 최소화하였다. 단백질-RNA 복합체를 UV-교호결합시키고 RNase 절단을 과도하게 한 다음, SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 그 결과, MBP-NF90(도 3a, 라인 4) 및 MBP-NF90/GST-NF45(도 3a, 라인 5)은 검출되었으나, 네가티브 대조군으로서의 GST(도 3a, 라인 1)와 MBP(도 3a, 라인 2), 그리고 GST-NF45(도 3a, 라인 3)은 검출되지 않았다. MBP-NF90은 SDS-PAGE 결과와 동일한 크기의 126 kDa 밴드를 나타내었다. MBP-NF90/GST-NF45은 두 개의 주요 밴드를 나타내었다. 빠르게 이동하는 밴드는 66 kDa의 추정 분자량을 나타내었는데, 이는 GST-NF45의 분자량에 해당된다. 느리게 이동하는 밴드는 MBP-NF90에 해당된다. 상기 결과와 일치되게, HE1-68로 프로빙된 EMSA는 GST-NF45(도 3b, 라인 3)는 프로브에 결합되지 않았으나, MBP-NF90(도 3b, 라인 4) 및 공동발현 MBP-NF90/GST-NF45(도 3a, 라인 5)는 결합하였다. 공동발현 MBP-NF90/GST-NF45 헤테로다이머는, MBP-NF90 보다 크게 전이(shift)된 밴드를 나타내었다. 전이된 모든 밴드들은 프로테아제 K 절단에 민감하였고, 이 결과는 상기 밴드들이 폴리펩타이드에 해당된다는 것을 확인시켜 준다.

상술한 데이터를 통하여, NF45의 HBV ϵ RNA에 대한 결합능에 헤테로다이머의 형성이 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다(추측컨대, 단백질 폴딩의 효과를 통하여). NF45의 HBV ϵ RNA 결합을 확인하기 위하여, 항-NF45 항체를 이용하여 슈퍼전이 분석을 실시하였다. 반응 후 항체를 첨가하였다. 도 3c에서 볼 수 있듯이, 항-NF45 항체를 첨가한 경우, MBP-NF90/GST-NF45 헤테로다이머 밴드 뿐만 아니라 슈퍼전이 밴드도 나타났다. 이 밴드는 헤테로다이머와 항체의 복합체이다. 이러한 데이터를 기초로 하여, 본 발명자들은 GST-NF45가 MBP-NF90/GST-NF45를 형성할 때 HBV ϵ RNA에 결합한다는 결론을 얻었다.

공동발현 MBP-NF90 및 GST-NF45의 RNA 결합 특이성

NF90은 dsRNA 및 고도로 구조화된 ssRNAs에 결합할 수 있다고 알려져 있다(24, 25). 최근에, NF45는 고도로 구조화된 ssRNA에 결합할 수 있다고 보고되었다(40). 그러나, RNA와 상기 단백질의 상호작용에 있어서 특이성은 연구가 거의 없다. *E. coli* 발현 RNA 결합 단백질의 특이성을 결정하기 위하여, 각각의 단백질을 표지된 HBV ϵ RNA와 반응시켰고 또한 비표지된 HBV ϵ RNA 또는 비표지된 dsRNA, poly(I)-poly(C)의 증가량과 반응시켰다. 실험 결과, MBP-NF90(도 4, 라인 2-5) 및 MBP-NF90/GST-NF45 헤테로다이머(도 4, 라인 6-9)는 유사한 패턴을 나타내었다. 비표지된 HBV ϵ RNA의 양을 증가시키면, 표지된 RNA-단백질 복합체의 양이 감소하였다. 또한, 비표지된 dsRNA, poly(I)-poly(C)의 20배 물량을 반응 전에 첨가한 경우, 전이밴드가 없어졌다. 이러한 결과를 통하여, *E. coli* 발현 NF90 및 NF45는 고도로 구조화된 HBV ϵ RNA에 선호적으로 결합하며 이러한 결합은 dsRNA에 의해 경쟁된다는 것을 알 수 있다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia coli*)에서 제조하기 위한 두 가지 발현벡터를 포함하는 발현벡터 시스템을 제공한다. 또한, 본 발명은 NF90/NF45 복합체를 활성화 형태로 대장균에서 제조하기 위한 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터가 하나의 대장균 세포에 공동형질전환 되어 대장균 세포의 여러 세대 동안 안정되게 유지되며, NF90 및 NF45를 발현하여 효율적으로 활성 NF90/NF45 복합체를 제조케 한다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참조문헌

1. A. Rao, NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes, Immunol. Today 15 (1994) 274-281.
2. G. R. Crabtree, N. A. Clipstone, Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes, Annu. Rev. Biochem. 63 (1994) 1045-1083.
3. J. Jain, C. Loh, A. Rao, Transcriptional regulation of the IL-2 gene, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995) 333-342.

4. C. Luo, E. Burgeon, A. Rao, Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 141-147.
5. S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, The mechanism of action of cyclosporin A and FK506, *Immunol. Today* 13 (1992) 136-142.
6. E. Serfling, A. Avois, M. Neumann, The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1263 (1995) 181-200.
7. G. R. Crabtree, Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation, *Science* 243 (1989) 355-361.
8. J. P. Shaw, P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, G. R. Crabtree, Identification of a putative regulator of early T cell activation genes, *Science* 241 (1988) 202-205.
9. P. N. Cockerill, F. Shannon, A. G. Bert, G. R. Ryan, M. A. Vadas, The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin 3 locus is regulated by an inducible cyclosporin A-sensitive enhancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2466-2470.
10. E. S. Masuda, H. Tokumitsu, A. Tsuboi, J. Shlomai, P. Hung, K. I. Arai, N. Arai, The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter cis-acting element CLE0 mediates induction signals in T cells and is recognized by factors related to AP1 and NFAT, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 7399-7407.
11. S. Chuvpilo, C. Schomberg, R. Gerwig, A. Heinfli, R. Reeves, F. Grummt, E. Serfling, Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter, *Nucl. Acids Res.* 21 (1993) 5694-5704.
12. S. J. Szabo, J. S. Gold, T. L. Murphy, K. M. Murphy, Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 4793-4805.
13. J. W. Rooney, M. R. Hodge, P. G. McCaffrey, A. Rao, L. H. Glimcher, A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression, *EMBO J.* 13 (1994) 625-633.
14. H. J. Lee, E. S. Masuda, N. Arai, K. Arai, T. Yokota, Definition of cis-regulatory elements of the mouse interleukin-5 gene promoter. Involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17541-17550.
15. A. E. Goldfield, P. G. McCaffrey, J. L. Strominger, A. Rao, Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 1365-1379.
16. S. Ho, D. J. Thomas, L. A. Timmerman, X. Li, U. Franke, G. R. Crabtree, NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19898-19907.
17. T. Hoey, Y. L. Sun, K. Williamson, X. Xu, Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins, *Immunity* 2 (1995) 461-472.
18. C. Luo, E. Burgeon, J. A. Carew, P. G. McCaffrey, T. M. Badalian, W. S. Lane, P. G. Hogan, A. Rao, Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 3955-3966.

19. E. S. Masuda, Y. Naito, H. Tokumitsu, D. Campbell, F. Saito, C. Hannum, K. I. Arai, N. Arai, NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 2697-2706.
20. P. G. McCaffrey, C. Luo, T. K. Kerppola, S. Jain, T. M. Badalian, A. H. Ho, E. B. Burgeon, W. S. Lane, J. N. Lambert, T. Curran, G. L. Verdine, A. Rao, P. G. Hogan, Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp, *Science* 262 (1993) 750-754.
21. J. P. Northrop, S. N. Ho, L. Chen, D. J. Thomas, L. A. Timmerman, G. P. Nolan, A. Admon, G. R. Crabtree, NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation, *Nature* 369 (1994) 497-502.
22. B. Corthesy, P. N. Kao, Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20682-20690.
23. P. N. Kao, L. Chen, G. Brock, J. Ng, J. Kenny, A. J. Smith, B. Corthesy, Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20691-20699.
24. H. J. Liao, R. Kobayashi, M. B. Mathews, Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 8514-8519.
25. J. O. Langland, P. N. Kao, B. L. Jacobs, Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, *Biochemistry* 38 (1999) 6361-6368.
26. L. R. Saunders, D. J. Perkins, S. Balachandran, R. Michaels, R. Ford, A. Mayeda, G. N. Barber, Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32300-32312.
27. F. W. Buaas, K. Lee, S. Edelhoff, C. Disteché, R. E. Braun, Cloning and characterization of the mouse interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) homolog in a screen for RNA binding proteins, *Mamm. Genome* 10 (1999) 451-456.
28. R. C. Patel, D. J. Vestal, Z. Xu, S. Bandyopadhyay, W. Guo, S. M. Erme, B. R. Williams, G. C. Sen, DRBP76, a double-stranded RNA-binding nuclear protein, is phosphorylated by the interferon-induced protein kinase, PKR, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20432-20437.
29. Y. H. Xu, G. A. Grabowski, Molecular cloning and characterization of a translational inhibitory protein that binds to coding sequences of human acid beta-glucosidase and other mRNAs, *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 441-454.
30. N. Matsumoto-Taniura, F. Pirollet, R. Monroe, L. Gerace, J. M. Westendorf, Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning, *Mol. Biol. Cell.* 7 (1996) 1455-1469.
31. L. M. Parker, I. Fierro-Monti, T. W. Reichman, S. Gunnery, M. B. Mathews, Double-stranded RNA-binding proteins and the control of protein synthesis and cell growth, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66 (2001) 485-497.
32. L. M. Parker, I. Fierro-Monti, M. B. Mathews, Nuclear factor 90 is a substrate and regulator of the eukaryotic initiation factor 2 kinase double-stranded RNA-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32522-32530.

33. C. J. Coolidge, J. G. Patton, A new double-stranded RNA-binding protein that interacts with PKR, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 1407-1417.
34. N. S. Ting, P. N. Kao, D. W. Chan, L. G. Lintott, S. P. Lees-Miller, DNA-dependent protein kinase interacts with antigen receptor response element binding proteins NF90 and NF45, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2136-2145.
35. L. F. Fung, A. K. Lo, P. W. Yuen, Y. Liu, X. H. Wang, S. W. Tsao, Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells, *Life Sci.* 67 (2000) 923-936.
36. T. W. Reichman, L. C. Muniz, M. B. Mathews, The RNA binding protein nuclear factor 90 functions as both a positive and negative regulator of gene expression in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 343-356.
37. I. Kranoselskaya-Riz, A. Spruill, Y. W. Chen, D. Schuster, T. Teslovich, C. Baker, Nuclear factor 90 mediates activation of the cellular antiviral expression cascade, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18 (2002) 591-604.
38. J. Shim, H. Lim, J. R. Yates, M. Karin, Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization, *Mol. Cell.* 10 (2002) 1331-1344.
39. T. W. Reichman, A. M. Parrott, I. Fierro-Monti, D. J. Caron, P. N. Kao, C. G. Lee, H. Li, M. B. Mathews, Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the NF90 family of double-stranded RNA-binding proteins, *J. Mol. Biol.* 332 (2003) 85-98.
40. H. J. Shin, S. S. Kim, Y. H. Cho, S. G. Lee, H. M. Rho, Host cell proteins binding to the encapsidation signal epsilon in hepatitis B virus RNA, *Arch. Virol.* 147 (2002) 471-491.
41. D. O. Morgan, Principles of CDK regulation, *Nature* 374 (1995) 131-134.
42. P. E. Shaws, Ternary complex formation over the c-fos serum response element: p62TCF exhibits dual component specificity with contacts to DNA and an extended structure in the DNA-binding domain of p67SRF, *EMBO J.* 11 (1992) 3011-3019.
43. R. Treisman, G. Ammerer, The SRF and MCM1 transcription factors, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2 (1992) 221-226.
44. T. Hsu, M. J. Betenbaugh, Coexpression of molecular chaperone BiP improves immunoglobulin solubility and IgG secretion from *Trichoplusia ni* insect cells, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 96-104.
45. L. Chen, J. T. M. Buters, J. P. Hardwick, S. Tamura, B. W. Penman, F. J. Gonzalez, C. L. Crespi, Coexpression of cytochrome P4502A6 and human NADPH-P450 oxidoreductase in the baculovirus system, *Drug Metab. Dispos.* 25 (1997) 399-405.
46. T. French, P. Roy, Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV, *J. Virol.* 64 (1990) 1530-1536.
47. C. Li, J. W. R. Schwabe, E. Banayo, R. M. Evans, Coexpression of nuclear receptor partners increases their solubility and biological activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 2278-2283.
48. W. B. R. Pollock, F. I. Rosell, M. B. Twitchett, M. E. Dumont, A. G. Mauk, Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome c. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome c and the alkaline conformational transition, *Biochemistry* 37 (1998) 6124-6131.
49. M. Munson, P. F. Predki, L. Regan, ColE1-compatible vectors for high-level expression of cloned DNAs from the T7 promoter, *Gene* 144 (1994) 59-62.

50. S. S. Kim, H. J. Shin, Y. H. Cho, H. M. Rho, Expression of stable hepatitis B viral polymerase associated with GRP94 in *E. coli*, *Arch. Virol.* 145 (2000) 1305-1320.

51. K. Johnston, A. Clements, R. N. Venkataramani, R. C. Trievel, R. Marmorstein, Coexpression of proteins in bacteria using T7-based expression plasmids: expression of heteromeric cell-cycle and transcriptional regulatory complexes, *Protein Expr. Purif.* 20 (2000) 435-43.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 다음의 두 가지 발현벡터를 포함하는 발현벡터 시스템:

- (a) 대장균에서 작동하는 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로(operatively) 연결된 NF90 유전자 및 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF90 발현용 벡터; 그리고,
- (b) 대장균에서 작동하며 상기 (a)의 복제원점과 다른 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 NF45 유전자 및 상기 (a)의 항생제-내성 유전자와 다른 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF45 발현용 벡터.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 대장균에서 작동하는 복제원점은 pBR322-유래 ori, p15A-유래 ori, pMB1-유래 ori, ColE1-유래 ori, Rldrd19-유래 ori, CloDF13-유래 ori 및 M13-유래 ori로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터 시스템.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 대장균에서 작동하는 프로모터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 발현벡터 시스템.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 항생제-내성 유전자는 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 또는 테트라사이클린에 대하여 저항성을 부여하는 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터 시스템.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 또는 *lacUV5* 프로모터를 포함하고, *lac I^q* 유전자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터 시스템.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 NF90 발현용 벡터는 도 1b에 기재된 유전자 지도를 가지는 것을 특징으로 하는 발현벡터 시스템.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 상기 NF45 발현용 벡터는 도 1a에 기재된 유전자 지도를 가지는 것을 특징으로 하는 발현벡터 시스템.

청구항 8.

NF(nuclear factor)90/NF(nuclear factor)45 복합체를 활성화 형태로 대장균(*Escherichia. coli*)에서 제조하기 위한 다음의 단계를 포함하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법:

(a) 다음의 두 가지 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;

(i) 대장균에서 작동하는 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로(operatively) 연결된 NF90 유전자 및 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF90 발현용 벡터; 그리고, (ii) 대장균에서 작동하며 상기 (ii)의 복제원점과 다른 복제원점, 대장균에서 작동하는 프로모터, 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 NF45 유전자 및 상기 (ii)의 항생제-내성 유전자와 다른 항생제-내성 유전자를 포함하는 NF45 발현용 벡터;

(b) 상기 항생제-내성 유전자에 의해 저항성이 발생된 항생제를 상기 대장균에 처리하여 항생제-내성 특성을 나타내는 대장균을 선별하는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 대장균을 배양하는 단계.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 대장균에서 작동하는 복제원점은 pBR322-유래 ori, p15A-유래 ori, pMB1-유래 ori, ColE1-유래 ori, R1drd19-유래 ori, CloDF13-유래 ori 및 M13-유래 ori로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

청구항 10.

제 8 항에 있어서, 상기 대장균에서 작동하는 프로모터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

청구항 11.

제 8 항에 있어서, 상기 항생제-내성 유전자는 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신 또는 테트라사이클린에 대하여 저항성을 부여하는 유전자인 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

청구항 12.

제 8 항에 있어서, 상기 NF90 발현용 벡터 및 NF45 발현용 벡터는 *tac* 프로모터, *lac* 프로모터 또는 *lacUV5* 프로모터를 포함하고, *lac I^q* 유전자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

청구항 13.

제 8 항에 있어서, 상기 NF90 발현용 벡터는 도 1b에 기재된 유전자 지도를 가지는 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

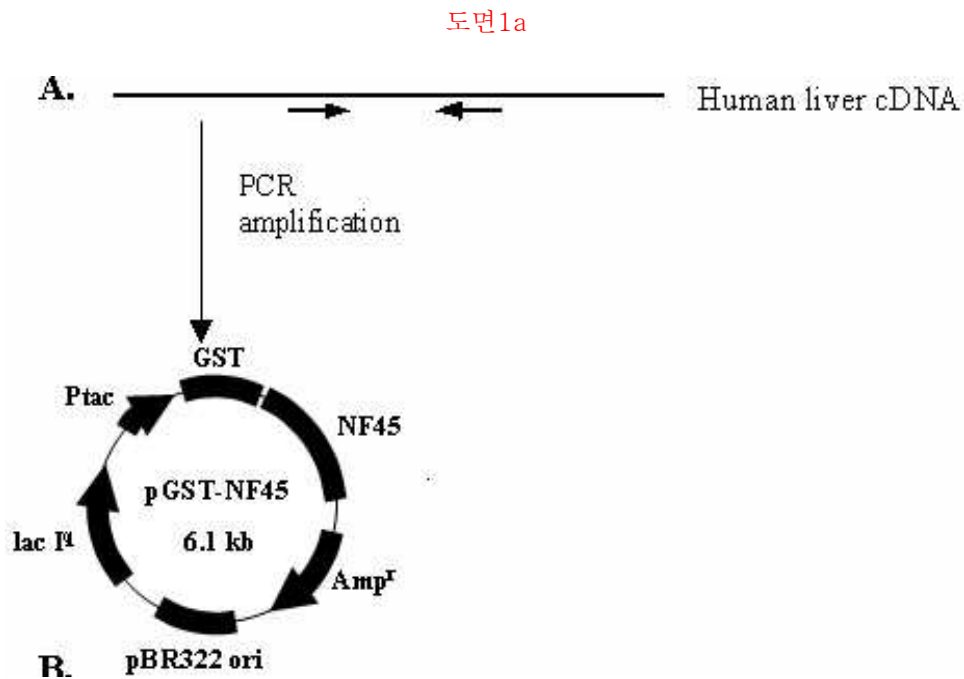
청구항 14.

제 8 항에 있어서, 상기 NF45 발현용 벡터는 도 1a에 기재된 유전자 지도를 가지는 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

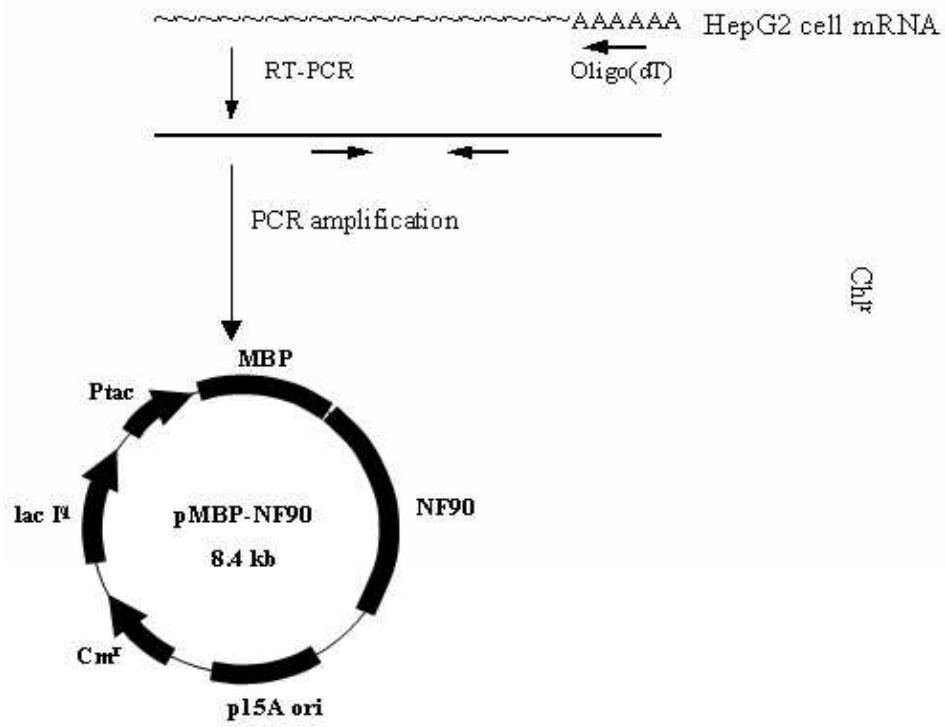
청구항 15.

제 12 항에 있어서, 상기 방법은 상기 배양된 대장균에 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 처리하여 NF90 및 NF45의 발현을 유도하는 단계 (d)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 활성 NF90/NF45 복합체의 제조방법.

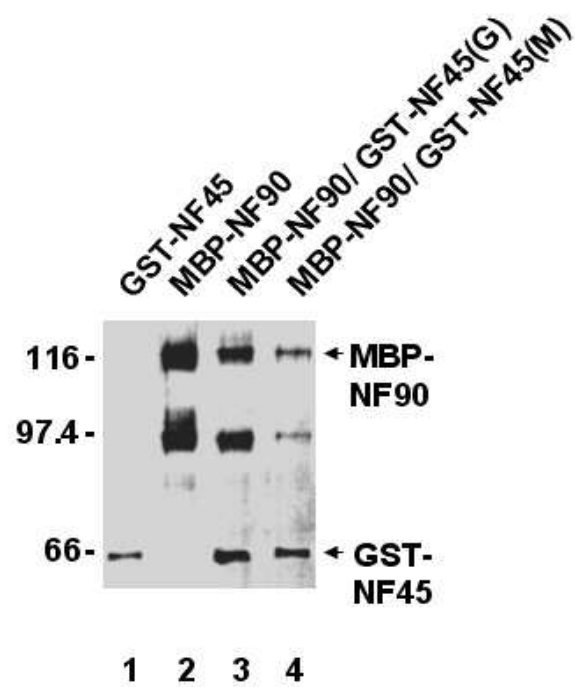
도면



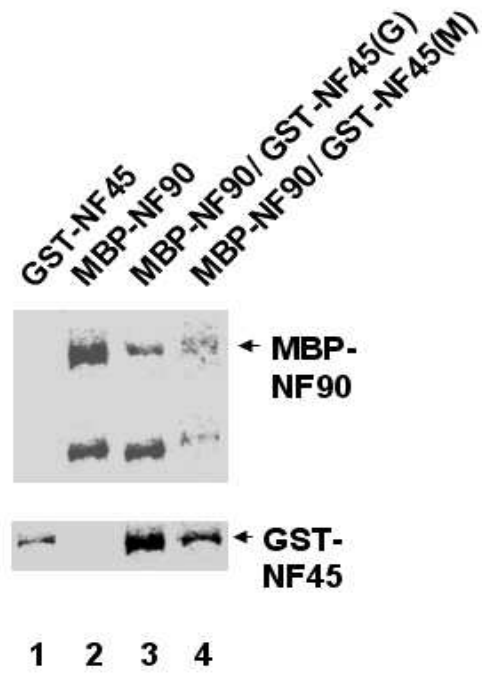
도면1b



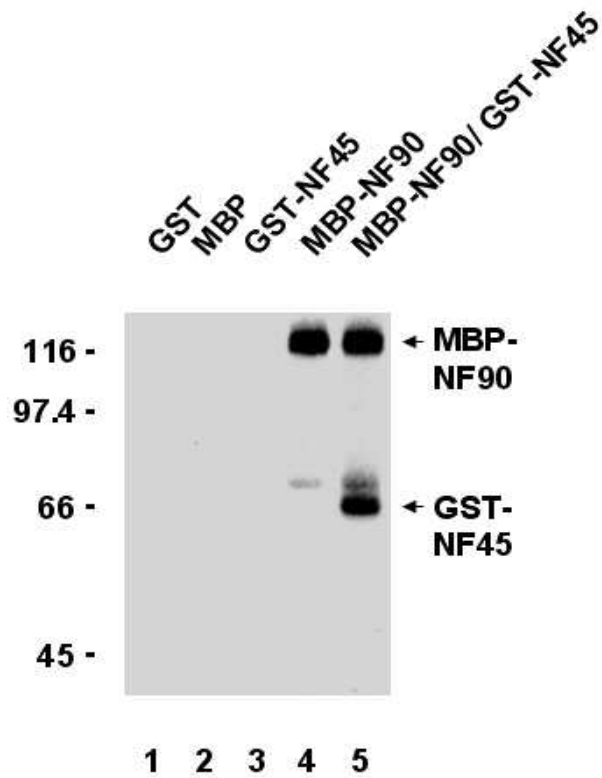
도면2a



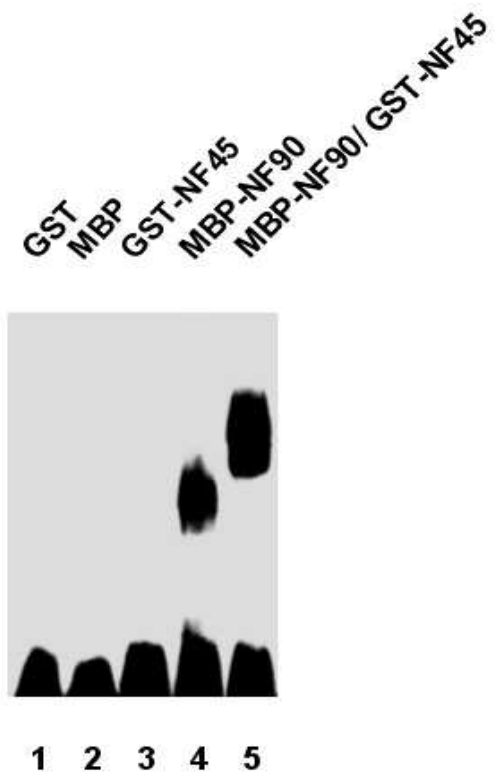
도면2b



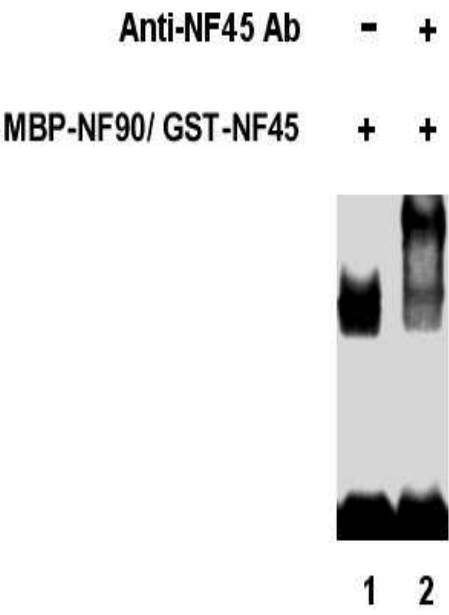
도면3a



도면3b



도면3c



도면4

